Rendiconti
Accademia Nazionale delle Scienze detta dei XL
Memorie di Scienze Fisiche e Naturali
119° (2001), Vol. XXV, pp. 359-372

LUIGI M. MONTI *

Analisi del genoma vegetale e valorizzazione delle produzioni tipiche **

L'attuale forzato impedimento della sperimentazione in campo di piante «geneticamente modificate» ha di fatto fermato la ricerca nei laboratori italiani sulle applicazioni della tecnica del DNA ricombinante. Il grottesco di questa situazione è che viene anche impedita la sperimentazione con piante in cui sono stati trasferiti con tecniche innovative geni provenienti da altre piante. Un'altra conseguenza di questa politica miope è che molti ricercatori italiani stanno sperimentando all'estero nuovi materiali genetici in specie di interesse per il Paese ospitante ottenuti con tecniche messe a punto in Italia su specie di nostro interesse e così, oltre alla fuga di cervelli, stiamo assistendo in questo particolare settore della genetica vegetale anche ad una fuga di «know-how». In attesa che venga a cessare questa deleteria limitazione, la ricerca genetica vegetale sta concentrando i suoi sforzi da una parte sulla valorizzazione delle produzioni più tipiche della nostra agricoltura e dall'altra su ricerche di laboratorio per l'identificazione di geni potenzialmente utili nel miglioramento genetico.

Questa relazione riporta i principali risultati conseguiti negli ultimi anni in questo ambito dai ricercatori dell'Università e del CNR operanti a Portici.

A. Analisi ed ampliamento della variabilità genetica

Fino a pochi decenni fa, lo studio della variabilità genetica era limitata ai caratteri morfo-fisiologici con forti limitazioni dovute alla loro scarsa variabilità ed al fatto che la loro espressione è fortemente condizionata dall'ambiente.

* CNR-IMOF Istituto per il Miglioramento Genetico delle Piante da Orto e da Fiore, Portici (NA) – Dipartimento di Scienze Agronomiche e Genetica Vegetale, Università degli Studi di Napoli «Federico II».

** Relazione presentata al Primo Convegno Nazionale della U.N.A.S.A. su «Biotecnologie agroalimentari, industriali, ambientali: problemi e prospettive», Roma, 1-2 ottobre 2001.

Da quando i progressi della biologia molecolare hanno permesso l'analisi della variabilità presente nelle piante a livello del DNA, è stato possibile applicare tecniche notevolmente precise non solo nello studio della variabilità ma anche per il miglioramento genetico. Ciò ha fatto aumentare notevolmente la risoluzione delle differenze genetiche tra genotipi diversi, permettendo di caratterizzare varietà, ecotipi ed accessioni diverse. L'uso di queste tecniche ha accresciuto in maniera incredibile la quantità di informazioni che è possibile ricavare dal germoplasma disponibile nelle collezioni e quindi la loro valutazione (Monti *et al.*, 2000).

A Portici, l'uso di RAPD, di microsatelliti, di AFLP ha permesso di distinguere ecotipi di pomodoro, di melo, e di recente anche di olivo e di noce, consentendo un'identificazione molto precoce dei tipi senza doverne attendere la fruttificazione.

In olivo sono state analizzate 5 cultivar del Cilento con marcatori AFLP: è stato possibile individuare i profili elettroforetici che identificano ciascuna delle 5 varietà ed è stato identificato anche un mutante della cv. Pisciottana. I dati ottenuti hanno anche dimostrato che piante di olivo millenarie accresciutesi nello stesso areale conservano una elevatissima similarità mantenendo praticamente immutato il genoma originario (Ambrosino *et al.*, 2002).

Anche in noce è stata realizzata un'analisi con AFLP di diverse popolazioni della cv. Sorrento: è stato possibile identificare le piante provenienti da seme da quelle derivanti da propagazione vegetativa ed è stato anche possibile identificare tipi diversi dal Sorrento (Avitabile *et al.*, 1999).

Le specie selvatiche posseggono nel loro genoma alleli di notevole interesse in particolare per l'adattamento ad avversità biotiche ed abiotiche, alleli che sono andati perduti durante il processo di domesticazione. L'identificazione di tali geni è sempre stato un obiettivo perseguito nei programmi di miglioramento genetico con l'analisi di collezioni di germoplasma (Monti, 2000). Una collezione di germoplasma di *Aster* è stata caratterizzata per la variabilità morfo-fisiologica, la capacità a produrre callo *in vitro* e la diversità genetica. Da una delle specie è stata estratta una frazione di saponina di triterpenoidi che ha manifestato attività biologica contro funghi fitopatogeni ed in particolare contro la *Botrytis* (Cammareri *et al.*, 2000, Cammareri *et al.*, 2002 in press).

L'utilizzazione di geni utili è stata spesso limitata dalle difficoltà di avere ibridi interspecifici e dalle dimensioni delle popolazioni segreganti. La coltura degli embrioni, la fusione somatica, l'uso di particolari mutanti meiotici, la trasformazione genetica e la selezione assistita da marcatori molecolari hanno notevolmente aumentato la possibilità di introgressione di geni da specie selvatiche.

A Portici è stata data particolare attenzione alla specie *Solanum commersonii* che possiede molti geni utili per il miglioramento genetico della patata coltivata; poiché essa non è direttamente incrociabile con *S. tuberosum*, sono stati sviluppati schemi alternativi per l'ibridazione a livello somatico ed a livello sessuale con l'ausilio di mutanti meiotici.

A tal fine sono state condotte numerose ricerche sulla caratterizzazione molecolare e citologica e sull'utilizzazione delle mutazioni meiotiche che portano alla produzione di gameti 2*n* in *Solanum*. I gameti 2*n* consentono infatti la manipolazione di interi set cromosomici attraverso la poliploidizzazione sessuale, e quindi permettono il trasferimento di geni utili e diversità allelica dal germoplasma selvatico diploide alle varietà tetraploidi di *S. tuberosum*.

Analisi molecolari con marcatori RFLP hanno consentito di stimare la percentuale di eterozigosi trasmessa da gameti *2n* di tipo FDR e SDR (Barone *et al.*, 1995), e quindi di definire i migliori schemi di poliploidizzazione sessuale. Sono stati condotti studi su genotipi di diversa origine (specie selvatiche, aploidi di *S. tuberosum*, ibridi interspecifici), che hanno portato all'identificazione delle mutazioni meiotiche più diffuse. L'omissione della seconda divisione e la presenza di fusi paralleli in metafase II sono risultate le principali mutazioni della gametogenesi rispettivamente femminile e maschile (Conicella *et al.*, 1991; Barone *et al.*, 1993; Barone *et al.*, 1999a; Alfano *et al.*, 1999; Carputo *et al.*, 2000a; Sebastiano *et al.*, 2001). Dati di segregazione sulla produzione di polline *2n* hanno fatto ipotizzare che la presenza di fusi paralleli in metafase II potesse essere una condizione necessaria ma non sufficiente per la produzione di polline *2n* (Carputo *et al.*, 1995; Barone *et al.*, 1997). Studi di immunolocalizzazione hanno consentito di evidenziare la distribuzione dell'α-tubulina e dell'F-actina durante la meiosi di genotipi produttori e non di polline *2n* e di confermare che, oltre all'orientamento dei fusi, anche anomalie a carico dei microtubuli durante la citochinesi sono necessarie per la manifestazione del fenotipo polline *2n* (Genualdo *et al.*, 1998).

Gli studi sui mutanti meiotici hanno portato alla selezione di genotipi superiori diploidi e triploidi (Filotico *et al.*, 1995; Conicella *et al.*, 1996; Tucci *et al.*, 1996b; Carputo *et al.*, 1997a), caratterizzati dalla produzione di polline e/o ovocellule *2n* e da buone performance agronomiche. Alcuni di questi mutanti sono stati utilizzati con successo per il trasferimento, attraverso ingegneria genomica, di geni di resistenza a stress biotici ed abiotici (Carputo *et al.*, 1997b; Carputo *et al.*, 2000b; Carputo *et al.*, 2000c), di geni per caratteristiche qualitative (Esposito *et al.*, 2001) e di elevati livelli di eterosi (Carputo *et al.*, 1994; Carputo *et al.*, 1996) da specie selvatiche alla patata coltivata.

Sempre ai fini dell'introgressione di geni utili in specie coltivate, sono stati condotti studi sull'utilizzazione della fusione somatica. Un protocollo per la rigenerazione di protoplasti è stato messo a punto in tre accessioni di *Solanum commersonii* (Cardi *et al.*, 1990). Due popolazioni di ibridi somatici *S. commersonii* (+) *S. tuberosum* sono state prodotte e caratterizzate a livello molecolare, citologico e morfologico; Cardi *et al.*, 1993b; Bastia *et al.*, 2000; Cardi, 1998, 2001). Gli ibridi somatici sono risultati più tolleranti del genitore coltivato per vari stress abiotici e biotici (Cardi *et al.*, 1993b; Carputo *et al.*, 1997; Parrella *et al.*, 1999), ma morfologicamente simili ad esso, mostrando in genere un forte vigore ed eterosi per le caratteristiche produttive (Cardi *et al.*, 2001a). Gli ibridi sono risultati general-

mente maschio sterili ma fertili dal punto di vista femminile (Carputo *et al.*, 1998). La maschio sterilità osservata ha mostrato ereditarietà materna (Bastia *et al.*, 1999; Cardi *et al.*, 1999), una precoce degenerazione del tappeto ed un'anomala organizzazione delle fibre del fuso meiotico durante la microsporogenesi. La formazione di multivalenti durante la profase meiotica degli ibridi fertili suggeriva la possibilità di appaiamento cromosomico intergenomico negli ibridi (Conicella *et al.*, 1997). Progenie, ottenute per autofecondazione e reincrocio degli ibridi somatici, sono state utilizzate per studi genetici (Barone *et al.*, 2001a) e per analizzare caratteristiche agronomiche, il contenuto di glicoalcaloidi ed altre caratteristiche qualitative (Basile *et al.*, 1998; Carputo *et al.*, 2000b; Esposito *et al.*, 2001; Cardi *et al.*, 2001c, d). La composizione del DNA mitocondriale e di quello plastidiale negli ibridi somatici maschio sterili e maschio fertili è stata studiata mediante analisi RFLP e PCR. Evidenze per la ricombinazione intergenomica del mtDNA sono state ottenute nella maggior parte dei cloni ibridi analizzati (Bastia *et al.*, 2001). È stato anche messo a punto un protocollo per l'estrazione di mtDNA ed mtRNA da quantità limitate di tessuto in ibridi somatici maschio sterili e maschio fertili (Scotti *et al.*, 2001).

Genotipi diversi di *S. commersonii* sono stati utilizzati in studi di rigenerazione e trasformazione di espianti fogliari (Cardi *et al.*, 1992; Cardi *et al.*, 1993a; Cardi, 1999). I cloni tetraploidi rigenerati sono stati incrociati con cloni diploidi *S. phureja* x *S. tuberosum*, producendo ibridi triploidi che sono stati caratterizzati a livello morfologico e citologico (Carputo *et al.*, 1995).

Le ricerche di trasformazione genetica hanno riguardato anche specie considerate «recalcitranti» alle manipolazioni *in vitro*, come le leguminose da granella. Per queste ultime sono stati sviluppati sistemi di trasformazione genetica particolari, basati sia sull'*Agrobacterium tumefaciens* sia su metodi diretti di trasferimento del transgene nel genoma della pianta bersaglio, come la biolistica e l'elettroiniezione. Benché i metodi devono essere ancora migliorati per ottenere frequenze di trasformazione comparabili con quelle di piante più facilmente manipolabili, i risultati sono incoraggianti e consentono di prevedere anche per alcune di queste leguminose importanti per i Paesi in via di sviluppo la possibilità di essere coinvolte nel miglioramento genetico basato su metodi innovativi (Lurquin *et al.*, 2001).

Una notevole attività è stata portata avanti anche sulla trasformazione genetica dei plastidi, una tecnologia innovativa che offre diversi vantaggi per le future applicazioni delle biotecnologie in campo vegetale (Cardi *et al.*, 2001b). Ricerche sono in corso per sviluppare questa tecnologia in Solanacee d'interesse agrario e far esprimere negli organelli di queste specie geni per la risposta agli stress o per la produzione di sostanze d'interesse farmaceutico-industriale.

B. Identificazione di geni utili e loro uso

La crescita e lo sviluppo delle piante, e conseguentemente la produttività delle specie agrarie, sono fortemente influenzati dagli stress ambientali. In seguito a stress tuttavia vengono attivati meccanismi di riparazione e/o protezione cellulare (osmoprotezione, omeostasi cellulare, sintesi di ormoni, mantenimento dell'integrità delle membrane, etc.), collegati alla capacità della cellula di adattarsi e tollerare lo stress (Grillo *et al.*, 1995; Grillo e Leone, 1996; Leone *et al.*, 1999). In particolare è stato dimostrato che in patata durante l'acclimatamento graduale a condizioni di stress osmotico sono attivati differenti pathway biochimici che inducono all'accumulo di ABA e prolina, l'espressione di specifici set di geni e di attività enzimatiche in grado di consentire il mantenimento delle strutture cellulari più sensibili e il raggiungimento di un nuovo equilibrio omeostatico (Leone *et al.*, 1994 a, b; Leone *et al.*, 1996a, b; Scaramagli *et al.*, 2000).

Per isolare geni i cui prodotti hanno un'attività enzimatica direttamente collegata all'adattamento cellulare a condizioni di stress termico e osmotico attraverso lo screening di librerie cDNA e genomiche, sono stati isolati da *Solanum commersonii*, diverse classi di geni i cui prodotti hanno una funzione metabolica nota, quali le desaturasi, l'H^+- e Ca^{++}-ATPasi del plasmalemma e tonoplasto e le calmoduline (Grillo *et al.*, 1996; Massarelli *et al.*, 2001). In particolare sono stati isolati i geni codificanti per una delta 9 e delta 12 desaturasi, enzimi chiave nel regolare il livello di insaturazione degli acidi grassi e quindi del mantenimento della fluidità delle membrane biologiche. Tali geni, la cui espressione è modulata in risposta a cambiamenti della temperatura ambientale, sono stati utilizzati per ottenere piante transgeniche con elevata espressione delle desaturasi, aumentato livello degli acidi grassi insaturi e più tolleranti le basse temperature (Grillo *et al.*, 1996; Leone *et al.*, 1996a).

Con l'uso delle tecniche *Differential Display Reverse Transcription (DDRT) - PCR* e *AFLP-cDNA* sono stati poi identificati numerosi geni di patata non noti, differenzialmente espressi in condizioni di stress osmotico differenti (Costa *et al.*, 1999). È stato infine sviluppato un approccio funzionale per identificare geni di patata la cui sovra-espressione permette a cellule batteriche di *Escherichia coli* di crescere su substrati contenenti alte concentrazioni saline. Tale metodologia ha già permesso l'isolamento di circa 14 cloni cDNA. Tra questi sono stati isolati un gene codificate per una deidrina e per una 'chaperonina' della classe 60, proteine già note per avere un ruolo nei meccanismi di risposta cellulare a stress osmotici e salini (Costa *et al.*, 1999; Massarelli *et al.*, 2001) insieme a geni la cui funzione è sconosciuta.

Per quanto riguarda la resistenza agli stress biotici ed in particolare a funghi fitopatogeni, l'espressione di proteine *PR* (proteine correlate alla patogenesi) è stato quello che ha ottenuto interessanti riscontri *in vivo*. La linea di ricerca sviluppata a Portici si è differenziata da questo approccio, ricercando altre fonti di geni PR, o classificabili come tali, in organismi sintetizzanti enzimi idrolitici più efficaci di

quelli prodotti in pianta. In collaborazione con i patologi vegetali di Portici, l'interesse è stato focalizzato sul fungo antagonista *Trichoderma harzianum*. Questo fungo si nutre di altri funghi, che attacca idrolizzandone le pareti cellulari grazie alla sintesi di potenti enzimi idrolitici, quali glucanasi, chitinasi, etc. Geni per una endochitinasi ed una 1,3-beta glucanasi sono stati quindi isolati e clonati in appositi vettori di espressione in pianta, sotto promotore costitutivo o inducibile. Sono state ottenute piante transgeniche di patata, petunia e tabacco, recanti una o più copie del transgene. Tali piante, grazie ad analisi molecolari, hanno evidenziato l'espressione dell'enzima transgenico e la sua efficacia in saggi *in vitro* su substrati specifici. In saggi *in vivo* su piante transgeniche inoculate con ceppi virulenti di differenti fitopatogeni, quali *Botrytis, Alternaria* e *Verticillium,* è stata osservata una reazione più rapida delle piante stesse all'attacco, con conseguente riduzione dei sintomi sino alla manifestazione di completa immunità (Lorito *et al.*, 1998; Esposito *et al.*, 2000). La resistenza indotta non è quindi di tipo verticale, ovvero relativa ad un unico e specifico riconoscimento tra pianta e parassita, bensì si dimostra essere di tipo ampio in quanto, oltre all'attività della specifica idrolasi transgenica, la pianta reagisce molto più rapidamente agli elicitori derivanti dalla degradazione delle pareti del fungo invasore.

A Portici sono anche state prodotte linee transgeniche di pomodoro sovraesprimenti il gene dell'osmotina di tabacco, una proteina PR della classe 5 attiva nei confronti di un vasto spettro di patogeni. Tali linee, con un numero di copie del transgene compreso tra 1 e 3, hanno dimostrato resistenza ad importanti patogeni quali *Oidium lycopersici*, *Phytophthora infestans* e *Botrytis cinerea* che, insieme alla stabilità dell'espressione del transgene, è stata confermata fino alla generazione T4 (Tucci *et al.*, 1996; Veronese *et al.*, 1998). Le piante transgeniche non hanno mostrato altre differenze fenotipiche rispetto ai controlli.

Allo scopo di valutare la resistenza ottenibile in pomodoro attraverso l'espressione ectopica di altre proteine ad attività antifungina, sono stati isolati da frumento tenero (*Triticum aestivum* cv. S. Pastore), attraverso un approccio RT-PCR, due cloni cDNA codificanti le proteine PR4 wheatwin1 e wheatwin2 dotate di spiccata attività antifungina *in vitro* sia contro patogeni specifici del frumento sia contro funghi a più ampio spettro di azione (Caruso *et al.*, 1999). Tali cloni, *wPR4a* e *wPR4b*, che contengono «open reading frames» di 441 e 447 bp codificanti rispettivamente wheatwin1 e wheatwin2, sono stati espressi in *Escherichia coli* (Caruso *et al.*, 2001). Le proteine ricombinanti sono state purificate dalla frazione insolubile e processate correttamente secondo un protocollo appositamente messo a punto e attualmente sotto richiesta di brevetto. Entrambe le proteine ricombinanti sono in grado di inibire la crescita *in vitro* di *Fusarium culmorum*, esibendo proprietà antifungine simili alle proteine native. I cloni *wPR4a* e *wPR4b* sono stati anche clonati in vettori binari ed utilizzati per la trasformazione genetica di pomodoro e della specie modello tabacco. Le piante trasformate contengono da 1 a 7 copie del transgene ed esprimono le proteine wheatwin1 o wheatwin2 ad alti livelli.

Per quanto riguarda la resistenza ad insetti, è stato espresso in tabacco il gene codificante per la prosistemina di pomodoro allo scopo di studiare i meccanismi di processamento post traduzionale di tale precursore, la loro conservazione in un'altra solonacea, e la possibiltà di conferire un'aumentata resistenza all'attacco di insetti. È stato dimostrato che piante transgeniche esprimenti la prosistemina mostrano un'elevata resistenza all'attacco di larve di lepidotteri ed è stato dimostrato mediante analisi molecolare che alcuni geni swrp, omologhi a quelli trovati in pomodoro, sono costitutivamente espressi nelle piante transgeniche (Tortiglione *et al.*, 1999).

Una seconda strategia seguita per la produzione di piante resistenti ad insetti prevede l'ottenimento di piante transgeniche esprimenti peptidi ormonali e neuropeptidi di insetto. La strategia di produzione di tali peptidi in pianta ha previsto l'uso di geni sintetici codificanti copie multiple di peptidi ripetuti in tandem e separati da potenziali siti di taglio endoproteolitico, arg-arg (Rao *et al.*, 1996). L'allevamento di larve di *H.virescens* su dischi fogliari di piante transgeniche di tabacco esprimenti il decapeptide TMOF ha determinato una notevole diminuzione dell'accrescimento ponderale rispetto alle larve cresciute sul controllo, identificando così una nuova classe di molecole aventi funzione insetticida (Tortiglione *et al*, 2002a). È stato inoltre recentemente dimostrato che il precursore peptidico è correttamente processato in pianta in corrispondenza dei siti proteolitici dibasici, rilasciando molecole attive (Tortiglione *et al.,* 2002b). Questa nuova strategia di produzione di piccoli peptidi potrà essere applicata all'espressione di diversi peptidi per l'ottenimento di resistenze piramidalizzate.

Sempre nel settore della resistenza agli stress biotici, è stata utilizzata la mappa RFLP di patata costruita presso il Max Planck Institut di Colonia (Gebhardt *et al.*, 1991) per identificare un gene di resistenza (Gro1) a *Globodera rostochiensis* sul cromosoma IX (Barone *et al.*, 1990) e due geni di resistenza al virus X sui cromosomi V e XII (Ritter *et al.*, 1991). Tale lavoro ha costituito la base preliminare per poter effettuare, oltre alla selezione assistita, anche la localizzazione fine ed il clonaggio di tali geni.

Allo scopo di trasferire geni di resistenza dalla specie selvatica *S. commersonii* a varietà coltivate di patata, è stato messo a punto un particolare schema di incrocio basato sulla manipolazione del livello di ploidia, finalizzato al superamento delle barriere di incompatibilità interspecifica esistente tra le due specie (Carputo *et al.*, 1997a). Sono stati utilizzati marcatori molecolari RFLP, RAPD e AFLP specifici di *S. commersonii* e *S. tuberosum* (Sebastiano *et al.*, 1999) per studiare la possibilità di ricombinazione tra le due specie (Barone *et al.*, 1999; Barone *et al.*, 2002), e quindi la possibilità di trasferire geni dall'una all'altra. Inoltre, marcatori RAPD e AFLP specifici di *Solanum commersonii* sono stati utilizzati per stimare il grado di recupero del genoma ricorrente in diverse generazioni di reincrocio, operando una vera e propria selezione assistita negativa. Tali ricerche hanno così consentito di selezionare ibridi *S. commersonii-S. tuberosum*, con diversi livelli di ploidia, che presentano

un buon livello di resistenza ad *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, carattere introgresso dalla specie selvatica, oltre a buone caratteristiche dei tuberi ed ad un basso contenuto in genoma selvatico (Barone *et al.*, 2001b).

Il progressivo sviluppo della genetica di base ha avuto formidabili conseguenze sulla conoscenza genetica delle specie di interesse agrario, delle più importanti delle quali (riso, mais, pomodoro etc.) esistono oggi mappe genetiche molto arricchite; mappe genetiche più ricche significano maggiori possibilità di miglioramento genetico, in quanto c'è maggiore comprensione del comportamento ereditario dei caratteri, anche di quelli più complessi e più condizionati dall'ambiente, una maggiore possibilità di realizzare una selezione assistita ed una migliore possibilità di clonare geni. Queste maggiori possibilità hanno riguardato anche i loci genetici influenzanti caratteri quantitativi (QTL).

A Portici è stata seguita la strategia per il miglioramento genetico di caratteri quantitativi assistito dall'uso di marcatori molecolari, nota come «Advanced Backcross QTL (AB-QTL) analysis» (Tanksley e Nelson, 1996). L'obiettivo di questo metodo è di integrare l'analisi dei QTL con l'ottenimento di varietà migliorate sfruttando la variabilità genetica presente nel germoplasma selvatico. Questa strategia è stata applicata a cinque popolazioni derivanti da incroci interspecifici con cinque specie selvatiche di pomodoro (Grandillo e Tanksley, 1996; Tanksley *et al.*, 1996; Fulton *et al.*, 2000; Grandillo *et al.*, 1999a). In tutti i casi è stato possibile identificare QTL della specie selvatica capaci di aumentare in modo significativo la qualità e la produttività delle specie coltivate.

Mediante selezione assisitita dall'uso di marcatori molecolari sono state ottenute diverse linee quasi isogeniche per QTL delle specie selvatiche in grado di migliorare uno o più caratteri di interesse. Queste linee sono state valutate in esperimenti replicati in diverse località (Tanksley *et al.*, 1996; Grandillo *et al.*, 1999b, 2000). Per alcune di queste linee i guadagni genetici ottenuti rispetto alla varietà controllo hanno raggiunto valori molto elevati per il brix, il colore del frutto e la produzione (Grandillo *et al.*, 1999c).

Contributo n. 234 del CNR-IMOF Istituto Miglioramento Genetico delle Piante da Orto e da Fiore.

BIBLIOGRAFIA

Avitabile A., Santangelo I., Gelone R., Grassi G. & Rao R. (1999). Caratterizzazione di cultivar e selezioni di noce (Juglans regia L.) attraverso marcatori AFLP. *5° Convegno nazionale sulla Biodiversità*, Caserta 9-10 settembre 1999, pp. 109-115.

Alfano F., Cammareri M., Errico A., Frusciante L. & Conicella C. (1999). 2n gametes in Solanum tuberosum dihaploids. *American Journal of Potato Research*, 76, 281-285.

Ambrosino O., Monti L.M. & Rao R. (2002). Marcatori AFLP per l'identificazione di cultivar di olivo e per la stima della variabilità genetica intra ed inter varietale. *Italus Hortus* (in stampa).

Barone A., Ritter E., Schachtschabel U., Debener T., Salamini F. & Gebhardt C. (1990). Localization by restriction fragment length polymorphism mapping in potato of a major dominant gene conferring resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Mol. Gen. Genet.*, *224*, 177-182.

Barone A., Carputo D. & Frusciante L. (1993). Selection of potato diploid hybrids for 2n gamete production. *J. Genet.*& *Breed.*, 47, 313-318.

Barone A., Gebhardt C. & Frusciante L. (1995). Heterozygosity in 2n gametes of potato evaluated by RFLP markers. *Theor. Appl. Genet.*, 91, 98-104.

Barone A., Carputo D., La Rotonda G. & Frusciante L. (1997). Discrepancy between spindle anomalies and 2n pollen production in *Solanum* interspecific hybrids. *Am. Potato J.*, 74, 399-403.

Barone A., Carputo D., La Rotonda G., Sebastiano A. & Frusciante L. (1999a). Cytological and genetic studies on 2n pollen formation mechanisms in diploid Phureja-Tuberosum hybrids. *J. Genet.* & *Breed.*, 53, 223-230.

Barone A., Sebastiano A. & Carputo D. (1999). Chromosome pairing in *S. commersonii-S. tuberosum* sexual hybrids detected by *commersonii* specific RAPDs and cytological analysis. *Genome*, *42*, 218-224.

Barone A., Li J., Sebastiano A., Cardi T. & Frusciante L. (2001a). Evidence for tetrasomic inheritance in a tetraploid *Solanum commersonii* (+) *S. tuberosum* somatic hybrid through the use of molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* (in stampa).

Barone A., Sebastiano A., Carputo D., Della Rocca F. & Frusciante L. (2001b). Molecular marker-assisted introgression of the wild *Solanum commersonii* genome into the cultivated *S. tuberosum* gene pool. *Theor. Appl. Genet.*, *102* (6/7), 900-907.

Barone A., Li J., Sebastiano A., Cardi T. & Frusciante L. (2002). Evidence for tetrasomic inheritance in a tetraploid *Solanum commersonii* (+) *S. tuberosum* somatic hybrid through the use of molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* (in stampa).

Basile B., Carputo D., Zoina A., Monti L. & Cardi T. (1998). *Solanum commersonii* (+) *Solanum tuberosum* somatic hybrids: fertility in inter-EBN backcrosses and evaluation of progenies. *Proc. Int. Symp. «Breeding Research on Potatoes»*, June 23-26, 1998, Grob Lüsewitz (Rostock), Germany, pp. 14-15.

Bastia T., Scotti N., Monti L., Earle E.D. & Cardi T. (1999). Genetic and molecular analysis of male fertility and cytoplasmic DNA variation in interspecific *Solanum* spp. somatic hybrids. In: *Plant Biotechnology and* In Vitro *Biology in the 21st Century*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 105-108.

Bastia T., Carotenuto N., Basile B., Zoina A. & Cardi T. (2000). Induction of novel organelle DNA variation and transfer of resistance to frost and Verticillium wilt in *Solanum tuberosum* through somatic hybridization with 1EBN *S. commersonii. Euphytica*, *116*, 1-10.

Bastia T., Scotti N. & Cardi T. (2001). Organelle DNA analysis of *Solanum* and *Brassica* somatic hybrids by PCR with 'Universal Primers'. *Theor. Appl. Genet.*, *102*, 1265-1272.

Cammareri M., Errico A., Filippone E. & Conicella C. (2002). Screening of *Aster* wild germplasm for *in vitro* response to regeneration. *J. Genet* & *Breed* (in stampa).

Cammareri M., Sebastiano A., Errico A. & Conicella C. (2000). Studio della variabilità genetica del genere *Aster* con marcatori AFLP. *Proc. 44th Meeting of the Italian Society of Agricultural Genetics*, September 20-23, 2000, Bologna (Italy), p. 113.

Cardi T., Puite K.J. & Ramulu K.S. (1990). Plant regeneration from mesophyll protoplasts of *Solanum commersonii* Dun. *Plant Sci*., 70, 215-221.

Cardi T., Iannamico V., D'Ambrosio F., Filippone E. & Lurquin P.F. (1992). *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Solanum commersonii* Dun. *Plant Sci*., 87, 179-189.

Cardi T., Iannamico V., D'Ambrosio F., Filippone E. & Lurquin P.F. (1993a). *In vitro* regeneration and cytological characterization of shoots from leaf explants of three accessions of *Solanum commersonii*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *34*, 107-114.

Cardi T., Puite K.J., Ramulu K.S., D'Ambrosio F. & Frusciante L. (1993b). Production of somatic hybrids between frost-tolerant *Solanum commersonii* and *S. tuberosum*: protoplast fusion, regeneration and isozyme analysis. *Am. Potato J*., 70, 753-764.

Cardi T. (1998). Multivariate analysis of variation among *Solanum commersonii* (+) *S. tuberosum* somatic hybrids with different ploidy levels. *Euphytica*, *99*, 35-41.

Cardi T., Bastia T., Monti L. & Earle E.D. (1999). Organelle DNA and male fertility variation in *Solanum* spp. and interspecific somatic hybrids. *Theor. Appl. Genet*., *99*, 819-828.

Cardi T. (1999). Transformation in *Solanum commersonii* Dun. In: Bajaj Y.P.S. (ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 45: *Transgenic Medicinal Plants*. Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 312-326.

Cardi T. (2001). Somatic hybridization between *Solanum commersonii* and *S. tuberosum*. In: Nagata T. and Bajaj Y.P.S. (eds.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 49: *Somatic Hybridization in Crop Improvement*. Part II. Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 245-263.

Cardi T., Consiglio F., Fiorentino F., Frusciante L. & Grillo S. (2001a). Valutazione agronomica e tolleranza al freddo di progenie di patata derivate da ibridazione somatica con la specie selvatica *Solanum commersonii*. *Riv. Agron*. (in stampa).

Cardi T., Filippone E. & Grillo S. (2001b). Tecnologie più sicure per produrre piante geneticamente modificate. *L'Informatore Agrario*, *48*, 33-35.

Cardi T., Mazzei M. & Frusciante L. (2001c). Field variation in a tetraploid progeny derived by selfing a *Solanum commersonii* (+) *S. tuberosum* somatic hybrid: a multivariate analysis. *Euphytica* (in stampa).

Cardi T., Mazzei M. & Frusciante L. (2001d). Multivariate analysis of variation in the field of tetraploid and (hypo)-hexaploid *Solanum commersonii* (+) *S. tuberosum* somatic hybrids. *Italian J. Agron.*, 4, 67-74.

Carputo D., Barone A., Consoli D. & Frusciante L. (1994). Use of seedling tubers from TPS in Southern Italy. *Am. Potato J*., 71, 29-38.

Carputo D., Cardi T., Frusciante L. & Peloquin S.J. (1995). Male fertility and cytology of triploid hybrids between tetraploid *Solanum commersonii* (2n=4x=48, 2EBN) and Phureja-Tuberosum haploid hybrids (2n=2x=24, 2EBN). *Euphytica*, *83*, 123-129.

Carputo D., Pentimalli M. & Frusciante L. (1996). Production and use of seedling tubers from True Potato Seed (TPS) for potato cultivation in Italy. *Potato Res*., *39*, 3-10.

Carputo D., Barone A., Cardi T., Sebastiano A., Frusciante L. & Peloquin S.J. (1997a). Endosperm Balance Number manipulation for direct *in vivo* germplasm introgression to potato from a sexually isolated relative (*Solanum commersonii* Dun.). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 12013-12017.

Carputo D., Cardi T., Speggiorin M., Zoina A. & Frusciante L. (1997b). Resistance to blackleg and tuber soft rot in sexual and somatic interspecific hybrids with different genetic background. *Am. Potato J*., *74*, 161-172.

Carputo D., Garreffa P., Mazzei M., Monti L. & Cardi T. (1998). Fertility of somatic hybrids *Solanum commersonii* (2*x*, 1EBN) (+) *S. tuberosum* haploid (2*x*, 2EBN) in intra- and inter-EBN crosses. *Genome*, *41*, 776-781.

Carputo D., Barone A. & Frusciante L. (2000a). 2n gametes in the potato: essential ingredients for breeding and germplasm transfer. *Theor. Appl. Genet.*, *101*, 805-813.

Carputo D., Basile B., Cardi T. & Frusciante L. (2000b). *Erwinia* resistance in backcross progenies of *Solanum tuberosum* x *S. tarijense* and *S. tuberosum* (+) *S. commersonii* hybrids. *Potato Res.*, *43*, 135-142.

Carputo D., Cardi T., Palta J.P., Sirianni P., Vega S. & Frusciante L. (2000c). Tolerance to low temperatures and tuber soft rot in hybrids between *Solanum commersonii* and *S. tuberosum* obtained through manipulation of ploidy and endosperm balance number (EBN). *Plant Breeding*, 119, 127-130.

Caruso C., Bertini L., Tucci M., Caporale C., Leonardi L., Saccardo F., Bressan R.A., Veronese P. & Buonocore V. (1999). Isolation and characterisation of wheat cDNA clones encoding PR4 proteins. *DNA Seq.*, *10* (4-5), 301-7.

Caruso C., Bertini L., Tucci M., Caporale C., Nobile M., Leonardi L. & Buonocore V. (2001). Recombinant Wheat Antifungal PR4 Proteins Expressed in *Escherichia coli*. *Protein. Expr. Purif.*, *23* (3), 380-8.

Conicella C., Barone A., Del Giudice A., Frusciante L. & Monti L.M. (1991). Cytological evidences of SDR-FDR mixture in the formation of 2n eggs in a potato diploid clone. *Theor. Appl. Genet.*, 81, 59-63.

Conicella C., Genualdo G., Errico A., Frusciante L. & Monti L.M. (1996). Meiotic restitution mechanisms and 2n pollen formation in a *Solanum tuberosum* haploid and in haploid x wild species hybrids. *Plant Breed.*, *115*, 157-161.

Conicella C., Genualdo G., Lucia R., Ramulu K.S. & Cardi T. (1997). Early tapetal degeneration and meiotic defects are involved in male sterility of *Solanum commersonii* (+) *S. tuberosum* somatic hybrids. *Theor. Appl. Genet.*, *95*, 609-617.

Costa A., Massarelli I., Dragonetti E., Leone A. & Grillo S. (1999). Isolation of genes involved in response to osmotic stress. *Abstract of Conference Paper and Posters of the 14th Triennial Conference of the European Association for Potato Research*, Sorrento, Italy, 2-7 May 1999, pp. 44-45.

Esposito F., Fogliano V., Cardi T., Carputo D. & Filippone E. (2001). Glycoalkaloid content and chemical composition of potatoes improved with non-conventional breeding approaches. *J. Agric. Food Chem.* (in stampa).

Esposito S., Colucci M.G., Frusciante L., Bressan R.A., Lorito M. & Filippone E. (2000). Antifungal transgenes expression in *Petunia hybrida*. *Acta Horticulturae*, *508*, 157-161.

Filotico F., Carputo D. & Barone A. (1995). 2n pollen production in *Solanum phureja-S. tuberosum* hybrids. *J. Genet. & Breed.*, *49*, 255-259.

Fulton T.M., Grandillo S., Beck-Bunn T., Fridman E., Frampton A., Lopez J., Petiard V., Uhlig J., Zamir D. & Tanksley S.D. (2000). Advanced backcross QTL analysis of a *Lycopersicon esculentum* x *L. parviflorum* cross. *Theor. Appl. Genet.*, *100*, 1025-1042.

Gebhardt C., Ritter E., Barone A., Debener T., Walkemeier B., Schachtschabel U., Kaufmann H., Thompson R.D., Bonierbale M.W., Ganal M.W., Tanksley S.D. & Salamini F. (1991). RFLP maps of potato and their alignment with the homeologous tomato genome. *Theor. Appl. Genet.*, *83*, 49-57.

Genualdo G., Errico A., Tiezzi A. & Conicella C. (1998). α-tubulin and F-actin distribution during microsporogenesis in a 2*n* pollen producer of *Solanum*. *Genome*, *41*, 636-641.

Grandillo S. & Tanksley S.D. (1996). Analysis of horticultural traits differentiating the cultivated tomato from the closely related species *Lycopersicon pimpinellifolium*. *Theor. Appl. Genet.*, *92*, 935-951.

Grandillo S., Bernacchi D., Fulton T.M., Zamir D. & Tanksley S.D. (1999a). Advanced backcross QTL analysis: a method for the systematic use of exotic germplasm in the improvement of crop quality. In: *Genetics and Breeding for Crop Quality and Resistance* (Scarascia Mugnozza G.T., Porceddu E. e Pagnotta M.A. (eds.), Kluwer Accademic Publishers, pp. 283-290.

Grandillo S., Ku H. & Tanksley S.D. (1999b). Identifying the loci responsible for fruit size and fruit shape variation in tomato. *Theor. Appl. Genet.*, *6*, 978-987.

Grandillo S., Zamir D. & Tanksley S.D. (1999c). Genetic improvement of processing tomatoes over the past 20 Years. *Euphytica*, *110*, 85-97.

Grandillo S., Monforte A.J., Fridman E., Zamir D. & Tanksley S.D. (2000). Agronomic characterization of a set of near-isogenic lines derived from a *Lycopersicon esculentum* x *L. hirsutum* cross. Poster presentato al *XLIV Convegno Annuale della Società Italiana di genetica Agraria (SIGA)*, Bologna, Settembre 20-23, 2000.

Grillo S., Leone A., Xu Y., Tucci M., Francione R., Hasegawa P.M., Monti L. & Bressan R.A. (1995). Control of osmotin gene expression by ABA and osmotic stress in vegetative tissues of wild type and ABA-deficient mutants of tomato. *Physiologia Plantarum*, 93, 498-504.

Grillo S., Costa A., Tucci M., Consiglio F., Amatruda M.R. & Leone A. (1996). Regulation of gene expression during cellular adaptation to water stress; In: *Physical stress in plants: genes and their products for tolerance*. S. Grillo and A. Leone (eds.), Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 163-169.

Grillo S. & Leone A. (eds.) (1996). *Physical stress in plants: genes and their products for tolerance*. Springer-Verlag, Heidelberg.

Leone A., Costa A., Tucci M. & Grillo S. (1994a). Adaptation versus shock response to PEG-induced low water potential in cultured potato cells. *Physiologia Plantarum*, *92*, 21-30.

Leone A., Costa A., Tucci M. & Grillo S. (1994b). Comparative analysis of short- and long-term changes in gene expression caused by low water potential in potato (Solanum tuberosum) cell-suspension cultures. *Plant Physiology*, *106*, 703-712.

Leone A., Costa A., Grillo S., Tucci M., Horvarth I. & Vigh L. (1996a). Acclimation to low water potential determines changes in membrane fatty acid composition and fluidity in potato cells. *Plant Cell & Environment*, *19*, 1103-1109.

Leone A., Grillo S. & Costa A. (1996b). Genes for tolerance to water stress in glycophyte plants. *Giornale Botanico Italiano*, *130*, 845-854.

Leone A., Costa A., Consiglio F., Massarelli I., Dragonetti & E. Grillo S. (1999). Tolerance to abiotic stress in potato plants: a molecular approach. *Potato Research*, *12*, 331-351.

Lorito M., Woo S.L., Garcia I., Colucci G., Harman G.E., Pintor-Toro J.A., Filippone E., Muccifora S., Lawrence C.B., Zoina A. & Scala F. (1998). Genes from mycoparasitic fungi as a novel source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 7860-7865.

Lurquin P.F., Filippone E. & Colucci G. (2001). Transgenic cowpea, lentil, and chickpea with reporter and agronomically relevant genes. In: *Transgenic Plants and Crops*, Khachatourians, McHughen, Scorza, Nip and Hui (eds.), M. Dekker Inc. (New York) chp. 41, pp. 603-612.

Massarelli I., Cioffi R., Leone A. & Grillo S. (2001). Isolation of potato osmotic responsive by a functional approach in *E. coli*. *Juan March Foundation Workshop*, 23-27 October 2001.

Massarelli I., Costa A., Leone A. & Grillo S. (2001). Isolation and characterization of different calmodulin isoforms from Solanum commersonii. *J. Genet. Breed* (in stampa).

Monti L. (2000). Attività degli Istituti C.N.R. nello studio delle risorse genetiche autoctone. *Atti del 4° Convegno Nazionale, Biodiversità Germoplasma locale e sua valorizzazione*, Alghero 8-11 Settembre 1998. Carlo Delfino Editore, pp. 65-78.

Monti L. & Grillo S. (2000). Contribution of molecular biology to the knowledge and utilization of biodiversity. *Convegno internazionale agriculture, biotechnology and chemistry, Accademia Nazionale dei Lincei*, Roma, 30 Settembre - 1 ottobre 1999, *27*, 103-114.

Parrella G. & Cardi T. (1999). Transfer of a new PVX resistance gene from *Solanum commersonii* to *S. tuberosum* through somatic hybridization. *J. Genet. Breed.*, 53, 359-362.

Rao R., Manzi A., Filippone E., Manfredi P., Spasiano A., Colucci G., Monti L. & Malva C. (1996). Synthesis and expression of genes encoding putative insect neuropeptide precursor in tobacco. *Gene*, *175*, 1-5.

Ritter E., Debener T., Barone A., Salamini F. & Gebhardt C. (1991). RFLP mapping on potato chromosomes of two genes controlling extreme resistance to potato virus X (PVX). *Mol. Gen. Genet.*, *227*, 81-85.

Ryan C.A. & Pearce G. (1998). Systemin: a polypeptide signal for plant defensive genes. *Annu. rev. cell. dev. Biol.*, *14*, 1-17.

Scaramagli S., Biondi S., Leone A., Grillo S. & Torrigiani P. (2000). Acclimation to low water potential in potato cell-suspension cultures leads to changes in putrescine metabolism. *Plant Physiology and Biochemistry*, *38* (4), 345-351.

Scotti N., Bastia T., Monti L., Earle E.D. & Cardi T. (1998). Composition and expression of the mtDNA in male fertile and male sterile interspecific *Solanum* spp. somatic hybrids. In: Møller I.M., Gardeström P., Glimelius K., Glaser K. (eds.), *Plant Mitochondria: from Gene to Function*. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands, pp. 95-98.

Scotti N., Cardi T. & Maréchal-Drouard L. (2001). Mitochondrial DNA and RNA isolation from small amounts of various potato tissues. *Plant. Mol. Biol. Rept.*, *19*, 67a-67h.

Sebastiano A., Frusciante L. & Barone A. (1999). Genetic relationships among *Solanum* genotypes used to introgress the wild *S. commersonii* genome into the *tuberosum* gene pool. *J. Genet & Breed*, *53*, 121-126.

Sebastiano A., Carputo D., Consiglio F., Filotico F., Frusciante L. & Barone A. (2001). FDR and FDR+SDR 2n pollen for true potato seed production. *J. Genet.* & *Breed.* (in stampa).

Seppänen M.M., Cardi T., Borg Hyökki M. & Pehu E. (2000). Characterization and expression of cold-induced glutathione S-transferase in freezing tolerant *Solanum commersonii*, sensitive *S. tuberosum* and their interspecific somatic hybrids. *Plant Sci.*, *153*, 125-133.

Tanksley S.D., Grandillo S., Fulton M.T., Zamir D., Eshed Y., Petiard V., Lopez J. & Beck-Bunn T. (1996). Advanced backcross QTL analysis in a cross between an elite processing line of tomato and its wild relative *L. pimpinellifolium*. *Theor. Appl. Genet.*, *92*, 213-224.

Tanksley S.D. & Nelson J.C. (1996). Advanced backcross QTL analysis: a method for the simultaneous discovery and transfer of valuable QTLs from unadapted germplasm into elite breeding lines. *Theor. Appl. Genet.*, *92*, 191-203.

Tortiglione C., Scarpetta R., Monti L. & Rao R. (1999). Engineering the systemin gene to produce small molecules in *Solanum tuberosum*. Abstract of *Conference Paper and Posters of the 14th Triennial Conference of the European Association for Potato Research*, Sorrento, Italy, 2-7 May 1999, pp. 594-595.

Tortiglione C., Fanti P., Pennacchio F., Malva C., Breuer M., De Loof A., Monti L.M., Tremblay E. & Rao R. (2002a). The expression in tobacco plants of *Aedes aegypti* Trypsing Modulating Oostatic Factor (Aea-TMOF) alters growth and development of the tobacco budworm; *Heliothis virescens*. *Mol. Breed* (in stampa).

Tortiglione C., Fanti P., Breuer M., Baggerman G., De Loof A., Pennacchio F., Malva C. & Rao R. (2002b). Polyproctolin precursors coded by synthetic genes are properly processed in tobacco producing active neuropeptide molecules. *Nat. Biotech* (submitted).

Tucci M., Caruso C., Chilosi G., Crinò P., Caporale C., Leonardi L., Bertini L., Veronese P., Magro P., Buonocore V. & Saccardo F. (1996). Proteine PR per l'espressione di resistenza a malattie fungine in pianta. *Atti Workshop congiunto dei gruppi di lavoro «Organismi Geneticamente Modificati» e «Resistenze Genetiche»*. Bologna 20 dicembre, pp. 28-30.

Tucci M., Carputo D., Bile G. & Frusciante L. (1996b). Male fertility and freezing tolerance of hybrids involving *Solanum tuberosum* haploids and diploid *Solanum* species. *Potato Res.*, *39*, 345-353.

Veronese P., Tucci M., Crinò P., Rugini E., Bressan R. & Saccardo F. (1996). Resistenza a patogeni fungini in piante di pomodoro transgeniche per gene osmotina. *Atti XL Convegno Annuale Società Italiana Genetica Agraria*. Perugia 17-23 settembre, p. 65 (abstract).

Veronese P., Tucci M., Crinò P., Hasegawa M.P., Bressan R.A. & Saccardo F. (1997). *Atti XLI Convegno Annuale Società Italiana Genetica Agraria*. Abbadia di Fiastra, Tolentino 24-27 settembre, pp. 158-159 (abstract).

Veronese P., Tucci M., Crinò P., Rugini E., Bressan R. & Saccardo F. (1998). Resistance to phytopathogenic fungi in plants of tomato overespressing an osmotin gene. *Proceedings of the IX International Congress on Plant Tissue and Cell Colture*. Jerusalem, Israel, June 14-19 (abstract).