



Cristian Silvestri



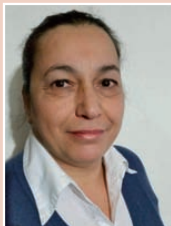
Stefania Astolfi



Silvia Celletti



Valerio Cristofori



Antonella Minandri



Giampiero Ubertini



Bruno Ruggiero



Eddo Rugini

STRATEGIE PER MIGLIORARE LA TOLLERANZA ALLO STRESS IDRICO DELL'ACTINIDIA (*ACTINIDIA DELICIOSA* A. CHEV.) E RICERCA DI MARKER BIOCHIMICI PER LA SELEZIONE PRECOCE

L'actinidia è una delle specie coltivate nell'aerale del Mediterraneo con una spiccata suscettibilità alla carenza idrica. L'irrigazione nelle fasi più critiche del ciclo annuale riveste un ruolo di fondamentale importanza non solo per assicurare la crescita adeguata dei frutti e quindi una buona resa degli impianti, ma influenza la produttività delle piante nell'anno successivo, condizionando la nutrizione minerale e l'induzione fiorale. Un indebolimento della pianta a causa di carenza idrica può causare anche una maggiore suscettibilità della stessa a stress di tipo biotico.

Sono stati condotti numerosi studi sull'irrigazione degli actinidieti e sulla fisiologia delle specie coltivate atti a verificare il comportamento degli impianti in presenza di stress idrico, che hanno permesso di acquisire utili informazioni per migliorare la sostenibilità della coltura. Il risultato produttivo dell'actinidia può essere infatti ottimizzato mediante un attento calcolo del fabbisogno irriguo derivante dal bilancio idrico della coltura. In natura esistono diverse specie appartenenti al

genere *Actinidia*, così come numerosi sono gli ibridi. Mutazioni naturali o incroci spontanei hanno dato origine a una grande variabilità in differenti caratteri e quindi alla disponibilità di una vasta base genetica utilizzabile per la selezione di nuove varietà (Testolin *et al.*, 2016). Tuttavia, molti caratteri agronomici di interesse, quali l'adattamento a climi freddi, la resistenza alle malattie, inclusa la tolleranza alla siccità, non sono presenti nelle varietà più diffusamente coltivate.

Le principali cause che hanno impedito il pieno sfruttamento del potenziale genetico e hanno reso il miglioramento genetico tradizionale lungo e costoso, sono il dioicismo della pianta, il background genetico sconosciuto degli individui maschili e la fase giovanile relativamente lunga. Inoltre, i diversi livelli di ploidia tra le specie di actinidia rappresentano un altro ostacolo per l'ibridazione interspecifica; numerosi tentativi di produrre piantine tramite ibridazione interspecifica sono falliti (Pringle 1986; Mc Neilage e Considine

1989; Mu et al 1990; Ke et al 1991).

Le tecniche di trasformazione genetica rappresentano una opportunità estremamente vantaggiosa per il miglioramento genetico delle piante arboree da frutto, inclusa l'actinidia, che di solito sono caratterizzate da un lungo periodo di giovanilità, da un alto livello di eterozigosi e da una variabilità genetica non molto elevata. Inoltre, a differenza delle altre tecnologie finora applicate, questa tecnica consente in tempi brevi di "migliorare" in maniera mirata alcuni caratteri nelle varietà commerciali di largo impiego, operando una sorta di "terapia genica", senza modificare profondamente il DNA della pianta, mantenendo quindi le caratteristiche peculiari delle varietà commerciali. Le prime piante legnose transgeniche, con geni potenzialmente utili a fini agronomici, sono state ottenute proprio in actinidia (*Actinidia deliciosa* A. Chev.) su un impollinatore a fioritura tardiva, GTH (Giallo Tardivo Hayward), trasformato con geni *rolABC* di *A. rhizogenes* (Rugini 1989; Rugini et al., 1991). A questi lavori pionieristici ne sono seguiti altri che hanno portato alla costituzione di piante di actinidia femmine della cv Hayward sia con geni *rol* sia di *osmotina* (Rugini et al. 2000) che sono state poi oggetto di sperimentazione di campo fino all'anno 2012 presso l'Università degli Studi della Tuscia (Rugini, 2012).

Materiali e Metodi

Le osservazioni in campo, su piante di 11 anni di età, hanno riguardato il grado di appassimento fogliare sui seguenti genotipi:

- 1)** piante maschili GTH (Giallo tardivo Hayward) modificate con geni *rol ABC* di *A. rhizogenes* sotto il promotore naturale del batterio;
- 2)** Piante della cv Hayward modificate con geni *rolABC*, *rolB*, *rolC* sotto il promotore naturale del batterio;
- 3)** piante innestate con innesti reciproci tra GTH *rolABC* e GTH wt;
- 4)** Piante della cv Hayward modificate con il gene dell'*osmotina* del tabacco sotto il controllo del promotore costitutivo *CaMV35S* (Rugini, 2012; Rugini 2015);
- 5)** piante di controllo (wt) sia di GTH che di Hayward;
- 6)** piante di Hayward rigenerate da callo (Hayward wt rigenerato).

Inoltre, sono state eseguite analisi relative ad alcuni parametri fisici del terreno su campioni di suolo prelevati nell'area sperimentale a 40 cm di profon-

dità, subito dopo che erano stati effettuati sul grado di appassimento fogliare, quali: la determinazione granulometrica (sabbia, limo ed argilla secondo i limiti dimensionali della I.S.S.S., con il metodo per setacciatura ad umido e sedimentazione o metodo alla pipetta) e la curva di ritenzione idrica con la determinazione delle costanti idrologiche della capacità idrica di campo (-33 kPa) e del punto di appassimento permanente (-1500 kPa) con il metodo dell'apparato a pressione - piastre di Richards -).

Le analisi in vitro e biochimiche sono state condotte a carico di due genotipi transgenici di actinidia: Hay *osm1* e Hay *osm166*, derivati da due diversi eventi di trasformazione e posti a confronto con i rispettivi controlli: Hayward *wt* e un genotipo Hayward *wt* rigenerato da callo che in campo si era distinto per tolleranza alla siccità. I germogli sono stati moltiplicati su un substrato di moltiplicazione solido composto da sali e vitamine MS (Murashige and Skoog, 1962), addizionato di BAP (0,7 mgL⁻¹), NAA (0,01 mgL⁻¹) e Plant Agar 0,6%, pH 5,8, arricchiti con diverse concentrazioni (0, 1, 2, 3%) di polietilenglicole (PEG), prima della sterilizzazione in autoclave a 121°C per 20 minuti. Le prove sono state condotte in vasi con capacità di 250 mL con 50 mL di substrato. Per ognuna delle diverse concentrazioni di PEG sono stati impiegati 3 vasi contenenti ciascuno 10 germogli.

I rilievi, condotti dopo 4 settimane di crescita in camera di crescita a 23°C, hanno riguardato il conteggio del numero di germogli neoformati ed il relativo numero di nodi per germoglio, nonché il peso del callo basale. Una aliquota di materiale vegetale (germoglio senza callo basale) è stato conservato a -80°C per le analisi biochimiche che hanno riguardato in particolare, la determinazione della concentrazione di prolina, di proteine totali, di composti tiolici e di malondialdeide (MDA) e la variazione di attività di alcuni enzimi correlati allo stress idrico (guaiacolo perossidasi e catalasi), utilizzando tecniche precedentemente descritte da Bradford (1976), Santangelo et al. (2003) e Astolfi et al. (2005). Lo scopo principale è stato quello di individuare markers enzimatici e non-enzimatici capaci di distinguere precocemente, in una moltitudine di genotipi, quelli più tolleranti agli stress idrici. In particolare si è voluto verificare eventuali differenze nei meccanismi di risposta allo stress idrico attivati dalle piante trasformate con *osmotina* e dalle piante controllo rigenerate da callo (Hayward wt rigenerato).

Risultati e discussioni

Test di campo

La determinazione granulometrica ha permesso di classificare il suolo su cui insistevano le piante oggetto di lavoro come "argilloso" secondo il relativo triangolo della tessitura I.S.S.S. La conoscenza della curva di ritenzione idrica, specifica del suolo interessato dalla prova sperimentale, si è prestata ad una valutazione comparativa con il contenuto dell'umidità gravimetrica del suolo presente all'atto del campionamento. Nell'area sperimentale il valore di umidità medio, all'epoca del campionamento, si è collocato al disotto del punto d'appassimento permanente, come desumibile per confronto con la curva di ritenzione idrica (Tabella 1). Le piante trasformate con i geni *rol* presentavano le note caratteristiche fenotipiche conferite da questi geni, già descritte in precedenti lavori (Rugini *et al.*, 1997 Gutiérrez-Pesce e Rugini 2008; Rugini 2012 e 2015) ed inoltre una migliore tolleranza allo stress idrico, dovuta probabilmente alla migliorata efficienza dell'apparato fogliare. Questa affermazione trova conferma nel fatto che tra le piante innestate risultavano tolleranti alla siccità solo quelle in cui il nesto era rappresentato dal transgenico (geni *rolABC* e *rolB*) e non il reciproco (Tabella 2). Di particolare interes-

se dal punto di vista agronomico e commerciale risultavano le piante Hayward *rolB* che, oltre alla tolleranza a stress idrico, presentavano frutti di dimensioni analoghe a quelli della pianta madre (Rugini 2012 e 2015).

Le piante transgeniche con l'*osmotina* presentavano una regolare fioritura e produzione di frutti analoga al controllo, senza mostrare differenze morfologiche apparenti, incluse la pezzatura e la forma (Rugini *et al.*, 1998; Rugini, 2012); i frutti presentavano una chiara tolleranza a *Botritis cinerea* (botrite) e a *Cadophora luteo-olivacea* (cadofores) come riportato in precedenti lavori (Rugini *et al.*, 2011). Ugualmente le foglie presentavano tale proprietà, verificata con infezioni artificiali con micelio della botrite in dischetti di agar (Figura 1). Parimenti alle piante *rolABC* e *rolB* mostravano una tolleranza a stress idrico desumibile dallo stato di appassimento fogliare rilevabile dal confronto con altre piante di controllo in condizioni di umidità del suolo in prossimità del punto di appassimento (Tabella 2). Tra le piante non transgeniche di particolare interesse è risultato il somaclone (Hayward wt rigenerato), prodotto dal callo di Hayward wt, che in campo aveva mostrato una tolleranza pressochè simile alle piante transgeniche con *osmotina* e con i geni *rol*.

Tabella 1 Composizione granulometrica e componenti idrologiche del suolo (\pm DS) al momento del rilievo sullo stato idrico delle foglie delle piante di Actinidia di 11 anni di età nel periodo estivo (fine giugno 2012).

Granulometria (I.S.S.S.)	% argilla	% limo	%sabbia
	50,53	23,78	25,69
Capacità di campo (-0.33 kPa) (Umidità % in peso)		38,09 \pm 0,77	
Punto appassimento (-1500 kPa) (Umidità % in peso)		24,94 \pm 0,18	
Umidità gravimetrica % (Umidità % in peso)		23,63 \pm 1,95	

Tabella 2

Stima dello stato di appassimento fogliare dei differenti genotipi autoradicati o innestati presenti in campo in assenza di irrigazione (A= Appassite; VA= inizio appassimento; V= Non appassite), al momento dell'espianto (fine giugno 2012, inizio del punto di appassimento irreversibile).

TESI	STATO DI APPASSIMENTO FOGLIARE
HAY wt	A
HAY wt rigenerato	V
HAY Osmotina (diversi cloni)	V- VA
GTH wt	A
GTH <i>rolABC</i>	V
HAY <i>rol ABC</i>	V
HAY <i>rol B</i>	V
GTH <i>rol ABC</i> / GTH wt	V
GTH wt / GTH wt	VA
GTH wt / GTH <i>rol ABC</i>	VA
HAY wt / HAY wt	A
HAY wt / GTH <i>rol ABC</i>	A



Figura 1 Infezioni artificiali di *Botrytis cinerea* su foglie e frutti con un tassello di agar contenente micelio del fungo, eseguite su tutte le foglie (vecchie, mature, giovani). Notare come le piante di controllo hanno perso tutte le foglie (destra) in seguito al trattamento con il fungo, mentre quelle transgeniche (sinistra) hanno circoscritto la malattia alla superficie occupata dal tassello.

Test di laboratorio

I test condotti in laboratorio hanno riguardato la risposta *in vitro* allo stress idrico indotto in germogli di due genotipi transgenici di osmotina di kiwi, derivati da due diversi eventi di trasformazione a confronto con i controlli Hayward wt e Hayward

wt rigenerato.

I germogli trasformati hanno mostrato una tolleranza superiore allo stress idrico indotto con PEG rispetto al controllo Hayward wt e, abbastanza simile al nuovo genotipo tollerante allo stress, Hayward wt rigenerato (Tabella 3).

Tabella 3 Parametri di crescita (Numero medio dei germogli, numero di nodi, peso del callo basale) dei cloni Hayward wt (controllo), Hayward wt rigenerato, Hayward osm1 e Hayward osm166. Le medie indicate con lettere diverse per ciascun gruppo di genotipi, mostrano differenze significative per $p \leq 0,05$ (Test di Tukey).

Clone	PEG 8000 (% w/v)	Numero di germogli	Numero di nodi	Callo basale
Hayward wt	0	1,67 a	5,11 a	0,25 a
Hayward wt	1	1,56 a	3,67 b	0,14 b
Hayward wt	2	1,68 a	3,88 b	0,10 b
Hayward wt	3	1,75 a	3,77 b	0,16 b
Hayward wt rigenerato	0	2,22 a	7,11 a	0,52 a
Hayward wt rigenerato	1	1,89 a	6,01 ab	0,25 b
Hayward wt rigenerato	2	2,01 a	5,01 b	0,29 b
Hayward wt rigenerato	3	1,61 a	5,55 b	0,20 b
Hayward osm1	0	1,68 a	5,22 a	0,46 a
Hayward osm1	1	1,70 a	5,00 a	0,29 b
Hayward osm1	2	1,77 a	5,03 a	0,16 b
Hayward osm1	3	1,65 a	4,89 a	0,16 b
Hayward osm166	0	1,84 a	6,33 a	0,36 a
Hayward osm166	1	1,81 a	6,70 a	0,23 ab
Hayward osm166	2	1,72 a	5,44 a	0,12 b
Hayward osm166	3	1,76 a	5,67 a	0,14ab

La crescita dei germogli trasformati ha mostrato gli stessi parametri anche alla concentrazione più elevata di PEG (3%), e simile a quelli posti nel substrato di controllo senza PEG. Al contrario, la crescita dei germogli della cv Hayward wt era progressivamente ridotta all'aumentare della concentrazione di PEG e le foglie erano visibilmente danneggiate. Il genotipo Hayward wt rigenerato mostrava una performance di crescita superiore alla cv Hayward wt, sia in termini di numero di germogli e nodi che di callo basale (calcolo statistico non mostrato nella tabella 2). Questo genotipo possedeva una maggiore vigoria in vitro e in campo (dati non mostrati). Trattandosi di una rigenerazione e quindi di una pianta prodotta da cellule competenti, probabilmente con delle caratteristiche epigenetiche differenti, potrebbe aver acquisito un rinverimento, similmente, ma di entità minore, riscontrabile in molti genotipi derivati da incrocio. Si potrebbe tentare di ipotizzare che questo fenomeno è tanto più palese quanto più la cultivar è vecchia, cioè tanto più tempo è stata moltiplicata per via agamica, a meno che non insorgano ulteriori modifiche dovute a variabilità somaclonale. Questo comportamento è stato osservato anche nelle prime piante di olivo della cv Canino rigenerate per embriogenesi somatica da tessuti adulti materni. Queste infatti presentavano una maggiore giovanilità e vigoria rispetto a quelle propagate per stimolazione delle gemme ascellari o per talea (Rugini comunicazione personale).

L'analisi dei parametri biochimici rilevati ha confermato che la tolleranza allo stress indotto è accompagnata da cambiamenti a livello delle attività enzimatiche e dell'accumulo di metaboliti coinvolti nei meccanismi di stress (Figura 3).

Nelle piante sottoposte a stress idrico si verifica generalmente una riduzione dell'attività fotosintetica che ha come conseguenza una minore velocità di assimilazione della CO₂ e l'accumulo di potere riducente. Quest'ultimo evento determina un aumento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS, *reactive oxygen species*) e di radicali liberi (Schwanz e Polle, 2001; Vranová et al., 2002); tale condizione di stress richiede quindi un aumento delle attività degli enzimi antiossidanti. Le piante contengono inoltre numerosi composti antiossidanti non enzimatici che possono detossificare i ROS, e quindi diminuire l'effetto negativo dello stress.

In questo lavoro sono state analizzate le variazioni delle attività di due enzimi antiossidanti, catalasi e perossidasi, coinvolti nell'eliminazione di H₂O₂ al

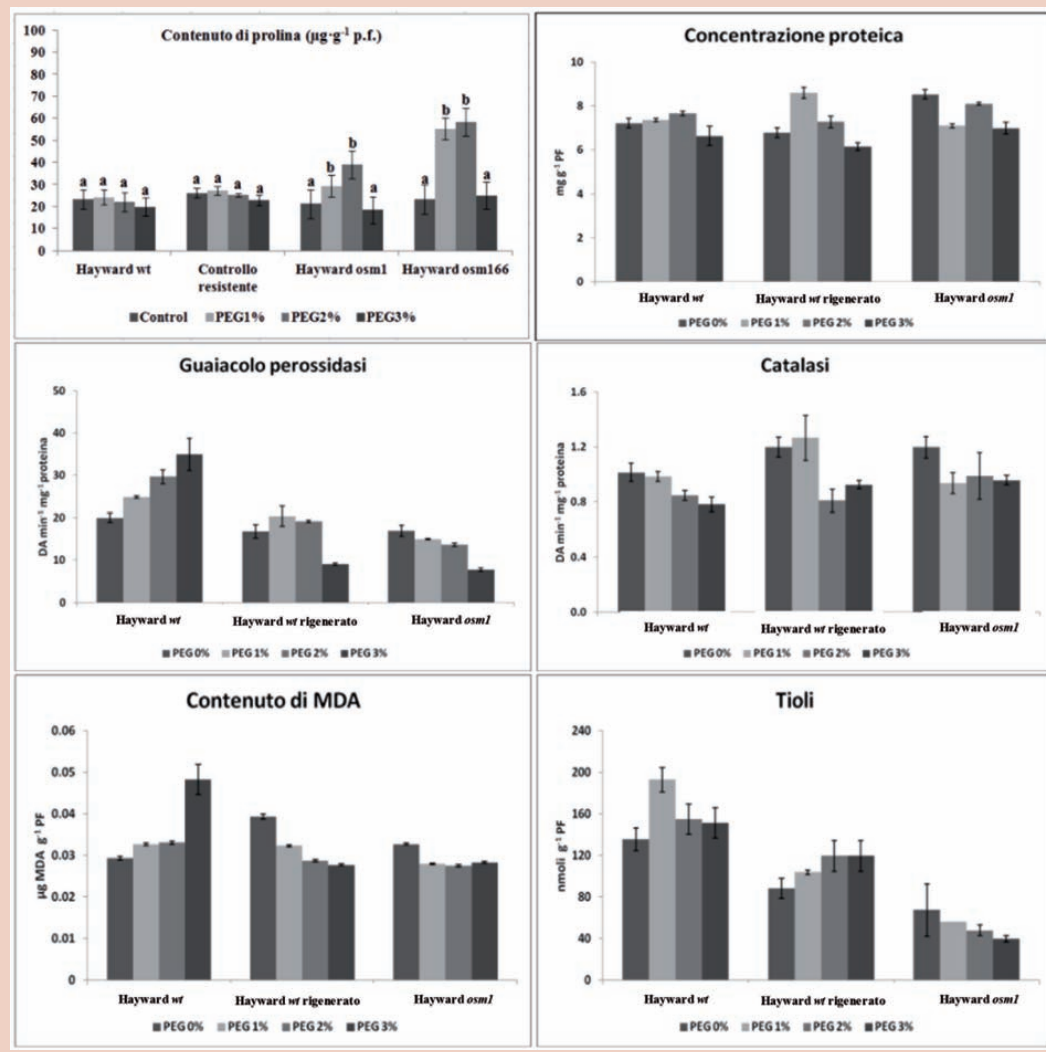
di fuori dei cloroplasti e la concentrazione dei tioli non proteici, come marker non enzimatico. Come indicatore del danno da stress ossidativo è stato invece analizzato il contenuto di MDA, che permette di valutare il livello di perossidazione dei lipidi delle membrane cellulari.

I risultati sembrano indicare che le piante del genotipo transgenico sarebbero in grado di affrontare lo stress idrico subendo meno danni, come indicato dai livelli più bassi di MDA rispetto al wt. In questo tipo di risposta non sembrano però essere implicate né la perossidasi né la catalasi, che non mostrano nello stesso genotipo variazioni rilevanti in seguito all'imposizione dello stress. Discorso diverso può essere fatto per il genotipo rigenerato tollerante a siccità, il quale mostra, come il transgenico, livelli inferiori di MDA, ma a differenza del transgenico, mostra delle variazioni sensibili dei due enzimi antiossidanti misurati, che potrebbero spiegare la migliore capacità di risposta di queste piante allo stress idrico generato dall'esposizione al PEG. D'altra parte, il genotipo controllo subisce i danni dello stress ossidativo (aumento dei livelli di MDA in seguito al trattamento con PEG) al quale reagisce con un aumento delle attività degli enzimi antiossidanti, principalmente la perossidasi.

Il fatto che l'attività perossidasi aumenti nei tessuti del genotipo Hayward wt durante la progressiva imposizione dello stress idrico, mentre resta costante, e addirittura diminuisce, nel genotipo transgenico, può essere in parte spiegato considerando che le perossidasi partecipano alla modulazione delle proprietà della parete cellulare durante la crescita della pianta (Bacon *et al.*, 1997) e quindi un incremento dell'attività di questi enzimi potrebbe riflettere variazioni delle proprietà meccaniche della parete cellulare, che a loro volta, potrebbero essere correlate ad un adattamento allo stress idrico, che sarebbe necessario nel genotipo Hayward wt ma non nel genotipo transgenico (in quanto non sembra subire danni). Quindi, anche nel genotipo wt l'enzima perossidasi non avrebbe solo un ruolo antiossidante.

Al fine di spiegare la migliore performance del genotipo transgenico nei confronti dello stress idrico, è stata valutata la concentrazione dei composti tiolici nelle foglie di queste piante per verificare se la mancanza del danno fosse dovuta ad una maggiore produzione di questi composti per la neutralizzazione dei ROS. I tioli, come la cisteina e il glutatione, sono forme di zolfo organico abbondanti nei tessuti vegetali e, in condizioni

Figura 3 Contenuto medio di prolina (espressa in $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ di peso fresco), concentrazione proteica ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ p.f.), guaiacolo perossidasi ($\Delta\text{A}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteine), catalasi ($\Delta\text{A}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteine), contenuto MDA ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ p.f.), di tioli ($\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$ p.f.) di Hayward wt (controllo), Hayward wt rigenerato, Hayward *osm1* in funzione delle diverse concentrazioni di PEG impiegato. Lettere differenti sul grafico indicano differenze significative per $P < 0.01$ (Tukey test).



normali, il glutatione è la forma predominante. Tuttavia, a differenza di quanto atteso, le concentrazioni dei tioli aumentavano nei genotipi *wt* e nel resistente, ma non nel transgenico.

Il significato di tali risultati, e in definitiva l'interpretazione del comportamento del genotipo transgenico, rimane una questione aperta e maggiori delucidazioni sicuramente potranno essere tratte dallo studio delle attività di altri enzimi antiossidanti, quali la superossidodismutasi (SOD) e l'ascorbico perossidasi (APX), enzimi-chiave del

sistema antiossidante non solo nei cloroplasti, ma anche in altri compartimenti cellulari. Inoltre, la misurazione delle variazioni del contenuto di GSH (che potrebbe essere mascherato all'interno della frazione tiolica totale) potrebbe spiegare qual è il meccanismo di difesa operato dalla pianta per ridurre gli effetti dello stress idrico.

In conclusione dai risultati preliminari ottenuti in questo lavoro dal confronto tra piante transgeniche per l'osmotina e il somadone, entrambi tolleranti a siccità, si potrebbe affermare che alcuni

parametri fisiologici, riscontrati in piante transgeniche per il gene dell'osmotina, potrebbero essere impiegati come possibili markers per selezionare precocemente piante tolleranti alla siccità derivate da altre tecniche di miglioramento genetico. Inoltre, le piante over-esprimenti osmotina, oltre a rappresentare una opportunità per l'agricoltura sostenibile, manifestando maggiori difese nei confronti di stress biotici e abiotici, potrebbero anche avere importanti riflessi per la difesa della salute umana. È noto infatti che l'osmotina appartiene alla famiglia delle proteine PR (Pathogen Related Proteins) tipo-5 (Anil Kumar *et al.*, 2015) ed in natura viene prodotta dalla pianta solo in risposta all'attacco di patogeni o a stress abiotici di varia natura. È stato osservato che l'osmotina è in grado di proteggere le clorofille e le vie metaboliche della fotosintesi (Barthakur *et al.*, 2001; Goel *et al.*, 2010), determinando l'aumento dell'accumulo di prolina, che attua un riequilibrio osmotico e la protezione della struttura cellulare (Subramanyam *et al.*, 2011). Relativamente alla salute umana, di particolare importanza è il ruolo che l'osmotina riveste in campo veterinario e umano, in quanto questa proteina vegetale è in grado di mimare l'attività dell'ormone umano Adiponectina (Kadowaki *et al.*, 2005).

L'adiponectina è un ormone prodotto dai tessuti adiposi e coinvolto in diversi processi metabolici quali la regolazione del glucosio e il catabolismo degli acidi grassi sia nel corpo che nel cervello. La carenza di adiponectina si riflette in malattie quali il diabete, malattie del fegato e problemi cardiovascolari (Kadowaki and Yamauchi, 2005; Tang *et al.*, 2005; Holland and Scherer, 2013). Per queste ragioni oggi c'è un interesse crescente nello studio dell'osmotina quale proteina con un potenziale terapeutico mirato all'uomo. Recenti pubblicazioni hanno dimostrato che l'osmotina è in grado di recuperare i danni causati dalla demenza senile, Alzheimer's, diabete, coliti e morbo di Crohn, grazie alla sua capacità di attivare i recettori Adipor1/Sirt1 (Shah *et al.*, 2016) e quindi di attivare la cascata enzimatica cellulare migliorando la funzionalità dei mitocondri e quindi potenziando le attività vitali della cellula, incluso il controllo sulla crescita neoplastica. Presso l'Università degli Studi della Tuscia a Viterbo è in corso un progetto di estrazione e purificazione di osmotina ricombinante dai genotipi di piante transgeniche di actinidia che, a differenza delle piante controllo, esprimono il gene ricombinante per l'osmotina del tabacco *Wisconsin 38* con un promotore vira-

le 35S, e che quindi producono la proteina ad un fattore che potrebbe variare da 4% al 16% delle proteine totali. Questi genotipi sono di fatto dei perfetti bioreattori in grado di fornire l'osmotina, di grande valore terapeutico, in buone quantità e in un contesto già pronto per il consumo umano e animale, rendendo una possibile commercializzazione di questa sostanza economicamente vantaggiosa per l'industria farmaceutica oltre che per i fornitori delle piante.

Bibliografia

- ANIL KUMAR, S. HIMA KUMARI, P. SHRAVAN KUMAR, G. MOHANALATHA, C. KAVI KISHOR, P. B. (2015). *Osmotin: A plant sentinel and a possible agonist of mammalian adiponectin*. *Frontiers in Plant Science*, 6(MAR).
- ASTOLFI S., ZUCHI S., PASSERA C. (2005) *Effect of cadmium on H+ATPase activity of plasma membrane vesicles isolated from roots of different S-supplied maize (Zea mays L.) plants*. *Plant Science* 169, 361-368. DOI: 10.1016/j.plantsci.2005.03.025
- BARTHAKUR S., BABU V., BANSAL K.C. (2001). *Over-expression of osmotin induces proline accumulation and confers tolerance to osmotic stress in transgenic tobacco*. *J. Plant Biochem. Biotechnol.* 10, 31-37.
- BRADFORD MM. (1976) *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal Biochem*; 72:248-54.
- CANDAN N., TARHAN L. (2012) *Tolerance or sensitivity responses of Mentha pulegium to osmotic and waterlogging stress in terms of antioxidant defense systems and membrane lipid peroxidation*. *Environ. Exp. Bot.* 75:83-88.
- GOEL D., SINGH A.K., YADAV V., BABBAR S.B., BANSAL K.C. (2010). *Overexpression of osmotin gene confers tolerance to salt and drought stresses in transgenic tomato (Solanum lycopersicum L.)* *Protoplasma* 245, 133-141.
- GUTIÉRREZ-PESCE P. AND RUGINI, E. 2008, *Kiwifruit*, in Kole, C. and Hall, T. C. (eds.), "Compendium of Transgenic Crop Plants: Transgenic Tropical and Subtropical Fruits and Nuts", Blackwell Publishing, Oxford, UK, pp 185-212.
- HOLLAND W.L., SCHERER PE. (2013). *Ronning after the adiponectin receptors*. *Science* 342, 1460-1461.
- KADOWAKI T., YAMAUCHI T. (2005). *Adiponectin and adiponectin receptors*. *Endocr. Rev.* 26, 439-451.
- MCNEILAGE M.A. AND CONSIDINE J.A. (1989). *Chromosome studies in some Actinidia taxa and implications for breeding*. *New Zealand Journal*

of Botany 27, 71-81.

- MU S.K., FRASER L.G. AND HARVEY, C.F. (1990A). *Rescue of hybrid embryos of Actinidia species*. Scientia Horticulturae 44, 97-106.
- MURASHIGE T, SKOOG F (1962) *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture*. Physiol Plant 15:473- 479
- PRINGLE J.G. (1986). *Potential for interspecific hybridization in the genus Actinidia*. New Zealand Agronomical Society Special Publication 5, 365-368.
- RUGINI E, CARICATO G., MUGANU M., TARATUFOLO C., CAMILLI M. AND CAMMILLI C. (1997). *Genetic stability and agronomic evaluation of six-year-old transgenic kiwi plants for rolABC and rolB genes* In: ISHS Acta Hort. 447 p. 609-610, ISSN 0567-7572
- RUGINI E. (2015) *Piante da frutto transgeniche e considerazioni sulle conseguenze dei divieti imposti alla ricerca in Italia*. Italus Hortus, Review n. 25, 22 (1): 31-57
- RUGINI E., 2012. *Risultati preliminari di una sperimentazione di campo di miglioramento genetico dell'Actinidia con tecniche biotecnologiche per tolleranza a stress idrico, funghi patogeni e modifica dell'architettura della chioma*. Kiwi informa, Luglio/settembre: 4 -18.
- RUGINI E., MUGANU M. GUTIERREZ-PESCE P. (2000). *Transformation of Actinidia spp* In: *In: Molecular Biology of Woody Plants, Vol 2* (S.M. Jain and SC Minocha) eds), Kluwer Academic Publishers, p 191-243.
- RUGINI E., MUGANU M., PILOTTI M., BALESTRA G. M., VARVARO L., MAGRO P., BRESSAN R., TARATUFOLO C. (1998). *Genetic Stability, transgene hereditability and agronomic evaluation of transgenic kiwi (Actinidia deliciosa A. Chev.) Plants for rolABC, rol B and Osmotin genes*. Forth International Symposium on Kiwifruit Santiago del Chile 11-14 Febr. p 26.
- RUGINI E., PELLEGRINESCHI A., JACOBONI A., MARIOTTI D. E MENCUCCINI M., 1989. *Trasformazione genetica dell'Actinidia (Actinidia deliciosa A Chev.) mediante geni "Root inducing" di Agrobacterium rhizogenes*. Atti XXXIII Convegno annuale di Genetica Agraria, p 147. Alghero.
- RUGINI E., PELLEGRINESCHI A., MENCUCCINI M. and MARIOTTI, D. (1991). *Increase of rooting ability in the woody species Kiwi (Actinidia deliciosa A. Chev.) by transformation with Agrobacterium rhizogenes T-DNA rol genes*. Plant Cell Reports, 10:291-295.
- RUGINI E., CRISTOFORI V., MARTIGNONI D., GUTIERREZ-PESCE P., ORLANDI S., BRUNORI E., BIASI R., MAGRO P., 2011. *Kiwifruit transgenics for*

osmotin gene and inoculation tests with Botrytis cinerea and Cadophora luteo-olivacea. Acta Hort. 913:197-204

- SANTANGELO E., FONZO V., ASTOLFI S., ZUCHI S., CACCIA R., MOSCONI P., MAZZUCATO A. AND SORESSI G. P. (2003) *The Cf-2/Rcr3esc gene interaction in tomato (Lycopersicon esculentum Mill.) induces autonecrosis and triggers biochemical markers of oxidative burst at cellular level*. Functional Plant Biology 30, 1117-1125. DOI:10.1071/FP03121

- SCHWANZ, P AND POLLE, A. 2001. *Growth under elevated CO² ameliorates defenses against photo-oxidative stress in poplar (Populus alba x tremula)*. Environmental and Experimental Botany 45: 43-53.

- SHAH S A, YOON G H, CHUNG S S., ABID M N., KIM T H., LEE H Y., KIM M O (2016) *Novel osmotin inhibits SREBP2 via the Adipo R1/AMPK/SIRT1 pathway to improve Alzheimer's disease neuropathological deficits*. Mol Psychiatry- /03/22/online, Macmillan Publishers Limited. 1 476-5578.

- SUBRAMANYAM K., SAILAJA K.V., SUBRAMANYAM K., RAO D.M., LAKSHMIDEVI K. (2011). *Ectopic expression of an osmotin gene leads to enhanced salt tolerance in transgenic chilli peppers (Capsicum annum L.)*. Plant Cell Tissue Organ. Cult. 105, 181-192.

- TANG Y.T., HU T., ARTERBURN M., BOYLE B., BRIGHT J.M., EMTAGE P.C., ET AL. (2005). *PAQR proteins: a novel membrane receptor family defined by an ancient 7-transmembrane pass motif*. J. Mol. Evol. 61,372-380.

- TESTOLIN R., HUANG H.-W., FERGUSON R. (Eds.). (2016). *The Kiwifruit Genome. Series Compendium of Plant Genomes*, Springer International Publishing Switzerland. DOI 10.1007/978-3-319-32274-2

- VERONESE P., RUIZ M.T., COCA M.A., HERNANDEZ-LOPEZ A., LEE H., IBEAS J.I. ET AL., (2003). *In defense against pathogens. Both plant sentinels and foot soldiers need to know the enemy*. Plant Physiol. 131, 1580-1590.

- VRANOVA E, ATICHARTPONGKUL S, VILLARROEL R, VAN MONTAGU M, INZE D, VAN CAMP W (2002) *Comprehensive analysis of gene expression in Nicotiana tabacum leaves acclimated to oxidative stress*. Proc Natl Acad Sci USA 99: 10870-10875.

Silvestri Cristian, Astolfi Stefania, Celletti Silvia, Cristofori Valerio, Minandri Antonella, Ubertini Giampiero, Ruggiero Bruno e Rugini Eddo

Dipartimento di Scienze Agrarie e Forestali (DAFNE) Università degli Studi della Tuscia, Via S. Camillo de Lellis, 01100 Viterbo