

# Rendiconto OLEA – I Anno

## U.O. UNINA

**Responsabile:** Rosa Rao

**WorkPackage 8** - Tolleranza e resistenza agli stress biotici e abiotici

### **Obiettivi della ricerca**

*(Max 2.000 caratteri spazi inclusi)*

Le piante rispondono agli attacchi degli insetti alterando l'espressione di numerosi geni che sono coinvolti in differenti vie metaboliche interconnesse. E' quindi molto probabile che, in olivo, sia l'interazione tra la drupa e la mosca [*Bactrocera oleae* (Gmel.)] che i meccanismi di tolleranza a questo insetto, siano caratterizzati da una elevata complessità genetica e coinvolgano un numero elevato di geni e di vie metaboliche. Di conseguenza lo studio delle basi molecolari della risposta della pianta alla mosca richiede approcci genomici e trascrittomici che valutino in modo globale tali fenomeni, che complementino valutazioni fenotipiche dei principali parametri morfologici della drupa associati alla tolleranza alla mosca. Gli obiettivi di questa attività erano quelli di: i) identificare sequenze codificanti proteine che abbiano una funzione rilevante per la tolleranza alla mosca, tramite un approccio di analisi trascrittomici; ii) descrivere i meccanismi e network di risposta della drupa.

### **Attività svolte**

*(Max 15.000 caratteri spazi inclusi)*

#### **Ricerca di sequenze codificanti di olivo che rispondono all'attacco della mosca**

E' stata costruita una libreria sottrattiva per identificare i geni la cui espressione di oliva è influenzata dalla infestazione *B. oleae*. La libreria di cDNA è stata ottenuta utilizzando RNA a partire da frutti con gallerie larvali come tester, e da frutti sani come driver. La selezione blue/bianco e le analisi di restrizione ha permesso di identificare 590 colonie ricombinanti su 1.180 analizzate. Dopo aver filtrato i cloni in base alla dimensione dell'inserito (> 200 bp), i plasmidi ricombinanti sono stati sequenziati ed i cloni con basso contenuto di informazione sono stati rimossi. La lunghezza media delle sequenze clonate di olivo e' stata 303 bp, da un minimo di 69 bp a un massimo di 766 bp. Per ottenere sequenze uniche (unigenes), e' stato eseguito un assembly utilizzando il programma CAP3, che ha individuato 87 singletons ed ha assemblato le restanti 111 sequenze in 33 contig, costituiti da 2 a 22 EST sovrapposti. La risultante collezione di unigene, a seguito di una traduzione in silico, è stato confrontato con i database disponibili per trovare analogie con le sequenze note. Solo tre cloni abbinato sequenze d'oliva già disponibili. Nel complesso, il 39,2% degli unigeni putativamente codificano per proteine con una notevole somiglianza con le proteine annotate in altri organismi. I restanti 73 unigeni (60,8%) sono stati considerati funzionalmente non identificati. Tra questi ultimi, 27 (risp. 2) EST sono stati annotati usando una banca dati nucleotidica Genbank di NCBI (risp. dbEST, NCBI). Una somiglianza rilevante per altri 23 cloni è stata trovata analizzando le sequenze d'olivo trascritte presenti nella banca dati EST OLEA db. L'analisi della collezione di unigene è stata effettuata utilizzando il software Blast2go, in considerazione delle limitate informazioni disponibili circa il genoma di oliva. Le sequenze sono state classificate in due categorie ontologiche, vale a dire, "processo biologico" e "funzione molecolare". È interessante notare che nella categoria "processo biologico", la voce più frequente era "Response to Stress", seguito da "Processo Catabolico". La più frequente "funzione molecolare" era l'attività idrolasica. Tra le sequenze annotate nella libreria SSH, abbiamo identificato EST cui omologhi in diverse altre specie sono associate con risposte pianta allo stress biotico, come le proteine della famiglia idrolasi e inibitori della proteinasi. È interessante notare che la caratterizzazione funzionale della libreria

indica la presenza di EST coinvolte nella risposta della pianta allo stress e' predominante, con la presenza di sequenze relative sia a stress biotici, come ad esempio gli insetti o i patogeni, che a stress abiotici, come la temperatura (alta o bassa), la siccità e la salinità'. Inoltre, sono stati identificati trascritti coinvolti nella trasduzione o nella produzione di molecole segnale o coinvolte nella risposta a ormoni e molecole (ad esempio, acido jasmonico e ROS) che sono associati alla resistenza delle piante ai parassiti erbivori. Un numero simile di sequenze non attotate funzionalmente ha trovato similarità con trascritti oliva, suggerendo che la risposta di oliva *B. oleae* potrebbe coinvolgere anche nuovi geni. L'annotazione funzionale della biblioteca ha dimostrato che una barriera fondamentale per lavorare con l'olivo è la dipendenza dai modelli di vie biochimiche, repertori Gene Ontology e le informazioni genomiche che sono principalmente basati su specie modello. Inoltre, sebbene molti processi cellulari e percorsi inerenti alla resistenza allo stress biotico sono evolutivamente conservati, l'analisi della libreria suggerito che la plasticità dei network di trasduzione del segnale e la varietà di composti di difesa può essere particolarmente pronunciata per le olivo. Questa ipotesi è concepibile, considerando non solo la differenza tra questo albero e le altre piante modello, ma anche la forte rapporto co-evolutivo di *B. oleae* il genere *Olea*. E' prevedibile che gli unigeni non ancora caratterizzati possano rappresentare un importante serbatoio di geni candidati della difesa e che il loro studio può permettere ulteriori approfondimenti nella complesso network di difesa dell'olivo.

### **Identificazioni dei meccanismi e network di risposta della drupa**

Considerando che le piante presentano una varietà di strategie per combattere gli insetti, era prevedibile che diversi processi molecolari siano coinvolti nei meccanismi di difesa contro la mosca dell'olivo. L'annotazione funzionale ha indicato che l'alimentazione larve di *B. oleae* significativamente riduce le attività collegate alla fotosintesi e modifica il metabolismo dei carboidrati. La down-regulation dei geni codificanti per le proteine fotosintetiche o il declino del tasso di fotosintesi nelle piante attaccate è stato osservato per gli erbivori diversi che si nutrono di foglie. E' interessante che abbiamo osservato un effetto simile sugli organi sink, sostenendo in tal modo il modello che metaboliti primari potrebbero anche funzionare come segnali specifici in pathway di difesa. E' anche possibile che l'attacco della mosca induca una maturazione precoce delle drupe. Considerando che unigeni relativi alla risposta allo stress rappresentano la più grande classe funzionale di geni iperespressi. Nel loro insieme, i dati indicati un considerevole spostamento del metabolismo verso la difesa durante l'alimentazione delle larve. La difesa diretta della drupa impiega una varietà di fattori inducibili, che includono geni che sono noti per essere importante nella determinazione della resistenza delle piante agli insetti erbivori, come quelle che codificano per gli inibitori della proteinasi o enzimi idrolitici (ad esempio, chitinasi e glucosidasi). Tuttavia, e' significativa anche l'attivazione di geni collegati alla patogenesi (PR genes). La produzione di composti coinvolti nella difesa diretta dovrebbe essere prevalentemente a carico di una rete che comprende le specie reattive dell'ossigeno e vie di segnalazione collegate ai fitormoni. Si e' riscontrato un notevole arricchimento di geni e proteine coinvolte nella regolazione dello stato redox, implicando che la produzione di ROS dovrebbe essere una componente rilevante di indotto olive difesa. Inoltre, la classificazione funzionale indicato la presenza di cloni che dovrebbero essere membri delle famiglie di geni appartenenti ai pathway degli ottadecanoidi (ad esempio, la lipossigenasi e il trasferimento lipidica) o dei flavonoidi (cioè, il trans-cinnamato 4-idrossilasi e la Caffeoil-o -metiltransferasi), pathway che producono composti che, nelle piante, sono coinvolti dalla difesa fisica e chimica contro lo stress biotico alla produzione di molecole segnale coinvolte nella segnalazione locale e sistemica. Complessivamente], i dati mostrano una sovrapposizione di diverse vie per la risposta drosfila e indicano che le risposte oliva ai patogeni e erbivori devono condividere un numero di componenti a livello di segnalazione

### **Definizione di possibili fattori genetici di resistenza alla mosca**

Le risposte delle drupe all'alimentazione delle larve possono variare a seconda della quantità di danni inflitti, delle condizioni ambientali nel momento in cui gli insetti si nutrono, e dalla disponibilità e allocazione delle risorse per la pianta. È pertanto rilevante che i nostri dati hanno indicato che tra i geni coinvolti nella risposta nella drupa che sono stati analizzati, l'attivazione trascrizionale più grande è stata rilevata per un inibitore della tripsina. In diverse specie vegetali, gli inibitori della proteinasi (serina, cisteina,

o aspartico proteasi) sono altamente attivati dalla limentazione delle larve. Le serin proteasi sono gli enzimi più importanti rilevate nell'intestino dei Lepidotteri, Coleotteri, Emitteri, Omotteri e Ditteri. Tuttavia, test biologici con Serpine (serina-inibitori della proteasi) contro Ditteri sono molto più limitato rispetto a ordini di altri insetti. E' stato dimostrato che le larve e adulti della mosca mediterranea della frutta (*C. capitata*) si basano su sistemi complessi proteolitici per la digestione delle proteine, con un piccolo contributo delle attività digestive delle proteine aspartiche e della cisteina. Per questa specie, tra le proteinasi basiche sono soprattutto le serin-proteasi ha fornire la principale attività endoproteinases nell'intestino, con le tripsina-serina proteasi i più importanti nelle larve. Per tutte queste ragioni, sosteniamo che la tripsina-inibitori dovrebbe essere un elemento importante della resistenza della drupa alla mosca. Avendo identificato EST codificanti tali proteine sara' necessario un test in vivo contro la mosca delle olive utilizzando inibitori purificati per chiarire se queste molecole potrebbero essere stimpiegate come una nuova strategia di controllo degli insetti. Tale molecole potranno essere impiegate come bio-pesticidi ma attualmente e' possibile ipotizzare anche la produzione di molecole specifiche per inibire la produzione di enzimi digestivi (ad esempio tramite la tecnica dell'RNAi) o eventualmente, sfruttare la attesa azione sinergica di queste due strategie.

### **Risultati ottenuti**

*(Max 6.000 caratteri spazi inclusi)*

Sebbene una quota parte dei componenti e dei meccanismi del network molecolare che governa la difesa dell'olivo alla mosca, principalmente a causa delle limitate informazioni genomiche, è ancora poco conosciuta, dai dati prodotti durante il primo anno sembra chiaro che la capacità della drupa di rispondere efficacemente alla mosca si basa su una alterazione dello stato fisiologico dei tessuti lesi, sulla capacità di riconoscere e identificare l'agente di stress e soprattutto da una gamma di meccanismi indotti che includono la produzione di specie reattive dell'ossigeno, la generazione di molecole segnale e l'accumulo di proteine di difesa diretta. La dissezione di queste risposte fisiologiche a livello molecolare può fornire preziose informazioni per migliorare le strategie di scelta delle attuali o future nuove varietà di olivo, e saranno di ausilio per la selezione di piante più resistenti ad un ampio spettro di stress. A sua volta, ciò porterà ad una riduzione dell'uso di prodotti chimici ed ai connessi rischi ambientali.

Questo studio rappresenta il primo passo nella comprensione dell'interazione molecolare tra l'olivo ed il suo maggior agente di stress biotico. Tuttavia, ulteriori progressi nella genomica e genetica molecolare dell'olivo sono ancora necessari per scoprire pienamente il modo in cui questa pianta elabora le proprie strategie di difesa. L'olivo italiano è caratterizzato da una ampia diversità genetica ed è necessario sfruttare questa risorsa naturale sia per identificare geni sia per definire la variazioni quantitative di tratti che sono importanti sia dal punto di vista agricolo che evolutivistico. Solo queste conoscenze forniranno un quadro concettuale per razionalizzare l'intervento dell'uomo per migliorare l'attuale panorama varietale italiano e ridurre l'input di risorse necessarie per garantire produzioni di qualità. Nel caso specifico della interazione mosca-olivo, tale intervento deve basarsi sull'integrazione tra studi sulla diversità e struttura genetica degli olivi italiani, sulla identificazione di geni candidati per la resistenza alla mosca e sui polimorfismi funzionali. La futura scoperta di alleli superiori (superior allele mining), che si baserà sulla conoscenza della naturale variazione allelica di geni identificati in questa attività nel panorama olivicolo italiano, sarà notevolmente facilitata dalla sinergia tra i vari gruppi di ricerca coinvolti nella genetica e genomica dell'olivo.

### **Ostacoli incontrati e azioni correttive**

*(Max 6.000 caratteri spazi inclusi)*

Il valore di ridondanza raggiunto nell'analisi della libreria ha suggerito di non estendere ulteriormente l'analisi dei cloni ESTs. Tale decisione e' stata supportata anche dall'assemblamento delle sequenze clonate, che ha fornito nella maggior parte degli unigene una ridotta estensione (ovvero una percentuale di overlap elevata). Per questi motivi le analisi molecolari si sono concentrati sul clonaggio delle sequenze codificanti

full-length di due geni candidati tramite RACE-PCR. Alle 198 EST clonate, sottomesse in banche dati come 111 unigenes, si sono dunque aggiunti due sequenze codificanti full-length di geni di difesa di olivo.

**Pubblicazioni / Eventi divulgativi / Eventi formativi**

sottomissione ai database pubblici 111 unigenes, derivanti da 198 ESTs

sottomissione ai database pubblici di due full-length coding sequences

P.Varricchio, A. Imperato, G. Corrado, F. Alagna, , L. Baldoni & R. Rao, 2010. Selezione di Sequenze Est ed identificazione di geni diversamente espressi in olivo a seguito dell'attacco della mosca *Bactrocera Oleae*. *Italus Hortus* 17(5): 25-28

Imperato A., Corrado G., Alagna F., Varricchio P., Baldoni L. and Rao R. 2010. Olive Molecular Response to the Attack of *Bactrocera Oleae*: Identification of Up-Regulated Genes in infested Olive Fruits, Proceedings of the International Horticultural Congress, Lisbon, August 22-27.

Giandomenico Corrado, Fiammetta Alagna, Mariapina Rocco, Giovanni Renzone, Paola Varricchio, Valentina Coppola, Mariangela Coppola, Antonio Garonna, Luciana Baldoni, Andrea Scaloni & Rosa Rao, 2012. Molecular interactions between the olive and the fruit fly *Bactrocera oleae* 2012 submitted

<b>Timbro Istituzione</b>	<b>Firma Responsabile Scientifico U.O.</b>