



Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN
"BIOCHIMICA, BIOLOGIA MOLECOLARE E
BIOTECNOLOGIE"

CICLO XXI

**ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE
DI SEQUENZE GENICHE PER L'ASSORBIMENTO
E L'ACCUMULO DI METALLI IN POMODORO**

Settore Scientifico Disciplinare BIO/11

Anni 2006/2008



Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN
"BIOCHIMICA, BIOLOGIA MOLECOLARE E
BIOTECNOLOGIE"

CICLO XXI

COORDINATORE Prof. Francesco Bernardi

**ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE
DI SEQUENZE GENICHE PER L'ASSORBIMENTO
E L'ACCUMULO DI METALLI IN POMODORO**

Settore Scientifico Disciplinare BIO/11

Dottorando

Dott. Trombetta Ciro

Tutore

Prof. Gambari Roberto

Co-Tutore

Prof. Filippone Edgardo

Anni 2006/2008

Alla mia famiglia, che ha sempre sostenuto in questi anni ogni mio sogno.

Agli amici, tutti, vicini, Pasquale, Cristiano, Alessandra, Luciana, Vincenzo e lontani ANDREA!!, il cui apporto è stato minimo in termini di lavoro, ma impagabile per tutto il resto! Grazie ragazzi!!!

Ai componenti del gruppo (Filippone, Lino, Silvia, Francesea, Mareo, Pasquale Antonio e tutti (l'elenco sarebbe troppo lungo!!!) che hanno alleviato il peso delle giornate di lavoro con il sorriso e l'umiltà.

A chi amo.

SOMMARIO.....	10
ABSTRACT	12
1 INTRODUZIONE	14
1.1 IL POMODORO: CARATTERI BOTANICI	14
1.2 PROPRIETÀ NUTRIZIONALI E SALUTISTICHE DEL POMODORO	15
1.3 MIGLIORAMENTO GENETICO DEL POMODORO: DALLA DOMESTICAZIONE AL “MOLECULAR BREEDING”	17
1.4 STRUMENTI DI GENOMICA STRUTTURALE E FUNZIONALE IN POMODORO	19
1.6 I METALLI PESANTI	22
1.7 MECCANISMO DI ACCUMULO DEI METALLI PESANTI NELLE PIANTE	23
1.8 MECCANISMI DI METALLO-TOLLERANZA	25
1.9 PROTEINE IMPLICATE NEL TRASPORTO DEI METALLI NELLE PIANTE	27
SCOPO DELLA TESI.....	30
2 MATERIALI E METODI	31
2.1 CLONAGGIO DI SEQUENZE DI GENI PER IL TRASPORTO DI METALLI IN POMODORO	31
2.1.1 MATERIALE VEGETALE	31
2.1.2 ESTRAZIONE DEL DNA GENOMICO	31
2.1.3 CORSA ELETTROFORETICA E QUANTIZZAZIONE DEL DNA ESTRATTO	32
2.1.4 DISEGNO DEI PRIMER	33
2.1.5 ANALISI DI AMPLIFICAZIONE DI DNA GENOMICO MEDIANTE PCR (POLIMERASE CHAIN REACTION)	34
2.1.6 PURIFICAZIONE DEL DNA DOPO REAZIONI DI PCR	35
2.1.7 CLONAGGIO DELLE SEQUENZE ISOLATE IN PLASMIDI	35
2.1.8 SEQUENZIAMENTO DEGLI AMPLICONI	38
2.2.1 ALLEVAMENTO DELLE PIANTE IN IDROPONICA	38
2.2.2 ANALISI DEL FENOTIPO E IONICA	40
2.2.3 ANALISI STATISTICA	40
3 RISULTATI.....	41
3.1.1 DISEGNO DEI PRIMER	41
3.1.2 AMPLIFICAZIONE DI DNA ED INSERIMENTO DEGLI AMPLICONI IN VETTORI DI CLONAGGIO.	41
3.1.3 SEQUENZIAMENTO DEGLI AMPLICONI	43
3.1.4 PCR “IN SILICO”	43
3.1.5 DISEGNO PRIMER SU SEQUENZE EST DI POMODORO	44
3.1.6 SEQUENZIAMENTO DEGLI AMPLICONI	44
3.2 STUDIO FISILOGICO SULL’ASSORBIMENTO LA TRASLOCAZIONE	

L'ACCUMULO DI METALLI PESANTI IN POMODORO.	46
3.2.1 ANALISI FENOLOGICA	46
3.2.2 ANALISI IONICA	46
4 DISCUSSIONI.....	48
4.1 L'ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE DI GENI COINVOLTI NELL'ASSORBIMENTO E NELLA TRASLOCAZIONE DI METALLI UTILI E NON IN POMODORO	48
4.2 STUDIO FISIOLOGICO SULL'ASSORBIMENTO LA TRASLOCAZIONE L'ACCUMULO DI METALLI PESANTI IN POMODORO.	53
5 CONCLUSIONI.....	56
6 FIGURE	57
7 BIBLIOGRAFIA.....	93

SOMMARIO

Una delle metodologie per il miglioramento genetico delle piante coltivate è l'incrocio tra varietà coltivate e specie selvatiche. Ciò comporta l'introggressione nella specie coltivata oltre di caratteri richiesti dal mercato alimentare anche di caratteri non desiderabili, tra cui l'assorbimento, la traslocazione e l'accumulo di metalli come il piombo ed il cadmio. Tale rischio deriva anche da una bassa specificità dei trasportatori di membrana deputati all'assorbimento di tali metalli, come il cadmio e lo zinco che possono essere traslocati all'interno delle radici dalla stessa proteina.

Nell'ambito del progetto "GenoPom", finanziato dal MIUR, il nostro obiettivo finale è quello di ottenere una mappa ionomica del pomodoro, ottenuta da analisi sull'omeostasi ionica e sull'espressione genica.

Il materiale vegetale utilizzato proviene da tre diverse specie: la cv M82 di *Solanum lycopersicum*, il parentale selvatico *Solanum pennelli*.

Riguardo gli esperimenti sull'omeostasi ionica, piante di *S. lycopersicum* M82 sono state coltivate in idroponica in condizioni controllate in presenza di concentrazioni non letali di Cd (5-10-20 μM), Pb (1,5-3-6 μM), Zn (50-100-200 μM) date separatamente.

Le analisi ioniche di *Solanum lycopersicum* M82 mostrano che le caratteristiche correlate all'omeostasi ionica sono significativamente modificate in risposta a tutti i metalli e al genotipo. Le analisi dei dati sugli ioni, ottenuti con ICP-MS, mostrano differenti risposte in caso di stress singolo o multiplo.

Per quanto riguarda l'approccio di genomica funzionale, studi bibliografici preliminari hanno permesso di individuare 25 geni maggiormente coinvolti nell'omeostasi dei metalli in pianta; di questi, 5 geni *ysl*, *hma*, *mtp*, *znt*, *zrt*, risultavano essere presenti in almeno due specie differenti, generalmente *Arabidopsis thaliana*, *Arabidopsis halleri* o *Thlaspi caerulescens* ma nessuno ancora clonato nel genere *Solanum*.

Analisi bioinformatiche hanno permesso di individuare diverse sequenze EST di pomodoro che, assemblate in UniGene rappresentano cluster che teoricamente corrispondono ad un singolo gene, risultano altamente omologhe a quelle da noi ricercate per i 3 geni *ysl*, *znt* e *mtp*.

Al fine di verificarne l'effettiva presenza, abbiamo disegnato coppie di primer su ciascun UniGene individuato, e in seguito clonato e sequenziato i frammenti ottenuti.

La sequenza nucleotidica di YSL1 da noi ottenuta è stata confrontata con tutte le sequenze nucleotidiche presenti nella banca dati ed è stata riscontrata un'identità del 92% con la sequenza codificante completa del gene YSL1 di tabacco (*Nicotiana tabacum*). La putativa sequenza nucleotidica codificante è stata tradotta in silico e confrontata con le sequenze amminoacidiche presenti in banca dati: l'identità risultante è stata del 89% con la sequenza amminoacidica della proteina YSL di tabacco (*Nicotiana tabacum*).

La sequenza nucleotidica di ZNT1 da noi clonata risulta avere invece un'omologia del 96% con la sequenza codificante completa del gene ZNT1 di *Chengiopanax sciadophylloides* mentre la risultante sequenza amminoacidica possiede un'omologia del 79% con la sequenza proteica sempre di *Chengiopanax sciadophylloides*.

ABSTRACT

Tomato breeders are using wild tomato relatives, even non-cross compatible ones, in order to obtain cultivars with highly commercial values bearing new traits. However, the introgression of a wild genome into the cultivated one produces a new gene combination that may lead to the expression of undeliverable traits, perhaps not so easy to recognise; even more, phenotypic variations may escape during the selection procedure when minor genes or non-abnormal phenotypes are involved. In the frame of the "GenoPom" project funded by MIUR, we have focused our interest on the alteration of heavy metals uptake from the soil and their loading into edible organs in commercial lines coming from *Solanum* interspecific crosses. Our final aim is to put together data coming from ion homeostasis and gene expression analyses, thus obtaining a ionic map of tomato. To pursue our goal, we have started to study the cv M82 of *Solanum lycopersicon* and the wild relative *Solanum pennelli*. Regarding the experiments on ion homeostasis, *S. lycopersicon* M82 were grown in hydroponics under controlled environmental conditions. Twenty day-old plants were left to grow for 10 days in the presence of non-toxic concentration of Cd (5-10-20 μ M), Pb (1,5-3-6 μ M), Zn (50-100-200 μ M) given separately. Control and treated roots and leaves were then harvested and stored at -80°C for ionic and gene expression analyses. Ions analysis of *Solanum lycopersicon* M82 showed that traits correlated to ionic homeostasis is significantly modified in response to all metals. The analysis of ions data, obtained by ICP-MS, give a picture of the different responses performed both to different stress and to combined stress, probably correlated to the up-regulation and/or down regulation of metal uptake proteins.

Regarding the functional genomics approach for gaining insight into gene networks involved in mineral-ion accumulation in tomato plants, in literature has been reported that at least 25 major family genes are involved for metal homeostasis in plants. Among them, the genes *ysl*, *hma*, *mtp*, *znt*, *zrt* have been already studied at least in the plant species *Arabidopsis thaliana*, *A. halleri* and *Thlaspi caerulescens*. So far, no such genes have been reported to be cloned in *Solanum* species.

We have focused our study on the genes YSL1, ZNT1 and MTP1 responsible for uptake, translocation and accumulation of metal such as zinc, cadmium, and iron into plant compartment.

For all of them, consensus sequences from nucleotide multialignment have been obtained. Then, each of those were blasted in a *Solanum* EST collection databank and an assembled UniGene sequence was obtained.. Finally, we have designed primers and performed PCR analysis on *S. lycopersicon* and *S. pennelli* genomic DNA. So far, we have cloned a putative *ys1* sequence from tomato, that has shown that a very high percentage of identity (92%) with whole *ys1* gene of *Nicotiana tabacum*; the *in silico* translated sequence of this sequence has shown a 89% of identity with the same tobacco protein. We have also cloned a putative *znt1* sequence from tomato, that has shown that a very high percentage of identity (97%) with whole *znt1* gene of *Chengiopanax sciadophylloides*; the *in silico* translated sequence of this sequence has shown a 89% of identity with the same *Chengiopanax sciadophylloides* protein.

1 INTRODUZIONE

1.1 IL POMODORO: CARATTERI BOTANICI

Il pomodoro (*Solanum lycopersicum* L.) appartenente alla famiglia delle Solanaceae è una pianta annuale a radice fittonante, fusto sarmentoso, abbondantemente ramificato e pubescente. Presenta foglie alterne, composte, pennate, con foglioline disuguali, pelose, che emanano un aroma caratteristico. I fiori gialli sono riuniti in grappoli radi; il frutto è formato da una bacca di forma variabile (globosa, allungata, tondeggiante, depressa) spesso solcata, di colore generalmente rosso, a buccia sottile e liscia, contenente numerosi semi piccoli, ruvidi, bianco-gialli ed oleaginosi.

Attualmente si ritiene che, oltre al pomodoro coltivato *S. lycopersicum*, e la sua primitiva forma varietale cerasiforme, appartengano alla sottofamiglia delle *Solanoidae* altre otto specie selvatiche. Tutte le specie sono caratterizzate dalla stessa formula genomica $2n=2x=24$ e tutte provengono dall'America del sud, dove occupano una grande varietà di ambienti: dalle aree costiere ad elevata salinità (*S. cheesmanii*), alle aree aride (*S. pennellii* e *S. chilense*), alle zone umide, e persino ad altitudini superiori ai 3000 metri (alcune accessioni di *S. hirsutum* e *S. chilense*) (Taylor, 1986)

Oggi il pomodoro è diffuso in tutto il mondo sia per il consumo diretto sia per la trasformazione industriale, e comprende una grande quantità di varietà ed ecotipi coltivati nei diversi areali.

Il pomodoro riveste un ruolo importante nell'economia agricola mondiale, occupando una superficie di circa di 4 milioni di ettari. Al primo posto nella produzione mondiale ci sono gli Stati Uniti con le 12.226.810 tonnellate prodotte, su una superficie di 176.730 ettari; l'Italia riveste un ruolo importante nel contesto mondiale con una produzione di 6.054.689 tonnellate (circa il 6% della produzione mondiale) su una superficie di 122.852 ha (3% della superficie mondiale) (FAOSTAT 2002).

1.2 PROPRIETÀ NUTRIZIONALI E SALUTISTICHE DEL POMODORO

Il pomodoro fresco è caratterizzato da un modestissimo apporto energetico, essendo ricco di acqua (fino al 94%) e contenendo circa il 3% di glucidi disponibili, rappresentati esclusivamente da zuccheri solubili (glucosio, fruttosio, tracce di saccarosio e rafinosio). Gli zuccheri non disponibili all'assorbimento sono le pectine, che influenzano la consistenza del frutto, la cellulosa e le emicellulose. Le proteine sono presenti in piccola concentrazione (circa l'1%) ed i lipidi in quantità decisamente trascurabili.

Nella componente acquosa del pomodoro sono disciolti decine di sali minerali e di oligoelementi; tra i primi prevale il potassio (297mg/100g), che aiuta l'organismo a ritrovare l'equilibrio idrico e quindi a combattere la ritenzione dei liquidi e l'ipertensione; sono ben rappresentati anche il calcio (9mg/100g), fondamentale per la salute di ossa e denti, ed il fosforo (25mg/100g), che è una componente essenziale di molti processi enzimatici e riveste un ruolo fondamentale nella contrazione muscolare.

Tra gli oligoelementi i più presenti sono il ferro (0,3mg/100g), lo zinco (0,11mg/100g) ed il selenio (2,3 µg/100g) che favoriscono la riparazione delle cellule e, per questo, aiutano a combattere i segni dell'invecchiamento cutaneo.

Il pomodoro rappresenta un vero e proprio elisir di salute anche per la presenza di fibre e di acidi organici. Le fibre (2%) sono soprattutto cellulosa ed emicellulosa, e sono concentrate nella buccia e nei semi; nella polpa, invece, si ritrovano gli acidi organici (soprattutto citrico e malico), che possono esercitare un'azione alcalinizzante, essenziale per neutralizzare i composti acidi che si formano nel nostro organismo; infatti, a dispetto del suo sapore acido, quest'ortaggio ha un buon equilibrio acido-basico, e per questo favorisce l'alcalinizzazione dell'organismo. Inoltre, grazie al suo sapore acidulo, il pomodoro stimola le secrezioni dell'apparato digerente e prepara la buona assimilazione del cibo.

Per completare il profilo nutrizionale della bacca, ricordiamo le vitamine; il pomodoro apporta tutte le vitamine idrosolubili ed è un'ottima fonte di vitamina C tanto che il consumo di un pomodoro di medie dimensioni riesce a coprire il 40% del fabbisogno di vitamina C di un adulto. In termini di contenuto vitaminico, non

bisogna dimenticare le vitamine del gruppo B che sono tutte presenti nel pomodoro anche se in quantità diverse e che tendono a favorire il ricambio e l'ossigenazione delle cellule. Fondamentale è anche la presenza di vitamina A in forma di β -carotene, uno dei componenti che apportano al pomodoro il suo tipico colore rosso (610 $\mu\text{g}/100\text{g}$): basta un pomodoro di 100g per coprire il 15% della quantità di β -carotene che andrebbe assunta ogni giorno; oltre che alla presenza di β -carotene, la colorazione caratteristica del pomodoro, è da attribuire alla presenza anche di altri pigmenti:

- i carotenoidi, in grado di conferire principalmente colorazione gialla, arancione, rossa; insolubili in acqua, resistenti al calore, agli acidi ed agli alcali, ma con elevato grado di insaturazione, quindi facilmente ossidabili;
 - le antocianine, in grado di conferire una colorazione rossa, che vira al rosa in ambiente acido ed al blu-viola in ambiente alcalino; molto solubili in acqua e resistenti al calore;
 - le antoxantine, più conosciute come flavonoidi, solubili in acqua, che colorano in bianco-giallo: bianco in ambiente acido e giallo che si intensifica in ambiente alcalino.
- Il colore del pomodoro, che sembrerebbe in grado di svolgere solo una funzione organolettica, è anche responsabile di un importante ruolo nutrizionale antiossidante.

Un ruolo salutistico significativo è attribuito anche ad alcune saponine steroidali contenute nel pomodoro: tra questi, la tomatina (chiamata anche licopersicina), prodotta soprattutto dalle foglie ma presente anche nei frutti acerbi. Questa molecola è simile alla solanina delle patate e mostra attività tossica nei confronti di molti predatori erbivori vertebrati ed invertebrati, ma recenti studi ne hanno rivelato anche effetti benefici sulla salute dell'uomo, grazie alla sua capacità di inibire la proliferazione delle cellule tumorali del colon e del fegato (Lee et al., 2004).

Un consumo costante di pomodori facilita la digestione dei cibi che contengono fecole ed amidi, come pasta, riso, patate, e aiuta ad eliminare l'eccesso di proteine che può essere provocata da un'alimentazione troppo ricca di carni. Il pomodoro è, inoltre, un eccellente attivatore della motilità gastrica e risolve, in molti casi, problemi relativi a una digestione lenta o ad una scarsa acidità gastrica, grazie al ricco contenuto di acido malico ed acido lattico. Da non sottovalutare anche la

sensibile azione disintossicante, dovuta alla buona presenza di zolfo.

1.3 MIGLIORAMENTO GENETICO DEL POMODORO: DALLA DOMESTICAZIONE AL “MOLECULAR BREEDING”

Con il termine “domesticazione” si intende quel processo per cui una specie, vegetale o animale, viene trasferita da una situazione naturale ad una situazione che prevede il controllo e l'intervento da parte dell'uomo su alcune funzioni fisiologiche, in particolare nutrizione e riproduzione. Per una specie vegetale quindi, il processo di domesticazione può dirsi concluso quando questa non è più in grado di crescere in condizioni spontanee, ma solo se coltivata (Lorenzetti et al., 1994). Il luogo e l'epoca esatta in cui ha avuto inizio tale processo a carico della pianta del pomodoro non sono precisamente noti: si ipotizza che il Messico sia stato il primo centro di domesticazione e che il Perù rappresenti, ancora oggi, il più importante centro di biodiversità di questa specie (Larry e Joanne, 2007).

I caratteri su cui, fin dal passato, si è incentrato il lavoro del miglioramento genetico, sono soprattutto habitus di crescita e peculiarità della bacca (taglia, forma, colore e morfologia); per quanto concerne le dimensioni del frutto, la variabilità è, ancora oggi, significativa: da taglie estremamente ridotte, che assolvevano al solo fine di propagare il seme, i breeder sono arrivati a costituire bacche di grandi dimensioni, che sono caratteristiche delle moderne cultivar di pomodoro e che risultano pienamente indicate per il consumo alimentare (Bai e Lindhout, 2007).

Con la domesticazione non si è avuta soltanto una variazione della taglia, ma anche della forma del frutto: dalle specie selvatiche con bacche prevalentemente tondeggianti, si è passati alle varietà moderne dalla bacca oblata, sferica, allungata o piriforme (Tanksley, 2004): probabilmente, nel corso del lavoro di selezione per frutti grandi, si sono verificati cambiamenti anche nella forma che potrebbero essere attribuiti ad effetti pleiotropici da parte di loci associati alla taglia delle bacche, o alla manifestazione di geni che risultano repressi in background genetici più ristretti (Grandillo et al., 1999).

Alla fine del XIX secolo, erano già disponibili sul mercato diverse cultivar di

pomodoro che venivano propagate utilizzando il seme ottenuto per autofecondazione; agli inizi del XX secolo, iniziarono a sorgere, soprattutto negli Stati Uniti, una serie di Istituti pubblici e privati particolarmente interessati al miglioramento genetico di questa specie: vennero costituiti i primi ibridi del pomodoro, molto più vigorosi e produttivi dei parentali: il 1946 fu l'anno in cui la prima cultivar ibrida di pomodoro, la "Single Cross", venne rilasciata sul mercato.

Gli obiettivi dei miglioratori si sono evoluti nel corso del tempo, rispecchiando, ogni volta, le esigenze di un particolare periodo sociale, economico e culturale; negli anni '70 si mirava al miglioramento della resa delle colture in pieno campo, negli anni '80 ci si soffermò sul problema della "shelf life" dei prodotti, negli anni '90 sulla questione del gusto, fino ad arrivare ai nostri giorni: oggi il miglioramento genetico si incentra sul cosiddetto "dogma centrale": produzione di variabilità genetica, selezione e rilascio della nuova cultivar. Produrre variabilità significa, essenzialmente, attingere al vasto patrimonio genetico che ci viene offerto dalle specie selvatiche: nel solo genere *Solanum* se ne ritrovano più di 3000 (Knapp, 2002). Le cosiddette "specie neglette", possono, in realtà, essere determinanti nei programmi di breeding come fonte di nuovi alleli per incrementare la produttività, la resa e l'adattabilità delle specie coltivate (Gur e Zamir, 2004).

Un ulteriore passo avanti nel lavoro di miglioramento genetico è stato reso possibile dall'avvento delle biotecnologie: colture *in vitro* per la rigenerazione di piante da tessuti o singole cellule, embryo rescue, fusione somatica tra specie sessualmente incompatibili, trasformazione genetica per il trasferimento di geni utili: sono solo alcuni dei numerosi approcci innovativi per la costituzione di specie "migliorate". Anche l'avvento dei marcatori molecolari è stato determinante nel coadiuvare il lavoro dei breeder, soprattutto nelle fasi di identificazione e selezione di caratteri utili (Masojc, 2002): si parla, ormai, di "selezione marcatore assistita" (MAS), attraverso la quale è possibile individuare caratteri di interesse in una popolazione sfruttando l'associazione tra questi ed una specifica regione cromosomica: la messa a punto di marcatori basati sulla tecnica PCR, quali CAPS e SCAR, ha reso applicabile l'uso delle tecniche del DNA nel lavoro di miglioramento genetico, dando inizio a quello che viene definito "molecular breeding" (Bai et al., 2004); inoltre, grazie allo sviluppo di marcatori quali RFLP e AFLP, è stato possibile generare mappe genetiche

in pomodoro (Haanstra et al., 1999).

Il futuro del breeding, per questa specie, si traduce nel completamento del progetto di sequenziamento genomico, nel mappaggio dei QTL (“Quantitative Trait Loci”), nella costituzione di Linee di Introgressione (IL) ed inoltre sempre più determinante sarà il ricorso a mezzi bioinformatici, grazie ai quali diventerà possibile realizzare, in silico, le migliori combinazioni tra genotipi in un processo di “breeding by design” (Paleman e Van der Voort, 2003).

1.4 STRUMENTI DI GENOMICA STRUTTURALE E FUNZIONALE IN POMODORO

Il pomodoro è una specie diploide il cui genoma è costituito da 12 cromosomi ($2n=2x=24$) per un totale di circa 950 Mb (Arumuganathan e Earle 1991); le regioni eucromatiche, che costituiscono circa il 25% dell'intero genoma, sono concentrate nelle parti distali dei cromosomi, mentre quelle eterocromatiche si trovano intorno al centromero e ai telomeri (Wang *et al.*, 2006).

Il genoma del pomodoro è circa 5.6 volte più grande di quello di *Arabidopsis thaliana* (Galbraith *et al.*, 1991), con il 77% di regioni eterocromatiche caratterizzate da sequenze ripetute e geneticamente inattive (Peterson *et al.*, 1996). Il numero di geni è di circa 35.000, molto più elevato rispetto a quello di *Arabidopsis* che ne possiede 25.000; tuttavia, circa il 70% dei geni del pomodoro mostra un significativo livello di omologia con quelli della crucifera, di cui, probabilmente, conservano la funzione. Il restante 30% dei geni a funzione sconosciuta potrebbe essersi evoluto in tempi relativamente più recenti acquisendo funzioni caratteristiche delle specie appartenenti alla famiglia delle Solanacee, come i geni codificanti per inibitori di proteasi di tipo II o per proteine con azione “estensina-like” (Van der Hoeven *et al.*, 2002).

Il pomodoro può essere considerato una delle specie vegetali sulla quale si è più concentrato il lavoro dei miglioratori e dei genetisti nell'ultimo ventennio. Già a partire dagli anni '80 sono stati messi a punto diversi marcatori molecolari, tra i quali RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”), SSR (“Simple Sequence

Repeat”), CAPS (“Cleaved Amplified Polymorphic Sequence”) e AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphism”) al fine di fornire uno strumento molecolare per la messa a punto di mappe genetiche e fisiche. Oggi per il pomodoro è disponibile una mappa RFLP ad elevata densità (Bostein *et al.*, 1980): in media, vi si riscontra un marcatore ogni 1,2 cM, per un totale di circa 1.000 marcatori, e questo rende altamente probabile il fatto che per ogni gene, tra cui anche quelli di importanza agronomica ed economica (resistenza a patogeni, maschiosterilità ed altri) vi sia un marcatore molecolare associato, il che assume rilevanza significativa soprattutto nei programmi di miglioramento genetico rendendo possibile la selezione assistita da marcatori molecolari (MAS). Inoltre, una mappa con tali caratteristiche dà una maggiore risoluzione nel mappaggio dei QTL (Quantitative Trait Loci) ed agevola la caratterizzazione delle regioni cromosomiche adiacenti ai geni di interesse (Tanksley *et al.*, 1992).

1.5 IMPORTANZA DELLE SPECIE SELVATICHE NEL MIGLIORAMENTO GENETICO DEL POMODORO

La variabilità genetica presente nel germoplasma delle specie selvatiche di pomodoro finora è stata sfruttata solo parzialmente; le specie selvatiche, infatti, sono state usate principalmente come fonte di caratteri monogenici importanti per l'agricoltura, quali le resistenze a malattie; la specie selvatica *S. pennellii*, ad esempio, è molto ricercata dai miglioratori, per i programmi di miglioramento genetico in quanto rappresenta un'importante fonte di geni utili per la resistenza ad attacchi di insetti come l'afidone della patata e del pomodoro (*Macrosiphum euphorbiae*) (Gentile e Stoner, 1968) e di acari come il ragnetto rosso (*Tetranychus urticae*) (Gentile *et al.*, 1969), analogamente, *L. hirsutum* è stato principalmente utilizzato come fonte di resistenze ad insetti (Taylor 1986, Kalloo 1991).

Uno degli aspetti negativi legato all'-utilizzo del germoplasma selvatico è dovuta a vari problemi associati agli incroci interspecifici, il più tipico dei quali è il fenomeno noto come deriva genetica.

Infatti, l'introggressione di geni utili dalle specie selvatiche nella specie coltivata, è spesso accompagnata dal trasferimento di molti altri geni non desiderati, che non

vengono eliminati dopo diverse generazioni di reincrocio (Young e Tanksley, 1989). Inoltre, la natura poligenica della maggior parte dei caratteri di interesse agronomico pone difficoltà aggiuntive all'introggressione di geni utili dal germoplasma selvatico. Un altro problema associato all'uso delle specie selvatiche è la difficoltà nell'identificare sulla base del solo fenotipo le specie che possono contenere geni utili per caratteri quali produzione e qualità, controllando solo alcuni delle migliaia di caratteri putativamente trasferiti nella progenie da parte del genitore selvatico. In un'ottica di sicurezza alimentare alcuni caratteri di rusticità, utili per le specie coltivate, sono spesso associati a caratteri negativi, quali l'assorbimento di metalli dal suolo e la loro traslocazione negli organi eduli. D'altra parte i micronutrienti sono essenziali per una nutrizione bilanciata; ad esempio, oggi la carenza di ferro e di zinco è la maggiore causa di disordini nutrizionali nella popolazione mondiale affliggendo più di due miliardi di persone. Inoltre, recentemente molta attenzione è stata diretta alla possibilità di utilizzare conoscenze di genomica funzionale per "fortificare" le specie vegetali di interesse alimentare migliorandone le loro caratteristiche sia organolettiche che nutrizionali, al fine sia di arricchire i cibi, in fase di pre-raccolta, degli elementi minerali indispensabili per una dieta bilanciata sia di evitare che si abbiano accumuli di metalli, quali ad esempio il cadmio, tossici per la salute umana. Attualmente, presso il Dipartimento di Scienze del Suolo della Pianta e dell'Ambiente (DiSSPA) dell'Università Federico II di Napoli, sono disponibili 75 linee di introggressione della specie selvatica *S. pennellii* (acc LA716) in *S. lycopersicum* (cv. M82) (Eshed e Zamir 1995) impiegate in programmi di miglioramento genetico, al fine di aumentare la resistenza a patogeni ed a stress biotici e abiotici. Ogni IL contiene una singola introggressione derivante dalla specie selvatica a frutto verde *S. pennellii*, definita da marcatori RFLP. Ciascuna IL è quasi isogenica al pomodoro coltivato e tali linee offrono una copertura completa del genoma del pomodoro. Tali linee non sono state ancora caratterizzate per quantità di metalli, pesanti o meno, traslocati nei vari organi vegetali, né per la presenza e l'espressione di geni putativamente legati all'assorbimento e/o traslocazione di tali metalli sia nei genomi parentali che in quelli ricombinanti.

1.6 I METALLI PESANTI

Il termine “metallo pesante” si riferisce a quegli elementi metallici che presentano densità superiore a 5 g/cm^3 (Holleman and Wiberg, 1985). I circa 40 elementi che rientrano in questa categoria si comportano usualmente come cationi e sono caratterizzati da diversi stati di ossidazione (elementi metallici di transizione), da bassa solubilità dei loro ossidi, da grande attitudine a formare complessi e da grande affinità per i solfuri (Riffardi and Levi-Minzi, 1989). In base a tali caratteristiche possono essere definiti metalli pesanti elementi chimici come piombo, cadmio e mercurio, questi 19 metalli non sono essenziali per il metabolismo e pertanto determinano fenomeni di tossicità anche a bassissima concentrazione intracellulare. Altri elementi pesanti quali ferro, rame, zinco, cobalto e manganese sono micronutrienti essenziali per il metabolismo (come attivatori o regolatori enzimatici ecc...); tuttavia il loro apporto eccessivo risulta estremamente tossico (Siedlecka, 1995; Bargagli, 1998a). Probabilmente, il termine metallo pesante è stato adottato in quanto evoca il concetto di tossicità e permanenza nei sistemi biologici, oltre che il lungo periodo di residenza o persistenza nell'ambiente che li caratterizza. La quasi totalità delle piante è in grado di accumulare metalli pesanti, quali Fe, Zn, Mn, Cu, indispensabili ai loro processi vitali. Certe piante possono accumulare anche altri tipi di ioni metallici, che apparentemente non svolgono una funzione biologica, ma che al contrario risultano notevolmente tossici per la maggior parte degli organismi viventi. L'inquinamento da metalli tossici di acque e suoli è aumentato notevolmente per effetto delle attività antropiche dovute principalmente a combustione di idrocarburi fossili, attività minerarie, uso di fertilizzanti, pesticidi e rifiuti urbani. I processi che avvengono ad alta temperatura immettono nell'atmosfera metalli in fase gassosa o sottoforma di particolato. I metalli immessi nell'atmosfera (principalmente As, Cd, Cu, Hg, Pb, Sn e Zn), prima di essere depositati al suolo e in mare, sono trasportati dai venti in funzione della loro forma fisico-chimica. La maggior parte del particolato più grossolano è depositato in una fascia di 10 Km dalla fonte di emissione. Per i metalli in fase gassosa, la deposizione può avvenire a distanze molto superiori, fino a 10.000 Km dalle fonti di emissione. I metalli in traccia immessi nell'ambiente, depositati sulla

terra, nelle acque e nei sedimenti, sono soggetti a cicli geochimici globali che ne determinano una continua circolazione tra i vari comparti ambientali (Zenk, 1996). I metalli pesanti, giunti al suolo direttamente con le particelle aerotrasportate e depositate in forma umida o secca, oppure indirettamente, tramite le acque meteoriche che dilavano gli inquinanti depositati sulla vegetazione, possono subire diversi processi quali adsorbimento, complessazione e precipitazione in funzione delle caratteristiche chimico-fisiche del suolo (Aromolo *et al.*, 1999). L'analisi di diverse specie vegetali sia terrestri che acquatiche ha mostrato che esse bioaccumulano efficacemente metalli pesanti, in condizioni di inquinamento. Molte piante, tra cui briofite, alghe e piante superiori, hanno evoluto la capacità di accumulare elementi in traccia a livelli superiori di quelli presenti nel suolo o nelle acque o anche rispetto a specie che crescono nella stessa area. Le briofite, per l'elevato rapporto superficie/volume e la presenza di una cuticola molto sottile, accumulano efficacemente metalli pesanti. Esse, infatti, concentrano nei loro tessuti metalli pesanti in misura superiore rispetto all'ambiente e per tale motivo vengono utilizzate come bioindicatori dell'inquinamento ambientale (Brown, 1984; Tyler, 1990).

1.7 MECCANISMO DI ACCUMULO DEI METALLI PESANTI NELLE PIANTE

Le piante possiedono un efficace sistema di difesa intracellulare per chelare i metalli pesanti. Tale sistema è costituito dalle fitochelatine (PC), peptidi la cui massa molecolare si aggira intorno ai 2-3 KDa, costituiti da cisteina, acido glutammico, glicina o alanina. Le fitochelatine non sono sintetizzate sui ribosomi e non richiedono un mRNA: la loro struttura coinvolge il legame S-glutamil-cisteinico che si forma per azione di un enzima detto fitochelatin-sintetasi (PC-sintetasi). La sintesi delle fitochelatine è indotta nel momento in cui la pianta è esposta all'azione dei metalli pesanti. Tale induzione non si esercita a livello genetico come nel caso delle metallotioneine, ma a livello metabolico: gli ioni dei metalli pesanti attivano l'enzima PC-sintetasi, promuovendo un processo di polimerizzazione che porta alla formazione di molecole di PC che possono comprendere da 2 a 11 unità

glutamincisteiniche (Zenk, 1996). Il meccanismo di accumulo dei metalli pesanti nelle piante può essere suddiviso in tre fasi essenziali: assorbimento a livello radicale, trasporto dei metalli all'interno della pianta, meccanismi di detossificazione (Salt et al., 1995a). Spesso la maggior parte dei metalli nel suolo è legata ai suoi costituenti, per cui, affinché le piante possano accumularli, è necessario che questi elementi vengano resi solubili. La mobilitazione dei metalli legati al suolo può avvenire in diverso modo: molte piante rilasciano, attraverso le radici, delle specifiche molecole (fitosiderofori) che hanno la capacità di chelare e solubilizzare i metalli pesanti (un esempio può essere l'acido avenico delle graminacee). Altre piante sono in grado di ridurre e conseguentemente mobilizzare gli ioni metallici, grazie all'intervento di specifici riducenti metallici legati alla membrana plasmatica delle cellule radicali. Analizzando delle piante di pisello si è notato, infatti, che individui carenti di nutrienti quali Fe e Cu manifestavano una maggiore capacità a ridurre il Fe(+3) e il Cu(+2); e parallelamente si assisteva ad un incremento nell'assorbimento di elementi quali Fe, Cu, Mn, Mg. Un'ulteriore modalità di solubilizzazione dei metalli pesanti può essere dovuta all'acidificazione del terreno grazie al rilascio di protoni dalle radici: un basso pH rilascia in soluzione gli ioni metallici. Una volta solubilizzati questi ioni possono entrare nelle radici o per via apoplastica (extracellulare) o per via simplastica (intracellulare); molti metalli entrano nelle cellule vegetali grazie ad un trasporto attivo mediato da carriers o canali specifici. Dalle radici gli ioni metallici possono passare al germoglio mediante i vasi xilematici e, successivamente, essere distribuiti al resto della pianta per mezzo del floema. Per poter giungere allo xilema questi ioni devono necessariamente attraversare l'endoderme che grazie alla banda del Caspary consente il trasporto simplastico, essendo la via apoplastica bloccata. Le piante che accumulano metalli pesanti devono poter resistere ai loro effetti tossici; ciò si realizza o limitando l'assorbimento dei metalli a livello cellulare, o detossificando il metallo entrato, oppure sviluppando un meccanismo biochimico che sia in grado di renderle resistenti. Molte piante posseggono specifici enzimi per la resistenza ai metalli pesanti, per esempio, le fosfatasi acide della parete cellulare. Una volta penetrati nelle cellule, i metalli devono essere detossificati e questo può avvenire per chelazione, per precipitazione o per compartimentalizzazione. Per esempio, lo Zn può essere chelato da acidi

organici ed accumularsi nel vacuolo, o essere precipitato sottoforma di Zn-fitato. Anche il cadmio è accumulato nel vacuolo dove risulta associato a fitochelatine. Il vacuolo nella pianta può svolgere anche una funzione di difesa. Nel momento in cui la pianta si trova a contatto con i metalli pesanti sono accumulati nel vacuolo dei peptidi a base di glutatione, le fitochelatine, che legano il metallo. Il glutatione stesso, legandosi a numerosi composti potenzialmente tossici (mediante il residuo di cisteina; enzima glutatione S-trasferasi, GST), contribuisce a rimuoverli dal citoplasma trasportandoli nel vacuolo (Alpi *et al.*, 2000).

1.8 MECCANISMI DI METALLO-TOLLERANZA

In presenza degli stessi elementi e nelle stesse condizioni ambientali, le piante possono mostrare tre differenti tipi di comportamento, per cui possono essere classificate in:

- 1) “excluders”, piante che hanno sviluppato il meccanismo di “avoidance” (controllo dello stress), che consiste nel prevenire l’assorbimento e la traslocazione degli ioni metallici;
- 2) “indicators”, che assorbono ed accumulano metalli tramite meccanismi come la chelazione, localizzazione ed inattivazione chimica, che ne riducono l’effetto tossico; esse sono utili per il biomonitoraggio in quanto la concentrazione dei metalli nei tessuti riflette la loro disponibilità ambientale;
- 3) “accumulators”, che tollerano e possono accumulare elevate concentrazioni di metalli nei propri tessuti, spesso indipendentemente dal significato fisiologico o dal livello ambientale di tali metalli (Bargagli, 1998b).

Da quanto detto, si evince che la risposta delle piante allo stress causato dalla tossicità dei metalli risulta molto diversificata, dipendendo, in parte, anche dalla variabilità individuale. I meccanismi di resistenza delle piante alla tossicità dei metalli, dunque, sono riconducibili a due tipi essenziali di strategia che consistono nel tollerare (indicators e accumulators) o nell’evitare lo stress (excluders), (Marchionni, 1999). Il concetto di metallo-esclusione ed i meccanismi di protezione contro l’assorbimento e la traslocazione dei metalli non sono ancora ben chiari; si

ritiene che la maggior parte delle piante “excluders” prevenga l’assorbimento e la traslocazione degli inquinanti presenti nel suolo immobilizzandoli nella membrana plasmatica delle radici o nelle micorrize. Tali piante riescono, così, a mantenere piuttosto costante la composizione elementare dei loro tessuti interni ed a prevenire eventuali effetti tossici degli inquinanti. (Bargagli, 1998a; Arduini *et al.*, 1996). La relazione simbolica stabilita con i funghi micorrizici rappresenta un valido meccanismo di difesa di tali specie (Marchionni, 1999). Nelle piante “tolleranti”, sono stati sviluppati, a livello cellulare, diversi meccanismi di metallo-resistenza, tra cui il sequestro a livello della parete cellulare, la presenza di membrane metallotolleranti e di pompe che trasportano attivamente i metalli all’esterno della cellula, la detossificazione enzimatica, la compartimentalizzazione, la riduzione della sensibilità dei target cellulari degli ioni metallici (Bruins, 2000). La protezione della pianta contro gli effetti tossici dei metalli è assicurata, in primo luogo, dal controllo dell’assorbimento radicale e del trasporto a lunga distanza dei metalli (Briat and Lebrun, 1999). Le radici agiscono come una barriera che limita la traslocazione dei metalli verso il germoglio; la sua capacità di accumulo, tuttavia, varia a seconda della specie. Per esempio, rispetto al cadmio le piante di pomodoro risultano più tolleranti delle piante di fagiolo, in quanto il loro sistema radicale è più efficiente nell’accumulare il cadmio (Leita *et al.*, 1991; Chung *et al.*, 1992; Obata and Umebayashi, 1993; Salt *et al.*, 1995b); in tal modo, nel sistema radicale si accumula la maggior quantità di metalli, mentre fusto, foglie, frutti e semi ne contengono quantità progressivamente minori. Tuttavia, l’assorbimento di metalli attraverso le foglie può diventare notevole nel caso di inquinanti atmosferici che le raggiungono direttamente attraverso le deposizioni atmosferiche (Bargagli, 1998a). In particolare, una delle ragioni dell’elevata metallo-tolleranza di alcune specie è data dalla capacità di accumulare metalli, soprattutto a livello cellulare, senza permettere ai metalli di penetrare all’interno del protoplasto, che è maggiormente sensibile all’azione tossica dei metalli. Le 28 cellule radicali a diretto contatto con le soluzioni circolanti nel suolo, sono esposte agli ioni tossici che possono danneggiare la membrana cellulare causando la perdita di potassio dalla cellula, o l’inibizione dell’attività degli enzimi superficiali (Carballeira *et al.*, 1999). In questo caso, un efficiente meccanismo di resistenza contro i metalli ad attività redox è rappresentato da modificazioni

strutturali nella membrana plasmatica tali da renderla meno vulnerabile alla perdita di nutrienti o all'inibizione enzimatica (Wainwright and Woolhouse, 1975). A livello intracellulare, le piante metallotolleranti possono adottare varie strategie per limitare l'azione tossica di quei metalli che, superando l'ostacolo della parete e della membrana cellulare, riescono a penetrare all'interno della cellula. La metallodetossificazione all'interno delle cellule si può realizzare anche attraverso il legame con specifici ligandi organici, in questo modo si ha la formazione di complessi metallici non dannosi per la cellula. Ad esempio, sia nelle specie sensibili, sia in quelle metallo-tolleranti, il maggior apporto di alcuni metalli, il cadmio in particolare, può indurre la produzione di peptidi metallo-chelanti, ricchi di residui cisteinici, generalmente definiti fitochelatine. Molti ricercatori hanno ipotizzato che le PCs sono direttamente coinvolte nel controllo omeostatico degli ioni metallici all'interno della cellula vegetale. Un ulteriore meccanismo di metallo-resistenza è rappresentato dall'accumulo preferenziale dei metalli in organi senescenti, per esempio le foglie, in modo che, con l'abscissione di tali organi, si ottenga anche la rimozione dell'eccesso di metalli dalla pianta (Bargagli, 1998a). La metallo-tolleranza può essere una proprietà costitutiva (determinata geneticamente), indotta (in seguito all'esposizione preventiva a metalli pesanti), oppure di natura mista, in quanto risulta determinata geneticamente, ma il suo grado di espressione dipende dalle condizioni ambientali. La metallo-tolleranza costitutiva è stabile e non influenzabile dalle condizioni ambientali, mentre la metallo-tolleranza indotta, essendo una forma di acclimatazione all'ambiente (Okland *et al.*, 1997), persiste finché sussistono gli specifici fattori di stress che ne hanno determinato l'insorgenza (Shaw, 1990; Godbolb and Kettner, 1991; Subhadra and Panda, 1994; Rout *et al.*, 2000).

1.9 PROTEINE IMPLICATE NEL TRASPORTO DEI METALLI NELLE PIANTE

Negli ultimi anni diversi studi hanno permesso di comprendere sempre più nel dettaglio i meccanismi di assorbimento di traslocazione e accumulo dei metalli in pianta.

I metalli di transizione, come rame, zinco, ferro o manganese, sono essenziali per la normale crescita e per lo sviluppo delle piante. Tali elementi devono essere assorbiti dal suolo, distribuiti nella pianta che ne regola la concentrazione nei differenti tessuti, cellule e organelli. I trasportatori di membrana giocano un ruolo centrale in queste differenti attività (figura 1.1), tanto che negli ultimi anni sono moltiplicati gli studi su questa tipologia di proteine (Hall 2003). Infatti, sono state identificate diverse famiglie geniche che mostrano la capacità di svolgere queste funzioni nella regolazione e nell'omeostasi dei metalli in pianta (figura 1.2).

Tali trasportatori possono essere suddivisi in "metal uptake protein" e "metal efflux protein", responsabili, rispettivamente dell'assorbimento dal suolo e del movimento intercellulare dei differenti elementi minerali nella pianta. (Colangelo and Guerinot 2006). Generalmente tali famiglie sono composte da un elevato numero di membri, ad esempio in *Arabidopsis* sono presenti otto HMA (heavy metal ATPase), sei NRAMP (natural-resistance associated macrophage protein) e quindici ZIP (ZRT-IRT protein). Tale variabilità può essere richiesta per diverse ragioni: per compensare l'alta o bassa affinità della pianta nei confronti dei metalli a diversa disponibilità nel suolo; per rispondere alla differente domanda e alle specifiche necessità di tali elementi nei diversi tessuti della pianta; per rispondere a differenti situazioni di stress. Naturalmente, alcuni membri di queste famiglie geniche sono ridondanti. Lo sviluppo di nuove conoscenze sui trasportatori di metalli è dovuto alla possibilità di utilizzare tali geni per la modificazione genetica di alcune specie sia per migliorare la qualità degli alimenti sia per la nutrizione umana che animale, sia per lo sviluppo di nuove tecniche di fitorisanamento per rimuovere dal suolo elementi tossici.

In pomodoro studi di genomica strutturale e funzionale hanno permesso ad esempio di individuare diversi geni responsabili per l'accumulo e la traslocazione del ferro nella pianta.

Sono stati così caratterizzati i geni IRT1 nramp 1 (Bereczky 2003) e IRT2 (Eckhardt 2003), in quanto responsabili dell'assorbimento (IRT1 e IRT2) e della traslocazione del ferro nei tessuti radicali. Tali evidenze sono risultate da analisi dei livelli di espressione di tali geni, in condizioni controllate e in condizioni di stress (sia da carenza che da eccesso di ferro nella soluzione nutritiva), e dall'espressione di tali proteine in lievito tramite trasformazione eterologa di *S. cerevisiae*. Per tali geni è

stata inoltre dimostrata che c'è microsintenia con il genoma di *Arabidopsis thaliana*
D'altro canto, in pomodoro, a tutt'oggi non sono stati ancora investigati i processi di omeostasi per altri metalli.

SCOPO DELLA TESI

Nell'ambito del progetto GenoPOM riguardo la qualità nutrizionale del pomodoro, l'aspetto sviluppato è stato uno studio preliminare per costruire una mappa ionomica in pomodoro.

A tale scopo, gli obiettivi del presente lavoro sono:

1. l'isolamento e caratterizzazione di geni coinvolti nell'assorbimento e nella traslocazione di metalli utili e non in pomodoro
2. lo studio fisiologico sull'assorbimento la traslocazione l'accumulo di metalli pesanti in pomodoro

2 MATERIALI E METODI

2.1 CLONAGGIO DI SEQUENZE DI GENI PER IL TRASPORTO DI METALLI IN POMODORO

2.1.1 MATERIALE VEGETALE

Semi di piante di pomodoro della varietà M82 e della specie *Solanum pennellii* sono stati fatti germinare in terreno sterile. Le piante sono state allevate in camera di crescita ad una temperatura giornaliera di 24°C e notturna di 20°C. Le piante sono state irrigate 2 volte a settimana con volumi costanti di acqua.

I tessuti fogliari delle piante, allevate come sopra riportato, sono stati usati come fonte di DNA e per le analisi degli elementi minerali.

2.1.2 ESTRAZIONE DEL DNA GENOMICO

L'estrazione del DNA genomico è stata effettuata secondo il protocollo di Doyle e Doyle (1990) al quale sono state apportate alcune modifiche.

La polvere ottenuta è stata inserita in tubo da centrifuga sterile da 50 ml, per un totale di 5 g. Al tessuto tritato sono stati aggiunti 20 ml di tampone di estrazione EBMA (Tris – HCl pH 8,00, 100 mM; EDTA 50 mM; NaOH 8,3 mM; SDS 1,25%; NaCl 500 mM; NaHSO₃ 3,8 mg ml⁻¹;) il tutto è stato incubato a 65°C per 30 minuti e poi miscelato con 14 ml di cloroformio:alcol isoamilico (24:1 v:v) e centrifugati a 4000 rpm per 10 minuti. A seguito del trasferimento del surnatante in una nuova provetta, è stata aggiunta ad esso 10 µl di una soluzione di RNasi alla concentrazione di 100 ng µl⁻¹ ed il tutto è stato incubato a 37°C per 30 minuti per la degradazione dell'RNA.

In seguito, alla soluzione sono stati aggiunti 15 ml di una soluzione contenente cloroformio ed alcool isoaminico nel rapporto di 24:1; il tutto è stato centrifugato alle condizioni sopra descritte per 10 minuti.

Alla fase acquosa surnatante, trasferita in un nuovo tubo sterile, sono stati aggiunti,

circa 2/3 del volume di isopropanolo freddo ed il tutto è stato incubato per una notte a 4°C.

Dopo una centrifugazione di 20 minuti a 4000 rpm e a 4°C, il pellet precipitato è stato sottoposto a un lavaggio mediante 1 ml di una soluzione di etanolo al 70% per due volte, e lasciato asciugare all'aria. Il DNA è stato risospeso in H₂O sterile e conservato a - 20° C .

2.1.3 CORSA ELETTROFORETICA E QUANTIZZAZIONE DEL DNA ESTRATTO

Il DNA estratto è stato visualizzato e quantizzato mediante gel elettroforesi.

Le corse elettroforetiche sono state effettuate su gel di agarosio all'1%. Per preparare i gel è necessario aggiungere il bromuro di etidio nella quantità di 1/20.000 e sciogliere l'agarosio in concentrazione 1% peso/volume in tampone TAE (40 mM tris, 25 mM sodio acetato, 0,5 mM EDTA, 0,1% di acido acetico glaciale).

Il tutto deve essere riscaldato al microonde finché l'agarosio non si è sciolto completamente.

Il bromuro di etidio è un intercalante del DNA che lo rende fluorescente quando irradiato da luce U.V. permettendone la visualizzazione sul gel.

Ai campioni è stato aggiunto un buffer di caricamento, il 6X Loading Dye Buffer (Tris – HCl pH 7,6 10 mM, Orange G 0,15%, Xilene Cianolo 0,03%, Glicerolo 60%, EDTA 60 mM) per favorire il depositarsi dei campioni nel fondo dei pozzetti e per visualizzare le bande durante la corsa.

Per la quantizzazione del DNA estratto l'immagine della corsa elettroforetica , è stata acquisita all'analizzatore di immagini Typhoon 9200 (Amersham Biosciences) ed analizzata con il programma ImageQuant 5.2.

2.1.4 DISEGNO DEI PRIMER

I primer utilizzati in reazioni di analisi di amplificazione PCR su DNA genomico sono stati disegnati con un approccio bioinformatico. In banche dati di DNA esistono sequenze dei geni clonati da diverse specie vegetali. La Banca Dati del National Center for Bioinformaic Information, NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), è il più importante esempio di database per gli studi computazionali in biologia molecolare. Da tale banca dati sono stati presi i geni per il trasporto di metalli già clonati in altre specie e grazie ad un programma gratuito (<http://www.es.embnet.org/Services/MolBio/t-coffee/>) sono stati allineati ed è stato possibile trovare le zone altamente omologhe presenti in essi. Su tali zone sono stati disegnati i primer riportati in tabella 3.1 e usati nelle analisi molecolari.

Per quanto riguarda il trasporto del ferro i geni scelti da analizzare sono stati YSL (yellow stripe like protein) e NRAMP (Natural resistance-associated macrophage protein), mentre per quanto riguarda zinco e cadmio i geni analizzati sono stati ZNT (Zinc transporter) HMA (heavy metal transporter) e MTP (metal transporter protein).

Ci si è avvalsi poi della banca dati di EST dell'SGN (Solanaceae Genomic Network <http://www.sgn.cornell.edu/>) per verificare l'eventuale presenza di sequenze espresse altamente omologhe ai geni da noi ricercati. In questo modo, utilizzando di volta in volta le sequenze ottenute per multiallineamento, si è riusciti ad identificare diverse EST altamente omologhi per i geni YSL, ZNT e MTP in pomodoro; tali sequenze confermano la presenza in pomodoro dei geni ricercati. Gli EST da noi ottenuti sono stati in seguito organizzati in UniGene, sovrapponendo tra di loro gli EST di ogni gene cercato, in modo da ottenere un'unica sequenza nucleotidica rappresentate il mRNA completo di ciascun gene. In tal modo si è potuto disegnare nuovi primers maggiormente specifici per i geni individuati.

2.1.5 ANALISI DI AMPLIFICAZIONE DI DNA GENOMICO MEDIANTE PCR (POLIMERASE CHAIN REACTION)

I primer utilizzati sono quelli riportati in tabella 3.1, disegnati con la procedura spiegata al paragrafo precedente.

Nella miscela di reazione oltre ad essere presenti i due primer specifici sono presenti: il DNA di pomodoro che funge da stampo, una Taq polimerasi e il suo buffer specifico, l' MgCl₂ che attiva la Taq polimerasi e stabilizza le interazioni tra oligonucleotidi e stampo ed i dNTPs (deossiribonucleotidi fosfato) che costituiscono i precursori per la sintesi del DNA. Per cui l'amplificazione è stata effettuata utilizzando 1 µl di ciascun primer alla concentrazione di 10 µM, 1 µl di dNTPs alla concentrazione di 10 mM, 2,5 µl di tampone della Taq polimerasi 10X (Invitrogen), 0,5 µl di Taq polimerasi (Invitrogen) alla concentrazione di 5U µl⁻¹, 1 µl di MgCl₂ alla concentrazione di 50 mM, 25 ng di DNA ed H₂O fino ad un volume totale di reazione pari a 25 µl.

La reazione di PCR è stata effettuata in un termocicizzatore "Mastercycler Eppendorf ep gradient (Eppendorf USA)".

Le condizioni di reazioni sono state denaturazione iniziale di 5 minuti a 94°C, seguita da 30 cicli ognuno dei quali è fatto da una denaturazione iniziale di 30 secondi a 92°C , una fase di ibridazione tra DNA stampo e primer lunga 30 secondi la cui temperatura dipende dalla temperatura alla quale funzionano i primer (melting) ed in fine da una fase di estensione di 1,5 minuti a 72 ° C.

I trenta cicli sono stati seguiti da un ciclo di estensione finale di 10 minuti a 72 ° C ed i campioni sono stati conservati a 4° C

Nella maggior parte dei casi più cicli di PCR sono stati necessari per amplificare le sequenze geniche dei geni znt, ysl, hma, nramp e mtp ed avere quantità adeguate di ampliconi per la successiva clonazione. Per ogni reazione sono stati preparati corrispondenti controlli negativi (eliminando il DNA stampo) e positivi (usando un DNA stampo o degli oligonucleotidi già usati in precedenza).

Solitamente 1/10 dei prodotti di reazione vengono sottoposti a elettroforesi su gel di agarosio all'1% insieme ad un marcatore di lunghezza per stimare la dimensione del frammento amplificato e valutare la purezza, oltre che per valutare la specificità

delle condizione di reazione o eventuali contaminazioni dei reagenti.

2.1.6 PURIFICAZIONE DEL DNA DOPO REAZIONI DI PCR

I prodotti della PCR e della RT-PCR sono stati isolati utilizzando il kit di purificazione fornito dalla Promega PCR (Wizard[®] SV Gel e PCR - Clean Up System). Esso si basa sulle proprietà di una resina a scambio ionico. In condizioni di elevata forza ionica il DNA si lega alla resina, mentre i contaminanti passano attraverso la colonna.

Le impurità vengono efficientemente lavate via mentre il DNA purificato viene fluito in acqua o in tampone Tris. La composizione dei tamponi presenti nel kit è ottimizzata per un efficiente recupero del DNA e per la rimozione di contaminanti.

Per la purificazione è stato seguito il protocollo fornito assieme al kit dalla casa produttrice.

La purezza dei frammenti amplificati è stata esaminata mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1% di un'aliquota di essi (Fig. 3.7).

Per la quantizzazione del DNA estratto l'immagine della corsa elettroforetica, è stata acquisita all'analizzatore di immagini Typhoon 9200 (Amersham Biosciences) ed analizzata con il programma ImageQuant 5.2.

2.1.7 CLONAGGIO DELLE SEQUENZE ISOLATE IN PLASMIDI

I frammenti amplificati e purificati sono stati clonati nel vettore di clonaggio pGEM-T Easy[®] (Promega) (Fig.2.1) e poi trasferiti nella specie batterica Escherichia coli.

Il clonaggio ha previsto le fasi di adenilazione degli amplificati ligazione degli amplificati in vettori di clonaggio e inserimento dei vettori nelle cellule batteriche.

Nella fase di adenilazione degli amplificati, questi ultimi sono stati adenilati utilizzando una polimerasi che lega deossiadenosina-monofosfato al 3'-OH indipendentemente dallo stampo. Per ogni frammento la quantità da adenilare, e

quindi successivamente da ligare nel vettore di clonaggio, è stata calcolata in base alla relazione seguente:

$$\text{ng inserto} = \text{ng vettore} \times (\text{paia di basi dell'inserto} / \text{paia di basi del vettore}) \times 3$$

tenendo conto che i protocolli della ditta Promega consigliano di utilizzare 50 ng di vettore in ogni reazione di legazione.

La reazione è stata eseguita in un volume di 10 μl . Nella miscela di reazione oltre all'amplificato sono presenti i dATP alla concentrazione di 2,5 mM la Taq polimerasi (Promega) alla concentrazione di 5 U μl^{-1} ed il suo tampone alla concentrazione 1X (Promega) e l' MgCl₂ alla concentrazione di 5 mM.

La miscela di reazione è stata posta a 70°C per 30 minuti nel termocicizzatore "Mastercycler Eppendorf ep gradient (Eppendorf USA)".

Alla fase di adenilazione ha fatto seguito quella di legazione.

La reazione di legazione consente di saldare le estremità di un plasmide a quelle di un frammento lineare di DNA grazie all'attività dell'enzima DNA ligasi, rendendo così possibile il clonaggio dei frammenti di DNA all'interno di vettori plasmidici.

Nel nostro caso ogni reazione di legazione è stata allestita aggiungendo alla miscela di adenilazione i seguenti reagenti:

- 1 μl di T4 DNA ligasi (promega) 3 U μl^{-1}
- 2 μl T4 DNA Ligasi Buffer 10X
- 1 μl pGEM-T-Easy (Promega) 50ng μl^{-1}
- H₂O fino ad un volume finale di reazione pari a 20 μl

La miscela è stata incubata a 4°C per una notte.

Una miscela di reazione priva dell'inserto è stata inoltre utilizzata come controllo per valutare la capacità del vettore di richiudersi su se stesso.

L'ultima fase è stata quella di inserimento del plasmide ricombinante in cellule batteriche. Il plasmide ricombinante è stato trasferito in cellule competenti di Escherichia coli, ceppo DH5a, preparate secondo il metodo del CaCl₂ descritto da Sambrook (Sambrook, *et al.*, 1989).

Per la trasformazione, 100 μl di cellule batteriche competenti sono state miscelate a

5 μ l di DNA plasmidico. La miscela è stata posta in ghiaccio per 45 minuti, poi a 42°C per 90 secondi in un bagno termostato. Trascorso questo tempo è stata posta di nuovo in ghiaccio in per 10 minuti. Ad essa sono stati aggiunti 800 μ l di LB sterile ed è stata posta in agitazione a 37°C per un'ora. La soluzione è stata centrifugata per 30 secondi alla velocità di 13.200 rotazioni per minuto in una centrifuga da banco; ciò ha consentito di eliminare gran parte del surnatante e risospendere il pellet nel surnatante residuo.

La miscela è stata dispensata omogeneamente in capsule di Petri sterili su LB, gelificato con agar, contenente ampicillina alla concentrazione di 100 mg l⁻¹. Su tale mezzo erano stati previamente dispensati 10 μ l di Isopropil-D-1-thiogalactopiranoside (IPTG) alla concentrazione di 200 ng μ l⁻¹ e 100 μ l di 5-Br-4-Cl-3-indolo-galactopiranoside (X-Gal) alla concentrazione di 20 ng μ l⁻¹. Le capsule Petri sono state incubate a 37°C per una notte. La presenza di colonie sul mezzo LB, reso selettivo per la presenza dell'ampicillina, ha indicato che i batteri da cui tali colonie derivavano erano sopravvissuti grazie al gene marcatore presente nel plasmide.

La selezione delle colonie è stata eseguita con il metodo della distinzione blu-bianco: nel plasmide è infatti presente il gene *lacZ* che codifica per la β -galattosidasi, un enzima che scinde la molecola di X-Gal in due molecole di cui una è di colore blu. L'IPTG agisce sul promotore del gene inducendo la sintesi della β -galattosidasi.

Durante il clonaggio il frammento si inserisce nella regione *lacZ* impedendo la sintesi dell'enzima. Le cellule che contengono l'inserito non sono in grado di scindere X-Gal presente nel substrato, quindi saranno di colore bianco; mentre quelle prive dell'inserito metabolizzano X-gal colorandosi di blu. Le colonie bianche sono state inoculate in 1 ml di LB liquido contenente ampicillina alla concentrazione di 100 mg l⁻¹ e lasciate crescere a 37°C per una notte in agitazione (Sambrook *et al.*, 1989).

E' stata eseguita una analisi di PCR su colonia, con primer specifici, per confermare la presenza dell'amplicone all'interno del plasmide contenuto dalla colonia.

2.1.8 SEQUENZIAMENTO DEGLI AMPLICONI

E' stato utilizzato il kit Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA purification System della Promega per purificare il DNA plasmidico delle colonie batteriche risultate positive all'amplificazione.

I plasmidi ricombinanti, contenenti quindi ognuno uno dei frammenti d'interesse, sono stati isolati dai batteri e impiegati per la reazione di sequenziamento dell'inserito. Il sequenziamento è stato affidato alla ditta GeneLab di Santa Maria di Galeria (Roma), alla quale sono stati inviati i campioni del DNA plasmidico e le sequenze dei primer utilizzati nella fase di amplificazione.

Gli elettroferogrammi ottenuti sono stati privati delle porzioni di sequenza del vettore fiancheggianti il sito di inserzione, ciò ha consentito di individuare la sequenza dell'inserito.

Le sequenze degli inserti sono state poi sottoposte ad analisi in silico utilizzando il programma Blast (<http://130.14.29.110/BLAST/>) che ha confrontato tali sequenze con tutte le sequenze nucleotidiche presenti nella banca dati GenBank del National Center for Biotechnological Information.

2.2.1 ALLEVAMENTO DELLE PIANTE IN IDROPONICA

Semi di pomodoro *S. lycopersicum* cv M82 sono stati sciacquati abbondantemente con acqua milliQ, sterilizzati in ipoclorito di sodio (NaClO) al 3% per 30 minuti e posti in acqua milliQ sterile per 24 ore. Successivamente i semi sono stati posti a germinare al buio su carta Whatman 3MM, in piastre Petri sterili, per 10 giorni, fino all'emergenza della radichetta. A tale stadio di maturazione le plantule sono state trasferite in vaschette contenenti perlite sterile (figura 2.2) in cui è stata somministrata la soluzione nutritiva composta da:

Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	708.45 (mg·l ⁻¹),
MgSO ₄ · 7H ₂ O	492.94 (mg·l ⁻¹),
KH ₂ PO ₄	136.09 (mg·l ⁻¹),
K ₂ SO ₄	348.50 (mg·l ⁻¹),
(NH ₄) ₂ SO ₄	396.39 (mg·l ⁻¹),
CaCl ₂ · 2H ₂ O	441.09 (mg·l ⁻¹),
H ₃ BO ₃	2.868 (mg·l ⁻¹),
MnSO ₄ · H ₂ O	1.545 (mg·l ⁻¹),
EDTA-Fe	33.0345 (mg·l ⁻¹),
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.220 (mg·l ⁻¹),
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.080 (mg·l ⁻¹),
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.0299 (mg·l ⁻¹).

Le piante sono state allevate in camera di crescita in condizioni controllate di temperatura (26°C/18°C), fotoperiodo (18h luce/6h buio), irradianza (300 µmoli m⁻² s⁻¹) ed umidità (60%), quest'ultima ottenuta mediante evaporazione libera di acqua deionizzata posta in appositi contenitori adattati per sopperire alla mancanza di controllo interno dell'umidità nella camera stessa.

Dopo 30 giorni di crescita nelle condizioni su descritte (figura 2.3), quando le piante avevano completamente sviluppato la sesta foglia, sono stati aggiunti alla soluzione nutritiva completa, i metalli oggetto di interesse, secondo il protocollo sperimentale riportato nello schema:

TRATTAMENTO	REPLICHE <i>in vivo</i>
Controllo	10
ZnSO ₄ 50 µM	3
ZnSO ₄ 100 µM	3
ZnSO ₄ 200 µM	3
CdSO ₄ 5 µM	3
CdSO ₄ 10 µM	3
CdSO ₄ 20 µM	3
PbNO ₃ 1,5 µM	3
PbNO ₃ 3 µM	3
PbNO ₃ 6 µM	3

2.2.2 ANALISI DEL FENOTIPO E IONICA

Dopo 10 giorni dall'inizio del trattamento (figura 2.4) le piante sono state caratterizzate fenotipicamente. Sono state prelevate le foglie del secondo palco dall'alto (foglie apicali), le foglie del penultimo palco dal basso (foglie basali) e le radici. Il campionamento è stato effettuato direttamente in camera di crescita per evitare modifiche della omeostasi ionica delle piante e sono state pesate. I campioni sono stati quindi congelati in N₂ liquido e conservati a -80° C per le successive analisi. La preparazione del materiale vegetale per l'analisi degli ioni mediante ICP-MS, ha previsto la loro essiccazione in un termostato settato a 70° C 72h, la successiva digestione in HNO₃ al 65 % di grado ultrapuro e H₂O₂ al 30% con dissoluzione in un sistema a microonde ad alta pressione (Multiwave Anton Paar). La concentrazione degli elementi minerali è stata effettuata mediante l'ICP-MS Elan 6000 Perkin Elmer equipaggiato con un nebulizzatore a flusso perpendicolare, presso il gruppo di ricerca dell'ENEA-Portici. Il metodo di digestione e la validazione dello strumento sono state effettuate usando due tipi di materiale vegetale di riferimento certificati (CRM): foglie di Orchard NBS 1571 e foglie di tabacco CTA-OTL-1.

2.2.3 ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica dei livelli di concentrazione di metalli è stata effettuata mediante ANOVA. I confronti tra le diverse concentrazioni di metalli nei differenti organi stati condotti utilizzando LSD con una soglia di significatività per $P < 0.05$. Il programma utilizzato è Systat 5.2.1.

3 RISULTATI

3.1.1 DISEGNO DEI PRIMER

Il disegno di primer per l'amplificazione dei geni prescelti per l'omeostasi di metalli in pianta si è avvalso dell'identificazione delle sequenze conservate ottenute mediante multiallineamento effettuato tramite i software T-Coffee e ClustalW.

In figura 3.1 sono riportati i risultati degli allineamenti dei seguenti geni: *znt*, *ysl*, *hma*, *nramp*, *mtp*. Dagli allineamenti fatti si evince la presenza di zone altamente conservate all'interno delle sequenze nucleotidiche, vale a dire regioni ad altissima omologia.

Molto spesso tali regioni rappresentano domini catalitici o domini transmembrana e possiedono un'elevatissima omologia di sequenza sia nucleotidica che amminoacidica sia all'interno della famiglia genica sia nelle diverse specie vegetali; in figura 3.1 tali zone sono evidenziate dai riquadri gialli.

Per questo motivo tali regioni sono risultate le più adatte per la costruzione dei primer da utilizzare nelle successive reazioni di amplificazioni *in vitro*. Per molti dei geni si è proceduto al disegno di più di una coppia di primer, in quanto si trattava di sequenze geniche molto lunghe e difficilmente amplificabili con una sola coppia di inneschi. In tabella 3.1 sono riportati i primer che hanno dato risultati in esperimenti di amplificazione di DNA genomico.

3.1.2 AMPLIFICAZIONE DI DNA ED INSERIMENTO DEGLI AMPLICONI IN VETTORI DI CLONAGGIO.

Al fine di verificare il corretto funzionamento dei primer, reazioni preliminari di controllo di amplificazione sono state eseguite utilizzando come stampo DNA genomico estratto da tessuti fogliari di diverse specie vegetali, quali *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*, *Phalaris canariensis*, *Cicer arietinum* e naturalmente *Solanum lycopersicum*. (fig. 3.2). In tali reazioni è possibile visualizzare il diverso pattern fornito dai primer sulle varie specie vegetali e soprattutto la presenza di un

amplificone avente peso molecolare simile sia in *Arabidopsis* sia in pomodoro (fig 3.1).

In seguito abbiamo proceduto con analisi di amplificazione *in vitro* del DNA di *S. lycopersicum* M82 e *S. pennellii* per ciascun gene, con tutte le possibili combinazioni dei primer disegnati.

Abbiamo ottenuto amplificati del peso molecolare atteso per i primer: F1-R2 ZNT, F2-R1 YSL, F1-R2 NRAMP, F1-R2 HMA; come è possibile vedere in figura 3.3, in tali profili di amplificazione, ripetuti più volte per cercare di ottenere pattern con il minor numero di bande possibili, in tre casi su quattro i primer amplificano più di una singola banda.

Utilizzando la coppia di primer F1-R2 ZNT (fig. 3.3 pannello A) abbiamo amplificato due bande, una dal peso molecolare compreso tra 1.600 e 2.000 bp, che rispetta le dimensioni attese in base ai nostri studi preliminari sulle sequenze presenti in banca dati; una di dimensioni minori, di circa 700 bp potrebbe essere un prodotto aspecifico della reazione.

L'amplificazione mediante i primer F2-R1 YSL ha prodotto un profilo di amplificazione con tre bande di dimensioni di 1.600 bp, 1.200 bp e 600 bp (fig 3.3 pannello B). Si noti che in questo caso la banda di circa 1.600 bp, rappresentante l'amplificato atteso, risulta di intensità maggiore delle altre.

I primer F1-R2 NRAMP hanno invece amplificato un prodotto di circa 1500 bp come da noi atteso e un prodotto dal peso molecolare molto basso di circa 400 bp (fig 3.3 pannello C).

Nell'ultimo caso riportato, l'amplificazione con i primer F1-R2 HMA ha prodotto una banda molto intensa del peso molecolare di circa 1.500 bp e 4 bande molto tenui di peso molecolare comprese tra i 300 e i 750 bp (fig 3.3 pannello D).

Si è così ricorso al taglio della banda di interesse dal gel di agarosio e alla successiva purificazione del DNA, scegliendo di analizzare le bande dal peso molecolare corrispondente a quello da noi atteso e cioè:

F1-R2 ZNT 1800 bp

F2-R1 YSL 1600 bp

F1-R2 NRAMP 1500 bp

F1-R2 HMA 1500 bp

Successivamente le sequenze sono state inserite in vettori di clonaggio ed è stata eseguita un'analisi di amplificazione sui plasmidi estratti per confermare la presenza dell'inserito (dati non mostrati).

3.1.3 SEQUENZIAMENTO DEGLI AMPLICONI

L'analisi comparativa delle sequenze nucleotidiche dei singoli geni, condotta tramite il programma BLAST come descritto in precedenza, ha evidenziato la mancata identità delle sequenze da noi clonate; infatti in tutti i casi, tali sequenze risultano essere regioni non codificanti del DNA di pomodoro e non i geni cercati (fig 3.4).

Successivamente, si è proceduto con una traduzione *in silico* delle sequenze ottenute mediante il programma Transeq, per cercare di trovare omologia funzionale e non più nucleotidica degli ampliconi da noi ottenuti.

In questo modo è stato possibile analizzare tutti i possibili frame di lettura delle nostre sequenze, ma in seguito alle analisi bioinformatiche svolte, effettuati sulle sequenze amminoacidiche così ottenute, nessuno dei 6 frame di lettura prodotti dalle sequenze in esame è risultato essere codificante per alcun peptide (fig 3.4).

3.1.4 PCR “*in silico*”

Al fine di individuare in pomodoro i geni per i trasportatori di metalli da noi cercati, abbiamo sviluppato un sistema di PCR in silico, utilizzando la banca dati di EST del SGN, Solanaceae Genomic Network. Per prima cosa è stata effettuata una ricerca in vari database, tra tutti l'NCBI, per individuare il maggior numero possibile di sequenze dei diversi geni codificanti per proteine trasportatrici dei metalli. In tal modo abbiamo potuto costruire un nostro database, con tutte le accessioni e le sequenze codificanti complete già studiate in diverse specie vegetali. In seguito abbiamo utilizzato tali accessioni per investigare la succitata banca dati di EST del SGN.

È stato così possibile individuare 22 sequenze geniche in *Arabidopsis* e altre specie vegetali, già studiate come trasportatori di metalli, che avessero riscontro in

pomodoro con elevata omologia di sequenza nucleotidica, fig. 3.5.

3.1.5 DISEGNO PRIMER SU SEQUENZE EST DI POMODORO

E' stato quindi deciso di cambiare approccio per la costruzione dei primers. Ci si è avvalsi della banca dati di EST dell'SGN (Solanaceae Genomic Network <http://www.sgn.cornell.edu/>) per verificare l'eventuale presenza di sequenze espresse altamente omologhe ai geni da noi ricercati. In questo modo, utilizzando di volta in volta le sequenze ottenute per multiallineamento, si è riusciti ad identificare diverse EST altamente omologhi per i geni YSL, ZNT e MTP in pomodoro; tali sequenze confermano la presenza in pomodoro dei geni ricercati. Gli EST da noi ottenuti sono stati in seguito organizzati in UniGene, sovrapponendo tra di loro gli EST di ogni gene cercato, in modo da ottenere un'unica sequenza nucleotidica rappresentate il mRNA completo di ciascun gene. In tal modo si è potuto disegnare nuovi primers maggiormente specifici per i geni individuati.

I primers sono stati utilizzati in nuove reazioni di amplificazione mediante PCR del DNA genomico di M82 e *S. pennellii* ottenendo amplificati delle dimensioni attese per i geni YSL e ZNT come visibile in fig. 3.6.

3.1.6 SEQUENZIAMENTO DEGLI AMPLICONI

Nel presente lavoro è stato utilizzato il programma BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) che, grazie ad un algoritmo specifico, ottimizza l'operazione di allineamento di una sequenza con quelle presenti in banca dati. Questo programma ha permesso di comparare le sequenze dei frammenti clonati con le sequenze presenti in banca dati e di poter capire la percentuale di identità con esse (fig. 3.7).

L'analisi comparativa delle sequenze nucleotidiche dei singoli geni ha mostrato un'alta percentuale d'identità con le sequenze degli stessi geni di altre specie. Tale alta identità conferma che la nuova strategia seguita con l'approccio bioinformatico usato per disegnare i primer è risultata valida.

La tabella 3.1 mostra per ogni singola sequenza il nome, la lunghezza della sequenza

sia in DNA che in cDNA e la percentuale di identità con la sequenza più simile ad essa presente in un'altra specie vegetale.

Il programma Transeq (www.ebi.ac.uk/emboss/transeq/) ha consentito una traduzione *in silico* delle sequenze nucleotidiche di cDNA clonate.

Nella fase successiva, mediante il programma Blast, è stato effettuato un confronto tra le sequenze amminoacidiche e quelle già sequenziate presenti in banca dati. Il risultato di tale confronto ha confermato l'alta percentuale di identità tra le sequenze amminoacidiche tradotte dalle sequenze clonate e quelle delle stesse proteine di altre specie.

Nella tabella, quindi, sono riportate per ogni gene anche la lunghezza amminoacidica della sequenza di cDNA tradotta *in silico* e la percentuale di identità con la sequenza più simile ad essa presente in un'altra specie vegetale.

La sequenza nucleotidica di YSL1 da noi ottenuta è stata confrontata con tutte le sequenze nucleotidiche presenti nella banca dati ed è stata riscontrata un'identità del 92% con la sequenza codificante completa del gene YSL1 di tabacco (*Nicotiana tabacum*). La putativa sequenza nucleotidica codificante è stata tradotta *in silico* e confrontata con le sequenze amminoacidiche presenti in banca dati: l'identità risultante è stata del 89% con la sequenza amminoacidica della proteina YSL di tabacco (*Nicotiana tabacum*).

La sequenza nucleotidica di ZNT1 da noi clonata risulta avere invece un'omologia del 96% con la sequenza codificante completa del gene ZNT1 di *Chengiopanax sciadophylloides* mentre la risultante sequenza amminoacidica possiede un'omologia del 79% con la sequenza proteica sempre di *Chengiopanax sciadophylloides*.

3.2 STUDIO FISILOGICO SULL'ASSORBIMENTO LA TRASLOCAZIONE L'ACCUMULO DI METALLI PESANTI IN POMODORO.

3.2.1 ANALISI FENOLOGICA

Sulle piante di pomodoro *S. lycopersicum* cv. M82 cresciute in perlite utilizzando una soluzione nutritiva completa, sono state effettuate analisi fenologiche relative al peso fresco dei vari organi della pianta in condizioni di stress e in condizioni normali (tab 3.2). L'analisi statistica dei risultati ottenuti, effettuata mediante il programma Systat 5.2.1 e condotta confrontando l'effetto dei diversi trattamenti su ciascun singolo organo dimostra che non ci sono differenze statisticamente significative tra i diversi trattamenti (fig 3.8).

Questo dato conferma l'ipotesi di lavoro, e cioè che i trattamenti imposti erano costituiti da concentrazioni non letali di ciascun elemento utilizzato durante la sperimentazione.

3.2.2 ANALISI IONICA

Al fine di studiare il comportamento della pianta in risposta alla presenza di dosi non letali di zinco, cadmio e piombo, somministrati singolarmente, è stata effettuata un'analisi della composizione ionica degli elementi minerali nei diversi organi della pianta. L'analisi dei campioni ha prodotto una quantificazione della concentrazione di ciascun elemento, espresso in $\mu\text{g/g}$ di peso secco. In figura 3.9, sono riportate le concentrazioni degli elementi oggetto di studio in funzione di ciascun organo vegetale considerato; foglie apicali, foglie basali e radici in funzione dei diversi trattamenti.

Al fine di semplificare ed evidenziare gli effetti di ogni singolo trattamento, le tabelle riassuntive e i relativi grafici, riportano esclusivamente la concentrazione del metallo "stressante".

L'analisi statistica multivariata sulle medie del contenuto di ciascun minerale in ogni

organo vegetale considerato in funzione del trattamento, ha permesso di rilevare differenze significative nei diversi trattamenti somministrati.

È così possibile notare, al trattamento con ZnSO_4 100 μM , un aumento significativo della concentrazione di zinco in foglie apicali e in foglie basali rispetto rispettivamente di 50 e 30 volte superiore al controllo (Tab 3.3 pannello A), mentre la quantità di zinco presente nelle radici risulta essere solo 4 volte superiore che nella parte aerea. Tale rapporto è nettamente appannaggio delle radici, con un contenuto di zinco fino a 15 volte superiore che nella parte aerea della pianta nel trattamento con ZnSO_4 200 μM .

Risulta interessante notare il comportamento della pianta rispetto ai due metalli tossici, cadmio e piombo.

Nelle piante trattate con PbNO_3 , non c'è stato alcun incremento della concentrazione di piombo nella parte aerea della pianta in nessuno dei trattamenti effettuati.

Nelle radici, in cui è presente una minima quantità di piombo già al controllo (0,66 $\mu\text{g/g}$ di peso secco), variazioni significative sono invece riscontrabili già a partire dal trattamento di PbNO_3 1,5 μM , in cui la concentrazione del metallo risulta essere di 15 volte superiore del controllo, aumentando in maniera scalare nei trattamenti successivi (tab. 3.3 pannello D).

Diversamente, la quantificazione del cadmio nei diversi organi in condizioni di controllo ha evidenziato la quasi totale assenza del metallo nella pianta in tutti gli organi analizzati con valori prossimi allo zero, mentre, a differenza del piombo, già al più basso trattamento somministrato, 5 CdSO_4 μM , è visibile un incremento significativo della concentrazione di cadmio nella parte aerea di circa 200 volte rispetto al controllo controllo, raggiungendo valori 400 volte superiore nel trattamento a 20 μM (tab. 3.3 pannello C).

Come nei precedenti casi, le radici mostrano incrementi significativi della concentrazione di cadmio al minimo trattamento effettuato, aumentando fino a quasi 600 volte la quantità di metallo nel trattamento con CdSO_4 20 μM .

4 DISCUSSIONI

4.1 L'ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE DI GENI COINVOLTI NELL'ASSORBIMENTO E NELLA TRASLOCAZIONE DI METALLI UTILI E NON IN POMODORO

Il presente lavoro di tesi si è proposto di identificare geni che contribuiscano in maniera sostanziale al rapido sviluppo di nuovi prodotti di pomodoro e suoi derivati attraverso l'analisi strutturale e funzionale del genoma di pomodoro e contribuire con tecnologie genetiche e genomiche per l'ottenimento di una mappa ionomica ottenuta dalla sovrapposizione di analisi sull'omeostasi ionica e sull'espressione genica.

Grazie agli studi eseguiti, in banca dati, oggi esistono le sequenze nucleotidiche di diversi geni implicati nel trasporto di metalli già clonati in diverse specie. Questi possono essere divisi in due sottogruppi: "Metal Efflux Protein" e "Metal Uptake Protein". di queste abbiamo scelto le più rappresentate nelle diverse specie vegetali, che sono risultate essere: *ysl* (yellow stripe-like protein) e *nramp* ([Natural resistance-associated macrophage protein](#)) come trasportatori del ferro, *znt* (Zinc transporter) *hma* (heavy metal transporter) e *mtp* (metal transporter protein) come trasportatori di cadmio e zinco.

I geni da noi studiati sono stati scelti sia perché risultano essere tra i più rappresentati nelle varie famiglie vegetali sia perché risulta di particolare importanza il ruolo di tali geni nell'omeostasi dei metalli in pianta.

Il gene Yellow Stripe 1, identificato per la prima volta in mais (*Zea mays*) (Wiren et al; 1994), codifica per una proteina di membrana che trasporta Fe(III) accoppiato a nicotinammia. Studi successivi hanno rivelato che tale proteina appartiene ad una famiglia, specifica delle piante (Guerinot et al; 2006), di trasportatori di oligopeptidi, presente in un gran numero di organismi (Yen et al; 2001). Sono infatti già stati individuati 18 membri in *Oryza sativa* e 8 in *Arabidopsis thaliana*. Studi strutturali hanno evidenziato la presenza di 14 domini transmembrana altamente conservati.

I vari membri della famiglia delle YSL svolgono nei processi di omeostasi del ferro funzioni differenti. In *Arabidopsis* è stato evidenziato che AtYSL1 viene espresso nello

xilema e sembra essere fondamentale per il trasporto a lunga distanza del ferro nei vari organi della pianta, mentre AtYSL2, espressa principalmente nei tessuti radicali, è coinvolta nei processi di assorbimento del ferro.

Inoltre, è stata evidenziata la presenza di tale famiglia anche in tabacco (*Nicotiana tabacum*) mentre non è ancora stata verificata in pomodoro.

Anche NRAMP rappresenta una famiglia di geni composta da diversi membri, implicata nel trasporto di diversi cationi divalenti, incluso il ferro; studi su AtNRAMP1 mostrano che tale proteina incrementa la resistenza anche a livelli tossici di ferro in piante che la overesprimono (Thomine 2000) e ristabilisce la capacità in ceppi di lievito mutanti, di assorbire ferro (Bereczky Z 2003).

Il gene *znt* fa parte della famiglia delle ZIP (ZRT-IRT-protein), generalmente contribuiscono all'omeostasi ionica trasportando cationi all'interno del citoplasma.

Più di 100 ZIP proteins sono state identificate in batteri funghi animali e piante (Guerinot 2000).

È noto il coinvolgimento di geni ZIP nell'accumulo di metalli in specie iperaccumulatrici: sono stati riscontrati alti livelli della proteina endogena TcZNT1 in correlazione all'incremento di assorbimento di zinco nelle radici della specie *Thlaspi caerulescens*, iperaccumulatrice di zinco e cadmio (Pence NS 2000).

Il gene *hma* appartiene alla famiglia delle P1b-type ATPase, proteine che usano l'energia derivante dall'idrolisi di ATP per traslocare cationi attraverso membrane biologiche; studi sulle HMA2 e HMA4 di *Arabidopsis thaliana* mostrano che tali proteine sono implicate nel trasporto di diversi cationi divalenti come zinco cadmio piombo e cobalto, in particolare, l'espressione di HMA2 in lieviti mutanti ha permesso di caratterizzare tale proteina per il trasporto sia dello zinco che del cadmio (Eren 2004).

Per ultimo, il gene *mtp* appartiene alla famiglia di CDF, cation diffusion facilitator, codificanti antiporti per portare i metalli fuori dal citoplasma. AtMTP1 è stato il primo di tali trasportatori ad essere studiato, e si è riscontrata una sua capacità di conferire tolleranza allo zinco se overespresso. L'espressione di AtMTP1-GFP in protoplasti di *Arabidopsis thaliana* ha permesso di individuare la localizzazione di tale proteina sulle membrane vacuolari di foglie e radici, suggerendone un ruolo nel sequestro dello zinco nel vacuolo stesso, ipotesi confermata dal minor accumulo di

zinco in piante in cui AtMTP1 è silenziato (Kobae Y. 2004)

Le banche dati rappresentano il materiale sperimentale della bioinformatica. Esse possono essere classificate in quattro grosse categorie: Banche Dati di biosequenze; Banche Dati genomiche; Banche Dati di espressione genica e Banche Dati di proteomica. La Banca Dati del National Center for Bioinformaic Information, comunemente chiamata NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), è il classico e più importante esempio di database per gli studi computazionali in biologia molecolare, in cui sono sviluppati programmi appositi per l'analisi delle sequenze genomiche in essa presenti.

Grazie alle sequenza nucleotidiche reperibili in banca dati è stato per noi possibile usare un approccio bio-informatico per disegnare primer utili all'isolamento di sequenze geniche dei geni scelti.

Due software disponibili in rete il cui nome è T-coffee (<http://www.es.emblnet.org/Services/MolBio/t-coffee/>) e clustal W (www.ebi.ac.uk/clustalw/) permettono di allineare 2 o più sequenze fornendo un file in output che, anche grazie a una differente scala di colori, permette di identificare le zone altamente identiche tra le sequenze allineate. Con tali software si è proceduto ad allineare le sequenze dei geni già clonati nelle altre specie vegetali reperibili dalla banca dati del NCBI. L'analisi in silico degli allineamenti ha mostrato che essi hanno delle zone nelle quali esiste un'alta identità di sequenza. Ipotizzando che tali zone siano quelle più conservate si è proceduto a disegnare su esse coppie di primer utilizzabili nelle future amplificazioni in vitro sul DNA.

Le amplificazioni effettuate con tali primer hanno prodotto ampliconi delle dimensioni attese per quattro delle cinque proteine ricercate: *znt*, *ysl*, *nramp* e *hma*. Gli ampliconi sono stati inseriti in vettori di clonaggio e in seguito sequenziati, ma non hanno fornito identità con i geni da noi ricercati: le sequenze da noi ottenute sono risultate essere regioni non codificanti del genoma di pomodoro. Per verificare tale risultato, le sequenze sono state tradotte *in silico* mediante il programma Transeq (www.ebi.ac.uk/emboss/transeq/) e nessuno dei 6 frame di lettura prodotti per ciascuna sequenza isolata è risultato essere codificante per alcun peptide.

I primers da noi disegnati sui multiallineamenti delle sequenze esistenti in banca dati non sono risultati utili a isolare i geni da noi scelti in pomodoro, nonostante tali

primers risultassero efficienti ad amplificare i geni stessi se utilizzati su DNA di *Arabidopsis* così come i controlli *in silico* e *in vitro* da noi effettuati hanno dimostrato. La ragione di questo mancato funzionamento può derivare da vari motivi, come ad esempio il diverso codon usage che le due specie adottano, diminuendo la specificità dei primer quando utilizzati in pomodoro.

Va inoltre ricordato che i primer da noi disegnati non sono degenerati quando nei multi-alignamenti era presente un mismatch, ma disegnati mantenendo la base azotata maggiormente rappresentata. Queste due possibili discriminanti, unite alla presenza di errori tecnici che sempre possono essere presenti in campo scientifico e molecolare potrebbero essere la causa del mancato funzionamento dei primer da noi disegnati sui multi-alignamenti in pomodoro.

Risulta in altro modo interessante che in pomodoro siano state amplificate in questo modo bande di pari peso molecolare che in *Arabidopsis*, che sono risultate essere regioni non codificanti del genoma.

Abbiamo così deciso di modificare la strategia per la costruzione dei primer; al fine di individuare in pomodoro i geni per i trasportatori di metalli da noi cercati, abbiamo sviluppato un sistema di PCR *in silico*, utilizzando la banca dati di EST del SGN, Solanaceae Genomic Network. Per prima cosa è stata effettuata una ricerca in vari database, tra tutti l'NCBI, per individuare il maggior numero possibile di sequenze dei diversi geni codificanti per proteine trasportatrici dei metalli. In tal modo abbiamo potuto costruire un nostro database, con tutte le accessioni e le sequenze codificanti complete già studiate in diverse specie vegetali. In seguito abbiamo utilizzato tali accessioni per investigare la succitata banca dati di EST del SGN.

È stato così possibile individuare 22 sequenze geniche in diverse specie vegetali, già studiate come trasportatori di metalli, che avessero riscontro in pomodoro con elevata omologia di sequenza nucleotidica.

Sono state così identificate diverse EST altamente omologhe per i geni YSL, ZNT e MTP in pomodoro; tali sequenze confermano la presenza in pomodoro dei geni ricercati. Gli EST da noi ottenuti sono stati in seguito organizzati in UniGene, sovrapponendo tra di loro gli EST di ogni gene cercato, in modo da ottenere un'unica sequenza nucleotidica rappresentate il mRNA completo di ciascun gene. In tal modo

si è potuto disegnare nuovi primers maggiormente specifici per i geni individuati. Le analisi di amplificazione hanno prodotto amplificati per i geni *ysl* e *znt*.

La sequenza nucleotidica di YSL1 da noi ottenuta è stata confrontata con tutte le sequenze nucleotidiche presenti nella banca dati ed è stata riscontrata un'identità del 92% con la sequenza codificante completa del gene YSL1 di tabacco (*Nicotiana tabacum*). La putativa sequenza nucleotidica codificante è stata tradotta in silico e confrontata con le sequenze amminoacidiche presenti in banca dati: l'identità risultante è stata del 89% con la sequenza amminoacidica della proteina YSL di tabacco (*Nicotiana tabacum*).

La sequenza nucleotidica di ZNT1 da noi clonata è risultata avere invece un'omologia del 96% con la sequenza codificante completa del gene ZNT1 di *Chengiopanax sciadophylloides* mentre la risultante sequenza amminoacidica possiede un'omologia del 79% con la sequenza proteica sempre di *Chengiopanax sciadophylloides*.

4.2 STUDIO FISILOGICO SULL'ASSORBIMENTO LA TRASLOCAZIONE L'ACCUMULO DI METALLI PESANTI IN POMODORO.

Un altro aspetto salutistico che è stato sviluppato nel presente progetto è la qualità nutrizionale legata alla presenza di elementi minerali. E' noto che le piante hanno capacità di assorbire dal suolo e dall'ambiente metalli indispensabili per la loro sopravvivenza. E' però anche noto che alcune specie o genotipi di piante di interesse alimentare possono assorbire in grande quantità oltre a questi metalli (specie iperaccumulatrici) anche altri metalli che possono interferire con i processi di conservazione e trasformazione industriale. Studi specifici su questi aspetti nutrizionali dell'assorbimento di metalli dal suolo sono recenti. Ad esempio, l'idea di "fortificare" le specie vegetali alimentari con i minerali essenziali richiesti per una dieta salutare ed in una forma bio-disponibile risulta relativamente nuova (Guerinot and Salt, 2001). Inoltre, il ridotto apporto da parte degli alimenti vegetali di Ferro e Zinco, uno dei più importanti deficit nutrizionali odierni potrebbe vantaggiosamente essere combattuto con l'incremento della disponibilità di tali minerali in forma disponibile nelle varietà commerciali di specie alimentari di largo consumo.

A tal fine è stato sviluppato un sistema di controllo della localizzazione di metalli quali zinco, cadmio e piombo in piante di *S. lycopersicum* M82 in perlite in condizioni controllate (26/18°C, 60% RH, 300 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ irradianza, fotoperiodo 18/6 h).

Piante di venti giorni sono state poste per 10 giorni in presenza di concentrazioni non letali di Cd (5; 10; 20 μM), Pb (1,5; 3; 6 μM), Zn (50; 100; 200 μM) somministrati separatamente. L'analisi fisiologica ha mostrato che la crescita delle piante, in termini di peso fresco e allocazione della biomassa, non risultava influenzata significativamente dalla presenza dei metalli in quanto non sono state riscontrate differenze statistiche nei diversi casi analizzati, dimostrando che le concentrazioni da noi utilizzate fossero non letali per le piante.

L'analisi quantitativa e simultanea della composizione degli elementi presenti nei diversi organi di *Solanum lycopersicum* M82, eseguite mediante ICP-MS, ha mostrato che i tratti correlati all'omeostasi ionica risultavano modificati significativamente in risposta ai metalli utilizzati. È infatti possibile visualizzare che nel caso del

trattamento con $ZnSO_4$ la parte aerea della pianta mostra un incremento della concentrazione di zinco a $100 \mu M$, come riportato in letteratura (Michael J 2007, Cosio 2004) per altre specie vegetali, ma non a $200 \mu M$, mentre nelle radici la concentrazione di tale metallo è incrementata proprio a $200 \mu M$. Abbiamo quindi ipotizzato una sorta di tolleranza da parte della pianta della concentrazione di zinco fino al raggiungimento di una concentrazione soglia ($100 \mu M$), soglia entro la quale è riscontrata una traslocazione del metallo dalla parte radicale alla parte aerea che non influisce sul fenotipo e sulla vitalità delle piante stesse, come dimostrano i risultati sull'analisi fenologia da noi effettuati, mentre a concentrazioni più elevate ($200 \mu M$) sembra attivarsi una sorta di barriera che limita la localizzazione dello zinco alle radici, evitando il trasferimento dello stesso alla parte verde della pianta.

Risulta interessante analizzare il trattamento da cadmio, che come il piombo è un metallo non essenziale e tossico per la pianta a determinate concentrazioni. In prima analisi, come per il piombo, non è stata rilevata la presenza di cadmio in nessun organo nei controlli effettuati. In seguito tale metallo è stato ritrovato sia in foglie apicali che in foglie basali in tutti i trattamenti effettuati, infatti, già alla minima somministrazione di $CdSO_4$ vi è stato un aumento significativo di cadmio nella parte aerea della pianta, sempre nettamente inferiore che nelle radici.

Tale risultato può essere spiegato, in accordo con quanto riportato in letteratura, in quanto il cadmio potrebbe utilizzare gli stessi canali di assorbimento e traslocazione utilizzati dallo zinco (Hart 2002). Infatti sia il cadmio che lo zinco appartengono al gruppo IIB dei metalli di transizione, e posseggono simili proprietà chimiche, geochimiche e ambientali. È inoltre nota una possibile interazione di tali metalli se somministrati insieme a dosi superiori di quelle normalmente vitali (Parameswaran 2005) ipotesi che conferma una forma di competitività dei due metalli per gli stessi trasportatori.

Risulta quindi interessante la capacità di tollerare alte concentrazioni di cadmio nella parte aerea delle piante analizzate, considerando che la soglia minima per definire le piante iperaccumulatrici di cadmio è di $100 \mu g/g$ del peso secco rispetto ai $74 \mu g/g$ p.s. da noi riscontrati in foglie apicali nel trattamento con $CdSO_4$ $20 \mu M$.

Un risultato completamente diverso si è avuto analizzando la localizzazione del

piombo: infatti, tale metallo non è stato mai riscontrato, in nessuno dei trattamenti effettuati, né in foglie apicali né in foglie basali, mentre pare essere accumulato esclusivamente nell'apparato radicale, anche in elevate quantità, a differenza di quanto riportato in letteratura. È nota infatti la capacità di assorbire e traslocare piombo nella parte aerea in diverse specie vegetali (Deng 2005) cresciute su suoli inquinati, con il risultato di avere una pari concentrazione di piombo sia nella parte aerea che nelle radici, ma è nota anche la mancata capacità di assorbire piombo di alcune piante eduli come il riso (Pallavi Sharma 2005), che anche in presenza di concentrazioni molto maggiori delle nostre (1000 μM contro 6 μM) non mostrano un significativo accumulo di piombo in nessun organo.

Il nostro studio dimostra quindi che piante di pomodoro cresciute in presenza di piombo, non hanno la capacità di immagazzinare tale metallo nella parte "verde" della pianta, ma limitano l'assorbimento e l'accumulo di piombo esclusivamente nella radice. Tale capacità è estremamente importante se inserita in un'ottica di sicurezza alimentare, considerando il pomodoro una delle principali piante eduli coltivate in tutto il mondo.

Per tutti i trattamenti eseguiti, risulta comunque una concentrazione dei vari metalli nella parte aerea della pianta estremamente inferiore di quella riscontrata nelle radici, com'era facilmente prevedibile dato che le radici stesse sono in contatto continuo con la soluzione nutritiva contenente i metalli stessi.

5 CONCLUSIONI

Il presente lavoro di tesi rappresenta la base per uno studio preliminare per lo sviluppo di una mappa ionomica in pomodoro, mediante la sovrapposizione delle informazioni sull'omeostasi ionica relativa ad un pool di metalli e l'espressione genica dei trasportatori dei metalli di interesse.

È stato possibile identificare le sequenze parziali dei geni *ysl* e *znt* in *S. lycopersicum* mediante l'utilizzo di banche dati pubbliche, di pari passo col costante apporto di nuove informazioni sul genoma di pomodoro provenienti dal progetto internazionale di sequenziamento della specie in esame. La metodologia utilizzata nel disegno di primer su sequenze EST è stato un valido approccio per investigare la presenza di trasportatori di metallo in pomodoro e potrà essere utilizzata per isolare e caratterizzare nuove sequenze dal genoma di tale specie.

Inoltre sono stati effettuati studi sul comportamento di piante di *S. lycopersicum* allevate in differenti concentrazioni di zinco cadmio e piombo, che hanno permesso di tracciare un quadro sul comportamento del pomodoro a concentrazioni non fisiologiche di tali elementi

6 FIGURE

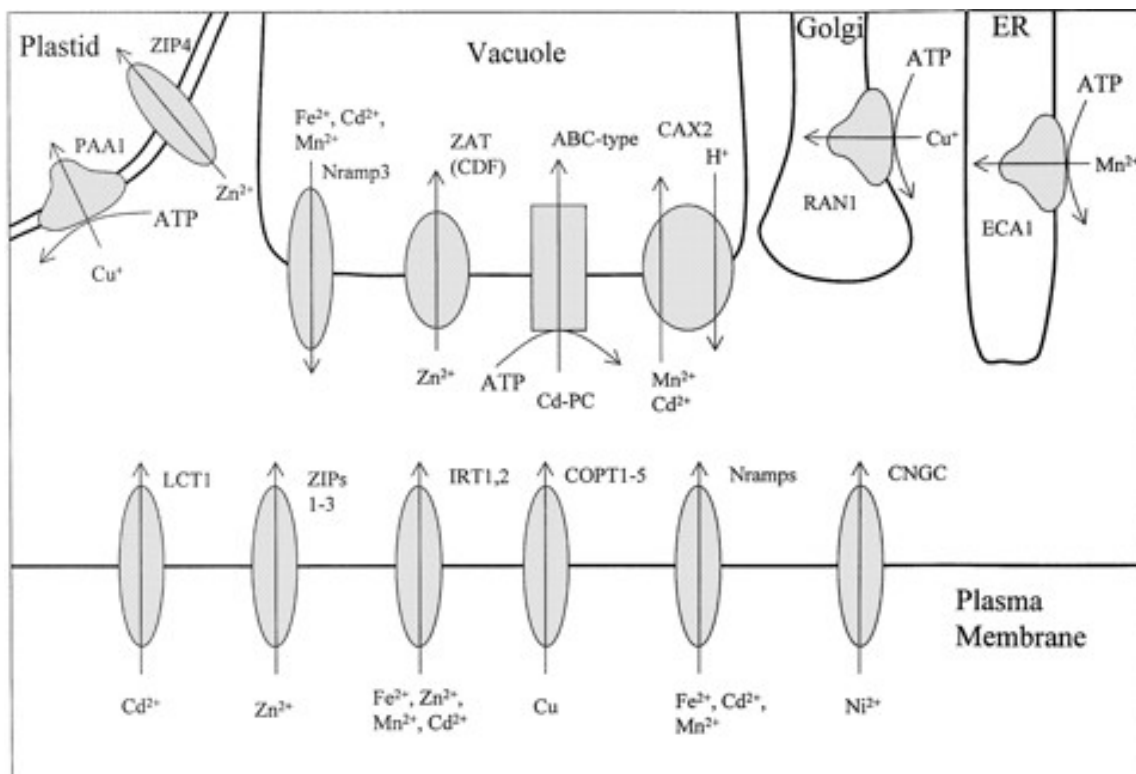


Figura 1.1. Putativi trasportatori di metalli identificati in pianta. La localizzazione di membrana di alcuni di questi trasportatori, soprattutto quelli del plasmalemma deve essere confermata. In particolare il gene *ysl* appartiene alla famiglia degli OPT mentre il gene *znt* alla famiglia ZIP.

Tabella 1.1. Putativa specificità e localizzazione dei principali trasportatori di metalli in pianta.

Name	Family members in <i>A. thaliana</i>	Proposed specificity	Cellular location	Main tissue expression
Heavy metal ATPases (P _{1B})	8			
RANI		Cu	Post-Golgi	Whole plant
PAA1		Cu	Chloroplast	
Ca ²⁺ -ATPases (P _{2A})	4			
ECA1		Mn ²⁺	ER	Roots?
Nramp	6 (+EIN2)			
AtNramp 1		Fe, Mn		Roots
AtNramp 2		-		Roots
AtNramp 3		Fe, Cd, Mn	Vacuole	Roots/shoots
AtNramp 4		Fe, Mn		Roots/shoots
OsNramp 1		Mn, Fe		Roots
OsNramp 2		Mn		Leaves
OsNramp 3		Mn		Roots/leaves
LeNramp1		Fe		Root vascular parenchyma
CDF	8			
ZAT (AtMTP1)		Zn	Vesicular/vacuolar	All tissues
TcZTP1		Zn	Intracellular membranes	Leaves, roots
TgMIP1		Cd, Co, Zn, Ni	Vacuole	Leaves
ShMTP1		Mn	Intracellular membranes	Roots, leaves
ZIP	15			
IRT1		Fe, Zn, Mn, Cd	PM	Roots
IRT2		Fe, Zn		Roots
OsIRT1		Fe		Roots
LeIRT1		Fe (broad?)		Roots
LeIRT2		broad?		Roots
TcZNT1		Zn, Cd		Roots, shoots
TcZNT2		-		Roots
ZIPs1-3		Zn		Roots
ZIP4		Zn	Plastids	Roots, shoots
GmZIP1		Zn	Peribacteroid membrane	Root nodules
Cation/H ⁺ antiporters	12			
CAX 2		Ca, Mn, Cd	Vacuole	Roots
ABC transporters	128			
ID17		Fe		
COPT1-5	5	Cu		Leaves, stems, flowers
GNGC channels	20	Ni, Pb	PM	

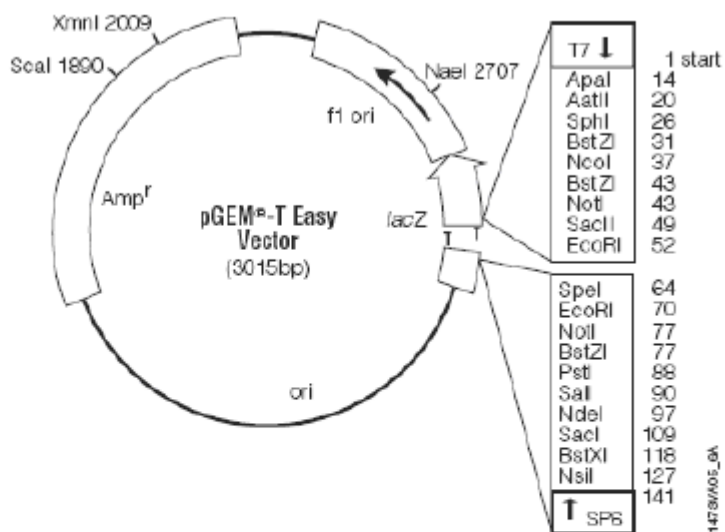


Fig. 2.1 Vettore di clonaggio pGEM-T Easy (Promega). I frammenti ottenuti dalle analisi di amplificazione del DNA e del cDNA , previamente adenilati, vengono inseriti nel sito di clonaggio tra i due residui di timina interrompendo il gene lac Z. Il contiene al suo interno un gene che conferisce resistenza all'antibiotico ampicillina.



Figura 2.2. Piante di *S. lycopersicum* a dieci giorni dalla germinazione



Figura 2.3. Piante di *S. lycopersicum* a 30 giorni dal trasferimento in perlite

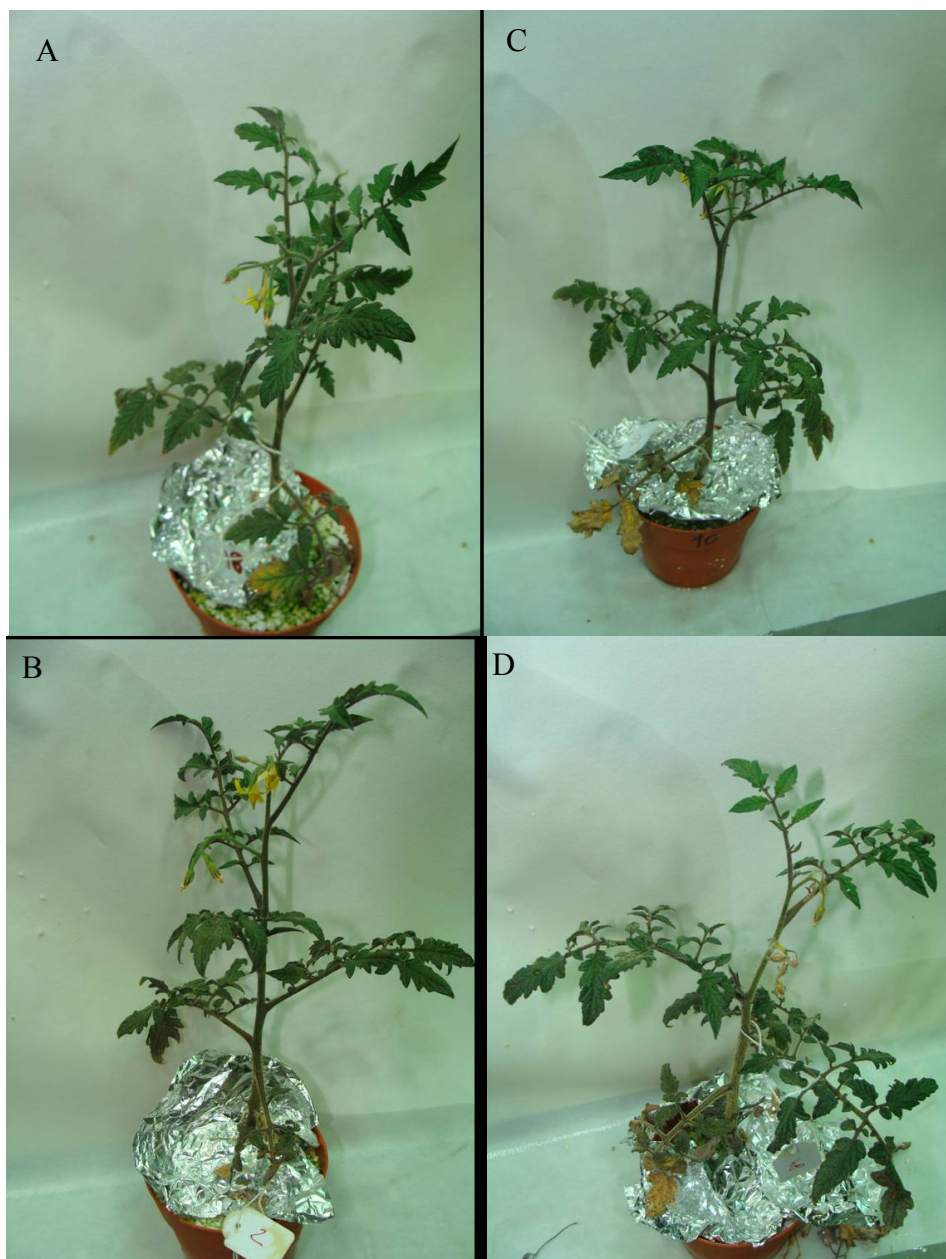


Figura 2.4. Pante di *S. lycopersicum* al termine del trattamento: (A) controllo (B) trattamento con ZnSO₄ 200 μM , (C), CdSO₄ 20 μM, (D) PbNO₃ 6 μM.

Tabella 2.1. elenco e principali caratteristiche dei geni scelti per l'isolamento in *S. lycopersicum*

Nome	Famiglia	Localizzazione	Specificità
ZRT1 zinc regulated transporter 1	ZIP	epidermide (radici)	Zn
HMA2 heavy metal transporter 2	P1BType-ATPase	periciclo-xilema (radici)	Cd-Zn
MTP1 metal transporting protein 1	CDF	vacuoli (foglie e radici)	Cd Ni-Zn
YSL2 Yellow stripe-like2	YSL	endoderma, periciclo (Radici, apici)	Fe
NRAMP 4 Natural resistance associated Macrophage protein	NRAMP	vacuoli	Fe


```

b      gacaatcaggatgaagctcatggagacgttactgagcagctgttgggaaaccaaag---
d      gacaagcagatgaagctcatggagacgtgactgagcagctgttgggaaaccaaag---
a      gacaagcacc---atgctcacggggatgtgactgagcagctgttgggaaaccaaagcct
c      acaca---tc---atgctcatggggatgtgactgagcaattgttgggaaaccaaagcct
          *          *  ***** ** ** *  *****  ***** ** * **

b      ca-----ggagaaagagaaaaagaaaaggaacatcaatttgcaggagcttatcttcat
d      ca-----ggagaaagagaaaaagaaaaggaacatcaatgtgcaaggagcttatcttcat
a      cagatcgtggacaaagagaaaacgaaagaggaacatcaatgtccaaggagcttatcttcat
c      caagtcgcagcaaaagagaaaaagaaaaggaacatcaatgtccaaggagcttatcttcat
          **          *  ***** ** ** *  *****  ***** **

b      gttcttgggtgattcaatccagagcgttgggtgttatgattggaggagctgccatttggtag
d      gttcttgggtgattcaatccagagcgttgggtgttatgattggaggagctgccatttggtag
a      gtccttggcgattccatccagagcgttgggtgttatgattggaggagctgtcatttggtag
c      gtccttggggatccatccagagcgttgggtgttatgattggaggagctatcatttggtag
          ** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

b      aaccgaaatggaagataaattgatctgatctgcactcttgccttttcggttatcgtcttg
d      aaccgaaatggaagataaattgatctgatctgcactcttgccttttcggttatcgtcttg
a      aaaccgaaatggaataatagtcgatctgatttgcactctcgtcttttcggttatcgtcttg
c      aaccggaatggaagatagtgatctgatctgcacacttgccttttcggttatcgtctta
          ** ** ***** ** * ***** ***** ** * ***** ***** ** *

b      ggacaaccatcaacatgattcgaaacattcttgaagtgttgatggagagtagcgcctaga
d      ggacaaccatcaacatgattcgaagcattcttgaagtgttgatggagagtagcgcctaga
a      ggaacaaccatcaacatgattcgaagcattcttgaagtattgatggagagtagcaccaga
c      ggaacaaccatcaacatgattcgaaacattctagaagtattgatggagagtagaccaga
          ** ***** ***** ***** ** * ***** ***** ***** **

b      gagattgacgctacaaagctcgaaggggttctcgaatggaaggagtggtggctgtt
d      gagattgacgctacgaagctcgaaggggttctcgaatggaagaagtggtggctgtt
a      gaggttgaagcctacgaagctcgaaggggttctcgaatggaagaagtggtggctgtt
c      gagattgacgccacaaagctcgaaggggtctgcttgaatggaagaagtggtggctgtt
          *** ***** ** ** * ***** ***** ***** ***** *****

b      catgagcttcacatttgggctatcacagtggaaggttttacttgcttgccatgtcaat
d      catgagcttcacatttgggctatcacagtggaaggttttctgcttgcttgccatgtcaat
a      catgagcttcacatttgggctatcacagtggaaggttttacttgcttgccatgtcaat
c      catgagcttcacatttgggctatcacagtggaaggtgctattggcttgccatgtcaat
          ***** ***** ***** ** * ***** ** * ***** *****

b      gttacaccacaagcagatgcagatattggtgctcaacaagggtggttgattacatccgcaga
d      gctagaccagaagcagatgcagatattggtgctcaacaagggtggttgattacatccgtaga
a      atcagaccagaagcagatgcagatattggttctgaacaagggtcattgattacatccgcagg
c      atcagaccagaagcagatgcagacattggtgctcaacaaggtaattgattacatccgcagg
          * ** * ***** ***** ***** ** ***** ***** ***** **

b      gagtacaatatcagtcatgtaaccatacaaatcgagcgctaa
d      gagtacaatatcagtcatgtaaccatacaaatcgagcgctaa
a      gagtacaatatcagtcacgtcacaatacaaatcgagcgctaa
c      gagtacaacattagtcattgacgatacaaatcgagcgctaa
          ***** ** ***** ** * ***** ***** *****

```


Figura 3.1 B- Allineamento nucleotidico di HMA di *A. thaliana*, *A. halleri* e *T. caerulescens*

```

A.halleri          -----ATGGCGTCACAAAACAAAGAAGAAGAGAAAAAGAAAGTGAAGAAGTTG 48
T.caerulescens   ATGGCGTTACAGAAGGAGATCAAGAACAAGAAGAAGATAAAAAGCAAAAGAAGAGTGG 60
A.thaliana       -----AACAAAGATGGCGTCGAAGAAGATG 25
                  * * * * *
A.halleri          CAAAAGAGTTACTTCGATGTTCTCGGAATCTGTTGTACATCGGAAGTTCCTATCATCGAG 108
T.caerulescens   CAGAAGAGTTACTTCGACGTTTTGGGAATCTGTTGTACATCGGAGATTCCCTCTGATCGAG 120
A.thaliana       ACCAAGAGTTACTTCGATGTTCTTGGAAATTGCTGTACATCGGAGGTTCCGTTGATCGAG 85
                  *****
A.halleri          AATATTCTCAAGTCTCTCGACGGCGTTAAGGAATATACCGTCATCGTTCCTCGAGAACC 168
T.caerulescens   AATATTCTCAAGTCTCTCGACGGCGTTAAGGAATATACCGTCATCGTTCCTCGAGAACC 180
A.thaliana       AATATTCTCAATCCATGGACGGTGTAAAGAATTCTCTGTTATTGTTCCGTCGAAGAACC 145
                  *****
A.halleri          GTGATCGTTGTTACACGACGCTCCTCATCTCTCCCTTCCAAATTGCTAAGGCATTGAAC 228
T.caerulescens   GTGATCGTTGTTCCACGACAGTCTCCTCATCCCCCGGTTCCAAATTGCTAAGGCATTGAAC 240
A.thaliana       GTCATCGTCCGTCACGACTCTCATCTCTCGCAGTTCCAAATCGTTAAGCACTGAAC 205
                  **
A.halleri          CAAGTAGGTTAGAAGCAAACGTGAGAGTAAACGGAGAAACAACTTCAAGAACAATGG 288
T.caerulescens   CAAGCGAGGTTAGAAGCAAACGTGAAAGTAAACGGAGAAACCACTTCAAGAATAAATGG 300
A.thaliana       CAAGCACAGTTAGAAGCAAATGTGAGGGTAAACGGAGAAACCAATTTCAAGAATAAATGG 265
                  *****
A.halleri          CCAAGCCCTTTGCGGTGGTTTCCGGCATACTTCTCCTCCTCCTCTTAAAGTTTGTG 348
T.caerulescens   CCGAGCCCTTTGCGGTGGTTTCCGGCATACTTCTCCTCCTCCTCCTTAAATTTGTA 360
A.thaliana       CCAAGTCCCTTTGCGGTGGTTTCCGGCATACTTCTCCTCCTCCTCCTTCAATACCTT 325
                  **
A.halleri          TACTCGCCTTAAATCGGATTGCAGTCGACGAGTGGCCGCGGTATATATCCGATACTT 408
T.caerulescens   TACCACCTTTCGATGGGTAGCTGTCGTTGGGCGTGGTGGTATTATCCGATTCTT 420
A.thaliana       TACTCCTCCTCCTGTTGGCTCGCTGTCGACGCGTGGTGGCATTATCCGATATTA 385
                  ***
A.halleri          GCCAAAGCCTTTGCTTCCATTAGAAGGCTTAGGCTCGACATCAACATATTGGTCATTATA 468
T.caerulescens   GCAAAAGCCGTCGCTTCTATAAGAAGGCTTAGGCTCGACATCAACATCCTAATCATTATC 480
A.thaliana       GCCAAAGCTGTAGCATCTCTTGAAGGTTTAGAATCGACATCAACATCCTTGTGTTGTA 445
                  **
A.halleri          ACCGTGATAGCAACTTGCAATGCAAGATTTTCATGGAGGCTGCAGCAGTTGTGTTCTTG 528
T.caerulescens   ACAGTGGCTGCAACACTTGCAATGCAAGATTTTCATGGAGGCTGCAGCAGTTGTGTTCTTA 540
A.thaliana       ACCGTGGGAGCAACAATGGCATGCAAGATTACACAGAAGCTGCAGTAGTTGTCTTCTTG 505
                  **
A.halleri          TTCACCATATCCGACTGGCTTGAACAAGAGCTAGCTACAGGGCGCAGCAGTAATGCAG 588
T.caerulescens   TTCACCACAGCTGACTGGCTGGAACAAGAGCTAGCTACAAGGCCAACTCGGTGATGCAG 600
A.thaliana       TTCACAATCGCTGAAATGGCTCCAATCTAGAGCTAGCTATAAGGCAAGTGCAGTGCAG 565
                  *****
A.halleri          TCTCTGATGAGCTTAGCTCCACAGAAGGCAATAATAGCAGAGACTGGTGAAGAAGTTGAA 648
T.caerulescens   TCTCTGATGAGCTTAGCTCCACAAAAGGCAATAATAGCAGAGACTGGAGAAGAAGTTGAA 660
A.thaliana       TCTTTGATGAGTTAGCTCCACAAAAGGCGGTGATGTCAGAGACTGGAGAAGAAGTTGAA 625
                  **
A.halleri          GTAGATGAGGTTAAGGTTAGCACAGTTGTAGCGGTTAAGCTGGTGAACCATTCCAATT 708
T.caerulescens   GTAGATGAGGTTAAGGTTAGCACAGTTGTAGCGGTTAAGCTGGTGAACCATTCCAATT 720
A.thaliana       GTGGATGAACTCAAGACTAACACAGTTATAGCTGTCAAAGCTGGTGAACCATTCCAATT 685
                  **
A.halleri          GATGGAATTGTGGTGGATGGTAACTGTGAAGTAGACGAGAAAACCTTAACGGGCGAAGCA 768
T.caerulescens   GATGGAATTGTGGTGGATGGTAACTGTGAAGTAGACGAGAAAACCTTAACGGGCGAAGCA 780
A.thaliana       GATGGAGTTGTTGTTGATGGAACTGTGAAGTTGATGAGAAAACCTTTGACCGGTGAAGCA 745
                  *****
A.halleri          TTTCTGTGCCGAAACAGAAGATTCTTCGGTTTGGGCTGGAACCATCAATCTAAATGGT 828
T.caerulescens   TTTCTGTGCCGAAACAGAAGATTCTTCGGTTTGGGCTGGAACCATCAATCTAAATGGT 840
A.thaliana       TTCCCGTGCCTAAACTGAAAGATTTCGACGTTTGGGCTGGAACCATCAATCTAAATGGT 805
                  **
A.halleri          TACATAAGTGTGAAAACAACCTTCTTTAGCGGGTGTGCGTGGTTGCGAAGATGGCTAAG 888
T.caerulescens   TATATAAGTGTGAACACAACCTGCTTTAGCTAGTGTGCGTGGTTGCGAAGATGGCTAAG 900
A.thaliana       TACATAACTGTGAACACCCTGCTTAGCTGAGGATGCGTGGTTGCGAAGATGGCAAAA 865
                  **
A.halleri          CTAGTAGAAGAAGCTCAGAGCAGTAAAACCAATCCCAAAGACTAATAGACAAATGTTCT 948
T.caerulescens   CTCGTAGAAGAAGCTCAGGCGAGTAAAACCAATCTCAGAGACTAATAGACAAATGTTCT 960
A.thaliana       CTTGTAGAAGAAGCTCAGAACAGCAAACCGAACTCAGAGATTTATAGATAAATGTTCC 925
                  **
A.halleri          CAGTACTATACTCCAGCATCATCGTAGTATCAGCTTGGCTGCCATTGTCCCGGTTATT 1008
T.caerulescens   CAGTACTATACTCCAGCAATCATATAATATCGGCTGGCTTTGCGATTGTCCCGGCTATA 1020
A.thaliana       AAGTACTATACTCCAGCATCATCTTCTGATATCAATCTGTTTGTGGCTATCCCAATTGCA 985
                  *****

```

A.halleri ATGAAGGTCCACAACCTTAAACATTTGGTTCACCTAGCATTAGTTGTGTAGTCAGTGG 1068
T.caerulescens ATGAAGGTTCCACAACCTCAACCATTTGGTTTCATTTAGCACTGGTTGTGTAGTCAGTGC 1080
A.thaliana TTGAAGGTTCCACAACCTGAACCATTTGGTTCACCTAGCACTAGTTGTGTAGTAAGTGC 1045
***** **

A.halleri TGTCCCTGTGGTCTTATCCTCTCTACACCAGTTGCTACTTCTGTGCCTTACTAAAGCG 1128
T.caerulescens TGTCCCTGTGGTCTTATCCTCTCTACACCAGTACATTTCTGTGCCTTACTAAAGCG 1140
A.thaliana TGTCCCTGTGGACTTATCCTCTCCACACCAGTACCACTTTCTGTGCCTCACAAGGCA 1105
***** **

A.halleri GCTACTTCAGGGCTTCTGATCAAAGTGTGATTATCTTGACACTCTCTCAAAGATCAAA 1188
T.caerulescens GCAACTTCAGGGCTTCTGATCAAAGTGTGTCATCTTGACACTCTTTCAAAGATCAAA 1200
A.thaliana GCCACATCAGGACTTTGATCAAAGGAGCTGATTACCTTGAAACCTTAGCCAAGATCAAG 1165
** * **

A.halleri ATCGTGCTTTTCGACAAAACCGGACTATTACCAGAGGAGGTTTCATTGTCATAGATTT 1248
T.caerulescens ATCGTGCTTTTTCGACAAAACCGGAATACCTAGAGGAGGTTTCATTGTCATAGATTT 1260
A.thaliana ATTGTTGCTTTTGTATAAACCGGACTATCACAGAGTGCATCGTCATGGATTT 1225
** * **

A.halleri AAGTCACTCTCTAGAGATATAAGCCTACGTAGCTTGCTTACTGGGTATCAAGTGTGAA 1308
T.caerulescens AAGTCACTCTCTAGAGACATAAGCCTACGCAGCTTGCTTACTGGGTGTCAAGTGTGAA 1320
A.thaliana CAGTCACTTTCTGAAGATATAAGCCTGCAGAGTCTGCTTACTGGGTATCAAGCAGCTGAG 1285
***** **

A.halleri AGCAAGTCAAGTCATCCAATGGCTGCAACAATCGTGGACTACGCGAAATCCGTTTCTGTT 1368
T.caerulescens AGCAAAATCAAGTCAACCAATGGCAGCAACGATTGTGGACTATGCTAAATCTGTTTCTGTT 1380
A.thaliana AGCAAGTCAAGCCATCCAATGGCTGCAGTGTGGACTATGCAAGATCTGCTCTGTT 1345
***** **

A.halleri GAGCCTAGGCCTGAAGAGTGTAGGACTACCAGAATTTCCAGGTGAAGGAATCTACGGG 1428
T.caerulescens GAGCCTAGGAGTGAAGAGGTTGAGGATTATCAGAATTTCCCTGGTGAAGGAATCTATGGG 1440
A.thaliana GAACCTAGCCTTGAAGCGGTGAAGACTACCAGAATTTCCAGGAGAAGGATTTATGGG 1405
** * **

A.halleri AAGATTGATGGGAACGATATCTACATCGGGAACAAAAGGATTGCTTCTCGAGCTGGTGT 1488
T.caerulescens AAGATTGATGGGAACGATATCTACATCGGGAACAAAAGGATTGCTTCTCGAGCTGGTGT 1500
A.thaliana AAGATTGATGGTAAAGAAGTCTATATCGGTAACAAAAGGATTGCTTCTAGAGCTGGGTGT 1465
***** **

A.halleri TCAACAGTTCAGAGACTGAAATGATACCAAAGGTGGGAAGACTGTTGGATACGCTCTAT 1548
T.caerulescens TCAACAGTTCAGAGACTGAGGTTGATACCAAAGGTAAGGAAAGACTGTCGGATACGCTCTAT 1560
A.thaliana TTATCAGTTCAGATATTGATGTTGATCTAAAGGAGGAAGCAATTGGATATGTATAT 1525
* * **

A.halleri GTAGGTGAAAGACTAGCTGGAGTTTCAATCTTTCTGATGCTTGTAGATCAGGTGTATCT 1608
T.caerulescens GTAGGTGAAAGATTAGCTGGAGTTTCAATCTTTCCGATGCTTGTAGATCCGGAGTAGCT 1620
A.thaliana GTTGGAGAAACACTAGCTGGTGTTTCAATCTCTCAGATGCTTGTAGATCTGGTGTAGCT 1585
** * **

A.halleri CAAGCAATGAAAGAATAAAATCTCTAGGAATCAAACCGCAATGCTAACGGGAGATAGT 1668
T.caerulescens CAAGCAATGAAAGGACTCAAAGATCTTGGAAATCAAACCGCAATGCTAACAGGAGATAAT 1680
A.thaliana CAAGCCATGAAAGAATAAAATCGTTGGAAATTAAGATTGCAATGCTTACCGGAGATAAT 1645
***** **

A.halleri CAAGCTGCGGCAATGCATGCTCAAGAACAGCTAGGGAATGTTTGGATGTTGTGCATGGA 1728
T.caerulescens CAAGATTCAAGCAATGCAAGCTCAAGAACAGCTAGGGAATGCTTGGATGTTGTTCATGGA 1740
A.thaliana CATGCCGCTGCAATGCATGCTCAAGAACAGCTAGGAAATGCTATGGATATTGTAGAGCA 1705
** * **

A.halleri GAACTTCTTCCAGAAGATAAAATCTAAAATCATACAAGATTCAAGA--AAGAAGGACCA 1785
T.caerulescens GAGCTTCTTCCAGAAGATAAAATCCAAAATCATACAAGATTCAAGA--AAGAAGGACCA 1797
A.thaliana GAGCTTCTTCCAGAAGATAAAATCTGAAATCATAAAACAGTTAAAGAGAGAAGAAGGGCCA 1765
** * **

A.halleri ACCGCAATGGTAGGGACGGTGTGAATGATGCACCAGCTTTAGCTACAGCTGATATTGGT 1845
T.caerulescens ACTTGTATGGTAGGAGATGGTGTGAATGATGCACCAGCTTTAGCTAATGCTGATATTGGT 1857
A.thaliana ACGCTATGGTAGGGACGGTGTGAATGATGCACCAGCTTTAGCTACAGCGGATATTGGT 1825
** * **

A.halleri ATCTCCATGGGATTCTGGCTCTGCTCTGCAACACAGACTGGTCATATATTCTCTGATG 1905
T.caerulescens ATCTCCATGGGATTCTGGCTCTGCGCTCGGACGACAGACTGGTCATATCATTCTCATG 1917
A.thaliana ATCTCAATGGGTGTTCCGGCTCTGCACTTGCACAGAGACTGGTAATATAATTCTCTGATG 1885
***** **

A.halleri TCTAATGACATAAGAAGGATACCACAAGCGGTGAAGCTAGCGAGAAGAGCTCGGCGCAA 1965
T.caerulescens TCAAATGATATCAGAAGATACCACAAGCGGATAAAGCTAGCAAGAAGAGCTCAGCGGAAA 1977
A.thaliana TCCAATGATATCAGAAGAATACCGCAGCGGATAAAGCTTGCAAAAAGAGCGAAAAGGAAA 1945
** * **

A.halleri GTTATTGAAAACGTGTGCTTTCCATCATTTTAAAAGCAGGAATACTGGCTTTGGCATT 2025
T.caerulescens GTTCTTCAAAAACGTGATCATCTCCATCACTTTGAAAGTAGGATACTGGTTTTCAGCATT 2037
A.thaliana GTGGTGGAGAATGTGGTCATATCAATCACTATGAAAGGAGCTATTCTGCATTGGCATT 2005
** * **

A.halleri GCTGGTCATCCCTTTGATTTGGGCAGCGGTTCTGTTGACGTAGGAACTGTTTGGCTGTG 2085
T.caerulescens GCTGGTCATCCCTTTGATTTGGGCTGCGGTGCTTACTGATGTAGGAGCTTGCTGATTTGTG 2097
A.thaliana GCTGGTCATCCGCTGATTTGGGCAGCTGTTCTTGCAGATGTAGGAACTGTCTGCTTGTG 2065
***** **

A.halleri	GATGTTGTATGGACAA-AGAAGAAGTGAC---ACAAATCTGCGGCTTGAAACTGAAGGT	3117
T.caerulescens	GGTGATGAAAAGAAAACAGAGGAGATAACTGAAGAGACGGACAATCTGAAAAGTGAAGT	3189
A.thaliana	-----	
A.halleri	GGTGGTGATGCAAAATCACATTGTTGTGGAACGGGTTGACACAAGAAGGGTCTTCGAAG	3177
T.caerulescens	GGTGATGACTGCAAAATCTCCTTGCTGTGGAACGGTTTGAAGCAAGAAGGGTCTTCTAGT	3249
A.thaliana	-----	
A.halleri	TTGGGCAATGT-----GGAGAGTGCTCAATCCGG---AGGCTGT-----	3213
T.caerulescens	TTGGTCAATGTTGTGGTGGAGAGTGGTGAATCCGGGTCAAGCTGTTGCAGCAAGGAGGGA	3309
A.thaliana	-----	
A.halleri	GGAACAGTGAAAGTCTCTAGTCAAAGCTGTGCACTAGTTCTACTGATCTGGTGCTATCT	3273
T.caerulescens	GAGATAGTGAAAGTCTCTAGCCAAAGCTGTTCGCAAGTCCAAGTATGTTGGTGTATCT	3369
A.thaliana	-----	
A.halleri	GACTTGCAAGTGAAGAAGGATGAGCATTGTAAGAGCTCACACGGAGCTGTCAAGGTAGAG	3333
T.caerulescens	GACTTGGAAGTCAAGAACTAGAGATTTGTTG-----CAAAGCGAAG	3411
A.thaliana	-----	
A.halleri	ACCTGTTGCAAAGTGAAGATTCCAGAGGCTTGTGCATCGGAATGTAAGGAAAAAGAGAAG	3393
T.caerulescens	A-----AGACTCCAGA---GGAGGTTTCGTGGATCTAAATGTAAGGAAACAGAGAAG	3459
A.thaliana	-----	
A.halleri	CGTC---ACAGTGGTAAAAGCTGTTGCAGGAGTTATGCAAAAGAGTTTGCAGCCAC---	3447
T.caerulescens	CGTCACCACGTTGGTAAAAGCTGTTGCAGGAGTTATGCAAAAGAGTATTGCAGCCACAGG	3519
A.thaliana	-----	
A.halleri	CGCCACCACCACCACCACCATCACCATGTGAG---TGCTTGA	3486
T.caerulescens	CATCACCACCACCACCACCACCATGTTGGGGCTGCTTGA	3561
A.thaliana	-----	

Figura 3.1 C. Allineamento nucleotidico di YSL da *Thlaspi caerulescens* *Nicotina tabacum*, *Vitis vinifera* e *Arabidopsis thaliana*

T. caerulescens	-----	
N. tabacum	AGAGTGGCCATTACGGCCGGGATTTCTGAATATAACCATTCTTGATTTTGTTTAATTGGAT	60
V. vinifera	-----	
A. thaliana	-----	
T. caerulescens	-----	
N. tabacum	TGAGGGGTTCAAGTTTTCTAATTTCTATACCCTTTTGTGCGACCATGAGAACCTCTCTGTAA	120
V. vinifera	-----	
A. thaliana	-----	
T. caerulescens	-GAGGTGAAATAACACATGATAGATTGATATGTGGTCTGATGAG-----TGATGATC	51
N. tabacum	ACAGGACAAAAAATTGTCAAACCATTTGTCGCTATCTGTTGAGCATTCTTCTTGATATTC	180
V. vinifera	-----	
A. thaliana	-----CTATTTTTT	9
T. caerulescens	ATACAATGTGTCGTT-TCGTATGATTTGGGCGTGAAGCAAGAAAATTTCTAAACTCTA	110
N. tabacum	AAAAAGTGAAAAAATCGATTTCTTTCCACTTCAGAGATTGTCAACTGAACCTCTCTGTC	240
V. vinifera	-----	
A. thaliana	GTACACTTAGAC---TAAGGAAAGCAAAGTTTCATATTCCTAAAAATTTCTGGTPTTATA	65
T. caerulescens	TTAAAAATCCCAGAATCGGATTGATCCAAAATAG-GAAGAAAAAATGAG-GAACTCGA	168
N. tabacum	CTGAAAAAGAATAGA--CAGGCTCTTTTACATTT-TTTGGGAAAAATGAGTAGAGTTGG	297
V. vinifera	-----GAAG	4
A. thaliana	AGTATCAAAGACAAATTCAGTCTCCATGGAAATAGAGCAAAGAAGGATCATGAAGAGAGA	125
T. caerulescens	TGGTGGGGGAGAGAGAGGCAAGAACTGAGATAGAGAGAGAAAAAGAGATGACTTGGAGG	228
N. tabacum	TGTAATGAGAGAAAGAGGAGAAGGAA-AAATCAATGGAAATACAAAGAGAGAAATGGAAG	356
V. vinifera	AATAGTAAGGCAAAAACATGGAACTGAGCTGAAAGAGATAGAGAAGGAGGACAAGGAGG	64
A. thaliana	AGGAGAAGAAGAAGACAACATCAACTTTC---ACTGCAAGAAGAAGAACAGATA	181
	* * * * *	
T. caerulescens	AAACGCAAAACGAAGCAGATGAATACAGGTCAATTCCTCCATGGAAGAGTCAAACTCACTT	288
N. tabacum	AAGTGAGAGACTATTCTGAAGAAGTGAAGAGAATTCCTCCTTGACAAAACAGATAACAG	416
V. vinifera	TACAGTCGGAAAAAGCTGAGGAGACGAAGAGGTTACCTCCATGGACAAAAGCAGATAACTG	124
A. thaliana	CAGAGGAAGAGATGTCTGG-----GAGGACAATCGAACCGTGACGGAAGCAGATAACGG	235
	* * * * *	
T. caerulescens	TCAGAGGAATCGTTGCAAGCTTGATCATTGGTGTCTACAGTGTGATCGTTCATGAAGC	348
N. tabacum	TTCGTGGGATTGTAGCAAGTGTGTTGATTGGAATTAATACAGTGTGATAGTAACGAAGC	476
V. vinifera	TAAGGGGAGTCATTGCCAGCATTGTGATAGGGAGCATGTACAGTGTGATAGCCATGAAGC	184
A. thaliana	TGAGAGGAGTGTTCGTGACATAGTGTGCGAGTTGTGTTTCAGTGTGATGCTCAGAAGC	295
	* * * * *	
T. caerulescens	TAAACCTAACACAGGTTTGGTTCGCAACCTAAACGTCTCTGCAGCACTTTTAGCCTTTG	408
N. tabacum	TTAATCTGACTACTGGACTTGTCCCAAATCTTAATGTATCAGCTGCTCTCTTGCCATATG	536
V. vinifera	TGAACCTCACAGTTGGGCTTACTCCTAATCTCAACATCTCTGCCGCCCTTCTCGCCTTTG	244
A. thaliana	TAAATCTCACGACAGGAATGTTTCCAAAATCTCAACAGCTCTGCAGCTTACTTGTGTTG	355
	* * * * *	
T. caerulescens	TGTTCTTAGAAGCTGGACCAAGCTACTCACCAAAGCTGGGATTATGACTAAACCCTTCA	468
N. tabacum	TATTCATACAGTCATGGACCAAGATTCCTTAAAAAGGCCAATTTTGTATACACTCCTTTTA	596
V. vinifera	TGTTTCATCCGGACATGGACAAAGCTGCTCCACAAGACCGGTTTCGTGACAACCCCATTC	304
A. thaliana	TCTTTGTCCGACTTGGACTAAGATTCTCAAGAAATCAGGATTTGTTGCGAAACCATTC	415
	* * * * *	
T. caerulescens	CCAAACAAGAGAACACTGTTGTCCAAACATGTGCTGT-TGCATGTACAGCA--TTGCAG	525
N. tabacum	CTAGACAGGAGAACTACTATTATTAGACTTGTGCTGTCTGCATGTTACAGCCACTTGCCG	656
V. vinifera	CCCCGCCAGGAGAAATACCATGATCCAGACATGTTTCAGT-TGCATGCTATAGCA--TTGCTG	361
A. thaliana	CAAGACAAGAGAACACAAATGATTCAGACATCTGCTGT-TGCTTGTACGGCA--TCGCTG	472
	* * * * *	
T. caerulescens	TTGGAGGTGGGTTTGGTTCGTACCTTCTTGCTTTGAACAAGAAAATTTATGAACAGTTCAG	585
N. tabacum	TGGGAGGTGGATTGGATCATATCTTTTGGGATTGAACAAGAACATATGAGCAAGCAG	716
V. vinifera	TTGGAGGTGGTTTTGGGTTCTTATCTGTGGGTTGAATAGGAAGACGTATGAGCTGGCGG	421
A. thaliana	TCGGAGGTGGGTTTGCTTCAATCTTCTGGGTTAAACCATAAGACATATGTGTGCTCTG	532
	* * * * *	
T. caerulescens	GAGATCATACGGAAGGAATAGTCCGGGAAGCACGAAAGAGCCCGGTCTCGGTTGGATGA	645

N. tabacum GAGTCGATACAGAAGGGAATACACCAGGAAGCCACAAGGAACCTAGTCTTGATTGGATGA 776
V. vinifera GGATCAACACAGAAAGAACTCTCCAACCTAGTATCAAGGAGCCGGGGCTTGGCTGGATGA 481
A. thaliana GTGTGAACCTGGAAGGTAACCTCTCCAAGAGTGTGAAAGAACCTGGCCTTGGTTGGATGA 592
* * * * *

T. caerulescens CCGCTTTCTGTTCTTTACATGCCTTGTGGTCTTTTGGCATTAGTTCCTCTAAGGAAGA 705
N. tabacum TTGGTTTTCTCTTTGTTGTAGCTTTGTGGGCTATTAGCTTTAGTTCCTCTAGAAAGA 836
V. vinifera TTGGCTTCTCTTTCTAGTTTGTGGTCTTTTGTGCTGATTCCTCTCAGAAAGG 541
A. thaliana CTGCTTATCTCTTTGTTGCTGTTTCATCGGTCTTTTGTCTAATCCCTCTCCGAAAGG 652
* * * * *

T. caerulescens TCATGATCATAGACTACAAGCTAACATATCCGAGTGGAAACAGCTACTGCGGTTTTAATCA 765
N. tabacum TCATGATAATTGACTATAAATTAGCTTATCCAAGTGGGACTGCAACTGCTGTTCTTATCA 896
V. vinifera TCATGATAATCGACTACAGATTAACATATCCAAGTGGGACAGCAACTGCAGTTCTCATCA 601
A. thaliana TTTATGATTGTTGACCTTAATAATTAACATATCCGAGTGGTTTAGCTACTGCGGTTCTCATCA 712
* * * * *

T. caerulescens ATGGCTTCCACACTCCTAAAGGCAATAAAATGGCCAAGAAACAAGTGTGGGTTTGTGA 825
N. tabacum ATGGGTTTCATACTCCCAAGGGAGATAAAATGGCCAAGAAACAGGTTAAAGGTTTCATGA 956
V. vinifera ATGGTTTCCATAGCC---AGGGCGATAAGTTGGGGAAGAGCAGGTTCTGTTGGTTTATGA 658
A. thaliana ATGGCTTCCACACAC---AAGGAGATGCACAGGCCAAGAAACAAGTGCCTGTTTTCATGA 769
* * * * *

T. caerulescens AGTACTTCTCATTAGCTTCATTGGGGCTTCTTTCAATGGTTCCTCTCTGGTGGCTCAA 885
N. tabacum AAGTTTTCTCAATGAGCTTCTTATGGAGTTTCTTTTCAGTGGTTTTATTCTGGTGGAGATC 1016
V. vinifera AGTCTTCTCAATGAGTTTCTTTGGGGTTTTTCCAATGGTTTTACACAGGGAAGAGG 718
A. thaliana AATACTTCTCATTAGTTTCTTTGGGGTTTTCTTCCAGTGGTTTTTCTCTGGTATGAAG 829
* * * * *

T. caerulescens CCTGTGGATTCAATCAGTTTCCAACCTTTCGGATTAGAAGCTTACAAGAACTCATTCTACT 945
N. tabacum AATGTGGATTTGCCCAATTTCCACGTTTCGGATTGAAAGCTTGGAAACAATCATTTTACT 1076
V. vinifera AATGTGGATTTGCTCAGTTCCCTACTTTCGGATTGCAAGCTTGGAAAGCAACGTTCTACT 778
A. thaliana AATGTGGCTTTGCTCAATTTCCACCTTTGGTTTGAAGCTTGGAAACAACGTTCTTCT 889
* * * * *

T. caerulescens TCGACTTTAGCATGACATACATTGGAGCAGGAATGATCTGTTCCCTACATTGTTAACTTAT 1005
N. tabacum TCGATTTTCAGCATGACTTATGTTGGAGCTGGAATGATCTGTTCCCACTTAGTGAAGTTGT 1136
V. vinifera TCCAATTCAGCATGACTTATGTTGGAACTGGGATGATCTGTTCCCACTTGTGAAGTTGT 838
A. thaliana TTGATTTTCAGCATGACATTTGTGGGAGCAGGAATGATTGTTTTCACATTTGGTTTAACTTT 949
* * * * *

T. caerulescens CTTTGCTTTTTCGGCGGATTTCTGCTTGGGGAATCATGTGGCCTCTCATTAAAGTCTTA 1065
N. tabacum CTTTGCTTCTCGGAGCTGTTCTCTCTTGGGGGATCATGTGGCCTCTAATGGTGAACGCA 1196
V. vinifera CTTTGCTTCTGGAGCTGTGCTCTCTTGGGGGCTAATGTGGCCACTCATCGGTAGTCTCA 898
A. thaliana CTTTGCTTTTAGGAGCTATCCTCTCTTATGGCTTAATGTGGCCTCTTCTGTATAAAGTTA 1009
* * * * *

T. caerulescens GCGGAGATTGGTATCCTTCAGATCTTCCCTCAAGGCAGCATGAAGAGTCTCAATGGCTACA 1125
N. tabacum AAGGATCTTGGTTTTCCTGCAACTTTACCGCAGAGCAGTATGAAGAGTCTAAGTGGTTACA 1256
V. vinifera AGGGCGAGTGGTTTCCAAGGAATTTGCCAGACAGCAGTATGAAGAGTCTAAATGGTTATA 958
A. thaliana AGGGCTCTGGTTCCCTGATAATCTGCAGCAACACAACATGAAGAGCATTACGGCTACA 1069
* * * * *

T. caerulescens AGGTGTTTCATATCAATCTCATTGATCCTCGGAGACGGGCTTACCATTTCATCAAGATCC 1185
N. tabacum AGGTTTTTATCTCCATTGCTCTCATCTCGGGAGATGGCCTATAACAATTTGTGAGGACAC 1316
V. vinifera AGGTTTTTATCTCGGTTTCTCTCATCTAGGTGATGGACTCTACAATTTCTGTCAGGATAC 1018
A. thaliana AAGTCTTCTTATCCGTAGCTCTAATCCTCGGCGACGGTCTTTACACTTTCGTTAAGATCC 1129
* * * * *

T. caerulescens TCCTTTTTCACAGCAAGAAACATGTACAACAAGTTAATGA-ATCACCGCTCTGGCAAAAC-- 1242
N. tabacum TTTTTTTTCACTGGTAGAAGCATAATGTCTCCCTGAAAACAAGGAGGCCCGAATCATCAG 1376
V. vinifera TGTATTTTTCGATCACAAGTATCTACGGTAGACTGAAGC-GCCAGCGCCAGAACCTCAA 1077
A. thaliana TCTTTGTGACCATTGCCAATGTCAACCGCAAGATTGAAGA---ACAAACCTAATGATCTA 1185
* * * * *

T. caerulescens -CTAATTCGAGAACGATAAACAATCTGTTGCAGATCTTCAAAGAGATGAGATCTTTGTA 1301
N. tabacum -CCGCAGCAGACAACAAGAATCAGCCCTTGATGAGCTGCAGAGAAACGAAATATTCATA 1435
V. vinifera ATAGATGGAGATGAGCAGACTAAGACACTGGATGATCTAAAACAAGACGAAGTTTTCATT 1137
A. thaliana GATGACGTAGGTACAAGAAACAA---CGGAAAGATCTCAAGGAAGATGAGAATTCCTC 1242
* * * * *

T. caerulescens AGAGACAGCATTCTTTATGGGTTGAGCAGTGGATACGAGCTTCTCTGCTGCTCTCG 1361
N. tabacum AGAGAGAGCATTCCCTTATGGCTAGCTTGTATTGGTTACATGGTTTTCTCCCTTATCTCC 1495
V. vinifera AGAGAATCCATTTCCCTGTGGATGGCAGTCACTGGATACATTACCTTCGCGGTTCTTTCA 1197
A. thaliana AGAGATAAATCCCAATGTGGTTCCGAGTTTCCGGATATCTTACATTCGCTGCGGTCTCA 1302
* * * * *

T. caerulescens ATCATCGCGATCCCTCTCATGTTCCCTGAGCTCAAATGGTACTTCATTGTCGTCGCTTAC 1421


```

N.tabacum          CCAATTTGTATGGCTTTTACAGTAGGACAGG--CATAGTGAAATATCCTGATTCTTGAAA 2333
V.vinifera        CCAATCTGCATGAAGTTCTTGGCTTCATAGA--GG-----AAGCTCCATAA 2021
A.thaliana        CCGATATGTATGAAGTTCTTAGCTTCATAGGATCAGTCAAAGAGATAAGAAGACTTGTGA 2142
                  ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **
T.caerulescens    AGAAAATGTAGAATTTTATG---AGTTTTACCTTT-TGTTGTGTAGCGTTAAAATAGCTA 2243
N.tabacum         CCAGTGAGTAGGTGTTTGCAGAAAGCATTAGAAGTATAGAAATCATCAATGAGATAGCTG 2393
V.vinifera        AGAATGCTGGAGCATTAGGAAATGGTTTGCCCAACATGGGACCCAATATTGTAATACGGT 2081
A.thaliana        AGTTAGAGTACTTAGAAGACGTCATATGATATTAATAAAT-CATCCTATTCTTAGAATAACAG 2201
                  * * * * *
T.caerulescens    AGAAA---ATGTTTAGGAATTGCGGAAATAAAA-----TACAGTTTGAGAAG----- 2287
N.tabacum         ATAAACGTACTTTTAGGATGTTCTTAGCAAAGAGTTTTGTCAAGTACGAGAATACCTAAT 2453
V.vinifera        ATCAAC---TATATA-----TCAAGT-CGATATT----- 2106
A.thaliana        GTAGACTTCTGAACAAGAACATCTCTTCTCTAGGA--ATTAAGACTAAAATCT-----A 2254
                  * * * * *
T.caerulescens    TTTATATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA----- 2314
N.tabacum         CTTATGTTAGCCAAAAAAAAAAGGCAGGAATAAACATTCAACTTCTGTTGACGGCCTG 2513
V.vinifera        -TTATATCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA----- 2132
A.thaliana        CTTACATCCGGATGATTCATGCTCTGTTTTTTGGTTTGGTATAATTTGTCAACACATCTA 2314
                  *** * * *
T.caerulescens    ----- 2573
N.tabacum         AAATGCTACTGAAATGTCTTTCCAGTTGACAGTGAAAGCGGGATTGACAAGCCTCAAG
V.vinifera        -----
A.thaliana        GATCTGTTCCATTTCCGGTTATCTTCTATTGGGTTATCTCTGAAACTGTTATGGGCTCGG 2374
T.caerulescens    ----- 2633
N.tabacum         AGAGTGGATGTCAAGAAAAGCAGAACTAGAGGGAATAGGATTATCTAACCAAACAATGA
V.vinifera        -----
A.thaliana        CCCATAAATTTAAACCTTGGTGTAAACAAAAAGTAATAAAATCAGCTATTTAATCCT---- 2430
T.caerulescens    ----- 2690
N.tabacum         ATGAATGAAATAAAGGACGGTGGCTTTTGTGAACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
V.vinifera        -----
A.thaliana        -----

```


Figura 3.1 D Allinamento nucleotidico ZNT da *Thlaspi caerulescens Arabidopsis thaliana* e *Zea mays*

T. caerulescens	-----	
A. thaliana	CTCTGTTTAGTTATGCGTCAGTCTCTCATCAGTGTTCAACTGCCACGGAGCGAACCATT	60
Z. mays	-----GTGGCGCGGCCCTAAT	16
T. caerulescens	-----	
A. thaliana	CCTAATTGCAACGTCCCAGTCCATAGAATGTCGACACTCTTCACTCTTCTCCAAGTT	120
Z. mays	TTCCGCCGCTGTGCTCTGCACCGTCGCGCTTTCCTGGGCCACATGCTTATCTTCTCGCT	76
T. caerulescens	-----	
A. thaliana	GCCTCCTTTGAGTCCCTTCTCATATTTTATAGACTCACTTCTGTTTCTTGATCCCGAGG	180
Z. mays	GCTATTATTCCTTCCCTTCCAAATTTGGGTCGTGTTAATTCCTCCGTTGTCGTTAGTTT	136
T. caerulescens	-----	
A. thaliana	AAGAAGAAGAATAAACTCTTGTTCATGATCTTCGTCGATGTTCTTTGGAAATGTTTC	240
Z. mays	CCCTCCATTTACGCCGCTGAATGCGAGGCGGAATCGCAGTTTTTTTTGATAATTCAGT	196
T. caerulescens	-----TT	2
A. thaliana	CTCTATACTCGTTTGGATCAGGAAGAGACTCTCTCTCAGAGTCCATTTTGCAGATCATT	300
Z. mays	TGTTGCGTTGCTATGAATCGTAGGAGATGATGGAATCGTCGTACATCCGCACGTACCTGC	256
T. caerulescens	TGCAGACAATGGCTTCATCTCCCACGAAAATCCTCTGTGATGCTGGCGAATCAGACCTC-	61
A. thaliana	CCGAGACAATGGCTTCTTCTACCACTAAAATCCTCTGTGATGCTGGCGAATCAGACCTC-	359
Z. mays	AGCAGATGGCAGCGTCCGCTCCACGGCGAGCTGCGACCCGCTAGCGGCGCCGATGAGG	316
	*** ** * * * * * * * * * * * * * * *	
T. caerulescens	----TGTGAGACGATGCGCTGCATTTCTACTCAAATTCGTAGCCATTGCGTCAATCC	116
A. thaliana	----TGTAGAGACGATTCTGCTGCATTTCTCCTTAAGTTGTAGCCATTGCCTCCATT	414
Z. mays	TGGAGTGCCGCGACGAGGCGGCGCGCTGAGGCTTATGATGGTGTTCGTCGTGGCCATAC	376
	** * * * * * * * * * * * * * * *	
T. caerulescens	TCATAGCCGGAGCTGCAGGTGTAGCCATACCTCTCATCGCAAGAACCGCC-----	167
A. thaliana	TACTAGCTGGAGCTGCTGGTGTAGCCATACCTCTCATTGGCAGGAACCGCC-----	465
Z. mays	TCGTGCGAGGCGGACCGCGCTGCGATCCCGCTCGTCGCGCCGCGCTGCCACGGGCATG	436
	* *	
T. caerulescens	--GGTTCCTTCAA---CCGAAGGAAATCTCTTGTAGCTGCTAAAGCCTTCGCAGCCG	221
A. thaliana	--GGTTTCTTCAA---CCGAGGGAAATCTCTTGTAGCTGCTAAAGCCTTTGCAGCTG	519
Z. mays	GAGCCTCCTCCTCCTCCACCGGTGGGGCGTTTCGTGCTCGTAAAGGCGTTTCGCGGCCG	496
	* *	
T. caerulescens	GTGTCATACTCGCCACTGGCTTCGTCCATATGCTTGCAGGCGCCACGGAAGCTCTGACCA	281
A. thaliana	GTGTCATACTCGCCACCGGCTTTGTCCATATGCTTGCAGGTGGCACAGAGCTCTGAGTA	579
Z. mays	GGGTGATCCTGGCCACGGCTTCGTCCACATGCTGCACGACGCGGACGAGGCGCTCACGG	556
	* *	
T. caerulescens	ATCCGTGCTTACCGGACTATCCGTGGTCTAAGTTTCCCTTCCCGGCTTCTTTGCAATGG	341
A. thaliana	ATCCGTGTTTACCGGATTTCCGTGGTCTAAGTTTCCCTTCCCGGCTTCTTTGCAATGG	639
Z. mays	ACCTTGTCTCCCGCGCGCGCTGGCGCGCTTCCCGTTCAGGTTTCGTGCGCATGC	616
	* *	
T. caerulescens	TGGCTGCTTTGATAACTCTGCTTGTGGATTCATGGGGACACAGTACTATGAGAGTAAGC	401
A. thaliana	TTGCTGCTTTAGCTACTCTGCTTGTGATTTTCATGGGGACACAGTACTATGAGAGGAAGC	699
Z. mays	TCGCGGCGCTCGGGACGCTGCTCTCGACTTCGTCGGCACGCATATGTACGAGCGCAAGA	676
	* *	
T. caerulescens	AACAGAGGAACGAGGTTGCTGGTGGTGAAGCAACTGTGTTGAGGAGACATCATCTG	461
A. thaliana	AAGAGAGGAATCAGGCTGCTACTG-----AAGCCGCTGCTGGTAGTGAAGAGATGCTG	753
Z. mays	AGCACC---ACGCCGATCGGGAGG-----AAGCCGCGCTGCTGTTGGCAATGCCAGTG	727
	* *	
T. caerulescens	TTCTTCCCGTGGTTGTGGAAAGAGGGAATGATAGCAAAGCGTTTGGTGAAGAAGACGGTG	521
A. thaliana	TTGTTCCGTGGTTGGGAAAGAGTGACCGATAATAAAGTGTGTTGGTGAAGAAGACGGTG	813
Z. mays	CCAGTGCCAATGC-GAGCGGCCACGACGTGATCGTTGCGCTGCTACAGGACGGCGCGCTC	786
	* *	
T. caerulescens	GAGGGATGCA-TATTGTTGGCATTCGTGCTCATGCAGCTCACCATAA-----TCATAGTC	575
A. thaliana	GCGGGATGCA-CATTGTCGGCATTCGTGCACATGCTGCTCACCATAG-----GCATAGTC	867
Z. mays	GTGGCAGACACTGGCAGCAGCATTTGGGAGAGACGGGGAGGCCACAAGGACCCATGCAC	846
	* *	

Figura 3.1 E. Alinhamento nucleotídico NRAMP da *Thlaspi caerulescens* *Thlaspi japonicum* *Arabidopsis thaliana* e *Brassica juncea*

T. caerulescens	-----GAGCTCAAAAGCAGC---GGCACCGATTCTGA--AACACCTA	36
T. japonicum	-----ACTCACTTAGGACTTAGGATTAGCTCAAGCACCGACTCCA--AACACTCA	48
A. thaliana	TCAAGATAGTCGTCACCTTAGTCGCAGCACCCACCAATTTTGAATTTAGCATTTCTGA	60
B. juncea	-----	
T. caerulescens	A-ATTAGCAATTCGGAATCGCCGGTACCGGAAAG-ATGTCGGAGACGGAGAGAGAGCGTC	94
T. japonicum	ATACTGACGGT--GAAATCGCCGGTACCAGGAGAG-ATGTCGGAGTCGGAGAGAGCGCGTC	105
A. thaliana	ATTCCGACTCTGAGAATCGGCGGTTACCGGAAATATGTCGGAGACTGATAGAGAGCGTC	120
B. juncea	-----	
T. caerulescens	CGTTATTAGCATCGGAGGAGAGACTTACGAAGAACTGAGAAAGTTCACATAGTCGGAG	154
T. japonicum	CATTTTTAGAAATCGGAGGAGAAAGCTTTTGAAGAACTGACAAGTTCACGTTGTCTGGAG	165
A. thaliana	CGTTATTAGCATCGGAGGAGAGACTTATGAAGAAACCAGAAAGTTCATAGTCGGAA	180
B. juncea	-----	
T. caerulescens	TCGACGAAGAGGATGACGCTAACTACGACGAG---CTCGGAAATGCGCCTCGGTTCTCGT	211
T. japonicum	TCGACGAAGATGATGACGTCGGTTACGACGAG---CTCGGAAATGCGCCTCCGTTCTCAT	222
A. thaliana	TCGACGAAGAAGAAGACGCTGATTACGACGATGACCCCGGAAACTCTCTAAATCTCAT	240
B. juncea	-----	
T. caerulescens	GGAAGAAGCTATGGCTGTTCACCGGACCTGGTTTTCTGATGAGCATCGCCTTCCTCGATC	271
T. japonicum	GGAAGAAGCTTTGGCTGTTCACCGGACCTGGTTTTCTGATGAGCATCGCCTTCCTCGATC	282
A. thaliana	GGAAGAAGCTTTGGCTATTCACTGGACCTGGTTTTCTGATGAGTATCGCTTCCTCGATC	300
B. juncea	-----	
T. caerulescens	CCGGTAACTTAGAGAGTATCTCCAAGCCGGAGCCATCGCTGGTTACTCTTTGATTTGGC	331
T. japonicum	CCGGTAACTTCGAGAGCGATCTCCAAGCCGGAGCCATCGCTGGTTACTCTCTGATTTGGC	342
A. thaliana	CAGGTAATCTCGAGAGCGATCTTCAAGCTGGAGCCATCGCTGGTTACTCTTTGATTTGGC	360
B. juncea	-----	
T. caerulescens	TCTTGATGTGGGCAACGGCGATCGGGCTCTGATTAGCTTCTCTCTGCTCGTCTCGGGC	391
T. japonicum	TCTTGATGTGGGCGACGGCGATCGGGCTCTGATTAGCTTCTCTCTGCTCGTCTCGGGC	402
A. thaliana	TATTGATGTGGGCTACGGCGATTGGGCTCTGATTCAACTTCTATCTGCCCGTCTCGGTC	420
B. juncea	-----	
T. caerulescens	TCGCCACCGGTTCGACACCTGGCGGAGCTGTGTTCGGAAGAGTATCCGACTTGGGCCAGGA	451
T. japonicum	TCGCCACCGGCCGACACCTGGCGGAGCTGTGTTCGGAAGAGTATCCGACTTGGGCCAGGA	462
A. thaliana	TGGCGACGGGTAGACATCTGGCGGAGTTGTGTTCGAGAAGAGTATCCGACTTGGGCCAGGA	480
B. juncea	-----TGGCTGAGCTTTGTCTGTCGGGAGTATCCCACTTGGGCCAGGA	42
	**** *	
T. caerulescens	TGGTGCTTTGGATCATGGCGGAGATTGCTTTGATCGGTCGCGATATTCAGGAAGTCATCG	511
T. japonicum	TGGTGCTTTGGATCATGGCGGAGATTGCTTTGATCGGTCGCGATATTCAGGAAGTCATCG	522
A. thaliana	TGGTGCTTTGGATCATGGCGGAGATTGCTTTGATCGGAGCTGATATTCAGGAAGTTATTG	540
B. juncea	TGGTGCTTTGGATCATGGCGGAGATTGCTTTGATCGGTCGCTGATATTCAGGAGTTATCG	102
	***** *	
T. caerulescens	GAAGTGCCATAGCTATCAAGATCTTGCTAATGGATTGATTCCTCTCTGGGCTGGAGTTG	571
T. japonicum	GAAGTGCCATAGCTATCAAGATCTTGCTAATGGATTGATTCCTCTCTGGGCTGGTGTG	582
A. thaliana	GTAGTGCTATAGCTATCAAGATCTTGCTAATGGATTGGTTCCCTCTTTGGGCTGGTGTG	600
B. juncea	GTAGTGCCATAGCTATCAAGATCTTGCTAATGGGTTGGTTCCCTCTTTGGGCTGGTGTG	162
	* *	
T. caerulescens	TAATCACCCTCTCGATTGTTTCATATTTCTATTTCTGGAGAATTACGGAATAAGGAAAC	631
T. japonicum	TAATCACTGCTCTCGATTGTTTCATATTTCTAATTTCTGGAGAATTACGGAATAAGGAAAC	642
A. thaliana	TTATCACTGCTCTGATTGTTTCATCTTTCTATTTTGGAGAATTATGGAATAAGGAAAC	660
B. juncea	TTATCACTGCTTTGGACTGTTTCATCTTTCTATTTCTGGAGAATTATGGAATAAGGAAAC	222
	* *	
T. caerulescens	TAGAAGCTGTGTTTGCTATTTCTGATTGCAACAATGGCGGTTGCGTTTGTCTGGATGTTTG	691
T. japonicum	TAGAAGCTGTGTTTGCTATTTTGGATTGCAACAATGGCGGTTTTCATTTGCTTGGATGTTTG	702
A. thaliana	TAGAAGCTGTGTTTGCTATTTGATTGCAACAATGGCTCTTGCAATTTGCTTGGATGTTTG	720
B. juncea	TAGAAGCTGTGTTTGCTATTTCTGATTGCAACAATGGCGGTTGCAATTTGCTTGGATGTTTG	282
	***** *	

T.caerulescens GGCAGACGAAGCCCA**GTGGAACCGAACTTCTTGTGG**AGCGTTGGTACCAAAAACCTCAGCT 751
T.japonicum GCCAGACAAAGCCCTAG**TGGGAACCGAACTTCTTGTGG**AGCTTTGGTCCCAAAAACCTAAGCT 762
A.thaliana GTCAGACGAAACCC**GTGGAACCTGAGCTCCTTGTGG**AGCATTGGTCCCTAAGCTTAGCT 780
B.juncea GTCAGACGAAACCC**GTGGAACCTGAACTCCTTGTGG**AGCATTGGTCCCAAAAACCTCAGCT 342
* *

T.caerulescens CCAGGACTATCAAAACAAGCTGTTGGAATCGTGGGATGCATCATCATGCCACACAATGTGT 811
T.japonicum CCAGGACTATAAAACAAGCTGTTGGAATGTGGGATGCATCATCATGCCCTCACAAATGTGT 822
A.thaliana CCAGGACTATCAAAACAAGCTGTTGGTATTGTGGGATGTATTATCATGCCCTCACAAATGTGT 840
B.juncea CCAGGACAATAAAACAAGCGGTGGAAATCGTGGGATGCATTATCATGCCCTCACAACTCT 402
* *

T.caerulescens TCTTGCACTCTGCGCTTGTGCACTCGAGAGAAGTTGATCCGAAAAACAGATTCCGCTGTCA 871
T.japonicum ACTTGCACCTCAGCGCTTGFGCAATCGAGAGAAAATCGATCCGAAAAAGAGATTCCGCTGTCA 882
A.thaliana TCTTGCACTCAGCACTTGTGCAATCCAGAGAAGTCGATCCGAAAAAGAGATTCCGGGCTCA 900
B.juncea TCTTGCACTCTGCGCTTGTTCATCGAGAAAAGTTGATCCCAAAAAGAGATTCCGCTGTCA 462
* *

T.caerulescens AAGAAGCTCTCAAGTACTACTCCATTGAATCCGCCGGCGCTCTCGCGGTTTCCCTTCATCA 931
T.japonicum AAGAAGCCCTCAGGACTATTCCATTGAATCCACGGAGCTCTCGTGGTTTCCCTTCATAA 942
A.thaliana AAGAAGCTCTCAAGTACTACTCCATTGAATCCACTGGTCTCTGCGGTTTCTTTTCATTA 960
B.juncea AAGAAGCTCTCAAGTACTACTCCATTGAATCCACGGAGCTCTCGCTGTTTCCCTTCATCA 522
* *

T.caerulescens TCAACGTCTTTGTGACCACAGTCTTTGCTAAGTCTTTTACGGGACGGACATAGCGGAGA 991
T.japonicum TCAACGTCTGTGTGACCACCGCTTTGCTAATCTTCTATAAGACAGACATAGCGGATA 1002
A.thaliana TCAACGTCTTTGTGACCACCGGTGTTGCCAAGTCGTTTTTACGGGACAGAGATAGCGGACA 1020
B.juncea TCAATGTCTTTGTGACCACCGCTCTTTGCCAAGCTTTTACGGGACAGACATAGCGGACA 582
* *

T.caerulescens CTATCGGTCTTGCAAACGCGGGACAGTACTTACAGGACAAGTACGGCCGCGGATATTTTC 1051
T.japonicum CTATCGGTCTTGCAAACGCGAGATTACTTACAGGAAAAATACGGCCGCGGATATTTTC 1062
A.thaliana CCATCGGTCTTGCAAATGCTGGACAGTACTTACAGGACAATAACGGGGTGGGTTTTTTC 1080
B.juncea CCATCGGTCTTGCAAACGCGAGCAGTACTTGCAGGACAATAACGGCCGCGGTTTTTTC 642
* *

T.caerulescens CGATACTCTACATATGGGCCATCGGAGTTTTAGCTGCTGGTCAGAGTAGTACCATTACAG 1111
T.japonicum CGGTGACTATATATGGGCCGCTCGGACTTTTAGCTGCTGGTCAGAGTAGTACCATCACTG 1122
A.thaliana CGATACTGTATATATGGGCGATTGGAGTCTTAGCTGCTGGTCAGAGTAGTACCATCACAG 1140
B.juncea CAATACTCTACATATGGGCGATAGGAGTGTGGCAGCTGGTCAGAGTAGTACCATCACAG 702
* *

T.caerulescens GTACTTACGCCGGACAGTTTATAATGGGAGGGTTCTTGAATCTCAAGATGAAGAAATGGG 1171
T.japonicum GTACATACGCCGGACAGTTTATAATGGGAGGGTTCTTGAATCTCAAGATGAAGAAATGGA 1182
A.thaliana GTACGTACGCCGGACAGTTTATAATGGGAGGGTTCTTGAATCTCAAGATGAAGAAATGGG 1200
B.juncea GCACCTACGCACGACAGTTTATAATGGGAGGGTTCTTGAACCTCAAGATGAAGAAATGGG 762
* *

T.caerulescens TGAGAGCGTGGATCACGAGAAGCTGCGCGATCATCCCCACGATGATTGTTGCGCTTGTCT 1231
T.japonicum TTAGAGCGACAATCACAAGAAGCTGCGCGATCATCCCTACGATGATCGTGGCGATTGTCT 1242
A.thaliana TTAGAGCCTTGATCACAAGAAGCTGTGCAATCATACCAACAATGATCGTGGCGCTTGTCT 1260
B.juncea TCAGAGCCTTGATCACAAGAAGCTGCGCCATCGTCCCGACAATGATCGTGGCTCTTGTCT 822
* *

T.caerulescens TTGATTCTTCGGCTTCGATGCTCGACGAGCTCAACGAATGGCTAAACGTTCTTCAATCTG 1291
T.japonicum TTAATTCTTCGGCTACATTGCTCGACGAGCTCAACGAATGGCTAAACGTTCTTCAATCTG 1302
A.thaliana TTGATTCTTCGGATTCTATGCTTGTGAGCTCAACGAATGGCTAAACGTTCTTCAATCGG 1320
B.juncea TTGATTCTTCTGATTCTATGCTTGTGAGCTTAAACGATGGCTTAAACGTTCTTCAATCTG 882
* *

T.caerulescens TTCAGATCCCTTTTGCAGTCACTCCTCTCTTTGCTTGGTCTCTAACGAGCAAATCATGG 1351
T.japonicum TTCAGATCCCTTTTCGCTGTGATCCCTCTCTTTGCTTGGTCTCCAACGAGAGGATCATGG 1362
A.thaliana TTCAGATCCCTTTTCGCTGTGATCCCACTCCTTTGCTTGGTCTCCAATGAGCAAATCATGG 1380
B.juncea TTCAGATCCCTTTTCGAGTATCCCTTTGCTTGGTCTCGAATGAGCAGATCATGG 942
* *

T.caerulescens GGAGCTTCAAGATCCAACCTTTAGTGCAGACGATCTCGTGGATTGTAGCTGCTCTTGTGA 1411
T.japonicum GCAGCTTCAAATCAAACCTTTAATGCAGGCAATCTCGTGGCTTGTAGCTGCTCTTGTGA 1422
A.thaliana GCAGTTTCAAATCAAACCTTTAGTCCAACAATCTCATGGATAGTAGCTGCTCTTGTGA 1440
B.juncea GGAGCTTTAAATCCAGCCTTTAGTGCAGACCATCTCGTGGATCGTAGCTGCTCTTGTGA 1002
* *

T.caerulescens TATCTATTAACGGGTATCTGATGGTGGATTCTTCTCGGGTGTGCGAAGAGTGTGGTTT 1471
T.japonicum TAGCCATTAACCGGTATCTGATGGTAAATTTCTTCTCGGGAGCTGCGAAGAGTGTGGTTA 1482
A.thaliana TAGCCATTAATGGGTATCTAATGGTGGATTCTTCTCAGGAGCTGCAACGAATTTGATT 1500
B.juncea TAGCTATTAATGGGTATTTGATGGTGGATTCTTCTCAGGAGGTGCGACGAGTGTGGCTT 1062
* *

T.caerulescens TGCTCGTGCTTGTGATCATATTTGCTGTTGCGTATGTTCTGTTTTGTGCTTTACCTTATCT 1531
T.japonicum TGCTCGTGCTTGTGATCATATTCGTTGTTGCGTATGTTTTTTTTGTGCTTTACCTTATCT 1542
A.thaliana TGCTTGTGCCAGTGATCATATTCGCAATTGCTTATGTTGTGTTTTGACTTTACCTTATCT 1560
B.juncea TGCTTGTGCCGGTGATCATATTCGCTGTTGCGTATGTTGGTTTTGTGCTTTACCTTATCT 1122
**** * 1122

T.caerulescens CGAGAGGCCTCACGTACACT---CCTTG-CAATTAGTGGCTTCGCAGAAAGTATCAACAG 1587
T.japonicum CAAGAGGCCTCACGTACACT---CCCTGGCAGTTAGTGGCTTCGCAGAAAGTA---AAAG 1596
A.thaliana CACGAGGACTCACGTACACT---CCTTGCAACTAGTGGCTTCTTACATAAAGAACCAC 1617
B.juncea CAAGAGGCCTCACGTATACTACTCCTTGGCAGCTAGTGTGTCGCAGAAAGTT---ACAG 1179
* **** * 1179

T.caerulescens AGAGGGATGATGAGTAAGTGAAGCGAAGAGTAGAGAGAAAGGCTCTTTTACTTGA--T 1645
T.japonicum AGAGGGATGATGAGTAAGTATGT---AAACGCAGAGA-----CCATTTGCGTGA--A 1643
A.thaliana AGAGGGATGATGAGTAAAGGAAAAGCAAAGAGA-----CCTTTTCAATGA--A 1667
B.juncea AGAGGGATGATGAGTAAGTACAA---AAAAGCAAAGA-----CTCTTTTACTGAATGG 1230
***** 1230

T.caerulescens AGCTAAAAATCCGAAACTGTAACACACAGTAGAAAAGTTGGTTTTCATTAATATCTCACATA 1705
T.japonicum GAATAAGA-CAAGAGAGAAAGGCTCTCTTTGATTAAAAA----- 1691
A.thaliana GAATAAGAATAAGAGAG-ATTGCTCTTTTGTGAAAACAAACAATAGAAAAGTTGAGTTTC 1726
B.juncea GAATAAATCTGGAAACTGAAACAAACAATAGAAAAGTTGGTTTTCATCAGTAGTAGTATGG 1290
*** * 1290

T.caerulescens TCATGACGTATTGTAATGTAATTTTATGGGTTAGATTATCGGTTTCGAGAGATAGAATAG 1764
T.japonicum ----- 1764
A.thaliana AGTATGGTAACAAAACAATGTCC-TGATGTATTTGTATTATAGTGTTTTATGGTTTTTAG 1785
B.juncea TAACAATGCATGATATGATATTTGTAATATTGGTATTTTATGGTTTAGAGCATAGACTTT 1350

T.caerulescens AAA----- 1767
T.japonicum ----- 1767
A.thaliana AGTATAGCTTTGGAAGAATCCGAATCGTATCGTTTGTGTA AAAACTTCCGGCGTTTCTTAG 1845
B.juncea GTGTAAGAATATATTCAGGACTTCCTTTCTTTTCTTTAGAAATTTGAAATGTTTCTCTTG 1410

T.caerulescens -----
T.japonicum -----
A.thaliana AATTTTGGCAGAAATAAAACGTAACATGAAGTTCCTTCTTCAGATGTGCGTTATTTTCAT 1905
B.juncea TTGAAAAA----- 1427

T.caerulescens -----
T.japonicum -----
A.thaliana TTTCTTTTAGATAGATTTTTTTTTTTTGGGTTTAAGTATATAAGTT 1951
B.juncea -----

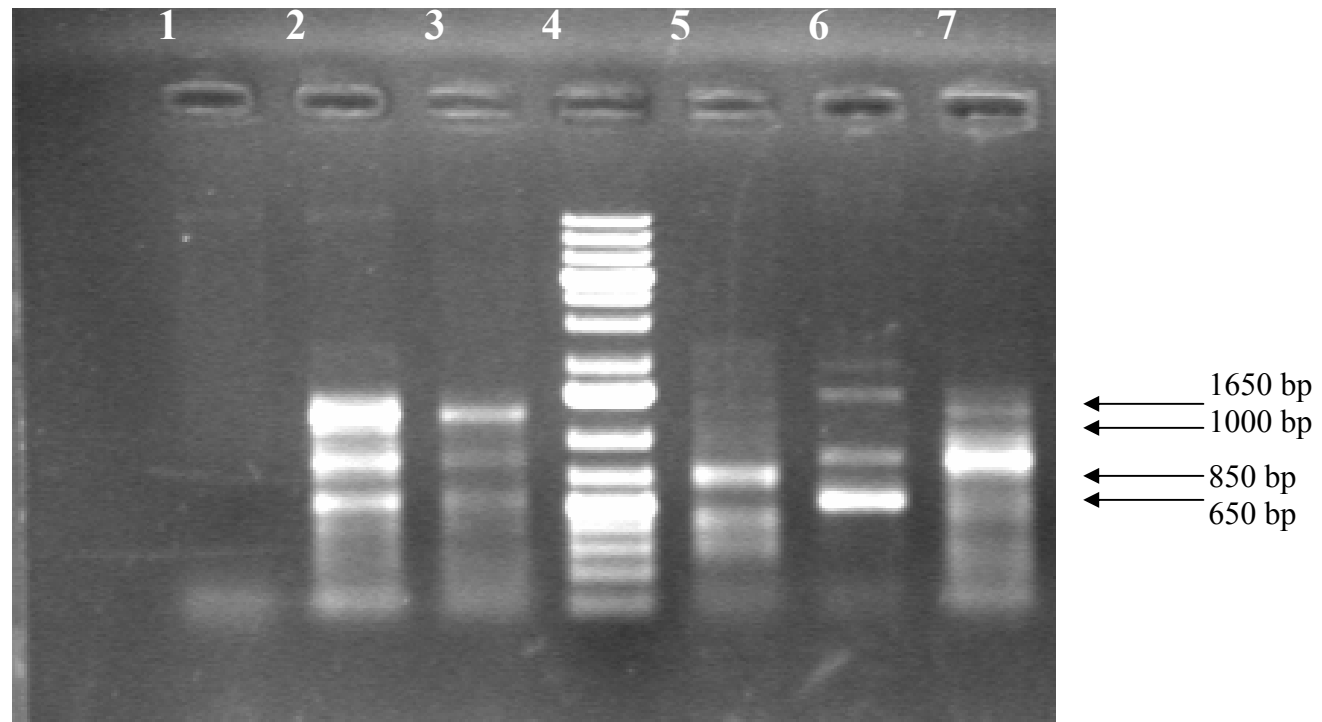


Figura 3.2. Amplificazione con i primer F1-R2 YSL su DNA genomico di *S. lycopersicum* (lane2), *A. thaliana* (3), *Nicotiana tabacum* (5), *Phalaris canariensis* (6), *Cicer arietinum* (7), Lane 1 C-, 4 1Kb

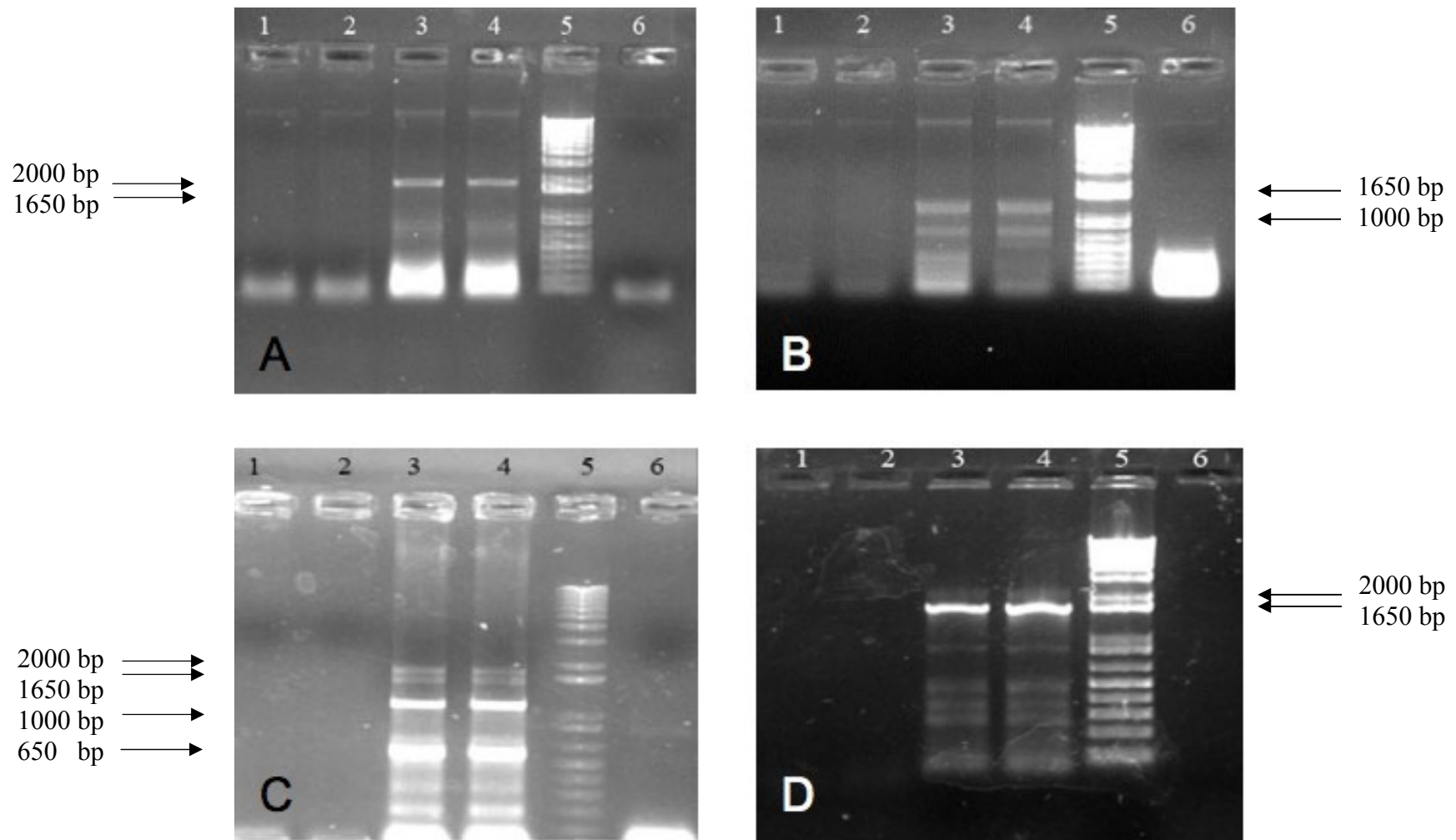
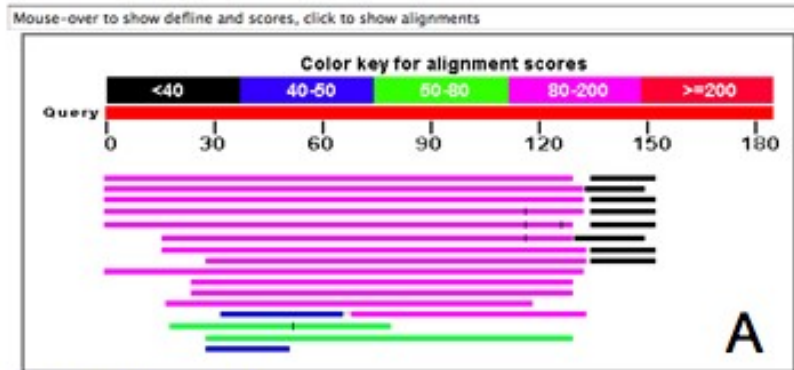


Figura 3.3:

- A) Amplificazione con i primers znt : lane 1-2 *S. pennellii*, 3-4 M82, 5 marker 1Kb, 6 C-;
 B) Amplificazione con i primers YSL: lane 1-2 *S. pennellii*, 3-4 M82, 5 marker 1Kb, 6 C-;
 C) Amplificazione con i primers NRAMP: lane 1-2 *S. pennellii*, 3-4 M82, 5 marker 1Kb, 6C-;
 D) Amplificazione con i primers HMA: lane 1-2 *S. pennellii*, 3-4 M82, 5 marker 1Kb, 6 C-;

Distribution of 49 Blast Hits on the Query Sequence



[Distance tree of results](#) ^{NEW}

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value
gi 108792487 emb CT990559.2 <i>S. lycopersicum</i> DNA sequence from...	199	3e-48
gi 95105944 gb DQ445623.1 <i>Lycopersicon esculentum</i> clone BAC ...	192	3e-46
gi 116118679 gb AC171735.2 <i>Solanum lycopersicum</i> chromosome 1...	184	1e-43
gi 120871674 db AP009318.1 <i>Solanum lycopersicum</i> genomic DNA...	162	5e-37
gi 118345474 gb AC171730.2 <i>Solanum lycopersicum</i> chromosome 1...	149	4e-33
gi 28372791 gb AC139840.1 <i>Solanum demissum</i> chromosome 5 clon...	149	4e-33
gi 85816297 gb DQ274179.2 <i>Solanum tuberosum</i> patatin-rich BAC 14	146	2e-32
gi 119371440 db AP009263.1 <i>Solanum lycopersicum</i> genomic DNA...	142	4e-31
gi 116312224 emb CU019619.10 <i>S. lycopersicum</i> DNA sequence fro...	105	6e-20
gi 95105945 gb DQ445624.1 <i>Lycopersicon esculentum</i> clone BAC ...	94.4	1e-16
gi 15987770 gb AF411805.1 <i>Lycopersicon esculentum</i> BAC clone ...	94.4	1e-16
gi 119371471 db AP009294.1 <i>Solanum lycopersicum</i> genomic DNA...	85.7	5e-14
gi 119371455 db AP009270.1 <i>Solanum lycopersicum</i> genomic DNA...	81.3	1e-12
gi 95105943 gb DQ445622.1 <i>Lycopersicon esculentum</i> clone BAC ...	66.0	4e-08

Translate Tool - Results of translation

Please select one of the following frames:

[S1 Frame 1](#)
S Met H L S R R T T R P S I I V T I A A R D T S L E I Q Y P S R R A I R P S K W H I L

[S1 Frame 2](#)
P C I C R G A R R D P R S t o p S t o p S t o p P S R R A I R P S K Y S I H R G A R Y V P R N G T S S

[S1 Frame 3](#)
H A S V A A H D A T L D N S N H R G A R Y V P R N T V S I A A R D T S L E M e t A H P L

[S2 Frame 1](#)
K R M e t C H F E G R I A R R D G Y C I S R D V S R A A M e t V T I I E G R V V R R D R C M e t

[S2 Frame 2](#)
R G C A I S R D V S R A A M e t D T V F R G T Y R A P R W L L S R V A S C A A T D A W

[S2 Frame 3](#)
E D V P F R G T Y R A P R W I L Y F E G R I A R R D G Y Y Y R G S R R A P R Q M e t H G

Database: All non-redundant GenBank CDS translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF excluding environmental samples
4,502,098 sequences; 1,546,363,617 total letters

If you have any problems or questions with the results of this search please refer to the [BLAST FAQs](#)
[Taxonomy reports](#)

Query=
Length=44

No significant similarity found. For reasons why, [click here](#).

Figura 3.4: Analisi in silico della sequenza ysl di *S. lycopersicum*. Nel pannello A è rappresentata la percentuale di allineamento tra la sequenza in questione e quelle presenti in banca dati, Nel panè risultata essere una regione non codificante del genoma di pomodoro (B); la sequenza è stata tradotta in silico (C) ma nessuno dei 6 possibili frame di lettura è risultato codificante per alcun peptide riconosciuto in banca dati (D).

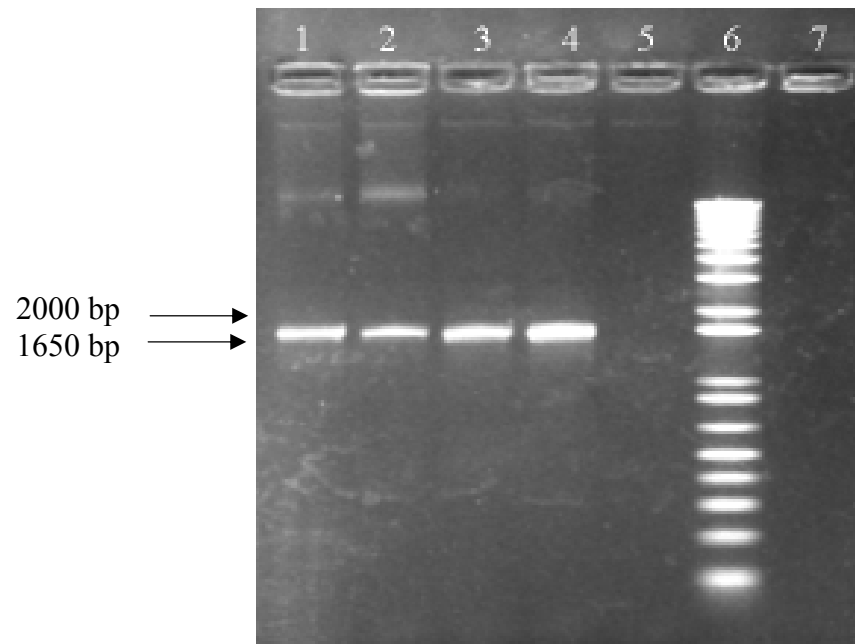


Figura 3.5 Pannello A. Amplificazione con primer YSL2°:lane 1-2: M82, 3-4: *S. pennellii* 5: C-, 6: marker 1Kb

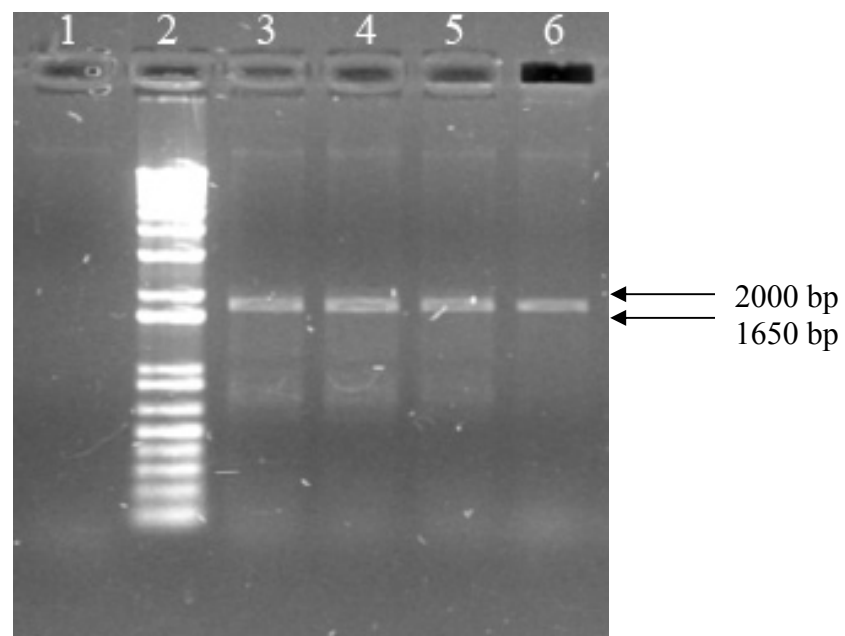


Figura 3.5 Pannello B. Amplificazione con primer ZNT2°:lane 3-4: M82, 5-6: *S. pennellii* 1: C-, 2: marker 1Kb



Figura 3.6. Analisi in silico della sequenza ysl di *S. lycopersicum* ottenuta con i primer "EST". Nel pannello A è rappresentata la percentuale di allineamento tra la sequenza in questione e quelle presenti in banca dati, nel pannello B è rappresentata la percentuale di omologia con le sequenze codificanti per ysl in altre specie; la sequenza è stata tradotta in silico e confrontata con le sequenze aminoacidiche presenti in banca dati (C,D).

Tabella 3.1. Primer disegnati sulle zone altamente conservate delle sequenze codificanti dei geni YSL, HMA, NRAMP, MTP, ZNT

Codice identificativo primer	sequenza
F1YSL1	CCTTCACAAGGCAGGAGAAC
F2YSL1	TCAACAGCTTCCACACACCC
R1YSL1	CCACACACATGTTCGATGGCG
R2YSL1	AACGTCCAAAGCCCTTCTCC
F1HMA4	CACGACAGTCTCCTCATCTC
F2HMA4	TGGATACGTCTATGTAGGTG
R1HMA4	CAAACAGACTTGCATTGTCC
R2HMA4	CTCCTGCAACAGCTTTTACC
F1NRAMP4	CTCATGGAAGAAGCTTTGGC
F2NRAMP4	GCATTTGCTTGGATGTTTGG
R1NRAMP4	ATGGCTATCACAAGAGCAGC
R2NRAMP4	TAACTGCCAAGGAGTGTACG
F1ZRT1	ACGAAAATCCTCTGTGATGC
F2ZRT1	GGACATGCTCATGGACAATC
R1ZRT1	TGCTTAGAAAATCAGCTGCG
R2ZRT1	ACATAAGTCCAGCTCCAAGG
F1MTP1	GCTTCTATGCGGAAGCTTTG
F2MTP1	GCATGATCATGGTCACAGTC
R1MTP1	CCACTGTGATAGCCCAAATG
R2MTP1	ATATCTGCATCTGCTTCTGG

Tabella 3.2 : primer disegnati sulle sequenze EST della banca dati SGN; mediante questi primer sono state amplificate sequenze per i geni YSL e ZNT.

Codice primer	sequenza
ZNMT FW	GAACTCAATTTGCTGGTGG
ZNMT RW	ATGGCCTTTTTGGTATCATTC
YSL2 FW	ATAGCCTTCAGCGGAGG
YSL2 RW	ACGGTCATGTAACCTGTC
MTP1 FW	TGTTACCACYCARSAYCATS
MPT1 RW	TGTHCCATMTCRAGCARACC

Tabella 3.3. Per ogni sequenza genica clonata è riportato la percentuale di identità con le sequenze degli stessi geni di altre specie già presenti nella banca dati. Nelle ultime 3 colonne sono riportate per ogni sequenza la lunghezza amminoacidica delle sequenza e la loro percentuale di identità con la proteina più simile ad essa già presente in banca dati.

Sequenza	lunghezza (b p)		identità nucleotidica (%)	specie con più alta identità nucleotidica	lunghezza (aa)	identità proteica %	specie con più alta identità proteica
	DNA	cDNA					
<i>S. lycopersicum ysl</i> (sequenza parziale)	1634	854	97	<i>Nicotiana tabacum</i>	284	89	<i>Nicotiana tabacum</i>
<i>S. lycopersicum znt</i> (sequenza parziale)	1859	902	96	<i>Chengiopanax sciadophylloides</i>	300	79	<i>Chengiopanax sciadophylloides</i>

Tabella 3.4 A. Concentrazione di zinco espressa come microgrammi su grammi di peso secco nei tessuti della radice, foglie apicali e foglie basali in piante di pomodoro M82 allevate in presenza di 4 concentrazioni di zinco nella soluzione nutritiva; lettere differenti per LSD $p < 0,05$. Dati raccolti al termine del trattamento.

	ZnSO ₄ (μM)	Zn 2+ Media ± d.s. (μg/g)	
Foglie apicali	0	23,20 ± 3.03	a
	50	224,10 ± 34.66	a
	100	1138,18 ± 332.12	b
	200	166,46 ± 22.97	a
Foglie basali	0	22,54 ± 1.49	a
	50	299,29 ± 5.46	a
	100	723,67 ± 217.39	b
	200	325,32 ± 65.51	a
Radici	0	128,74 ± 8.40	a
	50	2545,92 ± 90.02	a
	100	3764,29 ± 899.94	ac
	200	7480,01 ± 1032.44	bc

Tabella 3.4 B. Concentrazione di cadmio espressa come microgrammi su grammi di peso secco nei tessuti della radice, foglie apicali e foglie basali in piante di pomodoro M82 allevate in presenza di 4 concentrazioni di cadmio nella soluzione nutritiva; lettere differenti per LSD $p < 0,05$. Dati raccolti al termine del trattamento.

	CdSO ₄ (μM)	Cd 2+ Media ± d.s. (μg/g)	
Foglie apicali	0	0,17 ± 0.06	a
	5	35,08 ± 3.08	bc
	10	25,69 ± 1.68	bc
	20	74.00 ± 9.78	bd
Foglie basali	0	0,10 ± 0.01	a
	5	20,01 ± 2.21	bc
	10	14,39 ± 1.04	bc
	20	58,21 ± 13.04	bd
Radici	0	0,66 ± 0.15	a
	5	87,60 ± 11.15	b
	10	144,20 ± 20.44	b
	20	385,37 ± 16.24	c

Tabella 3.4 C. Concentrazione di piombo espressa come microgrammi su grammi di peso secco nei tessuti della radice, foglie apicali e foglie basali in piante di pomodoro M82 allevate in presenza di 4 concentrazioni di piombo nella soluzione nutritiva; lettere differenti per LSD $p < 0,05$. Dati raccolti al termine del trattamento.

	PbNO ₃ (μM)	Pb 2+ Media ± d.s. (μg/g)
Foglie apicali	0	0,16 ± 0.04 a
	1.5	0,51 ± 0.07 a
	3	0,28 ± 0.08 a
	6	0,64 ± 0.10 a
Foglie basali	0	0,32 ± 0.03 a
	1.5	0,37 ± 0.09 a
	3	0,53 ± 0.03 a
	6	0,30 ± 0.02 a
Radici	0	3,94 ± 0.36 a
	1.5	61,1 ± 0.76 b
	3	97,68 ± 9.65 c
	6	126,12 ± 14.79 c

Tabella 3.5. Elenco delle accessioni EST di pomodoro che risultano avere elevata similarità di sequenza con i geni per i trasportatori di metalli presenti in banca dati

NOME GENE	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>
YSL1	<u>NP_567694</u>	<u>SGN-U322329</u>
MTP1	<u>NM_180128</u>	<u>SGN-U323371</u>
ZNT1	<u>AAF61374</u>	<u>SGN-U324247</u>
ABC1	<u>AT1G59870.1</u>	<u>SGN-U317247</u>
ABC2	<u>AT1G15520.1</u>	<u>SGN-U328575</u>
ZIP2	<u>AT5G59520.1</u>	<u>SGN-U323551</u>
MTPC1	<u>AT2G47830.2</u>	<u>SGN-U332813</u>
MTPC2	<u>AT3G12100.1</u>	<u>SGN-U325039</u>
ZIP1	<u>AT3G12750.1</u>	<u>SGN-U331691</u>
ZIP8	<u>AT4G19690.2</u>	<u>SGN-U337897</u>
ZIP5	<u>AT1G05300.1</u>	<u>SGN-U324799</u>
ZIP 10	<u>AT1G31260.1</u>	<u>SGN-U323844</u>
ZIP3	<u>AT1G05300.1</u>	<u>SGN-U346020</u>
ZIP 6	<u>AT2G30080.1</u>	<u>SGN-U323910</u>
ZIP4	<u>AT2G30080.1</u>	<u>SGN-U332857</u>
CAX	<u>AT1G55730.2</u>	<u>SGN-U318156</u>
ABC	<u>AT3G60160.1</u>	<u>SGN-U317948</u>
ABC	<u>AT3G59140.1</u>	<u>SGN-U325292</u>
MRP4	<u>AT2G47800.1</u>	<u>SGN-U318859</u>
P1btype ATPase 1	<u>AT5G21930.1</u>	<u>SGN-U318095</u>
P1btype ATPase 2	<u>AT4G33520.3</u>	<u>SGN-U342455</u>
PAA1	<u>AT4G33520.2</u>	<u>SGN-U321017</u>
P1btype ATPase 3	<u>AT3G42640.1</u>	<u>SGN-U313547</u>

ZINCO

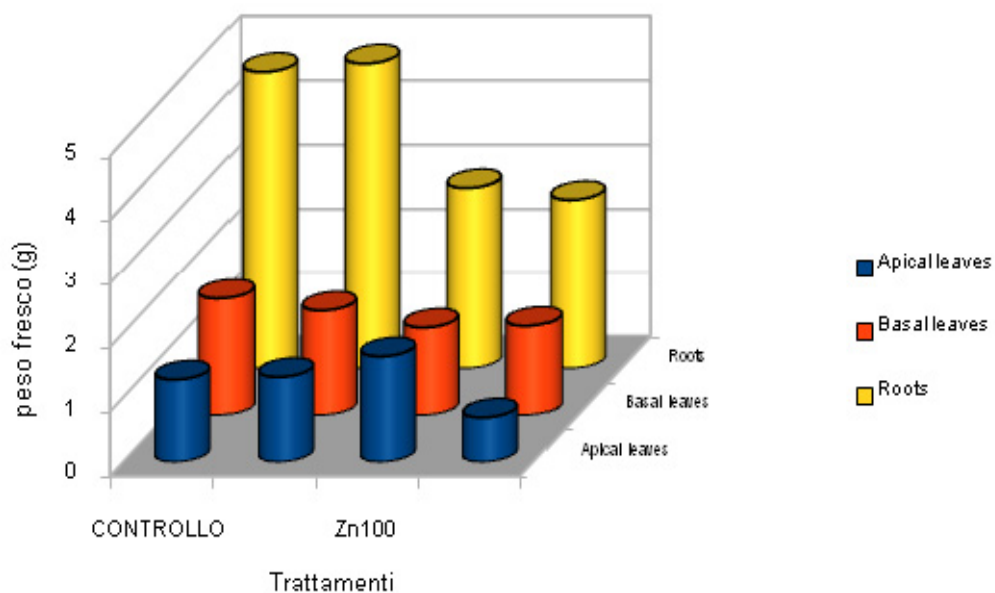


Figura 3.7 A: Distribuzione del peso fresco di foglie apicali, foglie basali e radici di piante allevate in presenza di 4 concentrazioni di zinco nella soluzione nutritiva. Dati raccolti al termine del trattamento

CADMIO

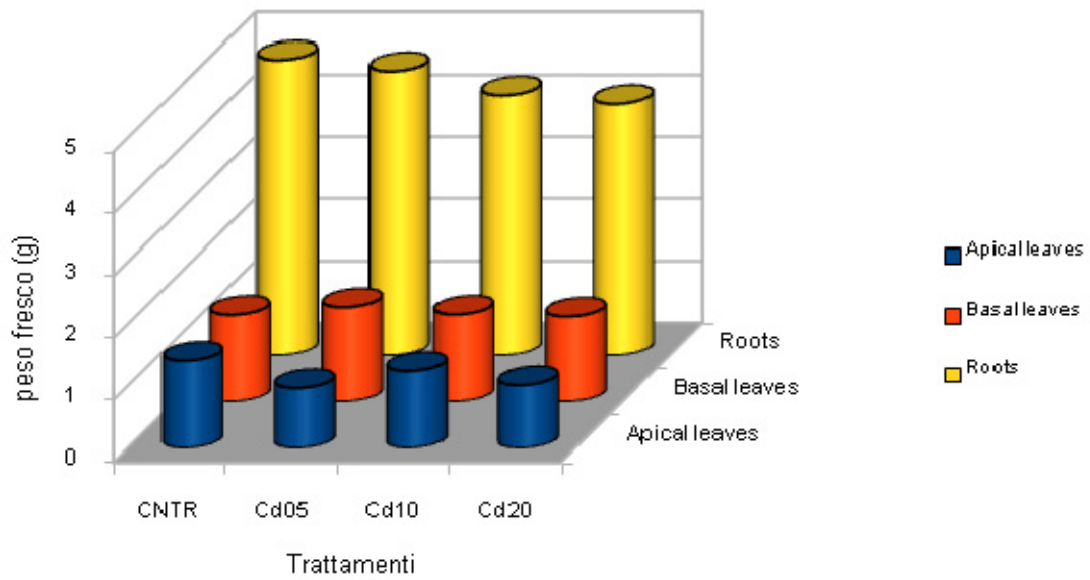


Figura 3.7 B: Distribuzione del peso fresco di foglie apicali, foglie basali e radici di piante allevate in presenza di 4 concentrazioni di cadmio nella soluzione nutritiva. Dati raccolti al termine del trattamento

PIOMBO

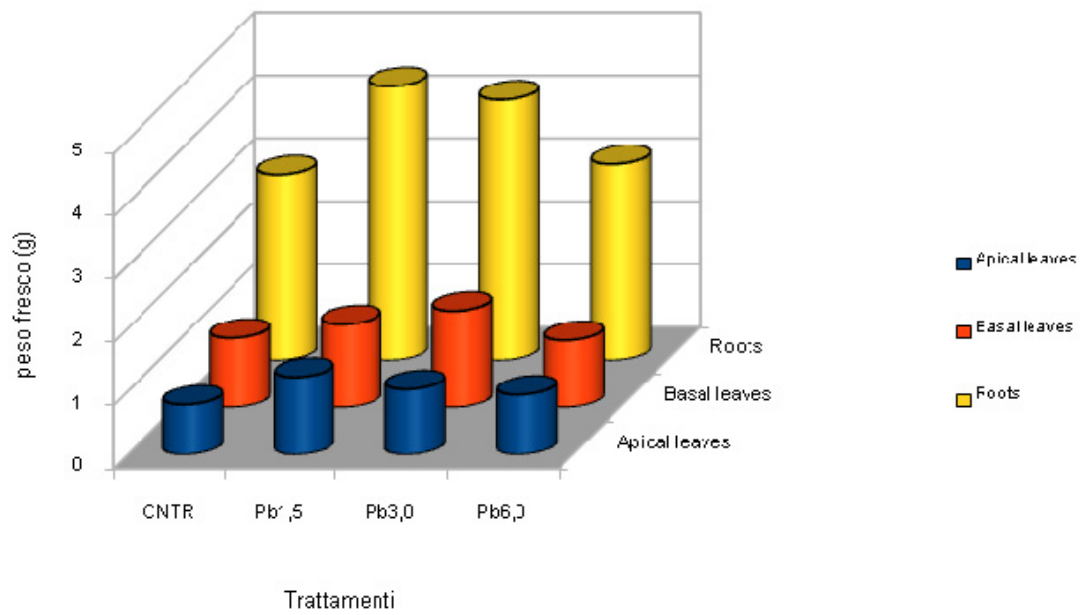


Figura 3.7 C: Distribuzione del peso fresco di foglie apicali, foglie basali e radici di piante allevate in presenza di 4 concentrazioni di piombo nella soluzione nutritiva. Dati raccolti al termine del trattamento

7 BIBLIOGRAFIA

Alpi A., Pupillo P., Rigano C. 2000 - Fisiologia delle piante. Ed. EdiSES 35-37.

Aromolo R., Benedetti A., Fiorelli F., Francaviglia R., Gataleta R., Marchionni M., Morselli L. 1999 – Aprocchio metodologico allo studio integrato dei metalli pesanti nell’ambiente. Conferenza Organizzativa: inquinamento del suolo da metalli pesanti. Sassari 6-7 Maggio.

Augier J. 1966 - Encyclopédie biologique-LXIV. Ed. P. Lechevalier, Paris

Arduini I., Douglas L., Onnis G. and A. 1996 – Cadmium and copper uptake and distribution in Mediterranean tree seedlings. *Physiologia Plantarum*, 97: 111-117.

Arumuganathan K., Earle ED. 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol Biol Rep* 9: 208-218.

Bai Y., Lindhout P. 2007. Domestication and breeding of tomatoes: what have we gained and what can we gain in the future? *Annals of Botany* 100: 1085-1094.

Bargagli R. 1998a - Chemical elements and plants life. In: Trace elements in terrestrial plants: an ecophysiological approach to biomonitoring and biorecovery 1-21.

Bargagli R. 1998b - Mosses as passive and active biomonitors of trace elements. In: Trace elements in terrestrial plants: an ecophysiological approach to biomonitoring and biorecovery 207-236.

Bereczky “Differential Regulation of nramp and irt Metal Transporter Genes in Wild Type and Iron Uptake Mutants of Tomato” *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* Vol. 278, No. 27, Issue of July 4, pp. 24697–24704, 2003

Bishop G.J., Harrison K., Jones J.G.D. 1996. The tomato Dwarf gene isolated by heterologous transposon tagging encodes the first member of a new cytochrome P450 family. *The Plant*

Cell 8: 959-969.

Bostein D., Skolnick M., Davis RW. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction length polymorphism. *Am J Hum Genet* 31: 173- 184.

Briat J. F. and Lebrun M. 1999 - Plant responses to metal toxicity. *C. R. Academy Science III* 322: 43-54.

Brown D. H. 1984 - Uptake of mineral elements and their use in pollution monitoring. In: Dyer A.F., Duckett 101

Brune A., Urbach W., Dietz k. J. 1995 – Differential toxicity of heavy metals is partly related to a loss of preferential extraplasmic compartmentation: a comparison of Cd-, Mo-, Ni-, and Zn-stress. *New Phytology* 129: 403-409.

Bruins M. R., Kapil S., Oehme F. W. 2000 – Microbial resistance to metals in enviroment. *Ecotoxicology Environmental Safety* 45: 198-207

Carballeira A., Lyopez J., Vyazquez M. D. 1999 – Uptake of heavy metals to the extracellular and intracellular compartments in three species of aquatic bryophyte. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 44: 12-24.

Chung L. K., Gupta V. K., Sawhney S. K. 1992 - Effect of cadmium on enzymes of nitrogen metabolism in pea seedlings. *Phytochemistry* 31: 395-400.

Eckhardt, Mas Marques and Buckhout: “Two iron-regulated cation transporters from tomato complement metal uptake-deficient yeast mutants” *Plant Molecular Biology* Volume 45, Number 4 / March, 2001.

Elizabeth P Colangelo and Mary Lou Guerinot 2006 - Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants. *Current Opinion in Plant Biology* 2006, 9:322–330

Eren E, Arguello JM: Arabidopsis HMA2, a divalent heavy metaltransporting P(IB)-type ATPase, is involved in cytoplasmic Zn²⁺ homeostasis. *Plant Physiol* 2004, 136:3712-3723.

Fry J. C. 1998 - Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals. *Biochemistry Journal* 332: 507-515

Grandillo S., Ku HM., Tanksley SD. 1999. Identifying loci responsible for natural variation in fruit size and shape in tomato. *Theoretical and Applied Genetics* 99: 953-951.

Guerinot and Salt, 2001 *Fortified Foods and Phytoremediation. Two Sides of the Same Coin* *Plant Phys.* 125, 164-167

Guerinot ML: The ZIP family of metal transporters. *Biochim Biophys Acta* 2000, 1465:190-198.

Gur A., Zamir D. 2004. Unused natural variation can lift yield barriers in plant breeding. *Plos Biology* 2: 1610-1615.

Hall J.L. and Williams Lorraine E. 2003 "Transition metal transporters in plant" ; *Journal of experimental botany*, vol 54, n. 393, pg 2601-2613,

Haanstra JPW, Wye C., Verbakel H., Meijer-Dekens F., Van den Berg P., Odinet P. 1999. An integraded high-density RFLP-AFLP map of tomato based on two *Lycopersicum esculentum* x *L.pennelli* F2 populations. *Theoretical and Applied Genetics* 99: 254-271.

Holleman A. F. and Wiberg E. 1985 - *Lehrbuch der anorganischen chemie*. Walter De Gruyter, Berlin p.868.

Hiramoto K., Ojima N., Sako K., Kikugava K. 1996 -Effects of plant phenolics on the formation of the spinadduct of hydroxyl radical and the DNA strand breaking by hydroxyl radical. *Biological Pharmaceutical Bulletin* 19: 558-563.

Kasparzak K. S. 1995 - Possible role of oxidative damage in metal-induced carcinogenesis. *Cancer Investigation* 13: 411-430.

Knapp S. 2002. Tobacco to tomatoes: a phylogenetic perspective on fruit diversity in the

Solanaceae. *Journal of Experimental Botany* 53: 2001-2022.

Kobae Y, Uemura T, Sato MH, Ohnishi M, Mimura T, Nakagawa T, Maeshima M: Zinc transporter of *Arabidopsis thaliana* AtMTP1 is localized to vacuolar membranes and implicated in zinc homeostasis. *Plant Cell Physiol* 2004, 45:1749-1758.

Larry R., Joanne L. 2007. Genetic resources of tomato. Genetic improvement of solanaceous crops. Vol. 2.

Lee K-R., Kuzukue N., Han J-S., Park J-H., Chang E-Y., Baek E-J., Chang J-S., Friedman M. 2004. Glycoalkaloids and metabolites inhibit the growth of human colon (HT29) and liver (HepG2) cancer cells. *J. Agric. Food Chem.* 52: 2832-2839.

Leita L., Contin M., Maggioni A. 1991 - Distribution of cadmium and induced cd-binding proteins in root, stem, leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Science* 77: 139-147.

Lorenzetti F., Falcinelli M., Veronesi F. 1994. Miglioramento genetico delle piante agrarie. Edagricole, Bologna.

Marchionni M. 1999 - Inquinamento del suolo da metalli pesanti: effetti sulle piante. Conferenza Organizzativa: inquinamento del suolo da metalli pesanti. Sassari 6-7 Maggio.

Masojc P. 2002. The application of molecular markers in the process of selection. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 7(2A): 499-509

Mathews H., Clendennen S.K., Caldwell C.G., Liang Liu X., Connors K., Matheis N., Schuster D.K, Menasco D.J., Wagoner W., Lightner J., Wagner D.R. 2003. Activation tagging in tomato identifies a transcriptional regulator of anthocyanin biosynthesis, modification, and transport. *The Plant Cell* 15: 1689–1703

Paleman JD., Van der Voort JR. 2003. Breeding by design. *Trends in Plant Science* 8: 330-334.

Moral R., Gomez I., Navarro Pedreno J., Maitax J. 1994 - Effects of cadmium on nutrient distribution, yeild, and growth of tomato grown in soilness culture. *Journal Plant Nutrition*

17: 953-962.

Pence NS, Larsen PB, Ebbs SD, Letham DL, Lasat MM, Garvin DF, Eide D, Kochian LV: The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. Proc Natl Acad Sci USA 2000, 97:4956-4960.

Okland R. H., Steinnes E., Okland T. 1997 – Element concentration in the boreal forest moss *Hylocomium splendens*: variation due to segment size, branching pattern and pigmentation. Journal of Bryology 19: 671- 684.

Obata H. and Umebayashi M. 1993 - Production of SH compounds in higher plants of different tolerance to Cd. Plant soil 155/156: 533-536.

Ouzoinidou G. 1994 - Copper-induced changes on growth, metal content and photosynthetic function of *Alyssum montanum* L. plants. Environmental and Experimental Botany 34: 154-160.

Peterson D.G., James Price H., Spencer Johnston J., Stack S.M. 1996. DNA content of heterochromatin and euchromatin in tomato (*Lycopersicon esculentum*) pachytene chromosomes. Genome 39: 77-82.

Riffardi R. and Levi-Minzi R. 1989 - Il controllo degli inquinanti in agricoltura. Gli inquinanti organici. Chimica del suolo, Patron Editore.

Salt D. E., Blaylock M., Kumar N. P. B. A., Dushenkov V., Ensley B. D., Chet I., Raskin I. 1995a - Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. Biotechnology 13: 468-473.

Salt D. E., Prince R. C., Pickering I. J., Raskin I. 1995b - Mechanism of cadmium mobility and accumulation in indian mustard. Plant Physiology 10: 1427-1433.

Siedlecka A. 1995 - Some aspects of interaction between heavy metals and plant mineral nutrients. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 64:265-272

Stallwitz E. and Header D .P. 1994 - Effects of heavy metals on mobility and gravitactic orientation of the flagellate, *Euglena gracilis*. *European Journal of Protistology* 30: 18-24.

Tanksley S. D., Ganai M. W., Prince J. P., De Vicente M. C., Bonierbale M. W., Broun P., Fulton T. M., Giovannoni J. J., Grandillo S., Martin G. B., Messeguer R., Miller J. C., Miller L., Paterson A. H., Pineda O., Riider M. S., Wing R. A., Wu W., Young N. D. 1992. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genom. *Genetics* 132: 1141-1160.

Tanksley SD. 2004. The genetic, developmental and molecular bases of fruit size and shape variation in tomato. *The Plant Cell*. 16: 181-189.

Thomine S, Wang R, Ward JM, Crawford NM, Schroeder JI: Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97:4991-4996.

Van der Hoeven R., Ronning C., Giovannoni J., Martin G., Tanksley S. 2002. Deductions about the number, organization, and evolution of genes in the tomato genome based on analysis of a large expressed sequence tag collection and selective genomic sequencing. *The Plant Cell* 14: 1441–1456.

Wainwright S. J. and Woolhouse H. W. 1975 - Physiological mechanism of heavy metals tolerance in plants. *British Ecological Society Symposium* 15: 231-258.

Wang Y., Tang X., Cheng Z., Mueller L., Giovannoni J., Tanksley S.D. 2006. Euchromatin and pericentromeric heterochromatin: comparative composition in the tomato genome. *Genetics* 172: 2529–2540.

Wierzbicka M. 1988 - Mitotic disturbance induced by low doses of inorganic lead. *Caryologia* 41: 143-160.

Zenk M. H. 1996 - Heavy metal detoxification in higher plants. *Gene* 179: 21-30.