



Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOLOGIA EVOLUZIONISTICA E AMBIENTALE

CICLO XXVI

COORDINATORE Prof. Guido Barbujani

Basi biochimico-molecolari del contenuto di
carotenoidi e fenoli in grano duro e pesco

Settore Scientifico Disciplinare BIO/04

Dottorando

Dott. Giberti Samuele

(firma)

Tutore

Prof. Forlani Giuseppe

(firma)

Anni 2011/2014

INDICE

	Pagina
1. Introduzione	1
1.1. Definizione di alimento e concetto di cibo funzionale	1
1.1.1 Il genere <i>Homo</i> e gli alimenti: una storia lunga milioni di anni	2
1.1.2. <i>Health claims</i>	4
1.1.3. Alimenti funzionali: caratteristiche e peculiarità	7
1.1.4. Impatto sociale dei cibi funzionali e il loro mercato	8
1.1.4.1. Il mercato dei carotenoidi	11
1.2. Fitonutrienti: l'importanza del metabolismo secondario	13
1.2.1. Flavonoidi	14
1.2.1.1. Il ruolo fisiologico dei flavonoidi nella pianta	14
1.2.1.2. La biosintesi dei flavonoidi	16
1.2.2. Carotenoidi	21
1.2.2.1. Il ruolo fisiologico dei carotenoidi nella pianta	21
1.2.2.2. L'importanza dei carotenoidi nella nutrizione umana	23
1.2.2.3. La biosintesi dei carotenoidi	25
1.2.2.4. Regolazione delle vie di sintesi dei carotenoidi	29
1.3 Fitonutrienti nelle piante di interesse agronomico	33
1.3.1. Strategie di accumulo di fitonutrienti senza l'impiego dell'ingegneria genetica	38
1.3.2. Accumulo di metaboliti mediante l'utilizzo delle biotecnologie	40
1.3.2.1. Il pomodoro	41
1.3.2.2. Il riso	42
1.3.2.3. La patata	43
1.3.2.4. Altre specie vegetali	44
1.4. Il catabolismo dei carotenoidi: le diossigenasi	45
1.4.1. La famiglia delle carotenoid cleavage dioxygenase 1 (CCD1)	50
1.4.2. La famiglia delle carotenoid cleavage dioxygenase 4 (CCD4)	51
1.4.2.1. Le diossigenasi in pesco	57
1.5. Le lipossigenasi vegetali: meccanismo di azione e classificazione	64
1.5.1. La struttura proteica delle lipossigenasi	66
1.5.2. Il ruolo fisiologico delle lipossigenasi vegetali	67
1.5.2.1. Mobilitazione dei lipidi di riserva (LOX-2 <i>Type1</i>)	68
1.5.2.2. Sintesi del Jasmonato e risposta a stress meccanico (13-LOX <i>Type2</i>)	71
1.5.2.3. Lipossigenasi coinvolte nella risposta ad attacco patogeno (9-LOX)	72
1.5.2.4. Altri ruoli fisiologici delle lipossigenasi vegetali: sviluppo vegetativo, senescenza e proteine di riserva	73
1.5.3. Il ruolo delle lipossigenasi in frumento duro	74
1.6. Genotipi colorati di grano	80
1.7. Scopo del lavoro	84
1.7.1. <i>Pathway</i> dei carotenoidi in frumento duro	85
1.7.1.1. Risultati attesi	85
1.7.2. <i>Pathway</i> dei carotenoidi in pesco	86
1.7.2.1. Risultati attesi	86
1.7.3. <i>Pathway</i> dei composti fenolici in frumento duro	86
1.7.3.1. Risultati attesi	87

2. Materiali e metodi	88
2.1. Condizioni di crescita della coltura in sospensione liquida di grano	88
2.2. Preparazione degli estratti cellulari	89
2.2.1. Estrazione delle colture cellulari	89
2.2.2. Estrazione di semi di grano	89
2.3. Purificazione delle lipossigenasi di <i>Triticum durum</i>	89
2.3.1. Passaggio desalante su resina Bio-Gel P6DG	89
2.3.2. Separazione per cromatografia a scambio anionico	90
2.3.3. <i>Salting out</i> mediante aggiunta di (NH ₄) ₂ SO ₄	90
2.3.4. Separazione per cromatografia a gel filtrazione	91
2.3.5. Cromatografia negativa su colonna di Reactive-Blue sepharose	91
2.3.6. Cromatografia per adsorbimento su colonna di idrossiapatite	91
2.3.7. Cromatografia liquida ad alta prestazione (FPLC)	92
2.4. Determinazione dell'attività enzimatica delle lipossigenasi	92
2.4.1. Preparazione delle soluzioni dei substrati e delle miscele di reazione	92
2.4.2. Purificazione della luteina da cellule di <i>Chlorella protothecoides</i>	93
2.4.3. Saggi per la rilevazione dell'attività delle lipossigenasi	94
2.4.4. Saggio per la rilevazione dell'attività di metabolizzazione dei 13S-H(P)ODE	95
2.5. Caratterizzazione biochimica dell'attività lipossigenasica	96
2.5.1. Determinazione del valore ottimale di pH	96
2.5.2. Determinazione dei parametri cinetici: K _M e V _{max}	96
2.5.3. Determinazione della stabilità enzimatica	97
2.5.4. Determinazione del contenuto proteico di un campione	97
2.6. Determinazione dell'espressione dei geni Lpx di grano duro	98
2.6.1. Estrazione dell'RNA totale da cellule in coltura di grano duro	98
2.6.2. Sintesi di cDNA	98
2.6.3. Amplificazione dei geni Lpx tramite PCR semi quantitativa	99
2.7. Localizzazione subcellulare delle forme di lipossigenasi di grano duro	100
2.8. Espressione della lipossigenasi di grano duro in risposta al trattamento delle cellule con sostanze ad azione ormonale	100
2.9. Elettroforesi denaturante su gel di poliacrilamide (SDS-PAGE)	101
2.10. Espressione eterologa e purificazione della CCD4 di <i>Malus domestica</i>	102
2.10.1. Crescita del ceppo BL21(DE3)pLysS di <i>Escherichia coli</i>	102
2.10.2. Preparazione delle cellule competenti e trasformazione	103
2.10.3. Induzione della sintesi della proteina eterologa	104
2.10.4. Estrazione di cellule batteriche	105
2.10.5. Purificazione mediante cromatografia per affinità su GSH-agarosio	105
2.10.6. Idrolisi della GST e purificazione della MdCCD4 mediante FPLC	106
2.10.7. FPLC per gel-filtrazione su colonna di Superose 12	106
2.11. Saggi <i>in vitro</i> per la determinazione dell'attività enzimatica delle diossigenasi	106
2.11.1. Materiale vegetale	106
2.11.2. Isolamento dei cromoplasti	106
2.11.3. Determinazione dell'attività di <i>bleaching</i> dei carotenoidi mediante saggio spettrofotometrico	108
2.11.4. Determinazione dell'attività di <i>bleaching</i> dei carotenoidi mediante RP-HPLC	108
2.11.5. Analisi statistica dei risultati	108
2.12. Ottenimento di anticorpi contro la PpCCD4	109
2.12.1. Sintesi di peptidi immunogenici sulla base della sequenza della PpCCD4	109
2.12.2. Induzione di anticorpi contro la PpCCD4 in topo	109
2.12.3. Analisi della presenza della PpCCD4 tramite <i>dot blot</i>	109

2.13. Determinazione dei livelli di attività specifica di enzimi-chiave nelle sintesi dei fenoli in grano	110
2.13.1. Materiale vegetale	110
2.13.2. Caratterizzazione delle diverse forme di 3-deossi-D-arabino-eptulosonato-7-fosfato sintasi	111
12.3.2.1. Condizioni di crescita della coltura in sospensione liquida di <i>Nicotiana plumbaginifolia</i> e preparazione degli estratti cellulari	111
2.13.2.2. Saggio <i>in vitro</i> della 3-deossi-D-arabino-eptulosonato-7-fosfato sintasi	111
12.3.2.3. Separazione delle forme di DAHP sintasi mediante cromatografia a scambio anionico	112
12.3.2.4. Amplificazione dei geni che codificano le due forme plastidiali di DAHP sintasi	112
2.13.3. Saggio <i>in vitro</i> della fenilalanina ammoniaca liasi	113
2.13.4. Saggio <i>in vitro</i> della calcone sintasi	113
2.13.5. Saggio <i>in vitro</i> della antocianidina sintasi	113
2.13.6. Saggio <i>in vitro</i> della antocianidina reduttasi	114
3. Risultati e discussione	115
3.1. Lipossigenasi in grano duro	115
3.1.1. Due forme di lipossigenasi sono espresse nelle diverse fasi del ciclo di crescita di cellule in sospensione liquida di grano	115
3.1.2. Le forme di lipossigenasi espresse nella coltura cellulare di grano duro <i>cv</i> Ofanto mostrano una diversa localizzazione subcellulare	118
3.1.3. Purificazione della Lpx-2 di grano duro	119
3.1.4. Caratterizzazione della Lpx-2 di Ofanto	124
3.1.5. Espressione del gene <i>Lpx-2</i> e conseguenti livelli di attività specifica in risposta al trattamento delle cellule con sostanze ad azione ormonale	127
3.1.6. Caratterizzazione della Lpx-B1.2 di Ofanto	129
3.1.7. Espressione del gene <i>Lpx-B1.2</i> e conseguenti livelli di attività specifica in risposta al trattamento delle cellule con sostanze ad azione ormonale	131
3.1.8. Differente efficienza di <i>bleaching</i> del β -carotene da parte di Lpx-B1.2 e Lpx-2	131
3.1.9. Evidenza in favore della presenza in cellule di grano duro di un <i>enzima secondario</i> capace di metabolizzare gli idroperossidi prodotti dalle Lpx e catalizzare a alta efficienza il <i>bleaching</i> del β -carotene	133
3.1.10. Livelli di attività enzimatica delle Lpx e dell' <i>enzima secondario</i> in semi di vari genotipi di grano duro	136
3.2. Diossigenasi in frutti di pesco	137
3.2.1. Espressione eterologa della CCD4 di <i>Malus domestica</i>	138
3.2.1.1. Purificazione della <i>MdCCD4</i> all'omogeneità elettroforetica	140
3.2.1.2. Saggi di attività <i>in vitro</i> della <i>MdCCD4</i>	141
3.2.2. Saggi enzimatici <i>in vitro</i> su cromoplasti purificati dalla polpa dei frutti di pesco	143
3.2.3. Livelli di attività di <i>bleaching</i> del β -carotene in frutti di diversi genotipi di pesco	145
3.2.3.1. Il sistema isogenico RedHaven - RedHaven Bianca	145
3.2.3.1.1. Induzione di anticorpi policlonali contro la <i>PpCCD4</i> e analisi immunologica dei cromoplasti isolati dai frutti di pesco	147
3.2.3.2. Il sistema isogenico Cristina - Caldesi 2000	148
3.2.3.3. Il genotipo ancestrale Yumyeong	148
3.2.4. Attività di <i>bleaching</i> del β -carotene in tuberi di patata	150
3.3. Enzimi-chiave nella sintesi dei polifenoli in grano	152
3.3.1. Messa a punto dei saggi enzimatici	153
3.3.2. La DAHP sintasi	153

3.3.2.1. Separazione cromatografica delle isoforme citosolica e cloroplastica della DAHP sintasi da cellule in coltura di <i>N. plumbaginifolia</i>	153
3.3.2.2. L'andamento dei livelli di attività specifica della DAHP sintasi lungo il ciclo di crescita della coltura di <i>N. plumbaginifolia</i> evidenzia la presenza di due forme cloroplastiche	155
3.3.2.3. Analisi dell'espressione dei geni della DAHP sintasi cloroplastica in coltura cellulare di <i>N. plumbaginifolia</i>	157
3.3.2.4. Sequenza dei geni della DAHP sintasi cloroplastica di <i>N. plumbaginifolia</i>	159
3.3.3. Gli enzimi coinvolti nella sintesi delle antocianine sono espressi a bassissimi livelli sia in cellule in coltura che in semi maturi di grano	161
3.3.4. In semi immaturi di genotipi pigmentati sia di grano tenero che di grano duro i livelli di attività specifica della PAL mostrano <i>patterns</i> differenti da quelli evidenziabili in genotipi non pigmentati	163
4. Conclusioni e prospettive	165
5. Bibliografia	167

Abbreviazioni e acronimi

ABA	Acido abscissico
ANS	Antocianidina sintasi
AOS	Allene ossido sintasi
C3G	Cianidina-3-beta-glucopiranoside
C4H	Cinnamato-4-idrossilasi
CCD	Carotenoid cleavage dioxygenases
CCO	Carotenoid Cleavage Oxygenase
CDP-ME	4-(citidina 5'-difosfo)-2-C-metil-D-eritritolo
CDP-ME2P	4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol-2-fosfato
CHI	Calcione isomerasi
CHS	Calcione sintasi
CHYB	β -carotene idrossilasi
CHYE	ϵ -carotene idrossilasi
CMK	4-(citidina 5'-difosfo)-2-C-metil-D-eritritolo chinasi
CoA	Coenzima A
CrtB	Fitoene sintasi batterica
CrtI	Fitoene desaturasi batterica
CRTISO	Carotenoide isomerasi
CRTW	β -carotene chetolasi
CrtY	Licopene β -ciclasasi batterica
CS	Corismato sintasi
CTP	Citidina pirofosfato
DAHP	3-deossi-D- <i>arabino</i> -eptulosonato-7-fosfato
DES	Divinil etere sintasi
DFR	Diidroflavonolo-4 reduttasi
DMAPP	Dimetilallil pirofosfato
DNA	Acido desossiribonucleico
DOXP	1-deossi-D-xilulosio 5-fosfato
DXP	1-deossi-D-xilulosio-5-fosfato
DXPS o DXS	1-deossi-D-xilulosio-5-fosfato sintasi
DXR	1-deossi-D-xilulosio-5-fosfato reduttoisomerasi
E4P	Eritrosio-4-fosfato
EPSP	5-enolpiruvil-scichimato-3-fosfato
ER	Reticolo endoplasmatico
ESPS sintasi	5- <i>enol</i> -piruvil-scichimato-3-fosfato sintasi
F3'5'H	Flavonoide-3'5'-idrossilasi
F3'H	Flavonoide-3'-idrossilasi
FNS	Flavone sintasi
FOSHU	Food for specified health uses
FUFOSE	European Commission Concerted Action on Functional Food Science in Europe
GALT	Sistema linfatico associato alla mucosa intestinale
GFP	Green fluorescent protein
GGPP	Geranilgeranil-pirofosfato
GGPS o GGDP	Geranil-difosfato-sintasi
HDR	1-idrossi-2-metil-2-E-butenil 4-difosfato reduttasi
HDS	1-idrossi-2-metil-2-E-butenil 4-difosfato sintasi

HMBPP	1-idrossi-2-metil-2-E-butenil 4-difosfato
HOD	Acido ossiottadecadienoico
HOT	Acido ossiottadecatrienoico
HPL	Idroperossido liasi
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HPOD	Acido idroperossiottadecadienoico
HPOT	Acido idroperossiottadecatrienoico
IFS	Isoflavone sintasi
ILSI	International Life Science Institute
IPP	Isopentenil pirofosfato
LCYB o β -LYC	Licopene β -ciclasi
LCYE o ε -LYC	Licopene ε -ciclasi
LDL	Low density lipoprotein
LHCII	Light harvesting complex II (complesso antenna II).
LOX	Lipossigenasi
MCT	2-C-metil-D-eritritolo 4-fosfato citidiltransferasi
MDS	2-C-metil-D-eritritolo 2,4-ciclodifosfato sintasi
MECP	2-C-metil-D-eritritolo 2,4-ciclodifosfato
MEP	2-C-metil-D-eritritolo 4-fosfato
MVA	Acido mevalonico
NCED	9-cis-epossicarotenoide diossigenasi
NPQ	Non photochemical quenching
NXS o NSY	Neoxantina sintasi
OPDA	Acido 12-osso-fitodienoico
PAL	Fenilalanina ammoniacca liasi
PDS	Fitoene desaturasi
PEP	Acido fosfoenolpiruvico
PSY	Fitoene sintasi
PUFA	Acidi grassi poli-insaturi
RDA	Raccomended dietary (o daily) allowance
RNA	Acido ribonucleico
RNAi	RNA interference
ROS	Specie reattive dell'ossigeno
SCFAs	Acidi grassi a catena corta
TAC	Contenuto totale di antocianine
TAG	Triacilgliceroli
TAL	Tirosina ammoniacca liasi
TE	Trolox Equivalenti
TEAC	Attività antiossidante in Trolox equivalenti
TPC	Contenuto totale di polifenoli
VAD	Deficienza da vitamina A
VDE	Violaxantina de-epossidasi
VOC	Composti organici volatili
ZDS	ζ -carotene desaturasi
ZEP	Zeaxantina epossidasi
Z-ISO	ζ -carotene isomerasi

Un pensiero speciale a Giuseppe, maestro di scienza e di vita, che ha permesso la realizzazione di questo sogno. Grazie per tutto quello che hai fatto e che continui a fare, ho trovato un amico prima che un professore!

Un ringraziamento dal cuore anche ai ragazzi del Laboratorio di Fisiologia e Biochimica Vegetale, in particolare Davidino, Berta, Davidone, Dodo, Andrea e Marco con cui ho trascorso momenti indimenticabili.

1. INTRODUZIONE

Se fossimo in grado di fornire a ciascuno la giusta dose di nutrimento ed esercizio fisico, né in difetto, né in eccesso, avremmo trovato la strada per la salute.

Ippocrate (460-377 a.C.)

1.1. Definizione di alimento e concetto di cibo funzionale

Per alimento si intende, facendo riferimento al Reg. CE gennaio 2002, n. 178 (art. 2), "qualsiasi sostanza o prodotto trasformato, parzialmente trasformato o non trasformato, destinato ad essere ingerito o di cui si prevede ragionevolmente che possa essere ingerito da esseri umani. Sono comprese bevande, gomme da masticare e qualsiasi sostanza, inclusa l'acqua, intenzionalmente incorporata negli alimenti nel corso della loro produzione, preparazione o trattamento". Più in generale possiamo dire che nella concezione comune il termine alimento viene riferito a un cibo o a una bevanda che garantisce all'individuo macro- e micro-nutrienti necessari al mantenimento e allo sviluppo delle funzioni dell'organismo.

Il concetto di alimento funzionale, definito in epoca moderna, in verità non è nuovo: già in tempi remoti Ippocrate, il famoso medico dell'antichità, sosteneva la filosofia del "cibo come medicina"; il *Corpus Hippocraticum* conteneva infatti tra gli altri anche manoscritti dedicati alla dieta, agli alimenti e all'alimentazione nelle malattie acute. Dopo la caduta dell'impero Romano il sistema ippocratico generò due correnti di pensiero, l'autoctono e l'islamico. Quest'ultimo diede origine alla medicina araba, mentre il primo è sopravvissuto in occidente grazie al monachesimo, all'opera di Benedetto da Norcia, e alla successiva scuola Salernitana. La Medicina Salernitana è basata su concetti ancora oggi di piena attualità: il *regimen sanitatis* diceva infatti che attenendosi a uno stile di vita opportunamente configurato, dove gli alimenti possono contribuire al mantenimento della salute e alla prevenzione dell'insorgenza di patologie, il sano si conserva tale mentre il malato ha possibilità di guarigione.

Dal punto di vista scientifico è a partire dal XX secolo che si intravedono le potenzialità salutistiche del cibo, come dimostra la "teoria delle vitamine" contro la pellagra, a opera di Casimir Funk. Durante la prima metà del secolo vennero identificati i nutrienti essenziali e, con l'obiettivo di promuovere l'accrescimento e il mantenimento dell'organismo umano, se ne stabilirono dei parametri di assunzione. Vennero successivamente pubblicati i valori di riferimento dei nutrienti, come ad esempio l'apporto nutrizionale, e linee guida come la piramide alimentare che contiene raccomandazioni sul fabbisogno giornaliero.

Complice lo sfrenato sviluppo economico di alcuni paesi, a partire dagli anni '70 si iniziò parlare di sovra-alimentazione, condizione sconosciuta nel passato e che ha portato rapidamente a uno smisurato incremento della spesa sanitaria (Mascie-Taylor *et al.*, 2003), e a raccomandare di evitare un consumo elevato di certi tipi di nutrienti. Ricerche scientifiche hanno infatti dimostrato che nutrirsi con grassi saturi, colesterolo, zuccheri semplici ecc., accresce l'insorgenza di numerose patologie croniche come quelle vascolari, obesità, diabete e molti tipi di tumori (McCullough *et al.*, 2002). Si è quindi cercato di migliorare la qualità della vita attraverso un'alimentazione specifica ricca di alimenti carenti dei nutrienti "incriminati", volta a favorire la salute riducendo i rischi di malattie. Il concetto moderno di alimento funzionale ha origine negli anni '80 in Giappone, dove le autorità sanitarie riconobbero la necessità di migliorare la qualità della vita utilizzando un'alimentazione capace di favorire lo stato di benessere e ridurre i rischi di contrarre malattie (Arai, 1996). Visto la tendenza della popolazione a invecchiare, la strategia del governo nipponico era tesa

a contrastare l'insorgere di patologie croniche negli individui anziani cercando di controllare altresì la spesa sanitaria. Infatti se da un lato si assisteva a un incremento esponenziale di questo tipo di patologie dovute allo stile di vita sedentario e iper-alimentato, l'aspettativa di vita della popolazione cresceva per via dei notevoli progressi scientifici in grado di offrire nuovi farmaci e terapie. In tale contesto sono stati definiti gli alimenti funzionali, la cui prima regolamentazione risale al 1991, quando l'autorità giapponese definì i FOSHU (*Foods for Specific Health Use*).

In Europa, invece, la materia è rimasta poco definita fino al 1999, quando con i "*Scientific Concepts of Functional Foods in Europe*" redatti dall'International Life Science Institute, si è affermato che "*un alimento può essere definito funzionale se è dimostrato con sufficiente chiarezza il suo effetto positivo su una o più funzioni dell'organismo in modo tale da essere rilevante per il miglioramento dello stato di salute o il benessere o nella riduzione del rischio di malattie. Tali prodotti devono essere sotto forma di comuni alimenti, e devono poter esercitare i loro effetti sulla base di un normale consumo. Non devono necessariamente esercitare effetti su tutta la popolazione*". Quest'ultimo è un concetto da sottolineare perché indica che un cibo può essere funzionale anche solo per determinate categorie di individui, come ad esempio bambini, anziani o donne in gravidanza.

Se dunque un tempo l'obiettivo della dieta era quello di fornire tutti i nutrienti richiesti dall'organismo, rispondendo alle esigenze di base, nasce ora un nuovo concetto di nutrizione che prevede l'ottimizzazione del fabbisogno giornaliero dei nutrimenti e la ricerca di componenti atti a favorire il mantenimento della salute. Ponendo attenzione a quest'ultimo termine, esso non definisce più come in passato l'assenza di malattia, ma più che altro il raggiungimento del così detto *wellbeing*, ovvero una situazione di completo benessere fisico, psichico e sociale. Questa nuova concezione di salute ha contribuito a ridefinire il concetto di alimentazione e la consapevolezza scientifica che certi alimenti sono particolarmente benefici per l'organismo in virtù dei loro componenti ha portato a rivalutare molti cibi tradizionali di uso comune come frutta, verdura, cereali integrali, latte e derivati, che vengono considerati oggi come funzionali. Il concetto di alimentazione cambia così da "positivo" a "ottimale" passando da una cultura dell'emergenza a una di prevenzione (Uauy *et al.*, 2009), dove gli alimenti funzionali costituiscono la chiave di volta di tale cambiamento. Così come le malattie da denutrizione, anche le patologie dovute a un regime dietetico eccessivo o squilibrato possono essere prevenute e curate correggendo l'alimentazione e lo stile di vita (*regimen sanitatis*). La moderna dietologia deve tenere quindi conto di svariati fattori e ha la necessità di essere una scienza multidisciplinare che si avvale del contributo di chimica e biochimica, biofisica e fisiologia, tossicologia, farmacologia e genetica. L'obiettivo ultimo consisterà nel determinare la dieta perfetta in base al patrimonio genetico dell'organismo: se si riuscirà a comprendere l'interazione tra i geni, fattori nutrizionali e patologie, si potrà attuare una prevenzione specifica per ogni singolo individuo. La nutrigenomica, che studia le interazioni tra i singoli geni e gli alimenti, è l'ultima frontiera dell'alimentazione funzionale, e creerà la possibilità di focalizzarsi su una selezione alimentare personalizzata in modo da individuare il regime dietetico più idoneo, non alla popolazione in generale, ma a un individuo nello specifico (Subbiah, 2008).

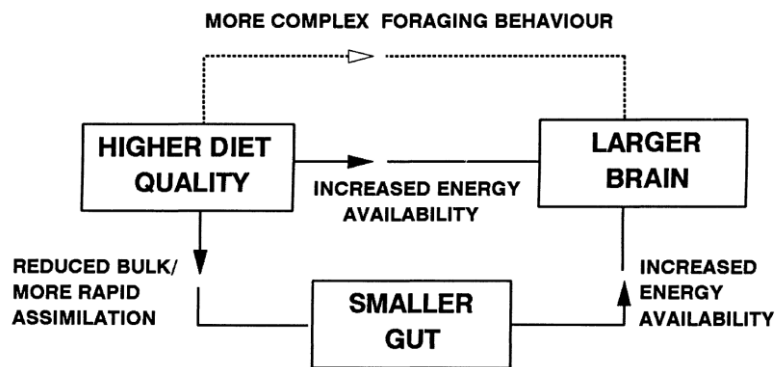
1.1.1. Il genere *Homo* e gli alimenti: una storia lunga milioni di anni

Ogni specie animale ha a disposizione una nicchia alimentare entro la quale scegliere e consumare il suo nutrimento e dispone degli strumenti per procacciarsi gli alimenti più adatti. L'uomo, che appartiene al sottotipo dei Vertebrati e alla classe dei Mammiferi, ordine dei Primati e famiglia degli Ominidi, non ha strumenti adatti alla cattura e all'uccisione di altri animali: i muscoli elastici e affusolati ci permettono di correre e nuotare agilmente, ma non di afferrare prede in movimento, l'assetto dentale e il movimento laterale della mandibola ci

consentono di avere una maggior predilezione parti vegetali come radici e semi, e i diversi organi ci consentono di vedere e annusare da vicino, raccogliere, scavare e cercare cibi fra frutti, tuberi e bacche. Un'altra caratteristica degli esseri umani riguarda la lunghezza del tubo digerente, che è circa 7-10 volte maggiore di quella dell'intero corpo; se si considera che questo parametro è generalmente proporzionale alla quantità di fibra presente nella dieta e che negli animali carnivori questo rapporto è approssimativamente di 4, se ne evince che l'uomo ha un intestino più adatto a un'alimentazione ricca di vegetali. Oltre alle peculiarità prettamente fisiche, un ulteriore fattore da tenere in considerazione che condiziona in maniera netta la scelta del cibo da parte degli animali è l'istinto. Tutti gli animali, compreso l'essere umano, sono dotati di un istinto congenito che li induce a compiere azioni utili alla sopravvivenza della propria specie, come ad esempio la riproduzione, l'allattamento o la cova, la migrazione o il letargo. Anche se l'uomo è un essere intelligente e dotato di senso critico ha mantenuto comunque questa "programmazione intrinseca". Se ci si sofferma sul fattore alimentare, è facile constatare come la nostra specie sia attratta ad esempio dai frutti colorati, mentre l'uccisione di altri animali e l'odore del sangue creano un senso di disgusto e di pietà.

Il processo di ominazione è durato qualche milione di anni ed è stato molto complesso e articolato. Il genere *Homo* comparve durante il Pliocene (da 5 a 1.8 milioni di anni fa) con *Homo habilis* che aveva un corpo molto simile a quello dell'*Australopithecus* ma un cervello di dimensioni molto maggiori. La crescita del cervello correlata a una riduzione della dentatura e all'aumento delle dimensioni corporee conferma l'ipotesi che nel corso dell'evoluzione del genere *Homo* i nostri antenati abbiano prediletto un'alimentazione di alta qualità. Nella continua ricerca di alimenti a elevata qualità gli ominidi cominciarono a far uso di cibi di origine animale come pesci, uova, midollo di carogne. Per introdurre in maniera stabile la carne nella dieta alcuni individui della popolazione vennero specializzati al procacciamento della selvaggina e alla sua conservazione. Tale organizzazione ha favorito un modello alimentare complesso che è arrivato fino ai tempi nostri, sostenuto da esigenze fisiologiche, economiche, ecologiche e da complessi aspetti culturali. Con la comparsa dell'uomo moderno il consumo di carne nella dieta è diventato un aspetto consolidato e l'utilizzo di prodotti animali è diventato quasi giornaliero. Ciò non implica però che la nostra specie si sia adattata da un punto di vista biologico a un'alimentazione scarsa in fibre vegetali. Se confrontiamo la dieta dello statunitense medio, che ingerisce circa 10 g di fibra al giorno, e quella dello scimpanzè, che ne ingerisce 10 volte tanto, ci risulta subito chiaro come l'alimentazione dell'uomo moderno non sia più conforme alle esigenze anatomiche e fisiologiche della nostra specie, tenendo conto che il nostro apparato digerente è del tutto simile a quello del bonobo (con cui condividiamo anche il 98% del patrimonio genetico). Studi effettuati sullo scimpanzè hanno dimostrato che il suo tubo digerente metabolizza la fibra vegetale in modo del tutto simile a quello dell'uomo e all'aumentare del contenuto di fibra cresce la velocità di transito intestinale: se la qualità degli alimenti si abbassa, aumenta la quantità di cibo trasformabile nell'unità di tempo. Inoltre un traffico intestinale lento, dovuto ad una dieta povera di fibre, aumenta il ristagno di prodotti cancerogeni all'interno del colon e quindi la probabilità di indurre mutazioni. L'utilizzo giornaliero di prodotti raffinati e di origine animale ha favorito l'insorgenza di patologie digestive (gastrite e colite), metaboliche (diabete) e degenerative che influenzano negativamente la salute umana (Walker *et al.*, 2005). Non dobbiamo però dimenticare, come affermato in precedenza, che la differente dieta ricca di vegetali adottata dagli scimpanzè e la dieta adottata dalla nostra specie potrebbe essere la discriminante che ha giocato un ruolo fondamentale nell'evoluzione dell'uomo. Questa teoria è sostenuta tra gli altri da Leslie e collaboratori (1995), che affermano che il consumo metabolico del nostro cervello può essere mantenuto solo grazie ad una dieta onnivora (Figura 1), e da uno studio più recente di un gruppo di ricercatori tedeschi del Max Planck Institute che ha dimostrato come la dieta dello scimpanzè e quella dell'uomo giochino un ruolo fondamentale nella regolazione dell'espressione di numerosi geni, in particolare nel fegato (Somel *et al.* 2008).

Figura 1. Relazione tra una dieta di alta qualità e l'incremento della grandezza del cervello (Leslie *et al.*, 1995).



Possiamo dunque dire che la selezione naturale ha favorito la comparsa dell'uomo premiando la scelta di prediligere alimenti ricchi in calorie provenienti da grassi e proteine animali e di cibi cotti più facilmente e velocemente digeribili. È altresì da tenere in considerazione che una dieta troppo ricca in cibi di origine animale, senza rispettare le esigenze fisiologiche dell'organismo, può portare all'insorgenza di una serie infinita di problemi e patologie. La qualità dei cibi è inoltre un fattore importante. Ad esempio, la stragrande maggioranza della carne consumata oggi presenta mediamente un contenuto lipidico del 15%, contro il 4-5% di quello della selvaggina procacciata dai nostri antenati. Considerando infine l'aspetto socio-culturale, l'utilizzo smodato di carne, per la produzione della quale vengono utilizzate enormi quantità di cereali, porta allo spreco di risorse alimentari che basterebbero ad alimentare i circa 2 miliardi di persone che giacciono anche oggi in condizioni nutrizionali inadeguate.

1.1.2. Health claims

Il *Codex Alimentarius* (<http://www.codexalimentarius.org/>) è una raccolta di linee guida che è stata redatta come riferimento per gli standard della sicurezza e qualità degli alimenti a livello mondiale e vuole essere una guida internazionale per tutti coloro che devono legiferare nell'ambito del commercio dei cibi. Il *Codex* è nato nel 1997 dalla collaborazione tra due delle più grandi organizzazioni no profit a livello planetario, l'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'Alimentazione e l'Agricoltura (FAO) e l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) e diede per la prima volta la definizione di *health claim*: "qualsiasi rappresentazione che stabilisce, suggerisce o implica che esiste una relazione tra un cibo o un suo componente e la salute di un individuo".

Gli *health claims* costituiscono il messaggio che il produttore vuole associare a un alimento per comunicare al consumatore le proprietà benefiche del prodotto sulla salute. L'Unione Europea attraverso l'European Commission Concerted Action on Functional Food Science in Europe (FUFOSE) consente l'utilizzo due tipi di health claims per gli alimenti funzionali:

- di TIPO A "*miglioramento di una funzione biologica*", in riferimento a specifiche attività fisiologiche, psicologiche e biologiche che vanno oltre il loro ruolo accertato nella crescita, nello sviluppo e in altre normali funzioni dell'organismo. Non si fa quindi riferimento a uno stato patologico ma solamente a un beneficio, ad esempio dell'azione svolta dalla caffeina nel momento in cui determina una miglior efficienza cognitiva.
- di TIPO B "*riduzione del rischio di malattia*", quando il consumo di un alimento o di un componente alimentare può contribuire alla riduzione del rischio di insorgenza di una data malattia o di uno stato patologico grazie a specifici nutrienti o non nutrienti in esso contenuti. Un corretto apporto di acido folico nelle donne in gravidanza può ad esempio ridurre il rischio di avere un figlio con spina bifida.

Nei paesi industrializzati gli alimenti funzionali stanno sempre più prendendo piede nell'interesse dei consumatori, creando nel contempo nuove opportunità di mercato che vengono rapidamente sfruttate, in particolare dalle multinazionali. Queste ultime esercitano sempre più pressioni per cercare di ampliare i confini degli *health claims* e estendere il diritto di propagandare come salutistici il maggior numero di prodotti, anche quelli che di funzionale presentano ben poco. Ecco allora la necessità di adottare norme precise sull'utilizzo delle indicazioni nutrizionali, in maniera da tutelare il consumatore e regolamentare in modo efficace il mercato interno, evitando l'insorgere di condizioni di concorrenza diseguali; a tal proposito sono state introdotte quattro definizioni cardine per l'etichettatura:

- *indicazione*: "qualunque messaggio o rappresentazione non obbligatorio in base alla legislazione comunitaria";
- *indicazione nutrizionale*: "qualunque indicazione che affermi, suggerisca, sottintenda che un alimento abbia particolari proprietà nutrizionali benefiche, dovute all'energia (valore calorico) che apporta un tasso ridotto o accresciuto, o non apporta, e/o alle sostanze nutritive o di altro tipo che contiene in proporzioni ridotte o accresciute, o non contiene";
- *indicazioni sulla salute*: "qualunque indicazione che affermi, suggerisca o sottintenda l'esistenza di un rapporto tra una categoria di alimenti, un alimento o uno dei suoi componenti e la salute";
- *indicazioni relative alla riduzione di un rischio di malattia*: "qualunque indicazione sulla salute che affermi, suggerisca o sottintenda che il consumo di una categoria di alimenti, di un alimento o di uno dei suoi componenti riduce significativamente un fattore di rischio di sviluppo di una malattia umana".

Tali assunzioni sono disciplinate dal Reg. CE 1924/2006; nell'articolo 3 di tale regolamento sono elencati i principi guida da utilizzare per l'etichettatura e il confezionamento dei prodotti, in maniera da tutelare la scelta del consumatore e garantire un *claim* chiaro e essenziale. Le indicazioni nutrizionali presentate non possono essere false, ambigue e fuorvianti, non devono incoraggiare il consumo eccessivo di un elemento, e non possono affermare che una corretta dieta non fornisca quantità adeguate di ogni sostanza nutritiva.

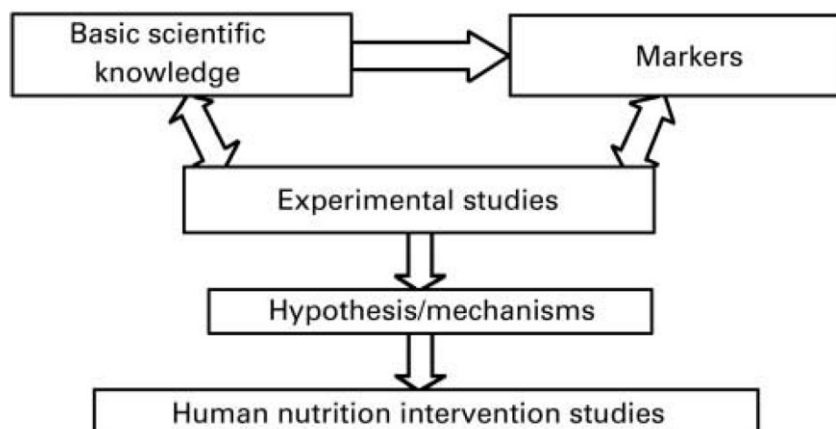
Per poter attribuire a alimenti, o parti di essi, proprietà salutistiche è necessario seguire un rigoroso *iter* scientifico derivante dal modello redatto dal coordinatore scientifico del progetto FUFOS (Robertfroid, 2002) che si basa su 3 livelli (Figura 2):

- *Livello 1*: ricerca di base e sperimentazione, identificazione dei fitonutrienti e comprensione dei meccanismi che stanno alla base dell'interazione tra alimento e modulazione dell'espressione genica, funzioni biochimiche cellulari e potenziali effetti fisiologici;
- *Livello 2*: sviluppo di modelli e metodologie, come ad esempio i *biomarkers*, per dimostrare attraverso studi nutrizionali gli effetti citati e le loro conseguenze, in maniera tale da poter giustificare l'utilizzo di specifiche indicazioni salutistiche (*functional and physiological claims*);
- *Livello 3*: disegno di adeguati studi di nutrizione umana atti a dimostrare, oltre gli effetti funzionali, un beneficio sulla salute, compresa la prevenzione di patologie, in maniera da giustificare l'utilizzo di *health claims*.

Nell'articolo 13 del Reg. CE 1924/2006 vengono regolamentate nello specifico le indicazioni "funzionali generiche" che si riferiscono "al ruolo di una sostanza nutritiva o di altro tipo per la crescita, lo sviluppo e le funzioni dell'organismo, alle funzioni psicologiche e comportamentali, al dimagrimento e al controllo del peso, al senso di sazietà o alla riduzione dell'energia apportata dal regime alimentare". La valutazione scientifica è svolta dall'European Food Safety Authority (EFSA) che certifica che le indicazioni riportate sulle etichette dei

prodotti alimentari e nei messaggi pubblicitari riguardanti salute e nutrizione siano sensate e corrette. L'EFSA è il riferimento dell'Unione Europea per la valutazione dei rischi relativi alla sicurezza alimentare ed è in continuo contatto con le autorità nazionali alle quali fornisce consulenza scientifica; è importante sottolineare che tale agenzia è indipendente, finanziata dal bilancio dell'UE e operante in modo autonomo dalla Commissione e dal Parlamento Europeo e dagli Stati membri. Ad oggi l'EFSA ha pubblicato 263 pareri, fornendo consulenza scientifica su oltre 2150 indicazioni "funzionali generiche" sulla salute tratte da un elenco di 4637 indicazioni trasmesse dalla Commissione Europea. L'elenco definitivo delle indicazioni è stato pubblicato in forma di banca dati in formato *Access*, al termine di un processo di consolidamento svolto dalla Commissione nel quale sono state prese in considerazione più di 44000 indicazioni presentate dagli stati facenti parte dell'unione.

Figura 2.
Rappresentazione schematica della strategia di scoperta e sviluppo dei cibi funzionali (Robertfroid 2002).



Nell'articolo 14 invece si definiscono le indicazioni riguardanti la riduzione dei rischi di malattia e allo sviluppo e alla salute dei bambini. Nell'agosto 2008 l'EFSA ha espresso la sua prima serie di pareri fornendo informazioni sulla giustificazione scientifica delle indicazioni, a oggi il gruppo di esperti scientifici sui prodotti dietetici, nutrizione ed allergie (NDA) ha ricevuto 268 richieste: 103 di esse sono state ritirate e 75 pareri scientifici riferiti sono stati adottati.

Gli artt. 13 e 14 sono dunque strumenti di fondamentale importanza per la regolamentazione dei *claims*: il primo dichiara il ruolo benefico di una sostanza nutritiva per le funzioni dell'organismo (ad esempio "la Vitamina A fa bene alla vista"), mentre il secondo si esprime sulla riduzione dei rischi di contrarre malattie (ad esempio "i flavonoidi sono antiossidanti che aiutano a prevenire patologie degenerative"); la presenza di questi due articoli e la validazione scientifica da parte dell'EFSA rappresentano una notevole garanzia nei confronti dei consumatori. A ulteriore tutela dei cittadini, il Reg. CE 1924/2006 ha introdotto infine il concetto di "profilo nutrizionale", che vieta l'utilizzo di *claims* per tutti quei prodotti che in qualche modo non lo soddisfano.

I parametri presi in considerazione nel profilo nutrizionale sono:

- ruolo dell'alimento nella dieta;
- composizione nutrizionale dell'alimento;
- quantità di grassi, acidi grassi saturi, trans, zucchero, sodio e sale.

Tutto questo sta a significare che per essere considerato tale un cibo funzionale non solo deve contenere il componente bioattivo, ma deve anche essere nutrizionalmente equilibrato; le industrie alimentari dovranno quindi, oltre a scegliere materie prime di qualità, formulare adeguatamente i prodotti e controllare la filiera a partire dalla produzione e finendo con la conservazione e lo stoccaggio.

1.1.3. Alimenti funzionali: caratteristiche e peculiarità

Si può dunque considerare un alimento come "funzionale" quando contiene al suo interno uno o più componenti bioattivi in grado di migliorare lo stato di benessere di un individuo o ridurre il rischio di contrarre patologie. Per essere considerato tale deve essere nutrizionalmente equilibrato, deve poter essere consumato regolarmente all'interno della dieta, non deve essere sotto forma di integratore alimentare (né di compresse o capsule) e i suoi effetti devono essere riconosciuti dalla comunità scientifica. Nella vita quotidiana possiamo quindi considerare alimento funzionale un prodotto "naturale", come ad esempio i vegetali o alcuni tipi di pesci, che contengono già al loro interno molecole attive, oppure prodotti "trattati" che hanno subito interventi tecnologici atti a modificarne la composizione e a conferirvi un valore aggiunto. Per ottenere un prodotto funzionale trattato si parte solitamente da un prodotto tradizionale consumato comunemente nella dieta e si agisce, attraverso l'utilizzo di processi tecnologici, nei seguenti modi:

- eliminazione di una o più sostanze aventi effetti negativi sulla salute
- sostituzione di componenti aventi effetti negativi con altri componenti bioattivi
- incremento di composti bioattivi presenti in quantità non sufficienti nel prodotto di partenza (arricchimento)
- addizione di componenti attivi non presenti nel prodotto di partenza (fortificazione)
- aumento della biodisponibilità di uno o più componenti in modo da migliorarne l'assimilazione.

I composti biologicamente attivi possono essere ricavati da composti naturali, come ad esempio flavonoidi o carotenoidi presenti nei vegetali, attraverso tecniche di separazione e purificazione, ma possono essere anche ottenuti attraverso sintesi chimica oppure mediante l'utilizzo di processi biotecnologici che si avvalgano di enzimi e microrganismi specifici in grado di metabolizzare tali molecole. Questi composti possono essere classificati in gruppi divisi per la loro azione specifica:

- antiossidanti
- antimutageni
- antipertensivi e ipocolesterolemici
- neuroregolatori
- antimicrobici e antivirali
- immunomodulatori e anti-infiammatori
- stimolatori del tratto intestinale.

Se una sostanza appartenente a una delle categorie sopraelencate viene aggiunta ad un alimento che la contiene naturalmente, si ottiene un alimento "arricchito", come ad esempio i succhi di frutta o il latte di soia addizionati con calcio. Se il prodotto è invece aggiunto *ex novo* si parla di alimenti "supplementati", come ad esempio l'aggiunta di carotenoidi alla margarina e grassi $\omega 3$ al latte. Una classe a sé stante è data dagli alimenti "fortificati" che per definizione sono cibi comunemente consumati dalla popolazione ai quali sono state aggiunte sostanze attive non presenti nelle materie prime di partenza, senza alterarne il valore energetico, con lo scopo di sopperire a una carenza alimentare. Ne sono esempi l'aggiunta di β -carotene nel riso consumato dalle popolazioni asiatiche, oppure la fortificazione di prodotti da forno con acido folico per prevenire l'insorgenza della spina bifida.

Seppur a volte non risulti facile definire il limite tra un alimento normale ed uno funzionale, è necessario distinguere le seguenti categorie di prodotti:

- *alimenti dietetici*: sono utilizzati su indicazione medica e sono diretti a soggetti affetti da specifiche patologie, mentre gli alimenti funzionali sono consumati da individui sani
- *prodotto nutraceutico*: è venduto solitamente sotto forma di preparato (pillole, capsule)

e non è necessariamente un alimento consumato all'interno della dieta quotidiana. Il termine nutraceutico viene riferito al componente funzionale attivo, ne sono esempi le capsule di $\omega 3$ e le pastiglie di carotenoidi

- *integratori alimentari*: sono definiti dal Ministero della Salute “prodotti alimentari destinati a integrare la comune dieta e che costituiscono una fonte concentrata di sostanze nutritive, quali le vitamine e i minerali, o di altre sostanze aventi un effetto nutritivo o fisiologico, in particolare, ma non in via esclusiva, aminoacidi, acidi grassi essenziali, fibre ed estratti di origine vegetale, sia monocomposti che pluricomposti, in forme predosate” (Direttiva 2002/46/CE, attuata con il decreto legislativo 21 maggio 2004, n. 169). Anche in questo caso le forme predosate quali pastiglie, capsule e compresse li escludono dalla categoria degli alimenti
- *novel food*: sono tutti quei prodotti e sostanze alimentari per i quali non è dimostrabile un consumo significativo al 15 maggio 1997 all'interno dell'Unione Europea (UE), data di entrata in vigore del regolamento medesimo" (Regolamento (CE) 258/97).

Tali prodotti devono appartenere ad una delle seguenti categorie:

- prodotti o ingredienti alimentari con una struttura molecolare primaria nuova o volutamente modificata
- prodotti o ingredienti alimentari costituiti o isolati a partire da microrganismi, funghi o alghe
- prodotti o ingredienti alimentari costituiti da vegetali o isolati a partire da vegetali e ingredienti alimentari isolati a partire da animali
- prodotti e ingredienti alimentari sottoposti a un processo di produzione non generalmente utilizzato, che comporta nella composizione o nella struttura dei prodotti o degli ingredienti alimentari cambiamenti significativi del valore nutritivo, del loro metabolismo o del tenore di sostanze indesiderabili.

Sono stati esclusi dal Reg. “*novel food*” gli organismi geneticamente modificati (OGM), precedentemente contenuti, per essere disciplinati in modo specifico e autonomo con il regolamento (CE) 1829/2003.

Nonostante le peculiarità che contraddistinguono le categorie di prodotti sopracitate, possono in alcuni casi presentarsi punti di contatto tra queste e il segmento dei cibi funzionali. Ad esempio è facile intuire che alcuni cibi funzionali potrebbero anche essere considerati “*novel food*” in quanto non ancora presenti in maniera significativa nella dieta dei cittadini europei, oppure alcuni “alimenti dietetici” destinati a individui con specifiche esigenze nutrizionali in condizioni non patologiche (es. donne in gravidanza) in base al *Consensus Document* potrebbero essere classificati come funzionali.

1.1.4. Impatto sociale dei cibi funzionali e il loro mercato

Il mercato degli alimenti funzionali ha subito un rapido incremento nel corso degli ultimi anni. Le ragioni di tale incremento sono da ricercare in un numero svariato di fattori tra i quali quelli socio-economici, culturali e demografici. Le generazioni nate dopo gli anni del boom economico del secondo dopoguerra hanno vissuto un periodo florido dal punto di vista dello sviluppo socio-economico e i progressi fatti dalla scienza e dalla tecnologia hanno aumentato il benessere dell'individuo, innalzando notevolmente l'aspettativa di vita, tanto che si può affermare che esse sono le più forti, salutisticamente parlando, mai vissute. La crescita del settore di mercato dei cibi funzionali a livello globale sembra essere stata promossa *in primis* dall'aumento della consapevolezza del ruolo che una corretta dieta svolge nel mantenimento di un livello di salute ottimale e nella prevenzione di molteplici tipi di patologie (malattie cardiovascolari, obesità, ipertensione, osteoporosi, ecc.). Lo stile di vita

moderno caratterizzato sempre più da sedentarietà e da una dieta squilibrata e povera di fibre, ha favorito la diffusione di patologie che gravano in modo ingente sulla spesa sanitaria, ragione per cui anche le autorità nazionali e internazionali sono state indotte a sviluppare piani di intervento per promuovere lo sviluppo e il consumo di *functional food*. Un settore di particolare interesse è dato da quei prodotti rivolti a preservare la salute del sistema cardio-circolatorio e alla prevenzione delle patologie cardiovascolari, che rappresentando oggi la principale causa di morte nei paesi sviluppati. Un numero considerevole di industrie alimentari sta investendo le proprie risorse nella ricerca scientifica per sviluppare questo tipo di alimenti, spinti dalla crescente domanda da parte dei consumatori che, preoccupati da fattori di varia natura come l'allarme sanitario, i timori legati all'uso delle biotecnologie e il conseguimento di una "vecchiaia dignitosa" ricercano sempre più spesso tali prodotti (Szakály *et al.* 2012). Nonostante ciò il concetto di "salubrità" della dieta è ormai riduttivo per descrivere il rapporto che i consumatori hanno rispetto al legame che intercorre fra cibo e salute. Infatti, come descritto nei precedenti capitoli, l'interesse attuale del consumatore non è più orientato solamente al concetto di "salubre"/"sano" quanto al fatto che esso possa contribuire al raggiungimento e al mantenimento del *wellbeing*.

La commercializzazione degli alimenti funzionali è iniziata da poco più di un ventennio in Giappone, per poi prendere piede nella maggior parte dei paesi sviluppati quali Stati Uniti, Canada e Europa. Il *business* di questi prodotti, pur essendo di recente sviluppo, ha acquistato ingenti quote di mercato, ed è da considerarsi una conseguenza dovuta all'aumento dell'aspettativa di vita delle popolazioni e il derivante incremento delle fasce di popolazione *over 60*. Bisogna sottolineare però che uno dei fattori a cui il consumatore dà più importanza nella scelta di un alimento è dato dalla soddisfazione sensoriale che esso è in grado di apportare (Annunziata e Vecchio, 2011), le caratteristiche organolettiche di un cibo sono infatti elementi imprescindibili nel determinare la scelta di un prodotto. La modificazione della composizione chimica effettuata su un alimento, al fine di aumentarne gli effetti benefici, può avere delle ripercussioni negative sui caratteri organolettici, e renderlo di fatto meno appetibile.

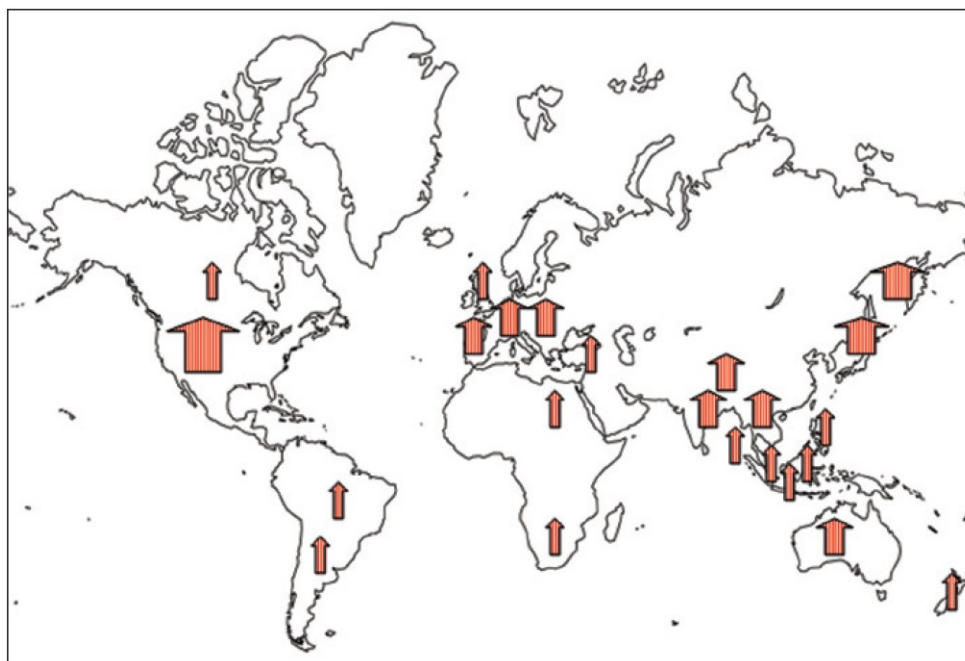
Un altro dei fattori che influenzano maggiormente le scelte alimentari è dato dal livello culturale e dal grado di istruzione del consumatore. Diversi studi hanno evidenziato che le persone dotate di formazione scientifica sono più inclini all'acquisto di alimenti funzionali in quando conoscono più approfonditamente i benefici che essi possono apportare nel medio e lungo termine (Cranfield, 2011). Vi è purtroppo una generale carenza di informazione su questo tipo di argomento: la maggior parte degli individui non saprebbe infatti fornire neppure una vaga definizione di alimento funzionale e spesso confonde in maniera errata questi cibi con integratori, nutraceutici o prodotti dietetici e erboristici. La scarsa conoscenza del concetto di *functional food* provoca in molti casi l'aumento dello scetticismo riguardo gli effetti benefici attribuiti ai cibi funzionali, traducendosi in un ostacolo allo sviluppo di tale mercato: in questo quadro è inevitabile che la scelta sia influenzata più dal *marketing* che dalla consapevolezza del beneficio. Studi di settore hanno dimostrato infatti che i consumatori preferiscono approvvigionarsi di alimenti e bevande funzionali dal marchio riconosciuto, mentre sono più restii nell'acquisto di prodotti di marchi sconosciuti (Krystallis e Chrysochou, 2012). Il consumatore ripone più fiducia nei confronti dei grandi produttori, che si pensa possano offrire maggiori garanzie di qualità e di sicuro effetto benefico; ciò è il frutto di ingenti investimenti in campagne pubblicitarie che giocano un ruolo davvero importante nell'influenzare l'opinione pubblica. Ecco allora che per poter risolvere il problema della lacuna informativa in merito all'argomento è fondamentale un coinvolgimento da parte delle istituzioni, della scuola e della ricerca al fine di tutelare la popolazione, permettendo di effettuare delle scelte alimentari consapevoli. Anche la legislazione è intervenuta a riguardo, occupandosi in particolar modo, come descritto nel capitolo precedente, della regolazione delle indicazioni presenti in etichetta.

Essendo i *functional foods* dei prodotti che conferiscono specifici effetti benefici per la salute del consumatore, essi vengono solitamente proposti sul mercato a un prezzo più alto rispetto a quello degli alimenti convenzionali, con un aggravio che può arrivare fino al 30-50%. Questo incremento di prezzo è giustificato dall'elevato costo di produzione: si stima che dall'idea iniziale all'introduzione del prodotto finito nel mercato i costi da sostenere si aggirino intorno a 1-1.5 milioni di euro. Si può facilmente intuire che la vendita di questi prodotti, che vengono commercializzati a prezzi più elevati rispetto alla media, è molto sensibile alle variazioni del contesto socio-economico e ai periodi di recessione. Buona parte delle risorse sono investite nel *marketing* del prodotto, poiché è noto che il cliente giustifica la maggior spesa da sostenere solo se il produttore riesce a divulgare una giusta informazione e a ottenere una collocazione ottimale sul mercato.

Riassumendo, possiamo quindi affermare che il mercato degli alimenti e delle bevande funzionali è in continua espansione (Figure 3 e 4) in conseguenza dei seguenti fattori:

- un incremento della coscienza pubblica sul tema, derivante da una adeguata informazione ed educazione
- una concezione del cibo non solo come fonte di sostentamento ma anche capace di determinare effetti benefici
- un aumento dell'età media della popolazione mondiale
- un aumento della spesa sanitaria a seguito dell'incremento delle patologie degenerative
- un avanzamento della ricerca e della tecnologia
- un ammodernamento della legislazione in materia di alimentazione funzionale.

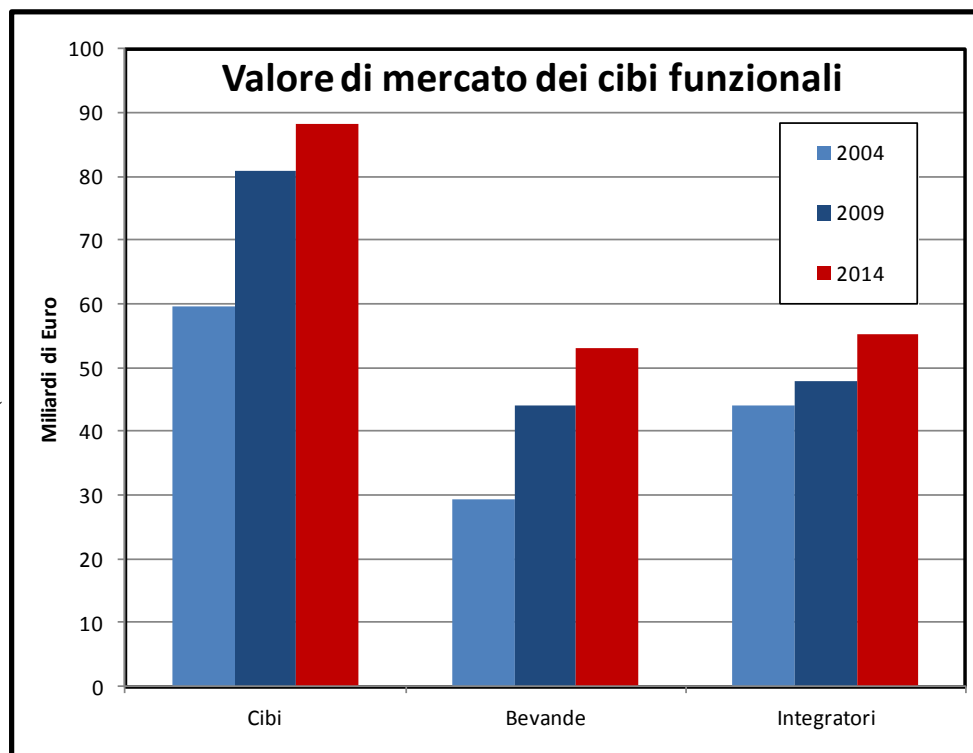
Figura 3.
 Proiezione del mercato dei cibi funzionali nei prossimi 10 anni. L'area delle frecce è proporzionale all'espansione di mercato prevista nella regione corrispondente (Vergari *et al.* 2010).



Nel 2010 le vendite di prodotti funzionali a livello mondiale hanno segnato un ricavo di circa 137 miliardi di euro soprattutto negli USA, in Europa e in Giappone, che insieme coprono l'86% del mercato. Gli USA sono ad oggi il paese con il maggiore sviluppo per questo tipo di prodotti, che già nel 2006 raggiungevano un fatturato di quasi 16 miliardi di euro e venivano esportati in tutte le parti del mondo; il Giappone nello stesso anno segnava un ricavo di circa 20 miliardi. In Europa si è riscontrata una netta espansione delle vendite negli ultimi 20 anni e in particolare dal 1999, quando il fatturato era di circa 1.2 miliardi di euro, al 2006, quando ha raggiunto i 6 miliardi con un incremento di più di 5 volte. La fetta di

mercato più consistente nell'Unione Europea è data da Germania, Francia, Regno Unito e Olanda. Altri due paesi dove l'interesse per questo tipo di prodotti è in crescita sono l'India e la Cina: il primo ha una ingente esportazione in USA e Giappone, il secondo ha visto negli ultimi 10 anni il nascere nel proprio territorio di più di 1000 aziende di settore (Vergari *et al.* 2010). Per quanto riguarda i consumi *pro capite*, i cittadini giapponesi risultano essere i più predisposti ad investire in una dieta funzionale, spendendo circa 122 euro nel corso di un anno, un dato atteso in quanto il mercato Giapponese è il più antico e consolidato, seguiti da quelli statunitensi con 100 euro e da quelli europei con 68 euro.

Figura 4.
Crescita del mercato degli alimenti funzionali negli ultimi dieci anni a livello globale. Nel 2014 il fatturato totale ha sfiorato i 200 miliardi di Euro (elaborazione personale su dati di BBC Research).



1.1.4.1. Il mercato dei carotenoidi

Nel mercato emergente dei cibi funzionali una delle classi di composti maggiormente utilizzati è quella dei carotenoidi, in particolare il β -carotene. Questo insieme di molecole oltre alle spiccate proprietà antiossidanti trova il suo maggior utilizzo come colorante alimentare, ad esempio per ravvivare la tinta di uova, pesce e carne avicola. Il loro valore di mercato a livello globale si aggira attualmente intorno ai 900 milioni di euro e si stima che supererà il miliardo entro il 2018, con una crescita annuale del 2.3% (Figura 5). Il settore del β -carotene, ad esempio, ha fruttato circa 180 milioni di euro nel 2007, 190 milioni nel 2010 e raggiungerà i 240 milioni nel 2018, con una crescita annuale superiore al 3%; anche le vendite della xantofilla luteina sono stimate al rialzo (3.6 % annuale) e si avvicineranno ai 230 milioni di euro nel 2018. In Europa l'astaxantina trova impiego principalmente nel campo dell'acquacoltura, ma è ottenuta quasi esclusivamente come prodotto di sintesi da fonti petrolchimiche: ha un prezzo che si aggira sui 1800 Euro al kg, con un fatturato annuo pari a 150 milioni. Negli ultimi anni per soddisfare le esigenze dei consumatori, che non vedono di buon occhio l'uso di composti di natura sintetica negli alimenti, la produzione di astaxantina ottenuta da matrici vegetali è incrementata del 35% e gli acquirenti arrivano a pagarla più di 8000 euro al kg (Vergari *et al.*, 2010).

Gli antiossidanti rappresentano una linea di difesa contro molteplici patologie, tra cui le malattie cardiovascolari, i tumori e la degenerazione maculare della retina. Uno studio

effettato dalla Società Francese di Salute Pubblica ha rivelato come in Europa ogni anno vengano spesi più di 180 miliardi di euro in cure mediche solamente per combattere le malattie che affliggono il sistema cardiovascolare, e si stima che con una corretta dieta ricca in carotenoidi unita ad un adeguato esercizio fisico si possano risparmiare fino a 144 miliardi sulla spesa sanitaria.

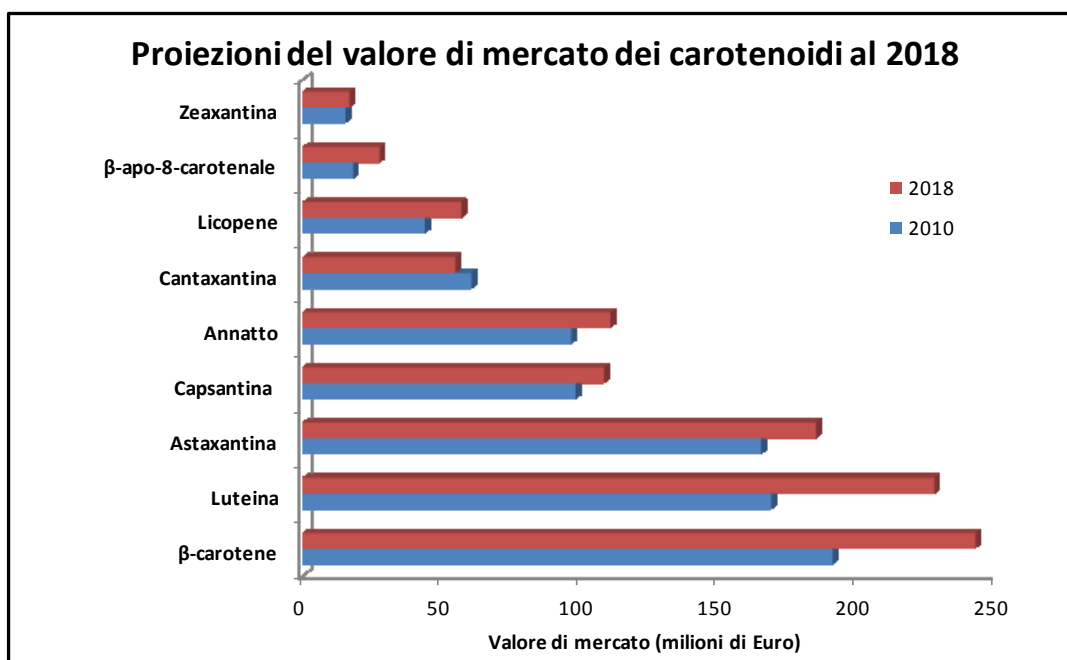


Figura 5. Proiezione del valore commerciale dei principali carotenoidi a livello mondiale nel 2018 (elaborazione personale su dati di BBC Research "<http://www.bccresearch.com/market-research/food-and-beverage/carotenoids-global-market-fod025d.html>").

Un altro campo dove cibi funzionali ricchi in carotenoidi potrebbe trovare impiego è quello dell'alimentazione per l'industria spaziale. Gli astronauti che rimangono per lunghi periodi nello spazio infatti sono soggetti a diversi tipi di disturbi, tra cui cambiamenti ematologici, incremento di rischio di calcoli renali e problemi al sistema nervoso centrale. Le radiazioni spaziali rappresentano la principale causa di stress ossidativo per gli equipaggi, inducendo ossidazione delle proteine, proteolisi muscolare e aberrazioni cromosomiche e accelerando il processo di invecchiamento (George *et al.*, 2001). La radiazione spaziale indebolisce quindi la capacità dell'organismo umano di attuare le proprie difese antiossidanti: una dieta ricca di composti bioattivi, tra i quali i carotenoidi e i flavonoidi, aiuterebbero a ripristinare queste protezioni.

Figura 6. Molecole bioattive di origine vegetale di possibile utilizzo nella alimentazione funzionale degli astronauti (Vergari *et al.* 2010).

Botanical biologic compounds with proved healthy activity

Compound	Main Botanical Sources	Therapeutic Category
Quinones	higher plants (Spinacia oleracea, Salvia spp)	Antioxidants, Antimicrobial
Zeaxanthin and Lutein, total Xanthophylls	algae (C. reinhardtii)	Antioxidants, protector of vision
Lycopene	Tomatoes	Anticancer
Phenylpropanoids	Broad beans	Cardioprotective
Isoflavones- flavones	Soybeam, Glycine max	Cardioprotective, Anticancer
Phytic acid	Pisum sativum Spinacea oleracea	Antioxidant
Resveratrol	Vitis vinifera	Antioxidant, Cardioprotective

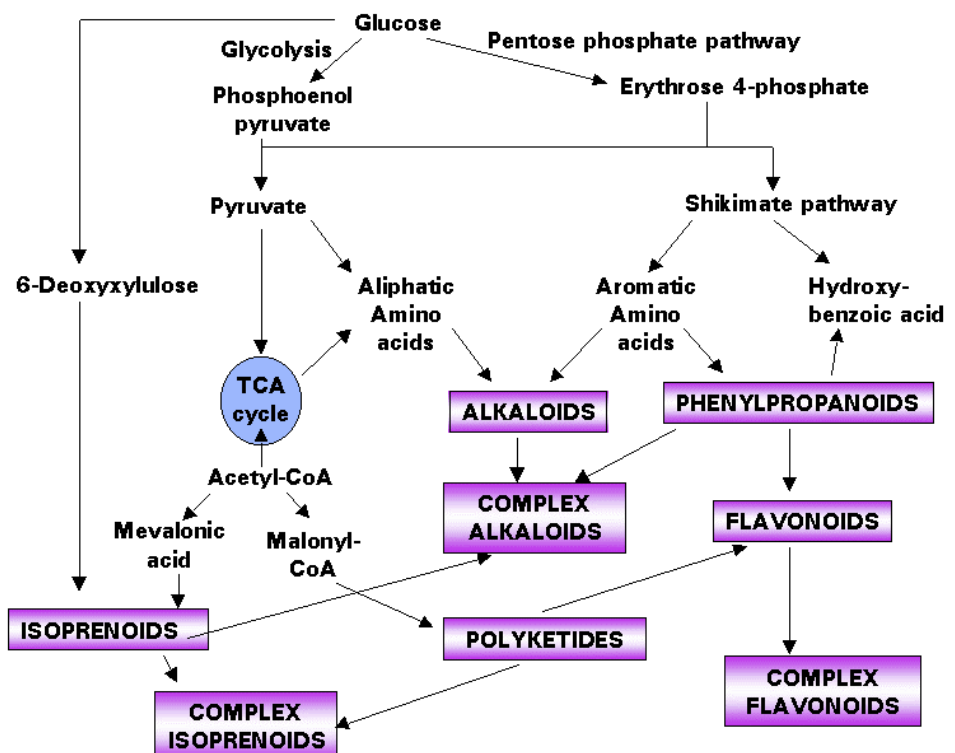
1.2. Fitonutrienti: l'importanza del metabolismo secondario delle piante

La maggior parte dei composti attivi degli alimenti funzionali sono costituiti da metaboliti secondari prodotti dalle piante. Oggi si conoscono più di 200.000 specie chimiche di origine vegetale e si stima che più del 60% dei medicinali riconosciuti sia riconducibile direttamente o indirettamente a esse. L'attenzione sulle molecole di origine naturale si è ulteriormente accentuata negli ultimi anni anche perchè l'utilizzo di approcci alternativi, come ad esempio quello dell'identificazione di sostanze bioattive mediante la chimica combinatoriale, non hanno dato gli esiti sperati. La produzione chimica di molecole aventi specificità e complessità pari a quelle naturali risulta essere oggi impraticabile, e sembra dunque più promettente attingere direttamente a quelle presenti nel regno vegetale. Delle circa 350,000 specie vegetali stimate (un terzo delle quali ancora sconosciute) solo una piccolissima parte è stata caratterizzata in maniera adeguata dal punto di vista chimico (Cseke *et al.* 2006).

I metaboliti secondari rappresentano un complesso sottoinsieme delle sostanze vegetali: essi sono coinvolti in alcune funzioni basali della pianta, ma giocano un ruolo fondamentale soprattutto per quanto riguarda l'interazione con l'ambiente esterno. Essi sono coinvolti infatti nella difesa da stress biotici e abiotici, fungono da regolatori della crescita e alcuni sono molecole segnale e agiscono come attrattivi per gli insetti impollinatori o nella mediazione di interazioni simbiotiche o parassitiche. Per quanto riguarda il punto di vista salutistico per l'uomo, queste sostanze esercitano importanti funzioni biologiche tra le quali attività antiossidante, modulazione di enzimi detossificanti, stimolazione del sistema immunitario, riduzione dell'aggregazione piastrinica e modulazione del metabolismo ormonale.

Seppur il quadro generale dei metaboliti secondari sia molto complesso, essi possono essere ricondotti a tre vie che utilizzano come precursori biosintetici derivati del metabolismo primario del carbonio: la via dello scichimato che porta alla formazione dei composti fenolici, la via del deossi-xilulosio-5-fosfato che genera i terpenoidi e i carotenoidi, e la via dell'acido mevalonico che porta alla sintesi di triterpeni, steroidi e politerpeni (Figura 7). La combinazione della via dei composti fenolici con quella dei terpenoidi genera la formazione di chinoni terpenoidi.

Figura 7.
Rappresentazione schematica della sintesi delle principali classi del metabolismo secondario delle piante (Hildebrand, 2010).



La maggior parte delle matrici alimentari di origine vegetale è dotata di una propria colorazione caratteristica, che spesso costituisce un fattore importante nel riconoscimento e apprezzamento da parte del consumatore. Tra i coloranti naturali vi sono carotenoidi, flavonoidi e betalaine. Tralasciando queste ultime, pigmenti che si ritrovano quasi esclusivamente nell'ordine *Caryophyllales* in sostituzione delle antocianine, carotenoidi e flavonoidi, pur differendo sensibilmente tra loro per struttura chimica e via biosintetica, rappresentano le due principali classi di composti funzionali. Accanto a influenze positive che questi composti possono apportare ai cibi, come l'appena citato colore, o il gradevole profumo, è importante sottolineare che spesso queste molecole possono essere causa di caratteristiche organolettiche negative che i consumatori non apprezzano: ecco allora che storicamente si è attuata una selezione per abbassarne il contenuto in alcune piante ad uso alimentare (Drewnoski e Gomez-Carneros, 2000).

1.2.1. Flavonoidi

I flavonoidi sono una delle classi più vaste di composti appartenenti alla categoria dei fenoli. Essi hanno uno scheletro carbonioso di base a 15 atomi di carbonio, ovvero due anelli aromatici uniti tra loro da un ponte a tre atomi di carbonio. Possiamo classificarli in 4 categorie principali in base al grado di ossidazione di tale ponte: flavoni, isoflavoni, flavonoli e antocianidine. I flavonoidi sono solitamente presenti nella pianta sottoforma di glicosidi, in cui l'aglicone è legato a uno zucchero mediante legami *O*-glicosidici: il più ricorrente è il D-glucosio ma sono frequenti anche galattosio, ramnosio e xilosio. La forma glicosidica risulta essere più polare e quindi maggiormente idrosolubile, ma è meno reattiva nei confronti dei radicali liberi. Sebbene la presenza dei gruppi ossidrilici degli zuccheri ne aumenti la solubilità in acqua, altri sostituenti come esteri metilici li possono rendere idrofili. I flavonoidi sono molecole che includono un'ampia gamma di sostanze colorate: il gruppo di pigmenti più vario è certamente quello dalle antocianine, glicosidi che derivano dalle antocianidine con uno zucchero legato in posizione 3, responsabili della maggior parte dei colori rosso, rosa, porpora e blu che si possono trovare nei fiori e nei frutti.

1.2.1.1. Il ruolo fisiologico dei flavonoidi nelle piante

Concentrati all'interno dei vacuoli, i flavonoidi svolgono nella pianta numerosi ruoli fisiologici, tra i quali un'azione protettiva nei confronti dei raggi UV-B, una funzione quali deterrenti alimentari contro erbivori, difesa da attacchi fungini, mediazione di interazione pianta-animale e pianta-microrganismo, fungendo in vari casi da molecole segnale.

L'azione di difesa dai raggi UV è una delle caratteristiche principali dei flavonoidi ed è fondamentale per la sopravvivenza della pianta: questa funzione è svolta in particolar modo da flavoni e flavonoli che sono in grado di assorbire la luce a lunghezze d'onda comprese tra 280 e 320 nm. Essi prevengono la formazione di radicali e specie reattive dell'ossigeno (ROS) proteggendo la pianta in due modi: assorbono la radiazione UV, riemettendola per fluorescenza e fungono da *quencher*, in quanto antiossidanti. Uno dei primi esperimenti che hanno dimostrato quanto questi composti siano importanti per la sopravvivenza della pianta è stato effettuato nei primi anni novanta da un gruppo di ricercatori americani: mutanti di *Arabidopsis thaliana* privi dell'attività della calcione sintasi, e quindi incapaci di sintetizzare flavonoidi, presentavano una sensibilità molto maggiore alla luce UV rispetto al *wild type* e erano capaci di crescere solo in condizioni di illuminazione ottimali (Li *et al.*, 1993). Molti studi su diverse specie di piante tra le quali ligustro, vite e petunia hanno dimostrato come la luce UV sia in grado di aumentare la sintesi di questi composti. Inoltre, visto la presenza del gruppo ossidrilico in posizione 3 dello scheletro carbonioso, i flavonoidi sono in grado di chelare gli ioni metallici come il ferro, rame, zinco e alluminio, riducendo il rischio della

formazione di radicali liberi (Verdan *et al.*, 2011). Specie erbacee come *Deschampsia antarctica*, *Deschampsia borealis* e *Calamagrostis epigeios*, che vivono in ambienti esposti a elevati livelli di radiazioni UV-B, presentano un accumulo costitutivo di grandi quantità di flavoni, come a esempio orientina e luteolina, che le aiutano nella fotoprotezione (Van de Staaij *et al.*, 2002).

La capacità di assorbire gli UV è correlata con la funzione vessillifera, fondamentale per il processo riproduttivo delle specie entomofile. Gli insetti sono infatti capaci di percepire la radiazione UV, non visibile all'occhio umano, e sono attratti e guidati ai fiori stessi. Dal punto di vista chimico è noto come i colori rosso, blu e violetto dei flavonoidi sono strettamente legati al numero di sostituenti chimici: un aumento di gruppi idrossilici porta a riflettere lunghezze d'onda maggiori, verso il rosso; l'aumento di gruppi metossilici sposta invece il colore verso il blu. Un altro fattore che ha un ruolo importante sull'influenza del colore è dato dal pH vacuolare, che varia la ionizzazione dei residui. Insetti come le api sono in grado di percepire le lunghezze d'onda assorbite dai flavoni e dai flavonoli e possono vedere i modelli simmetrici di strisce, macchie e cerchi concentrici che tali composti formano nei fiori e che vengono denominati "guide del nettare". Questi modelli sono immediatamente percepibili agli insetti e servono per indicare la posizione del polline e del nettare.

Oltre ad attrarre gli insetti impollinatori, in alcuni casi i flavonoidi sembrano essenziali anche per garantire l'integrità del polline: il silenziamento della flavonolo sintasi in tabacco causa la riduzione del contenuto di flavonoli e antocianidine con la conseguente produzione di frutti senza semi. Inoltre il polline di queste piante è incapace di produrre tubi pollinici funzionali; questa capacità può essere ripristinata somministrando quercetina esogena (*in vivo* e *in vitro*). Questo esperimento dimostra che i flavonoidi, e in particolare la quercetina, giocano un ruolo essenziale nella germinazione del polline e di conseguenza nella fertilità della pianta (Mahajan *et al.*, 2011). Queste piante potrebbero avere in futuro anche un ruolo commerciale in quanto il silenziamento della flavonolo sintasi potrebbe rappresentare una nuova strategia per ottenere frutti senza semi, dove però la fertilità può essere ristabilita chimicamente.

Un altro ruolo cruciale che i flavonoidi svolgono nelle piante superiori è quello di proteggerle dall'attacco di patogeni ed erbivori: in accordo con la teoria della coevoluzione, questi composti fungono da importanti mediatori nell'interazione pianta-patogeno. Alcuni isoflavoni prodotti dai legumi, come il rotenone, hanno proprietà insetticide e pesticide, altri come quelli presenti nel trifoglio inducono infertilità nelle pecore che se ne cibano, impedendone la riproduzione. Nell'ultimo decennio gli isoflavoni sono venuti alla ribalta per il loro ruolo di fitoalessine, composti ad attività antimicrobica che si accumulano in caso di infezione batterica o fungina e limitano la diffusione del patogeno. Un altro gruppo di composti che intervengono nella difesa della pianta è dato dai tannini, tossine che riducono in maniera significativa la crescita e la sopravvivenza degli erbivori che se ne cibano. I tannini possono essere "condensati" se si formano per condensazione di unità di flavonoidi, oppure si presentano sottoforma di polimeri eterogenei contenenti acidi fenolici e zuccheri e vengono in tal caso classificati come "idrolizzabili". I tannini condensati sono costituenti frequenti delle piante legnose e possono essere idrolizzati a antocianidine se trattati con acidi forti (vengono anche definiti per questo motivo pro-antocianidine). Questa classe di composti agisce da repellente per l'alimentazione di molti animali, tra i quali i mammiferi: un esempio è dato dall'elevato contenuto di queste molecole nei frutti ancora non maturi che ne scoraggia l'utilizzo fino a quando i semi sono pronti per essere dispersi. I tannini sembrano infine potersi legare covalentemente alle proteine presenti nella dieta formando complessi difficili da digerire; alcuni erbivori, come roditori e conigli, producono proteine salivari con un elevato contenuto di prolina che presentano una conformazione aperta e molto flessibile che ne facilita il legame con tali composti, sequestrandoli. Per ultimo queste molecole servono anche come difesa contro i microrganismi (Buzzini *et al.*, 2008): la parte interna di molti alberi ne è

ricca in modo da contrastare la penetrazione di funghi e batteri e salvaguardarne l'integrità. Un'altra molecola che ha dimostrato la sua attività nei confronti dei patogeni è la quercetina (e il suo glicoside rutina), che è in grado di aumentare la mortalità delle larve di *Spodoptera liture*, un insetto che attacca il tabacco (Mallikarjuna *et al.*, 2004).

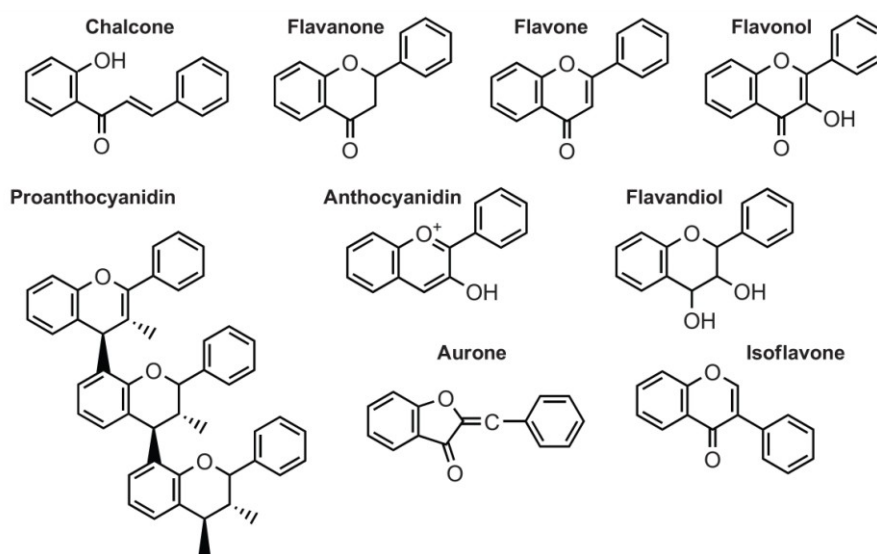
I flavonoidi sono coinvolti infine anche nel processo di nodulazione durante l'interazione legumi-rizobi: piante transgeniche di *Medicago truncatula* ottenute con la tecnologia del RNA antisense che sono incapaci di sintetizzare questi composti nelle radici non riescono ad inizializzare il processo di nodulazione (Wasson *et al.*, 2006). La somministrazione esogena di neringerina e liquiritigenina ripristina la formazione dei noduli; inoltre la carenza di queste molecole porta a un incremento locale del trasporto di auxina verso il nodulo che in condizioni normali dovrebbe essere invece bloccato. Mediante il silenziamento differenziale dei geni che codificano per isoflavone sintasi, calcone reduttasi, flavone sintasi e calcone sintasi in *M. truncatula* si è dimostrato come siano i flavoni e i flavonoli ad avere un ruolo importante durante l'interazione tra la pianta e il batterio *Sinorhizobium meliloti*: i primi sono in grado di indurre i geni *nod* e i secondi fungono da modulatori del trasporto di auxina (Zhang *et al.*, 2009).

Dal punto di vista dell'alimentazione umana, i flavonoidi presentano attività benefiche e farmacologiche che li rendono interessanti anche nell'ambito dei cibi funzionali. Come verrà approfondito nei capitoli successivi, tali composti rappresentano infatti nell'uomo elementi modulatori di risposte immunitarie e infiammatorie, hanno proprietà anticancerogene, antivirali, antitossiche e gastroprotettive. Molte di tali funzioni derivano dall'attività antiossidante che esercitano e rappresentano quindi una possibilità di prevenire le malattie associate a un danno ossidativo (Tanwar e Modgil, 2012), ma altre sembrano conseguenza di interazioni specifiche con bersagli molecolari.

1.2.1.2. La biosintesi dei flavonoidi

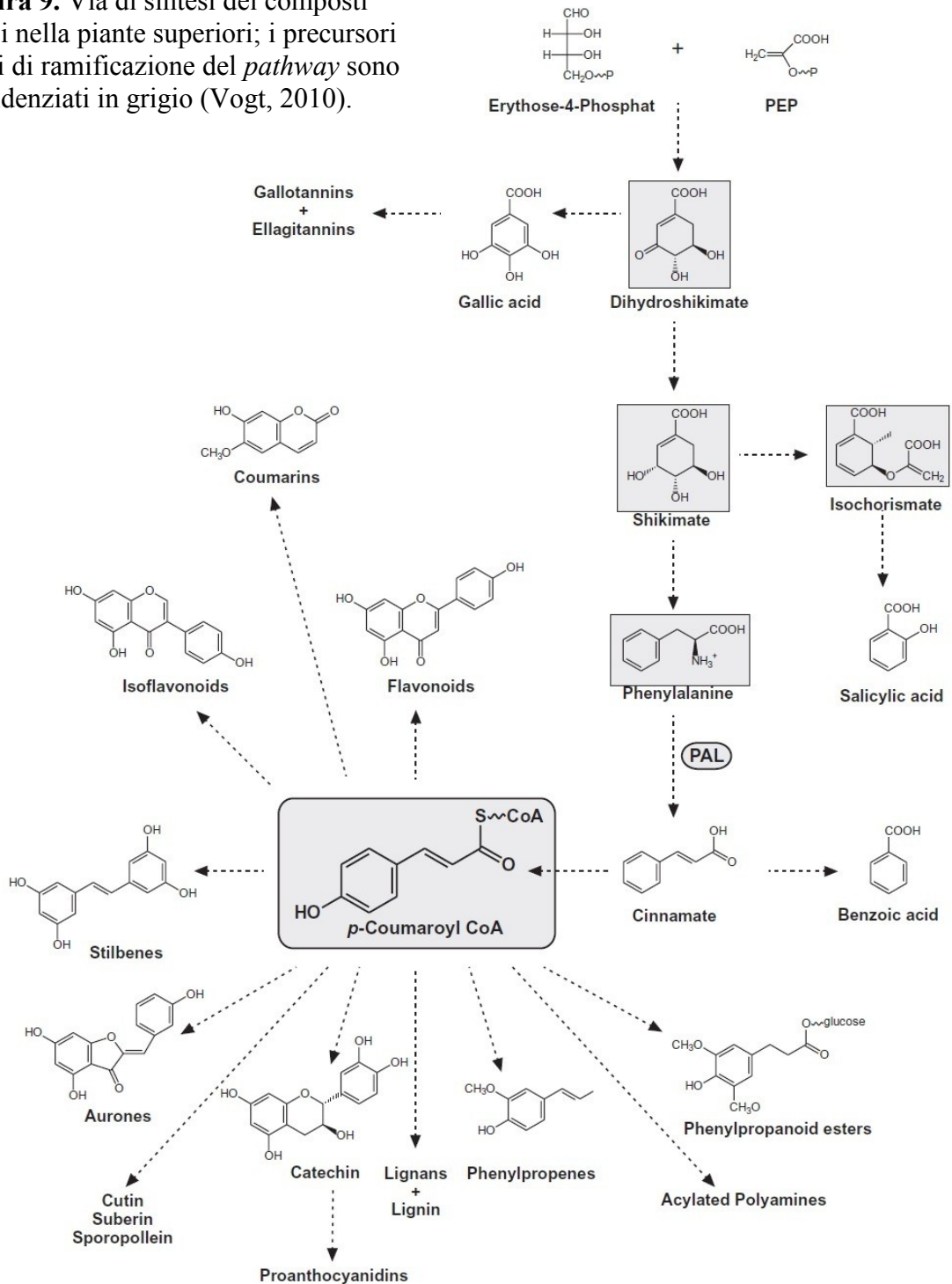
I flavonoidi sono una classe di composti fenolici che consta più di 6000 pigmenti che colorano fiori, frutti e semi. Possiamo classificare queste molecole in 6 sottogruppi: calconi, flavoni, flavonoli, flavandioli, antocianine e protoantocianidine (o tannini condensati) (Figura 8); un settimo gruppo, quello degli auroni, è stato scoperto solo in alcune specie (Winkel-Shirley, 2001). I legumi e un ristretto gruppo di altre piante sono capaci di sintetizzare particolari flavonoidi come gli isoflavonoidi e i flobafeni (Wang *et al.*, 2011).

Figura 8.
Schematizzazione delle sei principali classi di flavonoidi presenti nelle piante (Falcone Ferreyra *et al.*, 2012).



Queste molecole vengono sintetizzate attraverso due vie biosintetiche, la via dell'acido scichimico e la via dell'acido malonico (Figura 9). La via dell'acido scichimico converte carboidrati provenienti dalla glicolisi e dalla via ossidativa dei pentosi fosfati nei tre amminoacidi aromatici fenilalanina, tirosina e triptofano (Hermann e Weaver, 1999). Questa via metabolica è presente in piante, funghi e batteri, ma non è presente negli animali: i tre amminoacidi aromatici sono quindi essenziali per la dieta dell'uomo. La maggior parte dei composti contenenti il gruppo fenolico sono sintetizzati a partire dalla fenilalanina, che viene trasformata in acido cinnamico attraverso l'eliminazione di una molecola di ammoniaca da parte dell'enzima fenilalanina ammoniaca liasi (PAL).

Figura 9. Via di sintesi dei composti fenolici nella piante superiori; i precursori ai punti di ramificazione del *pathway* sono evidenziati in grigio (Vogt, 2010).



I substrati di partenza della via dello scichimato sono l'eritrosio-4-fosfato (E4P) derivante dalla via dei pentosi fosfati e l'acido fosfo-*enol*-piruvico (PEP) proveniente dalla glicolisi, che vengono utilizzati dalla 3-deossi-D-arabino-eptuloso-7-fosfato (DAHP) sintasi. Il DAHP così prodotto viene utilizzato in sequenza dalla 3-deidrochinato sintasi, dalla 3-deidrochinato deidratasi e dalla scichimato deidrogenasi a formare il composto che dà il nome all'intera via, l'acido scichimico. Quest'ultimo viene trasformato dalla scichimato chinasi in scichimato-3-fosfato, il substrato della 5-*enol*-piruvil-scichimato-3-fosfato (EPSP) sintasi. Gli ultimi passaggi della via, che è localizzata funzionalmente nel plastidio, si concludono con la sintesi di corismato da parte della corismato sintasi (CS). Dall'acido corismico la via si dirama, portando alla sintesi dei tre amminoacidi aromatici (Figura 10; Sato *et al.*, 2006).

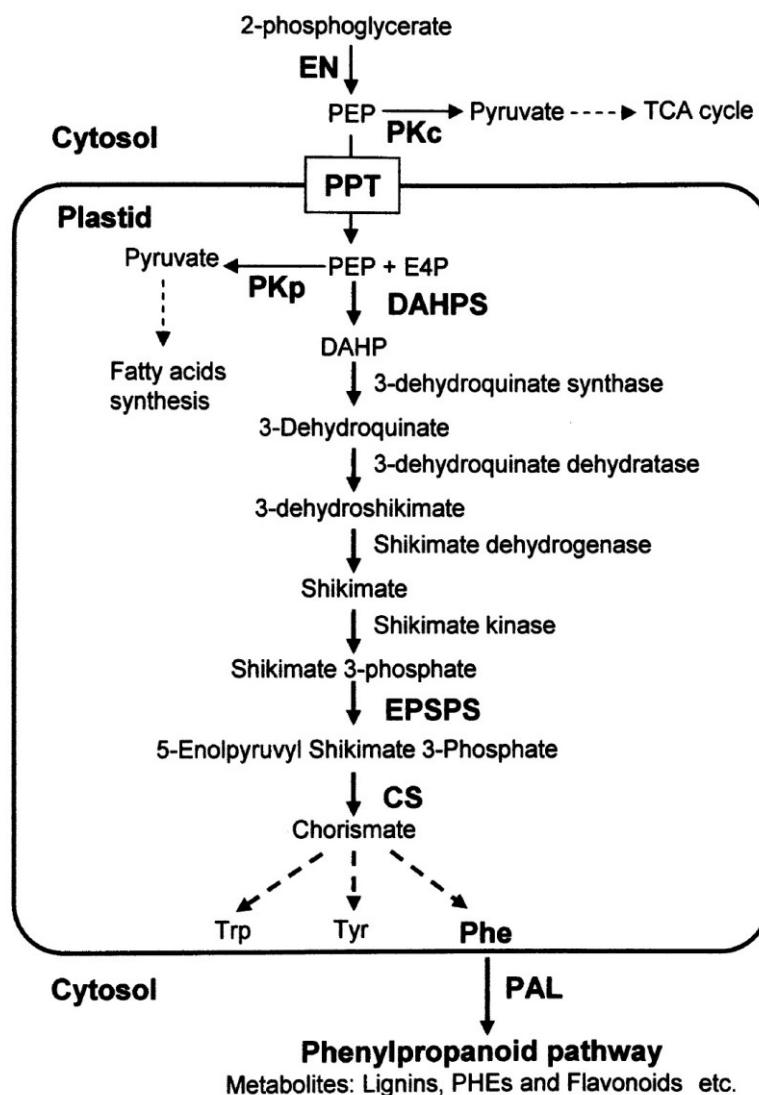


Figura 10. Via dello scichimico nei vegetali superiori (Sato *et al.*, 2006).

A questo punto la fenilalanina si sposta nel citosol dove viene convertita dalla PAL in acido cinnamico che a sua volta viene utilizzato dalla cinnamato-4-idrossilasi (C4H) per dare acido 4-cumarico. Meno studiata, e sicuramente con un ruolo più marginale nella via biosintetica, è la reazione parallela della tirosina ammoniacasi (TAL) capace produrre direttamente acido cumarico; questo enzima gioca un ruolo importante nella risposta allo stress biotico in colture cellulari di manioca (Dogbo *et al.*, 2012). Uno studio eseguito sulla TAL batterica ha evidenziato l'elevata specificità di substrato dell'enzima per la tirosina;

sostituendo però l'istidina 86 presente nel sito attivo con una fenilalanina (presente invece nel sito catalitico della PAL), questa specificità passa a favore della fenilalanina. Lo stesso vale anche nel caso contrario, e rappresenta uno dei rari esempi dove la sostituzione di un singolo amminoacido implica una variazione sostanziale nella preferenza di substrato (Watts *et al.*, 2006). Successivamente l'acido cumarico viene addizionato di una molecola di Coenzima A (CoA) attraverso l'azione di una CoA ligasi ottenendo il 4-cumaroil-CoA (o 4-idrossicinnamoil-CoA) che rappresenta il punto di snodo nella via dei fenilpropanoidi (Figura 9). Dalla condensazione di tale substrato con 3 unità di malonil CoA ad opera della calcione sintasi (CHS) si sintetizza il narigenin calcione (o 4,2',4',6'-tetraidrossicalcone) (Figura 11).

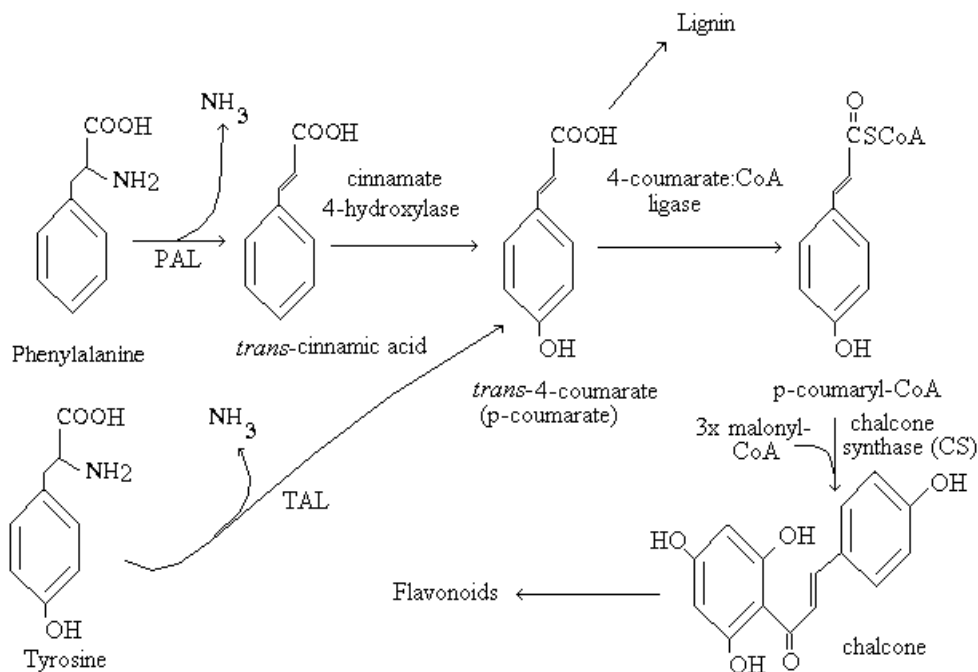


Figura11. Successione dei passaggi che portano alla formazione di calcione a partire dagli amminoacidi aromatici fenilalanina e tirosina (sito web della Purdue University).

La CHS catalizza la prima reazione selettiva per la biosintesi dei flavonoidi; la seconda è catalizzata dalla calcione isomerasi (CHI) che produce naringenina, un 2S-flavanone, chiudendo l'anello del tetraidrossicalcone. Il nucleo flavanico comune a tutti i flavonoidi è composto da 15 atomi di carbonio ed è chiamato benzo- γ -pirano, un aglicone con due anelli aromatici e un ponte a 3 atomi di carbonio. L'anello A dei flavonoidi deriva dalla via dell'acido malonico (acetato); l'anello B è invece un'unità fenilpropanica sintetizzata a partire dalla fenilalanina e derivante quindi dalla via dell'acido scichimico: si ha quindi una via biosintetica mista (Figura 12).

I 2S-flavanoni rappresentano uno dei punti cruciali nella ramificazione del metabolismo dei flavonoidi dal momento che l'isomerizzazione origina gli isoflavonoidi (fitoalessine); l'azione della flavone sintasi (FNS) sull'anello B genera i flavoni, mentre l'ossidrilazione dello stesso anello in posizione 3' da parte della flavonoide-3'-idrossilasi (F3'H) e quella simultanea in posizione 3' e 5' a opera della flavonoide-3'5'-idrossilasi (F3'5'H) generano rispettivamente i flavanoni eriodictolo e pentaidrossiflavanone. Dai flavanoni mediante l'azione della flavonolo sintasi (FLS) si producono i flavonoli caempferolo, quercetina e miricetina, mentre l'idrossilazione dell'anello C in posizione 3 ad opera della flavonoide-3-idrossilasi (F3H) sintetizza i diidroflavonoli (diidroquercetina, diidrocaempferolo e diidromiricetina). Da quest'ultimi attraverso una riduzione effettuata dalla diidroflavonolo-4 reduttasi (DFR) e all'azione della antocianidina sintasi (ANS) si formano le antocianidine: cianidina, pelargonidina e delphinidina (Figura 13).

Figura 12. L'origine biosintetica mista del benzo- γ -pirano (Taiz e Zeiger, 2010).

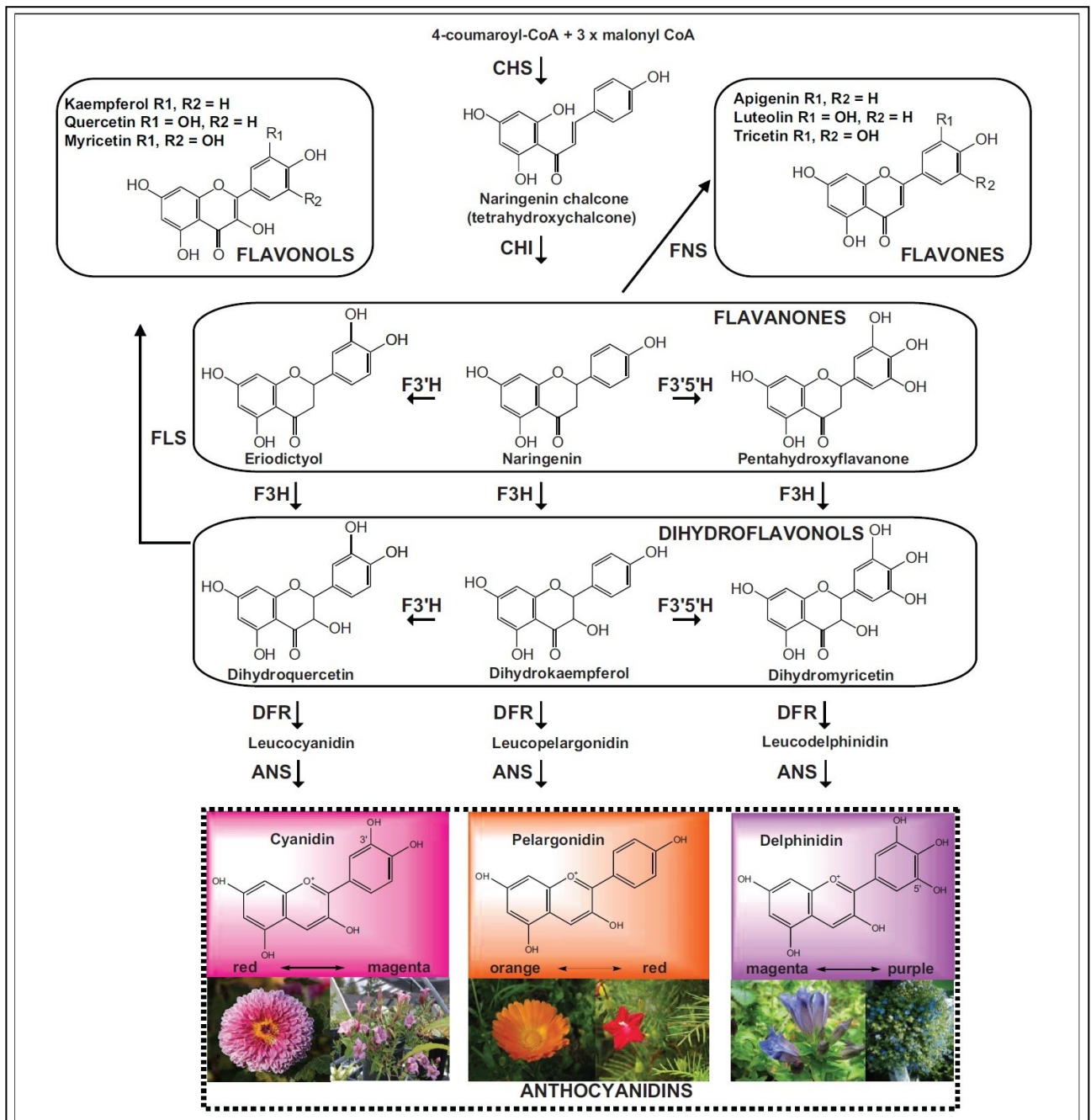
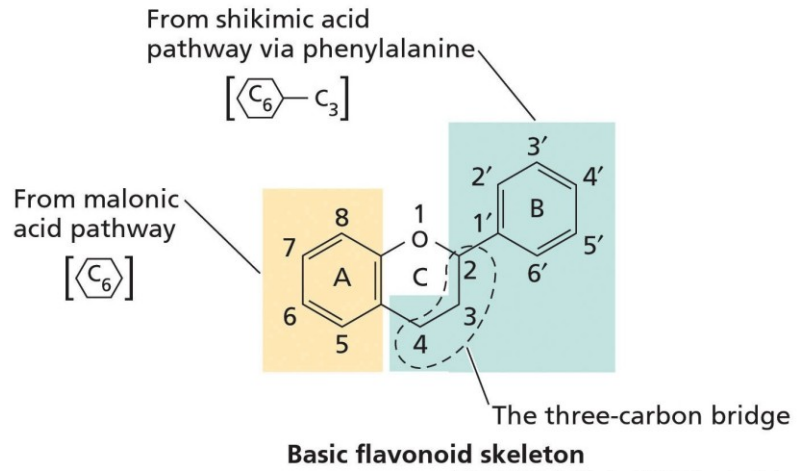


Figura 13. Via di sintesi dei principali flavonoidi a partire dal naringenin calcone (Ferreya Falcone *et al.*, 2012).

Negli ultimi anni stanno emergendo sempre più evidenze che suggeriscono che gli enzimi coinvolti nel pathway dei flavonoidi siano uniti tra di loro a formare un complesso sovramolecolare associato alla endomembrana del reticolo endoplasmatico (ER). Il primo dato è stato fornito dal *substrate channeling* tra PAL, che è un enzima citosolico che non contiene alcun sito di ancoraggio alla membrana del ER, e il C4H, enzima monossigenasico citocromo P450-dipendente, che è localizzato invece nella endomembrana. In un esperimento effettuato su piante di tabacco sono state identificate due isoforme dell'enzima: la PAL2 è risultata prettamente citoplasmatica mentre una rilevante frazione della PAL1 è risultata essere microsomiale. Questo dato è stato confermato utilizzando piante transgeniche mediante fusione con la *green fluorescent protein* (GFP) evidenziando come sia la C4H a legare la PAL2, andando così a formare un complesso multienzimatico che permette la canalizzazione del substrato (Achine *et al.*, 2004). Più a monte della via biosintetica è stata dimostrata l'interazione tra CHS, CHI e CFR di *A. thaliana* utilizzando un sistema ibrido di espressione in lievito. In questo caso l'interazione sembra direzionale in quanto CHI interagisce con CHS, CHS con DFR e DFR con CHI, anche il complesso in questione è di tipo globulare e non lineare (Burbulis e Winkel-Shirley, 1999). Non tutta la frazione di CHS e CHI è però unita a formare un complesso multienzimatico; questo lascia pensare a una dinamicità del sistema, che può variare in risposta a diversi tipi di stimoli. Esperimenti effettuati in riso, sempre utilizzando il saggio del doppio ibrido, hanno evidenziato come ci sia interazione tra l'omodimero di CHI e le proteine F3H, F3'H, DFR e ANS. In questo caso sembra che la CHI funga da molecola base per la formazione del complesso a cui tutti gli enzimi sopracitati si legano in maniera stereospecifica. Il complesso è a sua volta ancorato all'endomembrana del ER mediante il legame con la proteina P450-dipendente F3'H; in questo complesso non sembra essere presente la CHS (Shih *et al.*, 2008).

Anche se il complesso multienzimatico che porta alla sintesi dei flavonoidi sembra legato al ER, la maggior parte di questi composti viene accumulata nei vacuoli o nella parete cellulare. Due sono i modelli di trasporto a oggi ipotizzati: il primo è basato sulla *carrier protein* ligandina, il secondo utilizza il trasporto vescicolare attraverso la formazione di antocianoplasti, che vengono inglobati dal vacuolo attraverso un meccanismo autofagico (Pourcel *et al.*, 2010).

1.2.2. Carotenoidi

I carotenoidi e i prodotti del loro catabolismo, gli apocarotenoidi, formano un gruppo di più di 700 pigmenti liposolubili. Oltre che nei vegetali queste molecole sono state identificate anche in batteri non fotosinteticamente attivi, lieviti e muffe. Nelle piante i carotenoidi sono fondamentali per il processo fotosintetico; negli animali, che sono incapaci di procedere alla loro sintesi e devono quindi assumerli attraverso la dieta, giocano un ruolo soprattutto come antiossidanti: un esempio ne è la luteina, che è stata riconosciuta come molecola bioattiva anche dal punto di vista farmacologico. Alcuni prodotti di degradazione dei carotenoidi costituiscono fragranze utilizzate dall'industria dei profumi: molti apocarotenoidi sono responsabili della profumazione dei fiori, del tè e di molti frutti.

1.2.2.1. Il ruolo fisiologico dei carotenoidi nella pianta

Nel regno vegetale i carotenoidi sono coinvolti in diverse funzioni biologiche (Figura 14). Nella fotosintesi sono fondamentali sia perchè catturano la luce e sono in grado di convogliarla verso i centri di reazione, sia perchè sono in grado di proteggere questi ultimi dissipando l'eventuale eccesso di energia. I carotenoidi infatti sono presenti nei complessi antenna in qualità di pigmenti accessori, assicurando l'assorbimento della luce in ambiti spettrali già coperti dalle clorofille. Nonostante tale funzione accessoria, questa classe di

composti risulta essenziale per garantire la protezione dell'apparato fotosintetico dai danni derivanti dall'eccesso di irradiazione. Le clorofille, che possiedono due picchi di assorbimento, corrispondenti ai due stati eccitati del rosso e del blu, non sono infatti in grado di dissipare energia quando la luce in arrivo al complesso antenna II (LHCII) eccede la sua capacità di raccolta. In questo caso il surplus energetico può comportare la permanenza della clorofilla nello stato eccitato, con la possibilità che si formi un tripletto (^3chl) con inversione dello spin, cedendo infine l'energia all'ossigeno molecolare e portando alla formazione dell'ossigeno singoletto ($^1\text{O}_2$). Questa molecola, molto reattiva, è in grado di recare danno alle molecole presenti nella cellula, tra le quali acidi nucleici, proteine, cofattori enzimatici, e di compromettere l'integrità delle membrane biologiche attraverso la perossidazione lipidica. Per evitare che tali ROS possano formarsi e recare danno intervengono i carotenoidi che, non possedendo stati intermedi di eccitazione, possono assorbire la luce in arrivo, eccitarsi, e ricadere poi allo stato normale dissipando l'energia come calore. Alcuni di essi sono inoltre in grado di de-eccitare sia ^3chl che $^1\text{O}_2$, trasformandosi a loro volta nello stato di carotenoide tripletto, che può dissipare l'energia sotto forma di calore riportando il sistema allo stato iniziale: tale fenomeno viene definito *non-photochemical quenching* (NPQ), (Frank e Codgell, 1996). A questo fine viene attuata con un andamento circadiano l'interconversione tra violaxantina e zeaxantina, che prende il nome di "ciclo delle xantofille".

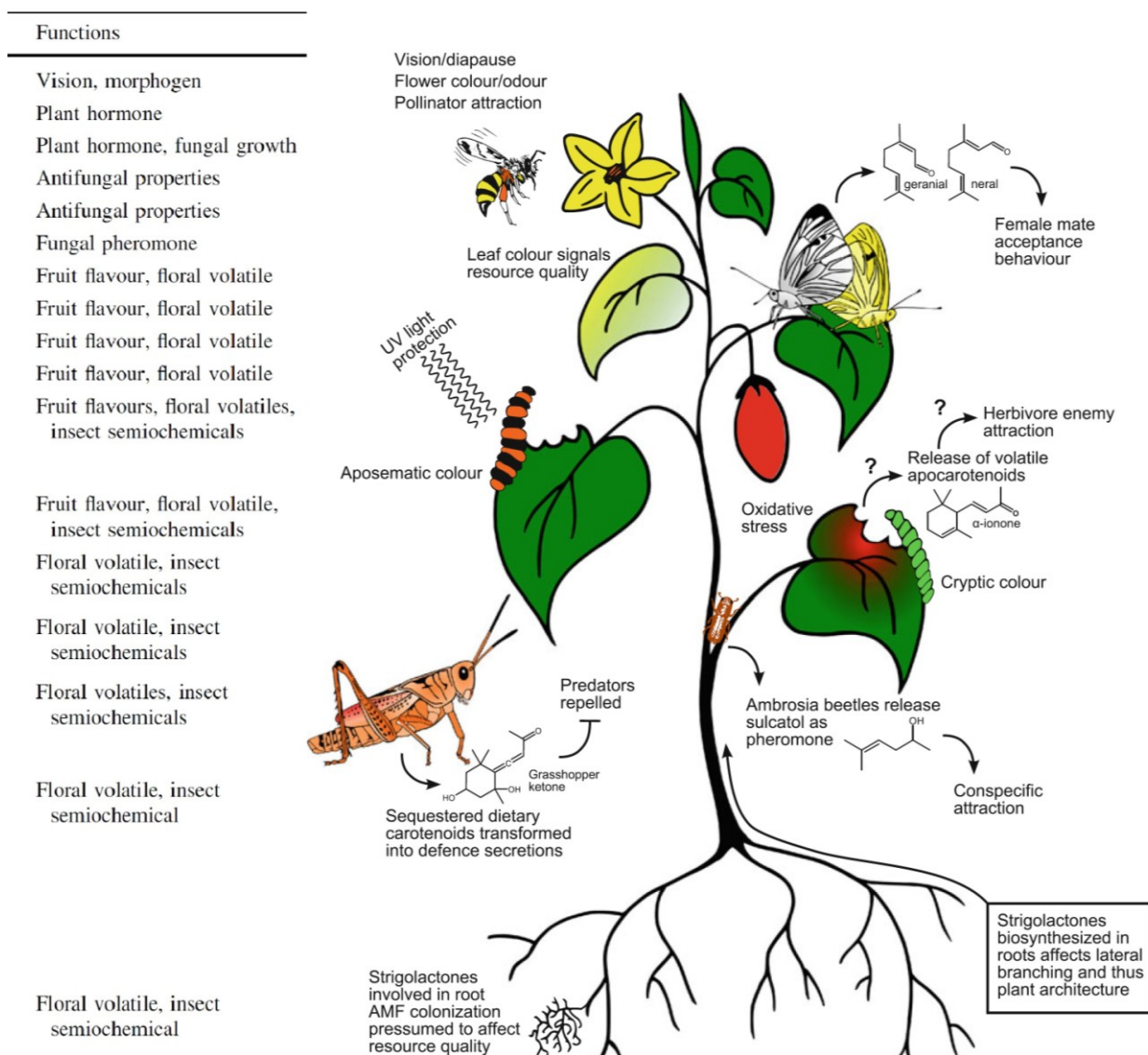


Figura 14. Funzioni dei carotenoidi e dei loro derivati nella pianta (Heath *et al.*, 2012).

Altre funzioni dei carotenoidi sono di tipo ecologico, fornendo ai fiori e ai frutti colori e profumi specifici che giocano un ruolo nell'attrarre insetti e altri animali, promuovendo così l'impollinazione e la dispersione dei semi. A fianco di questo ruolo "attrattivo" essi possono agire anche in maniera diametralmente opposta, ovvero fungendo da repellenti per patogeni e fitofagi, contribuendo in tale maniera a salvaguardare l'integrità della pianta. Infine i carotenoidi sono i precursori dall'ABA (Schwartz *et al.*, 1997) e di sostanze ad attività ormonale che agiscono da molecole-segnaie; gli apocarotenodi conferiscono sapori e aromi ai frutti e sono coinvolti nelle risposte di difesa a condizioni di stress biotico.

1.2.2.2 L'importanza dei carotenoidi nella nutrizione umana

I mammiferi non sono in grado di sintetizzare i carotenoidi, e dei 40 tetraterpeni che essi assumono solitamente attraverso la dieta circa il 50% non viene assimilato a causa di un assorbimento selettivo nel tubo digerente. Il ruolo nutrizionale di alcuni composti è di fondamentale importanza in quanto α - e β -carotene sono i precursori della vitamina A: la deficienza da vitamina A (VAD) ostacola il corretto funzionamento del sistema immunitario aumentando il tasso di mortalità dovuto a malattie infettive, impedisce la normale rigenerazione delle mucose, rallenta la crescita e può portare alla cecità (Wang *et al.*, 2004). Questo tipo di carenza alimentare si osserva oggi soprattutto nei paesi in via di sviluppo, ma si può incontrare anche nelle aree più povere dei paesi avanzati, e colpisce in maniera maggiore bambini, anziani, alcolisti e fumatori. La dose raccomandata (RDA) giornaliera per questo tipo di vitamina è di 600-1000 retinolo equivalenti (1 RE = 1 μ g di retinolo), tenendo conto che il fattore di conversione del β -carotene a vitamina A può variare da 3:1 a 12:1 (Wang *et al.*, 2004). Negli ultimi anni è stato dimostrato che una dieta supplementata con β -carotene porta benefici alle popolazioni che soffrono di VAD; in uno studio condotto in Nepal la somministrazione di 1 mg al giorno di vitamina A o di 6 mg di β -carotene si è avuta una riduzione del tasso di mortalità delle donne in gravidanza di quasi il 50% (West *et al.*, 1999). Oltre al β -carotene, l' α -carotene e la β -criptoxantina, che sono i soli ad avere attività pro vitamina A, gli altri carotenoidi maggiormente studiati per i benefici effetti apportati alla salute umana sono il licopene, la luteina e la zeaxantina.

Per il β -carotene le principali fonti di apporto sono i vegetali a foglia verde come gli spinaci, le arance, le verdure e i frutti gialli tra i quali carota, broccolo, zucca, melone e mango (Figura 15). Esperimenti effettuati su colture cellulari hanno dimostrato che questo composto è in grado di inibire la progressione di alcuni tipi di tumori; altri studi epidemiologici hanno evidenziato una correlazione tra il β -carotene e la diminuzione del rischio di insorgenza di cancro, soprattutto quello polmonare (Braun e Cohen, 2010). Un'altra indagine effettuata nei primi anni novanta in Cina ha sottolineato come una dieta supplementata con β -carotene, vitamina E e selenio è in grado di ridurre il rischio di contrarre tumori, specialmente quello allo stomaco, in popolazioni soggette a carenze nutrizionali (Blot *et al.*, 1993). Per quanto riguarda le malattie cardiovascolari è stato osservato che una dieta ricca di questo carotenoide, insieme ad altri importanti nutrienti, ha un effetto cardioprotettivo, ma quando si somministra solo β -carotene con una supplementazione sintetica in forma isolata questi effetti benefici spariscono. Se somministrato insieme ad altri antiossidanti è in grado anche di agire contro l'eritema, proteggendo la pelle dal danno ossidativo prodotto dall'esposizione alla luce ultravioletta.

Il licopene è un pigmento rosso intenso, e nella dieta è presente prevalentemente nel pomodoro e nei suoi derivati. Altre fonti di questo composto sono le albicocche, il pompelmo rosa, l'anguria e la papaia. La sua biodisponibilità dipende dalla cottura e dalla presenza di altri composti nella matrice, come grassi e altri carotenoidi. La dose raccomandata di questo componente può arrivare fino a 60 mg al giorno in condizioni specifiche, come ad esempio l'ipercolesterolemia (Braun e Choen, 2010). Il licopene è il più efficiente *quencher* nei

confronti dell'ossigeno singoletto ed è in grado di proteggere le cellule dai danni che questa ROS può indurre in grassi, proteine, lipoproteine e acidi nucleici. Si hanno evidenze degli effetti benefici che questa molecola ha nei confronti della prevenzione di molteplici tipi di tumori, come quello alla prostata: uno studio effettuato ad Harvard ha dimostrato che il rischio di insorgenza di questo tipo di cancro si riduce del 34% in quelle persone che si nutrono con almeno dieci porzioni di pomodoro alla settimana. Altri tipi di tumore in cui è stato dimostrato un effetto preventivo del licopene sono quello polmonare, cervicale, al seno e all'ovario (Rao e Rao, 2007). Numerosi studi sono presenti in letteratura anche riguardo al ruolo del licopene nella prevenzione delle malattie cardiovascolari, esso agisce sia come antiossidante, sia abbassando le "low density lipoprotein" del colesterolo: una dieta ricca di questo composto bioattivo riduce il rischio di arteriosclerosi e infarto (Rao e Rao, 2007).

La luteina e la zeaxantina sono pigmenti gialli che si trovano in alcuni vegetali a foglia verde, come spinacio e cavolo, e in mais e grano. La zeaxantina è presente in quantità cospicue anche in peperone giallo, arancia, mandarino e nel cacao. La biodisponibilità di questi composti è determinata dalla quantità di grassi presenti nella dieta, che sono richiesti sia per l'assorbimento che per il trasporto. Le RDA giornaliere sono rispettivamente di 6-20 mg per la luteina e 2-5 mg per la zeaxantina. Una dieta ricca in luteina è associata alla riduzione del rischio di alcuni tipo di tumori come quello all'endometrio, all'ovaio e al seno (Braun e Cohen, 2007). Una dieta ricca di questi due composti riduce anche il rischio di avere disturbi coronarici. Luteina e zeaxantina sono però soprattutto associati alla qualità della vista, dato che sono coinvolti nella riduzione del rischi di formazione della cataratta, della degenerazione maculare legata all'età e di alcuni disturbi ereditari della retina. Questi carotenoidi agiscono assorbendo l'energia in eccesso ad alta energia, salvaguardando così l'integrità della retina. Sempre per questa capacità di limitare il danno ossidativo causato dalla luce ultravioletta, la luteina protegge la pelle nei confronti dei raggi solari, riducendo la perossidazione lipidica e l'insorgenza di tumori.

Beta-carotene		Lycopene		Lutein and zeaxanthin	
Food Content (mg/100 g wet wt)		Food Content (mg/100 g wet wt)		Food Content (mg/100 g wet wt)	
Carrots, raw	18.3	Tomato paste	29.3	Kale, cooked	15.8
Mangos, canned	13.1	Ketchup	17.0	Spinach, raw	11.9
Sweet potato, cooked	9.5	Tomato puree	16.7	Spinach, cooked	7.0
Carrots, cooked	8.0	Pasta sauce	16.0	Lettuce, romaine, raw	2.6
Pumpkin, canned	6.9	Tomato sauce	15.9	Broccoli, raw	2.4
Kale, cooked	6.2	Tomato soup	10.9	Broccoli, cooked	2.2
Spinach, raw	5.6	Tomato, can, whole	9.7	Summer squash, zucchini	2.1
Spinach, cooked	5.2	Tomato juice	9.3	Corn, sweet, cooked	1.8
Winter butternut squash	4.6	Watermelon, raw	4.9	Peas, green, canned	1.4
Swiss chard, raw	3.9	Tomato, cooked	4.4	Brussels sprouts, cooked	1.3
Apricots, raw	2.6	Tomato, raw	3.0	Corn, sweet, canned	0.9
Pepper, red, raw	2.4	Others:		Beans, green, cooked/can	0.7
Pepper, red, cooked	2.2	pink grapefruit, apricots,		Beans, green, raw	0.6
Cantaloupe, raw	1.6	watermelon, guava,		Okra, cooked	0.4
Lettuce, romaine, raw	1.3	rosehip and papaya		Cabbage, white, raw	0.3
Tomato paste	1.2			Egg yolk, medium	0.3

Figura 15. Le principali fonti vegetali di carotenoidi nell'alimentazione umana (Brill, 2009).

La sinergia tra questi composti è fondamentale nel corso sia dell'assorbimento, del metabolismo che del trasporto. Come accennato, è stato dimostrato che se somministrato

isolatamente il β -carotene non è in grado di determinare alcun effetto positivo nei confronti delle malattie cardiovascolari, effetto benefico che si verifica solo quando si trova in presenza di altri carotenoidi. Anche la presenza di altri fitonutrienti, come ad esempio gli oli che sono in grado di aumentarne l'assorbimento a livello intestinale, risulta essenziale. Diviene quindi di fondamentale importanza nutrirsi con cibi funzionali contenenti fonti multiple di carotenoidi, avvalendosi di un'alimentazione varia che può fornire al nostro organismo tutti i molteplici fattori che regolano il loro assorbimento e metabolismo: una dieta effettuata con supplementazioni sintetiche può rilevarsi invece inefficiente e dannosa.

1.2.2.3. La biosintesi dei carotenoidi

I carotenoidi appartengono al gruppo dei terpeni, che comprende innumerevoli classi di metaboliti, sia primari che secondari. I primari comprendono carotenoidi, gibberelline e fitosteroli che sono necessari per diverse funzioni cellulari, tra cui crescita e mantenimento; i secondari svolgono ruoli per lo più riconducibili alle interazioni della pianta con l'ambiente (Croteau *et al.*, 2000).

Tutti gli enzimi coinvolti nella via biosintetica dei carotenoidi sono stati identificati e ne è stata caratterizzata l'attività (Howitt e Pogson, 2006). Nonostante la diversità strutturale e funzionale, tutti gli isoprenoidi hanno origine da un comune precursore a 5 atomi di carbonio, l'isopentenil-5-pirofosfato (IPP), enzimaticamente interconvertibile nel suo isomero dimetil-allil-pirofosfato (DMAPP). La sintesi dell'unità isoprenica può avvenire attraverso due diverse vie (Figura 16): il pathway dell'acido mevalonico (MVA), caratterizzato per primo e che avviene nel citosol, e la via mevalonato-indipendente, detta anche del metileritritolo-4 fosfato (MEP), individuata più recentemente e che ha sede nel plastidio.

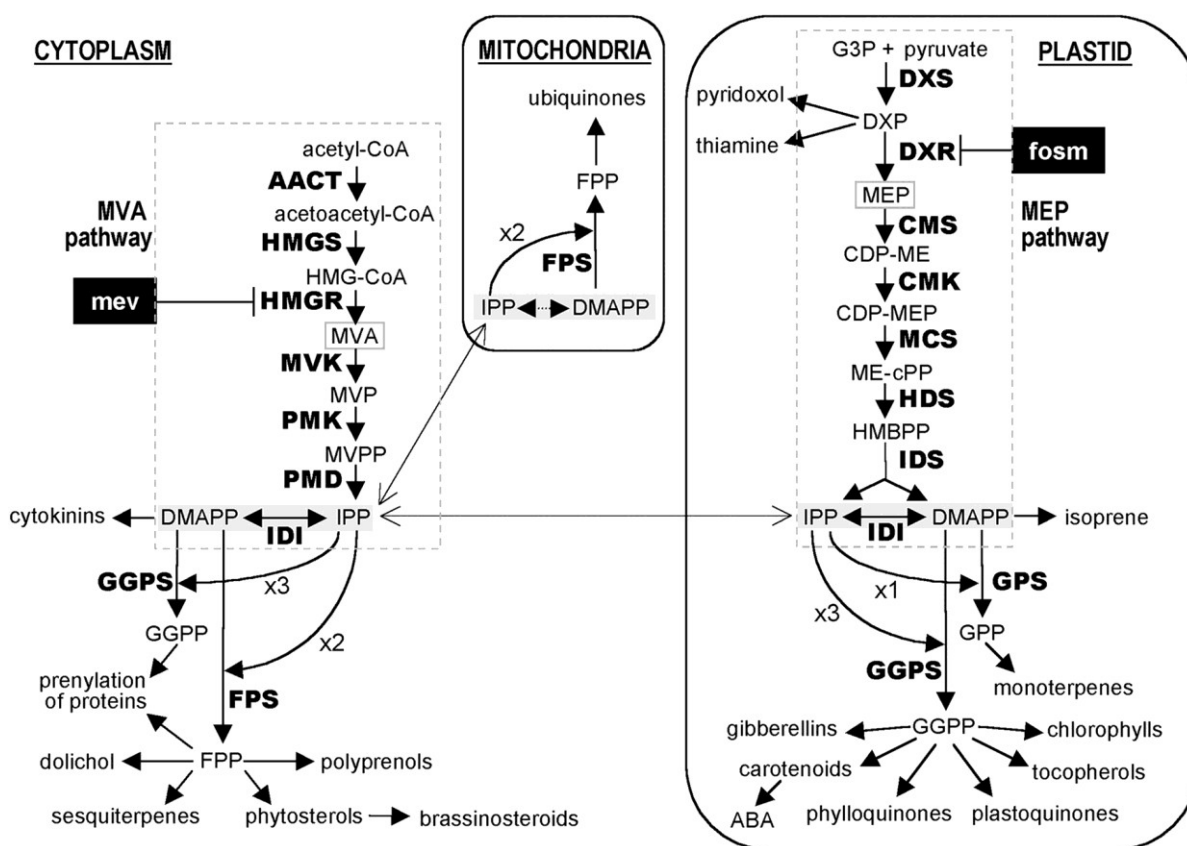
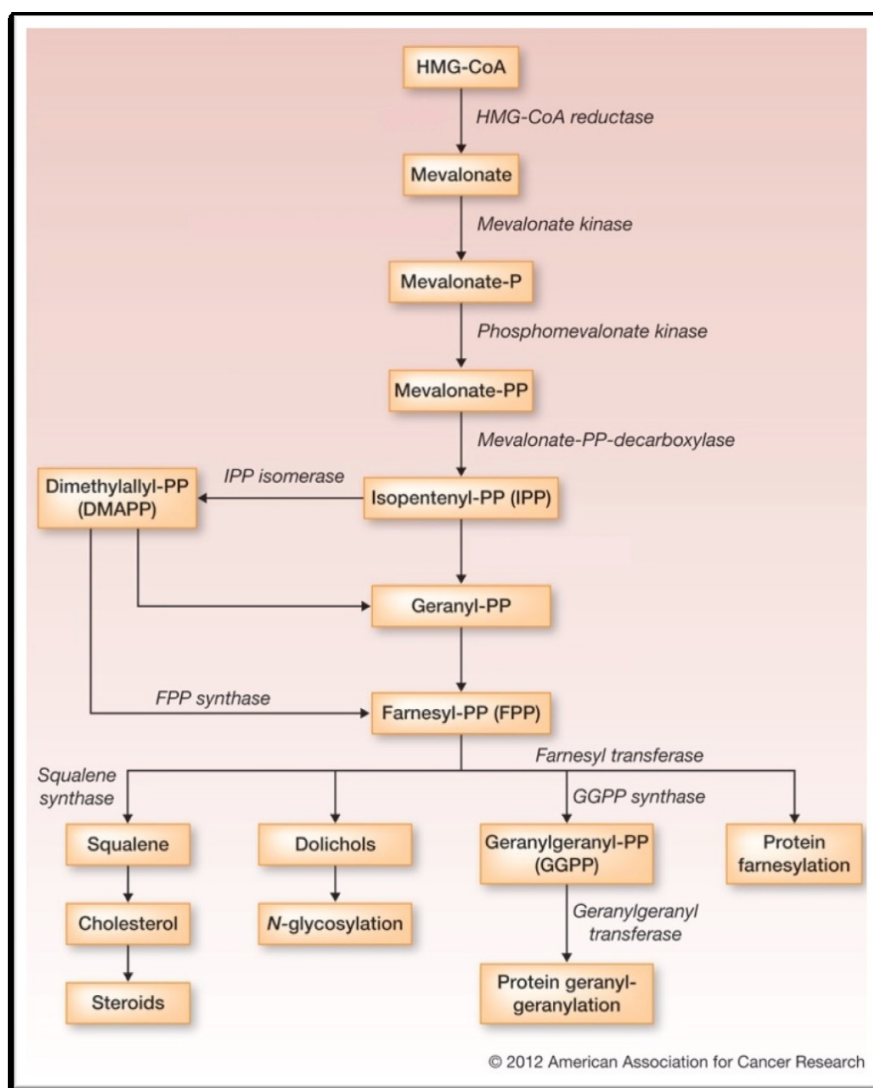


Figura 16. Biosintesi dell'isopentenil pirofosfato: a sinistra la via citosolica del MVA, a destra la via plastidiale del MEP (Rodriguez-Concepción e Boronat, 2002).

Nelle piante superiori sono attive entrambe le vie: nel *pathway* del mevalonato il precursore dell'IPP è l'acetilCoA, mentre in quella plastidiale si ha la combinazione di gliceraldeide-3-fosfato e piruvato per formare deossi-d-xiluloso-5-fosfato, da cui si giunge alla produzione di IPP. Anche se determinano la sintesi del medesimo prodotto, queste due vie portano alla formazione successiva di diversi prodotti finali: nel citoplasma si generano sesquiterpeni (C-15), triterpeni (C-30) e politerpeni, mentre monoterpeni (C-10), diterpeni (C-20) e tetraterpeni (C-40) hanno origine prevalentemente nel plastidio: tuttavia non è escluso che tra i due compartimenti in particolari condizioni fisiologiche vi sia uno scambio di intermedi (Croteau *et al.*, 2000).

La via citosolica (Figura 17), presente in tutti gli organismi viventi, consta di 6 passaggi: a una condensazione di tre molecole di acetil-CoA a dare 3-idrossi-3-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA) seguono due riduzioni NADPH-dipendenti da parte della HMG-CoA reduttasi, con la formazione di mevalonato. Due fosforilazioni consecutive da parte della mevalonato chinasi e della fosfo-mevalonato chinasi e una successiva decarbossilazione a opera della difosfo-mevalonato decarbossilasi portano alla sintesi di IPP: quest'ultimo può eventualmente essere isomerizzato a DMAPP per azione dell'enzima isopentenil-difosfato isomerasi.

Figura 17. Schema della via biosintetica mevalonato-dipendente (Thurher *et al.*, 2012).



La via mevalonato-indipendente (Figura 18), chiamata anche via del metileritritolo fosfato (MEP) avviene nel plastidio, ed è caratteristica di alghe e piante superiori (Philliphs *et al.*, 2008). Essa comprende 7 passaggi enzimatici, che iniziano con la condensazione di

piruvato (1) e gliceraldeide-3-fosfato (2) per produrre 1-deossi-D-xilulosio 5-fosfato (3) (DXP) ad opera della DXP sintasi (DXS). Quest'ultimo composto a seguito di un riarrangiamento intramolecolare e una riduzione effettuata ad opera della DXP reduttoisomerasi (DXR) viene trasformato in MEP (4) al quale viene aggiunto un gruppo citidilico (CTP) dalla MEP citidiltransferasi (MCT): si ottiene CDP-ME (5). La CDP-ME chinasi (CMK) fosforila 5 e il prodotto ottenuto, il 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol-2-fosfato (6) (CDP-ME2P), viene ciclizzato ad opera della ME-CPP sintasi (MDS) dando origine al 2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato (7) (ME-CPP). Il difosfato ciclico viene, a seguito di una eliminazione riduttiva catalizzata dalla HMBPP sintasi (HDS), trasformato in 1-idrossi-2-metil-2-E-butenil 4-difosfato (8) (HMBPP), che a sua volta viene ridotto ad opera della HMBPP reduttasi (HDR) a IPP (9) e DMAPP (10).

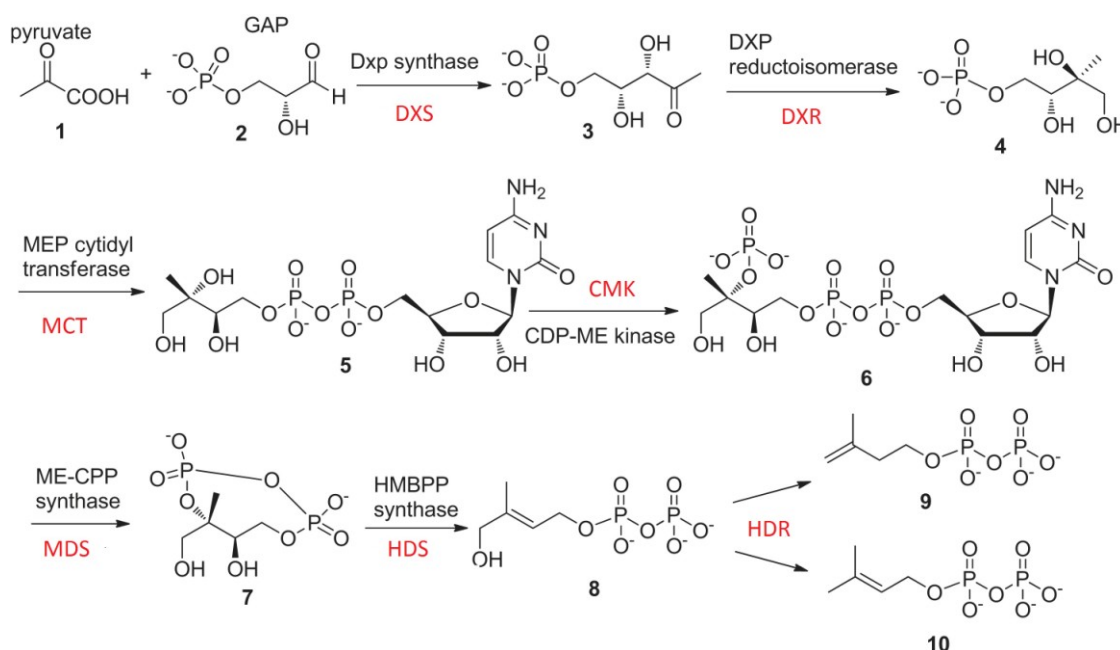


Figura 18. Via del metileritritolo fosfato (Narayanasamy *et al.*, 2010).

IPP e DMAPP rappresentano l'unità di base del metabolismo terpenico. L'unione testa/coda di questi due monomeri porta infatti alla sintesi di tutti i terpeni, classificati secondo il numero di atomi di carbonio: monoterpeni (C-10), sesquiterpeni (C-15), diterpeni (C-20), triterpeni (C-30), tetraterpeni (C-40) e politerpeni (n unità isopreniche). Il geranylgeranyl difosfato (GGPP), ottenuto per condensazione di 4 unità isopreniche ad opera della GGPP sintasi (GGPS), è il mattone che funge da precursore dei carotenoidi. La condensazione testa/testa di due molecole di GGPP a opera dell'enzima fitoene sintasi (PSY) da infatti origine al fitoene, primo vero carotenoide, da cui derivano i successivi tetraterpeni.

Il fitoene subisce la graduale introduzione di doppi legami coniugati, convertendosi in una molecola capace d'assorbire la luce, il *tutto-trans*-licopene, primo carotenoide colorato. In realtà il processo è più complesso, dal momento che l'attività desaturante crea alcuni intermedi in configurazione *cis*, condizione che richiede l'ausilio di enzimi isomerizzanti, i quali ripristinano la forma *trans*. Ecco allora che a partire dal fitoene, intervengono, in successione, gli enzimi fitoene desaturasi (PDS), ζ -carotene isomerasi (Z-ISO), ζ -carotene desaturasi (ZDS) e carotenoide isomerasi (CRTISO), con la concomitante formazione degli intermedi fitofluene, ζ -carotene, neuro-sporene e licopene (Figura 19). L'enzima CRTISO è stato identificato e caratterizzato in pomodoro (Isaacson *et al.*, 2002) e in *A. thaliana* (Park *et al.*, 2002). Nei batteri tutti questi processi vengono svolti dall'enzima multifunzionale CrtI.

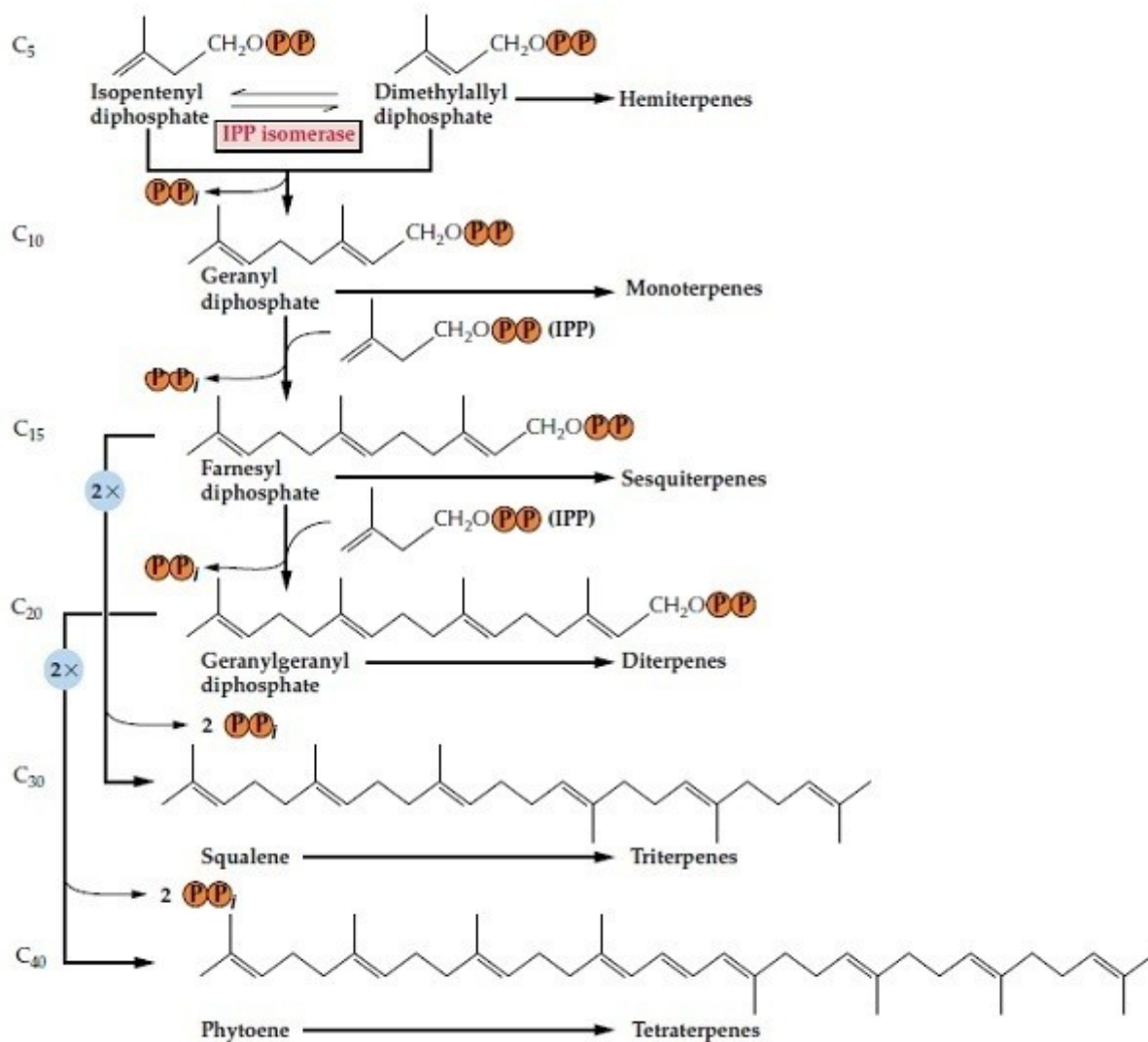


Figura 19. Schema della biosintesi delle varie classi di terpenoidi (Croteau *et al.*, 2000).

La variazione di colore che si determina da fitoene e fitofluene (incolori) a ζ -carotene (giallo), neurosporene (arancio) e licopene (rosso) è dovuta rispettivamente alla presenza di 5, 7, 9 e 11 doppi legami: più doppi legami sono presenti, più l'assorbimento si sposta verso lunghezze d'onda maggiori, con aumento dell'intensità cromatica percepita (Tanaka *et al.*, 2008) (Figura 20). Anche se fitoene e fitofluene sono incolori essi presentano un picco di assorbimento a 348 nm e secondo recenti studi potrebbero giocare un ruolo importante nella fotoprotezione della pelle dell'uomo, fungendo da *quencher* per le ROS indotte dagli UV-A (320-400 nm), in particolare l'ossigeno singoletto (Engelmann *et al.*, 2011).

Il passaggio successivo prevede una ciclizzazione del *tutto-trans*-licopene; la reazione può essere catalizzata da una licopene β -ciclasi (LCYB nelle piante e CrtY nei batteri) e/o da una licopene ϵ -ciclasi (LCYE): si osserva quindi una ramificazione della via di sintesi. Il LCYE è un enzima che in molte piante introduce nel licopene un solo ϵ -anello; carotenoidi con due anelli ϵ sono molto rari (Cunningham e Gantt, 2001). Si riscontrano allora principalmente due tipologie di prodotti: quelli aventi un β ed un ϵ -anello (α -carotene e derivati ϵ,β -carotenoidi), e quelli con due β -anelli (β -carotene e derivati β,β -carotenoidi) (Tanaka *et al.*, 2008). In seguito α e β -carotene possono a loro volta subire reazioni di idrossilazione, epossidazione o isomerizzazione per dare origine a una ampia varietà di

strutture: dall'idrossilazione dell' α -carotene si genera la xantofilla luteina, da quella del β -carotene a opera della β -carotene idrossilasi (CHYB) la zeaxantina. L'eossidazione in posizione C5,6 e C5',6' dell'anello β della zeaxantina, catalizzata dalla zeaxantina epossidasi (ZEP), porta alla formazione della violaxantina; quest'ultima può essere convertita in neoxantina dall'enzima neoxantina sintasi (NSY) (DellaPenna e Podgson, 2006). L'enzima β -carotene chetolasi (CRTW, CrtO nei batteri) rappresenta il punto di partenza per la sintesi dei chetocarotenoidi echinenone e astaxantina; questi ultimi sono pigmenti fotostabili ad elevata attività antiossidante che si accumulano in crostacei e pesci e che sono utilizzati come coloranti naturali in allevamenti ittici.

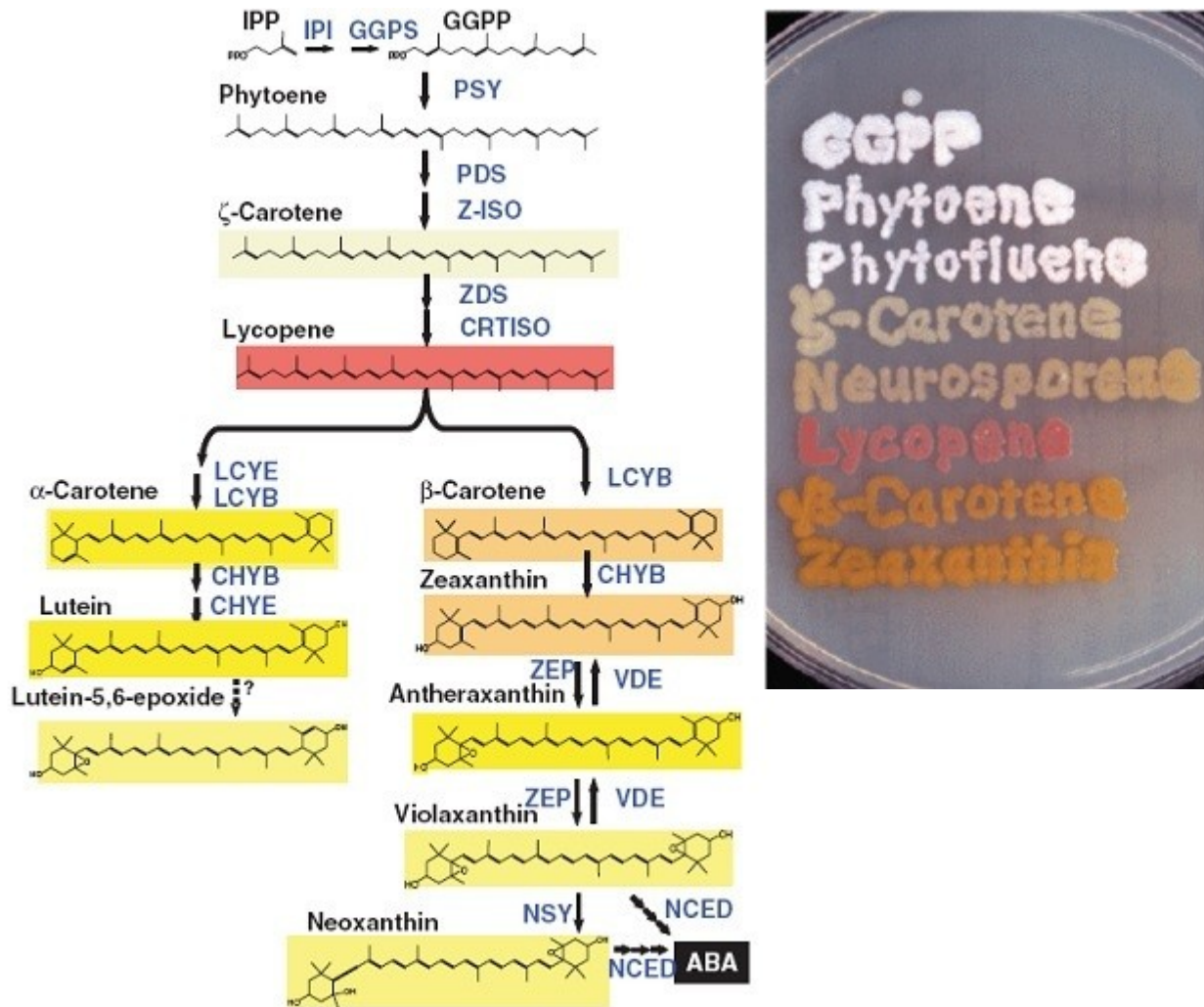


Figura 20. Biosintesi dei carotenoidi nelle piante (Tanaka *et al.*, 2008).

DXPS, 1-deossi-D-xilulosio-5-fosfato sintasi; DXR, 1-deossi-D-xilulosio-5-fosfato reduttoisomerasi; IPI, isopentenil pirofosfato isomerasi; GGDP, Geranyl-difosfato-sintasi; PSY, fitoene sintasi; PDS, fitoene desaturasi; Z-ISO, ζ -carotene isomerasi; ZDS, ζ -carotene desaturasi; LCYB, licopene β -ciclastasi; LCYE, licopene ϵ -ciclastasi; CHYB, β -carotene idrossilasi; CHYE, ϵ -idrossilasi; ZEP, zeaxantina epossidasi; VDE, violaxantina depossidasi; CRTISO, carotenoidi isomerasi; NSY, neoxantina sintasi; NCED, 9-cis-epossicarotenoidi diossigenasi.

1.2.2.4. Regolazione della biosintesi dei carotenoidi

Il contenuto di carotenoidi è estremamente variabile tra specie diverse, ma anche tra i diversi organi di una stessa pianta (Tanaka *et al.*, 2008). La loro biosintesi è regolata sia in

relazione a stimoli endogeni di tipo fisiologico, come ad esempio l'evoluzione del cloroplasto a cromoplasto, che di tipo ambientale, come l'esposizione ad una forte irradiazione che induce la carotenogenesi. Ecco allora che la sintesi di questi composti è regolata durante tutto il ciclo di vita della pianta, con variazioni sostanziali durante germinazione, fotomorfogenesi, fotosintesi, maturazione di fiori e frutti e anche in risposta a svariati tipi di stress.

La quantità di carotenoidi che si possono trovare in una pianta è data dalla sommatoria tra la loro biosintesi e la loro degradazione: in molti casi è proprio quest'ultima che risulta prevalente nel determinarne il contenuto finale; alcuni tessuti vegetali, infatti, contengono solo tracce di carotenoidi nonostante esprimano la via biosintetica. La regolazione sembra avvenire prevalentemente a livello trascrizionale, ma può verificarsi in misura minore anche a livello post-trascrizionale, con *feedback* da prodotto e con meccanismi di controllo epigenetico (Sandmann *et al.*, 2006).

Il primo punto di regolazione della sintesi dei carotenoidi è a carico della DXS, ancor prima della sintesi del MEP. L'espressione di questo enzima risulta infatti essere organo-specifica e la sua trascrizione aumenta sostanzialmente durante la maturazione della bacca di pomodoro: consequenzialmente all'aumento di DXS si osserva un incremento della trascrizione di PSY e dell'accumulo di carotenoidi (Lois *et al.*, 2000). La sovraespressione di DXS e DXR in *A. thaliana* provoca un innalzamento del contenuto di carotenoidi del 13% nei semi, mentre esperimenti di *RNA-silencing* di DXS lo riducono del 12% (Carretero-Paulet *et al.*, 2006). Un secondo punto di regolazione è a carico della HDR, enzima che catalizza la produzione di IPP e DMAPP; l'incremento della trascrizione del gene corrispondente, correlata all'aumento del contenuto di carotenoidi, è stata osservata in frutti di pomodoro in maturazione e in semi di *A. thaliana*. Un gruppo di ricerca spagnolo ha effettuato un esperimento in cui la sovraespressione della HDR di *Solanum lycopersicum* in *A. thaliana* ha aumentato l'accumulo di β -carotene e luteina nei cloroplasti, ma non negli ezioplasti (Botella-Pavia *et al.*, 2004). La disponibilità dei precursori rappresenta quindi un fondamentale elemento di regolazione e la produzione di unità isopreniche è a sua volta legata a fattori biotici e abiotici (come la luce), che possono alterare l'espressione dei geni della via del MEP (Cazzonelli e Pogson, 2010).

Il più importante punto di regolazione nella biosintesi dei carotenoidi è comunque ritenuto essere l'enzima PSY: studi di sovraespressione ne hanno infatti evidenziato il ruolo chiave nell'indirizzare il flusso dei precursori verso il pathway di questi composti (Fray *et al.*, 1995; Rodríguez-Villalón *et al.*, 2009). La trascrizione dei geni PSY subisce un incremento in risposta a elevata illuminazione, temperatura, fotoperiodo, stress salino e siccità, e al trattamento con ABA (Cazzonelli e Pogson, 2010). Mentre in *A. thaliana* vi è un solo gene codificante per la PSY, sono state identificati due o più omologhi in pomodoro, riso, mais e grano tenero. Anche se l'attività della varie PSY sembra essere ridondante, la loro espressione è tessuto specifica: la PSY3 di mais e il suo ortologo in riso, ad esempio, sono sovraespressi nella radici in condizioni di stress salino o siccità (Li *et al.*, 2008a). La rapida scomparsa dei trascritti di PSY2 e PSY3 nella fasi successive alla reidratazione dimostra invece uno stretto controllo della stabilità dei messaggeri. Non sempre però l'abbondanza del messaggero della PSY è correlato all'accumulo finale dei carotenoidi: nelle foglie di mais, ad esempio, è stato evidenziato che una diminuzione del trascritto della PSY1 dovuto alle elevate temperature ha come effetto un aumento del contenuto finale di tali metaboliti (Li *et al.*, 2008b). Sembra infine che i differenti profili di espressione delle varie isoforme di PSY in mais siano correlati alla presenza di promotori regolati dalla luce nel caso di PSY1 e PSY2 e dall'ABA per PSY3. Il trascritto di PSY2 di mais è up-regolato durante la fotomorfogenesi attraverso il pathway del fitocromo: la luce sia rossa che rossa lontana ne aumentano infatti la trascrizione (Welsh *et al.*, 2008).

Ci sono evidenze anche a favore di una regolazione da *feed-back* indotta dall'accumulo di MEP, carotenoidi e ABA. L'accumulo di acido abscissico in riso porta alla up-regolazione

di *PSY3* che gioca quindi un ruolo importante nelle risposte a stress abiotici. Uno studio condotto su semi eziolati di *A. thaliana* ha dimostrato come in una pianta transgenica sovraesprimente una *PSY* vi sia un incremento nell'accumulo degli mRNA della *DXS*, evidenziando un *feedback* positivo che stimola la produzione dei substrati della via del MEP. La sola iper-espressione della *DXS* non è sufficiente però ad innalzare il contenuto finale dei carotenoidi nei semi, dato che conferma l'importanza della *PSY* come primo vero punto di regolazione della via metabolica.

La carotenogenesi luce-dipendente è stata osservata in numerosi studi, mentre si nota un decremento o addirittura un blocco della sintesi in caso di buio prolungato (Simkin *et al.*, 2003). La regolazione in questo caso è prevalentemente trascrizionale: nelle foglie adattate al buio si ritrovano infatti piccole tracce degli mRNA dei geni *PSY*, *PDS* e *CRTISO*, mentre nelle foglie illuminate i livelli di questi messaggeri sono molto più elevati. Mutanti di *A. thaliana* che presentano una *PDS* non in grado di funzionare accumulano fitoene, che agisce da *feedback* negativo sui geni a monte. Tra gli enzimi che catabolizzano il licopene, ovvero *PDS*, *Z-ISO*, *ZDS* e *CRTISO*, un importante punto di regolazione risulta essere a carico di quest'ultimo, che promuove l'isomerizzazione dei legami *cis* in *trans*, portando alla produzione di all-*trans*-licopene, che a sua volta funge da substrato per gli enzimi *LCYB* e *LCYE* (DellaPenna e Pogson, 2006). Un mutante di pomodoro avente una *CRTISO* non funzionale (*tangerine*) accumula *cis*-carotenoidi nei cromoplasti delle bacche (Figura 21), ma non nei tessuti fotosinteticamente attivi; in questi ultimi, infatti, la reazione di isomerizzazione effettuata dall'enzima avviene tramite fotoisomerizzazione (Isaacson *et al.*, 2002). Se mutanti *tangerine* vengono fatti crescere in condizioni di buio, in assenza di fotoisomerizzazione, si ha accumulo di pro-licopene anche nei tessuti fotosintetici, e la via che porta alla sintesi del licopene viene bloccata.

Figura 21. Pomodori *wild type*, che accumulano licopene nella polpa, e pomodori transgenici *tangerine*, a ridotta attività della *CRTISO*, che accumulano pro-licopene (Isaacson *et al.*, 2002).



Questa isomerasi viene regolata anche in modo epigenetico tramite l'enzima metiltransferasico Set Domain Group 8 (*SDG8*), che interviene metilando l'istone dove è presente il gene *CRTISO*. L'assenza della *SDG8* altera la metilazione della cromatina associata al gene, riducendone la trascrizione e portando alla riduzione della sintesi di luteina e all'incremento della ramificazione dei germogli (Cazzonelli *et al.*, 2009).

Il *pathway* dei carotenoidi subisce una biforcazione dopo la sintesi del licopene il quale viene utilizzato come substrato dalla *LCYB* e dalla *LCYE* per generare rispettivamente β e ϵ -carotenoidi (Figura 22). In condizioni di scarsa luminosità la pianta ha la necessità di assorbire maggiormente la luce per poter sostenere la fotosintesi; in queste condizioni il ciclo

foto-protettivo delle xantofille non è di vitale importanza, quindi si assiste ad un incremento della sintesi dei ϵ -carotenoidi, come la luteina. Nella situazione opposta, in condizioni di luce intensa, la pianta ha necessità di dissipare l'energia in eccesso e il ciclo delle xantofille diventa essenziale: ecco allora che viene intensificata questa volta la via dei β -carotenoidi.

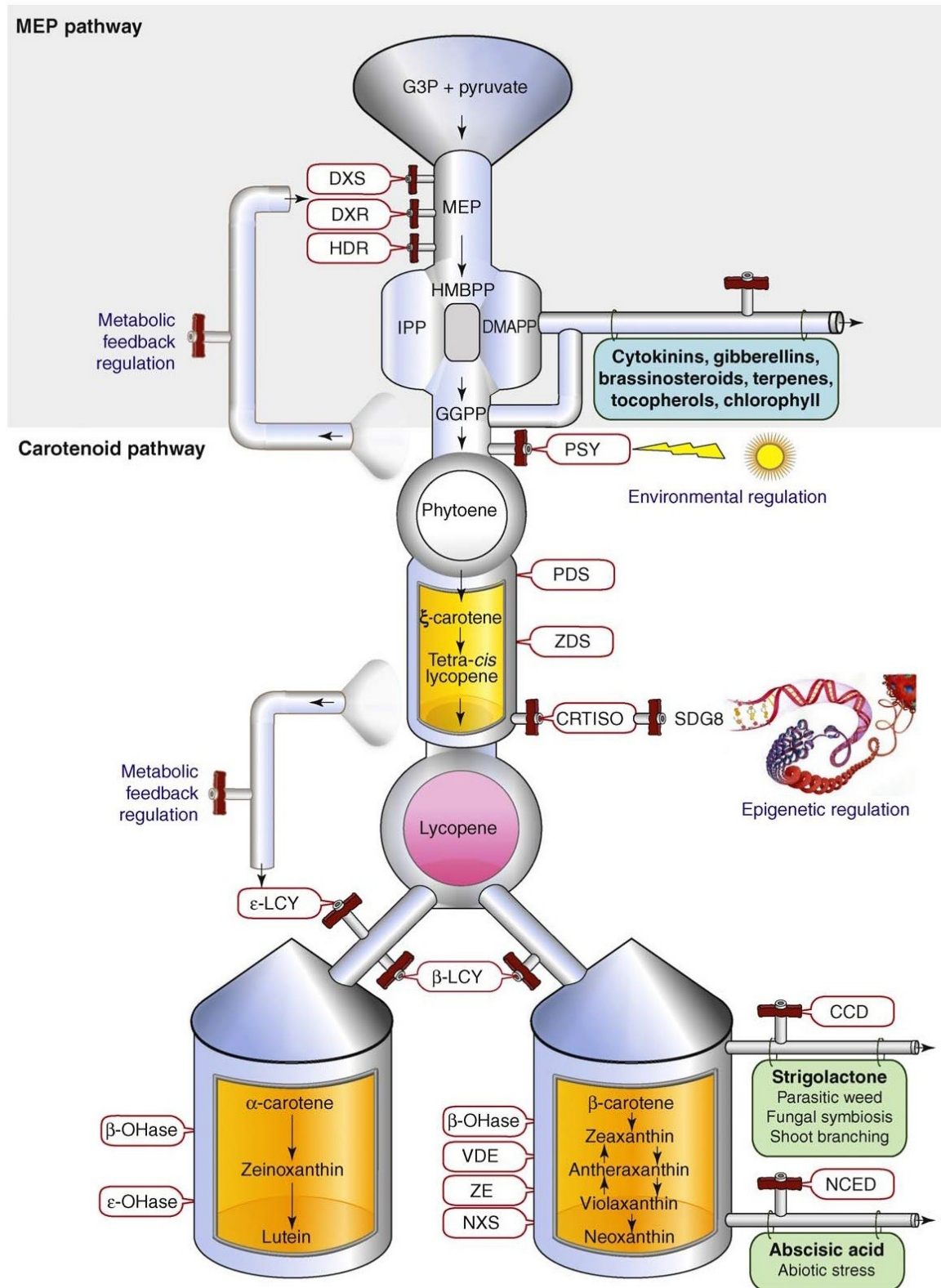


Figura 22. Pathway dei carotenoidi. I tubi cromati simboleggiano i carotenoidi più abbondanti nei tessuti fotosintetici e i punti di regolazione della via di sintesi. La via è regolata da fattori ambientali (luce), epigenetici e da meccanismi di *feed-back*. Gli imbusti laterali rappresentano esempi di controllo da *feed-back* (Cazzonelli *et al.*, 2010).

In *A. thaliana* ad esempio non viene osservata alcuna variazione del contenuto di luteina in condizione di scarsa luminosità, mentre si osserva un aumento delle xantofille (e un calo di luteina) dopo un'ora di esposizione a elevata irradianza. L'ottenimento di mutanti privi di una LCYE funzionale con un bassissimo contenuto di luteina ha dimostrato che l'enzima è un punto di controllo per la sintesi di tale metabolita (Cuttriss *et al.*, 2007). L'espressione del trascritto di *LCYE* è a sua volta soggetto a *feedback* negativo da parte del tetra-cis-licopene, che si accumula in assenza dell'attività della CRTISO: mutanti deficitari di CRTISO e SDG8 hanno infatti mostrato bassi livelli di mRNA dell'enzima ad attività ciclasica, con una marcata riduzione della produzione di luteina (Cazzonelli *et al.*, 2009).

1.3. Fitonutrienti nelle piante di interesse agronomico

L'alimentazione è uno dei fattori non genetici che influenzano maggiormente l'insorgere di patologie legate all'età e sia i componenti bioattivi di origine vegetale che i probiotici giocano un ruolo fondamentale nella prevenzione di svariati tipi di malattie cronico-degenerative e nell'ottimizzare le funzioni metaboliche. Solo assumendo attraverso la dieta una complessa miscela di questi componenti si può ottenere un effetto sinergico in grado di donare i benefici attesi. La scienza negli ultimi anni ha fatto enormi passi avanti anche nel campo dell'informazione e della divulgazione, cercando, basandosi su dati obiettivi e scientificamente validati, di orientare le famiglie al consumo di cibi funzionali. Le malattie cardiovascolari ed i tumori sono le più importanti cause di morte nei paesi industrializzati e si hanno sempre più evidenze che l'elevato consumo di frutta e verdura può ridurre la probabilità di contrarre questo tipo di patologie; si stima ad esempio che più del 30% dei tumori che colpiscono i cittadini americani possono essere prevenuti con un corretto stile di vita associato a una alimentazione ricca di prodotti vegetali. Le linee guida del dipartimento per l'agricoltura statunitense, redatte nel 2010, raccomandano alla maggioranza della popolazione il consumo di 9 porzioni di frutta e verdura al giorno basandosi su una dieta standard di 2000 Kcal: nonostante questo, la media attuale si aggira sulle 3.6 porzioni (Liu *et al.*, 2013). In tale contesto risulta quindi sempre più importante accertare e divulgare il ruolo funzionale dei composti bioattivi presenti nei cibi vegetali e la loro azione protettiva (Figura 23).

Un esempio di alimento funzionale conosciuto in tutto il mondo è il the verde, pianta appartenente alla specie *Camellia sinensis*, della famiglia delle *Theaceae*. Nel passato venivano raccolte solo le ultime due foglie e la gemma apicale, destinate agli imperatori. Oggi in seguito all'aumento del fabbisogno mondiale, tale raccolto viene destinato al mercato interno dei paesi produttori, mentre per le esportazioni si utilizzano per lo più il germoglio e le 4 foglioline più tenere. Questa bevanda è estremamente apprezzata in Cina, nord Africa e Medio Oriente. Il the verde contiene più del 35% di polifenoli in peso secco, con una frazione rilevante di catechine tra le quali l'epicatechina, epigallocatechina, epicatechingallato e epigallocatechingallato. Queste sostanze sono dotate di una notevole attività antiossidante: test effettuati su 18 campioni di the verde hanno mostrato un potere antiossidante di circa 761 $\mu\text{mol Trolox Equivalenti (TE) g}^{-1}$ rispetto ai 200 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ della media dei vegetali (Prior e Cao, 1999). I maggiori benefici che può apportare riguardano la cardioprotezione: studi *in vitro* hanno evidenziato la sua capacità di proteggere la cellula cardiaca dal danno ipossico (Bordoni *et al.*, 2002) e di modulare la produzione di ossido di azoto (Agnetti *et al.*, 2005). Il regolare consumo di the verde porta ad una diminuzione del rischio di contrarre patologie cardiovascolari grazie alla capacità dei polifenoli in esso contenuti di inibire la perossidazione delle LDL (low density lipoprotein) (Hodgson e Croft, 2010), e alla prevenzione di alcuni tipi di tumori, come quello della prostata, del colon, dei polmoni e dello stomaco, grazie all'elevato contenuto di epigallocatechingallato, sostanza ad attività chemiopreventiva. Studi più recenti hanno evidenziato anche il ruolo neuroprotettivo delle catechine, che sarebbero in grado di agire contro le malattie neurodegenerative e neuroinfiammatorie: gli esperimenti per

dimostrare questi effetti sono stati però condotti fino a ora solo *in vitro* e si è in attesa di una conferma anche *in vivo*.

Bioactive Compound	Examples	Sources	Putative Beneficial Biological Effects
Flavonoids			
Flavonols	Quercetin, kaempferol, catechin	Onion, apple, tea, berries, olives, broccoli, lettuce, red wine, cocoa/chocolate	↓ TC, ↓ LDL-C oxidation, ↑ HDL-C, AOX, antimutagen, ↓ tumor initiation/promotion, ↓ platelet aggregation, ↓ eicosanoid synthesis
Flavonols	Epicatechin, epigallocatechin, epicatechin-3-galleate, epigallocatechin-3-galleate	Green/black tea, cocoa/chocolate	AOX, carcinogen detox, antimutagen, ↓ tumor initiation/promotion, apoptosis, ↓ LDL-C oxidation, ↓ platelet aggregation
Phytoestrogens			
Lignans, coumestran	Enterolactone, enterodiol, coumestrol	Flaxseed oil, lucerne, clover	↓ LDL-C, AOX, estrogen/antiestrogen; adverse effect (CVD): pro-oxidant activity with partially defatted flaxseed
Isoflavones	Genistein, daidzein	Soybeans, legumes	↓ TC and LDL-C, ↓ LDL-C oxidation, ↓ TG, ↑ HDL-C, ↓ thrombosis, AOX, estrogen/antiestrogen, antimutagen; ↓ angiogenesis, ↑ apoptosis; adverse effect: procarcinogen potential?
Resveratrol		Grapes, red wine, peanuts	↓ LDL-C oxidation, ↓ platelet aggregation/thrombosis, ↓ eicosanoid synthesis, AOX, carcinogen detoxification, antimutagen, ↓ tumor initiation/promotion, estrogen/antiestrogen
Lycopene		Tomatoes, tomato products	↓ LDL-C and LDL-C oxidation, AOX, antimutagen
Organosulfur compounds	Allicin, diallyl sulfide, diallyl disulfide, allyl mercaptan	Garlic, onion, leek	↓ TC and LDL-C, ↓ TG, ↓ cholesterol and FA synthesis, ↓ BP, ↓ thrombosis, AOX, carcinogen detoxification, ↓ tumor promotion; adverse effect: tumor promotion potential?
Soluble dietary fibers	β-Glucan, pectin, psyllium	Oats, barley, yeast, fruit, vegetables, psyllium seed, fortified cereals and grains	↓ TC, TG, LDL-C
Isothiocyanates (ITC)	Phenethyl (PEITC), benzyl (BITC), sulforaphanes	Cruciferous vegetables (e.g., watercress, broccoli)	↓ Tumor initiation/promotion, ↓ carcinogen activation, carcinogen detoxification
Monoterpenes	d-Limonene, perillidic acid	Essential oils of citrus fruit, cherries, mint, herbs	↓ TC and LDL-C, carcinogen detoxification, ↓ tumor initiation/promotion, ↓ HMGR
Plant sterols	Sitostanol, stigmasterol, campesterol	Tall oil, soybean oil, rice bran oil	↓ TC and LDL-C, AOX, ↓ cholesterol absorption; adverse effect: ↓ carotenoid absorption
Olive oil	Tyrosol, hydroxytyrosol, oleuropeine, caffeic acid, cumaric acid	Extra virgin olive oil	AOX, ↓ LDL-C oxidation

AOx = antioxidant activity; BP = blood pressure; CVD = cardiovascular disease; HDL-C = high-density lipoprotein cholesterol; HMGR = HMG CoA reductase; TC = total cholesterol; TG = triglycerides.

Figura 23. Composti presenti nei vegetali di interesse agronomico che riducono il rischio di contrarre malattie cardiovascolari e tumori (Etherton *et al.*, 2002).

Un altro alimento funzionale riconosciuto a livello globale è rappresentato dalle arance rosse (*Citrus sinensis* L. Osbeck), frutti che crescono unicamente in Sicilia, in Florida e nell'isola di Malta. Oltre alla vitamina C, esse contengono anche acidi idrossicinnamici, flavanoni e antocianine che sono responsabili del colore caratteristico del frutto. Nelle arance pigmentate il potere antiossidante è dato per il 40% dalla Vitamina C e per il restante 60% dalle molecole di natura polifenolica, sostanze che non sono altresì presenti nelle arance bionde e che ne conferiscono gli effetti benefici per la salute umana. La più nota antocianina presente nel frutto è la cianidina-3-beta-glucopiranoside (C3G), chiamata anche curomanina. La C3G è un flavonoide a elevata biodisponibilità e è riconosciuta come potente antiossidante in grado tra le altre cose di inibire la perossidazione delle LDL; studi sia *in vitro* che *in vivo* ne hanno dimostrato l'azione anticancerogena mediata da attività antiproliferativa e pro-apoptotica e dall'effetto sull'espressione genica (Zhang *et al.*, 2005). Le antocianine e la curomanina in particolare sono anche molecole ad attività cardioprotettiva e anti-obesità: esperimenti effettuati su topo e uomo hanno infatti dimostrato come la C3G sia in grado di aumentare la produzione di adipocitochine negli adipociti e di stimolare la trascrizione delle lipasi, incrementando così la lipolisi (Tsuda *et al.*, 2006). Uno studio effettuato nel 2009 da

ricercatori italiani ha dimostrato come il succo di arancia pigmentata Moro ha la capacità di inibire la crescita degli adipociti in topo, mentre una somministrazione di C3G purificata non è in grado di svolgere la stessa funzione, dimostrando ulteriormente l'effetto sinergico delle sostanze contenute nei cibi (Titta *et al.*, 2009). Infine le antocianine stimolano la secrezione di insulina dalle cellule beta del pancreas, agendo di contrasto nei confronti del diabete, e si comportano da neuroprotettivi e antinfiammatori (Galvano *et al.*, 2007).

La soia (*Glycine max*) è una pianta originaria dell'Asia ma a partire dal XVI secolo la sua coltivazione si è estesa in tutto il mondo. Fin dall'antichità la soia era rinomata per le sue proprietà diuretiche e antipiretiche e oggi svolge un ruolo fondamentale come fonte proteica in quei paesi che hanno una dieta povera di carne, come ad esempio l'Asia Orientale. Le proteine nella soia costituiscono circa il 40% dei semi, il 30% è dato da polisaccaridi e il 20% da trigliceridi; esse hanno, a differenza di altre specie vegetali, un elevato valore biologico e una composizione ben bilanciata di amminoacidi. Contengono inoltre micronutrienti come calcio, ferro e vitamine, e fitoestrogeni come isoflavoni (ginesteina e daidzeina) e lignani, la soia ricade ampiamente nella categoria degli alimenti funzionali. De essa si ricavano una serie di prodotti derivati come il tofu, il miso, il tempeh e il latte di soia; nei prodotti fermentati gli isoflavoni sono presenti principalmente sotto forma di agliconi, più biodisponibili. Nei primi anni 2000 la Food and Drug Administration degli Stati Uniti ha affermato che una dieta equilibrata con l'assunzione di 25-50 g di proteine di soia può ridurre il rischio di contrarre patologie coronariche e abbassare i livelli di colesterolo cattivo anche del 13%. Gli isoflavoni presenti sembrano anche essere in grado di prevenire il rischio di tumori come quelli al seno e alla prostata (Akitha Devi *et al.*, 2009).

Un altro legume molto interessante dal punto di vista salutistico è il lupino (*Lupinus albus*), semi del quale sono stati trovati addirittura nelle piramidi egizie e che è da sempre utilizzato nell'alimentazione umana. I semi, che rappresentano la parte edibile, non possono essere consumati tal quali in quanto contengono alcaloidi tossici per il nostro organismo; devono quindi essere sottoposti a un processo di sanificazione che consta di macerazione, bollitura e conservazione in salamoia. Essi sono considerati funzionali in quanto hanno un basso indice glicemico, una elevata percentuale di fibra, un rapporto ottimale $\omega 6/\omega 3$ e soprattutto una elevata concentrazione proteica con albumine e globuline in rapporto 1 a 9. La parte proteica dei semi del lupino rappresenta la caratteristica funzionalmente più interessante in quanto in grado di contrastare le patologie cardiovascolari e di ridurre i livelli di colesterolo cattivo (Sirtori *et al.*, 2004), qualità che ne hanno determinato l'appellativo di "salva cuore".

Anche il cioccolato fondente è considerato un cibo funzionale, in quanto contiene elevate quantità di cacao che è ricco di flavonoidi, in particolare di flavanoli. Questi composti sono presenti in forma molecolare non coniugata come la (-) epicatechina e la (+) catechina, o come oligomeri chiamati procianidine che hanno attività insulino resistente e sono in grado di abbassare la pressione sistolica. Altri alimenti vegetali ricchi di flavanoli sono il pompelmo e i chicchi d'uva. La frutta oleosa, in particolare le noci, è ricca di acidi grassi polinsaturi $\omega 3$ ed è in grado di abbassare il colesterolo LDL: il consumo di 1-4 porzioni a settimana può ridurre il rischio di patologie coronario-cardiache di quasi il 40%. Gli acidi grassi $\omega 3$ e $\omega 6$ sono essenziali per l'uomo che è sprovvisto degli enzimi necessari per introdurre i doppi legami in posizione 3 e 6; l'acido linoleico (C 18:2, $\omega 6$) e α -linolenico (C 18:3, $\omega 3$) possono essere convertiti in altri acidi della serie $\omega 6$ e $\omega 3$, ma non viceversa. Le proprietà benefiche degli acidi grassi polinsaturi (PUFA) sono state scoperte per la prima volta più di trent'anni fa studiando il basso rischi di incidenza di malattie cardiovascolari di una popolazione di eschimesi della Groenlandia: si capì che tale fenomeno era dovuto a una dieta molto ricca di carne di foca e di balena, matrici estremamente ricche di PUFA $\omega 3$. Da allora centinaia di studi scientifici hanno evidenziato le proprietà funzionali di queste molecole che sono risultate essere in grado anche di modulare l'espressione genica a livello epatico e in adipociti,

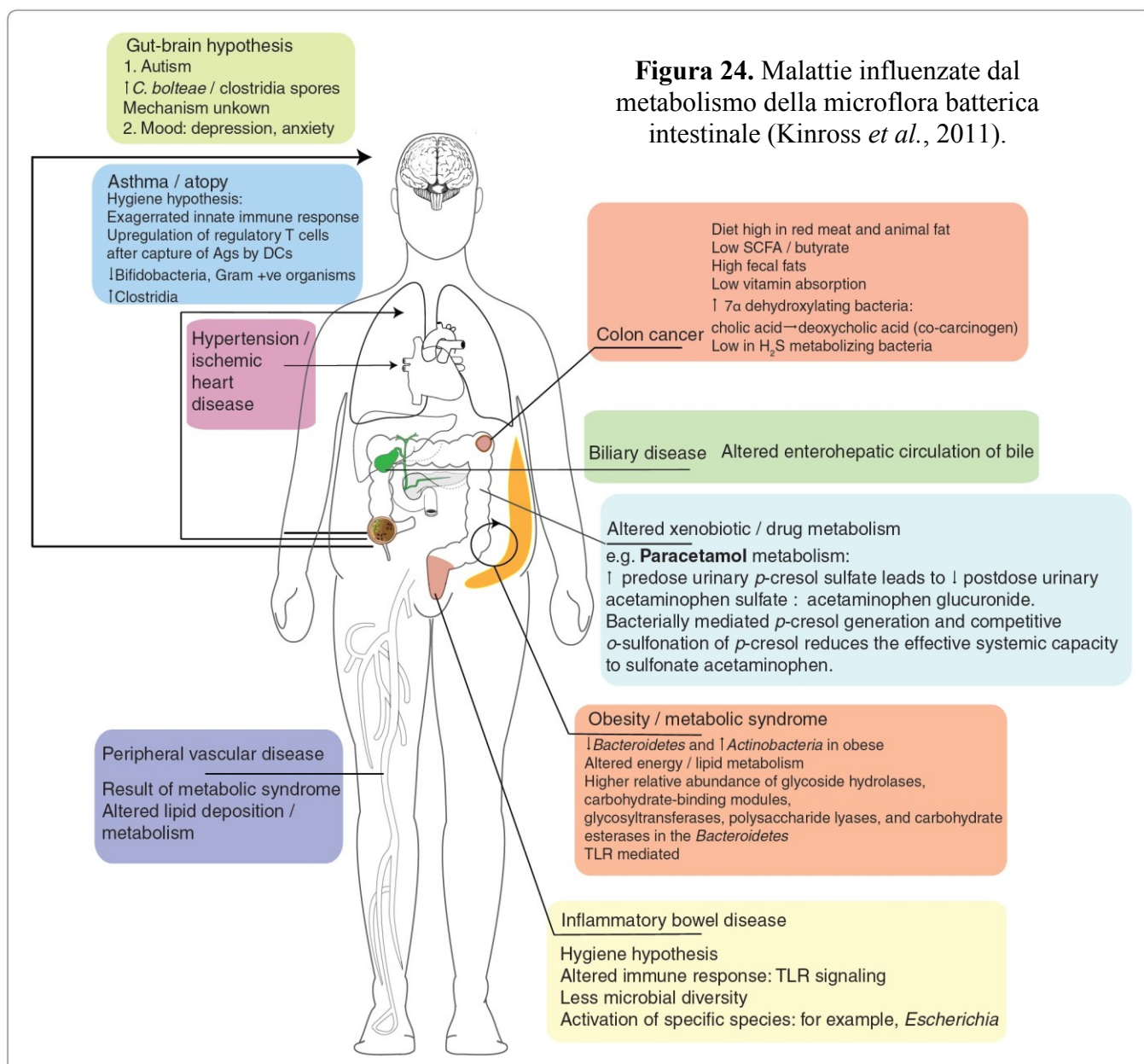
cellule nervose e immunitarie: ciò è portato a ipotizzare un'azione che coinvolge molteplici meccanismi e fattori di trascrizione.

Per quanto riguarda altre specie ortive, sono note le proprietà del pomodoro e della patata, ma anche di aglio, melanzana, peperone dolce, carota, carciofo, pisello e rucola. Per quanto riguarda l'aglio (*Allium sativum*), rinomato nella tradizione popolare per le sue proprietà antibatteriche e antisettiche, esso presenta anche innumerevoli altre caratteristiche benefiche per la salute umana, come quelle ipotensive e cardioprotettive, fluidificanti del sangue, ipoglicemizzanti, tonificanti, depurative e disintossicanti. Queste qualità sono dovute, oltre alla molecola allicina che ne conferisce il caratteristico odore, alla presenza di innumerevoli fitonutrienti ad attività antiossidante. La melanzana (*Solanum melongena*) è l'ortaggio più consumato in India, ed è particolarmente ricca di polifenoli come l'acido clorogenico e isochlorogenico che sono presenti soprattutto nella buccia del frutto. Studi hanno dimostrato che estratti di buccia di melanzana sono in grado di sopprimere lo sviluppo dei vasi sanguigni richiesto per la crescita dei tumori e per lo sviluppo delle metastasi, dimostrando quindi delle proprietà antitumorali (Matsubara *et al.*, 2005). Anche il broccolo (*Brassica oleracea*), che contiene invece acidi fenolici e sulforaphane, presenta attività anticarcinogena. Il peperone dolce ha un elevato potere antiossidante, in particolare quello rosso che contiene nelle bacche elevate quantità di composti fenolici, β -carotene, quercetina, capsantina e luteolina. Il carciofo, una Asteracea poliennale di cui l'Italia è il primo produttore a livello mondiale, ha foglie ricchissime di sostanze polifenoliche, che rappresentano il 2% del peso secco e sono impiegate per la produzione di prodotti farmaceutici e erboristici. Il suo gusto amaro è dato dalla cinaropricrina, un sesquiterpene lattonico che possiede proprietà anticarcinogene e antilipidemiche (Cho *et al.*, 2004). Esso ha inoltre un basso contenuto energetico e lipidico, mentre è molto ricco in fibra e in inulina, un efficiente prebiotico.

La quasi totalità del consumo attuale dei cereali riguarda quelli di tipo raffinato a scapito di quelli integrali che, non subendo raffinazione alcuna, mantengono il germe e la crusca. I cereali raffinati sono poi ulteriormente lavorati per ottimizzarne colore, sapore e consistenza attraverso processi che ne diminuiscono ulteriormente il potere funzionale. I cereali integrali contengono al contrario centinaia di sostanze bioattive, tra cui fitoestrogeni antiossidanti, fenoli, vitamine A ed E, selenio, zinco, rame e magnesio (Slavin, 2003). Tra tutti questi composti un'attenzione particolare dovrebbe essere posta sulla fibra alimentare e i carboidrati non digeribili che sono fermentati dalla flora intestinale, formando acidi grassi a catena corta (SCFAs): tali molecole sono fisiologicamente attive nel colon dove costituiscono il nutrimento dell'epitelio di cui modulano pH e volume cellulare, regolano la proliferazione, il differenziamento e l'espressione di alcuni geni.

I carboidrati non digeribili fanno parte della categoria dei prebiotici: non essendo interamente idrolizzati dall'apparato enzimatico dell'intestino, ne raggiungono la parte finale dove sono selettivamente fermentati dai microrganismi presenti, giocando un ruolo fondamentale nella regolazione dello sviluppo della microflora probiotica. Si tratta principalmente di fibre insolubili e polisaccaridi non amidacei (cellulose, emicellulose e lignina) e altri substrati parzialmente assimilabili, come fibre vegetali solubili (pectine, gomme e mucillagini). Possiamo definire come un composto prebiotico un ingrediente alimentare non digeribile che ha effetti benefici sull'ospite essendo in grado di stimolare lo sviluppo di un numero limitato di batteri probiotici. Il termine probiotico riguarda microrganismi in grado di promuovere la salute umana e degli animali, come alcuni ceppi di bacilli lattici e bifidobatteri: sono presenti oggi sul mercato innumerevoli prodotti ad azione probiotica destinati all'alimentazione. La sinergia tra probiotico e prebiotico gioca un ruolo fondamentale per il benessere dell'essere umano in quanto l'apparato gastrointestinale è in grado di regolare numerosissime funzioni biologiche (Miremedi e Shah, 2012). Il sistema linfatico associato alla mucosa intestinale (GALT) è l'organo linfatico più esteso dell'organismo e presenta funzioni immunomodulatorie e di difesa: esso deve distinguere non solo tra antigeni *self* e *non self*, ma anche

tra antigeni esogeni dannosi e cibi innocui ai quali è costantemente soggetto. Questa complessa funzione si acquisisce fin dalla primissima infanzia quando si determina una soppressione della risposta immunitaria nei confronti delle proteine alimentari e verso i batteri della flora intestinale in un processo che viene definito "tolleranza orale". La flora intestinale consta di un ecosistema di quasi 400 specie batteriche differenti ed è anch'essa in grado di influenzare l'equilibrio immunitario e le reazioni allergiche, agendo sulla tolleranza orale. Vengono attualmente considerati prebiotici il lattulosio, il raffiniosio, i galattoligosaccaridi, i fruttoligosaccaridi, gli oligosaccaridi della soia, l'inulina e l'estratto di germe di frumento. I fruttoligosaccaridi e l'inulina sono presenti in quantità significative in più di 36000 specie vegetali; l'assunzione di tali molecole nella dieta del passato era di circa 30 grammi al giorno mentre ora, nei paesi sviluppati, è diminuita fino a 2-12 grammi al giorno. Ciò ha contribuito a modificare la flora intestinale, con una riduzione della presenza dei batteri saprofiti a favore di quelli putrefattivi. Una dieta bilanciata ricca di probiotici e prebiotici può aiutare a modulare e migliorare l'efficienza del sistema immunitario, può prevenire l'insorgenza di allergie e intolleranze alimentari, riduce il rischio dello sviluppo delle malattie croniche intestinali e della gastrite, aiuta a prevenire il diabete e gioca un ruolo di importanza primaria contro lo sviluppo del cancro al colon (Sudhakar Reddy *et al.*, 2011).



1.3.1. Strategie per l'aumento del contenuto di fitonutrienti senza l'impiego dell'ingegneria genetica

Nel corso degli ultimi anni sono stati spesi grandi sforzi nello studio della fattibilità di approcci di *breeding* per aumentare l'accumulo dei diversi fitonutrienti nelle parti edibili della pianta. Ciò richiede la conoscenza dei determinanti che controllano la loro sintesi e degradazione: è necessario quindi partire dall'identificazione della molecola di interesse e procedere a ritroso fino ai geni che codificano per gli enzimi che ne regolano il metabolismo. A tal fine è necessario quindi individuare:

- gli enzimi implicati nella via metabolica
- gli enzimi chiave in grado di regolare i passaggi limitanti
- le isoforme enzimatiche che presentano maggior efficienza
- i geni codificanti gli enzimi e la loro posizione nel genoma.

Per ottenere un quadro completo è necessario quindi coordinare competenze di metabolomica, proteomica, biologia molecolare e genetica. Per poter comprendere al meglio i meccanismi sopraelencati è indispensabile d'altra parte disporre di un germoplasma che presenti variabilità genetica per il carattere in esame: la caratterizzazione di tale materiale genetico (*cultivar* di interesse agronomico e le rispettive specie selvatiche) è fondamentale per identificare varianti che possono essere selezionate (o eliminate, se negative) durante il processo di *breeding*. Attraverso l'incrocio di specie selvatiche capaci di accumulare il composto di interesse con specie coltivate presentanti un elevato vigore si possono ottenere ibridi aventi sia elevata produttività che ottime caratteristiche nutrizionali e nutraceutiche. Nello sviluppo di cibi funzionali è necessario scegliere d'altra parte alimenti ad elevato consumo pro-capite, così da poter poi soddisfare le esigenze di una ampia popolazione.

Esempi della riuscita di tale approccio sono l'aumento di acido clorogenico e isochlorogenico in melanzana, che è classificata tra le prime dieci specie vegetali a più elevata attività antiossidante, e il peperone in cui è stato incrementato il contenuto di quercetina. Per la patata la messa a punto di una tecnica analitica che permette lo screening di un elevatissimo numero di campioni ha facilitato la selezione di nuove varietà accumulatrici di polifenoli (Shakya *et al.*, 2006), mentre nel carciofo si è riusciti a aumentare l'accumulo di questi composti anche attraverso l'utilizzo di semplici pratiche agronomiche (Palermo *et al.*, 2013). Ottimi risultati sono stati ottenuti anche per i carotenoidi: l'incrocio di specie selvatiche ha permesso di ottenere piante di pomodoro "*high pigment*" con un elevato accumulo di licopene (Parisi *et al.*, 2009) e un programma di *breeding* specifico ha portato in patata il livello di questa classe di composti nei tuberi a un valore di 30 mg per 100 g di peso fresco, come nella *cultivar* "Yuma de Huevo". Nel caso delle antocianidine, un simile approccio è stato messo in pratica con successo da un gruppo di ricercatori italiani per ottenere piante di pomodoro ad elevato contenuto di antocianine nei frutti (Al-sane *et al.*, 2011).

Un'altra possibilità per ottenere cibi funzionali senza l'intervento delle biotecnologie e delle tecniche di ingegneria genetica è quello di agire sulle condizioni colturali, provocando la risposta della pianta a particolari tipologie di stress. Per quanto possa risultare vantaggioso per una pianta fissare geneticamente strategie di tipo difensivo e accumulare in modo costitutivo un composto per difendersi da fattori ambientali sfavorevoli, questa linea di difesa potrebbe risultare troppo costosa in termini energetici, soprattutto in condizioni limitanti di luce, acqua e nutrienti. Ecco allora che in determinati casi è più vantaggioso per la pianta attivare le difese solo nel momento in cui le condizioni avverse si verificano, e per un periodo limitato di tempo. A oggi si pensa che coesistano tre modalità di risposta allo stress:

- rapido innalzamento del composto di difesa in caso di stress ambientale esterno;
- accumulo costitutivo del composto a livello costante e solitamente elevato;
- accumulo costitutivo di un composto difensivo ma inerte, e accumulo di una molecola

"attivatrice" in un comparto cellulare a se stante: solo a seguito di un evento ambientale avverso si ha l'attivazione della molecola bioattiva.

Si può quindi intervenire per *simulare* tali condizioni, provocando ad esempio lacerazioni meccaniche simili a quelle che si verificano nel corso degli attacchi dei patogeni, stress termico, irradiazione eccessiva artificiale; oppure si può produrre uno stimolo usando sostanze che partecipano alla cascata di attivazione di una risposta difensiva (etilene, acido abscissico (ABA), ecc.). Il metodo della manipolazione colturale, chiamato anche "*deliberate elicitation*", viene sempre più riconosciuto come una strategia di accumulo credibile ed efficace. Negli ultimi anni questa tecnica si è ampliata attraverso l'utilizzo di prodotti bio-inoculanti, come ad esempio alcuni rizobatteri, e con l'alterazione nella somministrazione di nutrienti in maniera da causare uno stress ossidativo (Nautiyal *et al.*, 2008).

Figura 25.
Influenza delle
pratiche colturali
sull'accumulo
(+) e sulla
diminuzione (-)
di specifici
composti di
interesse
(Bagnaresi *et al.*
2009).

Pianta	Composto	Trattamento
<i>Athrixia phylicoides</i>	Polifenoli	Fertilizzazione azotata (-)
Broccoli	Vari glucosinolati	Applicazioni di N e S (+-)
Broccoli.	Polifenoli	Irradiazione luce bianca e UV-A (+)
Capsicum	Capsaicina	temperatura, luce e fertilizzazione (+-)
Carota	Zuccheri, carotenoidi	Nutrizione azotata (+ -)
Cavolfiore	Componenti minerali	Applicazioni di N e S (+)
Cavolo	Luteina e beta carotene	30 °C (+), lunghezza fotoperiodo (+), irradianza (+-)
Cavolo	Carotenoidi	Quantità e forma di somministrazione dell' azoto (+-)
Cipolla	Quercetina, Acido ascorbico	Irradiazione UV-A (+)
<i>Crataegus</i>	Epicatechina, catechina, acido clorogenico, quercetina, rutina, etc	10 gg: freddo, siccità, immersione, stress meccanico (+)
<i>Eucalyptus cladocalyx</i>	Glicosidi cianogenici	Luce (+)
Fragola	Acido ascorbico, glutazione, flavonoli e antocianine	Atmosfera arricchita in CO2 (+)
Frutta e ortaggi	Vitamina C	Intensità luce (+-) Fertilizzazione azotata(-)
<i>Hypericum perforatum</i>	Ipericina	Luce (+) Azoto (-)
<i>Isatis tinctoria</i>	Glucobrassicina	Acido Jasmonico (+), fertilizzazione N-S (+)
Mela	Antocianine e flavonoli	Irradiazione UV (+)
Mela	Polifenoli	Densità dei frutti (<i>crop load</i>) (+)
<i>Mentha piperita</i>	Specifici oli essenziali	Endofiti (+) radiazioni UV (+-)
Mirtillo	Antocianine	ABA e metil jasmonato (+)
Narcissus	Galantamine	fertilizzazione azotata (+)
<i>Nasturtium officinale</i>	Carotenoidi, glucosinolati	Fertilizzazione N e S (+-)
Ortaggi e frutta	Polifenoli totali, potere antiossidante	Rizobatteri (+)
Orticole varie	Carotenoidi	Luce, temperatura e fertilità (+-)
Orticole varie	Carotenoidi	Specie-specifici stadio di maturazione (+-) condizioni di crescita (+-)
Pomodoro	GABA (ac. gamma -aminobutirrico),	Stress salino (+)
Prezzemolo	carotenoidi	Nutrizione azotata (+)
Rosmarino	Acido rosmarinico e carnosico	Irradiazione UV-B(+)
Senape	Polifenoli totali	Applicazioni di N (-) e S (+)
Spinacio	Luteina e beta carotene	10 °C (+) Lunghezza fotoperiodo (+) irradianza (+/-)
Vino	Polifenoli totali, stilbeni	Suoli più fertili e con maggiore capacità di campo polifenoli totali (+), stilbeni (+/-)
Vite	Zuccheri, polifenoli, antocianine e catechine	Stress idrico (+)

Per quanto riguarda i composti fenolici, condizioni limitanti di azoto portano in alcuni casi all'accumulo di polifenoli (Li *et al.*, 2008), un effetto causato anche da eccesso di irrigazione e di irradiazione (Bakhshi e Arakawa, 2006). Relativamente ai carotenoidi, in alcune specie vegetali il loro accumulo viene facilitato da una concimazione ricca in azoto e dall'aumento dell'irradianza, della temperatura e del fotoperiodo (Lefsrud *et al.*, 2005).

1.3.2. Accumulo di metaboliti secondari mediante l'utilizzo delle biotecnologie

Un alimento di origine vegetale può già contenere uno o più fitonutrienti, o essere naturalmente povero di sostanze indesiderate. Nella maggior parte dei casi, però, il prodotto deve essere "funzionalizzato", ossia modificato opportunamente con particolari tecniche. Da molte centinaia di anni le specie coltivate vengono selezionate per renderle più adatte alle esigenze dell'uomo. I primi agricoltori cercavano di migliorare le colture semplicemente scegliendo i semi delle piante che presentavano i caratteri desiderati; in seguito gli agronomi svilupparono schemi di incroci fra piante al fine di introdurre e mantenere determinati caratteri. Questi metodi *classici* hanno però tempistiche piuttosto lunghe, dal momento che l'introduzione di un gene (o un gruppo di geni) richiede una serie ripetuta di incroci, ed è limitata alle piante che possono incrociarsi sessualmente. Le biotecnologie consentono lo stesso risultati in forma molto più rapida: con l'avvento delle tecniche di ingegneria genetica si possono trasferire infatti geni tra specie vegetali non incrociabili o addirittura introdurre nel genoma geni di organismi non vegetali, ad esempio batterici. Ad oggi sono state prodotte numerose piante transgeniche, alcune delle quali già commercializzate.

Nella maggior parte dei casi i fattori introdotti consistono nella resistenza a parassiti, a malattie o a particolari erbicidi. L'opinione pubblica, soprattutto quella europea, è però in genere contraria all'utilizzo di alimenti geneticamente modificati, tanto che il 99% delle coltivazioni transgeniche è concentrata in pochi paesi: Stati Uniti (51%), Canada, Sud America (Argentina, Brasile e Paraguay), India, Cina, e Sud Africa. Nonostante ciò, l'utilizzo di *cultivar* transgeniche stanno aumentando significativamente a livello globale (Figura 26).

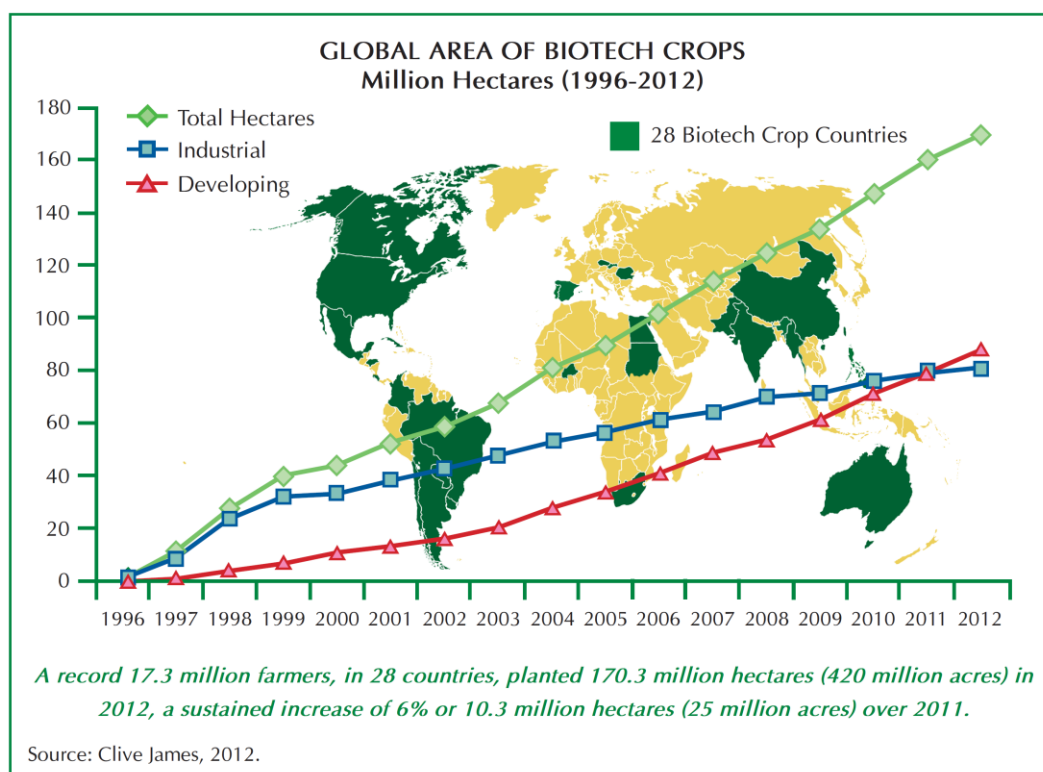


Figura 26. Espansione delle coltivazioni transgeniche dal 1996 a oggi (James, 2012).

Nel corso degli ultimi vent'anni molte scoperte a livello scientifico hanno permesso l'avvio dell'applicazione dell'ingegneria metabolica ai composti secondari: l'identificazione, il clonaggio e la caratterizzazione dei geni eucariotici e batterici coinvolti e la caratterizzazione biochimica di mutanti (in particolar modo negli organismi modello *A. thaliana* e *Solanum lycopersicum* di cui sono disponibili un ampio germoplasma, ampie collezioni di mutanti, di microarray a cDNA e oligonucleotidi) hanno permesso la creazione di piante transgeniche ad attività funzionale. Per l'ottenimento di queste piante si possono seguire prevalentemente due strategie: la sovra-espressione degli enzimi chiave nella biosintesi del metabolita di interesse (inserendo geni esogeni o fattori di trascrizione), e il silenziamento dei geni coinvolti nel suo catabolismo attraverso l'utilizzo della tecnologia del RNA antisenso o con mutazioni indotte.

1.3.2.1. Il pomodoro

Il pomodoro, una specie ortiva di grande importanza sia per il suo esteso utilizzo, sia per il suo eccellente valore nutrizionale essendo la più importante fonte di licopene, è stato ingegnerizzato per aumentare il contenuto dei composti bioattivi sia nella buccia che nella polpa. Per quanto riguarda i composti fenolici, essi non sono presenti in quantità sufficienti a conferire benefici alla salute umana. Nella buccia l'enzima limitante la sintesi delle antocianine è risultato essere la CHI, in quanto la CHS, la F35H e la FLS sono espresse a livelli elevati: è bastato quindi inserire il gene della CHI di petunia regolata dal promotore 35S del virus del mosaico del cavolfiore per ottenere un incremento di 78 volte il contenuto di tali composti (Miur *et al.*, 2001). La buccia non rappresenta però più del 5% del frutto, quindi il contenuto totale di questi composti funzionali in tale pomodoro transgenico non supera i 300 $\mu\text{g g}^{-1}$ di peso fresco. Nella polpa il discorso è completamente diverso, in quanto la quasi totalità dei geni della via metabolica è espressa in condizioni normali a bassi livelli. In questo caso ottimi risultati sono stati ottenuti da Butelli e collaboratori che hanno inserito nel genoma di pomodoro due fattori di trascrizione di bocca di leone, *Del* e *Ros1*, sotto il controllo del promotore frutto-specifico E8. Nonostante la pianta presenti un normale stato di crescita vegetativa, il frutto comincia a sintetizzare antocianine alla fine dello stadio verde e continua ad accumulare questi pigmenti durante tutta la maturazione, ottenendo alla fine un frutto violaceo sia per quanto riguarda la buccia sia per la polpa (Figura 27). Il contenuto di antocianine nella bacca si aggira intorno ai 3 mg g^{-1} di peso fresco.



Figura 27. Pomodoro *MicroTom* esprime i fattori di trascrizione *Del* e *Ros1* sotto il controllo del promotore E8. a) Mappa della regione T-DNA del vettore binario usato per la trasformazione. b) Analisi fenotipica dei frutti. c) Differenti stadi di maturazione del pomodoro transgenico. d) Immagine della bacca intera e sezionata del pomodoro selvatico e di quello transgenico (Butelli *et al.*, 2008).

Il pomodoro rappresenta d'altra parte una specie modello per lo studio della biosintesi dei carotenoidi nei frutti. Uno dei primi esperimenti effettuati per cercare di aumentare il contenuto di licopene nelle bacche è stato effettuato a metà degli anni 90 dal gruppo di ricerca del professor Fray che creò piante transgeniche overesprimenti la *PSYI* sotto il controllo del promotore *35S*: tali pomodori mostravano un accumulo del metabolita di interesse nelle prime fasi di sviluppo del frutto, ma il contenuto finale era minore che nel *wild type*. Le piante contenenti il transgene presentavano inoltre una serie di fenotipi pleiotropici, tra i quali il silenziamento per omologia del gene endogeno della *PSYI* che causava frutti albini e piante nane a causa della riduzione dei livelli di gibberelline (Fray *et al.*, 1995). Successivamente si è riusciti a aumentare i livelli di licopene mediante l'espressione di una fitoene sintasi del batterio *Erwinia* sotto il controllo del promotore frutto-specifico della poligalatturonasi, consentendo di aumentarne il contenuto fino a 4 volte; raddoppiati sono risultati nel contempo anche i livelli di fitoene, licopene e β -carotene (Fraser *et al.*, 2002).

A dispetto delle sue proprietà antiossidanti, il licopene non presenta però attività pro vitamina A. Molteplici tentativi sono stati quindi effettuati negli ultimi anni per cercare di aumentare il contenuto di β -carotene. Sono state ottenute ad esempio piante trasformate con il gene codificante la *LCYB* di pomodoro posto sotto il controllo del promotore *35S*: nei frutti di queste piante la quasi totalità del licopene viene convertita in β -carotene, che aumenta di quasi 32 volte rispetto al controllo (D'Ambrosio *et al.*, 2004). I livelli di espressione di *LYCB* sono stati alterati anche utilizzando metodologie di trasformazione dei cloroplasti, ad esempio inserendo nel plastidio il gene di *Erwinia herbicola* che codifica per una licopene β -ciclasi (*CrtY*), portando ad un aumento di β -carotene nei frutti di 4 volte senza influire sul contenuto totale di carotenoidi (Wurbs *et al.*, 2007). La trasformazione plastidiale sembra quindi essere una strategia vincente anche perchè presenta il vantaggio di non generare quei fenomeni di silenziamento epigenetico che possono avvenire con la trasformazione nucleare. Numerosi tentativi sono stati effettuati anche per cercare di aumentare il contenuto delle xantofille. La sovraespressione dei geni *LYCB* di *A. thaliana* e *CHY* di peperone sotto il controllo del promotore *PDS* ha permesso di aumentare il contenuto di xantofille, in particolare zeaxantina e β -criptoxantina, di 8 volte rispetto al controllo (Dharmapuri *et al.*, 2002). Infine sono stati effettuati esperimenti inserendo i geni precoci nella biosintesi dei terpenoidi: ad esempio con la sovraespressione del gene *DXS* batterico si è ottenuto un raddoppio del contenuto di carotenoidi totali, con il fitoene a rappresentare il composto ad incremento maggiore (Morris *et al.*, 2006). Questi risultati suggeriscono un possibile controllo a *feed-back* del fitoene sugli enzimi a valle del *pathway*.

1.3.2.2. Il riso

Il riso rappresenta l'alimento base per circa la metà della popolazione mondiale e in alcuni paesi come l'India orientale e le Filippine apporta più del 50% delle calorie consumate giornalmente. Le popolazioni più povere dell'Asia arrivano a consumare più di 200 kg di riso *pro capite* all'anno. Tale alimento, se consumato privo di tegumento esterno, è quasi completamente privo di carotenoidi provitaminici, e gli individui che attuano una tale dieta possono soffrire di disturbi legati alla carenza di retinolo. La carenza di vitamina A, essenziale per il funzionamento del sistema immunitario e responsabile della protezione delle membrane cellulari, colpisce più di 100 milioni di bambini in età infantile e milioni di donne in stato di gravidanza. Una dieta povera di tale vitamina aumenta d'altra parte i rischi di infezioni, di cecità notturna, e, nei casi più gravi, provoca cecità totale. Si stima che ogni anno un'alimentazione priva di vitamina A porti alla morte di oltre un milione di bambini.

Nel germoplasma di riso non esistono varietà a elevato contenuto di carotenoidi nell'endosperma e quindi l'unica strategia percorribile per ottenere il loro accumulo sembra essere quella dell'ingegneria genetica. Il primo esperimento attuato per ingegnerizzare la via

metabolica di questi composti secondari risale alla fine degli anni novanta, quando il gene della *PSY* di narciso posto sotto il controllo di un promotore endosperma-specifico è stato inserito nel genoma di riso mediante trasformazione biobalistica (Burkhardt *et al.*, 1997). I chicchi ottenuti presentavano un accumulo di fitoene e hanno costituito il punto di partenza per l'ottenimento del famoso "*Golden Rice*". In quest'ultimo sono stati inseriti i geni *PSY* e *LYCB* di narciso posti sotto il promotore endosperma-specifico della glutelina e il gene batterico *CrtI* sotto in controllo del promotore costitutivo *35S*: sorprendentemente i semi esprimenti i soli geni *PSY* e *CrtI* avevano elevati contenuti di β -carotene ($1.6 \mu\text{g g}^{-1}$ di peso secco), luteina e zeaxantina e bassissimi livelli di licopene, dimostrando che *LYCB* e *CHY* sono espressi in maniera costitutiva (Ye *et al.*, 2000). Visto che il gene *PSY* sembrava essere in riso lo *step* limitante della via biosintetica, si è cercato di ovviare al problema inserendo il gene vegetale capace di fornire la maggiore quantità di fitoene, quello di grano. Si è ottenuto in questo modo il "*Golden Rice 2*" che contiene nel genoma, oltre al gene *PSY* di grano, il gene batterico *CrtI* posto sotto il controllo di un promotore endosperma-specifico: i semi così ottenuti possiedono un contenuto di carotenoidi totali di $36 \mu\text{g g}^{-1}$ di peso secco, di cui la maggior parte composti da β -carotene ($31 \mu\text{g g}^{-1}$ di peso secco) (Paine *et al.*, 2005). L'utilizzo di questa pianta transgenica potrebbe sopperire alle carenze alimentari che colpiscono le aree povere del pianeta in quanto, ipotizzando un fattore di conversione del β -carotene in retinolo pari a 6, basterebbe mangiare 80 g di *Golden Rice 2* per raggiungere il 50% del fabbisogno giornaliero di un individuo adulto. Visto l'impatto benefico che questa pianta potrebbe avere sulla popolazione mondiale, gli studi stanno proseguendo per ottimizzarla attraverso l'eliminazione dei geni marcatori di resistenza agli antibiotici e per trasferire il costrutto alla *ssp indica*, più adatta alla coltivazione nelle aree tropicali.

Per quanto riguarda i flavonoidi si sono ottenuti ottimi risultati trasformando piantine di riso con due geni regolatori di mais; è noto infatti che i geni appartenenti alla famiglie geniche *C1* (codificante fattori di trascrizione *Myb*) e *R* (codificanti fattori di trascrizione di tipo *helix-loop-helix*) sono in grado di stimolare l'espressione dei geni della via biosintetica dei flavonoidi (Quattrocchio *et al.*, 1998). Ingegnerizzando il riso con i geni *C1* e *R-S* posti sotto il controllo di promotori endosperma-specifici, si sono ottenuti chicchi sovraesprimenti quasi tutti i geni del *pathway* dei flavonoidi, con un aumento del contenuto di tali composti di 10 volte rispetto al non trasformato (12mg g^{-1} di peso secco; Shin *et al.*, 2006). Tale varietà transgenica, nutrizionalmente molto valida, non contiene però antocianine in quanto il gene *ANS* non viene espresso.

1.3.2.3. La patata

La patata è attualmente al quarto posto tra le colture di importanza primaria per l'uomo dopo grano, riso e mais, e per questo negli ultimi anni è stata sottoposta ad un importante programma di arricchimento del contenuto di carotenoidi nel tubero. La patata è infatti ricca in vitamina C e altri micronutrienti, ma è povera in carotenoidi, il cui contenuto totale nella maggior parte delle qualità commerciali non supera i $2 \mu\text{g g}^{-1}$ di peso fresco. Essendo una specie molto utilizzata nei paesi in via di sviluppo, dove l'area coltivata supera i 18 milioni di ettari e dove vengono prodotti circa il 40% dei tuberi a livello mondiale, si è cercato di arricchirla in β -carotene per aumentare l'apporto di composti pro-vitaminici nella dieta delle popolazioni. Un esperimento che ha portato buoni risultati è stato effettuato nel 2005 quando un gene batterico che codifica per una fitoene sintasi (*CrtB*) è stato posto sotto il controllo di un promotore tubero-specifico e inserito nella specie coltivata *Solanum tuberosum*, portando a un aumento del contenuto totale di carotenoidi fino a $35 \mu\text{g g}^{-1}$ di peso secco, con una significativa percentuale di β -carotene ($11 \mu\text{g g}^{-1}$ di peso secco) (Ducieux *et al.*, 2005). Successivamente l'inserimento di un breve *pathway* di tre geni (*CrtB*, fitoene desaturasi *CrtI* e *CrtY*) della via biosintetica dei carotenoidi di *Erwinia* sotto il controllo del promotore tubero-specifico *PAT* ha portato all'ottenimento di un tubero a pasta gialla intensa, denominata

"golden potato". Questa patata ha un contenuto di carotenoidi totali 20 volte maggiore rispetto al genotipo di partenza ($114 \mu\text{g g}^{-1}$ di peso secco) e un contenuto di β -carotene di $47 \mu\text{g g}^{-1}$ di peso secco (3600 volte più alto rispetto al controllo): se consideriamo un fattore di conversione di 1:6 tra β -carotene e ER equivalenti, 250 g di questo tubero apporterebbero il 50% del fabbisogno giornaliero di vitamina A, contro i 700 kg necessari nel caso di una patata *wild type* (Diretto *et al.*, 2007a). Questo rappresenta a oggi il più alto incremento di carotenoidi ottenuto in specie di grande interesse agronomico.

Buoni risultati per quanto riguarda il contenuto di β -carotene sono stati ottenuti anche utilizzando una strategia di silenziamento dei geni *CHY1* e *CHY2* nel tubero, determinando in tal modo un incremento di 38 volte rispetto al controllo a fronte di un aumento di 4.5 volte dei carotenoidi totali (Diretto *et al.*, 2007b).

Sebbene i tuberi di patata contengano già elevate concentrazioni di composti fenolici, sono stati effettuati negli ultimi anni esperimenti atti ad aumentarne ancora di più la presenza. A tale scopo sono state trasformate piante con i geni considerati regolatori della via biosintetica, ovvero *CHS*, *CHI*, *DFR*, singolarmente o in combinazione (Lukaszewicz *et al.*, 2004; Aksamit-Stachurska *et al.*, 2008). I risultati ottenuti sono stati incoraggianti e la pianta transgenica accumulante la maggior quantità di flavonoidi è risultata quella ingegnerizzata con il solo gene della *DFR* controllato dal promotore tubero-specifico *B-33*; le piante sono state testate anche contro il patogeno Gram negativo *E. carotovora* risultando di gran lunga più resistenti rispetto al *wild type*. Nello stesso lavoro è stato analizzato l'effetto di queste patate viola nella dieta del topo evidenziando in animali alimentati con tale prodotto una riduzione del livello delle LDL e dei trigliceridi nel sangue (Kostyn *et al.*, 2013).

1.3.2.4. Altre specie vegetali

Grazie alla facilità di manipolazione genetica e la completa conoscenza del genoma, *A. thaliana* e tabacco sono state oggetto di numerosi esperimenti di ingegneria metabolica. In tabacco l'espressione sotto il controllo di un promotore costitutivo del gene *CrtI* di *Erwinia uredovora* ha generato un aumento della sintesi del β -carotene (Misawa *et al.*, 1993), mentre la trasformazione con promotore seme-specifico della β -carotene chetolasi di *Haematococcus* ha indotto un accumulo di chetocarotenoidi nei semi (Stalber *et al.*, 2003). La sovraespressione del gene *CHY* ha conferito una maggior tolleranza a condizioni di stress da luce intensa e temperatura in entrambe le specie (Davison *et al.*, 2002). Per quanto riguarda piante di interesse agronomico, l'espressione di una chetolasi esogena ha permesso di aumentare l'accumulo di chetocarotenoidi in foglie e radici di carota (Jayaraj *et al.*, 2008), mentre elevati livelli di β -carotene sono stati ottenuti in semi di colza mediante la trasformazione con il gene *CrtB* (Shewmaker *et al.*, 1999). In questi semi il contenuto di β -carotene è aumentato di 300 volte rispetto al controllo, e l'elevata solubilità del composto nell'olio quest'ultimo potrebbe essere utilizzato per prevenire la VAD.

Gli isoflavoni hanno un importante ruolo come fitoestrogeni e possono essere utilizzati per prevenire e curare malattie dovute a scompensi ormonali. Questa categoria di composti fenolici è presente quasi esclusivamente nei legumi, nei quali il primo enzima regolativo della via è rappresentato dall'isoflavone sintasi (ISF). Il gene *IFS* è stato utilizzato per cercare di ingegnerizzare alcune specie di altre famiglie al fine ultimo di indurre la sintesi degli isoflavoni. Il primo successo è stato ottenuto da un gruppo di ricercatori statunitensi che trasformando piante di *A. thaliana* con il gene *IFS* di soia posto sotto il controllo del promotore *35S* sono riusciti ad ottenere la conversione della naringenina in genisteina (Jung *et al.*, 2000). Se questo risultato fosse raggiunto anche in piante di interesse agronomico, esse acquisterebbero un elevato valore aggiunto.

1.4. Il catabolismo dei carotenoidi: le diossigenasi

Il contenuto finale di carotenoidi nella pianta è determinato, oltre che dalla velocità di sintesi, anche dalla loro degradazione, che può essere in alcuni casi determinante: si è infatti spesso osservato che tessuti con la medesima attività biosintetica contengono quantità molto diverse di carotenoidi (Sandmann *et al.*, 2006). Tale degradazione può essere di tipo enzimatico o non-enzimatico: quest'ultima modalità prevede la rottura non selettiva della catena polienica, imputabile a fattori abiotici quali luce e calore, portando alla formazione di un'ampia gamma di prodotti d'ossidazione (Glória *et al.*, 1993). L'ossidazione del β -carotene avviene a temperature non fisiologiche, e nei tessuti verdi delle piante il suo *bleaching* è perlopiù riconducibile a fotoossidazione: la sua struttura chimica predispone particolarmente la dislocazione del pigmento, che è presente in entrambi i fotosistemi e quindi esposto agli effetti ossidanti della luce (Sandmann *et al.*, 2006). La degradazione enzimatica rimane però il fattore più incidente. Un esempio eclatante a questo proposito è quello del crisantemo, che può presentare petali bianchi e gialli in funzione del diverso contenuto di carotenoidi; la loro concentrazione finale non è però correlata a un differente livello di carotenogenesi, ma alla specifica espressione nei petali bianchi di un gene che codifica per una diossigenasi (*CmCCD4a*), responsabile della degradazione di tali composti. La prova è stata ottenuta effettuando esperimenti di silenziamento del gene codificante tale enzima: le piante transgeniche mostravano un cambiamento drastico della pigmentazione dei petali, di colore giallo intenso (Figura 28; Ohmiya *et al.*, 2006).

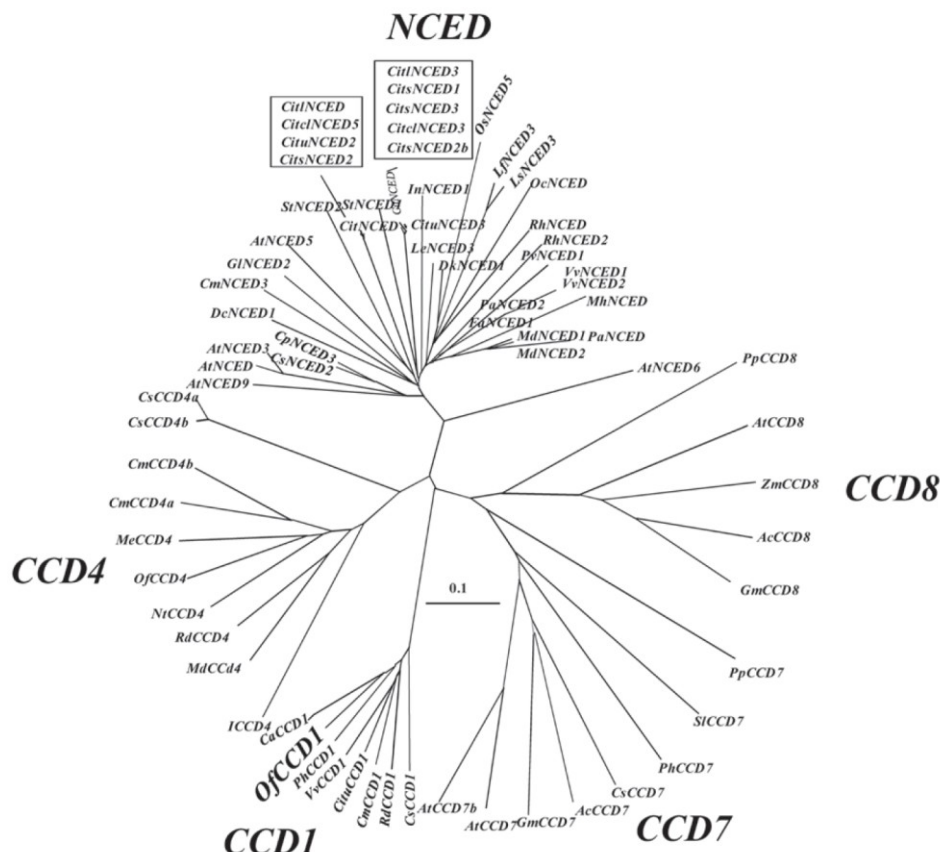


Figura 28. Fiori di *Chrysanthemum morifolium*: a sinistra il genotipo *wild-type*, a destra una linea in cui il gene *CmCCD4* è stato silenziato mediante tecnologia RNAi (Ohmiya *et al.*, 2006).

In generale, gli enzimi che degradano i carotenoidi vengono classificati in base al substrato e alla posizione di taglio. Le *Carotenoid Cleavage Oxygenases* (CCO) tagliano il doppio legame interno C-C dei carotenoidi in corrispondenza di aldeidi o chetoni, utilizzando l'ossigeno molecolare come co-substrato e il Fe^{++} come cofattore (Kloer e Schulz, 2006). Le *9-cis-epoxyhydroxycarotenoid dioxygenases* (NCED) sono una sottoclasse di diossigenasi che idrolizzano il legame in posizione C-11,12 di violaxantina e neoxantina generando la xantoxina, il precursore dell'ABA. La prima NCED fu scoperta nel mutante *viviparus14* ABA-deficiente di mais (VP14, Swartz *et al.*, 1997). Successivamente sono state identificate numerose altre NCED in varie specie di piante come pomodoro (Burbidge *et al.*, 1999), fagiolo (Qin e Zeevaart, 1999), avocado e *A. thaliana* (Iuchi *et al.* 2001). Nel genoma di *A. thaliana* sono presenti nove diossigenasi, cinque delle quali (2,3,5,6 e 9) sono state classificate come NCED in quanto risultano essere strettamente correlate con VP14 e sono

implicate nella sintesi di ABA, catalizzando la rottura del legame 11,12 (11',12') dei 9-cis-epossicarotenoidi. Le quattro rimanenti hanno scarsa identità di sequenza genetica con le NCED e ne differiscono anche per caratteristiche biochimiche come la diversa specificità di substrato: esse sono state denominate *carotenoid cleavage dioxygenases* (CCD: CCD1, CCD4, CCD7 e CCD8). Dal punto di vista filogenetico, la famiglia delle CCD è antica e si ritrova in batteri, animali e piante, che mostrano il sistema più complesso (Bouvier *et al.*, 2005). Nonostante le reazioni catalizzate siano apparentemente simili, le sequenze delle diverse forme di CCD divergono in modo anche marcato, come nel caso di *AtCCD7* e *AtCCD8*. Le relazioni tra le sequenze dei cDNA di *Malus domestica* (*MdCCD4*), *Chrysanthemum morifolium* (*CmCCD4*), *Rosa damascena* (*RdCCD4*) e *Osmanthus fragrans* (*OfCCD4*) con quelle di NCED di altre specie vegetali è riportata in Figura 29 (Baldermann *et al.*, 2012).

Figura 29.
Albero filogenetico senza radice delle sequenze dei geni delle CCD4s e delle NCEDs di varie specie vegetali. La barra rappresenta 0.1 unità di distanza filogenetica (*nucleotide substitution per position*) (Baldermann *et al.*, 2012).



Questa variabilità di sequenza corrisponde a differenti proprietà biochimiche, selettività di substrato, *pattern* d'espressione e organizzazione genomica. La famiglia genica di *A. thaliana* (CCD1, NCED2, NCED3, CCD4, NCED5, NCED6, CCD7, CCD8 e NCED9) è stata presa come riferimento, e gli ortologi di altre specie sono classificati sulla base dell'omologia con i suoi membri (Huang *et al.*, 2009).

Le reazioni catalizzate da queste diossigenasi producono apocarotenoidi, che a loro volta possono subire modifiche quali ossigenazioni, isomerizzazioni e ulteriori tagli a livello dei doppi legami: tale processo è definito come "rimodellamento ossidativo". La *AtCCD1* catalizza l'ossidazione del legame 9-10 (9'-10') di una grande varietà di carotenoidi, dimostrando una elevata specificità del legame che attacca, ma una altrettanto elevata promiscuità di substrato; il prodotto primario di questa reazione è il β-ionone, composto volatile a 13 atomi di carbonio, che conferisce aroma ai frutti (Schwartz *et al.*, 2001). La *AtCCD4*, posizionata tra *AtCCD1* e le *AtNCED* nell'albero filogenetico, sembra apparentemente più correlata alle NCED che alle CCD. Nel corso degli ultimi anni sono state caratteriz-

zate anche la CCD7 e la CCD8, che producono un apocarotenoide coinvolto nella regolazione dello sviluppo delle ramificazioni (Booker *et al.* 2004). Tra le diossigenasi si conoscono altre due tipologie di enzimi caratterizzate da assoluta specificità di substrato: la zeaxantina diossigenasi (ZCD) e la licopene diossigenasi (LCD), che tagliano rispettivamente il C-7,8 e C-5,6 degli omonimi substrati (Bouvier *et al.*, 2003a; Bouvier *et al.*, 2003b).

Schematizzando, dunque, se le CCD1 e le CCD4 sembrano perlopiù coinvolte nella formazione di prodotti volatili, le CCD7 e CCD8 intervengono nella formazione di apocarotenoidi con funzione ormonale; le NCED, che risultano in grado degradare unicamente i 9-cis-epossicarotenoidi (neoxantina e violaxantina), sono invece coinvolte nella biosintesi dell'ABA (Figura 30). Tale ormone, responsabile della risposta ad alcuni tipi di stress e dello sviluppo del seme, deriva dall'apocarotenoide C-15-xantossina, prodotto dall'attività enzimatica delle NCED (Schwartz *et al.*, 1997).

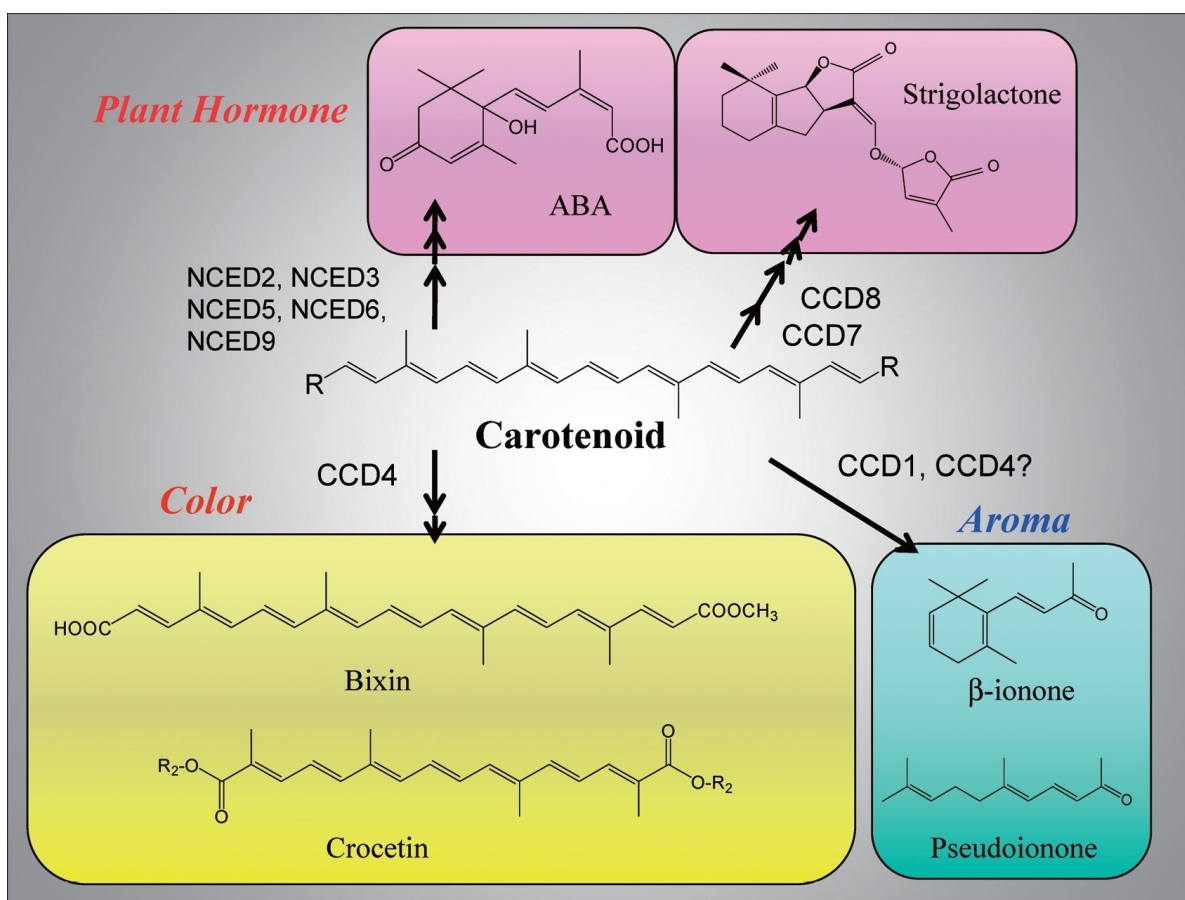
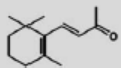

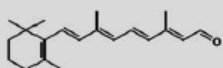
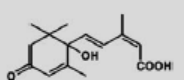
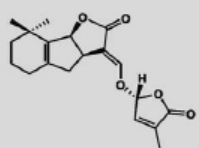
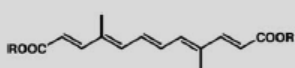
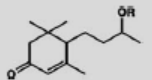

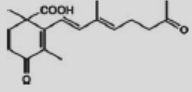


Figura 30. Rappresentazione schematica delle funzioni delle NCEDs e delle CCDs nelle pianta (Ohmiya, 2009).

Oltre all'ABA altre molecole-segnaie derivanti dall'ossidazione dei carotenoidi sono rappresentate dagli strigolattoni: identificati per la prima volta in *A. thaliana*, sono il prodotto del "rimodellamento ossidativo" dei prodotti della CCD7 e CCD8. In particolare la *AtCCD7* catalizza un taglio asimmetrico del β -carotene in posizione 9'-10' producendo 10'-apo- β -carotene-10-ale e β -ionone. La *AtCCD8* utilizza come substrato l'apocarotenoide prodotto da *AtCCD7* e lo taglia in posizione 13-14 producendo 13-apo- β -caroten-13-one e una dialdeide a 9 atomi di carbonio (Aldrige *et al.* 2006a). Questi composti svolgono un ruolo cruciale nelle interazioni micorriziche (Bouwmeester *et al.*, 2007), e sembrano coinvolti nella crescita vegetativa della pianta, bloccando le ramificazioni laterali: l'inibizione di questi enzimi porta quindi allo sviluppo di rami ascellari (Bouvier *et al.*, 2005). In un lavoro pubblicato su *Nature*

produzione di strigolattoni non è risultata correlabile a una riduzione dei livelli di ABA, e ciò sembra dimostrare che l'ormone è in grado di influenzare la produzione di questi apocarotenoidi, ma non viceversa.

Un altro importante prodotto del catabolismo dei carotenoidi è dato dal retinale (15-apo- β -carotenale) e dai suoi derivati, che nell'uomo sono fondamentali per la funzione visiva. Per quanto riguarda i composti volatili, le diossigenasi portano alla formazione anche di norisoprenoidi a basso peso molecolare che contribuiscono a dare fragranza e aroma a fiori e frutti. Questi *volatile organic compounds* (VOC) derivano principalmente dall'azione della CCD1 e della CCD4, che sono in grado di metabolizzare un'ampia gamma di substrati (Brandi *et al.*, 2011). Gli apocarotenoidi β -ionone e β -damascenone sono componenti di molte fragranze dei frutti e presentano una soglia di percezione di appena 0,007 e 0,002 ppb, rispettivamente. Entrambi appartengono ai megastigmani, norisoprenoidi C-13 caratterizzati da un particolare scheletro carbonioso: il taglio in di tale struttura in specifiche posizioni origina altri norisoprenoidi volatili e percettibili all'olfatto (Huang *et al.*, 2009a; Winterhalter e Rouseff, 2002). Altri apocarotenoidi in grado di conferire profumo sono il β -ciclocitrale, il geraniale, il geranil-acetone, il theaspirone e lo pseudoionone (Auldrige *et al.*, 2006b). Il colore e la fragranza dei fiori e dei frutti hanno un ruolo prettamente ecologico, rappresentando la base per l'attrazione di specie impollinatrici e dispersori di semi, o la repulsione dei predatori (Figura 32) (Schwartz *et al.*, 2001; Bouvier *et al.*, 2005). I composti α e β -ionolo sono in grado di attrarre ad esempio l'insetto *Bratocera latifrons* (Mc Quate e Peck 2001), mentre il β -ionone è stato dimostrato essere un ottimo attrattivo per gli scarafaggi (Donaldson *et al.*, 1990).

Apocarotenoids influence a wide variety of biological processes.			
Apocarotenoid	Known biological activity	Related CCD	Reference(s)
	β -ionone	Pollinator attractant, fruit or vegetable flavor	CCD1, CCD7, β -dioxII [8,23,30**]
	β -cyclocitral	Fruit or vegetable flavor	? [22]
	Retinal retinoic acid (OH)	Visual chromophore, hormone	β -dioxI, ACO, β -dioxII [7,8,53**]
	Abscisic acid	Phytohormone required for dormancy and drought tolerance	NCED2, NCED3, NCED5, NCED6, NCED9, VP14 [4,5,16,17]
	Strigolactone	Fungal growth stimulant, germination stimulant	NCED? [55,56]
	Mycorradicin	Antifungal properties	CCD1? [57]
	Blumenin	Antifungal properties	CCD1? [57]
	MAX product	Plant growth regulator	CCD7/MAX3, CCD8/MAX4 [30**,33]
	Trisporic acid	Pheromone	? [58]

The CCDs responsible for the production of many apocarotenoids are known in many cases and others have been implied.

Figura 32. Esempi di processi biologici influenzati dagli apocarotenoidi derivanti dal catabolismo dei carotenoidi (Auldrige *et al.*, 2006b).

1.4.1. La famiglia delle *carotenoid cleavage dioxygenase 1* (CCD1)

Ogni sotto-famiglia di diossigenasi raggruppa enzimi accomunati da molti aspetti: la CCD1 riunisce gli enzimi citosolici che tagliano in modo specifico e simmetrico il doppio legame in posizione 9,10 / 9',10' di numerosi carotenoidi, anche se recentemente è stata rilevata un'attività catalitica sul licopene in posizione 5,6 / 5',6' (Vogel *et al.*, 2008). *In vitro* è stata accertata l'abilità di processare un numero molto elevato di substrati tra i quali fitoene, ζ -carotene, licopene, β -carotene, δ -carotene, zeaxantina, violaxantina e neoxantina: per questa bassa specificità di substrato vengono definiti "enzimi promiscui" (Auldridge *et al.*, 2006b). La CCD1 scinde il β -carotene in due molecole di β -ionone e una dialdeide C-14 centrale (Figura 33); la simmetria di taglio suggerisce che l'enzima agisca sotto forma di dimero, tagliando così contemporaneamente le due estremità del carotenoido (Schwartz *et al.*, 2001). La reazione, secondo il meccanismo proposto da Schmidt e collaboratori, avverrebbe mediante formazione di un intermedio diossietanico (Figura 34) ed è regioselettiva (Schmidt *et al.*, 2006).

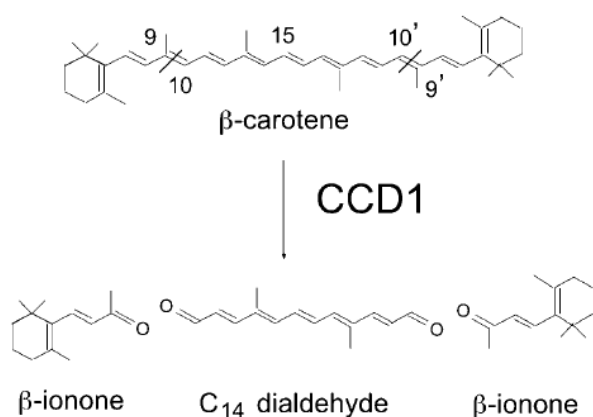


Figura 33. Meccanismo di taglio simmetrico del β -carotene proposto per la CCD1 (Simkin *et al.*, 2004a).

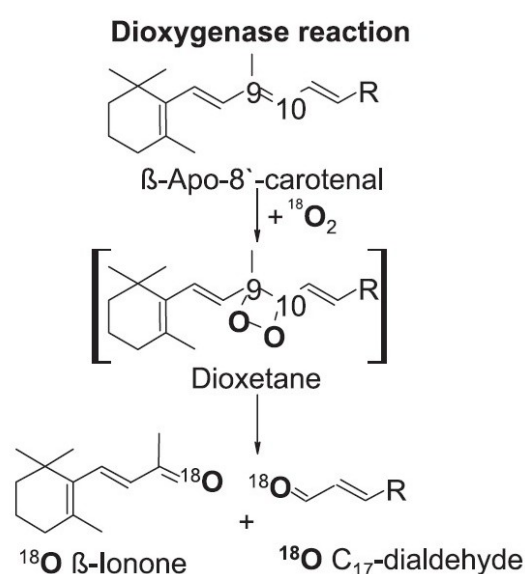


Figura 34. Meccanismo proposto per il taglio ossidativo del β -apo-8'-carotenale da parte di AtCCD1 (Schmidt *et al.*, 2006).

Geni ortologhi della CCD1 di *A. thaliana* sono stati trovati in molte specie vegetali tra le quali petunia (Simkin *et al.*, 2004b), pomodoro (Simkin *et al.*, 2004a), vite (Mathieu *et al.*, 2005), limone (Kato *et al.*, 2006), melone e rosa (Huang *et al.*, 2009b). In petunia, vite e pomodoro l'espressione della CCD1 è stata correlata ad un aumento nell'emissione degli apocarotenoidi volatili: questo sottolinea come tale classe di enzimi abbia un ruolo fondamentale nel conferimento del caratteristico aroma di alcuni fiori e frutti. In alcuni casi la soppressione di tale enzima non influenza però il contenuto totale dei carotenoidi nei tessuti della pianta, fenomeno che potrebbe essere dovuto alla sua localizzazione citosolica che limita l'accesso ai substrati, localizzati principalmente nei cromoplasti. In *A. thaliana* la CCD1 è l'unica CCD che non presenta il peptide di transito per i plastidi e la sua azione sembra limitata ai carotenoidi che sono localizzati nello strato esterno di tali organuli; in specie come pisello (Markwell *et al.*, 1992) e spinacio una non trascurabile parte di β -carotene è accumulata proprio in questo comparto. In un recente studio è stato selezionato un genotipo di *A. thaliana* con una mutazione puntiforme nel gene *AtCCD1* che rende inattiva la proteina. Il

contenuto e la composizione dei carotenoidi nelle foglie non ne sono risultati influenzati; al contrario nel seme, dove nel *wild-type* il carotenoide più abbondante risulta essere la luteina, con una presenza significativa anche delle xantofille zeaxantina e antheroxantina, il mutante presenta un aumento del 37% del contenuto totale di carotenoidi, con un incremento di 2 volte di violaxantina e di 4 volte di neoxantina (Auldrige *et al.*, 2006a). Questo potrebbe dipendere dal fatto che nei semi maturi, dove la rottura degli organelli associata all'essiccazione porta alla liberazione di tali composti, il catabolismo ne viene incrementato. Analizzando l'espressione del mRNA si nota come esso sia presente in tutti i tessuti con maggior espressione nei fiori e nelle silique. Per confermarne la localizzazione subcellulare si è utilizzato un prodotto di fusione con la GFP evidenziando come la proteina sia effettivamente citoplasmatica (Figura 35).

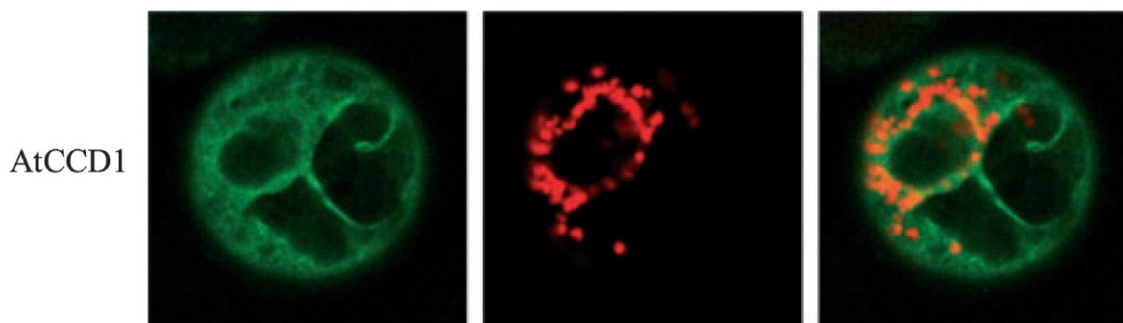


Figura 35. Localizzazione cellulare della *AtCCD1*: l'espressione della proteina di fusione con la GFP risulta diffusa nel citosol di protoplasti di tabacco (a sinistra) e del tutto differente rispetto a quella di un marcatore cloroplastico (al centro). A destra è riportata l'immagine complessiva (Auldrige *et al.*, 2006a).

Il catabolismo dei carotenoidi nel seme potrebbe svolgere una funzione protettiva associata alla sintesi degli apocarotenoidi, alcuni dei quali presentano caratteristiche antimicrobiche (Fester *et al.* 1999). Uno studio più recente ha dimostrato che l'attività *in vivo* della CCD1 può avere un ruolo anche nei sistemi simbiotici: quando l'enzima di *Medicago truncatula* (*MtCCD1*) viene soppresso, nelle micorrize si nota una riduzione di quasi il 50% del contenuto degli apocarotenoidi C14 e C13, mentre si evidenzia un incremento dei C27. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che l'enzima in questo sistema non catalizza la rottura del legame dei carotenoidi da C40 a C13 e C27, ma solo quello degli apocarotenoidi da C27 a C13 e C14 (Floss *et al.*, 2008). Su questa base si potrebbe ipotizzare un primo taglio dei substrati all'interno dei plastidi e una fuoriuscita nel citosol degli apocarotenoidi C27, che a questo punto potrebbero venire a contatto con la CCD1 e essere a loro volta ulteriormente degradati (Floss *et al.*, 2009).

1.4.2. La famiglia delle *carotenoid cleavage dioxygenase 4* (CCD4)

La famiglia della CCD4 rimane la meno studiata e caratterizzata, e il suo ruolo nella pianta è ancora da chiarire. Come già ricordato il silenziamento della CCD4 di crisantemo (*CmCCD4a*) ha dimostrato come questo enzima sia fondamentale nella degradazione dei carotenoidi presenti nei petali (Ohmiya *et al.*, 2006); l'enzima non è stato però caratterizzato. Ci sono evidenze che la CCD4 sia localizzata nei plastoglobuli, strutture ovali o tubolari molto ricche in lipidi presenti in tutti i plastidi, le cui funzioni specifiche sono ancora da chiarire (Figura 36). Oltre ai lipidi essi contengono chinoni, α -tocoferolo e, nei cromoplasti, anche i carotenoidi. I plastoglobuli sono presenti in maniera ubiquitaria in tutti i tipi di plastidi (Vishnevetsky *et al.*, 1999); in quelli dei cromoplasti, dove è noto l'immagazzinamento dei carotenoidi, sono stati identificati enzimi specifici per la biosintesi di tali composti (Ytterberg

et al., 2006), compresa la CCD4, che sembra giocare un ruolo fondamentale nel catabolismo dei carotenoidi indotto dal buio: nelle piante sottoposte a lunghi periodi di oscurità i livelli di espressione del gene infatti raddoppiano. Lo stesso enzima nei cloroplasti è in grado di interagire con la proteina "zinc-finger" VAR3 (Næsted *et al.*, 2004). Le proteine più importanti nei plastoglobuli sono le fibrilline, di cui in *A. thaliana* sono stati identificati 13 geni (Laizet *et al.*, 2004). Le fibrilline sono composte da una o più regioni idrofobiche che sembrano avere un ruolo nella stabilizzazione dei globuli e nella prevenzione della coalescenza (Deruere *et al.*, 1994); queste proteine non hanno attività enzimatica ma solo strutturale. Alcuni plastidi, in particolare i cloroplasti, vengono convertiti in cromoplasti durante la morfogenesi dei fiori o la maturazione dei frutti: durante questo processo si osserva la disgregazione delle membrane tilacoidali e le clorofille e altri composti coinvolti nella macchina fotosintetica vengono degradati, mentre si assiste a un elevato accumulo di carotenoidi in nuove strutture. In assenza di clorofilla la funzione protettiva dei carotenoidi non è più necessaria, ma entrano in gioco però altri ruoli di questa classe di composti, come la capacità di attrarre gli insetti impollinatori. Lo studio dei cromoplasti ha evidenziato differenti tipologie di strutture atte all'accumulo dei carotenoidi che possono essere classificate come globulari, cristalline, fibrillari e tubolari: i cromoplasti globulari contengono plastoglobuli concentrici.

La formazione delle fibrille richiede strettamente la presenza di carotenoidi biciclici come le xantofille. Sono stati identificati nei plastoglobuli enzimi come ZDS, LYCB e β -carotene idrossilasi che operano in serie per produrre zeaxantina e luteina a partire da ζ -carotene (Hirschberg, 2001). Questa evidenza dimostra che, oltre alla funzione di sequestro e accumulo, si ha nei plastoglobuli anche una specifica via biosintetica che porta alla produzione di carotenoidi.

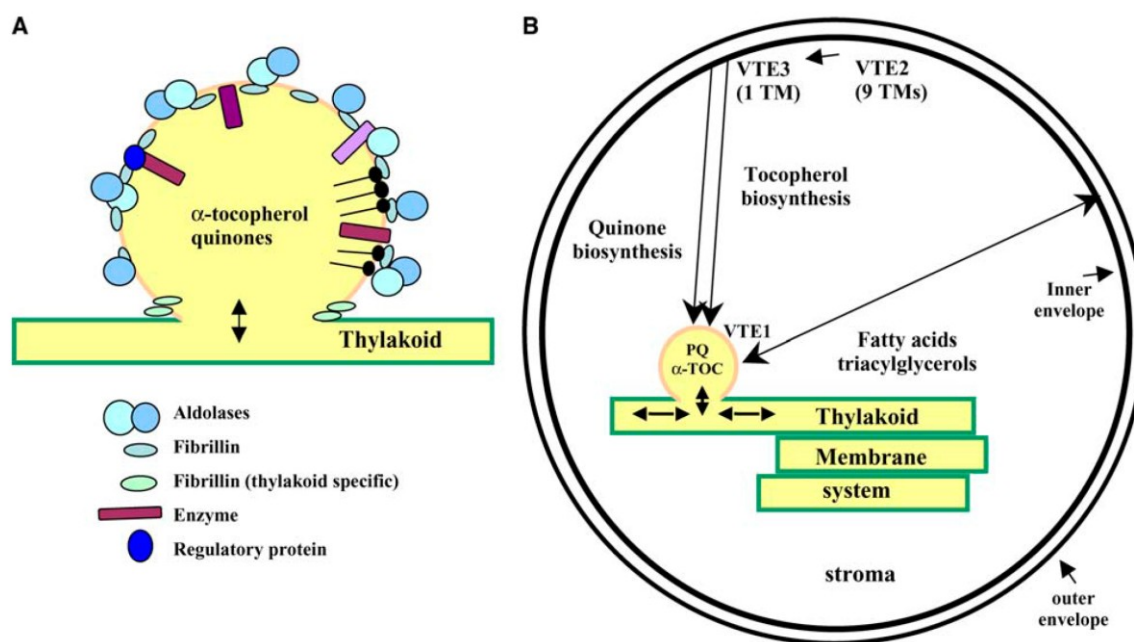


Figura 36. Rappresentazione schematica di un plastoglobulo (A) e del suo ruolo funzionale (B). Il plastoglobulo è formato da un singolo strato fosfolipidico nel quale sono sequestrate e immagazzinate molecole idrofiliche come chinoni e α -tocoferolo; le proteine strutturali come le fibrilline e gli enzimi sono ancorati al monostrato lipidico, ma non presentano un dominio transmembranale (A). Integrazione della funzione del plastoglobulo nel metabolismo plastidiale; tocoferolo ciclastasi (VTE1), omogentisato fitiltransferasi (VTE2), 2,3-dimetil-5-fetil-5-fetil-chinolo transferasi (VTE3) (Ytterberg *et al.*, 2006).

Nel 2008 è stato dimostrato mediante espressione eterologa in *E. coli* che la CCD4 di *Crocus sativus* (*CsCCD4*) è in grado di tagliare in modo specifico il β -carotene in posizione 9,10 (9',10'), producendo β -ionone (Rubio *et al.*, 2008). Sempre nello stesso lavoro l'enzima è stato localizzato nei plastoglobuli di *A. thaliana* mediante l'utilizzo di un costrutto di fusione con la GFP: le immagini a microscopio confocale dimostrano come la proteina sia presente nei plastoglobuli di foglie mature, mentre nessun segnale è stato rilevato in germogli, cotiledoni e nelle foglioline piccole, dove tali compartimenti sono assenti o troppo piccoli e poco numerosi per essere localizzati (Figura 37).

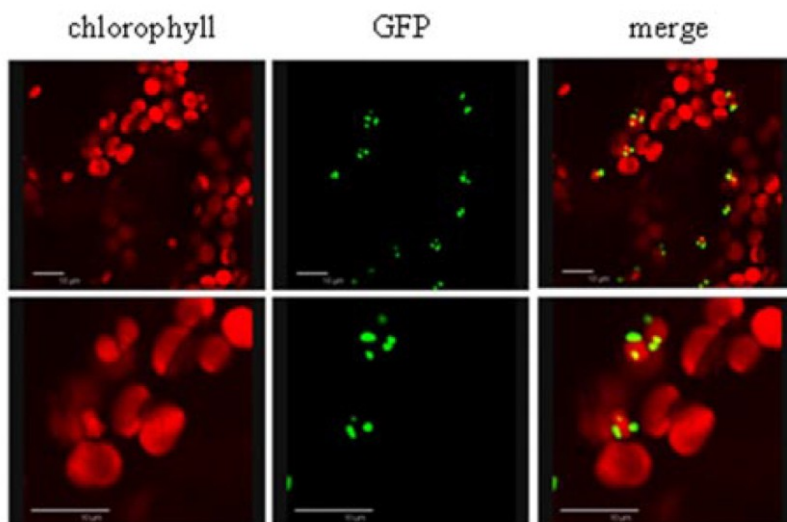


Figura 37. Immagine al microscopio confocale della localizzazione della *CsCCD4*-GFP a due livelli di risoluzione. Si può notare come la proteina sia localizzata nei plastoglobuli all'interno dei cloroplasti (Rubio *et al.*, 2008).

In *C. sativus* sono state identificate due varianti dell'enzima (*CsCCD4a* e *CsCCD4b*) che hanno una identità del 98% e sono considerate due varianti alleliche dato che lo zafferano è una pianta triploide. Seguendo l'espressione dei geni mediante PCR *real time* si è visto che il suo trascritto è assente negli stadi iniziali dello sviluppo dello stigma, mentre si nota un picco durante l'antesi. Questo elevato livello di espressione coincide con lo sviluppo sia di numero che di grandezza dei plastoglobuli nello stigma, avvalorando ancora di più l'ipotesi che questo enzima abbia un ruolo funzionale in tali compartimenti.

Almeno due isoforme della CCD4 sono state descritte in molte specie; in crisantemo sono stati ad esempio isolati due geni *CmCCD4a* and *CmCCD4b* che mostrano solamente il 74% di identità tra loro e hanno differenti *patterns* di espressione (Ohmiya *et al.*, 2006). Il trascritto della *CmCCD4a* è strettamente limitato ai petali del fiore e non è stato rilevato in altre parti della pianta. Al contrario il livello del trascritto di *CmCCD4b* è molto basso nei petali mentre è alto negli stami. In limone sono presenti due forme (*CcCCD4a* e *CcCCD4b*) le cui sequenze nucleotidiche sono identiche solo al 49% (Agusti *et al.*, 2007). Questa marcata diversità tra isoforme potrebbe corrispondere anche ad una differente funzionalità biologica. L'espressione dell'enzima di crisantemo è indotta da stress idrico e da quello da calore (Rubio *et al.*, 2008) mentre quelli di *A. thaliana* e di limone non sembrano subire variazioni in condizioni di siccità (Iuchi *et al.*, 2001; Agusti *et al.*, 2007).

Per elucidare le caratteristiche funzionali della CCD4 i geni di quattro specie, mela (*MdCCD4*), crisantemo (*CmCCD4*), rosa (*RdCCD4*) e *Osmanthus fragrans* (*OfCCD4*), sono stati isolati insieme a quello di *A. thaliana* e espressi in *E. coli*. Le proteine ricombinanti sono state caratterizzate sia *in vivo* mediante co-espressione dei carotenoidi in *E. coli* che *in vitro* utilizzando diversi substrati (Huang *et al.*, 2009a). Nella sequenza nucleotidica si può osservare la presenza di un introne di 1285 bp sul gene *MdCCD4* e di 2 introni in quello di *OfCCD4* (di 1942 bp il primo e di 491 bp il secondo); un introne di 104 bp è stato identificato in crisantemo (Ohmiya *et al.*, 2006). Nei geni di *A. thaliana* (Tan *et al.*, 2003), e di rosa non sono invece stati identificati introni (Figura 38).

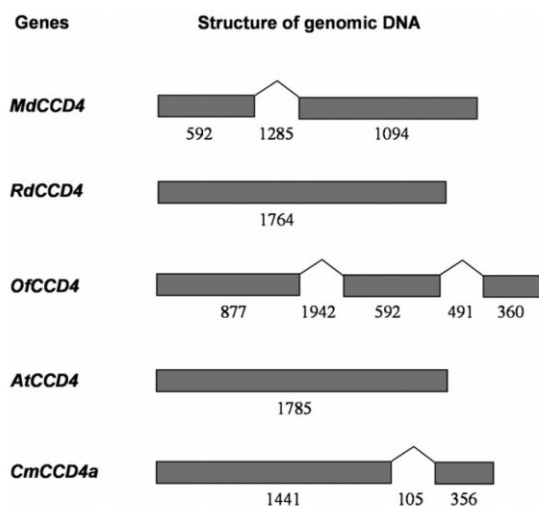


Figura 38.
Rappresentazione schematica della struttura genomica dei geni *MdCCD4*, *CmCCD4*, *RdCCD4*, *OfCCD4* e *AtCCD4*. Le caselle rappresentano gli esoni, le linee gli introni (Huang *et al.*, 2009a).

Dai dati ottenuti da Huang e collaboratori si evince come la *CmCCD4a* sia capace di utilizzare il β -carotene come substrato tagliandolo in posizione 9,10 (9',10') determinando il colore bianco dei petali; non è invece in grado di catabolizzare le xantofille, così come gli altri quattro enzimi oggetto dello studio. Il gene *MdCCD4* risulta espresso principalmente negli organi riproduttivi in piena fioritura (Watillon *et al.*, 1998), in modo simile a quello di crisantemo, e l'enzima prodotto catabolizza il β -carotene producendo β -ionone. In maniera analoga il gene *RdCCD4* è espresso quasi esclusivamente nei petali di rosa, ma non sembra coinvolto nella formazione dei norisoprenoidi C13 in quanto non in grado di produrre β -ionone (Huang *et al.*, 2009a). Dei 5 enzimi caratterizzati nel lavoro di Huang e collaboratori solo quelli di melo e di crisantemo sembrano quindi metabolizzare in maniera efficiente il β -carotene liberando β -ionone (Figura 39); gli enzimi *CmCCD4a* e *MdCCD4* utilizzano infatti come substrato preferenziale i carotenoidi a 40 atomi di carbonio mentre la *AtCCD4* e la *RdCCD4* hanno maggiore affinità per il composto 8'-apo- β -caroten-8'-ale a 30 atomi di carbonio.

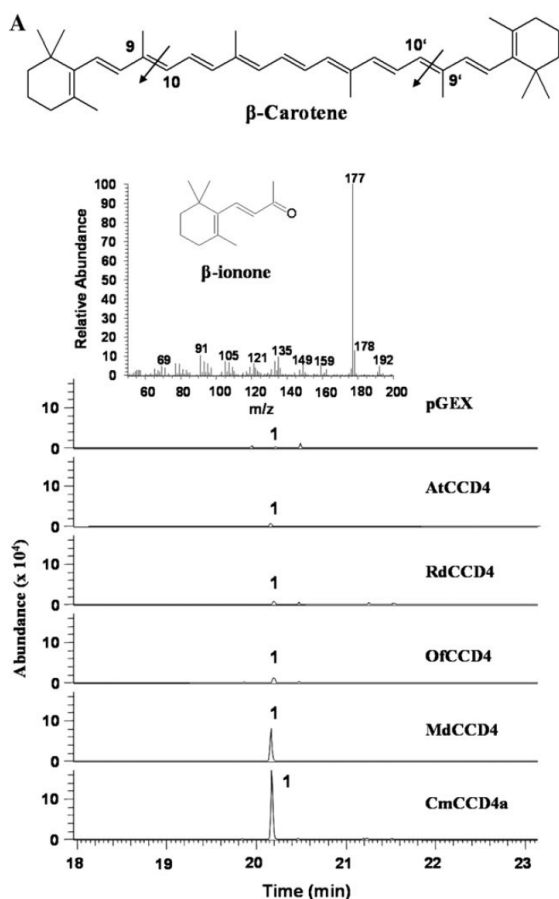


Figura 39. Analisi mediante GC-MS della produzione di β -ionone derivante dal *bleaching* del β -carotene in ceppi di *E. coli* co-trasformati con pGEX-*AtCCD4* (*AtCCD4*), pGEX-*RdCCD4* (*RdCCD4*), pGEX-*OfCCD4* (*OfCCD4*), pGEX-*MdCCD4* (*MdCCD4*), pGEX-*CmCCD4a*, o pGEX-4T1 (vettore vuoto, controllo negativo) (Huang *et al.*, 2009a).

Dai risultati riportati in questo studio si evince che i due enzimi che producono in maniera efficiente il β -ionone hanno un pattern di espressione simile, specifico nei fiori, e contengono introni, mentre quelli che hanno come substrato preferenziale il 8'-apo- β -caroten-8'-ale non presentano introni. La correlazione tra numero di introni, *pattern* di espressione e specificità di substrato potrebbe essere il risultato di un rimescolamento del DNA di un gene ancestrale che ha avuto come risultato l'evoluzione di nuove isoforme con diverse proprietà biochimiche e biologiche.

Anche la CCD1 è in grado di produrre β -ionone e piante transgeniche di petunia, pomodoro e *M. truncatula* in cui l'espressione dei geni codificanti questi enzima è repressa mostrano una minore produzione di tale composto rispetto al *wild type* (Simkin *et al.*, 2004a, b, Floss *et al.*, 2008). CCD4 e la CCD1 sono quindi entrambe in grado di produrre questo composto volatile, ma quest'ultima ha una promiscuità di substrato maggiore e produce una varia gamma di prodotti C13, mentre la prima è incapace di catabolizzare i carotenoidi lineari, come il licopene e le xantofille (Schwartz *et al.*, 2001; Ibdah *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2009b). Vista la diversa localizzazione subcellulare di queste due classi di enzimi e la differente capacità di metabolizzare i substrati, è possibile ipotizzare che le CCD4 catabolizzino i carotenoidi presenti nei plastoglobuli e che i loro prodotti, una volta migrati nel citosol, vengano ulteriormente degradati dalle CCD1. Un'ulteriore prova a favore di questo modello viene da un recente lavoro di proteomica quantitativa del plastoglobulo di *A. thaliana*: la AtCCD4 è situata nel plastoglobulo e viene co-espressa insieme a enzimi plastidiali coinvolti nella sintesi dei carotenoidi, come PDS, ZDS e ZEP. Nello schema proposto vi è una continua rigenerazione dei carotenoidi che vede la via sintetica localizzata nel cloroplasto agire in maniera coordinata a quella del catabolismo: i carotenoidi derivanti dall'apparato fotosintetico vengono sequestrati dalla fibrillina4 e trasportati nel plastoglobulo, dove la CCD4 li degrada parzialmente. Gli apocarotenoidi generati sono in grado a questo punto di fuoriuscire dal plastidio, dove possono fungere da substrato per la CCD1 (Figura 40, Lundquist *et al.*, 2012).

Basandosi sul gene *CCD4a* di crisantemo e sulle CCD4 delle specie vegetali fin qui citate, è stato identificato nel 2010 il gene codificante la CCD4 di *Solanum tuberosum*. In questa specie sono stati osservati elevati livelli di espressione del gene in tuberi maturi di due *cultivars* a polpa bianca (Desiree e Maris Piper), mentre in colture a polpa gialla (Phureja) tali livelli sono risultati molto inferiori. Utilizzando la metodologia di silenziamento genico mediante RNAi sui genotipi a polpa bianca si è ottenuto un incremento del contenuto totale dei carotenoidi di quasi 6 volte rispetto al controllo, dimostrando che la CCD4 gioca un ruolo importante nel *bleaching* di tali composti nel tubero. Questo effetto di aumento del contenuto totale di carotenoidi è stato osservato solamente nei tuberi e nei petali colorati, mentre nei restanti organi della pianta (come foglie, stemi e radici), nonostante la netta riduzione dei livelli di mRNA, il contenuto non ha subito variazioni rilevabili (Campbell *et al.*, 2010). Associato al cambiamento del contenuto dei carotenoidi è stata osservata una forma allungata nei tuberi, spesso concatenati tra loro. Questi cambiamenti fenotipici sono molto simili a quelli che si osservano quando le patate vengono mantenute a basse temperature e poi sono repentinamente portate a temperature più elevate (Jefferies e Mackerron, 1987). Questo potrebbe significare che la CCD4 sia coinvolta nella risposta dallo stress da calore: quando la sua attività viene ridotta, come nei genotipi transgenici, si ha l'insorgenza di fenotipi anomali. Questo ruolo funzionale della CCD4 è stato ipotizzato anche in *C. sativus* dove, come accennato in precedenza, la sua espressione è incrementata nelle foglie soggettate ad alte temperature (Rubio *et al.*, 2008).

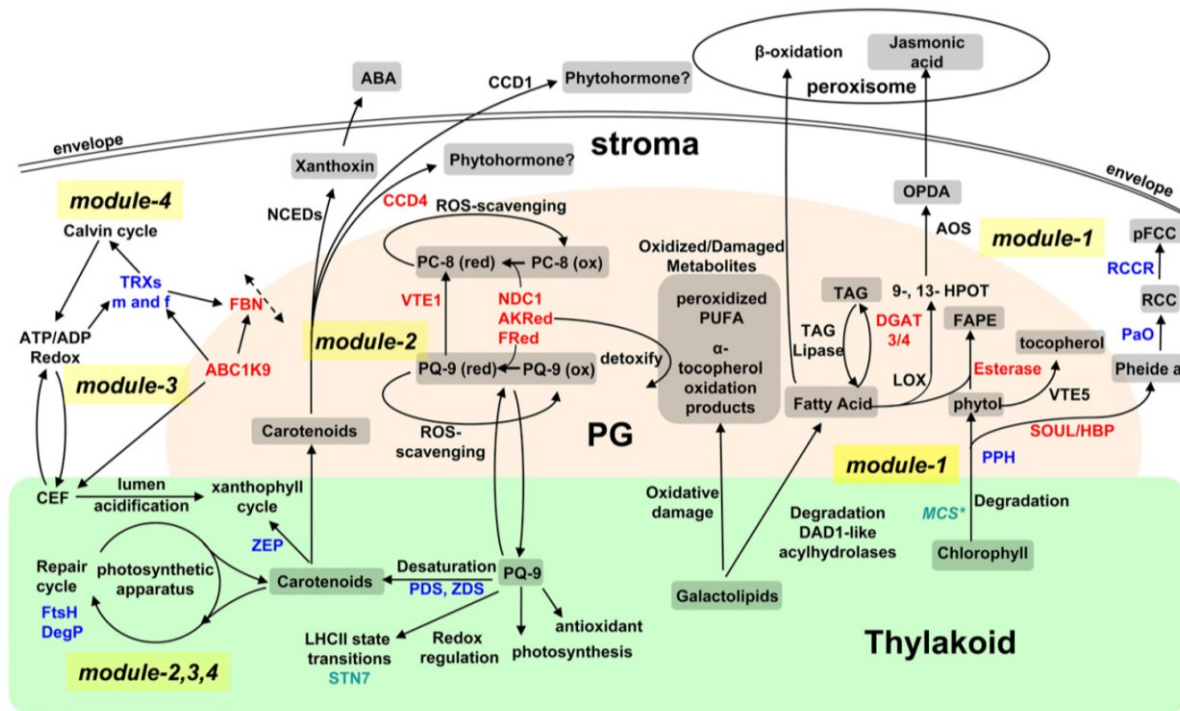


Figura 40. Modello delle funzioni del plastoglobulo nel metabolismo cloroplastico. Gli enzimi evidenziati in rosso sono stati localizzati nel plastoglobulo, mentre quelli in blu sono plastidiali e co-espressi con quelli plastoglobulari. La CCD4 è coinvolta nel *module-2* ed è co-espressa con con gli enzimi coinvolti nella sintesi dei carotenoidi PDS, ZDS e ZEP (Lundquist *et al.*, 2012).

Un recente lavoro effettuato in mandarino ha dimostrato che gli apocarotenoidi C30 come la β -citraurina (3-idrossi- β -apo-8'-carotenale) sono il prodotto di una nuova isoforma di CCD4 fino ad allora non identificata. La β -citraurina è una dei maggiori responsabili del colore caratteristico della buccia di arance e mandarini: nonostante la via di sintesi dei carotenoidi in queste specie vegetali sia molto studiata (Alquézar *et al.*, 2008a; Kato, 2012), riguardo alla produzione degli apocarotenoidi C30 si sa poco o nulla. Un'analisi *in silico* dei geni della CCD4 in *Citrus* ha permesso di identificare 4 geni codificanti per proteine funzionali: *CcCCD4a*, *CcCCD4b2* e *CcCCD4c*, che non vengono espresse se non a bassissimi livelli nella buccia dei frutti, e *CcCCD4b1*, che invece viene sovraespressa in tale tessuto soprattutto nel corso della fase di maturazione. Il pattern di espressione della CCD4b1 dimostra come essa sia trascritta in tessuti diversi dalle altre CCD4, che sono presenti per lo pi  negli organi del fiore come i petali, e il suo pattern risulta correlato all'accumulo di β -citraurina. Trattamenti che portano alla riduzione del colore della buccia e a un conseguente abbassamento della concentrazione di apocarotenoidi C30, come ad esempio lo stress da calore, determinano contemporaneamente un drastico calo dei livelli del messaggero dell'enzima in questione. Le analisi funzionali effettuate *in vitro* sulla CCD4b1 hanno dimostrato la possibilit  che questo enzima effettui un taglio asimmetrico nel doppio legame in posizione 7',8' di zeaxantina e β -criptoxantina: quando nei frutti comincia l'accumulo di queste due xantofille si assiste a una massiva produzione di β -citraurina dovuta all'attivit  della proteina (Rodrigo *et al.*, 2013).

Quando questa specifica diossigenasi   stata espressa in ceppi ingegnerizzati di *E. coli* in grado di accumulare licopene, α -carotene, β -carotene e violaxantina nessun prodotto di degradazione   stato identificato, dimostrando l'incapacit  dell'enzima di catabolizzare tali substrati. In un analogo esperimento con ceppi capaci di produrre zeaxantina e β -criptoxantina si   invece osservata la produzione di β -citraurina, avvalorando la specificit  di substrato (Ma

et al., 2013). Trattamenti con etilene o con impulsi di luce aumentano l'espressione di questa CCD4 in modo proporzionale all'accumulo di β -cittraurina: questi risultati potrebbero suggerire nuove strategie di accumulo di carotenoidi e loro derivati nei frutti.

Un'ulteriore CCD4 che catabolizza il legame dei carotenoidi in posizione 7-8 (7',8') è stata identificata in zafferano, dove le 2 isoforme caratterizzate in precedenza (*CsCCD4a* e *CsCCD4b*) sono in grado di scindere il β -carotene in posizione 9-10 (9',10'). Questa terza isoforma, *CsCCD4c*, mostra una espressione limitata al solo stigma e correlata alla produzione dei megastigma-4,6,8-trieni. Essa è indotta da condizioni di stress quali ferite, elevate temperature e iperosmosi, e sembra quindi coinvolta nella risposta dello stigma a condizioni ambientali avverse. L'attività enzimatica è stata determinata *in vivo* in *E. coli* e *Nicotiana benthamiana*: il β -carotene sembra il substrato preferenziale, dal cui si libera β -ionone. Nonostante ciò, l'enzima è in grado anche di metabolizzare luteina, violaxantina e neoxantina, generando un β -ciclocitrato risultante dalla scissione dei legami in posizione 7,8 (7,8') (Rubio *et al.*, 2013).

1.4.2.1 Le diossigenasi in pesco

Il pesco (*Prunus persica*) è una specie arborea da frutto appartenente alla famiglia delle Rosacee prunoidee. I suoi frutti, molto apprezzati per le qualità nutrizionali e organolettiche, si dividono sostanzialmente in tre categorie: pesche comuni, pesche noci (o nettarine) e perocche. Questa specie è la terza in ordine di rilevanza economica tra gli alberi da frutto e è originaria della Cina da dove, nel secondo secolo A.C., è stata esportata in Europa, Africa e America attraverso la Persia, originando il germoplasma delle moderne *cultivars* (Faust e Timon, 1995). Nelle regioni con clima temperato vengono prodotte 21 milioni di tonnellate di pesche ogni anno e l'Italia, con 1.6 milioni di tonnellate, è il secondo produttore a livello globale dopo la Cina (FAOSTAT 2011, <http://faostat.fao.org/>). Esistono una molteplicità di diversità fenotipiche nelle coltivazioni odierne, che si sono adattate a crescere in condizioni climatiche molto diverse: tra esse il colore della polpa del frutto è una delle più importanti. Questo colore è dato dalla presenza di carotenoidi ed è forse il più importante carattere commerciale, sia perché aumenta l'appetibilità nei confronti del consumatore, sia per l'elevato valore aggiunto che apporta a livello di proprietà nutrizionali (Gil *et al.*, 2002; De la Rosa *et al.*, 2009). Negli ultimi decenni molti sforzi sono stati fatti per selezionare *cultivars* con diverse caratteristiche (Williamson *et al.*, 2006). Dal punto di vista genetico il colore della polpa è un tipico carattere mendeliano controllato da un singolo locus, denominato Y (da "Yellow"). Il fenotipo bianco, totalmente dominante su quello giallo (Connors, 1920), è considerato quello ancestrale, in quanto in Asia sono nettamente predominanti la specie con questa caratteristica (Faust e Timon, 1995). Da questo nel corso degli anni si sono sviluppate una serie di mutazioni spontanee che hanno portato la formazione di specie a frutto giallo, e viceversa. Nella maggior parte dei casi queste mutazioni hanno dato origine a chimere nei quali solo un singolo strato è affetto da tale modificazione: il cambiamento fenotipico si osserva quando la mutazione coinvolge lo strato L2, dal quale si origina il tessuto del mesocarpo (Dermen e Stewart, 1973). I genotipi mutanti mantengono il loro stato di chimera anche dopo la moltiplicazione vegetativa tramite innesto, e una piccola parte del frutto, in corrispondenza della sutura, originata dallo strato L1, mantiene il fenotipo ancestrale (Brandi *et al.*, 2011). La differente colorazione del mesocarpo corrisponde a un diverso accumulo di carotenoidi e in uno studio condotto su 20 diverse *cultivar* di pesche americane si è visto come varietà a polpa gialla contengono quantitativi di carotenoidi compresi tra 700 e 2100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (peso fresco), mentre in quelle bianche tale concentrazione scende a 70-200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Gil *et al.*, 2002). Il taglio enzimatico di questi composti produce norisoprenoidi volatili, soprattutto β -iononi: i livelli di 3-idrossi-7,8-diidro- β -ionolo e 3-idrossi- β -ionone aumentano simultaneamente alla maturazione del frutto, grazie probabilmente all'azione di CCD che agiscono per lo più sul β -carotene (Aubert *et al.*, 2003; Baldermann *et al.*, 2005).

Un recente studio effettuato da un gruppo di ricerca italiano ha valutato l'espressione dei geni coinvolti nel metabolismo dei carotenoidi in un sistema di pesche isogeniche: Red Haven (RH), con mesocarpo giallo, e Red Haven Bianca (RHB), un mutante che presenta una polpa del frutto bianca (Brandi *et al.*, 2011). L'accumulo dei carotenoidi, l'emissione dei composti volatili e i livelli dei trascritti dei geni coinvolti nella sintesi e nel catabolismo di tali composti sono stati misurati nei 5 stadi di maturazione del frutto: S1 (circa 35 giorni dopo l'impollinazione [dap]), S2 (circa 50 dap), S3 (circa 90 dap), Breaker (Br; circa 115 dap), e S4 (122 dap; Figura 41). Negli stadi finali della maturazione (Br e S4) la carotenogenesi è molto evidente in RH, dove il mesocarpo si colora di un giallo intenso, mentre è quasi impercettibile in RHB, dove il frutto rimane di colore bianco. Osservando lo stadio di maturazione S4 di RHB si può notare chiaramente come un settore del frutto, corrispondente alla sutura che ha avuto origine dallo strato apicale L1 non mutato, presenta la stessa colorazione di RHB. Come nella maggior parte dei frutti che accumulano carotenoidi, la loro sintesi massiva avviene negli ultimi stadi di maturazione parallelamente alla transizione dei plastidi a cromoplasti.



Figura 41. Fenotipo dei frutti di RHB (A) e RH (B) durante la maturazione. Risulta evidente la differenza di colore che si sviluppa a partire dallo stadio S3, dove in RH comincia l'accumulo massivo di carotenoidi (Brandi *et al.*, 2011).

Nei primi due stadi i frutti sia di RHB che di RH presentano modeste quantità di carotenoidi, in particolare β -carotene e luteina; a partire dalla fase S3 il mesocarpo di RH si arricchisce di tali composti fino a un picco in S4, dove il colore della polpa è più intenso, mentre in RHB la concentrazione di questi metaboliti rimane esigua (Figura 42).

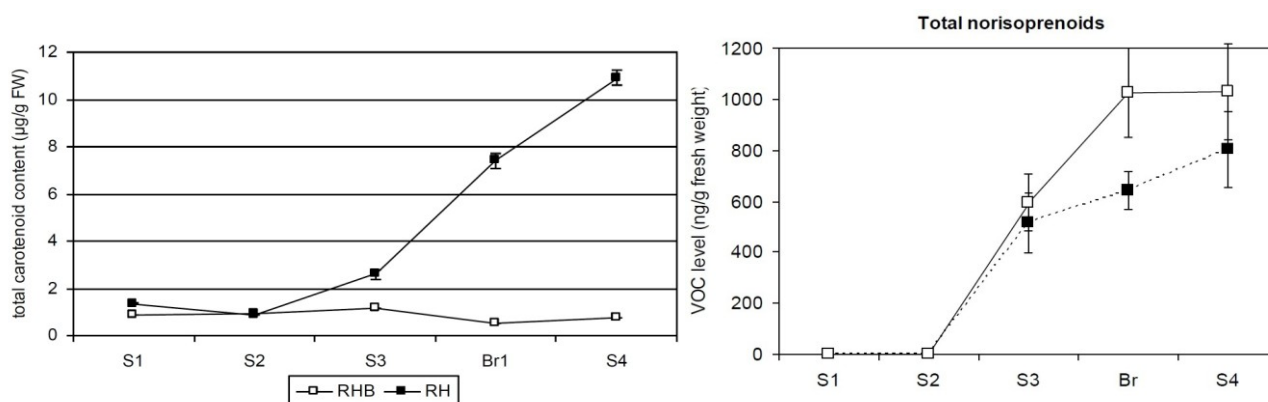


Figura 42. Accumulo di carotenoidi nei vari stadi di maturazione di RH e RHB (a sinistra), e corrispondente produzione di norisoprenoidi volatili (a destra; Brandi *et al.*, 2011).

Oltre alla quantità, anche la composizione del pool dei carotenoidi varia tra i due genotipi. In RH si ha l'accumulo di una più ampia gamma di composti: in S4 la zeaxantina risulta essere la molecola più abbondante in RHB, mentre le xantofille anteraxantina, luteoxantina e zeaxantina predominano in RH. Per quanto riguarda i VOC, i norisoprenoidi sono molto più abbondanti nei frutti di RHB a partire dallo stadio 3 fino alla completa maturazione, mentre negli stadi iniziali tra i 2 genotipi non si notano diversità sostanziali. In RHB è evidente un picco di liberazione di VOC nello stadio Br, che poi rimane costante nello stadio 4, mentre in RH se ne evidenzia una produzione più modesta (Figura 42). L'espressione dei geni coinvolti è riportata in Figura 43.

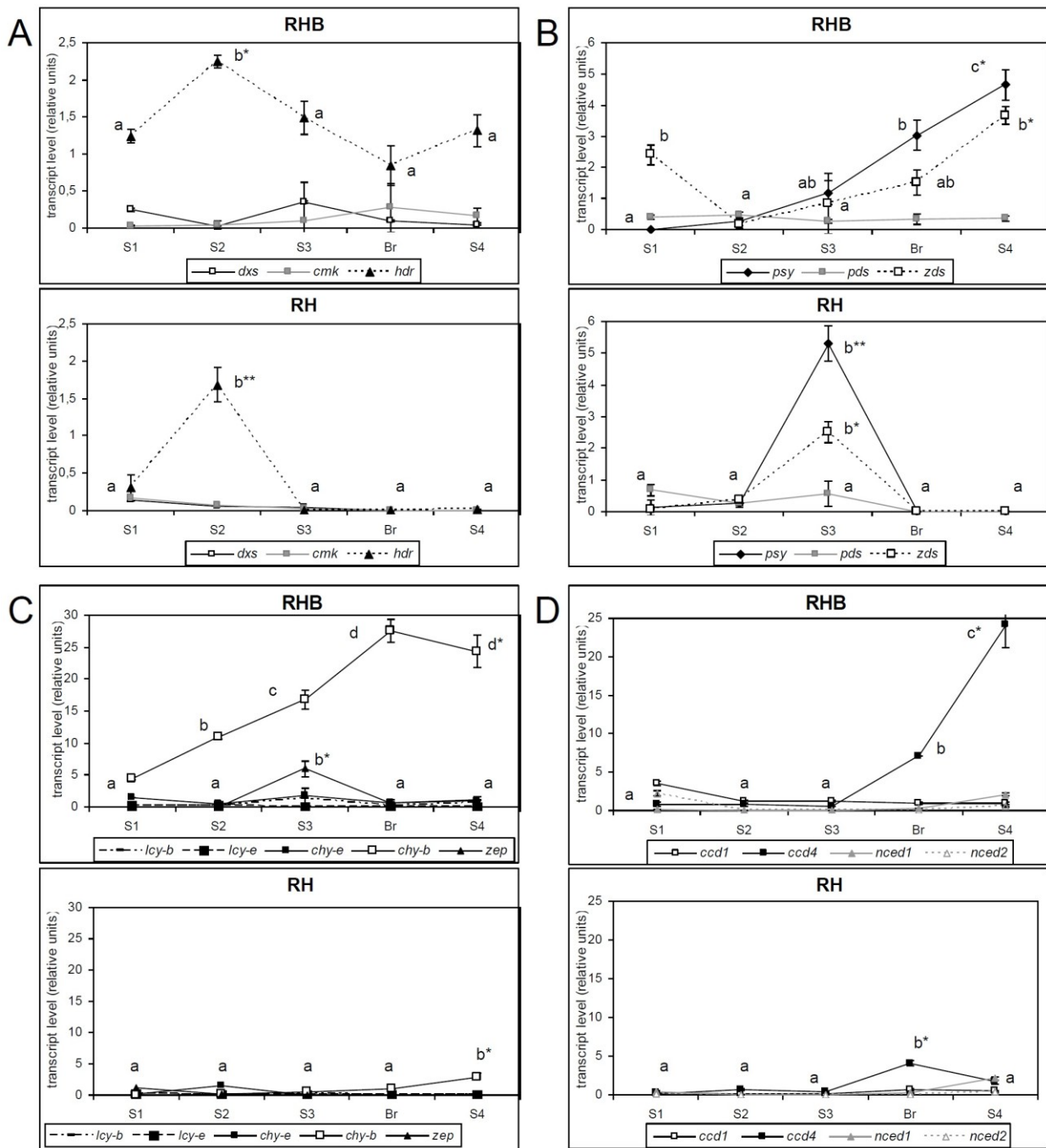


Figura 43. Analisi mediante RT-PCR dell'espressione dei geni coinvolti nel metabolismo dei carotenoidi nei genotipi RH e RHB durante le varie fasi della maturazione del frutto. Espressione dei trascritti codificanti per gli enzimi della sintesi iniziale degli isoprenoidi (A); per PSY, PDS e ZDS (B); per gli enzimi a valle della sintesi dei carotenoidi (C); per gli enzimi del catabolismo (D) (Brandi *et al.*, 2011).

Relativamente ai trascritti riguardanti la sintesi degli isoprenoidi, come *DXS* and *CMK*, i livelli rimangono bassi nel corso della maturazione del mesocarpo sia in RH che in RHB (Figura 43). Per i geni *HDR*, *PSY* e *ZDS* si nota un picco di trascrizione per il genotipo a polpa gialla nel corso degli stadi 2 e 3 per poi tornare a livelli basali in S4: al contrario in RHB la loro espressione cresce costantemente fino a completa maturazione. Degli enzimi a valle della via di sintesi (LYCB, LYCE, CHYB, CHYE e ZEP) solamente *CHYB* è fortemente indotto in RHB mentre, stranamente, tutti i restanti geni non sembrano essere espressi a livelli sostanziali in nessuno dei due genotipi. Nel caso degli enzimi responsabile del catabolismo dei carotenoidi, CCD e NCED sono espresse a livelli basali in entrambi i genotipi con la sola eccezione della CCD4, che viene sensibilmente sovraespressa in RHB a partire dallo stadio Br fino a completa maturazione, dove presenta livelli di trascritto 13 volte superiori rispetto al mutante (Figura 43). Da questi dati il diverso accumulo dei carotenoidi nei due genotipi è stato imputato alla CCD4, che ne promuove il *bleaching* liberando norisoprenoidi: in RH, dove l'espressione di tale enzima è limitata, il frutto si arricchisce di composti colorati, mentre in RHB la polpa rimane bianca ma produce un aroma caratteristico, dovuto al rilascio dei norisoprenoidi volatili.

Dall'analisi genomica la mutazione che ha originato RHB risulta associata al *locus* Y, responsabile del colore giallo del mesocarpo; il gene codificante la *PpCCD4* è stato recentemente co-localizzato proprio in tale porzione di genoma (Adami *et al.*, 2013). A tal fine il messaggero della CCD4 di *Malus domestica* (#EU327777; Huang *et al.* 2009a) è stato allineato tramite BLAST al "*peach genome v1.0*" (ottenuto dal doppio aploide della *cultivar* a polpa gialla Lovell): si è così identificata una sequenza nucleotidica con una identità dell'85,4%, che è stata confrontata con quella delle altre diossigenasi (Figura 44).

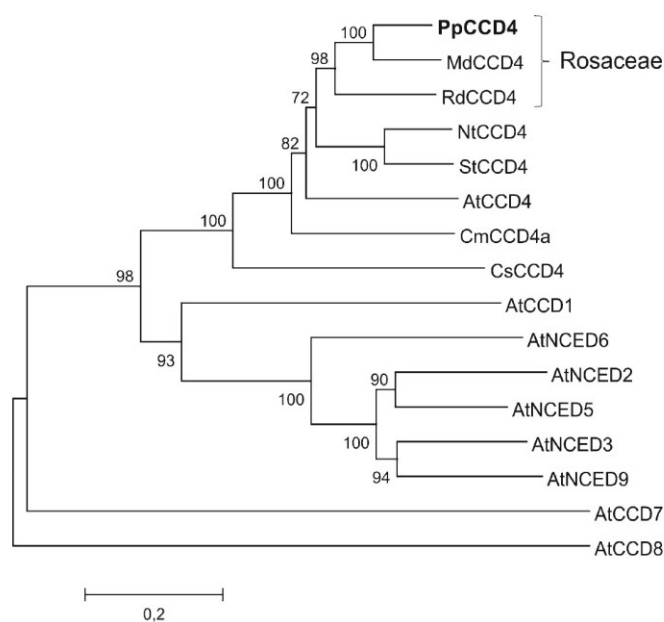


Figura 44. Albero filogenetico delle sequenze amminoacidiche predette di varie diossigenasi. Si può notare come le CCD4s siano localizzate in un *cluster* a se stante, separato dagli altri enzimi (Adami *et al.*, 2013)

Nostante l'elevata identità a livello nucleotidico la sequenza amminoacidica predetta per la CCD4 di pesco (ppa006109m) risulta molto più breve rispetto all'ortologo (427 residui contro 591). Questa differenza è dovuta alla presenza di un microsatellite (CT)₉ a monte del codone di inizio, non presente nella sequenza della *MdCCD4*, che produce un *frame shift*, impedendo la corretta codificazione della proteina. Le analisi successive hanno evidenziato la presenza di due alleli nel germoplasma di pesco aventi un polimorfismo in questo microsatellite: il primo [(CT)₉] corrispondente alla sequenza presente nel *database* del genoma di pesco ha un microsatellite di 201 bp, mentre il secondo [(CT)₈] è più corto di 2 bp. La sequenza amminoacidica predetta utilizzando il microsatellite (CT)₈, ristabilendo il corretto *frame*, risulta essere di 597 aa e mostra un'identità dell'86% con quella di melo.

Analizzando il genoma di RH e RHB con marcatori specifici per tali microsatelliti si è visto che entrambi sono eterozigoti e possiedono entrambi gli alleli (CT)₈ e (CT)₉. È emersa però una differenza: RH presenta una inserzione di 6.263 bp all'interno dell'introne, con una sequenza molto simile a un retrotrasposone LTR (*Gypsy-like*), che non è presente invece in RHB. Considerando che il fenotipo a polpa bianca è dominante su quello giallo, i due alleli sono stati associati al colore del mesocarpo e denominati y1 (per l'allele (CT)₉) e y2 (per l'allele (CT)₈ contenente l'inserzione). L'allele y1 è presente in entrambi i genotipi, mentre in RHB y2 è retro-mutato in W1, che è identico ma mancante del retrotrasposone. La sua riattivazione sarebbe responsabile del *bleaching* dei carotenoidi (Figura 45).

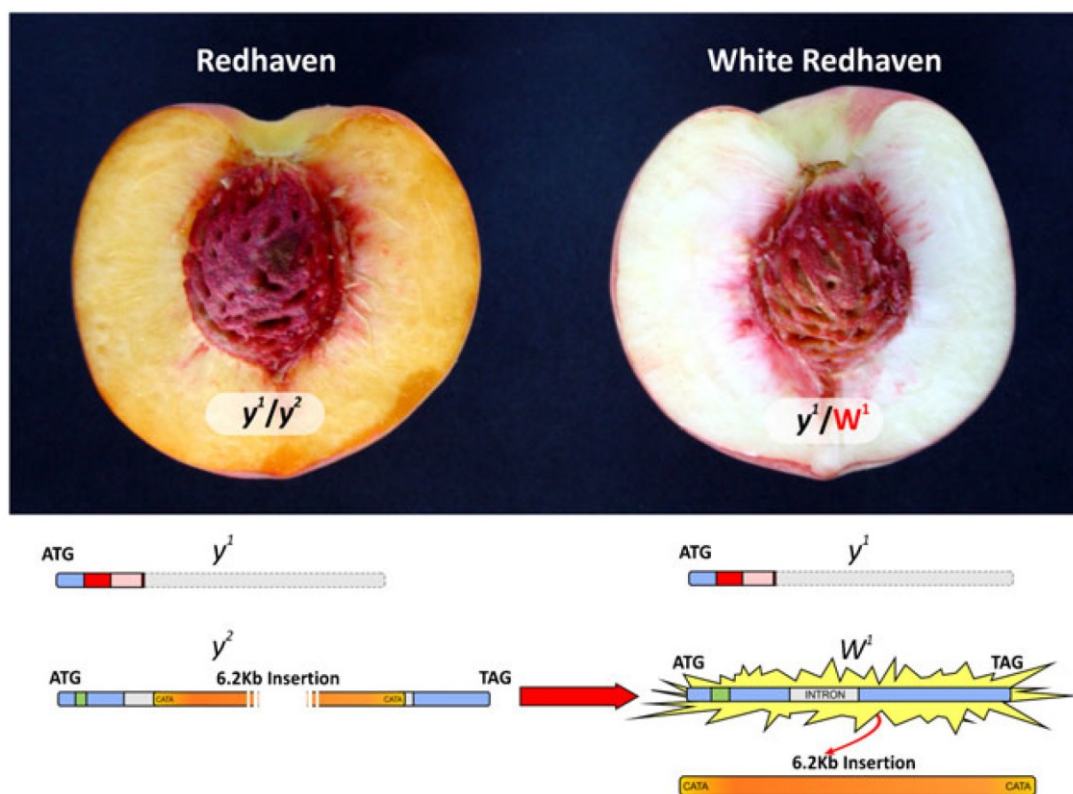


Figura 45. Reversione della mutazione y2 in RHB. RH presenta il genotipo y1/y2; in RHB l'inserzione da 6.2 kb è persa, e l'allele è revertito alla forma funzionale W1, che ristabilisce il fenotipo a polpa bianca (Adami *et al.*, 2013).

Sulla base di questo quadro l'analisi è stata estesa a un secondo sistema isogenico composto da una *cultivar* a polpa bianca, Caldesi 2000, e dal suo mutante a polpa gialla Cristina. Nessuno dei due genotipi possiede l'inserzione LTR: Caldesi 2000 risulta essere eterozigote per la lunghezza dei microsatelliti (y1, W1), mentre Cristina è omozigote per l'allele y1. Tutti gli alleli sono composti da due esoni e un introne; W1 codifica per una proteina di 597 amminoacidi putativamente funzionale, mentre una mutazione consistente di un'aggiunta di una unità ripetuta causa la mutazione di W1 in y1 in Cristina. Il conseguente *frame shift* causa la trascrizione di un mRNA troncato (Adami *et al.*, 2013; Figura 46).

Dopo aver mappato la CCD4 nel locus Y mediante l'utilizzo della progenie delle *cultivar* Yoshihine (W1/y2) e Royal Prince (y1/y2), la distribuzione di queste varianti alleliche è stata studiata in 106 genotipi di pesco di importanza economica su scala mondiale. Tutte le *cultivar* che contenevano almeno una copia di W1 presentavano un fenotipo a polpa bianca, con l'eccezione di tre varietà (Gialla Tardiva, Jonia e OroA) in cui è stata identificata

una terza mutazione dell'allele W1, puntiforme, che porta alla formazione di un codone di stop con perdita di 91 residui amminoacidici nella parte C-terminale. Esistono dunque tre alleli mutanti originati da W1 (y^1 , y^2 e y^3) che non codificano più una CCD4 funzionale (Figura 47). W1 può d'altra parte derivare anche da una retro-mutazione di y^2 per la perdita del retrotrasposone LTR in esso contenuto.

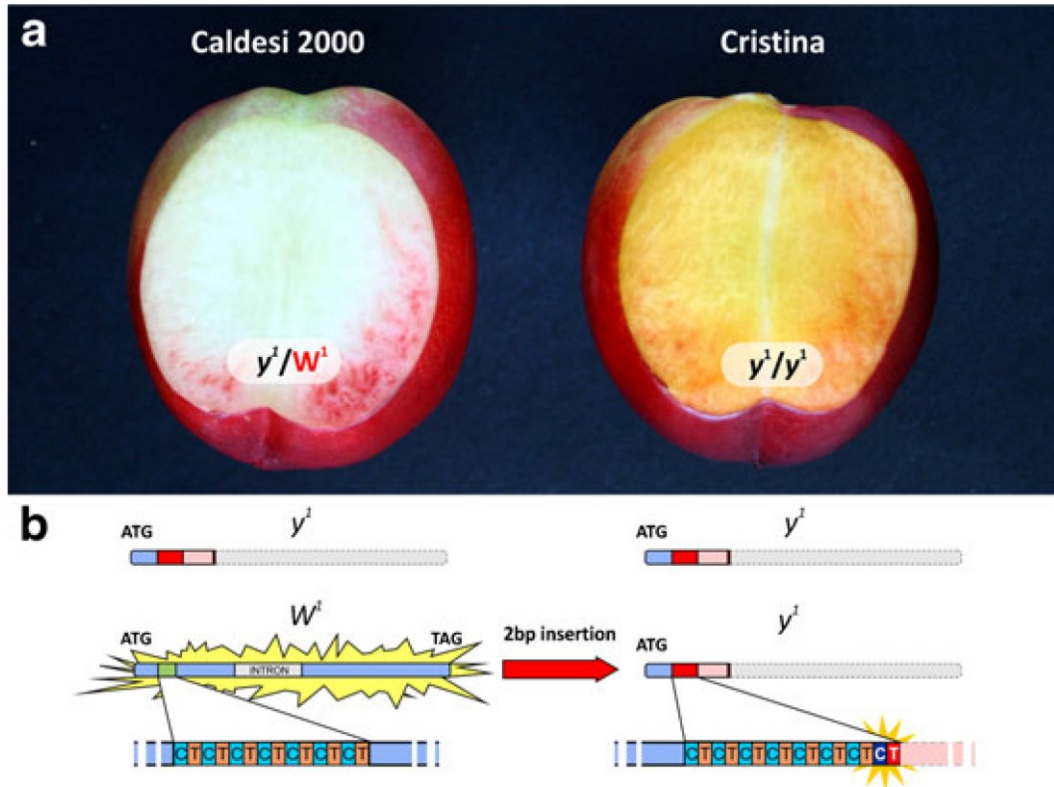
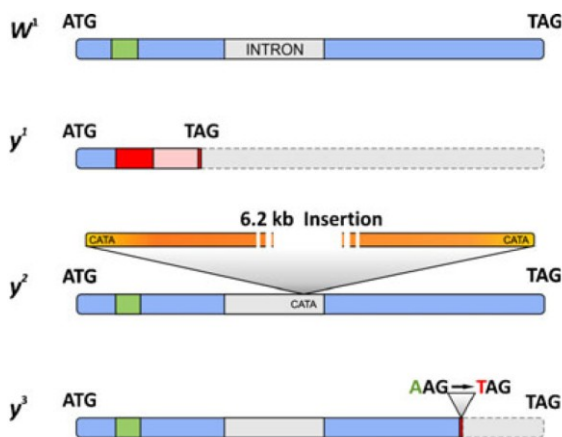


Figura 46. Rappresentazione del sistema allelico della CCD4 in Caldesi 2000 e Cristina. Il genotipo a polpa bianca risulta un eterozigote y^1/W^1 e quindi codifica per una CCD4 funzionale; in Caldesi, invece, l'aggiunta di una unità ripetuta CT nel microsatellite di W^1 lo muta in y^1 , originando il genotipo omozigote y^1/y^1 (Adami *et al.*, 2013).



Distribution of *ccd4* alleles among 106 white and yellow-fleshed peach cultivars

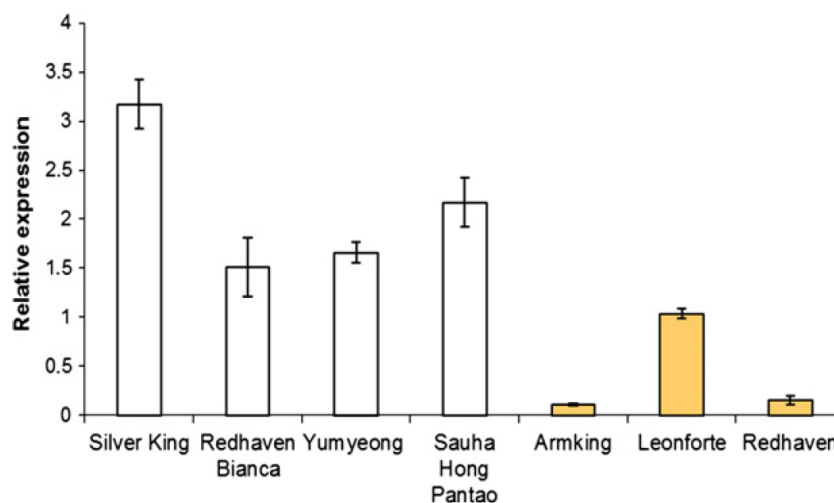
Allele	W^1	y^1	y^2	y^3
W^1	9	33	5	0
y^1	–	47	7	2
y^2	–	–	2	0
y^3	–	–	–	1
No. of genotypes	47 white	59 yellow		

Figura 47. Schema raffigurante le tre mutazioni che hanno portato alla formazione degli alleli y^1 , y^2 e y^3 a partire da W^1 . A destra la distribuzione delle varianti alleliche nei 106 genotipi analizzati, dove è possibile notare come i 47 fenotipi a mesocarpo bianco presentino all'interno del genoma almeno un allele funzionale W^1 (Adami *et al.*, 2013).

Un quadro analogo è stato proposto anche da un altro gruppo di ricercatori italiani, i quali si sono soffermati sull'analisi del retrotrasposone LTR senza però trovare al suo interno regioni codificanti proteine e catalogandolo quindi come elemento non autonomo. Questo tipo di retrotrasposoni sono stati descritti anche in altri genomi eucariotici e utilizzano enzimi codificati da altri retrotrasposoni per essere mobilitati (Havecker *et al.*, 2004). La presenza di un elemento di queste dimensioni all'interno dell'introne di *CCD4* non dovrebbe causare un'aberrazione della proteina, ma potrebbe determinare uno *splicing* errato e impedire la corretta maturazione del messaggero (Falchi *et al.*, 2013). Al fine di verificare tale meccanismo sono state compiute analisi sul trascrittoma di RH ed è stato osservato come effettivamente il messaggero maturo derivante dall'allele contenente il retrotrasposone sia mancante, supportando così l'ipotesi formulata. RH rappresenta il primo esempio in pesco di una inattivazione genica mediata da un solo retroelemento; il meccanismo che ha portato l'excisione del retrotrasposone dando origine al genotipo RHB è un evento molto raro e complesso. Questo tipo di trasposoni infatti solitamente si moltiplica all'interno del genoma ma non reverte, anche se esistono altre documentazioni di questo raro fenomeno, ad esempio in *A. thaliana* (Kuzin *et al.*, 1994).

Per verificare se i livelli di trascritti nei genotipi a polpa bianca fossero generalmente più alti di quelli a mesocarpo giallo, come avviene nel sistema RH-RHB (Brandi *et al.*, 2011), sono stati analizzati i cDNA di altre varietà mediante PCR quantitativa. Questa analisi ha evidenziato come effettivamente i genotipi colorati abbiano livelli di trascritti inferiori a quelli ancestrali e anche come l'efficienza della trascrizione venga ristabilita in caso di retro-mutazione: in RHB, che deriva dal genotipo RH in cui il retrotrasposone è stato *exciso*, la quantità di mRNA torna infatti a essere considerevole (Figura 48, Falchi *et al.*, 2013).

Figura 48. Livelli di espressione relativa del gene *PpCCD4* in diverse varietà di pesche a mesocarpo giallo e bianco. L'espressione è stata determinata mediante PCR *real time* quantitativa (Falchi *et al.*, 2013).



Le mutazioni identificate nei genotipi a mesocarpo ricco in carotenoidi portano quindi a una ridotta espressione della *PpCCD4*, probabilmente per una instabilità del messaggero: questo potrebbe essere il risultato dal decadimento mediato dalla presenza di codoni di stop prematuri (Van Hoof e Green, 2006; Brogna e Wen, 2013). Questo meccanismo di degradazione del messaggero può essere ipotizzato però solamente nei casi degli alleli y1 e y3, mentre l'assenza di un trascritto maturo e funzionale per y2 dovrebbe essere dovuto ad un improprio *splicing* dell'introne contenente il retrotrasposone. Questo complesso meccanismo mutazionale che coinvolge la *PpCCD4* rappresenta un esempio di come i livelli dei messaggeri possano essere regolati anche senza un vero e proprio controllo della regolazione della trascrizione. Il meccanismo di mutazioni che coinvolge la *PpCCD4* e le ripercussioni che esso ha sul fenotipo del mesocarpo dei frutti sono stati recentemente confermati anche in numerose varietà giapponesi (Fukamatsu *et al.*, 2013).

1.5. Le lipoossigenasi vegetali: meccanismo di azione e classificazione

Le lipoossigenasi (EC 1.13.11.12: LOX), sono un gruppo di enzimi presenti in piante, animali e funghi, capaci di ossidare gli acidi grassi poli-insaturi (PUFA) contenenti il legame cis,cis-1,4-pentadiene, formando i corrispondenti idroperossidi in forma cis,trans (Brash, 1999). Si tratta di diossigenasi non emiche che contengono un atomo di Fe^{++} nel sito attivo, coinvolte nel catabolismo dei lipidi. Esistono anche esempi marginali di molecole, come i metil esteri, che non presentano queste caratteristiche, ma che possono in alcuni casi essere ugualmente utilizzate dalle LOX (Robinson *et al.*, 1995). Negli animali gli idroperossidi lipidici derivanti dall'attività delle lipoossigenasi e i loro prodotti di conversione sono coinvolti in molti processi fisiologici e patologici e rappresentano i precursori di importanti classi di messaggeri chimici, come i leucotrieni e le lipossine. Nelle piante superiori le LOX catalizzano in particolar modo la perossidazione degli acidi linoleico (18:2, ω 6) e linolenico (18:3, ω 3) con conseguente produzione di acido idroperossioctadecadienoico (9/13 HPOD) e acido idrossioctadecatrienoico (9/13 HPOT). Negli animali e nelle piante inferiori, invece, i substrati preferenziali sono acidi grassi a più lunga catena come l'acido arachidonico (20:4). La nomenclatura tradizionale classifica le LOX animali in base alla loro capacità di perossidare l'acido arachidonico in diverse posizioni: esistono così 5-LOX, 8-LOX, 11-LOX, 12-LOX e 15-LOX. Visto però che questo acido grasso non rappresenta il substrato ideale per le lipoossigenasi vegetali e è anche il meno presente tra i PUFA nelle pianta, le LOX vegetali vengono generalmente classificate in base alla loro specificità di ossidazione nei confronti dell'acido linoleico che può essere ossigenato sull'atomo C-9 (9-LOX o LOX-1) o C-13 (13-LOX o LOX-2) generando prevalentemente 9S-idroperossidi o 13S-idroperossidi (Figura 49).

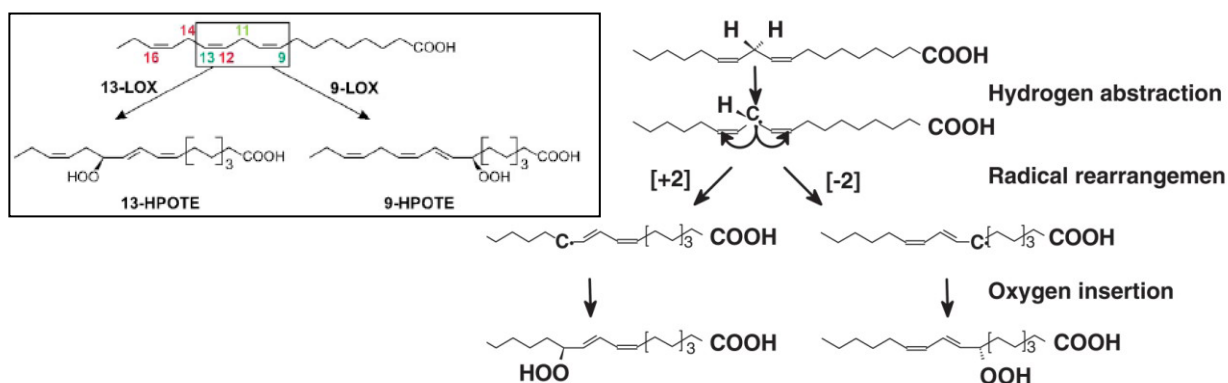
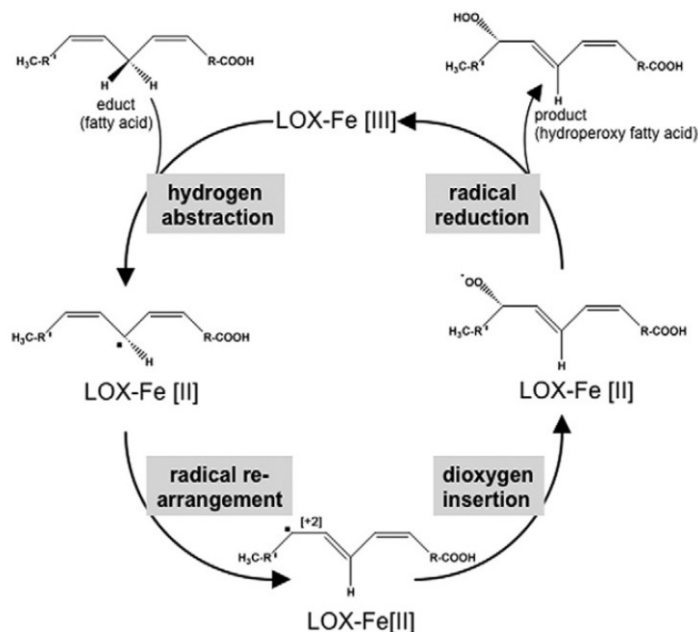


Figura 49. Meccanismo della reazione enzimatica che porta alla formazione di idroperossidi a partire dall'acido linoleico, catalizzata dalle LOX (Liavonchanka e Feussner, 2006).

Le LOX delle piante possono essere considerate come enzimi versatili, in quanto sono in grado di catalizzare tre diversi tipi di reazioni: la diossigenazione dei substrati lipidici, la conversione degli idroperossidi derivanti dall'ossidazione dei lipidi, e infine la formazione degli epossidi-leucotrieni. In condizioni fisiologiche la prima reazione è nettamente prevalente sulle altre, che possono essere considerate marginali (Feussner e Wasternack, 2002). Lo schema proposto per elucidare il meccanismo d'azione della LOX durante la catalisi dividono in 4 parti il processo. Questo deve iniziare con l'attivazione dell'enzima, che contiene un atomo di Fe nella forma ad alto spin Fe(II) , incapace di coordinare la molecola di ossigeno e quindi di far procedere la reazione. Perché la catalisi possa avvenire è necessario quindi che si passi alla forma ossidata Fe(III) : solitamente tale forma è presente a una concentrazione molto più bassa, ed è possibile assistere a una fase di *lag* nel passaggio allo stato attivo che può variare a seconda della concentrazione di substrato e di enzima. Il primo *step* prevede la

rimozione stereoselettiva dell'idrogeno dal metilene: l'atomo di idrogeno è rimosso come protone e l'elettrone risultante viene prelevato dal Fe^{3+} che viene ridotto alla forma ferrosa; questo rappresenta il passaggio limitante della reazione (Rickert e Klinman, 1999). Segue un riarrangiamento radicale nel quale l'elettrone può essere dislocato sia in direzione della estremità metilica dell'acido grasso (posizione [+2]) sia in direzione del carbossilato (posizione [-2]). Il terzo passaggio prevede l'inserzione di una molecola di ossigeno che viene introdotta nella direzione opposta a quella del piano determinato dal sistema del doppio legame correlato all'estrazione dell'idrogeno. Segue la riduzione del perossi-radicalo che viene ridotto da un elettrone proveniente dal Fe^{++} e convertito nel corrispondente anione: si ha così la ri-ossidazione alla forma ferrica e quindi l'enzima torna alla sua forma attiva. In ultimo il perossi-anione viene protonato generando l'idroperossido dell'acido grasso (HPOD) (Figura 50; Ivanov *et al.*, 2010).

Figura 50. Meccanismo della reazione catalizzata dalla LOX. L'ossigenazione degli acidi grassi procede attraverso quattro reazioni elementari consecutive, la stereochimica delle quali è strettamente controllata (Ivanov *et al.*, 2010).



La specificità della diossigenazione di un regioisomero piuttosto che un altro è dovuta a due diversi fattori: la selettività iniziale, che prevede la rimozione dell'atomo di idrogeno, e quella del sito di inserzione della molecola di ossigeno, che porta all'intermedio radicalico. Nel primo caso è noto che le LOX di pianta effettuano l'eliminazione dell'idrogeno solo sul C11, anche se in linea teorica tale reazione potrebbe avvenire anche al C14. Una volta rimosso l'idrogeno, l'ossigeno molecolare può essere inserito, per il secondo criterio di selettività, sul C9 o sul C13 (ovvero in posizione [+2] o [-2]) (Feussner e Wasternack, 2002). In quest'ultimo caso il passaggio chiave sembra essere l'orientamento del substrato nel sito attivo: nelle 13-LOX l'acido grasso penetra nel sito attivo con il suo metilene terminale, mentre nelle 9-LOX entra con il gruppo carbossilico. Il diverso orientamento del substrato potrebbe essere dovuto allo spazio disponibile nel sito attivo: nelle 13-LOX nella tasca di legame del substrato vi è un residuo di istidina o di fenilalanina estremamente conservato (Hornung *et al.*, 1999); nelle 9-LOX tali amminoacidi sono sostituiti da un residuo di valina, anch'esso altrettanto conservato. La presenza dell'istidina è di primaria importanza nel determinare la specificità posizionale: in un esperimento effettuato in cetriolo è stata inserita una mutazione puntiforme che ha portato alla sostituzione $\text{His} \Rightarrow \text{Val}$, e questo ha determinato l'inversione di inserimento dei PUFA nel sito di legame. Modelli strutturali dell'interazione enzima-substrato suggeriscono che questa sostituzione porti alla perdita di una carica positiva per il residuo guanidinico di un'arginina, che può di conseguenza formare dei ponti ionici con il gruppo carbossilico del substrato che entra per primo (Hornung *et al.*, 1999).

Le LOX costituiscono una grande famiglia genica e all'interno del regno vegetale possono essere classificate anche in base alla similarità di sequenza: gli enzimi che non hanno un peptide di transito e hanno un'alta similarità (maggiore del 75%) di sequenza sono noti come LOX-*type1*, mentre gli enzimi che presentano tra loro una bassa similarità di sequenza (minore del 35%) e contengono il peptide di transito per i cloroplasti al N-terminale sono noti come LOX-*type2* (Feussner e Wasternack, 2002). Tutte le lipossigenasi *type2* fino ad ora descritte perossidano i PUFA sul C13 e producono quindi 13S-idroperossidi. A oggi sono stati pubblicati più di 14000 articoli scientifici su questa classe di enzimi e, visto il grado di complessità e diversità che essi presentano, non è ancora stata delineata una classificazione univoca.

1.5.1. La struttura proteica delle lipossigenasi

La maggior parte delle LOX è composta da una singola catena polipeptidica avvolta in una struttura contenente due domini: un piccolo β -barrel N-terminale e un grande dominio catalitico elicoidale. La struttura cristallografica della LOX1 di soia, che ha una catena lunga 836 aa, mostra come essa abbia una forma ellissoidale della grandezza di 9x6.5x6 nm (Minor *et al.*, 1996). Il dominio N-terminale di tutte le LOX di cui è nota la struttura cristallografica è composto principalmente da β -filamenti antiparalleli che assomigliano al dominio C2 della lipasi pancreatica, implicato nel legame con la membrana (Chahinian *et al.*, 2000). Per quanto riguarda la LOX1 di soia esso è composto dai primi 146 residui amminoacidici ed è significativamente più grande di quello degli enzimi animali, pur con una struttura simile. I domini C e N-terminale sono in collegati tra loro mediante un piano di contatto, che negli enzimi animali è grande circa 1600 Å² mentre in soia è significativamente più grande (circa 2600 Å): questa differenza potrebbe suggerire che il legame tra i due siti sia più forte nelle lipossigenasi vegetali. L'alto grado di conservazione di questo dominio all'interno della famiglia potrebbe implicare per esso un ruolo fondamentale nella funzione dell'enzima. Per verificare questa possibilità è stata creata una "mini-LOX" priva di questo dominio, ottenuta grazie ad una parziale proteolisi della LOX1 di soia (Di Venere *et al.*, 2003). Questa "mini-LOX" risulta essere cataliticamente attiva e, pur mostrando un'affinità quasi dimezzata verso l'acido linoleico, possiede una V_{max} (e quindi una efficienza catalitica) molto superiore (363 s⁻¹ contro 55 s⁻¹). La rimozione della parte N-terminale sembra alteri la struttura del sito attivo per cui l'atomo di Fe può essere rimosso reversibilmente, cosa che non può avvenire nella conformazione completa (Dainese *et al.*, 2010). Nonostante non risulti indispensabile per l'attività catalitica, il dominio N-terminale delle LOXs di piante e animali è coinvolto nel legame con le membrane dei liposomi e dei corpi lipidici (May *et al.*, 2000).

Il dominio catalitico di tutte le isoforme di LOX fino a oggi descritte è composto da una α -elica contenente l'atomo non emico di ferro; per quanto riguarda la LOX1 di soia, l'elica 9 (che è composta dai residui amminoacidici compresi tra la posizione 473 e la 518 con una lunghezza di 65 Å) rappresenta la struttura centrale del sito (Minor *et al.*, 1996). Il sito attivo di questa proteina contiene due cavità principali (cavità I e II) nelle vicinanze dell'atomo di Fe e le catene laterali contenenti l'arginina707 e della valina354 separano la cavità II in due parti (cavità IIa e IIb): la prima sub-cavità gioca un ruolo fondamentale in quanto è la tasca di legame del substrato e è intersecata da un canale contenente gli amminoacidi Ile₅₅₃ e Trp₅₀₀ (Figura 51) che sembrano responsabili dell'entrata dell'ossigeno molecolare. Studi effettuati con mutazioni sito-dirette hanno dimostrato come la Ile₅₅₃ sia fondamentale per regolare la disponibilità dell'ossigeno nel sito attivo (Knapp e Klinman, 2003) e il corretto allineamento degli acidi grassi (Meyer *et al.*, 2008). Analizzando la struttura delle varie isoforme delle LOX di soia si notano variazioni di forma e volume della cavità IIa; a esempio nella LOX1 tale sacca è formata da un canale continuo, non interrotto, mentre le altre isoforme presentano barriere che limitano la penetrazione dei substrati (Youn *et al.*, 2006). Effettuando un allineamento delle sequenze amminoacidiche delle LOX conosciute si evince che gli enzimi

classificati come S-LOX contengono una alanina in una posizione critica del sito attivo, che è sostituita da una glicina nelle R-LOX (Coffa *et al.*, 2005a). Nella LOX1 di soia, che converte l'acido linoleico quasi esclusivamente in 13S-H(P)ODE, una mutazione specifica che sostituisce l'alanina in posizione 542 con una glicina induce la formazione di un 40% di 9R-H(P)ODE: in entrambi gli enzimi il substrato entra nella stessa posizione e l'idrogeno sottratto è lo stesso, mentre la differenza dei prodotti ottenuti è data solamente dall'inversa direzione del riarrangiamento radicale che è [+2] nel caso del wild-type e [-2] per il mutante (Coffa *et al.*, 2005b).

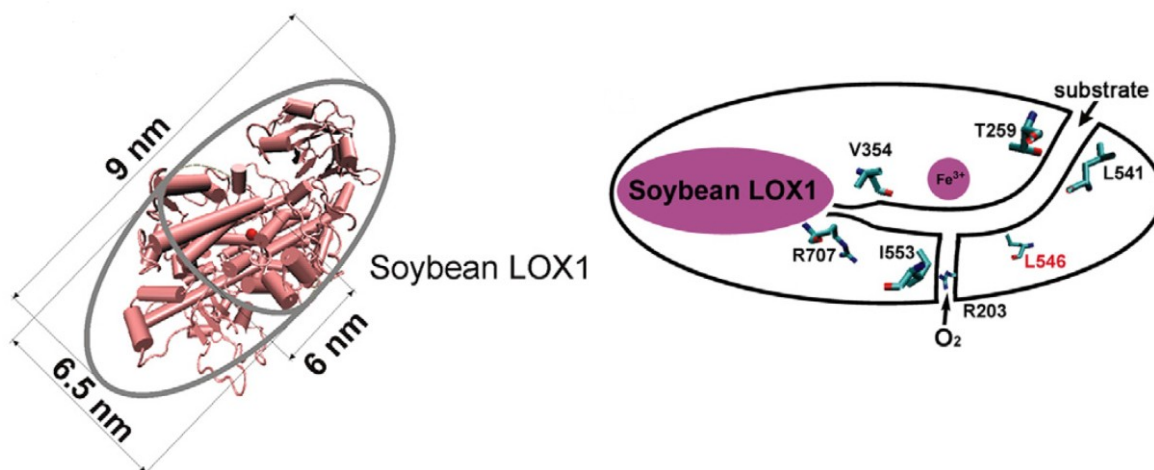


Figura 51. Rappresentazione schematica della LOX1 di soia; a destra è raffigurato il dettaglio della tasca del sito catalitico coi i canali di entrata del substrato e dell'ossigeno molecolare (Ivanov *et al.*, 2010).

1.5.2. Il ruolo fisiologico delle lipossigenasi vegetali

La composizione delle membrane lipidiche è in continuo cambiamento sia durante lo sviluppo della pianta che in risposta agli stimoli ambientali; all'interno di tale *turnover*, la formazione degli acidi grassi polinsaturi ossidati, chiamati collettivamente ossilipine, è una delle reazioni più importanti (Muller *et al.*, 2004). Le ossilipine sono derivati ossigenati degli acidi grassi che intervengono, con meccanismi ancora largamente sconosciuti, nelle reazioni di difesa delle piante a stimoli abiotici e biotici: tali molecole, chimicamente eterogenee, includono gli idrossidi, gli epossidi e gli idroperossidi degli acidi grassi, e i loro derivati. La formazione iniziale degli idroperossidi può avvenire tramite attività lipossigenasica, auto-ossidazione e attività diossigenasica (α -DOX) (Hamberg *et al.*, 2002): il metabolismo indotto dalle LOX e tutti i sottoprodotti che ne derivano vengono denominati LOX *pathway* (Bl e, 2002). Gli idroperossidi dei PUFA sono molecole altamente reattive e pericolose e vengono immediatamente metabolizzati, oltre che da una ulteriore attivit  della LOX che porta alla formazione di chetoacidi grassi, attraverso 4 vie principali che producono metaboliti a elevata attivit  biologica e con particolari caratteristiche organolettiche: idrossi e epossidi acidi grassi nella via delle perossigenasi, aldeidi per azione della idrossiperossido liasi (HPL), alleni per conversione effettuata dalla allene ossido sintasi (AOS), e divinil eteri originati dal *pathway* della divinil etere sintasi (DES) (Figura 52). Alcuni di questi enzimi (HPL, AOS e DES) sono correlati tra loro e fanno parte di una classe particolare di proteine citocromo P450 specializzate nel metabolismo degli idroperossidi, chiamata CYP74 (Matsui *et al.*, 1996). Questa classe di enzimi si differenzia dalle altre P450 in quanto non necessita di legare l'ossigeno molecolare, ma utilizza gli acidi grassi gi  ossigenati come fonte di equivalenti riducenti senza richiedere l'intervento di alcun cofattore (Hughes *et al.*, 2009).

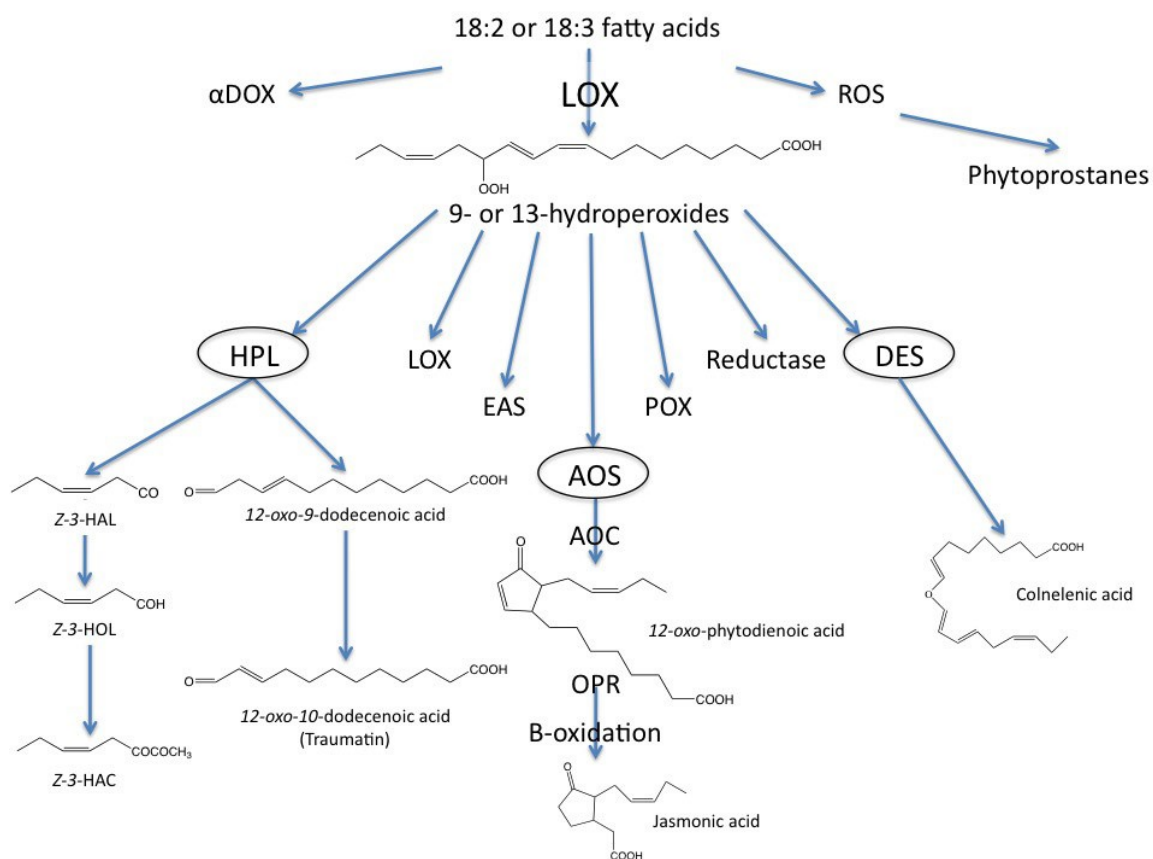


Figura 50. Schema della via di sintesi delle ossilipine nelle piante. Gli enzimi evidenziati con un cerchio sono quelli limitanti nelle 3 vie principali: produzione dei composti volatili delle foglie verdi (HPL), sintesi dell'acido jasmonico (AOS), e formazione del divinil etere (DES). HPL e AOS utilizzano come substrato preferenziale i 13-idroperossidi derivanti dall'acido linoleico, mentre la DES metabolizza i 9-idroperossidi (<http://5e.plantphys.net/>).

Gli idrossi e epossidi acidi hanno un ruolo nella biosintesi della cutina e nella difesa dagli attacchi dei patogeni; le aldeidi hanno caratteristiche capaci di attrarre gli insetti impollinatori e conferiscono aromi e sapori ai fiori e ai frutti. Gli alleni come l'acido jasmonico, il metil jasmonato e la traumatina svolgono importanti ruoli: il primo è coinvolto in molteplici processi biologici (Wasternack, 2007), tra i quali l'induzione dei geni codificanti la PAL (Gundlach *et al.*, 1992) e la calcone sintasi, ed è anche responsabile della cascata di trasduzione del segnale in risposta a vari tipi di stress, in particolare quello da lesione e da attacco patogeno; la traumatina induce invece la divisione cellulare e sembra essere coinvolta nella risposta a lesioni meccaniche. Le ossilipine, dunque, sono coinvolte in numerosi processi fisiologici della pianta, dallo sviluppo alla riproduzione, dalla senescenza alla risposta a molteplici tipi di stress, in particolare quelli biotici.

1.5.2.1. Mobilitazione dei lipidi di riserva (LOX-2 Type1)

Il fatto che le varie LOX producano differenti idroperossidi utilizzando acido linoleico come substrato preferenziale potrebbe implicare che esse giochino ruoli differenti in questi processi. Nell'orzo in germinazione, ad esempio, sono espresse sia 9-LOX che 13-LOX in periodi temporali diversi. In uno studio di Holtman e collaboratori sono stati analizzati i livelli di mRNA della LOX-A (9-LOX) e della LOX-C (13-LOX) durante la germinazione: la prima è presente in tutta la durata della germinazione mentre la seconda viene espressa durante il primo giorno di germinazione e i livelli di trascrizione calano notevolmente a partire dal 4°

giorno; questi dati sono confermati anche dall'analisi della composizione degli idroperossidi prodotti durante queste fasi (Figura 53).

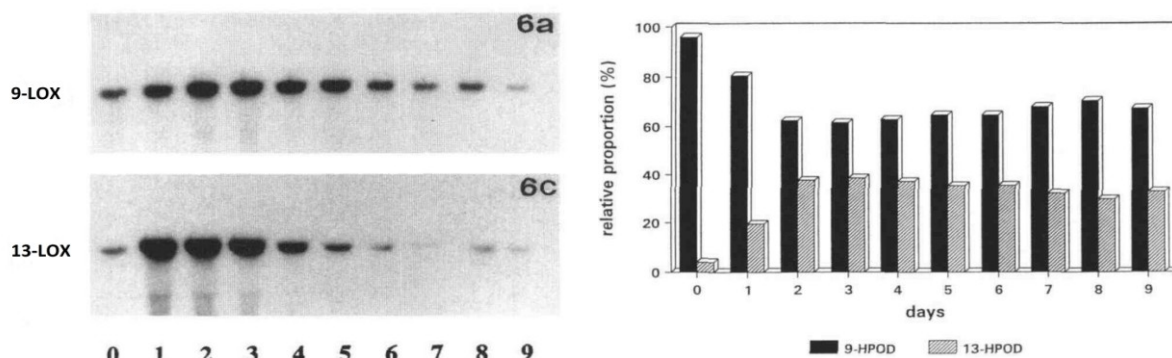


Figura 53. Espressione differenziale della 13-LOX e della 9-LOX durante le varie fasi della germinazione di embrioni di orzo (a sinistra) e corrispondente composizione degli HPOD (a destra) (Holtman *et al.*, 1996).

Un profilo simile è stato osservato anche nei semi in maturazione di grano duro dove la Lpx-2 (13-LOX) viene espressa nei primi stadi della maturazione (8 giorni dopo la fecondazione [DAF]) per poi decrescere, mentre la Lpx-1 rimane pressoché costante per tutta la durata della maturazione (De Simone *et al.* 2010). Per capire meglio il ruolo delle due isoforme durante la germinazione esse sono state caratterizzate e parzialmente purificate: la 13-LOX riesce a utilizzare i substrati complessi molto meglio della 9-LOX, anche se per entrambe le isoforme i substrati ottimali rimangono l'acido linoleico e linolenico (Holtman *et al.* 1996). La capacità della 13-LOX di poter metabolizzare substrati complessi suggerisce un suo ruolo nella degradazione dei lipidi di riserva, ipotesi supportata anche dal fatto che a partire dal primo giorno della germinazione il rapporto 9/13 HPOD derivanti dall'idrossilazione dei lipidi totali si sposta a favore dei 13-HPOD. È soprattutto nelle piante a semi oleosi, come girasole e lino, che le 13-LOX sembrano avere un ruolo cruciale nel primo passaggio della mobilizzazione lipidica, iniziando la β -ossidazione: è stata infatti ipotizzato un *pathway* associato a questo tipo di enzimi che agisce in maniera parallela alla classica via lipasi dipendente (Feussner *et al.*, 2001). Dopo la rottura dei corpi lipidici, che avviene inizialmente con la digestione proteolitica delle oleosine e successivamente con la disgregazione del monostrato fosfolipidico a opera di una fosfolipasi *patatin-type*, le 13-LOX specifiche espresse durante il primo stadio di germinazione sembrano in grado di catalizzare la idroperossidazione in posizione 13 dei triacilgliceroli (TAG) (Feussner *et al.*, 1998).

La formazione di una grande quantità di 13-HODE è stata osservata in corpi lipidici isolati (Feussner *et al.*, 1995a) e anche in estratti citosolici di cotiledoni di cetriolo (Weichert *et al.*, 2002). In quest'ultimo lavoro analisi immunocitochimiche hanno localizzato una 13-LOX ancorata alla membrana dei corpi lipidici nel corso dei primi stadi della germinazione; un risultato simile è stato ottenuto anche in piante transgeniche di tabacco trasformate con la suddetta lipossigenasi di cetriolo (Hause *et al.*, 2000). Questo tipo di lipossigenasi viene tradotta nel citoplasma e è successivamente trasferita nei corpi lipidici dove si ancora alla membrana (Figura 54); il peptide segnale per questo processo sembra trovarsi nel dominio N-terminale della proteina (May *et al.*, 2000): questa interazione è in grado di aumentare l'attività catalitica dell'enzima di quasi quattro volte. Le LOX dei corpi lipidici sembrano avere un peso molecolare superiore (~100 kDa) a quelle delle altre LOX *type-1* e sono le uniche in grado di ossigenare direttamente la trilinoleina nei triacilgliceroli ossidati derivati: questa attività è stata dimostrata anche *in vitro* utilizzando una lipossigenasi ricombinante espressa in *E. coli* (Bachmann *et al.*, 1998).

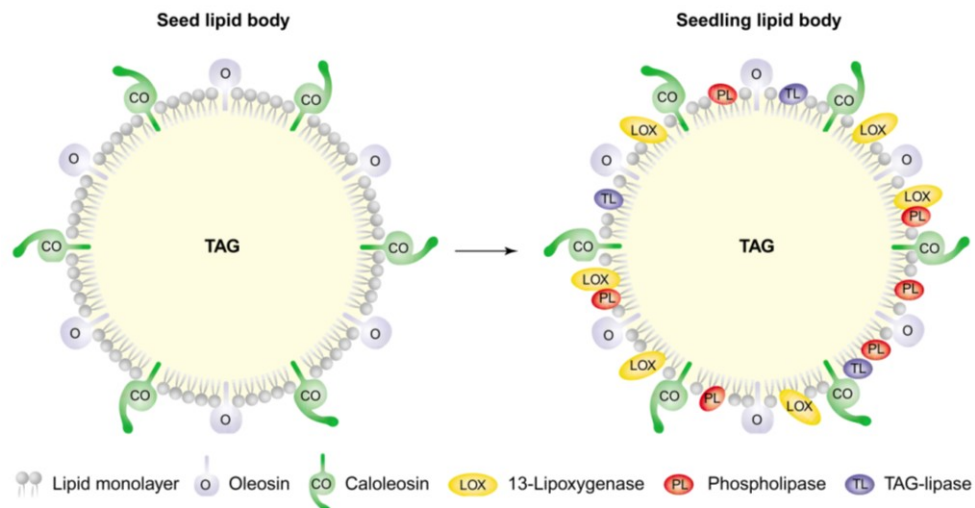


Figura 54. Composizione dei corpi lipidici durante la germinazione del seme. Nei semi dormienti solo due proteine sono presenti nel monostrato fosfolipidico, l'oleosina e la caloleosina, mentre durante la germinazione se ne aggiungono altre tre: la 13-LOX, una fosfolipasi *patatin-type* e una TAG lipasi (Feussner *et al.*, 2001).

Visto che i derivati ossigenati della trilinoleina sono presenti solamente nei germogli di gran parte delle piante oleose (come girasole, tagete e lino), la LOX in grado di produrli dovrebbe giocare un ruolo fondamentale durante la germinazione. In accordo con questo scenario la mobilizzazione dei lipidi di riserva sembra essere inizializzata non da una lipasi ma da una specifica 13-LOX. In questo nuovo *pathway* l'ossigenazione dei lipidi di riserva da parte della LOX precede l'idrolisi dei TAG, che viene effettuata da una specifica lipasi dei corpi lipidici; successivamente si assiste alla riduzione degli idroperossidi liberi. Infine la β -ossidazione glicosomiale provvede alla produzione di molecole di acetil-CoA necessari per la crescita del germoglio (Figura 55).

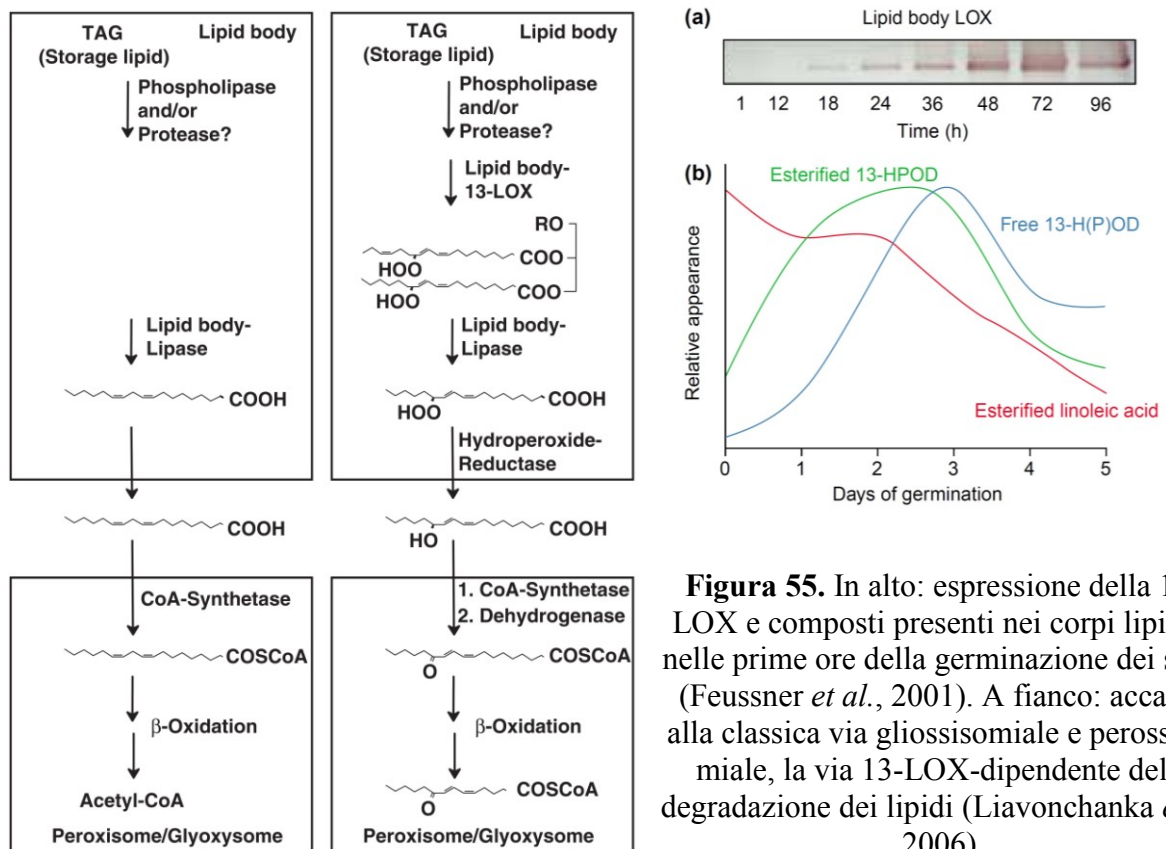


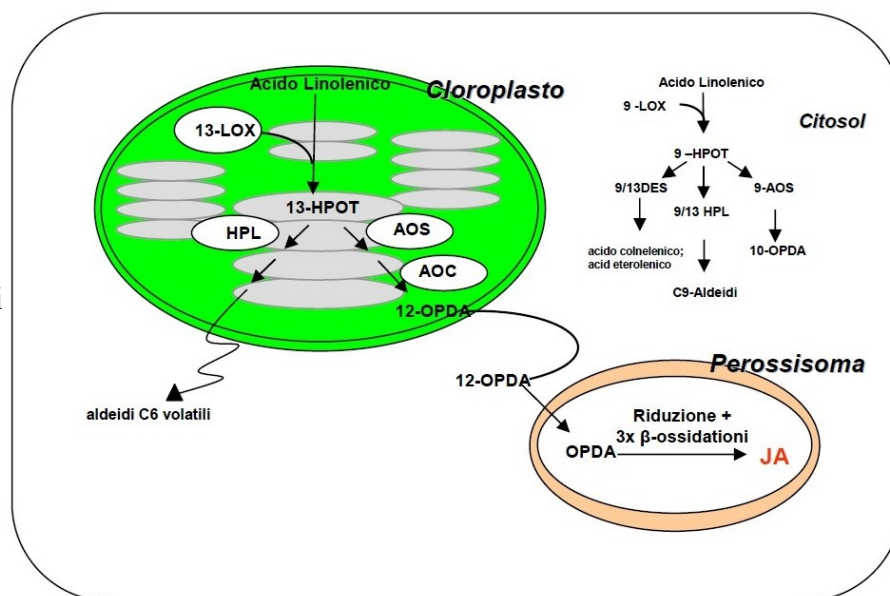
Figura 55. In alto: espressione della 13-LOX e composti presenti nei corpi lipidici nelle prime ore della germinazione dei semi (Feussner *et al.*, 2001). A fianco: accanto alla classica via glicosomiale e perossisomiale, la via 13-LOX-dipendente della degradazione dei lipidi (Liavonchanka *et al.* 2006).

La via di lipossigenazione lipidica sembra essere però meno efficace della via degradativa classica. Studi effettuati sui gliosissomi di girasole e di cetriolo isolati dai cotiledoni (Gerhardt *et al.*, 2005) mostrano infatti come l'inserzione della molecola di ossigeno in posizione C-13 possa impedire in alcuni casi la completa β -ossidazione dei substrati: questo potrebbe essere il risultato di un processo evolutivo atto ad avvantaggiare processi paralleli a quello della crescita del germoglio quando vi è un eccesso di lipidi di riserva.

1.5.2.2. Sintesi del Jasmonato e risposta a stress meccanico (13-LOX *Type2*)

Le 13-LOX *Type-2*, ovvero quelle che presentano il peptide di transito per i plastidi, sembrano essere coinvolte prevalentemente nella sintesi dell'acido jasmonico (JA), un ormone capace di riprogrammare l'espressione dei geni di difesa della pianta per proteggersi dall'attacco di insetti e erbivori (Howe e Jander, 2008). La biosintesi di questo composto è complessa, avviene in tre distinti compartimenti cellulari con la produzione di dieci intermedi che devono essere trasportati da un organello all'altro (Figura 56; Wasternack, 2007). L'inizio della sintesi avviene nei plastidi a opera della LOX e il suo prodotto viene deidratato dalla allene ossido sintasi e ciclizzato dalla allene ossido ciclasi in acido 12-osso-fitodienoico (OPDA). Questo è trasportato nel perossisoma dove prima è ridotto a ciclopentanone dalla OPDA reductasi e successivamente a JA con tre cicli di β -ossidazione (Shaller *et al.*, 2005). Il JA può essere trasportato nel citosol dove sarà utilizzato per ottenere le sue varianti bioattive tramite metilazione (dando origine al composto volatile metil jasmonato) o coniugazione con amminoacidi come l'isoleucina (JA-Ile). Il metil giasmonato è in grado di oltrepassare la membrana citoplasmatica e può così esercitare la sua azione a distanza, mentre la forma JA-Ile può essere immagazzinata in vacuoli e trasportata attraverso lo xilema dalle radici alle foglie o viceversa (Poltronieri *et al.*, 2011).

Figura 56.
Raffigurazione schematica della sintesi dell'acido jasmonico a partire dalle 13-LOX *type2* (Poltronieri *et al.*, 2011).



Nel corso della prima metà degli anni novanta è stato dimostrato che la LOX2 di *A. thaliana* è coinvolta nella sintesi di JA indotta da condizioni di stress meccanico. Piante in cui il gene codificante tale isoforma era stato silenziato mediante la tecnologia dell'RNA antisense non erano in grado di accumulare JA se sottoposte a tale tipo di stress e i livelli di trascritto dei geni indotti da tale trattamento (come a esempio *vsp1*) erano di molto inferiori rispetto al *wild-type*; i livelli basali di JA restavano invece inalterati (Bell *et al.* 1995).

Dei sei geni codificanti per lipossigenasi in *A. thaliana*, altri tre (*LOX3*, *LOX4* e *LOX6*) appartengono alle LOX *type2* e sono coinvolti nella sintesi del JA (Bannenberg *et al.*, 2009). Doppie mutanti per i geni *LOX3* e *LOX4* sono risultati maschio sterili, rivelando il ruolo

fondamentale di queste due isoforme per la fertilità della pianta mediata da acido jasmonico. Inserendo i geni funzionali nei genotipi mutanti o somministrando JA esogeno la fertilità viene ristabilita (Caldelari *et al.*, 2011). L'analisi di tutte le possibili combinazioni di doppi, tripli e quadrupli mutanti per le 13-LOX *type2* di *A. thaliana* pochi secondi dopo il ferimento delle foglie, con concomitante misurazione delle concentrazioni di JA e Ile-jasmonato, ha permesso di identificare la LOX6 come l'isoforma necessaria per l'inizio della sintesi JA nei tessuti distali al sito di danno (Chaaubin *et al.*, 2014).

Un altro esempio di LOX *type2* coinvolte nel *pathway* del JA è dato dalle LOX di foglia di patata, chiamate LOX-H3 e LOX-H1 (Royo *et al.* 1996). L'isoforma H3 viene accumulata immediatamente dopo lo stress meccanico, con un picco massimo di mRNA dopo 30 min dal trattamento, mentre la H1 raggiunge la massima espressione a 24 ore. Il silenziamento della isoforma H3 mediante metodologia antisense riduce sensibilmente l'accumulo dell'mRNA della proteasi inibitrice del jasmonato (Pin2), suggerendo un ruolo specifico di questa LOX nelle prime fasi della sintesi dell'ormone (Royo *et al.*, 1999). Per quanto riguarda l'orzo è stata dimostrata invece la presenza di 13-LOX cloroplastiche inducibili da metil jasmonato (Feussner *et al.* 1995b). In pomodoro è stata identificata una specifica isoforma inducibile da stress meccanico e da somministrazione esogena di metil jasmonato (*TomLOXD*) che raggiunge il picco massimo di espressione un'ora dopo il trattamento (Heitz *et al.*, 1997).

In mais, dove sono presenti 14 geni codificanti le lipossigenasi, la *ZmLOX8* è coinvolta nella sintesi del JA. La determinazione del sesso in mais è definita da un processo che porta allo sviluppo di un fiore unisessuale derivante da un meristema bisessuale: la perdita del pistillo primordiale presente inizialmente, con la successiva formazione del fiore maschile, è mediato da un processo di morte cellulare programmata. In piante mutanti incapaci di produrre una *ZmLOX8* funzionale si nota una netta riduzione dei livelli di JA endogeno durante l'infiorescenza e un conseguente mancato sviluppo del fiore maschile; ripristinando i livelli di ormone mediante trattamento esogeno il processo viene ristabilito, dimostrando il ruolo fondamentale dell'enzima nello sviluppo del fiore (Acosta *et al.*, 2009).

1.5.2.3. Lipossigenasi coinvolte nella risposta all'attacco patogeno (9-LOX)

Il coinvolgimento delle LOX-1, che catalizzano preferenzialmente la formazione dei 9-HPOD, nella risposta all'attacco patogeno è ampiamente documentata. In tabacco il silenziamento di una specifica 9-LOX attraverso tecnologia antisense rende la pianta molto più suscettibile del *wild-type* all'infezione da parte di *Phytophthora parasitica* (Rance *et al.*, 1998). Un analogo risultato è stato osservato in mais infettato da *Aspergillus flavus* (Wilson *et al.*, 2001). L'acido colneleico e colnelenico, due divinil-eteri con attività antimicrobica derivanti dall'attività della 9-LOX, vengono sintetizzati in foglie di patata in seguito a infezione da *P. infestans* (Weber *et al.*, 1999), mentre nell'interazione tra *Phaseolus vulgaris* e *Pseudomonas syringae* l'ossilipina a attività antimicrobica è il (*E*)-2-esenale (Croft *et al.*, 1993).

Alcuni prodotti del metabolismo delle LOX sono coinvolti anche nella risposta ipersensibile (HR) della pianta, che vede la produzione massiva di ROS (scoppio ossidativo) associata a una perdita dell'integrità della membrane cellulari e all'induzione di fenomeni di morte cellulare programmata, che tende a fare terra bruciata intorno al punto di penetrazione del patogeno. In particolare le LOX sembrano essere coinvolte nella perossidazione dei lipidi di membrana nel corso di tale risposta (Rusterucci *et al.*, 1999). In foglie di tabacco trattate con elicitore fungino si assiste a una estesa perossidazione dei lipidi della membrana del cloroplasto a opera dei metaboliti della 9-LOX, che viene iper-espressa. La necrosi delle foglie correlata con la perossidazione degli acidi grassi è indotta anche da trattamento con metil jasmonato, che è in grado di aumentare l'espressione della 9-LOX coinvolta nel processo di HR. Si assiste quindi al coinvolgimento di due tipi di lipossigenasi, la 13-LOX che induce la sintesi del JA e la 9-LOX che è indispensabile per il danneggiamento delle

membrane e il processo di morte cellulare programmata. Il ruolo fondamentale delle lipossigenasi nel processo di HR è stato osservato anche nelle leguminose: nelle radici di lenticchia gli HPOT derivanti dall'attività delle LOX sono coinvolti nella morte cellulare programmata; se si somministrano inibitori specifici per tali enzimi i protoplasti risultano essere più resistenti al perossido di idrogeno (Maccarone *et al.*, 2000). Ci sono anche esempi di 13-LOX coinvolte nella risposta ipersensibile della pianta: gli idroperossidi prodotti dall'acido linolenico in *A. thaliana* sono capaci di degradare le membrane dei cloroplasti in risposta a stress da ossigeno singoletto (Op de Camp *et al.*, 2003).

1.5.2.4. Altri ruoli fisiologici delle lipossigenasi vegetali: sviluppo vegetativo, senescenza e proteine di riserva

Recentemente è stato dimostrato che silenziando una specifica 9-LOX di patata espressa nel tubero si inibisce sensibilmente la crescita di quest'ultimo e in alcuni casi si assiste alla sua rottura. Questi dati sembrano dunque evidenziare la presenza di metaboliti prodotti dalla 9-LOX che sono coinvolti nella regolazione dello sviluppo del tubero (Kolomiets *et al.* 2001). Nei noduli di *P. vulgaris* le 9-LOX sono presenti in tutti gli stadi dello sviluppo, mentre si assiste alla loro scomparsa quando raggiungono la grandezza definitiva (Porta *et al.*, 1999).

Oltre a inizializzare la perossidazione dei precursori dell'acido abscissico, le LOX possono intervenire anche indirettamente nella sintesi del JA. In mutanti di mais privi della LOX10 le piante non sono in grado di produrre i composti volatili delle foglie verdi (GLV); si assiste inoltre a una notevole riduzione della produzione di JA in quanto questi composti sembrano essere in grado di stimolare l'espressione di un'altra 13-LOX, quella coinvolta nella sintesi dell'ormone (Christensen *et al.*, 2013). Le piante mutanti risultano essere molto più suscettibili all'attacco di insetti.

I prodotti derivanti dalla via delle 13-LOX possono essere convertiti in composti volatili C6, molto abbondanti ad esempio in bacche mature di pomodoro, e conferiscono potere attrattivo ai frutti (Chen *et al.*, 2004). Questi composti derivano dalla via della HPL (Porta e Rocha-Sosa, 2002) dove gli idroperossidi vengono scissi in aldeidi C6 che vengono successivamente ridotte nei corrispondenti alcoli per azione della alcool deidrogenasi e trasformati in composti volatili dalla BAHD aciltransferasi. Oltre a conferire profumo ai frutti, l'emissione dei GLV è coinvolta nella protezione dall'attacco dei predatori in quanto questi composti sono in grado di attrarre i nemici naturali degli erbivori e in alcuni casi di provocarne la morte (Shiojiri *et al.*, 2006). Oltre a questi composti sono state identificate anche molecole volatili C5 che derivano da specifiche isoforme di 13-LOX che hanno il ruolo di conferire odore ai frutti, come la *TomLOXC* di pomodoro (Shen *et al.*, 2014).

Le 13-LOX *type2* sembrano essere coinvolte anche negli ultimi stadi del processo di senescenza foliare, dove si crede possano intervenire ossidando direttamente le membrane plastidiche, anche se l'ossidazione più determinante resta quella di tipo chimico (He *et al.*, 2002). Un altro esempio di lipossigenasi coinvolta nei processi vegetativi è stato riportato in *Camellia sinensis*, la pianta del tè, nella quale la *CsLOX1* è coinvolta nella regolazione della morte cellulare, nella senescenza fiorale e nella risposta difensiva agli attacchi di afidi (Liu e Han, 2010). Tale enzima, pur presente in vari tessuti nella pianta, è espresso prevalentemente nei petali dei fiori, con una *down-regulation* durante l'apertura del fiore a cui segue una forte sovra-regolazione al momento della senescenza dei petali (Figura 57). Nelle foglie, invece, l'enzima è espresso in maniera inferiore rispetto ai fiori ma in caso di ferimento, attacchi di insetti defogliatori o da parte di afidi la trascrizione subisce un rapido incremento.

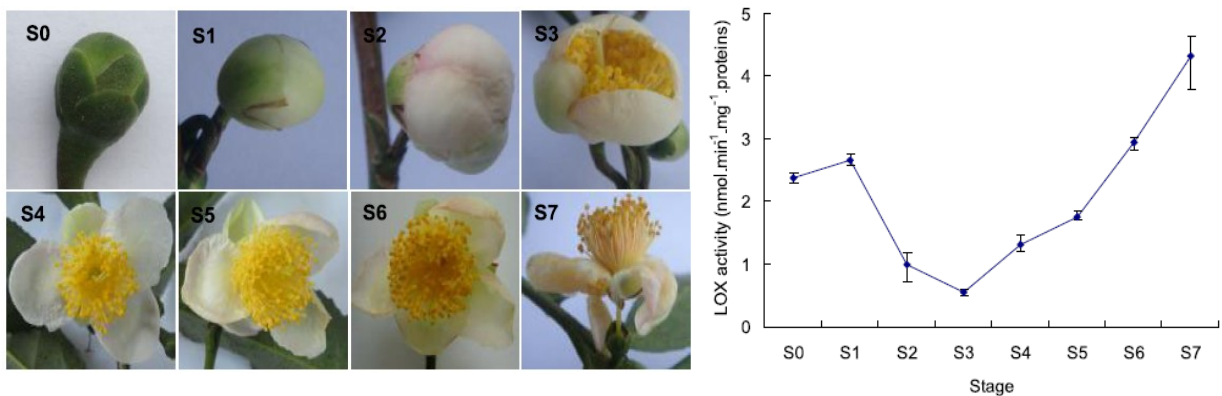
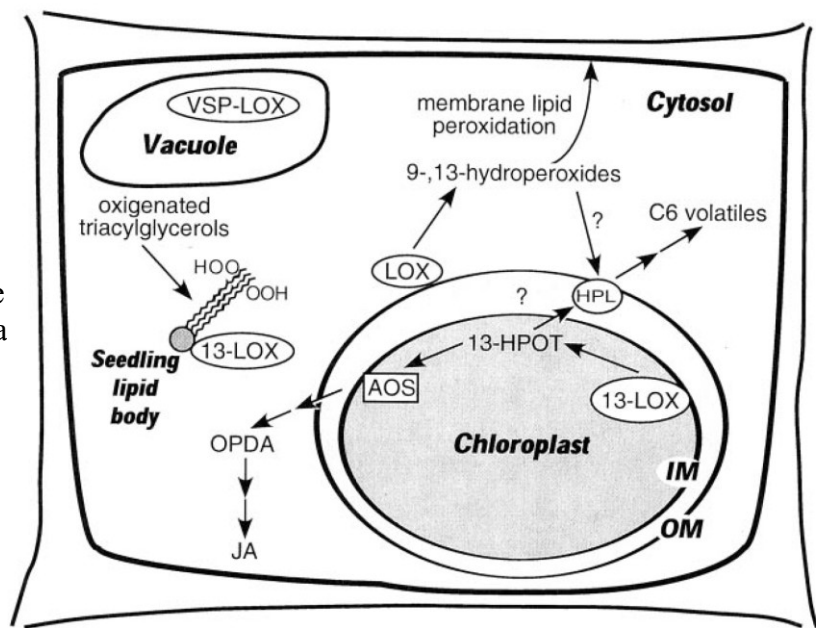


Figura 57. Fasi di sviluppo, apertura e senescenza del fiore in *C. sinensis* (a sinistra) e concomitante andamento dell'attività della CsLOX1 (a destra; Liu e Han, 2010).

Alcune LOX sono state infine classificate come proteine di riserva vegetative (VSP), che vengono immagazzinate dalla pianta quando vi è un eccesso di azoto; si possono trovare VPS ad esempio nei vacuoli della guaina del fascio, nei cotiledoni e nei fiori. In soia sono state identificate 5 isoforme di lipossigenasi che potrebbero essere coinvolte nel processo di riserva vegetativo (VLX A-E) e che sono iperesprese in condizioni di "sink-limitation" (Fischer *et al.*, 1999), anche se recentemente uno studio di localizzazione cellulare ne mette in dubbio tale ruolo (Turner *et al.*, 2011). Un quadro generale dei ruoli delle LOX è riportato in Figura 58.

Figura 58. Rappresentazione schematica del ruolo funzionale e della localizzazione cellulare delle varie isoforme di LOX finora identificate (Porta e Rocha-Sosa, 2002).



1.5.3. Le lipossigenasi in frumento duro

Il frumento duro (*Triticum turgidum* L. var. *durum*) è un frumento tetraploide $2n = 28$, genoma AABB, appartenente alla famiglia delle *Poaceae*, gruppo *Triticeae*. Questo ibrido ha avuto origine in Medio Oriente dall'interazione interspecifica tra 2 specie selvatiche: *Triticum urartu* ($2n=14$, genoma AA) e una specie non ancora chiarita del genere *Aegilops* con corredo cromosomico $2n=14$, genoma BB. Addomesticando l'ibrido selvatico ottenuto da questa unione ($2n=28$, genoma AABB) conosciuto come *Triticum dicoccoides* si è ottenuto il frumento duro "moderno".

La cariosside di frumento è un frutto secco indeiscente di forma ovoidale, lungo da 6 a 8 mm e largo 3-4 mm, diviso dall'esterno verso l'interno in pericarpo (8-10%), endosperma (87-89%) e embrione o germe (2-4%) (Cappelli e Vannucchi, 2005). Il pericarpo è formato da una serie di strati di cellule, che costituiscono l'involucro esterno del chicco, conosciuto comunemente come crusca, molto ricco di cellulosa, sali minerali e in alcuni casi flavonoidi. L'endosperma è diviso in 2 strati: lo strato aleuronico esterno, contenente proteine di alto valore biologico, lipidi, vitamine e sali minerali e l'endosperma amilifero, al centro, contenente granuli di amido e proteine di riserva. Dal punto di vista salutistico molti composti biologicamente attivi della granella derivano in larga parte dal pericarpo e dal germe: si tratta per lo più di fibre alimentari, vitamine del gruppo B (tiamina, niacina, riboflavina e acido pantotenico), minerali e amminoacidi essenziali che conferiscono un valore nutritivo e salutistico alla semola e ai prodotti che da essa derivano (Flagella, 2006). Nell'endosperma la molecola più funzionale è la luteina, che rappresenta il carotenoide più abbondante.

Il grano duro è la specie maggiormente coltivata a livello mondiale, con una produzione globale nel 2009 di quasi 39 milioni di tonnellate. I principali produttori sono l'Europa mediterranea e il nord Africa, l'America del nord e l'Asia occidentale, in particolare l'Italia, il Canada, la Turchia, la Siria, il Kazakistan e gli Stati Uniti che insieme forniscono circa il 50% dell'offerta mondiale. *Leader* a livello europeo è proprio l'Italia, in cui la regione più produttiva è rappresentata dal Meridione, dove si trova un clima molto adatto alla coltivazione di questa pianta. Dal frumento duro, per semplice molitura delle cariossidi, si ottiene la semola, che si differenzia dalla farina di grano tenero per la sua consistenza vitrea data dall'alto contenuto in proteine; questa può essere utilizzata come tale per la preparazione di piatti, ma viene impiegata principalmente per la produzione della pasta. Un altro prodotto ottenuto dalla lavorazione della semola è il cous-cous, che rappresenta l'alimento di base nei Paesi del nord-Africa.

La pasta è il prodotto di trasformazione del frumento duro più apprezzato e consumato; il DPR 187/01 definisce "*pasta di semola di grano duro e pasta di semolato di grano duro i prodotti ottenuti dalla trafilazione, laminazione e conseguente essiccazione di impasti preparati rispettivamente ed esclusivamente con semola e semolati di grano duro e acqua*". Alcune indicazioni attribuirebbero l'origine della pasta alla Cina, anche se si hanno evidenze del suo uso in Italia durante la civiltà etrusca. Il processo di pastificazione ha subito nel corso degli anni notevoli ammodernamenti, ma le operazioni in linea generale sono le stesse: inizialmente si forma un impasto nel quale la semola viene unita a un 20-30% di acqua; successivamente si procede con la trafilazione, nel corso della quale l'impasto viene tagliato per assumere la forma desiderata. Infine la pasta in uscita dalle trafile viene essiccata in modo da abbassarne l'umidità, che deve essere minore del 12.5% (Cappelli e Vannucchi, 2005). La pasta secca di alta qualità è caratterizzata da un colore uniforme giallo brillante, privo di macchie, bolle d'aria o incrinature; deve avere odore e sapore gradevoli e alla cottura deve essere tenace ed elastica, assorbire acqua, aumentando di peso e di volume fino a due o tre volte. Da sempre l'Italia è il principale produttore, con circa 3.000.000 tonnellate, ma anche il principale consumatore in quanto ogni cittadino ne consuma una media di 26 kg all'anno. La pasta rappresenta sicuramente uno dei settori portanti del "*made in Italy*" e la sua produzione, che rappresenta il 12% del totale mondiale e il 75% di quello europeo, è una filiera di grandissimo valore sociale e economico. Per salvaguardarla dalla concorrenza internazionale di minore qualità si dovrebbero apportare interventi mirati, volti soprattutto al mantenimento della qualità e allo sviluppo di *claim* funzionali, che ne apporterebbero un elevato valore aggiunto. La pasta in se è un alimento di grande valore nutrizionale e 100 g apportano circa 360 Kcal, di cui il 74% sotto forma di carboidrati complessi (amido), l'11.5% sotto forma di proteine di scarso valore biologico (derivanti per lo più dal germe), e l'1.2% di grassi. Ha un basso contenuto di vitamine e di amminoacidi essenziali come la lisina, ma vanta un alto contenuto di cisteina e metionina, oltre a un eccesso di potassio. Particolarmente importante

dal punto di vista salutistico è il mantenimento, nelle fasi di lavorazione, di quei composti biologicamente attivi come i polifenoli a attività ipocolesterolemica, antidiabetica e antitumorale, i tocoferoli e i carotenoidi a azione antiossidante.

Il colore della pasta è dovuto alla presenza di carotenoidi e xantofille che le conferiscono un elevato valore aggiunto dal punto di vista funzionale; inoltre la colorazione giallo-naturale della pasta ne aumenta l'appetibilità da parte del consumatore che la riconosce come un prodotto di qualità. Il *total yellow pigment* (TYP), che viene utilizzato come indice di determinazione dei pigmenti gialli e dei carotenoidi, è determinato spettrofotometricamente (Hentschel *et al.*, 2002) ed è comunemente usato per lo *screening* del grano nei programmi di *breeding* e nel determinare la qualità della semola e della pasta. Numerosi studi sono stati effettuati per stabilire la composizione in carotenoidi delle cariossidi di grano duro: il principale componente è la luteina, che può arrivare a concentrazioni anche di 10 $\mu\text{g g}^{-1}$ in alcune *cultivars* e che costituisce dall'80% al 94% dei carotenoidi totali, seguita in concentrazioni molto minori da zeaxantina e da α/β carotene (Abdel-Aal *et al.*, 2007).

Il contenuto naturale di carotenoidi nelle cariossidi può variare a seconda del genotipo della pianta e delle condizioni ambientali e di crescita utilizzate, e può essere significativamente modificato dalla presenza di attività idroperossidasiche. Queste si esplicano principalmente in due fasi: prima nella cariossidi e successivamente nel processo di pastificazione, dove si registra il maggior decremento di YPC. Oltre al contenuto endogeno, quindi, il fattore che influenza in maniera significativa il contenuto di questi composti bioattivi è dato dalle attività ossidative che avvengono nelle fasi di stoccaggio dei grani, dopo la macinazione, o nel corso del processo di produzione della pasta (Troccoli *et al.*, 2000). L'ossidazione che causa la riduzione del TYP nel processo di pastificazione è principalmente enzimatica e la classe di enzimi a cui viene imputato il *bleaching* dei carotenoidi è quella delle lipossigenasi (Borrelli *et al.*, 1999; Borrelli *et al.*, 2008) i cui prodotti di ossidazione agiscono degradando i carotenoidi. In alcuni casi si assiste a una perdita di colore che può arrivare all'8% nella fase di macinazione e al 16% nel processo produttivo. Inibendo l'attività delle LOX si potrebbe ovviare a questo problema, aumentando il contenuto di composti funzionali e consentendo allo stesso tempo di ridurre l'uso di coloranti alimentari (Borrelli *et al.*, 2003). Due sono i punti critici dell'intero processo: l'impasto, in cui si forma il glutine e in cui le condizioni ambientali sono ottimali per la catalisi enzimatica, e l'essiccazione, in particolare quella a bassa temperatura (40-45°C per 20 ore). Ecco allora che la caratterizzazione delle varie isoforme di LOX in frumento duro e la selezione di *cultivar* che presentino una bassa attività lipossigenasica potrebbe avere ottimi risvolti pratici per ovviare al *bleaching* dei prodotti di lavorazione; inoltre qualsiasi fattore che possa inibire tale attività (come ad esempio le alte temperature) potrebbe essere impiegato per mantenere un'alta qualità della pasta (Flagella, 2006).

I primi studi sulle LOX dei cereali sono stati condotti in orzo, nel quale sono state identificate e parzialmente caratterizzate 2 isoforme che differiscono per la natura dei prodotti: la LOX-1, che produce 9-HPOD, e la LOX-2 che genera prevalentemente 13-HPOD. Queste forme, codificate rispettivamente dai geni *LoxA* e *LoxC*, sono espresse in maniera differenziale durante la formazione dell'embrione e della germinazione del seme (Holtman *et al.*, 1996). Sempre in orzo sono stati successivamente identificati 3 cDNA codificanti per lipossigenasi ed espressi in fase di germinazione, rinominati *LoxA*, *LoxB* e *LoxC*: il primo codifica per l'isoforma 9-LOX ed è localizzato nel cromosoma 4HS; *LoxC* corrisponde all'isoforma 13-LOX ed è posto sul cromosoma 5HC, mentre *LoxB* è stato mappato a breve distanza da *LoxA* sul cromosoma 4HS (Van Mechelen *et al.*, 1999). *LoxB* è espresso in maniera molto più ridotta durante la maturazione del seme rispetto agli altri due.

Per quanto riguarda il frumento, nella prima metà degli anni ottanta vennero isolate e parzialmente caratterizzate dalla farina di grano duro 3 forme isoenzimatiche separabili su una colonna di carbossimetil-cellulosa (Hsieh e McDonald, 1984). Tre frazioni contenenti attività

lipossigenasica, denominate L-1, L-2 e L-3, sono state parzialmente purificate anche dall'endosperma e mostrano un ottimo di pH rispettivamente pari a 10.2, 4.8 e 6.6 (Borelli *et al.*, 2003). L'isoforma L-1 mostra attività lipossigenasica ma viene considerata una lipossigenasi atipica. Un gruppo di ricercatori italiani ha dimostrato inoltre che a pH 10.5-11.5 non si rileva alcuna attività enzimatica riferibile alla LOX ma si ha ugualmente il *bleaching* del β -carotene, suggerendo la possibile esistenza di lipossigenasi atipiche (Pastore *et al.*, 2000).

Studi più recenti hanno dimostrato che i geni *LOX* in frumento duro, denominati *Lpx*, sono posizionati in regioni corrispondenti a quelle di orzo, rappresentandone gli ortologi. Sulla base dell'omologia di sequenza *Lpx-1* è stato associato al gene *LoxA* di orzo, *Lpx-2* a *LoxC* e *Lpx-3* a *LoxB*. L'associazione tra i loci *Lpx-1* e *Lpx-3* è stata studiata utilizzando una libreria BAC di frumento duro (Garbus *et al.*, 2009), evidenziando come *Lpx-B1.1* e *Lpx-B3* siano a una distanza inferiore a 103 kbp l'uno dall'altro, mentre *Lpx-B1.2* risulta essere più lontano. Nel genoma A si è trovata solamente una copia parzialmente deleta di *Lpx-1*, posizionata all'interno di una regione di 42 kpb con *Lpx-A3*. Questo quadro rende molto complicato separare questi loci per ricombinazione in modo da selezionare una combinazione ottimale di questi alleli in un processo di *breeding* per il miglioramento della qualità della pasta. Inoltre sono stati identificati due differenti geni *Lpx-1* (*Lpx-B1.1*, *Lpx-B1.2*) che derivano probabilmente da una duplicazione del locus: in alcuni genotipi una successiva delezione del locus *Lpx-B1.1* causa una riduzione dell'attività lipossigenasica associata a un minore *bleaching* dei carotenoidi durante il processo di pastificazione (Carrera *et al.*, 2007). Il livello di omologia tra le sequenze *Lpx-B1.1* e *Lpx-B1.2* (95% per il DNA genomico e 97% per il cDNA) sembra indicare che la duplicazione sia avvenuta in tempi ravvicinati alla divergenza dei genomi A, B e D, ma successivamente alla divergenza frumento-orzo; questo spiegherebbe perché in orzo sia presente solamente un gene per tale isoforma (Garbus *et al.*, 2009). La vicinanza nel tempo tra la duplicazione del locus *Lpx-B1* e la divergenza tra i genomi del frumento rende difficile capire se le stesse duplicazioni si siano verificate anche sui genomi A e D; i dati ottenuti sembrerebbero suggerire che questa duplicazione si trovi solamente nel genoma B (Carrera *et al.*, 2007).

In un recente lavoro sono state correlate tra loro l'attività LOX e il valore di YPC in *cultivar* italiane antiche e contemporanee: i dati ottenuti mostrano come i genotipi moderni presentino un YPC maggiore e una attività lipossigenasica nettamente inferiore, passando da 7.91 EU g⁻¹ DW nel genotipo antico Matarese a 1.32 EU g⁻¹ DW nel genotipo moderno Lesina (De Simone *et al.*, 2010). Esprimendo i valori di attività lipossigenasica in funzione dell'anno di rilascio delle *cultivar* si nota come i genotipi più datati hanno effettivamente una maggiore attività lipossigenasica e un minore YCP (Figura 59).

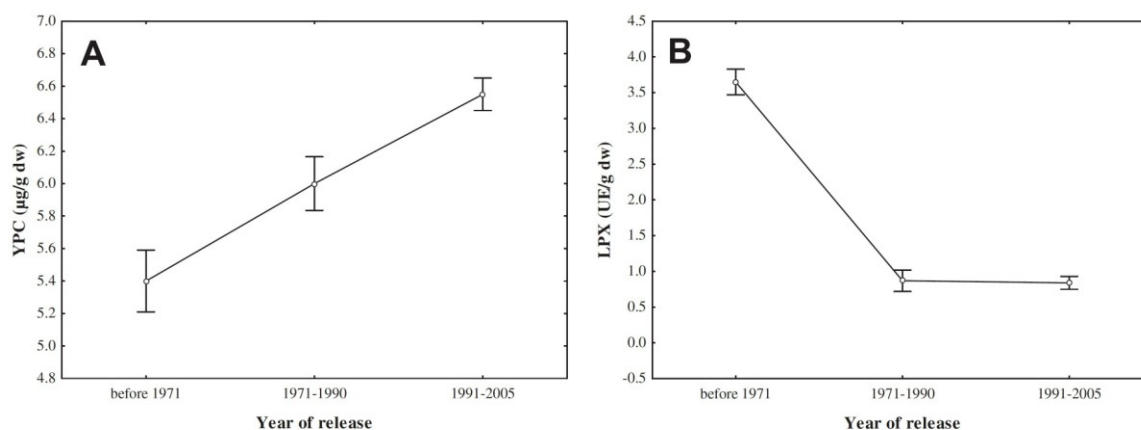


Figura 59. Andamento dell'indice YPC e dell'attività LPX in genotipi di grano duro rilasciati in Italia nel corso del XX secolo (De Simone *et al.*, 2010).

Come ipotizzato da Carrera e collaboratori (2007) che hanno dimostrato come le differenze nell'attività delle Lpx nei semi siano associate alla delezione del gene *Lpx-B1.1*, anche in questo lavoro viene validato questo gene come possibile *target* per la selezione di varietà adatte alla produzione della pasta. Analizzando infatti due coppie di genotipi, una con il gene *Lpx-B1.1* funzionale (Trinakria e Primadur) e l'altra con quello deleto (Creso e Cosmodur), si è verificato come la diversa attività lipossigenasica corrisponda a una riduzione dell'indice YCP nei vari processi di pastificazione (Figura 60).

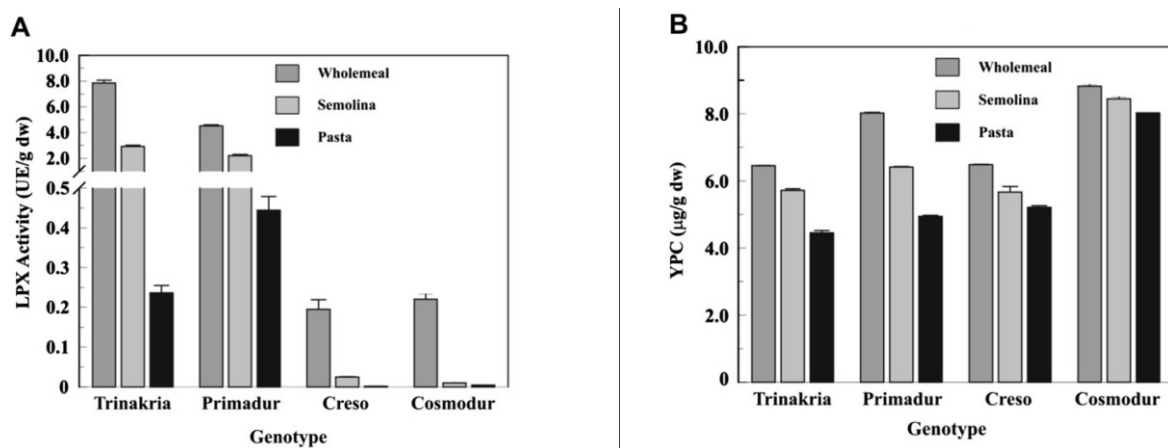


Figura 60. Livelli di attività delle Lpx nei diversi stadi del processo di pastificazione (a destra) e relativi valori di YPC (sinistra; De Simone *et al.*, 2010).

L'attività lipossigenasica nella semolina dipende dai livelli di espressione dei geni *Lpx* durante lo sviluppo del seme e dalle proprietà biochimiche delle differenti isoforme. L'assenza del trascritto della *Lpx-2* alla fine dello sviluppo del seme (40 DAF) suggerisce come l'attività enzimatica nei grani maturi dovrebbe essere attribuita alle sole *Lpx-1* e *Lpx-3*, la prima delle quali espressa in misura maggiore (Figura 61).

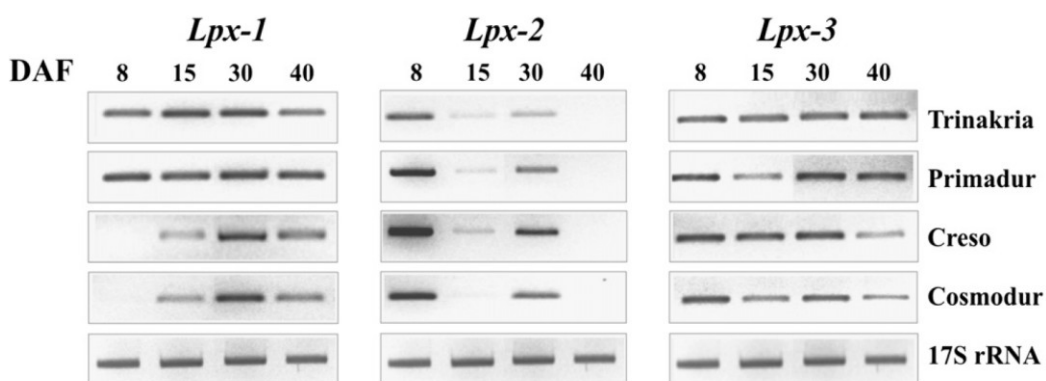


Figura 61. Espressione dei geni *Lpx* in alcune *cultivar* di grano duro nel corso della maturazione del seme (De Simone *et al.*, 2010).

Per elucidare ulteriormente il ruolo delle *Lpx-1* è stata recentemente effettuata una caratterizzazione approfondita del locus *Lpx-1* in una ampia collezione di germoplasma di frumento duro e sono stati identificati 3 geni, di cui uno presente in tre forme alleliche. Oltre ai geni *Lpx-B1.1*, contenente una sequenza MITE nell'ultimo introne, e *Lpx-B1.2*, dove tale sequenza non è presente, è stato infatti scoperto e caratterizzato un terzo gene denominato *Lpx-B1.3* identico al primo (99,9% di identità della regione codificante) ma mancante della

sequenza MITE. Il gene *Lpx-B1.1* è presente infine in 3 diverse forme alleliche classificate come *Lpx-B1.1a*, *Lpx-B1.1b* e *Lpx-B1.1c* (Figura 62; Verlotta *et al.*, 2010). Tutti i geni e le forme alleliche codificano per un mRNA maturo di 2586 pb dal quale viene tradotta una proteina dedotta di 861 residui amminoacidici con un peso molecolare di circa 96 kDa; fa eccezione *Lpx-B1.1c*, che è una forma troncata con un mRNA di 1101 pb che codifica per una proteina priva del dominio catalitico. Nella proteina integra sono state identificate tutte le regioni caratteristiche delle lipossigenasi vegetali, come il dominio PLAT/LH2 nella regione N-terminale, le subunità del sito catalitico per il legame con il substrato e l'ossigeno molecolare e il motivo TV/R tipico delle 9-LOX (Feussner e Wasternack, 2002).

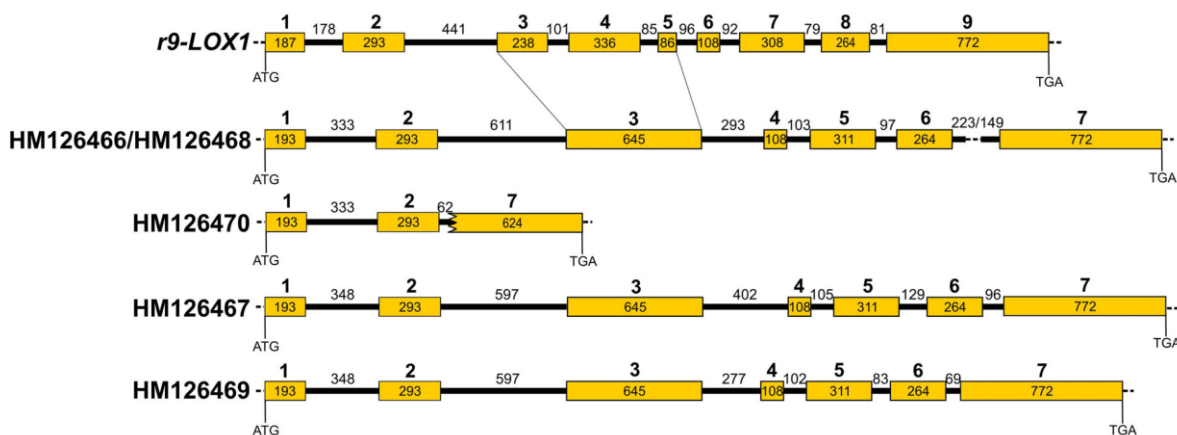


Figura 62. Struttura dei geni *Lpx-B1* in frumento duro. La sequenza delle *Lpx-B1* è messa a paragone di quella della *9-LOX1* di riso (AB099850): i riquadri gialli rappresentano gli esoni, le linee gli introni; la linea interrotta nella sequenza dell'ultimo introne di HM126466 (*Lpx-B1.1a*) e HM126468 (*Lpx-B1.1b*) rappresenta il polimorfismo MITE. La sequenza HM126470 (*Lpx-B1.1c*) è mancante di tutta la parte centrale, mentre HM126467 (*Lpx-B1.2*) e HM126469 (*Lpx-B1.3*) non hanno la sequenza MITE (Verlotta *et al.*, 2010).

In funzione della distribuzione di questi 5 geni/alleli sono stati identificati 3 distinti gruppi all'interno della collezione di germoplasma, corrispondenti a 3 differenti aplotipi (Figura 63). Dalle analisi si evince che ogni genotipo contiene solo 2 geni *Lpx-B1* determinando aplotipi con differenti livelli di attività lipossigenasica e di *bleaching* del β -carotene (Verlotta *et al.*, 2010).

General features of the three haplotypes at gene, transcript and activity levels							
Haplotype	Nomenclature	Gene/allele		Transcript		LOX activity ^a (E.U./g of dry weight)	
		GenBank accession n.	Length (bp)	GenBank accession n.	Length (bp)	Linoleate hydroperoxidation	β -carotene bleaching $\times 10^{-2}$
I	<i>Lpx-B1.1b</i>	HM126468	4,172	HM126473	2,586	4.60 \pm 2.38 ^A	5.76 \pm 1.50 ^A
	<i>Lpx-B1.3</i>	HM126469	4,062	HM126469	2,586		
II	<i>Lpx-B1.1a</i>	HM126466	4,246	HM126471	2,586	2.59 \pm 1.08 ^B	3.34 \pm 0.65 ^B
	<i>Lpx-B1.2</i>	HM126467	4,263	HM126472	2,586		
III	<i>Lpx-B1.1c</i>	HM126470	1,505	HM126475	1,101	0.12 \pm 0.09 ^C	0.47 \pm 0.23 ^C
	<i>Lpx-B1.2^b</i>	HM126467	4,263	HM126472	2,586		

^aValues are expressed as means of the three field replications \pm S.D.; for each activity the different uppercase letters correspond to significantly different values ($P < 0.05$). ^bThe full-length of the *Lpx-B1.2* gene isolated from the haplotype III cultivar Ofanto was found to be 100% identical to that isolated from the haplotype II cultivar Primadur.

Figura 63. Aplotipi *Lpx-B1* e livelli di attività lipossigenasica in grano (Verlotta *et al.*, 2010).

L'aplotipo III, che possiede il gene non funzionale *Lpx-B1.1c*, presenta bassissimi livelli di attività lipossigenasica che corrispondono a un altrettanto limitato *bleaching* del β -carotene. Analizzando nello specifico l'espressione genica in grano maturo tramite PCR semi-quantitativa si nota come *Lpx-B1.2* sia espresso a bassi livelli in entrambi gli aplotipi in cui è presente (II e III); nell'aplotipo III, dove l'attività lipossigenasica è determinata solamente da tale isoforma, l'ossidazione del β -carotene è quasi assente. L'aplotipo I, in cui sono presenti sia *Lpx-B1.1b* e *Lpx-B1.3* entrambi espressi a livelli alti, l'attività enzimatica risulta invece la più elevata (Figura 64).

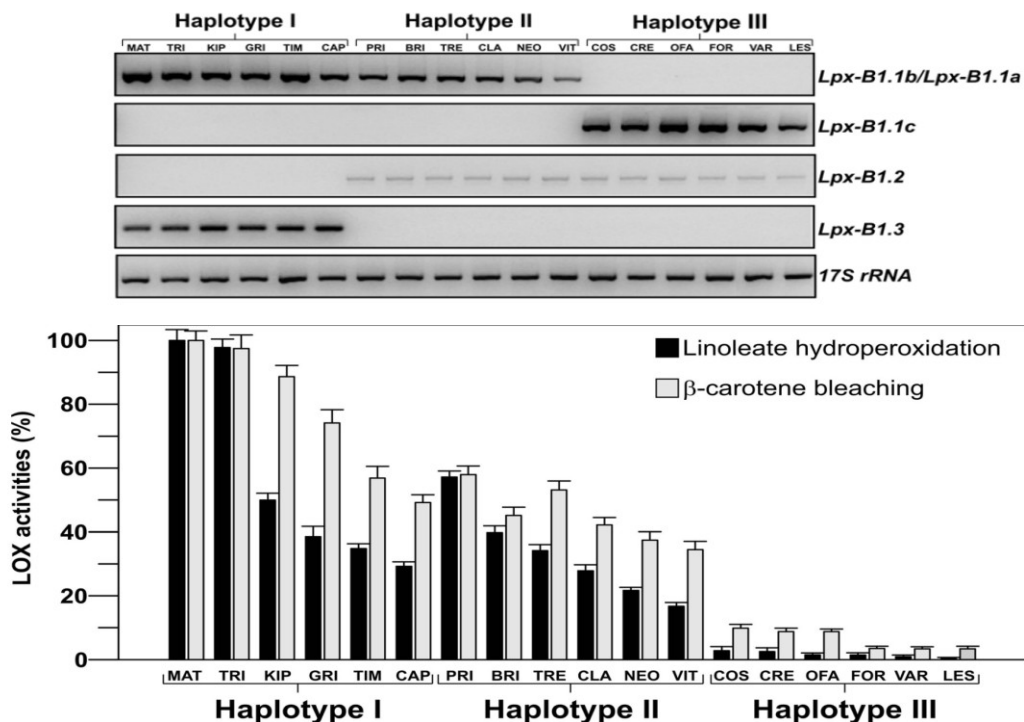


Figura 64. Livelli di espressione di *Lpx-B1* in semi maturi di grano (in alto) e attività lipossigenasica e di ossidazione del β -carotene (in basso) in 18 genotipi di frumento duro italiani (Verlotta *et al.*, 2010).

Questo quadro è stato confermato anche dall'analisi enzimatica, effettuata su estratti grezzi di 6 genotipi appartenenti ai 3 diversi aplotipi. I livelli di attività lipossigenasica e di *bleaching* del β -carotene mostrano come effettivamente le *cultivars* appartenenti all'aplotipo III presentano una produzione di idroperossidi molto inferiore a quelli dell'aplotipo I, quello antico e non più presente nel germoplasma moderno.

1.6. Genotipi colorati di grano

Come ricordato, i composti bioattivi presenti nella granella di frumento sono rappresentati per lo più da carotenoidi. Al contrario, la cariosside dei cereali è in genere povera di flavonoidi. Esistono però alcuni genotipi, le cosiddette varietà pigmentate, che possono accumulare rilevanti quantità di antocianine o proantocianidine nel pericarpo e/o nello strato dell'aleurone. Nei frumenti, in particolare, esiste una grande variabilità per quanto riguarda il colore del seme (Figura 65), correlato alla presenza di questi composti polifenolici. L'utilizzo di farina integrale ottenuta da queste varietà nella produzione di lavorati farinacei, come pasta e pane, potrebbe portare a grandi benefici da un punto di vista nutrizionale. Considerato l'esteso consumo di alimenti a base di cereali, l'uso di genotipi colorati aumenterebbe infatti

in modo significativo la dose giornaliera ingerita di questi fitonutrienti ad azione protettiva (Finocchiaro *et al.* 2010, Shipp e Abdel-Aal, 2010).

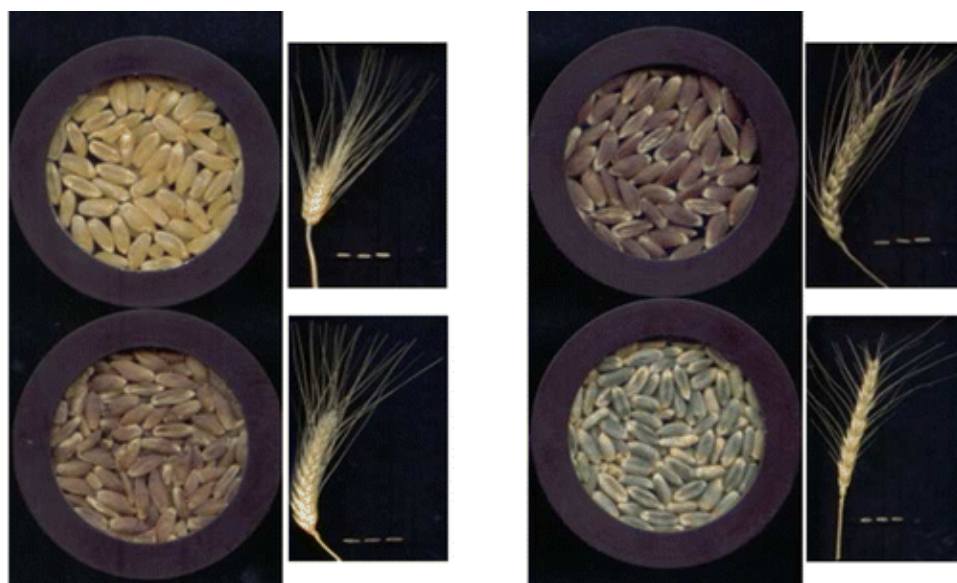


Figura 65. Genotipi pigmentati di grano coltivati in Italia (Ficco *et al.*, 2014a).

Al contrario dei carotenoidi, per i quali le conoscenze sono ad uno stadio avanzato, per quanto riguarda i fenoli una adeguata caratterizzazione non è ancora disponibile. Recenti studi hanno evidenziato la presenza nella granella di frumenti rossi di flobafeni e proantocianidine, classi di flavonoidi caratterizzate da un elevato potere antiossidante, mentre nei genotipi blu o viola, meno comuni, i composti più abbondanti sono gli antociani.

Nella sintesi dei polifenoli la calcione isomerasi catalizza l'isomerizzazione stereospecifica del calcione in naringerina, che è a sua volta trasformata in diidroflavonolo a opera della F3H. La conversione in antocianine procede poi con la riduzione degli diidroflavonoli in leucocianidine attraverso la diidroflavonolo-4-reduttasi e successive ossidazioni, deidratazioni e glicosilazioni di quest'ultime portano alla sintesi di pelargonidina (rosso-arancione), cianidina (rossa), delfinidina (blu) (Figura 66). Nei semi dei genotipi rossi il gene che codifica per la F3H risulta sovraespresso, e sembra costituire il punto nodale nella regolazione della sintesi delle proantocianidine (Himi *et al.*, 2011). I pigmenti di colore viola sono localizzati quasi esclusivamente nel pericarpo, mentre quelli blu sono per lo più concentrati nell'aleurone (Zeven, 1991). Tuttavia la regolazione della biosintesi delle antocianine è ancora poco chiara: l'aleurone blu sembra essere controllato da un singolo gene dominante, mentre il pericarpo viola parrebbe essere controllato da due loci, i geni omoallelici *Pp-1* e *Pp-3* (Khlestkina *et al.*, 2009). Studi comparativi mostrano che *Pp-1* è ortologo del gene C1 di mais e di riso, i quali codificano per fattori di trascrizione contenenti il dominio MYB responsabili dell'attivazione dei geni strutturali codificanti vari enzimi coinvolti nella via di sintesi delle antocianine (Saitoh *et al.*, 2004). *Pp-3* è ortologo dei geni *Pb/Ra* di riso (Wang e Shu, 2007) e *Lc/R* di mais, che codificano per fattori di trascrizione MYC-like contenenti il dominio bHLHL, regolatori anch'essi della sintesi delle antocianine (Shoeva *et al.*, 2014). Che le proteine codificate dei geni *Pp-1* e *Pp-3* lavorino in sinergia tra loro è stato ribadito anche in un recente lavoro, dove si ipotizza l'esistenza di un complesso R2R3-MYB/bHLH/WD40 (MBW) (Shoeva *et al.*, 2014). L'allele dominante del gene *Pp-D1* sembra essere responsabile della riduzione dell'espressione del gene *Pp-3* (chiamato anche *TaMyc1*), tramite una regolazione negativa a *feed-back* da parte del complesso MBW (Figura 67). Questo potrebbe portare alla sintesi in giuste proporzioni dei componenti facente parte del complesso MBW

che lavorerebbe così in maniera ottimale, andando a regolare l'espressione dei geni a monte nella sintesi dei polifenoli. Questo meccanismo è stato confermato anche in altre specie come *Petunia hybrida* e *A. thaliana* (Albert *et al.*, 2014).

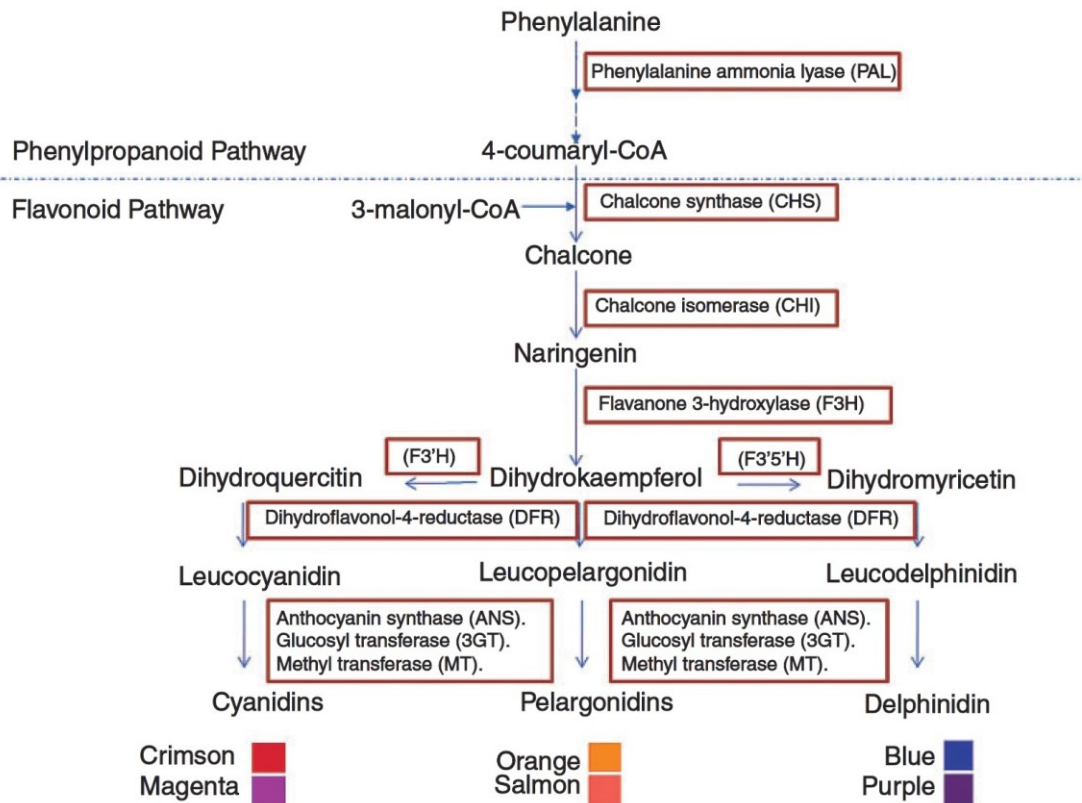


Figura 66. Via di sintesi dei flavonoidi presenti nei frumenti pigmentati rossi, blu e viola (Ficco *et al.*, 2014b)

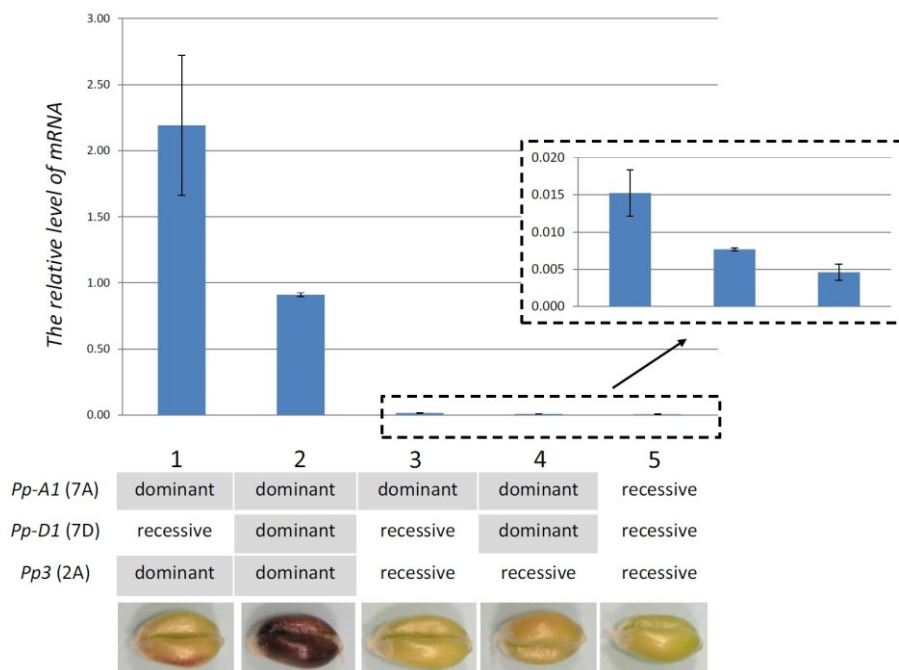
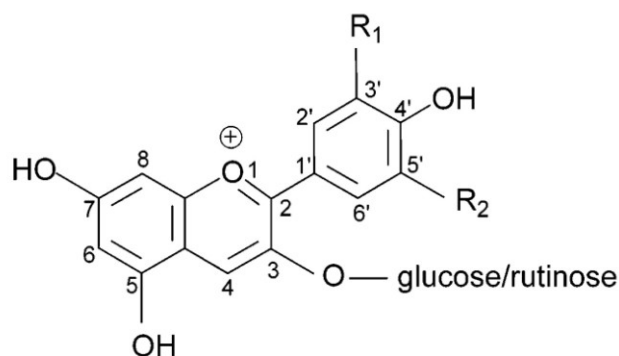


Figura 67. Variazione dei livelli di trascritto del gene *TaMyc1* in semi di grano in funzione della presenza dei geni *Pp* (Shoeva *et al.*, 2014).

L'accumulo di antocianine non è mai stato preso in considerazione nel corso dei programmi di miglioramento genetico del grano, e nel germoplasma moderno è quindi difficile trovare varietà che contengano elevate concentrazione di queste molecole bioattive, a parte alcune *cultivars* di grano tenero originarie soprattutto dell'Etiopia (Zeven, 1991). In tali genotipi la concentrazione totale di questi composti varia da 7.1 a 211.9 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Abdel-Aal *et al.*, 2006). L'antocianina più abbondante nei genotipi viola è la cianidina 3-O-glucoside (Cy-3-Glc) seguita dalla peonidina 3-O-glucoside (Pn-3-Glc), mentre in quelli blu la delphinidina 3-O-glucoside (Dp-3-Glc) è la più rappresentata (Figura 68) (Abdel-Aal e Hucl, 2003). La loro concentrazione raggiunge il picco massimo a metà della fase di sviluppo dei semi, per decrescere leggermente a maturazione (Kniewel *et al.*, 2009). Questo quadro è confermato anche a livello molecolare, visto che mentre la calcone sintasi mostra la massima espressione nello stadio iniziale, la diidrossiflavonolo-4-reduttasi (DFR) e la flavonoide-3-5-idrossilasi raggiungono un picco di trascrizione proprio nella fase intermedia (Figura 69) (Yang *et al.*, 2004).

Figura 68. Principali antocianine presenti in semi di grano (Abdel-Aal *et al.*, 2006).



- Pelargonidin-3-glucoside: $R_1=H$, $R_2=H$, **11**
- Cyanidin-3-glucoside: $R_1=OH$, $R_2=H$, **6**
- Delphinidin-3-glucoside: $R_1=OH$, $R_2=OH$, **1**
- Peonidin-3-glucoside: $R_1=OCH_3$, $R_2=H$, **15**
- Petunidin-3-glucoside: $R_1=OCH_3$, $R_2=OH$, **9**
- Malvidin-3-rutinoside: $R_1=OCH_3$, $R_2=OCH_3$, **20**

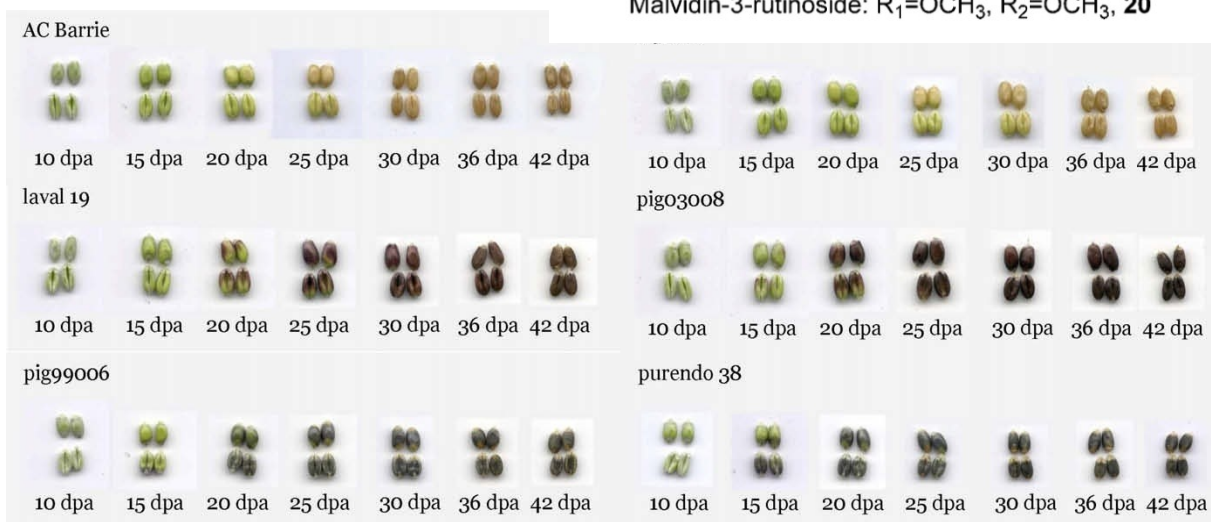


Figura 69. Accumulo dei pigmenti colorati nelle varie fasi di sviluppo nei semi di *Triticum aestivum*. La produzione di fenoli avviene nelle fasi intermedie (Kniewel *et al.*, 2009).

Uno studio effettuato su genotipi pigmentati coltivati in Italia ha confermato che le varietà con aleurone blu sono quelli che presentano un maggiore contenuto totale di anto-

cianine (TAC), con un valore medio di 118.37 $\mu\text{g g}^{-1}$, mentre quelli viola (22.60 $\mu\text{g g}^{-1}$) e rossi (9.91 $\mu\text{g g}^{-1}$) presentano concentrazioni rispettivamente 5 e 12 volte inferiori (Ficco *et al.*, 2014a). Insieme al TAC, l'indice del contenuto totali di polifenoli (TPC) rappresenta un indicatore della capacità antiossidante di una matrice, con una elevata correlazione con l'attività antiossidante in trolox-equivalenti (TEAC) (Simonetti *et al.*, 1997). Il TEAC però è fortemente influenzato dal contenuto in carotenoidi e polifenoli, per cui genotipi con una concentrazione quasi irrilevante di antocianine, come Preco, possono comunque mostrare elevati valori di questo indice (Figura 70). Agire in modo sinergico sulle vie di sintesi di entrambe le classi di pigmenti potrebbe portare all'ottenimento di genotipi ancora a più elevato indice TEAC (Ficco *et al.*, 2014a).

species	color	genotype	TPC	TEAC
<i>Triticum aestivum</i>	blue	Sebesta Blue1	6.82	24.11
<i>Triticum durum</i>	purple	World Seeds3	6.26	24.61
		MP3	5.67	20.53
		ELS 6404-115-5	3.16	15.11
	red	ELS 6404-140-2	3.34	14.23
		ELS 6404-116-1	3.23	15.57
	control	Preco	4.79	19.44
LSD _(0.05)			0.96	0.74

Figura 70. Relazione tra indice TPC e TEAC in alcuni genotipi di grano duro colorato (Ficco *et al.*, 2014a).

A oggi, tra i cereali, solo il riso pigmentato e il mais sono stati impiegati in modo significativo per l'alimentazione umana. In particolare, il mais blu e viola è stato utilizzato con successo per la produzione di prodotti farinacei colorati, come le *tortillas*, mentre il riso rosso ha trovato largo impiego nello sviluppo di prodotti finalizzati all'alimentazione infantile (Hirawan *et al.*, 2011). Considerando che l'uso delle antocianine come coloranti alimentari naturali è in forte sviluppo, in particolar modo per sostituire quelli sintetici (Horbowicz *et al.*, 2008), e che attualmente esse vengono ottenute quasi esclusivamente dal riso rosso (Shipp e Abdel-Aal, 2010), è possibile ipotizzare un forte interesse per lo sviluppo di altri cereali pigmentati, tra i quali il grano potrebbe avere un ruolo fondamentale.

1.7. Scopo del lavoro

Il presente lavoro si inserisce nel più ampio quadro del progetto ALISAL (Miglioramento delle proprietà igienico-sanitarie, salutistiche e funzionali di commodity per l'alimentazione dell'uomo e/o degli animali), finanziato dal Ministero delle Politiche Agricole e Forestali. Il compito della Unità Operativa (UO) di Ferrara è quello di contribuire in sinergia con le altre UO coinvolte alla caratterizzazione delle vie biosintetiche e degradative dei carotenoidi e dei polifenoli in frumento duro e pesco, in genotipi divergenti per il contenuto di questi fitonutrienti nelle parti edibili, così da individuare gli enzimi-chiave alla base della loro omeostasi. L'UO perseguirà in particolare la messa a punto dei saggi di attività *in vitro* degli enzimi di interesse e, se necessario, di protocolli di risoluzione cromatografica di diverse forme isoenzimatiche. Procederà poi alla misurazione dei livelli di attività specifica nei genotipi selezionati, su materiale prelevato negli stadi fenologici di formazione della cariosside di frumento e di maturazione del frutto del pesco, fornito dalle altre Unità. Tali

attività costituiranno le basi per una successiva purificazione e caratterizzazione di forme alleliche che abbiano mostrato una forte correlazione con il contenuto finale di carotenoidi o polifenoli, così da delucidare le proprietà potenzialmente in grado di determinare un ulteriore incremento del valore nutrizionale di questi alimenti.

Nel piano complessivo delle attività del progetto, l'UO è impegnata in 3 linee di ricerca che si prefiggono lo studio delle vie metaboliche dei fenoli e dei carotenoidi in frumento e pesco, secondo il seguente schema:

PATHWAY DEI CAROTENOIDI					
	U.O.	APPROCCIO METABOLOMICO	APPROCCIO MOLECOLARE	APPROCCIO BIOCHIMICO	APPROCCIO GENETICO
FRUMENTO	CRA-CER (Trono)	X	X	X	X
	UNI-FG (Pastore)			X	
	UNI-FE (Forlani)			X	
PESCO	CRA-RPS (Valentini)	X			
	CRA-FRU (Caboni)		X		
	UNI-FE (Forlani)			X	
	CRA-FRF (Giovannini)				X

PATHWAY DEI COMPOSTI FENOLICI					
	U.O.	APPROCCIO METABOLOMICO	APPROCCIO MOLECOLARE	APPROCCIO BIOCHIMICO	APPROCCIO GENETICO
FRUMENTO	CRA-GPG (Cattivelli)	X	X		X
	UNI-FE (Forlani)			X	

Relativamente a queste linee di ricerca, gli obiettivi *a priori* sono i seguenti:

1.7.1. Pathway dei carotenoidi in frumento duro

Messa a punto in un sistema modello del saggio *in vitro* degli enzimi responsabili della parziale distruzione dei carotenoidi nella granella di frumento, appartenenti alla famiglia delle lipoossigenasi. Verrà utilizzata a questo fine una coltura in sospensione liquida di frumento duro (cv. Ofanto), verificando in stretta collaborazione con l'Unità CRA-CER l'effettiva espressione di tali geni. Dal momento che è noto che in frumento sono presenti 3 forme isoenzimatiche, si provvederà a individuare un protocollo di separazione cromatografica in grado di risolvere tra di loro le diverse isoforme, così da quantificare l'apporto di ognuna all'attività complessiva.

I protocolli ottimizzati saranno applicati al fine di purificare e caratterizzare le tre forme di lipoossigenasi, direttamente da materiale vegetale o mediante espressione dei corrispondenti geni in sistemi eterologhi. Il clonaggio dei geni e il loro inserimento in opportuni plasmidi di espressione è previsto a opera della UO CRA-CER. Con i costrutti da essa forniti si cercherà di ottenere cloni ricombinanti di *E. coli* o di lievito, in cui l'espressione del transgene verrà indotta e la proteina purificata mediante uno o più passaggi per cromatografia liquida o FPLC.

1.7.1.1. Risultati attesi

Messa a punto e ottimizzazione delle condizioni di saggio e delucidazione preliminare delle proprietà di enzimi sin qui non adeguatamente caratterizzati in frumento. Identificazione e caratterizzazione di varianti geniche/alleliche con diversa efficienza catalitica. Valutazione

dell'importanza relativa della attività delle lipoossigenasi nel determinare il contenuto finale di carotenoidi nella granella di frumento.

I risultati consentiranno: ① una verifica di alcune conoscenze sul metabolismo dei carotenoidi, fin qui principalmente acquisite su specie modello, in una specie di grande interesse agrario; ② la caratterizzazione del ruolo degli enzimi ossidativi che riconoscono i carotenoidi come substrati nel determinare i livelli finali nella granella di questi fitonutrienti, elemento che potrà rivelarsi utile per una successiva fase di *breeding* tesa a incrementarne la concentrazione in *cultivar* commerciali.

1.7.2. Pathway dei carotenoidi in pesco

Messa a punto in un sistema modello del saggio *in vitro* degli enzimi (diossigenasi) responsabili della ossidazione di quantità rilevanti di carotenoidi nella polpa del frutto di pesco. Verrà utilizzato a questo fine materiale di due genotipi contrastanti (Redhaven e il suo mutante bianco) caratterizzati da una forte differenza nella pigmentazione del frutto. Il materiale sarà fornito dalla UO CRA-FRF, che dispone già di dati preliminari sulla espressione dei relativi geni, su cui sarà possibile basarsi per la scelta della fase fenologica in cui raccogliere i campioni. Dal momento che è noto che in pesco sono presenti diverse forme di diossigenasi, si provvederà inoltre a ottimizzare un protocollo di separazione cromatografica, cercando di risolvere tra di loro gli enzimi presenti negli estratti grezzi, così da quantificare l'apporto di ognuno all'attività complessiva.

I protocolli ottimizzati saranno applicati al fine di purificare almeno parzialmente le diverse diossigenasi, e di caratterizzarle soprattutto per quanto riguarda la loro selettività di substrato. Si procederà inoltre a misurare i livelli di attività specifica a tempi crescenti nel corso della maturazione del frutto in 2-4 genotipi contrastanti di pesco. Tali materiali saranno definiti in concerto con le altre UO sulla base dei risultati dello screening su un numero più elevato di genotipi caratterizzati da colore della polpa differenziato, nella gamma dal bianco al giallo arancio, condotto dall'Unità CRA-RPS.

1.7.2.1. Risultati attesi

Messa a punto e ottimizzazione delle condizioni di saggio e delucidazione delle proprietà di enzimi sin qui non adeguatamente caratterizzati in pesco. Valutazione del ruolo della via catabolica nel determinare il contenuto finale di carotenoidi nella polpa del frutto. Caratterizzazione preliminare di varianti alleliche con diversa efficienza catalitica.

I risultati consentiranno: ① una verifica delle conoscenze sul metabolismo dei carotenoidi, fin qui principalmente acquisite su specie modello, in una specie arborea di grande interesse economico in Italia; ② l'individuazione del ruolo delle diossigenasi nel determinare i livelli di questi fitonutrienti nei frutti maturi, elemento da utilizzare per una successiva fase di *breeding* tesa a incrementarne la concentrazione nel prodotto commerciale.

1.7.3. Pathway dei composti fenolici in frumento duro

Messa a punto in un sistema modello (cellule in coltura di frumento duro, cv. Ofanto) dei saggi *in vitro* degli enzimi che controllano il flusso carbonioso nella via che porta alla biosintesi di antociani e proantocianidine, e precisamente:

- DAHP sintasi, primo enzima del pathway dei composti aromatici
- PAL, che incanala la fenilalanina verso la sintesi dei fenilpropanoidi
- calcione sintasi (CHS), che regola il livello di produzione complessiva dei flavonoidi

- antocianidina sintasi (ANS), che catalizza la conversione dei flavan-3,4-dioli in antocianidine
- antocianidina reductasi (ANR), che avvia queste ultime alla condensazione in proantocianidine.

Non essendo noti metodi spettrofotometrici di rilevazione diretta della formazione dei prodotti, la cui concentrazione/identificazione dovrà essere ottenuta a termine del saggio mediante analisi chimica o risoluzione mediante HPLC.

I protocolli che sarà stato possibile ottimizzare saranno applicati al materiale fornito dalla UO CRA-GPG al fine di determinare i livelli di attività enzimatica in genotipi di frumento contrastanti, caratterizzati dalla presenza o assenza di polifenoli nel seme. In particolare, sulla base dei dati ottenuti dall'altra Unità nel corso del primo anno di attività e relativi all'analisi metabolomica di un numero elevato (≈ 75) di genotipi colorati, si sceglierà un gruppo ristretto di varietà caratterizzate dalla presenza di ① antociani nel tegumento (color porpora) ② proantocianidine nel tegumento (color rosso) e ③ antociani nell'aleurone (color azzurro), a confronto di ④ un genotipo in cui la presenza di fenoli nel seme sia trascurabile. In queste linee saranno valutati i livelli di attività specifica degli enzimi di interesse. I risultati dovrebbero consentire l'individuazione dell'enzima-chiave, i cui maggiori livelli correlino con un maggiore contenuto finale di fitonutrienti.

1.7.3.1. Risultati attesi

Ottimizzazione delle condizioni di saggio e delucidazione delle proprietà di enzimi sin qui non adeguatamente caratterizzati in frumento. Identificazione dei punti di regolazione del metabolismo fenolico in genotipi a diverso contenuto di polifenoli.

I risultati consentiranno: ① una verifica delle conoscenze sul metabolismo dei fenoli, fin qui acquisite su specie modello, in una specie di grande interesse agrario; ② l'individuazione dei punti-chiave nella regolazione del flusso carbonioso nella via di sintesi di questi fitonutrienti, che potrà rivelarsi utile per una successiva fase di *breeding* tesa a incrementarne la concentrazione in *cultivar* commerciali.

2. MATERIALI E METODI

2.1. Condizioni di crescita della coltura in sospensione liquida di grano

La coltura cellulare di frumento duro, varietà Ofanto, è mantenuta in terreno MS (Murashige e Skoog, 1962) che contiene vitamine e sali minerali, divisi a loro volta in microelementi e macroelementi, secondo il seguente schema:

Microelementi

CoCl ₂ 6H ₂ O	0.025 mg L ⁻¹	0.11 μM
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.025 mg L ⁻¹	0.1 μM
FeNaEDTA	36.7 mg L ⁻¹	0.1 mM
H ₃ BO ₃	6.2 mg L ⁻¹	0.1 mM
KI	0.83 mg L ⁻¹	5 μM
MnSO ₄ H ₂ O	16.9 mg L ⁻¹	0.1 mM
NaMoO ₄ 2H ₂ O	0.25 mg L ⁻¹	1.03 μM
ZnSO ₄ 7H ₂ O	8.6 mg L ⁻¹	29.91 μM

Macroelementi

CaCl ₂	332.02 mg L ⁻¹	2.99 mM
KH ₂ PO ₄	170 mg L ⁻¹	1.25 mM
KNO ₃	1900 mg L ⁻¹	18.79 mM
MgSO ₄	180.54 mg L ⁻¹	1.5 mM
NH ₄ NO ₃	1650 mg L ⁻¹	20.61 mM

Vitamine

Glicina	2 mg L ⁻¹	26.64 μM
Mio-inositolo	100 mg L ⁻¹	0.56 mM
Acido nicotinico	0.5 mg L ⁻¹	4.06 μM
Piridossina	0.5 mg L ⁻¹	2.43 μM
Tiamina	0.1 mg L ⁻¹	0.3 μM

Inoltre, poichè le cellule in coltura non sono autotrofe, è necessario aggiungere una fonte di carbonio, rappresentata da saccarosio a una concentrazione finale nel terreno di 30 g L⁻¹. Per indurre la proliferazione cellulare, sono inclusi nel terreno anche ormoni, solitamente auxine e citochinine. In questo caso esso contiene solo l'auxina 2.4D a una concentrazione finale nel terreno di 2 mg L⁻¹, in quanto la coltura di grano non necessita di citochinine per la crescita. Infine, per evitare contaminazioni, viene aggiunto un composto antimicrobico, il *Plant Preservative Mixture* a una concentrazione di 2 mL L⁻¹. Il pH del terreno così ottenuto è circa 4, e la sterilizzazione tende ad abbassarlo ulteriormente; il pH viene pertanto corretto con KOH fino a 5.9. Il terreno viene quindi sterilizzato in autoclave per 20 minuti a 118°C.

La crescita avviene in luce fioca (< 50 μmol sec⁻¹ m⁻²) in un incubatore termostato alla temperatura costante di 24 ± 1°C, solitamente in beute Erlenmeyer da 500 mL di volume contenenti 125 mL di terreno, poste su un agitatore rotativo a 100 rpm. In alcune prove si sono utilizzate beute di diverse dimensioni, ma mantenendo invariato il rapporto volumetrico beuta/terreno. In tali condizioni il ciclo colturale viene completato in circa 8-12 giorni, al termine dei quali la coltura deve essere rinnovata: a questo fine, operando sotto cappa a flusso laminare orizzontale, una aliquota da 25 mL della coltura in fase stazionaria viene trasferita in un'altra beuta, contenente 100 mL di terreno fresco. Allo scopo di mantenere il più possibile le cellule in fase di proliferazione, nel corso del presente lavoro i reinoculi sono stati effettuati ogni 7 giorni, in modo da evitare che le cellule entrassero in quiescenza.

2.2. Preparazione degli estratti cellulari

2.2.1. Estrazione delle colture cellulari

La sospensione cellulare viene filtrata su filtri di nylon da 50 μm mediante un apparato filtrante collegato a una pompa da vuoto, lavando abbondantemente con acqua distillata. Il materiale cellulare viene pesato e posto in un mortaio pre-equilibrato alla temperatura del ghiaccio fondente insieme a 1 g g^{-1} (FW) di sabbia di quarzo e 2 mL g^{-1} (FW) di tampone di estrazione [Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, contenente 0.1% Triton-X100 e 0.5 mM ditiotreitolo (DTT)]. Attraverso l'ausilio del pestello, le cellule sono omogenate energicamente per 5 min e, dopo l'aggiunta di un ulteriore volume di tampone d'estrazione, per altri 3 min. Si aggiunge infine una punta di spatola di polivinil polipirrolidone, un composto insolubile che assorbe i fenoli impedendone la polimerizzazione e evitando una possibile conseguente inattivazione dell'attività enzimatica. L'omogenato viene trasferito in un tubo da 50 mL e centrifugato per 2 min a 3000 g; il supernatante così ottenuto viene prelevato e trasferito in provette Corex da 30 mL e sottoposto a un nuovo ciclo di centrifuga per 10 minuti a 10000 g in una centrifuga refrigerata Sorvall a 4°C.

2.2.2. Estrazione da semi di grano

Circa 1 g di semi di grano duro sono trattati per 10 min con 5 mL di etanolo puro per eliminare gli antifungini che ricoprono il tegumento. Previa eliminazione dell'etanolo mediante lavaggi con acqua distillata, i semi sono asciugati prima con carta bibula e poi tramite un flusso di aria tiepida. Una volta ben asciutti, i semi vengono frantumati per 5 min in un mortaio, fino all'ottenimento di un composto farinoso. Lo sfarinato viene posto in una beuta da 50 mL con 10 mL g^{-1} di tampone 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, contenente lo 0.1% di TritonX-100. Dopo 60 min di agitazione a 200 rpm a in ghiaccio, l'estratto viene centrifugato come descritto per 10 minuti a 10000 g.

2.3. Purificazione delle lipossigenasi di *Triticum durum*

2.3.1. Passaggio desalante su resina Bio-Gel P6DG

In un estratto le proteine possono essere separate dalle piccole molecole quali sali, aminoacidi e zuccheri grazie a un passaggio cromatografico per gel filtrazione. Si utilizza a questo scopo una resina poliacrilamidica (Bio-Gel P6DG, Pharmacia), caratterizzata da un diametro delle particelle idratate pari a 90-180 μm e un intervallo di frazionamento di 1000-6000 Da. La cromatografia ad esclusione si basa sulle proprietà di setaccio molecolare proprie di numerosi materiali porosi, permettendo la separazione delle molecole del campione in base alla forma e al peso molecolare. I materiali più comunemente utilizzati a questo scopo sono polimeri presenti sotto forma di reticolo tridimensionale poroso che conferiscono proprietà di gel (*gel permeation chromatography*). Il limite di esclusione della resina Bio-Gel P6DG favorisce il rallentamento delle componenti più piccole, che non entrano nelle sferule della fase stazionaria: l'eluizione dei sali e delle piccole molecole viene ritardata, e possono così essere eliminate in modo inversamente proporzionale alla loro dimensione. Tramite l'ausilio di tale processo cromatografico è possibile separare agevolmente i sali dalle proteine, a patto che il campione caricato presenti un volume inferiore al 20% di quello della colonna utilizzata. Questo passaggio permette quindi la purificazione delle proteine dai sali presenti, inclusi i residui di solfato di ammonio derivanti da un processo del *salting-out*, che potrebbero avere un'azione inibente sull'attività enzimatica.

Per la preparazione di una colonna da 10 mL di *bed-volume* vengono pesati 1.5 g di resina che viene idratata in tampone 25 mM Tris-HCl pH 7.5; trascorsi 30 min di riequilibrio alla temperatura di 4°C, la sospensione viene degasata per 3 min mediante l'ausilio di un apparato sotto vuoto. La resina viene quindi impaccata in una colonna di 1.5 cm di diametro e

equilibrata con almeno 2 volumi di tampone di eluizione, utilizzando la pressione esercitata da un sifone in entrata. La taratura viene effettuata utilizzando una soluzione da 2 mL contenente azocaseina 0.1% e cianocobalamina 0.01% e la presenza dei due marcatori viene rilevata spettrofotometricamente nelle frazioni di eluizione rispettivamente a 440 e 360 nm. Tutto il processo viene effettuato in camera fredda a 4°C e sulla base dei risultati ottenuti si può identificare il profilo di eluizione delle proteine (> 6000 Da) e quello delle piccole molecole (<1355 Da), e decidere quali frazioni conservare per ottenere un recupero maggiore possibile delle proteine contenute nell'estratto eliminando nel contempo gran parte dei sali e dei metaboliti presenti nella cellula. La stessa procedura viene seguita per la preparazione e la taratura di una serie di colonne in maniera da poter essere utilizzate in base ai volumi di estratto da desalare: su una colonna da 100 mL di *bed-volume*, a esempio, possono essere caricati 20 mL di estratto.

2.3.2. Separazione per cromatografia a scambio anionico

Le proteine presenti in un estratto possono essere separate sulla base della loro carica grazie alla cromatografia a scambio ionico. La resina DEAE Sephacel è costituita da una matrice di particelle di cellulosa a cui sono legati covalentemente dei gruppi dietilamminotilici (pK ≈ 8.5), che comportano un debole scambio anionico. Tali gruppi presentano infatti una carica positiva permanente nell'intervallo di pH 2-9, capace di attrarre molecole con carica netta negativa, comprese le proteine, che vengono così trattenute della fase stazionaria. La resina è di tipo macro-poroso, e presenta un limite d'esclusione di circa 1000 kDa per le proteine globulari.

Si utilizza una colonna di DEAE Sephacel di 1.5 cm di diametro e 30 mL di volume, precedentemente riequilibrata per passaggio di 50 mL di tampone 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, contenente 1 M NaCl, in modo che qualsiasi anione presente sia sostituito da ioni cloruro, seguiti da almeno 10 volumi del medesimo tampone privo di sale, fino a che il pH del liquido in uscita dalla colonna sia uguale a quello in entrata. Il tutto viene effettuato a 4°C in camera fredda. Il flusso di eluizione viene mantenuto costante a 1 mL min⁻¹ da una pompa peristaltica in uscita. L'estratto viene caricato su colonna, e le proteine trattenute dalla resina vengono quindi eluite mediante un gradiente lineare da 0 a 100 mM NaCl in 200 mL di tampone. L'eluato viene suddiviso in frazioni (generalmente da 5 mL) mediante l'utilizzo di un collettore automatico.

2.3.3. *Salting out* mediante aggiunta di (NH₄)₂SO₄

La tendenza di una proteina ad aggregare, che è funzione della composizione amminoacidica di superficie, può essere favorita da diversi metodi, tra i quali l'aggiunta di elevate concentrazioni di sali. L'ammonio solfato è un sale estremamente solubile, ottenibile a un elevato grado di purezza e a costi ridotti, utilizzato comunemente per effettuare la tecnica del *salting-out*. Questa metodologia consiste nell'aggiungere a un estratto concentrazioni crescenti di sale; l'innalzamento della forza ionica che ne consegue causa la precipitazione selettiva e progressiva delle proteine, a partire da quelle più idrofobiche per finire con quelle idrofiliche (Duong-Ly e Gabelli, 2014). L'utilizzo di una quantità di sale pari al 70% della soluzione satura determina l'uscita di soluzione di virtualmente tutte le proteine, che possono così essere sia concentrate che separate dalle piccole molecole, come ioni e amminoacidi, che rimangono in soluzione. Alcune proteine precipitano a basse concentrazioni di sale, altre richiedono concentrazioni vicine a quelle saturanti: l'utilizzo di concentrazioni opportune ammonio solfato può quindi consentire l'eliminazione di buona parte delle proteine presenti nell'estratto e il recupero quasi integrale di quella di interesse.

Prove preliminari hanno mostrato che in estratti cellulari di Ofanto l'aggiunta di 226 mg $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \text{ mL}^{-1}$, pari al 40% di saturazione a 4°C, determina la quasi totale precipitazione delle LOX e un allontanamento delle proteine ancora solubili, con un arricchimento dell'attività specifica. Il pool ottenuto mediante cromatografia a scambio anionico viene quindi trattato con questa quantità di sale, mescolando ripetutamente e mantenendo in ghiaccio per 5-10 min fino a ottenere la sua completa dissoluzione. In condizioni ottimali le proteine precipitate sono sedimentate per centrifugazione per 10 minuti a 10000 g a 4°C come descritto. Eliminato il supernatante, il sedimento viene sospeso in un opportuno volume di tampone.

Spesso però, probabilmente per la densità del campione, le proteine precipitate non sedimentano, ma formano un menisco flottante sulla fase liquida. Per recuperare tale materiale si procede a saturare con 15 mL di una soluzione 10 mg mL^{-1} di BSA un filtro di cellulosa da 0.22 μm (Millipore), posto in un apparato filtrante collegato a una pompa a vuoto. Dopo aver allontanato l'eccesso di BSA tramite lavaggi con acqua distillata, viene effettuato il passaggio del campione sul filtro di cellulosa, che trattiene il precipitato. Il filtro viene quindi trasferito in un tubo Greiner da 50 mL e immerso in un piccolo volume di tampone 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, contenente 250 mM NaCl, rimescolando per 15 min così da facilitare la risospensione delle proteine.

2.3.4. Separazione per cromatografia a gel filtrazione

Il campione ottenuto, in un volume di 5 mL, viene caricato su una colonna per gel filtrazione di Sephacryl S200 (Pharmacia), con un diametro di 2.5 cm e un *bed-volume* di 200 mL, riequilibrata nello stesso tampone a un flusso di 0.5 mL min^{-1} . La presenza di sale nel tampone consente di evitare l'aggregazione delle proteine. Questa resina ha la proprietà di rallentare le proteine con peso molecolare inferiore a 250 kDa, e un'aggregazione proteica potrebbe portare alla formazione di complessi con peso molecolare superiore al limite di esclusione. La colonna viene eluita con 350 mL di tampone, raccogliendo frazioni da 2.5 mL.

2.3.5. Cromatografia negativa su colonna di Reactive-Blue sepharose

Una colonna di Reactive-Blue sepharose di *bed-volume* pari a 5 mL viene riequilibrata tramite il passaggio di 10 mL di tampone 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, contenente 1 M NaCl, e di 10 volumi di tampone senza sale, mantenendo il flusso a 1 mL min^{-1} mediante una pompa peristaltica connessa in entrata per evitare la formazione di bolle.

Il pool ottenuto dal passaggio precedente viene portato a 20 mL e desalato su una colonna da 100 mL di *bed-volume* di BioGel P6DG, ottenendo un preparato di 35 mL. Tale campione viene caricato in colonna, raccogliendo il *flow through* in un'unica frazione. La colonna viene poi lavata con 10 mL di tampone, raccogliendo l'eluato che viene unito al precedente, ottenendo 45 mL di volume totale.

2.3.6. Cromatografia per adsorbimento su colonna di idrossiapatite

Una colonna di idrossiapatite viene preparata idratando 1.80 g di tale resina in 40 mL di tampone potassio fosfato 10 mM, pH 7.5. Si elimina quindi il liquido in eccesso, che contiene particelle piccole che potrebbero dare problemi aumentando considerevolmente la resistenza della colonna. Si effettua un secondo lavaggio con ulteriori 40 mL di tampone, e poi la resina viene impaccata in colonna. Si ottiene così una colonna di 7 mL di volume che viene riequilibrata tramite il passaggio di 15 mL di tampone potassio fosfato 10 mM, pH 7.5. Il flusso della colonna viene mantenuto a 40 mL ora^{-1} . Al campione ottenuto dalla colonna di Blue-sepharose viene aggiunta una opportuna aliquota di tampone 0.5 M potassio fosfato, pH

7.5, così da avere una concentrazione finale pari a 10 mM. Dopo il caricamento dell'estratto su colonna si applica un lavaggio con 10 mL di tampone, e le proteine vengono eluite mediante un gradiente da 10 a 200 mM fosfato in 200 mL di volume, raccogliendo frazioni da 2.5 mL. Anche in questo caso l'intero procedimento viene effettuato in camera fredda a 4°C.

2.3.7. Cromatografia liquida ad alta prestazione (FPLC)

Il *pool* ottenuto dal passaggio cromatografico su colonna di idrossiapatite viene concentrato per centrifugazione in un filtro con *cut-off* di 30 kDa (Millipore) ottenendo un preparato di 0.5 mL. Tale campione viene diluito a un volume di 10 mL con tampone 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, permettendo di diluire la concentrazione di fosfato di 20 volte (2 mM rispetto ai 40 mM iniziali). Il preparato così ottenuto viene iniettato per mezzo di un *superLoop* (Pharmacia) su una colonna monoQ (Pharmacia) da 1 mL di *bed-volume* riequilibrata per passaggio di 10 mL di tampone 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, contenente 500 mM NaCl e 20 mL di tampone senza sale a un flusso di 0.5 mL min⁻¹. Si lava quindi con 2 mL di tampone e si eluisce mediante un gradiente da 0 a 50 mM NaCl in 3 mL e un secondo gradiente 50 a 200 mM NaCl in 25 mL, leggendo l'eluato a 280 nm. Durante il gradiente vengono raccolte frazioni da 0.5 mL di volume, che vengono poste immediatamente a 4°C.

2.4. Determinazione dell'attività enzimatica delle lipossigenasi

2.4.1. Preparazione delle soluzioni dei substrati e delle miscele di reazione

Le lipossigenasi catalizzano la reazione di *bleaching* del β-carotene come conseguenza indiretta dell'azione sul substrato fisiologico, il linoleato: i carotenoidi fungono da co-substrato, venendo ossidati dagli idroperossidi che si generano nella prima reazione. Per i saggi *in vitro* vengono preparate, immediatamente prima dell'uso, le seguenti soluzioni:

Soluzione di linoleato

4.5 mg di linoleato di sodio (Sigma-Aldrich L8134), vengono sciolti in 870 μL di acqua, 30 μL di tween 20 (Sigma-Aldrich P1379) e 100 μL di tampone 25 mM Tris-HCl, pH 7.5; la soluzione viene rimescolata fino a completo scioglimento del linoleato, e mantenuta in ghiaccio fino all'utilizzo. Essa ha una concentrazione teorica di 15 mM, ma in pratica il titolo risulta leggermente inferiore, a causa della rapida ossidazione del composto (Pastore *et al.*, 2000); una volta preparata, la soluzione deve essere utilizzata in giornata.

Soluzione di β-carotene

5 mg di β-carotene (Fluka 22040) vengono sciolti in 2.5 mL di cloroformio e 140 μL di tween 20. La soluzione così preparata viene mantenuta in freezer a -20°C. Quando richiesto, una aliquota da 0.5 mL di questa soluzione viene mandata a secco, sotto cappa chimica, per rotazione manuale del tubo da 50 mL in cui è posta; il residuo secco viene rapidamente risospeso in 10 mL di acqua, e la concentrazione della soluzione ottenuta viene determinata spettrofotometricamente a 460 nm sulla base di un coefficiente di assorbimento molare di 125000 cm⁻¹ M⁻¹; questa soluzione acquosa viene utilizzata in giornata. Si nota una blanda ossidazione del β-carotene anche quando si trova disciolto in cloroformio a -20°C, perdendo circa il 10% dell'assorbanza iniziale in 10 giorni (Craft, 1992): per questo motivo anche la soluzione *stock* viene periodicamente fatta *ex-novo*.

Soluzione di luteina

Viene utilizzato un preparato di luteina ottenuto tramite estrazione della xantofilla da colture cellulari di *Chlorella* e conservato a -20°C in MetOH 100% (paragrafo 2.4.2). Ad aliquote da 75 μL del suddetto preparato si aggiungono 10 μL di una soluzione di Tween20 allo 0.05%: questo volume è ottimale per una miscela di reazione di 250 μL di volume finale, in quanto si ottiene una concentrazione di detergente dovuto unicamente alla luteina dello 0.002%. Si evapora totalmente la soluzione di luteina in MetOH 100% ponendola in una eppendorf da 1.5 mL aperta in un bagnetto termostatico a 55°C : il tempo impiegato per il processo è di circa 45 min.

Soluzione FOX

Il saggio FOX è basato sulla riduzione dei perossidi da parte del Fe^{2+} in condizioni acide; la produzione del Fe^{3+} porta alla formazione di un complesso $\text{Fe}^{3+}\text{-XO}$, generando un composto colorato che presenta un massimo di assorbanza a 560 nm (Jiang *et al.*, 1992), con un coefficiente di assorbimento molare di circa $70000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, valore che viene calcolato di volta in volta tramite taratura con concentrazioni crescenti di H_2O_2 . La miscela di reazione FOX è costituita da metanolo-acqua in rapporto 9:1. Alla parte acquosa vengono aggiunti, in ordine, i seguenti componenti:

- H_2SO_4 25 mM
- Butil-idrossitoluene (BHT) 4 mM
- Xylenol Orange (XO) 76 mg L^{-1}
- FeSO_4 2 mM

La variazione dell'ordine di aggiunta alla miscela delle soluzioni compromette il corretto sviluppo della soluzione. La miscela viene preparata almeno 15 minuti prima dell'utilizzo; l'aggiunta del BHT ha come fine quello di ridurre l'eventuale rumore di fondo causato dalla presenza nell'estratto utilizzato di molecole ossidanti (Pinto *et al.* 2007).

2.4.2. Purificazione della luteina da cellule di *Chlorella protothecoides*

La luteina, come la maggior parte dei carotenoidi, è disponibile commercialmente a prezzi molto elevati. Pertanto si è messo a punto un metodo per purificarla dall'alga verde *Chlorella protothecoides* (Shi *et al.*, 1997). Questa microalga, cresciuta in condizioni eterotrofe, è caratterizzata da elevate concentrazioni di luteina, che viene accumulata all'interno della cellula. Nella collezione algale del laboratorio di Fisiologia e Biochimica vegetale è presente il ceppo ATCC 30411 di *Chlorella protothecoides* che è stato quindi utilizzato per mettere a punto un protocollo di purificazione preparativa capace di fornire luteina in quantità e a un livello di purezza idonei al suo utilizzo per la determinazione dell'attività delle LOX. A tal fine cellule di *Chlorella* vengono raccolte per centrifugazione a 2500 g per 5 min e la biomassa ottenuta viene risospesa in 25 mL g^{-1} di metanolo 100%. L'estrazione in solvente organico viene lasciata procedere per 30 min al buio, vortexando ogni 10 min. Dopo un'ulteriore centrifugazione il supernatante viene trasferito in un pallone di vetro da 500 mL e concentrato a temperatura ambiente sotto vuoto mediante un apparato Rotavapor.

L'ottenimento di un preparato di luteina con un accettabile livello di purezza richiede la sua risoluzione dagli altri pigmenti presenti, in particolare delle clorofille e del β -carotene. L'esclusione di tali molecole dal campione di interesse non risulta però semplice per via della loro comune natura fortemente idrofobica. La metodica prescelta è stata quella dell'estrazione in fase solida (SPE), utilizzando colonnine C18 in cui la resina, affine ai composti polari grazie alle lunghe catene idrocarburiche presenti, trattiene sia le clorofille che i carotenoidi. La luteina è una xantofilla, mentre il β -carotene non contiene atomi di ossigeno, per cui risulta essere significativamente più idrofobico della prima. Le clorofille presentano una polarità

intermedia tra i due carotenoidi, quindi la cromatografia dovrebbe portare al seguente ordine di eluizione: luteina, clorofille e β -carotene. Una volta che il campione è stato concentrato circa 10 volte, aliquote da 5 mL vengono caricate su una cartuccia C18 octadecil (Baker, 500 mg), precedentemente riequilibrata mediante il passaggio di 10 mL di metanolo 100% e 10 mL di metanolo 95%. Il flusso viene regolato a 60 mL ora⁻¹ e viene mantenuto costante mediante l'ausilio di una pompa peristaltica. Una volta caricato il campione, la colonna viene eluita prima con metanolo 95%, e successivamente con metanolo 100%; si raccolgono frazioni da 1 mL (Figura 71). Le frazioni contenenti luteina sono combinate e concentrate come descritto in Rotavapor.

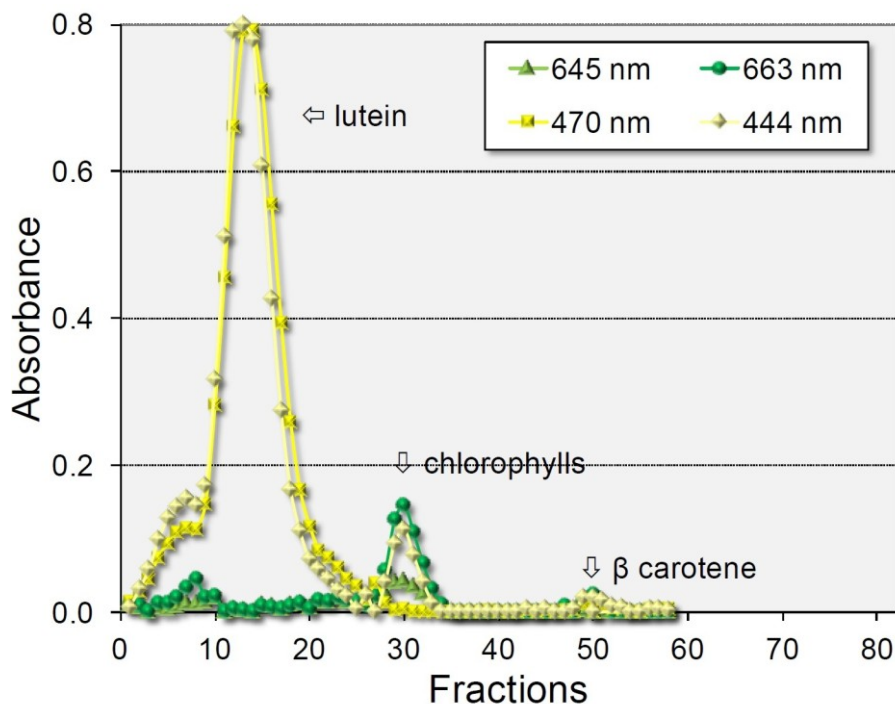


Figura 71. Eluizione dei diversi pigmenti per SPE su colonna C18 octadecil. La luteina eluisce per prima e viene separata sia dalle clorofille sia dal β -carotene.

La purezza del preparato ottenuto viene analizzata mediante HPLC. Una aliquota da 20 μ L del campione viene iniettata su una colonna a fase inversa Zorbax ODS C18 (Agilent) da 5 μ m, \varnothing 4,6 mm e 250 mm di lunghezza. La corsa cromatografica, gestita da un apparato Kontron 450 con acquisizione automatica del segnale, procede a 1 mL min⁻¹ mediante un gradiente complesso (Bertazzini, 2009), misurando l'assorbanza dell'eluato a 444 nm mediante un detector Kontron 432.

2.4.3. Saggi per la rilevazione dell'attività delle lipossigenasi

Attività in vitro della lipoossigenasi (saggio diretto a 234 nm)

L'attività lipossigenasica può essere valutata spettrofotometricamente misurando direttamente l'incremento di assorbanza a 234 nm (Grossman e Zakut, 1979). La miscela di reazione è costituita da 100 μ L di tampone 0.5 M Tris HCl pH 7.5 (concentrazione finale 50 mM) e 34 μ L della soluzione di linoleato (finale 500 μ M) in un volume finale di 1 mL. Dopo aver pre-equilibrato la miscela a 35°C in un bagnetto termostatico per 3 minuti, la reazione viene fatta partire mediante l'aggiunta di un opportuno volume di estratto in una cuvetta di quarzo da 1 mL di volume. L'assorbanza a 234 nm viene seguita per 5 min attraverso una lettura ogni 15 sec contro un bianco costituito da un campione parallelo senza acido linoleico. L'attività viene calcolata in pkat (1 pkat corrisponde alla comparsa di 1 pmol di idroperossido al secondo) sulla base di un coefficiente di assorbimento molare dell'idroperossido pari a 30000 M⁻¹ cm⁻¹.

Attività in vitro della lipoossigenasi (saggio FOX)

L'attività della lipoossigenasi può essere valutata spettrofotometricamente in maniera indiretta misurando l'incremento di assorbanza a 560 nm provocata dalla reazione tra gli idroperossidi prodotti dalla reazione primaria e il reattivo FOX (Jiang *et al.*, 1992). La miscela di saggio è costituita da 200 μL di tampone 0.5 M Tris HCl pH 7.5 (concentrazione finale 50 mM) e 68 μL della soluzione di linoleato (500 μM), in un volume di 2 mL. Dopo aver pre-equilibrato la miscela a 35°C in un bagnetto termostatico per 3 minuti, la reazione viene fatta partire mediante l'aggiunta di un opportuno volume di estratto. Ogni 2 min vengono prelevati 100 μL di miscela di saggio, che sono addizionati a 900 μL di miscela FOX, lasciati reagire per 15 min e letti allo spettrofotometro a 560 nm in una cuvetta di polimetacrilato da 1 mL di volume. L'attività viene calcolata sulla base di un coefficiente di estinzione molare pari a 71000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

Attività di bleaching del β -carotene ad opera della lipoossigenasi

L'attività di *bleaching* del β -carotene (e della luteina) viene valutata spettrofotometricamente misurando la diminuzione di assorbanza a 460 nm. La miscela di reazione è costituita da 100 μL di tampone 0.5 M Tris HCl pH 7.5 (concentrazione finale 50 mM), 34 μL della soluzione di linoleato (500 μM), e un volume variabile della soluzione acquosa di β -carotene (o luteina) in modo da ottenere una concentrazione pari a circa 8 μM ($\text{abs} = 1$) in un volume finale di 1 mL. Dopo aver pre-equilibrato la miscela a 35°C in un bagnetto termostatico per 3 minuti, la reazione viene fatta partire mediante l'aggiunta di un opportuno volume di estratto in una cuvetta di polimetilmetacrilato da 1 mL di volume. L'assorbanza a 460 nm viene seguita per 5 o 10 min attraverso una lettura ogni 30 sec contro un bianco costituito da un campione parallelo senza enzima. L'attività viene calcolata sulla base di un coefficiente di assorbimento molare di 125000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ per il β -carotene (Borrelli *et al.*, 1999) e uno di 137096 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ per la luteina.

Modalità miniaturizzate di saggio

Tutti i saggi descritti, laddove opportuno, sono stati effettuati anche su scala più ridotta grazie all'utilizzo di particolari cuvette (UVette, Eppendorf) nelle quali il volume minimo del campione è di soli 50 μL . Solitamente i saggi miniaturizzati vengono effettuati in un volume finale di 200 μL , permettendo di ridurre l'utilizzo dei reagenti di 5 volte rispetto al protocollo usuale.

2.4.4. Saggio per la rilevazione dell'attività di metabolizzazione dei 13S-H(P)ODE

I 13S-H(P)ODE del linoleato sono stati prodotti *in vitro* tramite l'utilizzo della LOX di soia prodotta dalla Sigma (L6632-1) come sospensione in ammonio solfato a una concentrazione di 3.6 mg mL^{-1} e a una attività specifica di 500000-1000000 U mg^{-1} . In una provetta eppendorf vengono a questo fine uniti tampone 50 mM potassio fosfato, pH 8.8, 500 μM acido linoleico, 0.1% (v/v) Tween 20 e 10000 U di LOX commerciale in un volume di 1 mL (Brash e Song, 1996). La reazione viene lasciata procedere a completamento, al termine del quale la concentrazione di 13S-H(P)ODE viene misurata a 234 nm su una diluizione del preparato.

L'attività di metabolizzazione dei H(P)ODE viene misurata in presenza di 0.2 mM 13S-H(P)ODE, seguendo il conseguente decremento di assorbanza a 234 nm.

2.5. Caratterizzazione biochimica dell'attività lipossigenasica

2.5.1. Determinazione del valore ottimale di pH

Il valore di pH ottimale per l'attività lipossigenasica e per quella di *bleaching* dei carotenoidi viene determinato aggiungendo alla miscela di reazione in diverse proporzioni Tris-HCl e Tris base, secondo lo schema riportato in Figura 72. Per i valori di pH inferiori a 7 viene utilizzato invece il tampone MES, che presenta un PkA inferiore. Alla fine di ogni saggio il pH effettivo è misurato mediante l'ausilio di un pHmetro. I dati vengono quindi riportati in grafici che mettono in relazione l'attività lipossigenasica e il pH.

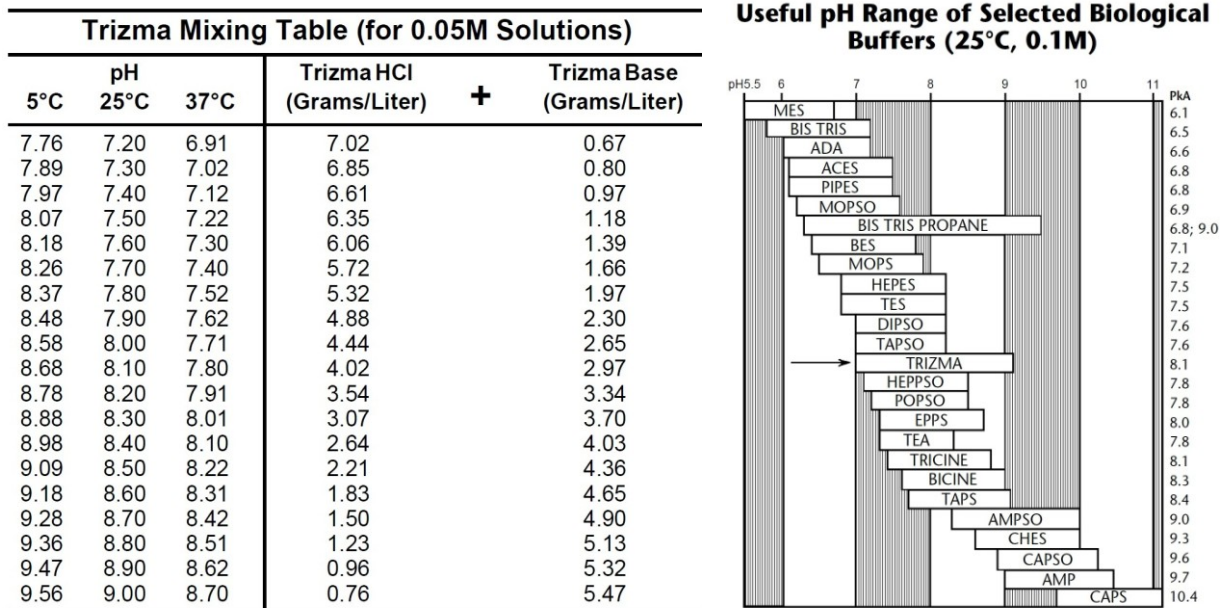


Figura 72. Tabella di preparazione del tampone Tris-HCl a diversi valori di pH (a sinistra) e schema rappresentante i più importanti tamponi biologici in ordine di PkA (a destra).

2.5.2. Determinazione dei parametri cinetici: K_M e V_{max}

Per spiegare le proprietà cinetiche della maggior parte degli enzimi può essere impiegato il modello di Michaelis-Menten, in cui un enzima (E) si combina con il substrato (S) per formare un complesso (ES), che poi procede a formare il prodotto finale (P). La velocità di formazione del prodotto (V) è data dall'equazione

$$V = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}$$

dove V_{max} è la velocità quando l'enzima è completamente saturato dal substrato, e la K_M è la concentrazione di substrato a cui la velocità di reazione è la metà di quella massima. La velocità massima è data dal prodotto tra il numero di turnover e la concentrazione totale di enzima. La prima corrisponde al numero di molecole di substrato convertite in prodotto per l'unità di tempo da un unico sito catalitico a concentrazione saturata di substrato. L'equazione in oggetto descrive un'iperbole equilatera dove V_{max} e K_M sono gli asintoti (Figura 73A). Il valore della K_M può essere quindi calcolato per interpolazione grafica. La suddetta equazione può essere linearizzata ponendo sugli assi cartesiani gli inversi della concentrazione e della velocità (Figura 73B), in modo che i due asintoti siano trasformati in intercette. Quest'ultimo modello, descritto da Lineweaver-Burk, permette una più semplice analisi dei dati.

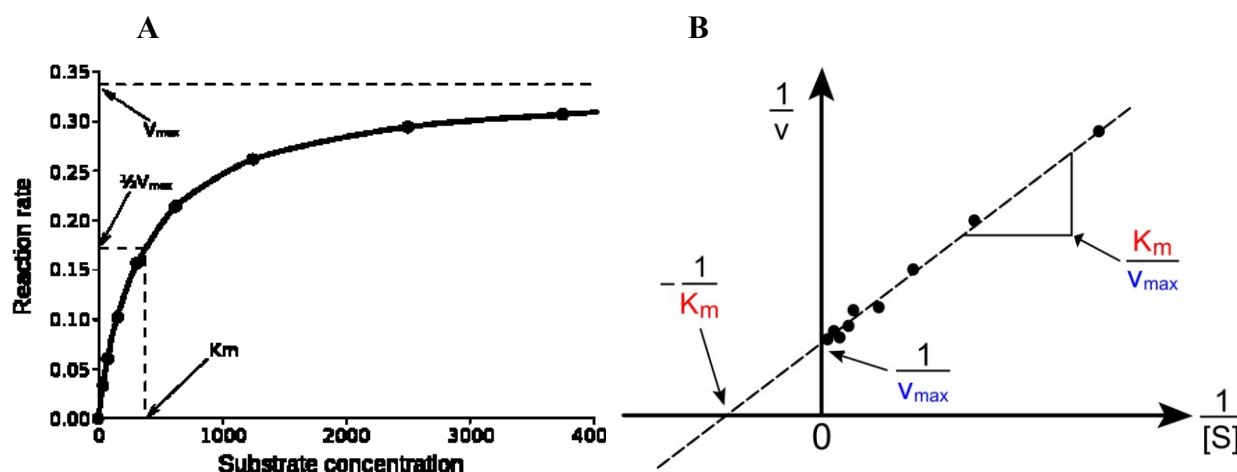


Figura 73. Rappresentazione grafica delle equazioni di Michaelis-Menten (A) e di Lineweaver-Burk (B).

La determinazione dell'affinità delle lipossigenasi per i substrati, in particolare l'acido linoleico, è stata valutata variando la concentrazione del linoleato tra 0 e 1 mM. Con i dati ottenuti è stata ricavata la curva di Michaelis-Menten, di cui è stata effettuata la linearizzazione con il metodo dei doppi reciproci. Questo metodo ha il vantaggio che i valori di velocità v per un dato valore di concentrazione di substrato $[S]$ sono facilmente deducibili, ma ha lo svantaggio di condensare i punti dei dati ad alte $[S]$ in una piccola regione e di mettere in rilievo i punti a basse $[S]$. In alcuni casi particolari, i parametri cinetici sono stati calcolati tramite il *software* "Prism 6 for Windows" (versione 6.03, GraphPad Software Inc.) che si basa su una analisi non lineare.

2.5.3. Determinazione della stabilità enzimatica

La stabilità enzimatica viene valutata misurando ogni 12 o 24 ore l'attività specifica su aliquote di un preparato parzialmente purificato, conservato nel frattempo in ghiaccio. I risultati ottenuti sono espressi come percentuale del valore ottenuto al tempo 0.

2.5.4. Determinazione del contenuto proteico di un campione

Per determinare la concentrazione proteica di un campione viene utilizzato il saggio di Bradford (1976) che si basa sul principio del legame non covalente in ambiente acido tra un colorante, il Blu di Comassie, e i gruppi basici delle proteine. Questo legame sviluppa un colore scuro con massimo di assorbimento a 595 nm, misurabile per mezzo di uno spettrofotometro. Il reattivo viene preparato sciogliendo 100 mg di Coomassie Brilliant Blue G250 in 50 mL di etanolo 96%, mantenendo la soluzione in blanda agitazione per mezzo di un magnete; si aggiungono quindi 100 mL di acido fosforico 85% e si porta lentamente al volume di 1 L con acqua distillata. Quando il colorante ha raggiunto un buon grado di solubilizzazione (dopo circa 20 minuti di agitazione) si procede alla filtrazione su carta della soluzione per eliminare il composto in eccesso. Il reattivo così ottenuto viene conservato in una bottiglia di vetro scuro, e rimane stabile per alcuni mesi a temperatura ambiente.

La risposta quantitativa del reattivo deve essere determinata sperimentalmente per ogni preparazione. Aliquote da 1 mL della soluzione colorimetrica sono distribuite in provette tipo Eppendorf da 1.5 mL. Dopo aver preparato una soluzione 1 mg mL^{-1} di albumina di siero bovina (BSA), che può essere poi conservata a -20°C , si allestisce una diluizione della stessa in

modo da ottenere una concentrazione di 0.2 mg mL^{-1} . Aliquote comprese tra 5 e 25 μL di quest'ultima soluzione, corrispondenti a 1-5 μL di proteina, sono aggiunte alle provette in duplicato. Dopo aver lasciato a temperatura ambiente per 10 minuti in modo da consentire il completo sviluppo del colore, l'assorbanza dei campioni viene determinata allo spettrofotometro a 595 nm contro un bianco costituito da solo reattivo. Con i risultati ottenuti si costruisce una curva di taratura ponendo in ordinata i valori di assorbanza e in ascissa quelli relativi alla concentrazione di BSA; la pendenza della retta interpolante rappresenta il valore di assorbanza che corrisponde a 1 μg di proteina. Solitamente l'ambito di linearità del metodo è compreso tra 0.1 e 0.4 A_{595} , ma tali valori sono determinati di volta in volta analizzando la curva di taratura ottenuta.

Al fine di determinare la concentrazione proteica di un campione incognito, dopo aver preparato una diluizione opportuna dell'estratto ad aliquote da 1 mL di reattivo sono uniti solitamente 5 volumi differenti (nell'ambito compreso tra 5 e 25 μL) di campione, e si determina con le modalità indicate l'assorbanza risultante. Si riportano quindi i valori ottenuti a 1 mL di campione e se ne calcola la media; il dato viene quindi diviso per il valore di assorbanza che corrisponde a 1 μg di proteina: il risultato, eventualmente corretto per il fattore di diluizione, rappresenta la concentrazione di proteine solubili in $\mu\text{g mL}^{-1}$.

2.6. Determinazione dell'espressione dei geni *Lpx* di grano duro

2.6.1. Estrazione dell'RNA totale da cellule in coltura di grano duro

Una coltura in fase stazionaria viene re-inoculata trasferendo circa 5 mL di cellule in 100 mL di terreno fresco. A tempi crescenti dall'inoculo si effettua un prelievo di circa 20 mL della sospensione, che viene filtrata in apparato sottovuoto. Aliquote da 50 mg di cellule sono trasferite in un omogenizzatore Potter (*teflon-in-glass Potter homogenizer*) da 15 mL e si aggiungono 500 μL della soluzione di estrazione contenuta nel Kit Agilent "Plant RNA isolation mini kit" insieme a 5 μL di β -mercaptoetanol. Si procede quindi con l'estrazione effettuata con 20 *strokes* grazie a un motore che mantiene in rotazione il pestello di teflon. Dopo un minuto 350 μL dell'omogenato sono trasferiti nella *prefiltration column*; si centrifuga per 3 min a 12000 g a RT. Ai 300 μL circa di filtrato sono aggiunti 300 μL di isopropanolo, si mescola accuratamente e il preparato viene caricato sulla *isolation column*, facendo adsorbire mediante centrifugazione 35 sec a 12000 g. La colonna viene quindi lavata prima con 700 μL di *wash solution*, centrifugando per 35 sec, e quindi con altri 500 μL per 2 min e una ulteriore centrifugata di 30 sec. L'RNA viene infine eluito ponendo 50 μL di H_2O *RNase-free* nella colonnina e, dopo 60 sec di riequilibrio, centrifugando 1 min a 12000 g. Si ottiene un preparato finale di circa 50-55 μL , che viene conservato in ghiaccio. Per verificarne purezza e contenuto, una aliquota da 5 μL viene diluita in acqua a 100 μL e letta a 260 e 280 nm usando una UVette.

Con la procedura descritta si ottengono in genere concentrazioni comprese tra 0.5 e 1.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ($1 A_{260} = 40 \mu\text{g}$) e un rapporto A_{260}/A_{280} compreso tra 1.5 e 1.6.

2.6.2. Sintesi di cDNA

In una provetta tipo Eppendorf da 0.2 mL si pongono, nell'ordine, 30-N μL di H_2O *RNase-free*, N μL del preparato corrispondenti a 1.5 μg di RNA totale, 6 μL di 5X *iScript reaction mix* (*iScript cDNA Synthesis Kit*, BioRad 170-8890) e 1.5 μL di trascrittasi inversa (20X). Si incuba quindi per 5 min a RT (circa 26°C in acqua in un beaker), 30 min a 42°C , e la reazione è infine terminata ponendo per 5 min a 85°C . La provetta viene trasferita in ghiaccio, dove è conservata fino all'utilizzo. Prima di effettuare la retrotrascrizione viene applicato un trattamento con DNAsi (SIGMA, AMP-D1) per la rimozione di eventuali residui

di DNA. A tal fine si compone una miscela di reazione di 10 μL di volume finale contenente un'aliquota di mRNA corrispondente a 1 μg , 1 μL di apposito tampone e 1 μL di soluzione di DNAsi. Dopo 15 minuti di incubazione a temperatura ambiente si aggiunge 1 μL di *stop solution* e la reazione viene terminata mediante inattivazione termica per 12 min a 70°C in termociclatore.

Gene	Primer Forward (5'-3')	Primer Reverse (5'-3')
Lpx-B1.1c	CCAAGATGATACTGGGCGGGC	CGCCGCCTTGCCGTGGTTGG
Lpx-B1.2	TACACGCCGGTGCCGAGCGGCAG	CTCGTCGGAGGAGTGCTTCGACAG
Lpx-2	GACCACAAGCGTGCCACAGTCAG	CAGATGGAATCCTGTTGGGGATG
Lpx-3	GATGCTGCTGCACGGGCTGGTGG	GATGCTGCTGCACGGGCTGGTGG
17S	GCTCGTAGTTGGACCTTGG	GTATCTGATCGTCTTCGAGC
Actina	CTTCGGACCCAAGAAAGAAAGCC	CACCGCCCGTATTTCTCTAGTAGCC

2.6.3. Amplificazione dei geni *Lpx* tramite PCR semi quantitativa

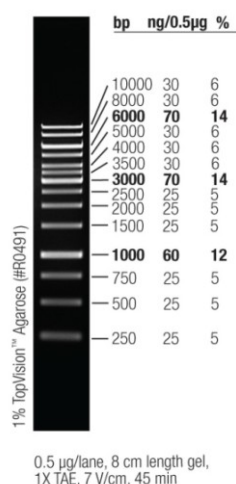
Aliquote da 2 μL di cDNA sono amplificate in un volume finale di 20 μL unendo tra di loro 6 μL di acqua, 1+1 μL degli opportuni primers, e 10 μL della iQTMSupermix (BioRad 170-88650). Le coppie dei *primers* utilizzate (Verlotta *et al.*, 2010) sono riportate nello schema sottostante:

gene	Lpx-B1.1c	Lpx-B1.2	Lpx-2	Lpx-3	17 S	Actin
T di annealing (°C)	54	70	62	60	60	62
Amplificato (bp)	1154	887	294	197	382	280

Il programma di amplificazione è composto da 27, 30 o 33 cicli (30 sec di *denaturation* a 94°C, 30 sec di *annealing*, 1 min di *extension* a 72°C e 1 min di *final extension*), con una denaturazione iniziale di 3 min a 95°C per l'attivazione della polimerasi e uno *step* di *final extension* di 3 min. Le temperature di *annealing* utilizzate vengono elencate di seguito:

Una volta terminata l'amplificazione, ogni campione viene aggiunto con 5 μL di 5X GelPilot Loading Dye (Qiagen), e i campioni sono caricati su un gel di agarosio all'1% contenente 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ di etidio bromuro. I marcatori utilizzati sono "GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder" (Figura 74) e la corsa elettroforetica viene fatta procedere a 44 V per circa 75 min prima di essere visualizzata al transilluminatore.

Figura 74. Marcatori "GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder"



2.7. Localizzazione subcellulare delle forme di lipossigenasi di grano duro

Circa 15 g di cellule in coltura sono risospese in 4 mL g⁻¹ di tampone 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, contenente 0.4 M mannitolo ed estratte per aliquote da 10 mL in un Potter da 30 mL. L'estratto così ottenuto viene centrifugato a 1000 g per 2 min; una aliquota da 1.5 mL del supernatante viene diluita 1:4 con acqua e addizionata con 0.1% di TritonX-100: essa rappresenta l'estratto totale. Il restante supernatante viene centrifugato a 10000 g per 10 min; il materiale sedimentato viene risospeso in tampone 50 mM Tris HCl, pH 7.5, addizionato con lo 0.1% TritonX-100 e rappresenta la frazione organellare. Il supernatante (S10) viene successivamente sottoposto a ultracentrifugazione a 100000 g per 1 ora; il materiale sedimentato viene risospeso in tampone di estrazione e rappresenta la frazione membranaria, mentre il supernatante costituisce la frazione citosolica.

Tutti i campioni ottenuti vengono sottoposti a parziale purificazione tramite passaggio su colonna desalante Bio-Gel P6DG (15 mL *bed-volume*) e cromatografia a scambio anionico su colonna DEAE-Sephacel (3 mL *bed-volume*), con le modalità precedentemente descritte.

2.8. Espressione della lipossigenasi di grano duro in risposta al trattamento delle cellule con sostanze ad azione ormonale

Culture cellulari in precoce fase stazionaria sono unite tra loro in condizioni sterili, eliminando il più possibile il terreno. Si risospescono quindi le cellule in terreno in cui il 2.4D è stato omesso, e si divide tale sospensione in aliquote da 20 mL che sono poste in beutine da 100 mL. A queste si effettuano le seguenti aggiunte, eseguendo 6 repliche per trattamento:

Ormone	Concentrazione
nessuna aggiunta	
Auxina (2.4D)	50 µM
Citochinina (6.BAP)	50 µM
Acido gibberellico	5 µM
Acido abscissico	50 µM
Ethephon	50 µM
Acido Jasmonico	50 µM
Metil Jasmonato	50 µM
Acido Salicilico	50 µM

A 24 e 48 ore dall'aggiunta, 3 repliche per trattamento sono filtrate e le cellule sono utilizzate: ① per la determinazione dei livelli di espressione della *Lpx-2* e della *Lpx-B1.2* mediante PCR semi-quantitativa come descritto nel paragrafo 2.6; ② per la determinazione dell'attività specifica delle due isoforme, previa separazione mediante cromatografia a scambio anionico su colonnine da 3 mL di *bed-volume* di DEAE-Sephacel. A quest'ultimo fine la colonna viene eluita *step-wise* con 10 mL di tampone addizionato con 100 mM NaCl, raccogliendo un'unica frazione sia del materiale non trattenuto che dell'eluato.

2.9. Elettroforesi denaturante su gel di poliacrilamide (SDS-PAGE)

Preparazione dei campioni per l'elettroforesi

Le proteine vengono denaturate mescolando il campione da analizzare con un identico volume di 2X *treatment buffer*, costituito da tampone Tris-HCl 125 mM, pH 6.8, contenente 4% (p/v) SDS, 20% (v/v) glicerolo, 10% (v/v) β -mercaptoetanol, e 1 mg mL⁻¹ blu di bromofenolo e trattando per 5 minuti a 100°C.

Elettroforesi

L'elettroforesi in condizioni denaturanti è una tecnica adatta per la separazione delle proteine, che migrano nel gel unicamente in base al loro peso molecolare a causa della denaturazione con SDS. Maggiori sono le dimensioni della proteina da separare e meno concentrato deve essere il gel per favorirne la migrazione. Vista la massa molecolare attesa per la LOX (circa 90 kDa), si prepara un gel al 10%. Viene utilizzato un gel discontinuo, preparando uno *stacking gel* con una concentrazione del 5% di poliacrilamide la cui funzione è quella di focalizzare il campione caricato nei pozzetti, in modo che tutti i campioni comincino la loro migrazione dallo stesso punto di partenza. La prima operazione da fare è montare l'apparato per l'elettroforesi verticale, per cui si hanno a disposizione:

- 2 lastre di vetro rettangolari 8 x 10 cm
- 2 spaziatori di plastica per tenere distanziate le lastre
- un pettine a 10 denti dello spessore degli spaziatori per i pozzetti dei campioni
- una guarnizione in gomma da avvolgere attorno ai due vetrini
- 2 pinze per tenere insieme le 2 lastre distanziate
- il supporto per la gelificazione.

Vengono preparati inizialmente 9 mL di *separating gel*, sopra al quale, una volta solidificato, si aggiungono circa 3 mL di *stacking gel*, secondo il seguente schema:

Componenti	Stacking gel	Separating gel
Acqua	2 x 912 μ L	5 x 960 μ L
Gel	750 μ L	3 x 750 μ L
Soluzione SDS al 10%	30 μ L	90 μ L
Acrilamide al 40%	375 μ L	2 x 900 μ L
Degasare per 5 minuti		
Ammonio persolfato (APS) 10%	30 μ L	75 μ L
TEMED	7.5 μ L	10 μ L

Nella preparazione di entrambi, dopo aver unito l'acqua, l' SDS e l'acrilamide, si degasa per 5 minuti in un apparato a vuoto per eliminare l'aria presente; quindi si uniscono i catalizzatori della reazione di polimerizzazione, TEMED e APS. Subito dopo aver aggiunto nell'apparato lo *stacking gel*, viene inserito il pettine, che verrà tolto una volta polimerizzato il gel, creando così i pozzetti per il caricamento dei campioni. Il gel è trasferito nell'apparato per la corsa, dove viene immerso nel *tank buffer* (25 mM Tris - 192 mM glicina, 0.1% di SDS), e con una pipetta pasteur si tolgono le bolle presenti sotto al gel che potrebbero interferire con il passaggio della corrente. I campioni (40 μ L) sono caricati mediante una siringa Hamilton da 200 μ L; come riferimento vengono utilizzati solitamente 20 μ L di *molecular markers high range* [Sigma S8320, così composti: gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (36 kDa), ovalbumina (45), glutamico deidrogenasi (55), albumina (66), fosforilasi B (97), β -galattosidasi (116), miosina (205)] o *low range* (M3913) (Figura 75). Una volta collegati gli elettrodi, la corsa viene eseguita a amperaggio costante (10 mA) fino a che la migrazione dei campioni non arriva a 1 cm circa dal fondo del gel.

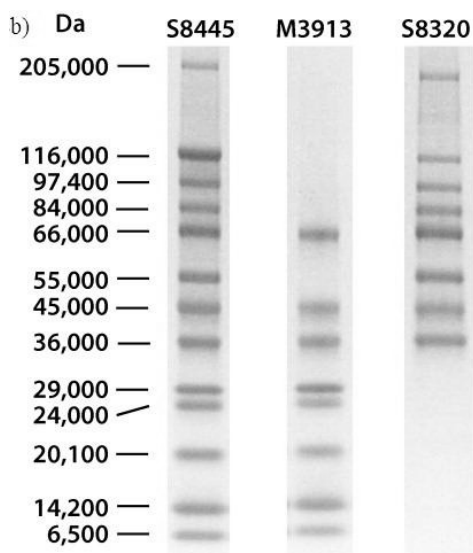


Figura 75. Marcatori di peso molecolare per l'elettroforesi denaturante su gel di poliacrilammide.

Colorazione del gel con Coomassie Brilliant Blue R250

Il gel viene quindi trasferito dall'apparato di corsa a una vaschetta contenente 50 mL di soluzione colorante (40% metanolo, 7% acido acetico, 0.1% *Coomassie Brilliant Blue R250*). Trascorsi 15 minuti, dopo aver tolto la soluzione colorante il gel viene posto in soluzione decolorante (40% metanolo, 7% acido acetico), lasciando agire inizialmente per 5-10 minuti; quindi si effettuano dei trattamenti successivi sempre più lunghi, finché schiarendosi lo sfondo non risultino ben visibili le bande proteiche. La soluzione esausta viene posta in un apposito contenitore con carbone attivo in modo da riassorbire il colorante, consentendone il successivo riutilizzo. Il gel viene infine riequilibrato in acqua distillata.

Colorazione del gel con nitrato d'argento

Dopo la decolorazione del gel in *destaining solution* si effettua un accurato riequilibrio in acqua, operato con più passaggi in modo da eliminare completamente l'acido acetico presente nella miscela di decolorazione: solitamente vengono effettuati a questo fine 4 lavaggi da 20 min. Si pone quindi a incubare per 60 min in 50 mL di una soluzione 50 mM di AgNO_3 in acqua, in blanda agitazione su uno shaker a temperatura ambiente. Dopo un veloce lavaggio in acqua il gel viene quindi trasferito in una soluzione di sviluppo ottenuta sciogliendo 1.5 g di Na_2CO_3 in 50 mL di acqua distillata, cui si aggiungono 30 μL di formaldeide. Si utilizza inizialmente circa la metà della soluzione di sviluppo che, dopo 5 minuti di incubazione, viene rimpiazzata con la restante metà. La colorazione viene lasciata procedere fino al raggiungimento della intensità desiderata, quindi, previo scarto della soluzione di sviluppo, si pone il gel in acqua e si blocca la reazione con l'aggiunta di alcune gocce di acido acetico glaciale. Dopo riequilibrio con acqua il gel può essere conservato indefinitamente per un lungo periodo di tempo in una soluzione al 7% di acido acetico.

2.10. Espressione eterologa e purificazione della CCD4 di *Malus domestica*

2.10.1. Crescita del ceppo BL21(DE3)pLysS di *Escherichia coli*

Per effettuare l'espressione eterologa del gene della CCD4 di *Malus domestica*, posta nel vettore di espressione pGEX-4T-1 sotto il controllo del promotore T7 (gentilmente fornito dal prof. F. Huang dell'università di Monaco; Figura 76) si utilizza il ceppo BL21(DE3)pLysS di *E. coli*. Tale ceppo è infatti stato sviluppato specificamente per l'uso di sistemi di espressione basati sulla RNA polimerasi del batteriofago T7. Mediante l'aggiunta al mezzo di coltura di isopropil- β -D-1-tiogalattopiranoside (IPTG) viene indotta l'espressione di questa polimerasi, che a sua volta determina la trascrizione del gene di interesse. Nonostante ciò, l'espressione

della polimerasi T7 a livelli basali potrebbe portare a una instabilità del plasmide, se il gene eterologo codificasse per una proteina tossica: per prevenire ciò il ceppo è dotato del plasmide pLysS (di 4886 bp), che viene mantenuto grazie alla presenza di un gene per la resistenza al cloramfenicolo. Tale plasmide impedisce la trascrizione del gene eterologo in assenza dell'induttore.

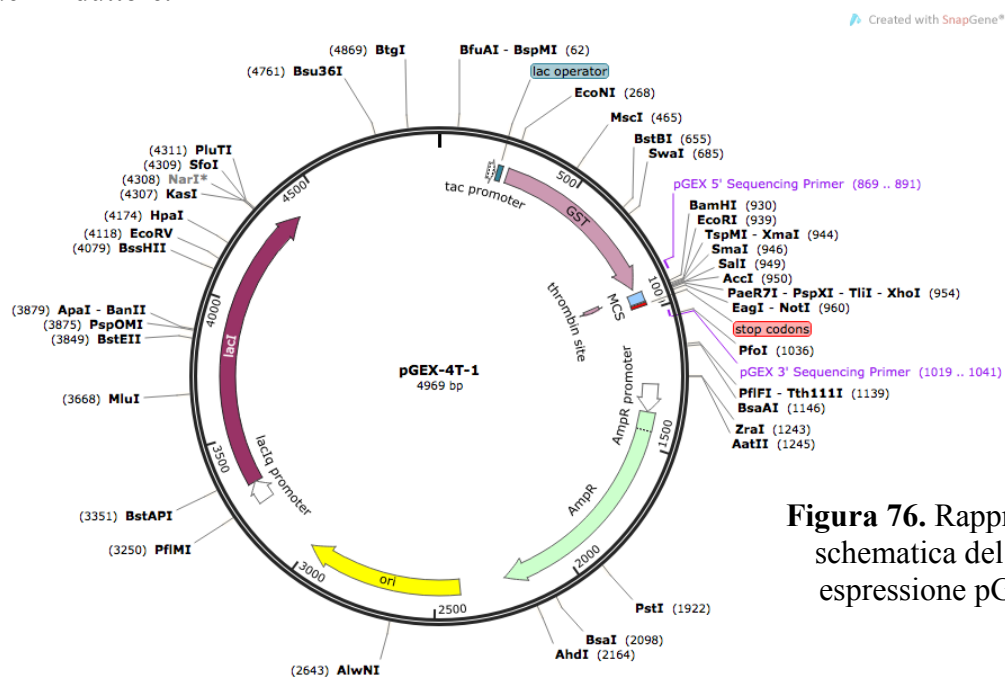


Figura 76. Rappresentazione schematica del vettore di espressione pGEX-4-T1

Il ceppo batterico viene cresciuto a 37°C su terreno LB, composto da 10 g L⁻¹ NaCl, 10 g L⁻¹ triptone e 5 g L⁻¹ estratto di lievito, a pH 7.5. Per la preparazione del terreno solido viene aggiunto il 12% di agar prima della sterilizzazione, che avviene in autoclave a 118°C per 20 min. Dopo la sterilizzazione il terreno viene distribuito in piastre petri di plastica del diametro di 90 mm, nelle quali è già stato posto l'antibiotico. Nel caso del cloramfenicolo, la soluzione *stock* viene preparata in etanolo puro a una concentrazione di 10 mg mL⁻¹. Esso viene aggiunto al terreno agarizzato a una concentrazione finale di 50 mg L⁻¹, in quello liquido a 25 mg L⁻¹. Il ceppo viene conservato per brevi periodi in piastre madri a 4°C, e rinnovato ogni 2 settimane; per tempi più lunghi, invece, si preparano dei glicerinati risospendendo una coltura a 1.5 - 2.0 A₆₀₀ in 50% v/v glicerolo sterile; questi sono conservati a -20°C.

2.10.2. Preparazione delle cellule competenti e trasformazione

Con una colonia singola di BL21(DE3)pLysS prelevata da una piastra cresciuta di fresco si avvia un pre-inoculo in 25 mL di LB contenente cloramfenicolo che viene lasciato crescere overnight a 24°C a 100 rpm. La mattina seguente la sospensione ottenuta viene utilizzata per inoculare 30 mL di terreno contenente cloramfenicolo in modo tale da ottenere una assorbanza iniziale A₆₀₀ < 0.1. I batteri vengono cresciuti a 24°C fino a quando la densità ottica è pari a 0.2, quando si aggiungono 10 µL mL⁻¹ di una soluzione 2 M MgCl₂; si lascia quindi crescere ulteriormente la coltura fino a ottenere una A₆₀₀ = 0.45 - 0.55. La coltura viene a questo punto trasferita in ghiaccio per 30 min. Le cellule batteriche vengono raccolte mediante centrifugazione in una centrifuga Sorvall per 5 min a 10000 g e 4°C. Eliminato il supernatante, si risospende delicatamente il pellet in metà del volume iniziale della soluzione Ca²⁺/Mn²⁺ (CH₃COONa 40 mM, MnCl₂ 70 mM, CaCl₂ 100 mM, portato a pH 5.5 con HCl 1 M e sterilizzato in autoclave a 118°C per 20 min) pre-equilibrata a 0°C, lasciando riposare in ghiaccio per 2 h. Le cellule vengono di nuovo recuperate per centrifugazione e il pellet questa

volta viene risospeso in un decimo del volume precedente di soluzione $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$. Dopo ulteriori 60 min a 4°C le cellule possono subire il processo di trasformazione.

A tal fine un'aliquota da 50 μL della sospensione di cellule competenti viene unita a 1 μL della soluzione del plasmide a una concentrazione compresa tra 1 e 10 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$. Dopo 30 min a 4°C , le cellule sono sottoposte a heat-shock per 45 sec a 42°C senza agitare; immediatamente si diluisce la sospensione con 450 μL di terreno SOC (triptone 10 $\text{g } \text{L}^{-1}$, estratto di lievito 5 $\text{g } \text{L}^{-1}$, NaCl 5 $\text{g } \text{L}^{-1}$, glucosio 10 mM, MgCl_2 10 mM e MgSO_4 10 mM, portato pH a 7.5 con NaOH 1 M e sterilizzato in autoclave a 118°C per 20 min). Si pone quindi la sospensione in incubatore per 1 h a 37°C in agitazione. Aliquote da 100, 50 e 10 μL della sospensione sono infine distribuite su piastre selettive contenenti 50 $\mu\text{g } \text{mL}^{-1}$ di cloramfenicolo e ampicillina 100 $\text{mg } \text{L}^{-1}$, incubando overnight a 37°C . La mattina seguente si procede al conteggio delle colonie su ogni piastra, risalendo all'efficienza di trasformazione espressa come Unità Formanti Colonia (UFC) μg^{-1} plasmide.

2.10.3. Induzione della sintesi della proteina eterologa

IL ceppo BL21(DE3)pLysS è dotato dell'operone *lac*, che viene indotto dall'IPTG, un analogo del galattosio non metabolizzabile, in modo da protrarne nel tempo l'effetto. L'operone *lac* comprende tre geni, *lacZ*, *lacY* e *lacA*, codificanti per una β -galattosidasi, una lattosio permeasi e una tiogalattoside transacetilasi che elimina i tiogalattosidi tossici importati dalla lattosio permeasi. La trascrizione dei geni è regolata da due proteine, l'attivatore CAP (Catabolite Activator Protein) e il repressore *lac*, la cui attività dipende dalle concentrazioni cellulari di glucosio (attivatore) e lattosio (repressore) (Figura 77).

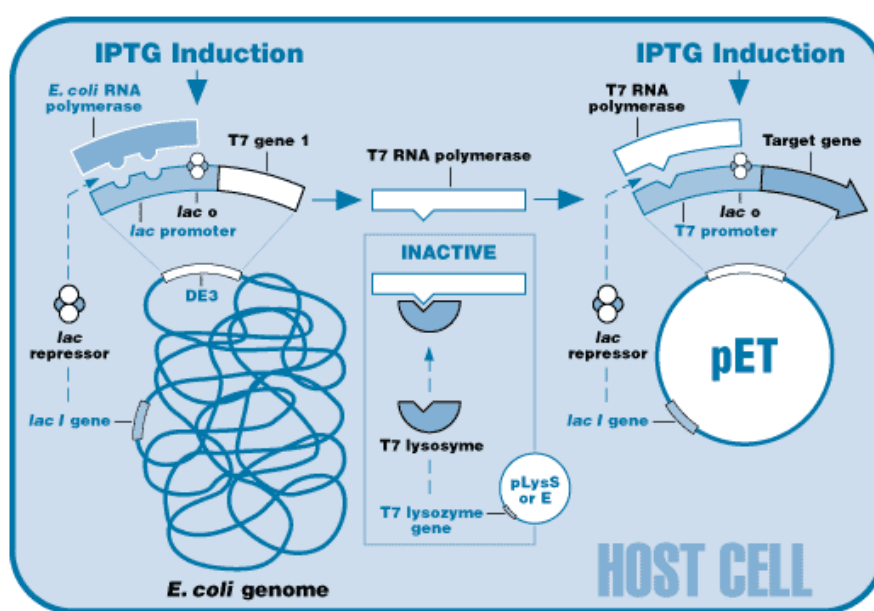


Figura 77. Schema dell'induzione di una proteina eterologa nel ceppo BL21(DE3)pLysS.

Per indurre la produzione della proteina di interesse si avvia un pre-inoculo da una colonia singola in 25 mL di terreno LB contenente cloramfenicolo e ampicillina, incubando overnight a 24°C . Il mattino seguente un'opportuna aliquota del preinoculo viene usata per inoculare 400 mL di LB + antibiotici in una beuta da 2 L, in modo che l' A_{600} iniziale sia pari a 0.2. La coltura viene cresciuta a 24°C in agitazione a 100 rpm fino al raggiungimento di una A_{600} compresa tra 0.6 e 0.8, quando si aggiunge l'IPTG ad una concentrazione finale di 1 mM. Dopo l'aggiunta dell'induttore la fermentazione viene lasciata procedere per 6 ore; al

termine le cellule sono raccolte mediante centrifugazione a 4000 g per 10 min. Il materiale cellulare così ottenuto viene conservato a -20°C.

2.10.4. Estrazione di cellule batteriche

Le cellule vengono poste ancora congelate in un mortaio di porcellana del diametro di 7 cm, pre-equilibrato alla temperatura del ghiaccio fondente. La pasta cellulare viene addizionata con 2 g g⁻¹ di ossido di alluminio (Al₂O₃) e si procede con l'estrazione per 5 minuti con l'aiuto di un pestello. L'omogenato viene risospeso in 20 mL g⁻¹ di tampone PBS (10 mM sodio fosfato, pH 7.4, contenente 150 mM NaCl) e centrifugato a 4°C a 10000 g per 10 min. Il supernatante ottenuto costituisce l'estratto grezzo.

2.10.5. Purificazione mediante cromatografia per affinità su GSH-agarosio

La resina di Glutathione Agarosio (Sigma G-4510) consiste in molecole di glutathione legate covalentemente a una matrice d'agarosio (Figura 78). Il sistema GST (*Glutathione S-transferase*) Gene Fusion System è basato sulla fusione della proteina ricombinante con l'enzima GST di *Schistosoma japonicum*. Solitamente il frammento della GST è sempre espresso dal lato N-terminale dell'enzima, in maniera tale che l'attività enzimatica della proteina eterologa non subisca variazioni (Parker *et al.*, 1990; Maru *et al.*, 1996). Il sistema GST è compatibile unicamente con l'espressione in *E. coli*. La purificazione per affinità avviene mediante l'elevata selettività di legame tra il glutathione e la proteina glutathione S-transferasi (GST) fusa all'enzima: il legame avviene tra il solfuro del tripeptide e l'eossido del polisaccaride. Ciò permette di eliminare le impurità presenti nell'estratto, che non vengono trattenute dalla resina nel corso del processo cromatografico. Successivamente si procede con un'eluizione non denaturante mediante passaggio di tampone contenente 5-10 mM glutathione ridotto, che consente di staccare dalla resina la proteina di interesse preservandone la funzionalità e l'antigenicità.

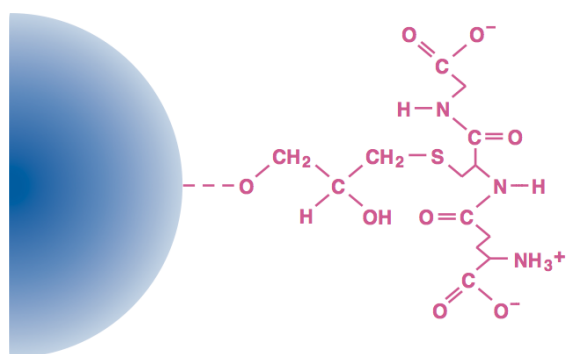


Figura 78. Struttura del glutathione immobilizzato su resina Sephadex.

La resina, ha una capacità di legame pari a 5-10 mg GST mL⁻¹ e viene conservata a 4°C in una soluzione di NaCl 2 M. La colonna cromatografica, di 1 mL di volume, viene lavata mediante il passaggio di 10 volumi di acqua, e successivamente equilibrata con altrettanti volumi di tampone PBS. L'intero processo cromatografico viene effettuato in camera fredda a 4°C. All'estratto precedentemente preparato viene aggiunto TritonX-100 alla concentrazione finale dell'1% e si carica immediatamente sulla colonna, in cui il flusso viene fatto procedere per gravità. La resina viene lavata 4 volte con 5 mL di PBS contenente 1% TritonX-100 raccogliendo l'eluato in un'unica frazione. L'enzima di interesse viene successivamente eluito con 5 mL di tampone Tris-HCl 50 mM, pH 9.0, contenente 1-10 mM GSH, raccogliendo frazioni da 1 mL di volume.

La colonna viene quindi rigenerata per lavaggio, in successione, con 5 volumi di tampone sodio borato 0.1 M, pH 8.5, contenente 0.5 M NaCl, 5 volumi di acqua distillata, 5

volumi di tampone sodio acetato 0.1 M pH 4.5 contenente 0.5 M NaCl, 5 volumi di acqua e 5 volumi di 2 M NaCl contenente 1 mM sodio azide, in cui la resina viene conservata.

2.10.6. Idrolisi della GST e purificazione della MdCCD4 mediante FPLC

L'estratto purificato su colonna di GSH-agarosio viene trattato *over night* con 4 μ L di trombina bovina (Sigma T-4648, 374 U mL⁻¹; 1.5 U in 10 mL). Il dosaggio consigliato è pari a 10 U mg⁻¹ di proteine. Il peso molecolare della trombina bovina è pari a 33 kDa (Mann e Batt, 1969). Al termine dell'incubazione il preparato viene iniettato, con le modalità descritte nel paragrafo 2.3.7, sulla colonna MonoQ 5.5 equilibrata in tampone Tris-HCl 50 mM, pH 9.0. L'eluizione avviene mediante un gradiente lineare da 0 a 500 mM NaCl in 50 mL, raccogliendo frazioni da 2.5 mL, che sono analizzate mediante SDS-PAGE.

2.10.7. FPLC per gel-filtrazione su colonna di Superose 12

Il pool ottenuto nel passaggio cromatografico precedente viene concentrato in un volume di 120 μ L tramite l'utilizzo di un filtro Millipore con limite di esclusione di 50 kDa. Il campione così ottenuto viene iniettato mediante un *loop* calibrato da 100 μ L su una colonna Superose 12 (10/300 μ l, GE Healthcare, 17-5173-01), che presenta un *bed-volume* di 25 mL e un limite di esclusione di 1000 kDa. La colonna viene eluita in condizioni isocratiche in tampone Tris-HCl 50 mM, pH 9.0, contenente 150 mM NaCl a un flusso di 0.4 mL min⁻¹, e si raccolgono frazioni da 0.2 mL. La resina mostra un elevato grado di porosità e può essere utilizzata fino ad una pressione limite di 20 bar. Per questo durante il riequilibrio prima dell'iniezione si procede a un flusso più basso, pari a 0.25 mL min⁻¹.

2.11. Saggi *in vitro* per la determinazione dell'attività enzimatica delle diossigenasi

2.11.1. Materiale vegetale

I frutti di pesco dei genotipi *RedHaven* e *RedHaven Bianca* (Figura 79), *Caldesi 2000*, *Cristina* e *Yumyeong* sono stati raccolti nelle annate 2012 e 2014 da piante coltivate in un centro sperimentale localizzato nei pressi di Forlì (44.161° N, 12.088° E) e gentilmente forniti dalla dott.ssa Daniela Giovannini. Tutti i frutti sono stati raccolti in 4 differenti stadi di sviluppo: S1 (circa 35 giorni dopo l'impollinazione, dap), S2 (50 dap), S3 (90 dap), e S4 (122 dap). Tutto il materiale è stato immediatamente congelato e conservato a -20°C.


I tuberi di patata sono stati cortesemente forniti dal dott. Giuseppe Mandolino (Centro di Ricerca per le Colture industriali di Bologna). I tuberi sono stati congelati in azoto liquido e conservati a -20°C fino all'utilizzo. Sono stati analizzati materiali di 9 differenti genotipi, caratterizzati da pasta bianca, gialla e arancio (Figura 80).

2.11.2. Isolamento dei cromoplasti

Aliquote da 6 g di polpa di pesca o patata vengono tagliate in piccole fettine e fatte scongelare per 5 min in 2 mL g⁻¹ di tampone 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, contenente 0.4 M mannitolo. Utilizzando un tampone con mannitolo si previene la lisi dei plastidi. I campioni sono successivamente estratti attraverso l'utilizzo di un omogenizzatore a lame, modello Virtis (45 Precise Super 30) mediante 2 trattamenti di 15 sec al 70% della massima velocità in coppa da 30 mL di volume. Gli omogenati ottenuti vengono immediatamente centrifugati per 2 min at 500 g. Il supernatante viene filtrato attraverso una maglia di 20 μ m. Il filtrato viene ulteriormente centrifugato per 3 min a 16,000 g e i pellet vengono risospesi in tampone di estrazione senza mannitolo.


Cultivar	Stadio	Contenuto medio in carotenoidi su peso fresco (ng g ⁻¹)	
Redhaven Bianca	S1	β-carotene Luteina	310 457
	S2	β-carotene Luteina	313 485
	S3	β-carotene Luteina	330 690
	S4	β-carotene Luteina	nd nd
Redhaven	S1	β-carotene Luteina	178 830
	S2	β-carotene Luteina	109 577
	S3	β-carotene Luteina	292 1394
	S4	β-carotene Luteina	583 nd

White Redhaven



y¹/W¹

Redhaven



y¹/y²

Figura 79. Contenuto medio di carotenoidi nelle varietà Redhaven e Redhaven bianca di pesco.




Cultivar	Specie	Contenuto medio in carotenoidi su peso secco	
Daifla	<i>Solanum tuberosum</i>	4.74 μg g ⁻¹ zeaxantina 3,8%	
Chacoense	<i>Solanum chacoense</i>	1.74 μg g ⁻¹ zeaxantina 0%	
Yema de Huevo	<i>Solanum phureja</i>	n.d.	
Papa Pura	<i>Solanum phureja</i>	29.68 μg g ⁻¹ zeaxantina 74,9%	
ISCI 105/7-8	<i>Solanum phureja</i>	17.06 μg g ⁻¹ zeaxantina 76,3%	
Mayan Gold	<i>Solanum phureja</i>	35.25 μg g ⁻¹ zeaxantina 9,9%	
7M6	<i>Solanum tuberosum</i>	n.d.	
2R4	<i>Solanum tuberosum</i>	n.d.	
Melrose (ISCI 5/03-1)	<i>Solanum tuberosum</i>	25,06 μg g ⁻¹ zeaxantina 8,5%	

Figura 80. Tuberi di patata a pasta bianca, gialla e arancio appartenenti alle varietà analizzate nel corso del presente lavoro.

2.11.3. Determinazione dell'attività di *bleaching* dei carotenoidi mediante saggio spettrofotometrico

Come riportato da alcuni autori (Schwartz *et al.*, 2001; Schwartz *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2009a), l'attività delle *carotenoid cleavage dioxygenases* può essere misurata utilizzando il β -carotene come substrato. Il saggio viene condotto in una miscela di reazione contenente tampone 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 8 μ M β -carotene, 50 μ M FeSO₄, 0.1% (v/v) TritonX-100 e una opportuna aliquota dell'enzima in un volume finale di 1 mL. Dopo incubazione a 35°C al buio a tempi crescenti (fino a 24 ore), i campioni sono letti a 460 nm misurando la degradazione del substrato contro dei bianchi in cui l'enzima è stato sostituito da un identico volume di tampone. In alternativa, i campioni di riferimento sono costituiti da miscele identiche, in cui però l'enzima sia stato inattivato termicamente per 5 min a 100°C.

Dal momento che l'idrolisi del carotene potrebbe dare origine a intermedi che mantengono la capacità di assorbire la luce nel blu, in alcuni esperimenti i campioni sono stati analizzati mediante λ -scan in un range da 400 a 550 nm.

2.11.4. Determinazione dell'attività di *bleaching* dei carotenoidi mediante RP-HPLC

Miscele di reazione (1 mL) in cui è stata condotta la reazione enzimatica secondo le modalità sopra indicate sono estratte con 200 μ L di cloroformio, rimescolando accuratamente 3 volte per 10 secondi con un Vortex; l'emulsione viene centrifugata a 12000 g per 10 min, ottenendo la separazione delle fasi. La fase organica, inferiore, deve essere prelevata senza mescolare le due fasi; a questo fine si procede immergendo il puntale con la pipettatrice già pronta per l'aspirazione, e sacrificando parte del preparato. Una aliquota da 100 μ L della fase organica viene trasferita in una provetta di vetro, e il solvente viene evaporato a temperatura ambiente per mezzo di un apparato Rotavapor sotto vuoto. I residui sono risospesi in 200 μ L di etilacetato:metanolo:acqua in rapporto 75:20:5 (V:V:V). Il campione viene centrifugato 3 min a 12000 g e una aliquota da 20 μ L viene immediatamente iniettata su una colonna a fase inversa Zorbax ODS C18 (Agilent) da 5 μ m, \varnothing 4.6 mm e 250 mm di lunghezza. La corsa cromatografica, gestita da un apparato Kontron 450 con acquisizione automatica del segnale, procede mediante eluizione isocratica a 1 mL min⁻¹ nello stesso eluente usato per la risospensione dei campioni, misurando l'assorbanza dell'eluato a 460 nm.

2.11.5. Analisi statistica dei risultati

I risultati ottenuti riguardo all'attività del *bleaching* dei carotenoidi sono stati espressi come media con la relativa deviazione standard. È stato inoltre utilizzato il calcolo della varianza (*one-way* ANOVA) per determinare se l'ipotesi zero (ovvero che le differenze osservate siano casuali) sia da rifiutare o meno, avvalorando quindi l'esistenza di una reale diversità tra i campioni presi in esame. Sono state quindi calcolate la devianza tra i gruppi e la devianza entro i gruppi e il confronto fra queste due varianze è stato eseguito calcolando il rapporto F: se le medie dei gruppi non presentano differenze le due varianze risultano uguali (entro i limiti dell'errore sperimentale). Il valore ottenuto dal rapporto deve essere confrontato con i valori tabulari (con un livello di probabilità di 0.05 o 0.01): se il valore ottenuto supera quello critico l'ipotesi nulla viene rifiutata e quindi viene accertata l'esistenza di una differenza significativa fra le medie dei vari gruppi. I calcoli statistici sono stati effettuati con l'utilizzo dei software "Excel 2010" (Microsoft) e "Prism 6".

2.12. Ottenimento di anticorpi contro la *PpCCD4*

2.12.1. Sintesi di peptidi immunogenici sulla base della sequenza della *PpCCD4*

I peptidi vengono disegnati e sintetizzati dalla ditta Proteogenix (Schiltigheim, France) e sono composti dai seguenti amminoacidi:

- PEPTIDE1: cys-GLDPSKVPRIGVIPR [MW 1707.08]
- PEPTIDE2: cys-IRNGPNPQYLPRGPY [MW 1845.12]

Entrambi i peptidi sono di lunghezza pari a 15 amminoacidi più una cisteina iniziale e presentano un grado di purezza superiore al 95%. I peptidi sono inoltre coniugati con la *Keyhole limpet hemocyanin* (KLH) attraverso la cisteina iniziale; la presenza di tale proteina incrementa notevolmente la capacità di immunizzazione in topo (Le Moigne, 2011). La validità e la specificità dei peptidi disegnati viene testata mediante l'ausilio dei software "innovagen" e "Antigen profiler peptide tool". Effettuando un'analisi con il software "IEBD Ellipro" (http://tools.immuneepitope.org/tools/ElliPro/iedb_input) utilizzando la struttura tridimensionale dell'enzima del cianobatterio *Synechocystis* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/66361521>) si nota come i peptidi in questione si trovino in regioni della proteina localizzate nella parte esterna che hanno buone probabilità di essere immunogene. I peptidi immunogenici vengono solubilizzati in tampone PBS a una concentrazione di 1 mg mL⁻¹.

2.12.2. Induzione di anticorpi contro la *PpCCD4* in topo

Le soluzioni di peptidi ottenute vengono utilizzate per l'immunizzazione di quattro topi (2 esemplari per ciascun peptide), gentilmente messi a disposizione dal Prof. Ottorino Belluzzi (Università di Ferrara), mediante tre cicli di iniezioni sottocutanee praticate alla base della coda. Nella prima iniezione 100 µL della soluzione di peptide vengono addizionati a 100 µL di adiuvante completo di Freund [una sospensione di *Mycobacterium butyricum* essiccato (5 mg), di olio di paraffina (8.5 mL) e un agente emulsionante, il mono-oleato di mannide (1.5 mL)] ottenendo una concentrazione finale di 0.5 mg mL⁻¹ (Billiau e Matthys, 2001). Per la seconda e la terza iniezione, praticate a intervalli di 14 giorni, si usano 100 µL di adiuvante incompleto di Freund, ovvero la stessa soluzione usata precedentemente ma mancante del *Mycobacterium*. Dopo sette giorni dalla terza iniezione i due topi vengono anestetizzati in una apposita gabbia di plexiglass in cui viene posta dell'ovatta imbevuta di cloroformio. Il sangue viene prelevato mediante una piccola incisione alla base delle coda e lasciato coagulare per 1 h a 37°C. Il particolato viene successivamente sedimentato per centrifugazione a 10.000 g per 10 min a 4°C. Il supernatante viene recuperato e misurato, diluito con 4 volumi di TBS (50 mM Tris-Cl, pH 7.5, contenente 150 mM NaCl), e suddiviso in aliquote da 200 µL che sono conservate a -20°C. Per ogni animale si ottengono circa 2 mL di soluzione anticorpale.

2.12.3. Analisi della presenza della *PpCCD4* tramite *dot blot*

Estratti preparati come descritto nel paragrafo 2.11.12 sono sottoposti ad analisi immunologica in condizioni non denaturanti. Aliquote da 10 µL dei campioni sono adsorbite goccia a goccia direttamente su nitrocellulosa non idratata, ottenendo così degli *spot* di forma rotondeggiante. La nitrocellulosa viene quindi saturata per 50 minuti in 10 mL di TBS contenente 3% (p/v) BSA. L'immunolocalizzazione avviene utilizzando una diluizione 1:1250 dell'antisiero di topo e una diluizione 1:5000 di IgG di coniglio coniugata alla fosfatasi alcalina (Sigma A4312) in TBS contenente lo 0.2% (v/v) Tween 20 e lo 0.5% (p/v) di BSA. Al termine della saturazione la nitrocellulosa viene sciacquata velocemente tre volte con TBS-Tween, e incubata per 90 minuti nella diluizione di anticorpo primario. Si effettuano quindi due lavaggi da 10 minuti con circa 15 ml di TBS, e si incuba altri 90 minuti con l'anticorpo secondario. Si effettuano infine 3 lavaggi da 10 minuti in TBS. Durante l'ultimo

lavaggio si prepara la soluzione di sviluppo. I *blots* vengono sviluppati per 30 min a 35°C in tampone 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 9.5, contenente 0.1 M NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.3 mg mL⁻¹ nitroblu di tetrazolio e 0.4 mg mL⁻¹ 5-bromo-4-cloro-3'-indolifosfato. La reazione viene terminata mediante l'aggiunta di 20 mM EDTA. L'intensità delle bande viene misurata tramite l'ausilio del *software* "ImageJ".

2.13. Determinazione dei livelli di attività specifica di enzimi-chiave nelle sintesi dei fenoli in grano

2.13.1. Materiale vegetale

Tutte le varietà di grano sono state fornite dal dott. Pasquale De Vita e raccolte nelle annate 2012 e 2013 da piante coltivate in un'area sperimentale localizzata nei pressi di Foggia. Tutti i semi sono stati raccolti in 4 differenti stadi di sviluppo, come descritto in Figura 81.

		Materia Lattea (Milk)	Materia Cerosa I (Soft dough)	Materia Cerosa II (Hard dough)	Materia Fisiologica (Ripe)
T. aestivum					
<i>Spada</i>	non pigm	13/05/2013	27/05/2013	06/06/2103	14/06/2013
<i>sebesta blu 2</i>	Blu	13/05/2013	29/05/2013	07/06/2103	14/06/2013
<i>P1542453</i>	Rosso	23/05/2013	31/05/2013	07/06/2103	14/06/2013
T. durum					
<i>PR22D89</i>	non pigm	13/05/2013	27/05/2013	06/06/2103	14/06/2013
<i>T1303</i>	Purple	13/05/2013	31/05/2013	06/06/2103	14/06/2013
<i>ELS6304-56</i>	Rosso	20/05/2013	29/05/2013	07/06/2103	14/06/2013



Cultivar	Colore	Contenuto totale di antocianine TAC (µg g ⁻¹)	
<i>Triticum aestivum</i>			
<i>Spada</i>	non pigm.	0.75	
<i>SebestaBlu2</i>	Blu	174.27	
<i>P1542453</i>	Rosso	nd	
<i>Triticum durum</i>			
<i>Pr22d89</i>	non pigm.	0,00	
<i>ELS6304-56</i>	Viola	36.73	
<i>T1303</i>	Rosso	44.08	

Figura 81. Genotipi e concentrazione delle antocianine presenti nei semi delle varietà di grano pigmentato oggetto di studio nel presente lavoro. I livelli di antocianine presenti all'ultimo stadio di sviluppo sono stati misurati da Ficco e collaboratori (2014).

2.13.2. Caratterizzazione delle diverse forme di 3-deossi-D-arabino-eptuloso-7-fosfato sintasi

12.3.2.1. Condizioni di crescita della coltura in sospensione liquida di *Nicotiana plumbaginifolia* e preparazione degli estratti cellulari

La coltura cellulare di *Nicotiana plumbaginifolia* Viviani viene cresciuta in luce fioca ($< 50 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$) in un incubatore termostato alla temperatura costante di $24 \pm 1^\circ\text{C}$, solitamente in beute Erlenmeyer da 500 mL di volume contenenti 125 mL di terreno, poste su un agitatore rotativo a 100 rpm. In alcune prove si sono utilizzate beute di diverse dimensioni, ma mantenendo invariato il rapporto volumetrico beuta/terreno. In tali condizioni il ciclo colturale viene completato in circa 15 giorni, al termine dei quali la coltura deve essere rinnovata: a questo fine, operando sotto cappa a flusso laminare orizzontale, una aliquota da 25 mL della coltura in fase stazionaria viene trasferita in un'altra beuta, contenente 100 mL di terreno fresco. La coltura è mantenuta in terreno MS contenente lo 0.3% (w/v) di saccarosio e 0.5 mg L^{-1} degli ormoni 2.4D e 6-BAP.

La sospensione cellulare viene filtrata su filtri di nylon da $50 \mu\text{m}$ mediante un apparato filtrante collegato a una pompa da vuoto, lavando abbondantemente con acqua distillata. Il materiale cellulare viene pesato e posto in un mortaio pre-equilibrato alla temperatura del ghiaccio fondente insieme a 2 g g^{-1} di sabbia di quarzo e 2 mL g^{-1} di tampone di estrazione [Tris-HCl 25 mM, pH 7.2, contenente 0.5 mM ditionitrotolo (DTT)]. Dopo aver omogenato per 5-10 min con un pestello, si aggiungono 10 mg mL^{-1} di polivinil polipirrolidone, un composto insolubile che assorbe i fenoli impedendone la polimerizzazione e evitando una possibile conseguente inattivazione dell'attività enzimatica. L'omogenato viene trasferito in un tubo da 50 mL e centrifugato per 15 minuti a 12000 g in una centrifuga refrigerata Sorvall a 4°C . Il supernatante viene frazionato con ammonio solfato (70% di saturazione) e le proteine precipitate vengono sedimentate nuovamente tramite centrifugazione e risospese in un volume minimo di tampone di estrazione. Per eliminare il sale si procede a un passaggio cromatografico per gel filtrazione su una colonna di resina BioGel P6DG (BioRad) equilibrata con il medesimo tampone.

2.13.2.2. Saggio *in vitro* della 3-deossi-D-arabino-eptuloso-7-fosfato sintasi

Per saggiare le due diverse isoforme di DAHP sintasi sono state usate condizioni differenti. La prima isoforma, infatti, necessita della presenza di ioni Co^{++} , ha una elevata K_M per l'E4P e può utilizzare al posto di quest'ultimo altre aldeidi, tra cui la glicolaldeide, con una efficienza maggiore dello stesso substrato naturale. La seconda non richiede necessariamente cationi divalenti, ma è stimolata dal Mn^{2+} , e mostra inibizione da substrato a elevate concentrazioni di E4P. La miscela di reazione utilizzata per il saggio dell'isoforma plastidiale è costituita da 50 mM tampone EPPS-KOH, pH 7.75, contenente 2 mM PEP, 0.5 mM E4P, 0.7 mM MnCl_2 e 0.5 mM DTT in un volume finale di 100 μL . Queste condizioni, impiegate nella quasi totalità degli esperimenti descritti in questo lavoro, sono state scelte sulla base dei risultati di studi precedenti sull'enzima di *N. plumbaginifolia* (Forlani *et al.*, 1996, 1999), in cui sono stati valutati i rapporti tra l'attività enzimatica e il pH, l'isteresi della produzione di DAHP in assenza di un agente riducente e la stimolazione della velocità di catalisi da parte di diversi ioni divalenti. Nel caso dell'isoforma citosolica si è invece applicato un protocollo di saggio descritto in letteratura come specifico, in grado cioè di discriminare tra le due attività, dal momento che la forma plastidiale dell'enzima non dovrebbe mostrare la capacità di usare come substrato la glicolaldeide (Doong *et al.*, 1992). La miscela di reazione contiene 100 mM tampone Tris-HCl, pH 8.8, 20 mM MgCl_2 , 2 mM PEP e 4 mM glicolaldeide, sempre in un volume finale di 100 μL .

Dopo incubazione per tempi crescenti a 35°C, la quantità di prodotto formatosi viene determinata attraverso un saggio chimico per il DAHP. La metodica sfrutta la produzione dell'acido β -formil piruvico derivato da quest'ultimo per azione del periodato che, reagendo con l'acido tiobarbiturico a 100°C, forma un addotto di colore rosa, con un massimo di assorbimento a 549 nm. Dopo aver fatto procedere come descritto la reazione per tempi compresi tra 10 e 60 min (solitamente 30 min), essa viene bloccata per aggiunta di 25 μ L di una soluzione al 20% (p/v) di acido tricloroacetico. I campioni vengono quindi centrifugati per 3 min a 12000 g in modo da sedimentare le proteine che precipitano in ambiente acido, e 100 μ L del supernatante ottenuto sono uniti a 100 μ L di una soluzione 25 mM di sodio metaperiodato in 0.125 N acido solforico. Questa soluzione è tendenzialmente instabile, e deve essere utilizzata entro poche ore dalla preparazione. La conseguente ossidazione del DAHP viene lasciata procedere per 30 min a 37°C, dopo di che il periodato in eccesso viene distrutto per aggiunta di 200 μ L di una soluzione al 2% (p/v) di sodio arsenito in 0.5 N HCl. L'arsenito è un potente veleno, e per la sua utilizzazione devono essere adottate le opportune precauzioni, come l'utilizzo di guanti e camice, e adeguate modalità di eliminazione del materiale contaminato. Si uniscono quindi 800 μ L di una soluzione 0.3% (p/v) di acido tiobarbiturico e si incuba per 10 minuti a 100°C. Il colore sviluppatosi viene immediatamente letto a 549 nm, e l'attività desunta da un coefficiente di estinzione molare pari a 45.000 M⁻¹ cm⁻¹ (Srinivasan e Sprinson, 1959), tenuto conto della diluizione effettuata sul volume iniziale della miscela di reazione.

12.3.2.3. Separazione delle forme di DAHP sintasi mediante cromatografia a scambio anionico

Un volume di estratto desalato contenente circa 25 mg di proteine viene caricato su una colonna di DEAE-Sephacel di 1.5 cm di diametro e 10 ml di volume, precedentemente equilibrata con tampone di estrazione. Il flusso in entrata viene mantenuto a 1 mL min⁻¹. Dopo un lavaggio con 20 mL di tampone, le proteine vengono eluite attraverso il passaggio sequenziale di 20 mL di tampone addizionato con 50 mM NaCl e di 30 mL di tampone con 150 mM NaCl, raccogliendo frazioni da 2 mL. Tale protocollo consente la separazione della forma citosolica da quelle cloroplastiche. Per la separazione delle due forme cloroplastiche di DAHP sintasi, invece, le proteine ottenute dopo il *salting out* con ammonio solfato vengono desalate in tampone di estrazione addizionato con 50 mM NaCl, e caricate su colonna di DEAE-Sephacel equilibrata con lo stesso mezzo. Le proteine vengono in questo caso eluite mediante un gradiente lineare da 50 a 250 mM NaCl in 200 mL complessivi, raccogliendo frazioni da 5 mL.

12.3.2.4. Amplificazione dei geni che codificano le due forme plastidiali di DAHP sintasi

Quantità di cellule raccolte nelle diverse fasi del ciclo di crescita della coltura di *N. plumbaginifolia* pari a circa 50 mg sono estratte in Potter con le modalità descritte per l'estrazione dell'RNA totale nel paragrafo 2.6.1. Il cDNA viene preparato come riportato nel paragrafo 2.6.2. Aliquote da 2 μ l di cDNA sono amplificate tramite PCR in un volume finale di 20 μ l unendo tra di loro 6 μ l di acqua, 1 μ l di ciascuno degli opportuni *primers*, e 10 μ l della miscela di reazione iQTM Supermix (BioRad 170-88650).

Il programma di amplificazione è composto da 30 cicli nel caso delle coppie di primers specifici per la prima isoforma o da 35 cicli nel caso della seconda isoforma:

30 sec *denaturation* a 94°C

30 sec *annealing* rispettivamente a 59°C e 57°C

1 min *extension* a 72°C

con una denaturazione iniziale di 3 min a 95°C per l'attivazione della polimerasi e uno *step* di *final extension* di 3 min. Al termine dell'amplificazione a ogni campione sono aggiunti 5 µl di 5X GelPilot Loading Dye (Qiagen), e i campioni sono caricati su un gel di agarosio all'1% contenente 0.5 µg ml⁻¹ di etidio bromuro. La corsa viene lasciata procedere a 44 V per circa 75 min.

2.13.3. Saggio *in vitro* della fenilalanina ammoniacica liasi

L'attività della PAL è stata misurata come descritto (Giberti *et al.*, 2012), seguendo spettrofotometricamente la produzione di acido cinnammico. La miscela di reazione contiene tampone 50 mM Tris-HCl, pH 9.0, 5 mM L-Phe e una concentrazione limitante di enzima in un volume finale di 1 mL. Tale miscela viene incubata a 35°C per 10 min, monitorando l'assorbanza a 290 nm ogni 20 sec contro bianchi in cui il substrato viene omesso o sostituito dalla forma non fisiologica della fenilalanina (D-Phe). L'attività viene calcolata utilizzando l'equazione di regressione lineare della produzione del cinnammato nel tempo, sulla base di un coefficiente di estinzione molare stimato con uno standard puro.

2.13.4. Saggio *in vitro* della calcione sintasi

L'attività enzimatica della calcione sintasi viene misurata come descritto da Rahman e collaboratori (2012), con alcune piccole modifiche. La miscela di reazione di 500 µL di volume contiene tampone 20 mM fosfato, pH 7.0, 40 µM malonil-CoA, 20 µM esanoil-CoA, e aliquote fino a 100 µL di estratto. La reazione viene fatta procedere per 2 h a 35°C e terminata con l'aggiunta di 100 µL di 6 N HCl. I prodotti di reazione sono successivamente estratti per 2 min con etil acetato; la fase superiore viene prelevata, facendo attenzione a non contaminarla con la fase sottostante, e analizzata mediante RP-HPLC. A tal fine viene utilizzata una colonna C18 Zorbax (5 µm, 4.6 mm × 250 mm): il flusso di eluzione viene posto a 0.5 mL min⁻¹ e la separazione cromatografica avviene utilizzando un gradiente di metanolo (40–75% in 30 min) in acqua. L'assorbanza dell'eluato viene misurata in continuo a 280 nm mediante un detector Kontron 432.

2.13.5. Saggio *in vitro* della antocianidina sintasi

Per misurare l'attività della ANS si compone una miscela di reazione di 200 µL di volume contenente tampone 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 500 µM naringenina, 10 mM α-ketoglutarato, 10 mM acido ascorbico, 0.25 mM ammonio ferro (II) solfato e un volume di estratto fino a 50 µL. La capacità della ANS di utilizzare come substrato la naringenina invece della diidroquercetina è stata dimostrata in vari studi (Welford *et al.*, 2001; Lukacin *et al.*, 2003). La miscela viene incubata a 35°C per 30 min, al termine dei quali la reazione viene fermata mediante l'aggiunta di 600 µL di metanolo and 8 µL di acido formico. Il campione così ottenuto viene sonicato per 10 min, centrifugato a 14000 g per 5 min e iniettato direttamente in HPLC o estratto due volte con un egual volume di etil acetato. La miscela viene centrifugata a 13000 g, e l'estratto organico viene completamente evaporato in un apparato Rotavapor. Il residuo viene risospeso in 100 µL di metanolo 75% (v/v) contenente 1.3 µL di acido formico. Il campione viene analizzato su colonna C18 Zorbax e tramite gradiente da 20 a 50% solvente B (90% metanolo contenente 0.1% TFA), dove il solvente A è composto da acqua ultrapura contenente lo 0.1% di TFA. L'eluizione avviene a un flusso di 1 mL min⁻¹, monitorando l'eluato a 280 nm.

2.13.6. Saggio *in vitro* della antocianidina reduttasi

L'attività enzimatica della ANR viene seguita a 35°C seguendo l'ossidazione cianidina-dipendente del NADPH. La miscela di reazione è composta da tampone 100 mM Tris-HCl, pH

7.4, 100 μM cianidina cloruro, e volumi di estratto variabili fino a 20 μL in un volume finale di 90 μL ; 10 μL di soluzione di NADPH (2 mM) preparata al momento vengono aggiunti direttamente alla miscela di reazione in una microcuvetta (UVette, Eppendorf); la diminuzione dell'assorbanza a 340 nm è misurata a intervalli di 2 min fino a 30 min. L'attività viene calcolata utilizzando l'equazione di regressione lineare sulla base di un coefficiente di estinzione molare di $6.220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. In alternativa, la stessa miscela di reazione viene allestita in un volume di 500 μL e lasciata incubare a 35°C per 2 ore; la reazione viene quindi fermata previa aggiunta di 1 mL di etil acetato e si estrae per 1 min agitando fortemente con un Vortex. Dopo centrifugazione 3 min a 12000 g la fase organica viene evaporata sottovuoto e il residuo ottenuto viene solubilizzato in 100 μL di metanolo. Il campione viene analizzato mediante RP-HPLC su una colonna C18 Zorbax, dove l'eluizione avviene tramite un gradiente complesso da 20 a 95% metanolo come descritto da Xie e collaboratori (2004). L'eluizione procede a un flusso di 1 mL min^{-1} , monitorando l'assorbanza a 280 e 520 nm.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1. Lipossigenasi in grano duro

3.1.1. Due forme di lipossigenasi sono espresse nelle diverse fasi del ciclo di crescita di cellule in sospensione liquida di grano

Per mettere a punto le condizioni per caratterizzare le diverse forme di LOX che in grano duro possono determinare una significativa riduzione del contenuto in carotenoidi si è deciso di utilizzare come sistema sperimentale una coltura cellulare in sospensione liquida della *cultivar* Ofanto, già disponibile in laboratorio, in quanto essa dovrebbe presentare livelli di attività enzimatica più bassi rispetto ad altri genotipi.

Quando De Simone e collaboratori nel 2010 hanno analizzato l'attività lipossigenasica e l'indice YPC in semi maturi di diverse *cultivar* italiane antiche e moderne, hanno infatti riscontrato in questo genotipo una bassissima attività, imputata alle proprietà della forma Lpx-B1. In un successivo lavoro (Verlotta *et al.*, 2010) lo stesso gruppo di ricerca ha caratterizzato il sistema genico della *Lpx-B1*, in cui sono state identificate 3 diverse isoforme (*Lpx-B1.1*, *Lpx-B1.2* e *Lpx-B1.3*), la prima delle quali è presente con 3 diverse forme alleliche (*Lpx-B1.a*, *Lpx-B1.b* e *Lpx-B1.c*). I vari genotipi contengono solo 2 geni *Lpx-B1* e possono quindi essere classificati in aplotipi con differenti caratteristiche di attività lipossigenasica. L'aplotipo III, quello a cui appartiene Ofanto, presenta nei semi maturi elevati livelli di espressione della *Lpx-B1.1c*, un gene parzialmente deleta e codificante per una proteina non funzionale, e bassa espressione del gene *Lpx-B1.2* (Figura 82). Questa combinazione determina un basso livello di attività lipossigenasica, a cui corrisponde un'altrettanto basso *bleaching* del β -carotene. Ofanto poteva essere quindi un sistema semplificato per la caratterizzazione enzimatica delle lipossigenasi in quanto possiede solamente una isoforma funzionale delle Lpx-1. Inoltre metodi in grado di rilevare adeguatamente i livelli di attività specifica presenti in queste condizioni avrebbero poi dovuto a maggior ragione risultare adeguati se applicati a genotipi con livelli di attività specifica più elevati.

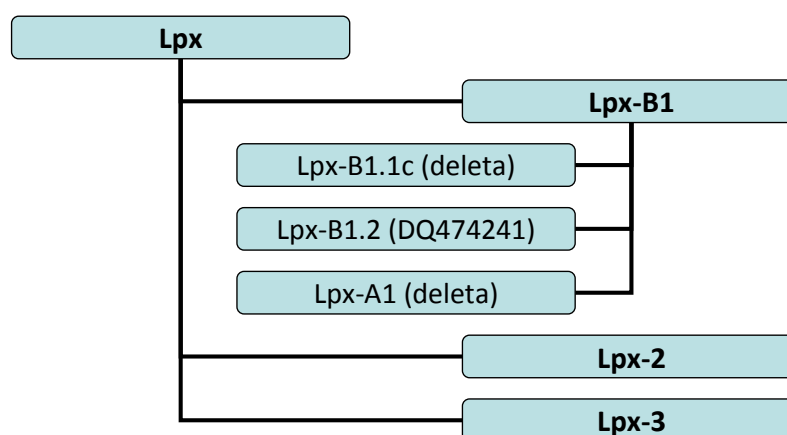
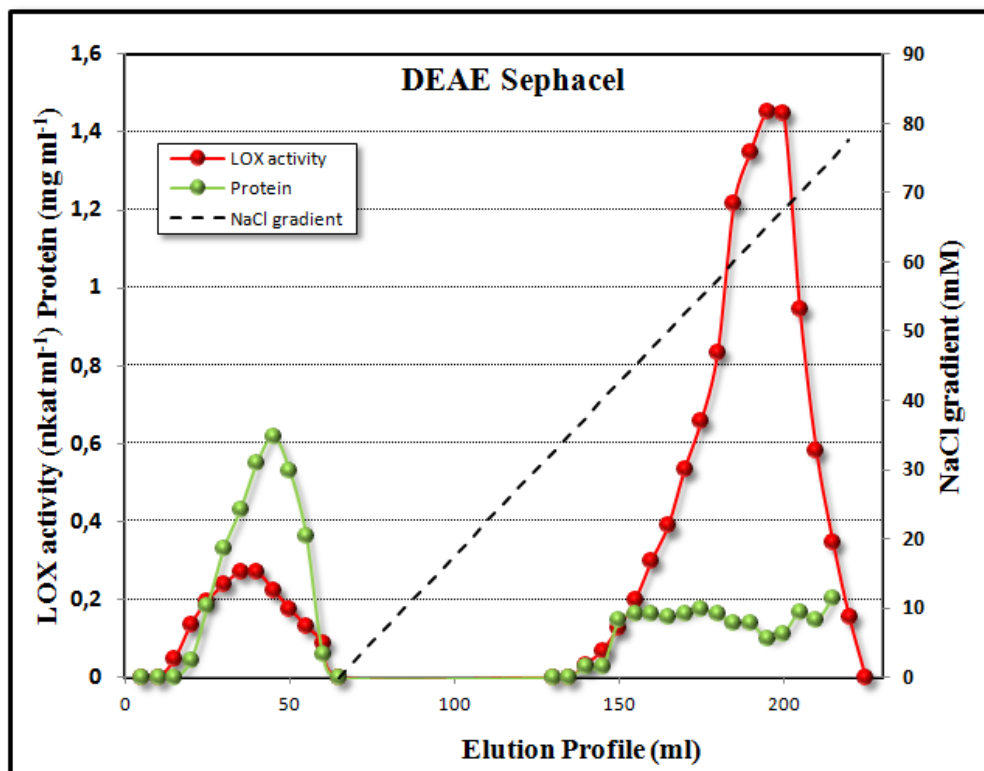


Figura 82. Schema dei geni LOX presenti nella varietà Ofanto di grano duro.

Prove preliminari su estratti di semi maturi hanno però evidenziato valori di attività lipossigenasica quasi indistinguibili dal *bianco* (ossidazione in assenza dell'enzima), tali da rendere poco plausibile una adeguata caratterizzazione biochimica, soprattutto nel caso in cui l'enzima avesse mostrato una non perfetta stabilità nel tempo. Di qui la scelta della coltura in

sospensione, in grado di fornire elevate quantità di cellule, con un livello di attività specifica nettamente superiore.

Il frazionamento di estratti grezzi preparati da cellule raccolte in fase esponenziale di crescita per cromatografia a scambio anionico su una colonna di DEAE-Sephacel (Figura 83) ha permesso di separare due picchi di attività enzimatica. Circa il 20% dell'attività lipossigenasica risulta presente nelle frazioni non trattenute dalla resina (isoforma-1), mentre il restante 80% (isoforma-2) viene eluito a una forza ionica corrispondente a circa 60 mM NaCl.



Dal momento che il rapporto quantitativo tra queste due attività mostrava una certa variabilità tra i diversi esperimenti, il protocollo di separazione è stato applicato su cellule raccolte in momenti diversi lungo il ciclo di crescita della coltura. Dal recupero di attività trattenuta o meno dalla resina, rapportato alla quantità di proteine caricate su colonna, si è calcolato il corrispondente valore di attività specifica (Figura 84). Come si può osservare dal grafico, le due putative forme isoenzimatiche sembrano essere espresse in maniera differenziale nelle diverse fasi di crescita: l'isoforma-1 rimane a lungo a livelli basali per poi aumentare in precoce fase stazionaria; l'isoforma-2, al contrario, aumenta con la ripresa della proliferazione cellulare per poi raggiungere un *plateau* in tarda fase esponenziale, circa 9 giorni dopo il reinocolo.

Poiché tali risultati, pur indicando un diverso *pattern* di espressione per le due forme di LOX separabili per cromatografia a scambio anionico, non fornivano alcuna indicazione sulla loro identità, parallelamente alla rilevazione dell'attività enzimatica è stato effettuato un esperimento per la determinazione semi-quantitativa dei livelli di espressione dei diversi geni *Lpx*. L'RNA totale è stato pertanto estratto da cellule raccolte subito dopo il reinocolo, in piena fase esponenziale e in precoce fase stazionaria. Dopo retrotrascrizione, il cDNA è stato amplificato utilizzando *primers* specifici descritti da Verlotta e collaboratori (2010). I risultati ottenuti sono riportati in Figura 85.

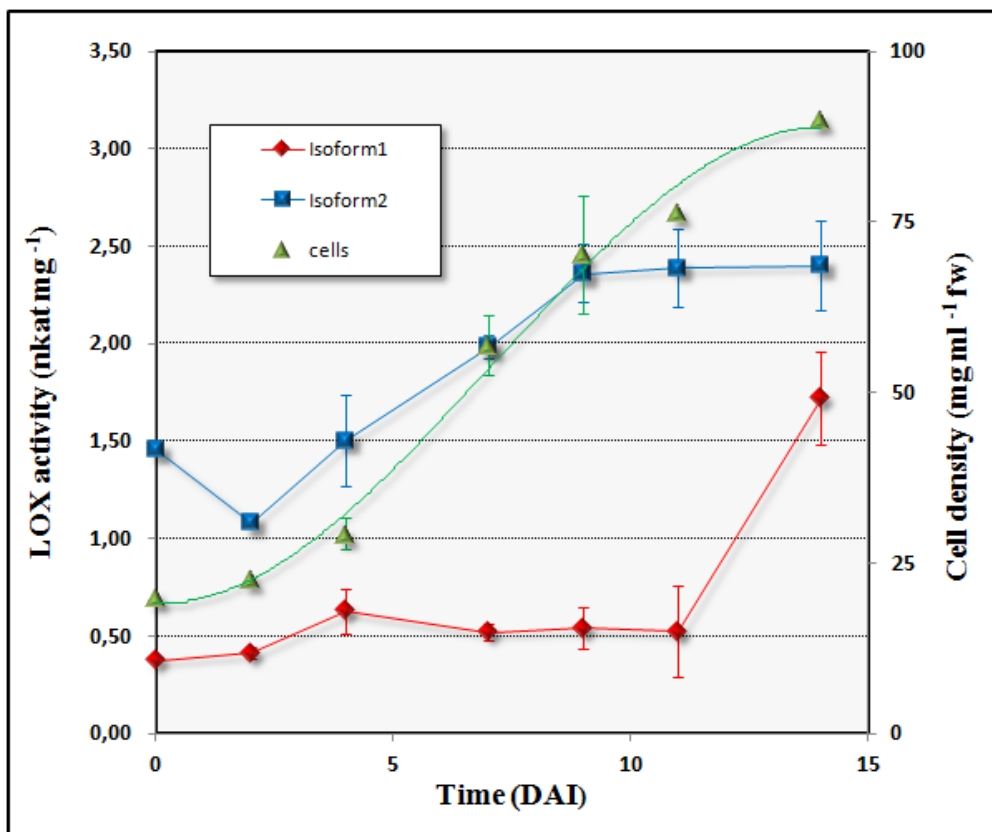


Figura 84. Livelli di attività specifica di due putative isoforme LOX durante il ciclo di crescita della coltura cellulare di Ofanto. DAI, days after the inoculum.

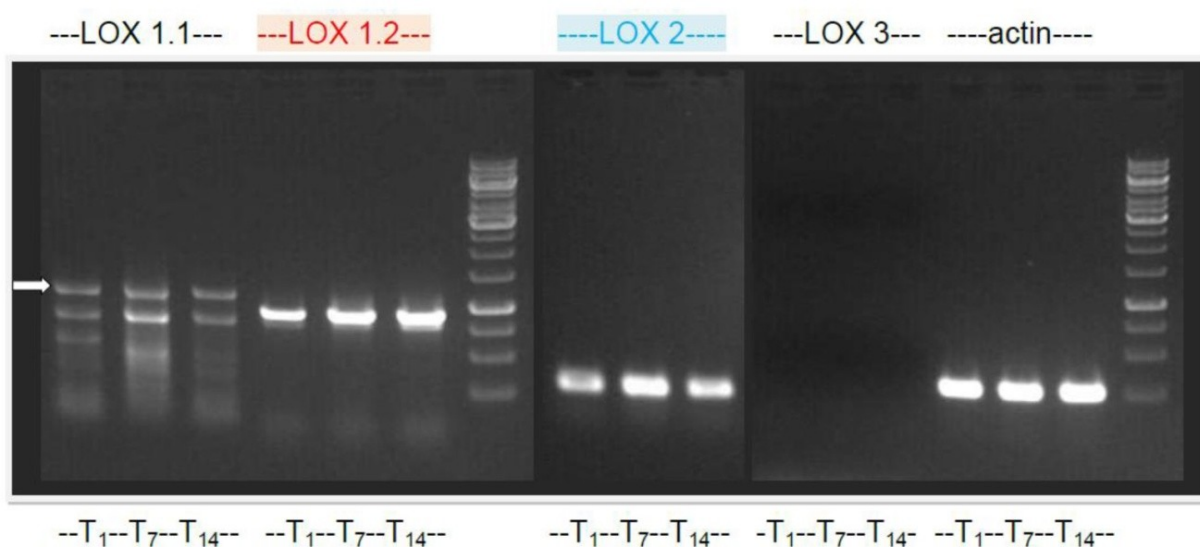


Figura 85. Analisi mediante RT-PCR semi-quantitativa dell'espressione delle diverse forme di LOX in cellule in coltura di grano duro, varietà Ofanto. L'amplificazione selettiva è stata ottenuta utilizzando *primers* specifici per le varie lipossigenasi. Per quanto riguarda i geni *Lpx-1.2* e *Lpx-2* sono state ottenute bande del peso molecolare atteso; nel caso di *Lpx-1.1* sono invece presenti anche prodotti aspecifici: il frammento di dimensioni attese è evidenziato dalla freccia bianca.

Il gene *Lpx-3* è risultato del tutto non espresso. Anche se in presenza di prodotti aspecifici, un amplificato delle dimensioni attese è stato ottenuto per *Lpx-1.1*; esso in Ofanto codifica però per una proteina tronca e non funzionale (Figura 82), per cui ad esso non può corrispondere nessuna delle due forme evidenziate negli estratti cellulari. Prodotti di amplificazione sono stati ottenuti anche per *Lpx-B1.2*, espressa a bassi livelli immediatamente dopo il reinocolo e poi a livelli sempre maggiori, e per *Lpx-2*, che ha un massimo di espressione in fase esponenziale di crescita. Il confronto tra questi dati e l'andamento dei livelli di attività

specifica lungo il ciclo di crescita della coltura ha portato pertanto a identificare l'isoforma-1 con Lpx-B1.2, e l'isoforma-2 con Lpx-2.

3.1.2. Le forme di lipossigenasi espresse nella coltura cellulare di grano duro cv Ofanto mostrano una diversa localizzazione subcellulare

Per ottenere maggiori informazioni sulla natura delle due attività così identificate, sono stati ottenuti mediante estrazione e centrifugazione differenziale dei preparati arricchiti nelle frazioni citosolica, organellare e membranaria. Ognuno di questi campioni, così come l'estratto totale, sono stati frazionati per cromatografia a scambio anionico per ottenere come descritto la separazione e la quantificazione delle due putative isoforme. L'insieme dei risultati è presentato in Figura 86.

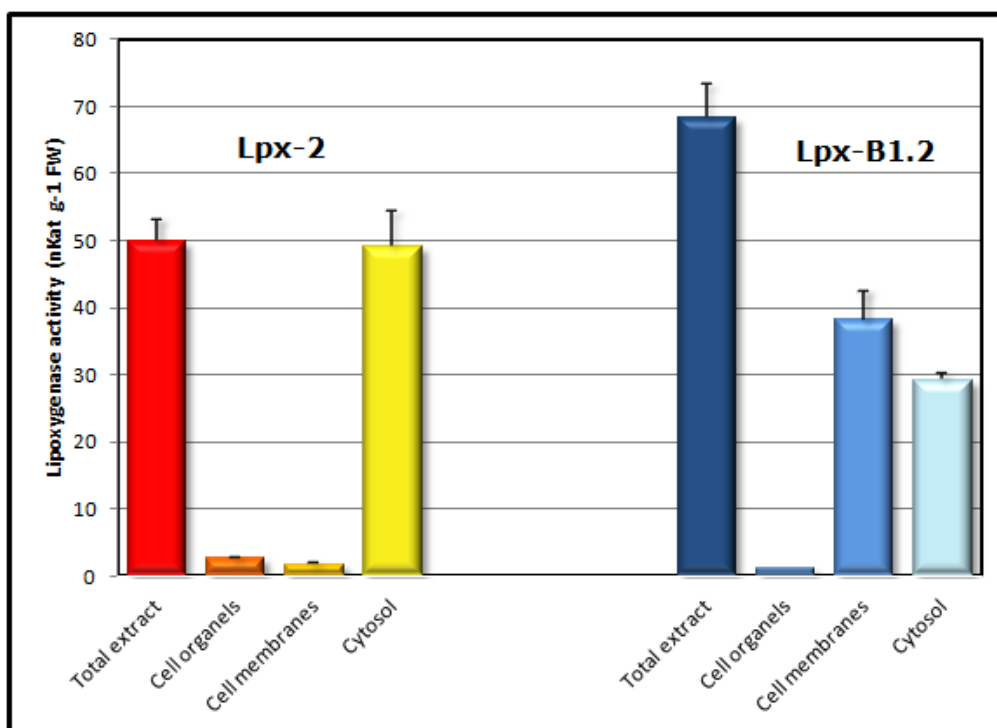


Figura 86. Localizzazione subcellulare delle isoforme Lpx-2 e Lpx-B1.2 espresse in cellule in coltura di grano duro cv. Ofanto.

Come si può in essa notare, l'isoforma-2 è stata riscontrata quasi esclusivamente nella frazione citosolica, un dato che rafforza la sua identificazione con la Lpx-2, un enzima appartenente alla categoria delle 13-LOX non cloroplastiche, coinvolte principalmente nella mobilitazione dei lipidi di riserva durante la germinazione del seme. Al contrario l'isoforma-1 è risultata presente in quantità paragonabili nella frazione microsomiale e in quella citosolica. Il dato è in parte atteso in quanto le 9-LOX come Lpx-B1.2 sono per la maggior parte classificate come enzimi citoplasmatici. Una interazione con le membrane microsomiali non è invece stata sin qui riportata in modo conclusivo. Ciò nonostante, dal momento che alcune forme di LOX-1 sono coinvolte nella risposta ipersensibile della pianta nell'ambito della quale agiscono metabolizzando gli acidi grassi delle membrane plastidiali probabilmente liberati dalle lipasi, è stata ipotizzata una loro localizzazione in connessione a tali membrane (Rusterucci *et al.*, 1999; Porta e Rocha-sosa, 2002; Figura 87). Per ottenere dati più attendibili al riguardo bisognerebbe però fare ricorso a metodi più precisi di separazione delle diverse frazioni subcellulari, ad esempio mediante centrifugazione su gradiente di saccarosio o di Percoll.

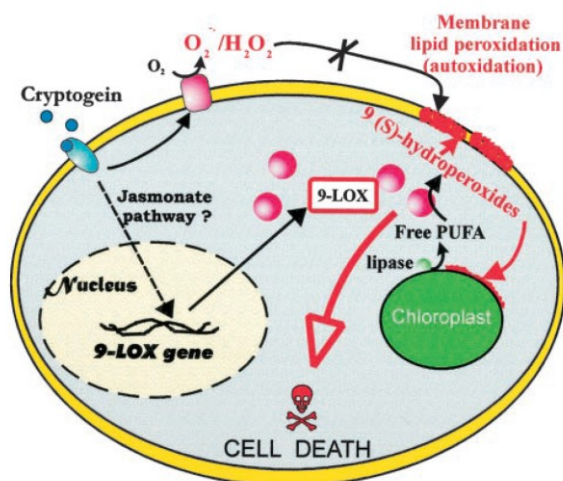


Figura 87. Schema raffigurante il ruolo della 9-LOX nella risposta ipersensibile della pianta; per alcune di esse si è ipotizzata una localizzazione funzionale a stretto contatto con le membrane plastidiali (Porta e Rocha-sosa, 2002)

3.1.3. Purificazione della Lpx-2 di grano duro

Separazione per scambio anionico

Visti i livelli di attività specifica lungo le fasi di crescita della coltura, per cercare di purificare all'omogeneità elettroforetica la forma più abbondante di LOX, si è deciso di partire da cellule raccolte 8 giorni dopo il reinocolo della coltura di Ofanto, momento in cui si ha la massima presenza della forma di interesse. Dopo alcune prove preliminari per identificare la concentrazione di detergente in grado di determinare il massimo recupero senza interferire con il saggio di attività enzimatica, si è effettuata una estrazione preparativa in presenza di 0.1% Triton-X100 di 20 g di materiale cellulare (peso fresco). L'estratto è stato desalato su colonna per allontanare ioni e piccole molecole che avrebbero potuto interferire con il passaggio a scambio ionico, e l'isoforma-2 è stata separata dall'isoforma-1 con le modalità già descritte in Figura 83. Il preparato ottenuto, contenente circa 2700 nkat a una attività specifica di $11.4 \text{ nkat mg}^{-1}$, è stato considerato il materiale di partenza. Nell'estratto grezzo, infatti, le prove effettuate hanno dato un valore di attività specifica di circa 0.4 nKat mg^{-1} , ma questo valore deve essere riferito alla somma delle due isoforme. Esso è inoltre palesemente inattendibile, poichè la quantità di enzima presente nel solo *pool* ricavato unendo le frazioni più attive eluite dalla colonna di DEAE Sephacel risulterebbe maggiore di tutta quella presente nell'estratto grezzo. In quest'ultimo, evidentemente, deve essere contenuto qualche componente in grado di interferire con il saggio di attività, falsandone in parte i risultati e portando a una sottostima del valore effettivo. Nel contempo si è raccolto anche il materiale non trattenuto dalla resina, che è risultato contenere l'isoforma-1 a una attività specifica di $2.01 \text{ nKat mg}^{-1}$.

Frazionamento mediante salting out con ammonio solfato

Per poter concentrare il campione ottenuto e procedere con il successivo passaggio per gel filtrazione, si è quindi proceduto a una precipitazione delle proteine con ammonio solfato. Invece di utilizzare una elevata concentrazione di sale, in grado di far uscire di soluzione tutti gli enzimi, si sono ottimizzate le condizioni per una frazionamento selettivo. Si è infatti potuto constatare che la proteina di interesse precipita a valori di forza ionica relativamente modesti. L'uso di ammonio solfato al 40% della soluzione satura ha in tal modo consentito un ulteriore arricchimento della LOX, con un incremento di quasi 3 volte della attività specifica ($30.2 \text{ nKat mg}^{-1}$). Di contro, il recupero è risultato decisamente basso per questa tecnica (70.2%). La perdita significativa di enzima è da attribuire al fatto che anche a 20000 g le proteine precipitate non sedimentano alla base delle provette, ma formano un menisco sulla

superficie del liquido, probabilmente per la presenza nel *pool* di qualche sostanza che lo rende particolarmente denso. Nonostante diversi tentativi effettuati, non si è riusciti a ottimizzare ulteriormente tale recupero.

Frazionamento per gel filtrazione

Le proteine recuperate sono state risospese in un piccolo volume di tampone contenente una relativamente elevata concentrazione di NaCl (200 mM) per minimizzare le interazioni aspecifiche proteina-proteina durante il successivo passaggio, e il campione è stato caricato su una colonna per gel filtrazione di Sephacryl S200; la scelta è caduta su questa resina perchè ha un limite di esclusione di 250 kDa, ovvero fraziona le proteine con una massa molecolare relativa compresa tra 20 e 200 kDa. Dal momento che la LOX ha una massa relativa attesa di circa 90 kDa, essa avrebbe dovuto eluire al centro del cromatogramma, dove massimo è il potere di risoluzione. Il profilo di eluizione ottenuto è riportato in Figura 88.

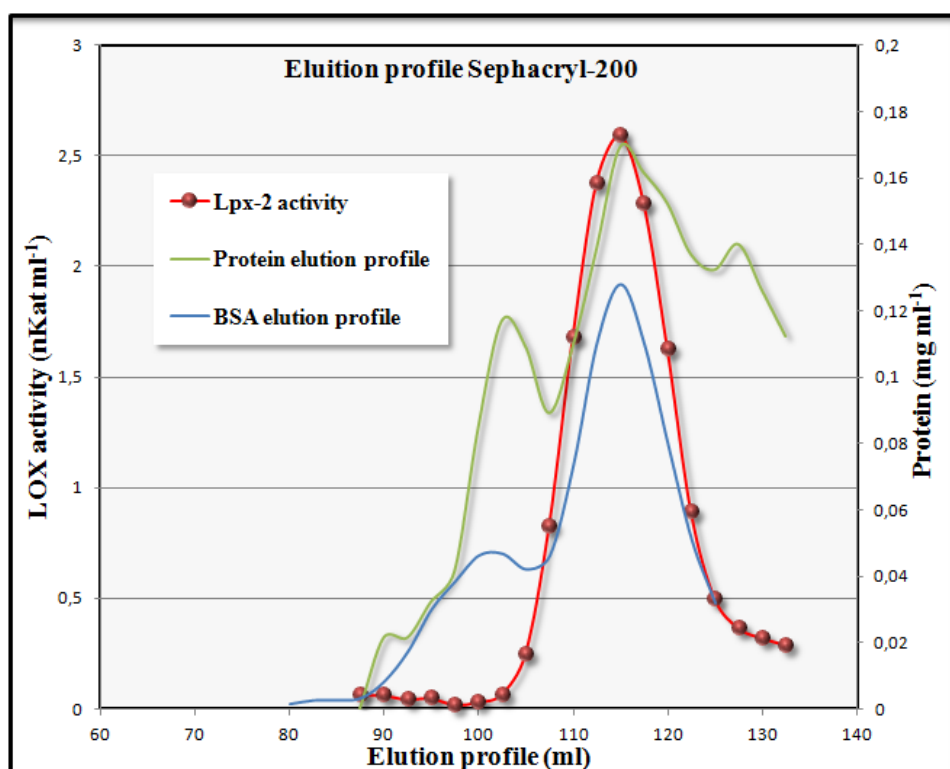


Figura 88. Profilo di eluizione dell'isoforma Lpx-2 in cromatografico per gelfiltrazione su una colonna di resina Sephacryl S200. Viene riportato anche il contenuto proteico delle frazioni raccolte, e il profilo di eluizione della albumina di siero bovina, una proteina con massa molecolare relativa di 67 kDa.

Come si può osservare, il picco di attività della Lpx-2 eluisce effettivamente al centro delle frazioni contenenti una significativa concentrazione di proteine. La gel filtrazione in condizioni native, oltre a consentire un arricchimento della proteina di interesse, permette anche in genere una stima della sua massa molecolare relativa. Il volume di ritenzione della LOX è stato pertanto paragonato a quello di marcatori di peso molecolare noto. In modo inaspettato, il profilo di eluizione è risultato quasi perfettamente sovrapponibile a quello della BSA, implicando un peso molecolare simile (67 kDa). Un comportamento analogo è stato riportato in orzo, in cui le LOX parzialmente purificate su colonna Superose-12 HR 10/30 presentavano un profilo di eluizione compatibile con un peso molecolare di 65 kDa, anche se poi la proteina purificata, analizzata mediante SDS-PAGE, è risultata possedere una massa molecolare relativa di circa 92 kDa. Tale deviazione potrebbe essere dovuta a interazioni

aspecifiche tra la proteina e la fase stazionaria (Doderer *et al.*, 1992). Bisogna però tenere conto che la velocità di eluizione in gel filtrazione è proporzionale non tanto al peso molecolare, quanto al raggio di Stokes, ovvero al discostamento più o meno marcato della forma della proteina dalla sfericità (Erickson, 2009). L'anomalo comportamento in gel filtrazione potrebbe dunque essere anche dovuto a una forma asimmetrica della proteina.

Indipendentemente dalla stima del peso molecolare relativo, unendo le frazioni con maggiore attività si è ottenuto un *pool* con una attività specifica pari a 117.5 nKat mg⁻¹, con un ulteriore arricchimento di circa 4 volte e un recupero pressochè integrale dell'attività caricata su colonna.

Cromatografia negativa su colonna di resina HiTrap Blue HP

Il preparato ottenuto è stato quindi desalato su colonna e fatto passare attraverso un letto di resina HiTrap Blue HP, una matrice cui a un supporto inerte di sefariosio è legato un colorante, il Cibacron Blue F3G-A. Questa resina viene solitamente usata per la rimozione dell'albumina dal sangue, ma può essere impiegata anche per legare enzimi che utilizzano il NAD(P)(H) come cofattore, dal momento che la forma del colorante sembra *mimare* quella del dinucleotide. Non è questo il caso della LOX, ma a uno stadio avanzato nella purificazione di una proteina si può prevedere un passaggio, detto di cromatografia negativa, in cui ci si aspetta che l'enzima di interesse non si leghi. Si possono però legare altri contaminanti, conseguendo comunque un ulteriore arricchimento del preparato, con un recupero pressochè integrale e una bassissima diluizione del campione frazionato. Così è stato in effetti, visto la frazione non trattenuta è risultata contenere più del 99% dell'enzima caricato, a una attività specifica di 177 nKat mg⁻¹, con un arricchimento di 1.5 volte.

Cromatografia per adsorbimento su colonna di idrossiapatite

Il campione ottenuto è stato addizionato con potassio fosfato 10 mM e caricato su una colonna di idrossiapatite, un fosfato di calcio cristallino. Questa può essere usata per la purificazione per affinità di enzimi che utilizzano substrati fosforilati, ma anche per una forma particolare di interazione elettrostatica, definita per adsorbimento o per *scambio ionico misto*. Si basa infatti su interazioni aspecifiche tra ioni calcio carichi positivamente e ioni fosfato carichi negativamente, entrambi presenti sulla fase stazionaria, e le cariche opposte delle proteine in soluzione: i gruppi carbossilici carichi negativamente e quelli amminici carichi positivamente a pH neutro. Se ne determina una serie di interazione di difficile predizione. L'eluizione delle proteine trattenute è in genere ottenuta facendo passare concentrazioni crescenti di un fosfato.

Con un gradiente da 10 a 200 mM di potassio fosfato in questo caso si è ottenuto il profilo di eluizione riportato in Figura 89, in cui si osserva un picco di attività enzimatica in corrispondenza di una concentrazione pari a 40 mM KPi. Unendo le frazioni più attive, si è ottenuto un preparato con una attività specifica pari a 430 nKat mg⁻¹, con un arricchimento di 2.4 volte e un recupero di poco superiore al 42%.

Frazionamento per cromatografia liquida ad alta pressione su colonna MonoQ

Complessivamente, si è ottenuto in tal modo una purificazione dell'enzima di interesse di più di 40 volte, permettendo l'esecuzione di un passaggio finale per FPLC. Il campione è stato concentrato 30 volte per centrifugazione in un filtro con *cut-off* di 30 kDa, ottenendo un preparato che è stato diluito in tampone Tris, consentendo di far scendere la concentrazione del fosfato al di sotto di 2 mM. Senza questo passaggio, l'elevata forza ionica avrebbe interferito con la resina a scambio anionico. Il frazionamento finale del preparato su colonna

MonoQ ha permesso di ottenere il cromatogramma riportato in Figura 90, dove si nota come la maggior parte delle proteine contaminanti vengano risolte dall'enzima di interesse.

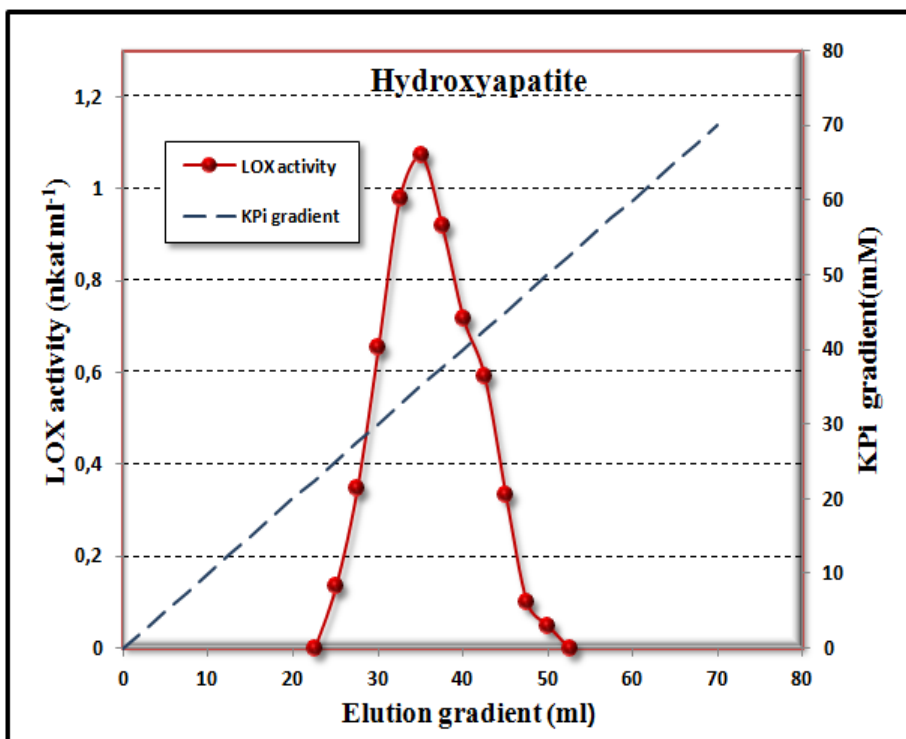


Figura 89. Profilo di eluizione dell'attività lipossigenasica frazionata per cromatografia ad adsorbimento su colonna di idrossiapatite.

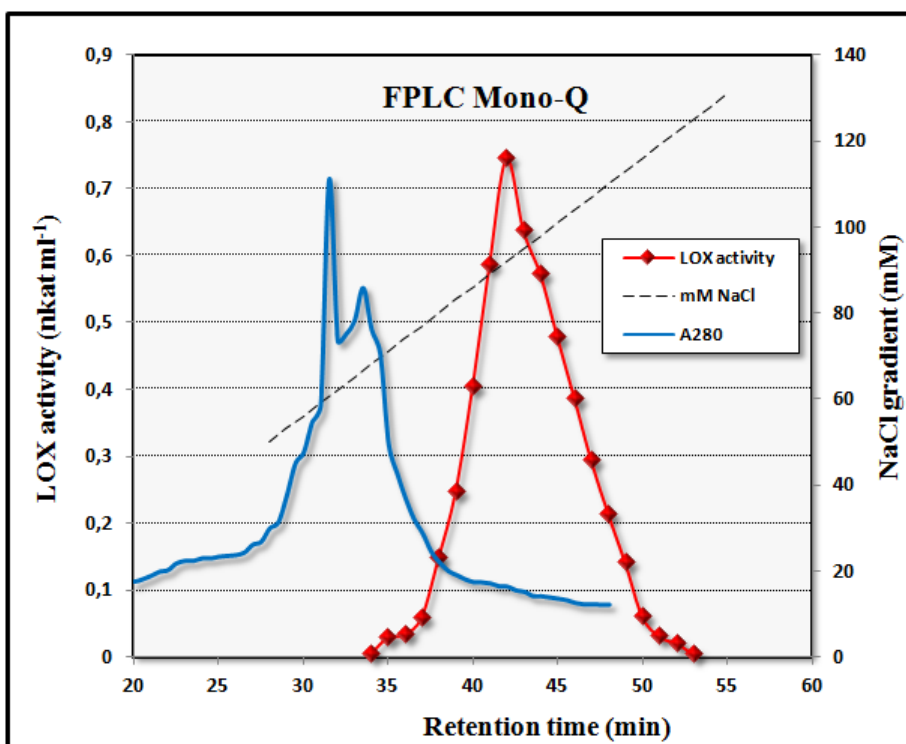


Figura 90. Profilo di eluizione dell'attività lipossigenasica nel passaggio finale del protocollo di purificazione, mediante FPLC su colonna MonoQ.

L'analisi del preparato ottenuto unendo le frazioni più attive ha mostrato un'attività specifica di 2504 nKat mg⁻¹, con un recupero del 70.4% rispetto al *pool* ottenuto nel passaggio precedente. L'applicazione delle cinque tecniche cromatografiche descritte ha permesso di conseguire nell'insieme un arricchimento della Lpx-2 superiore a 250 volte rispetto al preparato ottenuto dopo separazione dall'isoforma-1, e di più di 6000 volte se si

tenesse conto dell'attività specifica riscontrabile nell'estratto grezzo, con un recupero di circa un sesto dell'attività di partenza (Tabella 1).

Purification Step	nKat mg⁻¹	Purification (fold)	Yield
Crude Extract	0.4		
DEAE-Sephacel	11.4	28.5	100
A.S. fractionation	30.2	75.5	70.2
Sephacryl S-200	117.5	293.7	69.8
Reactive Blue Sepharose	177.1	442.6	69.5
Hydroxyapatite	429	1072.5	29.6
Mono-Q	2504	6260	17.6

Tabella 1. Resa e efficacia dei diversi passaggi nel protocollo di purificazione della Lpx-2.

Analisi elettroforetica del preparato finale

Il preparato ottenuto è stato concentrato 10 volte per ultrafiltrazione, e analizzato mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti. In corsie parallele sono stati fatti correre marcatori di peso molecolare noto. Viste le basse concentrazioni di proteine, la corsa è stata visualizzata mediante colorazione con nitrato d'argento sopra una prima colorazione con Coomassie Blue R250. Il risultato viene presentato in Figura 91.

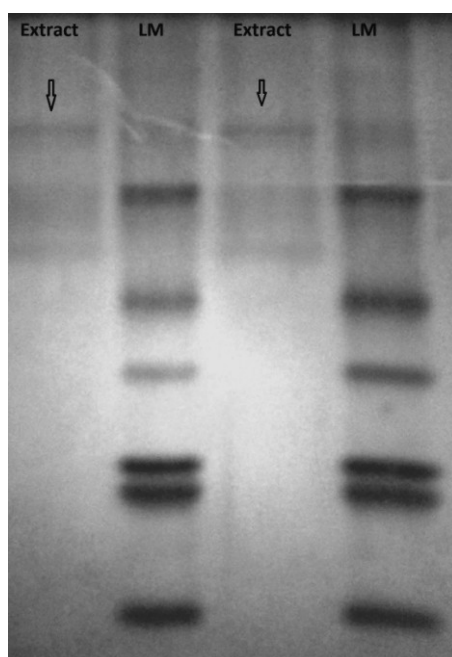


Figura 91. Analisi elettroforetica su gel di poliacrilammide al 10% dell'estratto purificato contenente la Lpx-2. La freccia indica la banda di peso molecolare atteso per la proteina di interesse.

Come si può vedere, il preparato non risulta omogeneo all'analisi elettroforetica. Ciò nonostante, una banda più netta presente nella parte alta del gel, che all'analisi densitometrica corrisponde a circa il 40% delle proteine totali, presenta una posizione compatibile con una massa molecolare relativa di circa 90 kDa, esattamente quella deducibile dalla sequenza della proteina di interesse. La presenza residua di bande contaminanti a peso molecolare più basso ha impedito di poter utilizzare il preparato per l'induzione di anticorpi policlonali in topo. Il livello di purificazione è sembrato però adeguato per una caratterizzazione delle proprietà biochimiche dell'enzima. Considerando che la proteina di interesse rappresenta solo il 40% delle proteine presenti, l'attività specifica della proteina pura va corretta in circa 6260 nkat mg⁻¹.

3.1.4. Caratterizzazione della Lpx-2 di Ofanto

Determinazione dell'optimum di pH

Il valore di pH ottimale per l'attività lipossigenasica e per quella di *bleaching* dei carotenoidi da parte dell'enzima purificato è stato determinato in tampone Tris HCl per valori di pH compresi tra 7 e 9, e tampone MES per quelli acidi. Tra pH 6.75 e 7.50 sono state eseguite prove con entrambi i sistemi tampone, per escludere che vi potesse essere un effetto legato non al pH ma alle specie tamponanti, alla fine di ogni saggio il pH effettivo è stato misurato mediante l'ausilio di un pHmetro. La reazione è stata fatta avvenire in presenza di una concentrazione non saturante di 500 μ M acido linoleico, mentre β -carotene e luteina per quanto riguarda la reazione di co-ossidazione sono stati aggiunti alla concentrazione iniziale di 8 μ M. I dati ottenuti sono riassunti in Figura 92.

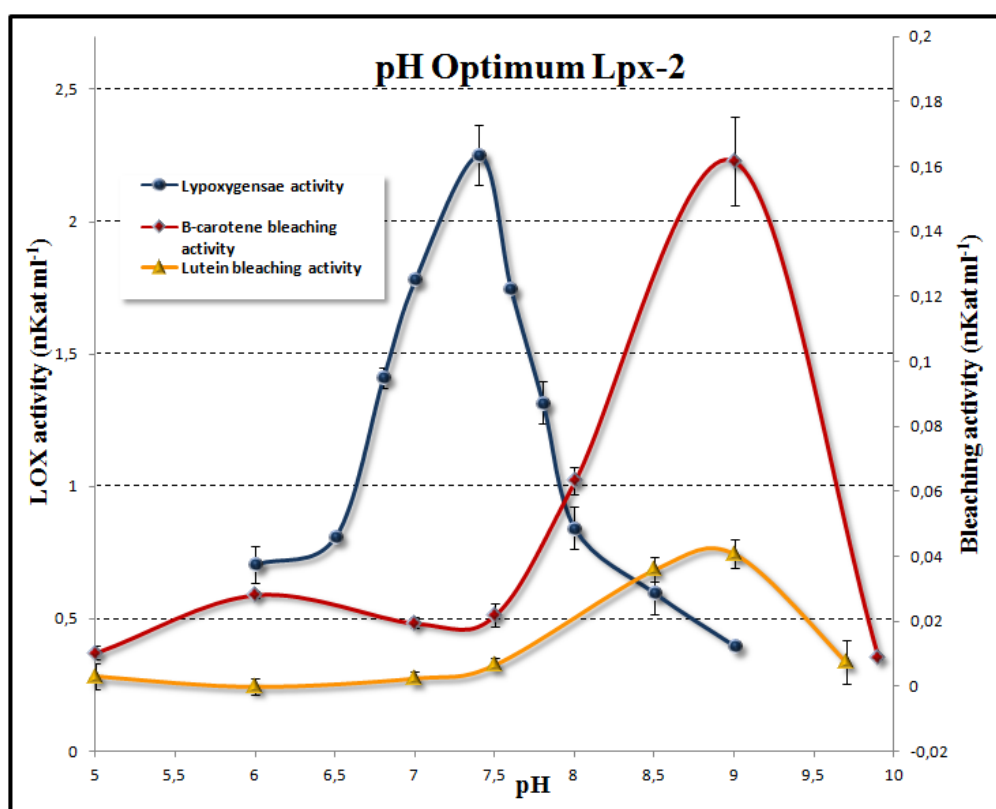


Figura 92. Relazione tra pH e attività della Lpx-2 determinata sia per la reazione lipossigenasica (linea blu), sia per il *bleaching* del β -carotene (linea rossa) e della luteina (linea gialla).

Il valore ottimale di pH per la reazione lipossigenasica primaria, saggiata con il metodo FOX, è risultato pari a 7.5. Al contrario, la reazione di degradazione dei carotenoidi mostra un ottimo a un pH più basico, intorno a 9. È importante sottolineare che le due attività sono riportate su scala differente. Il rapporto stechiometrico tra le reazioni è infatti molto basso: la reazione secondaria rispetto alla generazione primaria di idroperossidi del linoleato si attesta intorno al 5% per il β -carotene, e a un valore ancora più basso se riferito alla xantofilla. I dati indicano dunque una bassa efficienza di degradazione dei carotenoidi da parte degli idroperossidi prodotti da questa isoforma enzimatica. In letteratura vi sono esempi di lipossigenasi con una ridotta capacità di causare il *bleaching* dei carotenoidi, come a esempio la LOX1 di soia e la LOX2 di pisello che presentano un rapporto stechiometrico tra la reazione lipossigenasica primaria e quella del catabolismo del β -carotene inferiore al 15% anche in condizioni ottimali (Wu *et al.*, 1999). Per quanto riguarda il grano duro, negli esperimenti effettuati da Verlotta e collaboratori (2010) su estratti grezzi ottenuti da semi maturi, il rapporto tra le due attività non è mai risultato superiore al 4% .

Determinazione dei parametri cinetici della Lpx-2

La determinazione dell'affinità della lipossigenasi per l'acido linoleico è stata valutata con il metodo FOX variando la concentrazione del linoleato tra 0 e 700 μM . Con i dati ottenuti è stata ricavata la curva di Michaelis-Menten, da cui sono stati determinati i parametri cinetici V_{max} e K_{M} . La reazione è stata effettuata a pH 7.5, valore in cui la Lpx-2 utilizza il substrato in maniera più efficiente. I dati ottenuti sono riportati in Figura 93. Prove effettuate con l'acido linolenico come substrato alternativo, in accordo con i dati di letteratura (Fuller *et al.*, 2001; Feussner e Wasternack, 2002), hanno mostrato una attività molto più bassa (risultati non presentati), indicando che il linoleico è con tutta probabilità il substrato fisiologico.

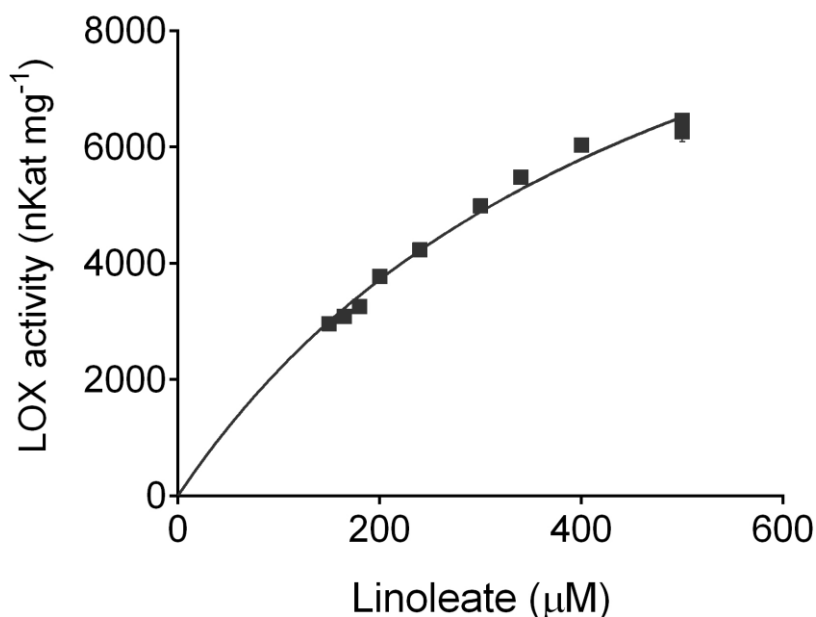


Figura 93. Grafico dei doppi reciproci per il calcolo di affinità per il substrato e velocità massima di catalisi dell'isoforma Lpx-2 di Ofanto.

Dai dati ottenuti è stato possibile calcolare una V_{max} pari a $13088 \pm 727 \text{ nKat mg}^{-1}$ e una K_{M} per il linoleato di $504 \pm 47 \mu\text{M}$. Considerando un massa molecolare dedotta di 92 kDa, la V_{max} corrisponde a una costante catalitica (ovvero il numero di eventi catalizzati al secondo in presenza di concentrazioni saturanti di substrato) di 1204 eventi catalitici s^{-1} .

Determinazione della stabilità della LOX-2 e della sua energia di attivazione

La stabilità della proteina purificata è stata valutata conservando il preparato a 4°C e prelevando ogni 12 o 24 ore un'aliquota su cui è stata misurata l'attività dell'enzima. I risultati (Figura 94) sono stati espressi come percentuale del valore al tempo 0 in funzione del logaritmo del tempo, e hanno permesso di calcolare emivita di 77.5 ± 1.8 ore. Si tratta di un valore decisamente basso; per fare un paragone, la P5C reduttasi di *Arabidopsis thaliana* non ha mostrato una perdita di attività quantificabile dopo un mese di conservazione nelle stesse condizioni (Giberti *et al.*, 2014). Rimanendo comunque attivo l'enzima per qualche giorno, si è potuto ad ogni modo effettuare una sua accurata caratterizzazione.

Per quanto il rapporto tra temperatura e attività catalitica, la perossidazione del linoleato è stata misurata in un ambito di temperature comprese tra 20 e 55°C; l'efficienza massima è stata riscontrata a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ (Figura 95), evidenziando anche in questo caso una notevole labilità termica. La rielaborazione dei dati nel grafico di Arrhenius ha consentito il calcolo della energia di attivazione, che è risultata pari a $41 \pm 3 \text{ KJ mol}^{-1}$.

Il quadro di insieme delle proprietà della Lpx-2 è stato riassunto nella Tabella 2.

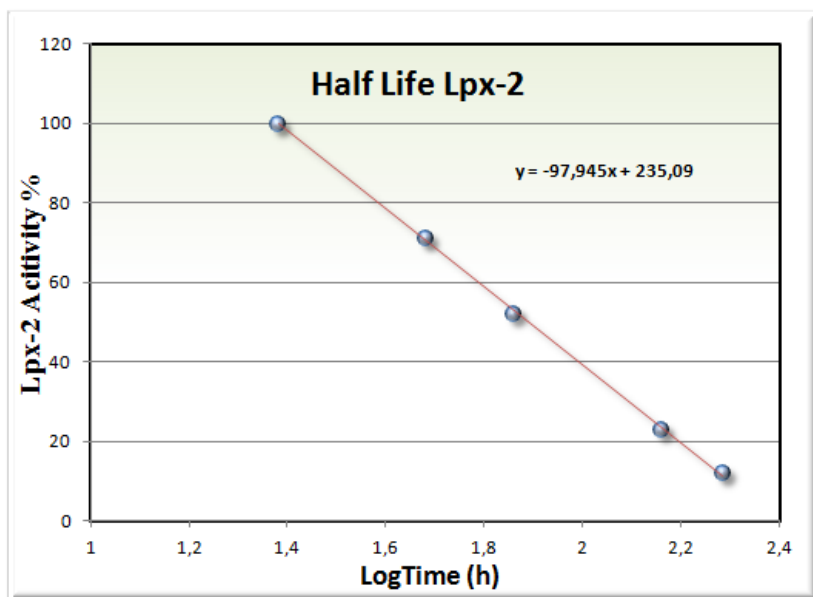


Figura 94. Grafico di decadimento nel tempo dell'attività della Lpx-2, da cui è stata calcolata la sua emivita.

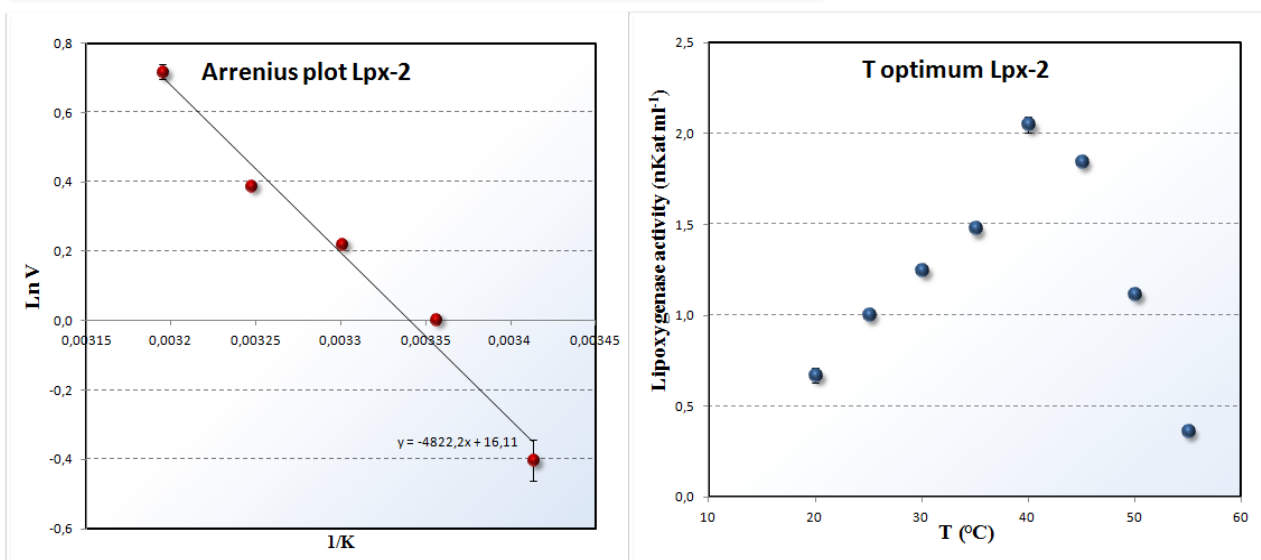


Figura 95. Relazione tra temperatura e attività enzimatica (a destra) e *Arrenius plot* per il calcolo dell'energia di attivazione (a sinistra) della reazione catalizzata dalla Lpx-2.

Property	Lpx-2
Km (linoleic acid)	504 ± 47 μM
Vmax(linoleic acid)	13088 ± 727 nKat mg ⁻¹
T optimum	40 ± 2 °C
pH optimum	7.5
Half life	77.5 ± 1.8 ore

Tabella 2. Tabella riassuntiva delle proprietà della Lpx-2.

3.1.5. Espressione del gene *Lpx-2* e conseguenti livelli di attività specifica in risposta al trattamento delle cellule con sostanze ad azione ormonale

Per ottenere maggiori informazioni sul ruolo fisiologico della *Lpx-2* in grano duro e verificare se la sua espressione sia regolata da uno o più degli ormoni che la pianta utilizza per coordinare la risposta agli stimoli ambientali, la coltura in sospensione liquida della cv. Ofanto è stata risospesa in terreno senza auxina e trattata con tali composti. A 0, 24 e 48 ore dal trattamento le colture parallele sono state estratte e, previo frazionamento per cromatografia a scambio anionico in modo da separare le due diverse forme isoenzimatiche, l'attività specifica della *Lpx-2* è stata determinata in triplicato. I risultati ottenuti vengono riportati in Figura 96.

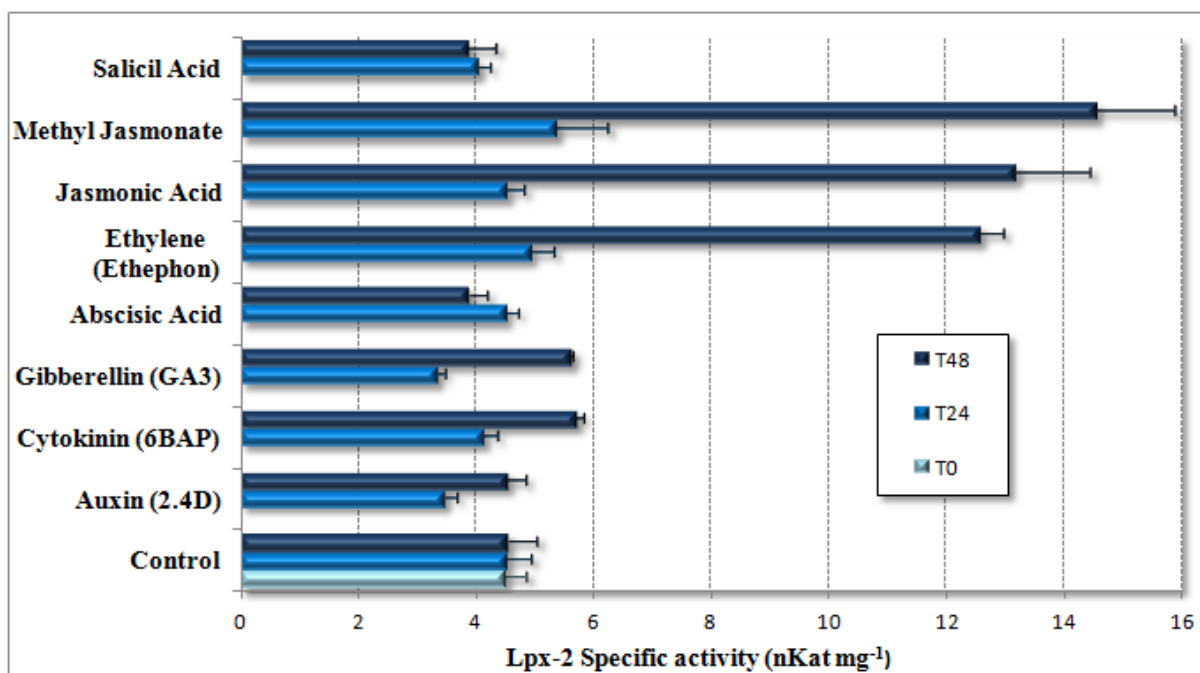


Figura 96. Attività specifica della *Lpx-2* a tempi crescenti dopo il trattamento della coltura cellulare con sostanze a attività ormonale.

Dopo 24 ore dal trattamento, in nessun caso si nota una stimolazione significativa dei livelli dell'enzima, anche se un aumento medio è visibile nel caso del metil giasmonato. Al contrario, il trattamento con auxina e acido gibberellico determina una diminuzione, statisticamente significativa ancorchè di modesta entità, rispetto al controllo in assenza di ormoni. Un quadro completamente differente è invece evidente dopo altre 24 ore, con un fortissimo aumento dell'attività specifica nelle cellule trattate con etilene, acido giasmonico e metil giasmonato. Anche se di entità nettamente minore, un aumento significativo viene riscontrato anche in risposta a citochinine e gibberelline.

Per ottenere una ulteriore conferma e aumentare l'attendibilità dei risultati, nelle stesse colture sono stati valutati anche i livelli di espressione del corrispondente gene mediante estrazione dell'RNA, retrotrascrizione e PCR semi-quantitativa utilizzando dei *primers* specifici per la forma isoenzimatica di interesse. I risultati, riportati in Figura 97, confermano sostanzialmente i dati enzimologici, evidenziando a 24 ore dal trattamento una quantità di amplificato significativamente maggiore nei campioni trattati con (in ordine quantitativo decrescente) metil giasmonato, acido giasmonico ed etilene. Si nota un aumento del trascritto della *Lpx-2* anche nelle cellule trattate con una citochinina sintetica (6BAP).

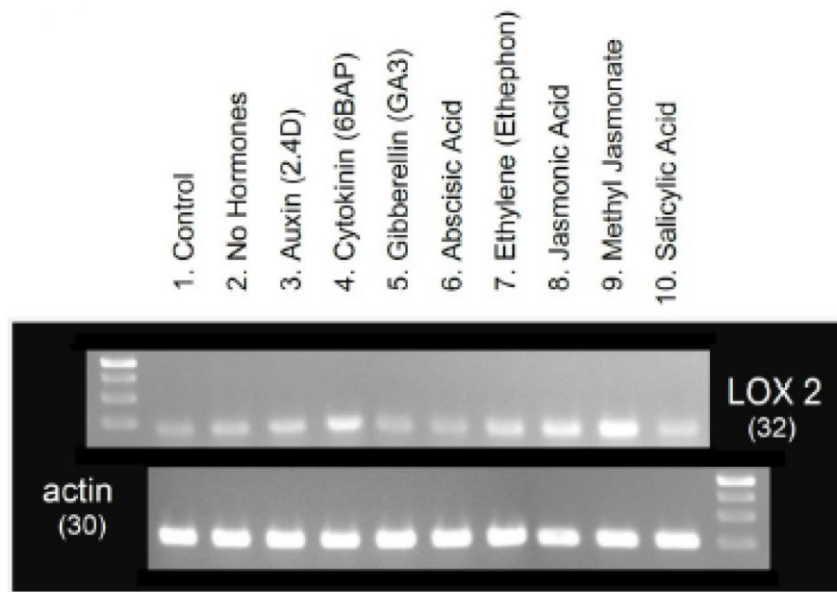


Figura 97. Analisi dell'espressione del gene *Lpx-2* di grano duro in risposta al trattamento con sostanze a attività ormonale, stimato mediante PCR semi-quantitativa dopo retrotrascrizione dell'mRNA isolato dalle colture 24 ore dopo i diversi trattamenti. Tra parentesi sono indicati i cicli di amplificazione usati per massimizzare le differenze tra i diversi cDNA.

Al contrario, in alcuni casi è stata dimostrata un *down regulation* da parte delle citochinine nei confronti delle lipossigenasi (Gomez-Lobato *et al.*, 2012), dato che questi ormoni tendono a prevenire il processo di senescenza in cui alcune isoforme di LOX hanno un ruolo fondamentale. L'induzione dei trascritti di alcune forme di lipossigenasi è stata d'altra parte osservata in numerose specie vegetali in risposta allo stress meccanico. La funzione di questi enzimi in tali circostanze sembra essere legata alla produzione di numerosi composti derivanti dagli idroperossidi, capaci di alleviare gli effetti del danno. L'acido giasmonico è una delle più importanti molecole segnale prodotte in risposta alle ferite di natura meccanica (Creelman e Mullet, 1997; Glauser *et al.*, 2008) e a vari tipi di stress biotici (insetti e funghi) (Browse, 2009). Le lipossigenasi sono inoltre coinvolte nella sintesi di questo fitormone, che avviene proprio a partire dall'acido linoleico (Shaller *et al.*, 2005). In molti casi i geni *LOX* indotti da stress meccanico sono anche risultati regolati positivamente dal trattamento con JA esogeno (Porta *et al.*, 1999), così come da quello con MeJA e dall'attacco da parte di erbivori (Chung *et al.*, 2008). In cetriolo, ad esempio, 10 geni codificanti per lipossigenasi sono indotti sia dal trattamento meccanico che dal MeJA (Yang *et al.*, 2012); 8 tra questi 10 rispondono positivamente anche alla somministrazione esogena di etilene. Per quanto riguarda il coinvolgimento di quest'ultima molecola, un ormone che gioca un ruolo fondamentale nella maturazione dei frutti, è stato dimostrato che alcuni idroperossidi derivanti dall'attività lipossigenasica sono coinvolti nella sua produzione (Sheng *et al.*, 2000). Dai dati ottenuti si può quindi ipotizzare che la *Lpx-2* di grano, analogamente a quanto osservato in cetriolo, sia coinvolta nella sintesi di composti necessari per porre rimedio ai danni determinati da lacerazioni meccaniche, ma anche nella produzione di etilene attraverso un ciclo a *feedback*, interrompendo la dormienza dei semi e dando inizio alla germinazione.

In letteratura è noto d'altra parte che la somministrazione di ABA, una molecola chiave nella risposta della pianta a condizioni ambientali sfavorevoli come gli stress osmotico, salino o da esposizione a basse temperature (Tuteja, 2007), porta all'incremento della trascrizione di specifici geni *LOX*; se tale induzione risulta molto veloce (poche ore) in condizioni di stress salino (NaCl e KCl) in risposta al freddo, il tempo di risposta al trattamento con l'ormone

esogeno è invece più lungo (24 h) (Yang *et al.*, 2012). Dai dati ottenuti nel presente lavoro, però, si deduce che la Lpx-2 non risulta stimolata dal trattamento con tale ormone nemmeno a tempi più lunghi (48 h). Il quadro ottenuto induce a ipotizzare un ruolo per questa forma isoenzimatica nell'ambito della risposta all'attacco patogeno e allo stress meccanico. Anche questo elemento sembra dunque confermare la possibilità di una classificazione della Lpx-2 come una 13-LOX citoplasmatica coinvolta sia nella mobilitazione dei lipidi di riserva nelle prime fasi della germinazione dei semi, ma anche nella risposta della pianta a queste tipologie di condizioni avverse. Una LOX *type I* capace di indurre il processo di germinazione del seme è stato recentemente descritta in riso (Huang *et al.*, 2014), mentre lipossigenasi coinvolte nella risposta a stress biotico stimolate dal trattamento con trealosio sono state osservate in grano tenero (*Triticum aestivum*, Tayeh *et al.*, 2014).

3.1.6. Caratterizzazione della Lpx-B1.2 di Ofanto

Nel caso dell'isoforma-1, identificata come Lpx-B1.2, alcuni tentativi di messa a punto di un protocollo di purificazione analogo a quello sviluppato per l'isoforma-2 sono stati vanificati dalla estrema labilità di questo isoenzima. Anche se non è stata determinata con precisione, l'emivita di tale forma di LOX è risultata infatti decisamente breve, inferiore alle 24 ore a 4°C. Una perdita di più di metà dell'attività presente in un preparato in un solo giorno rende in pratica impossibile l'isolamento della proteina attiva, in mancanza di una procedura cromatografica per affinità che consenta il raggiungimento dell'obiettivo in un unico passaggio. Per ottenere comunque dei dati relativi alle sue proprietà catalitiche, si è deciso di procedere a una caratterizzazione biochimica del preparato ottenibile per scambio anionico degli estratti grezzi su colonna di DEAE-Sephacel, in cui semplicemente la Lpx-B1.2 viene separata dall'altra forma isoenzimatica, senza applicare ulteriori processi di purificazione.

Determinazione dell'optimum di pH

Su tali preparati, con le stesse modalità utilizzate nel caso della Lpx-2, è stata determinata la relazione tra pH e attività nei confronti del substrato primario, e del β -carotene come reazione secondaria. I dati ottenuti sono riportati in Figura 98.

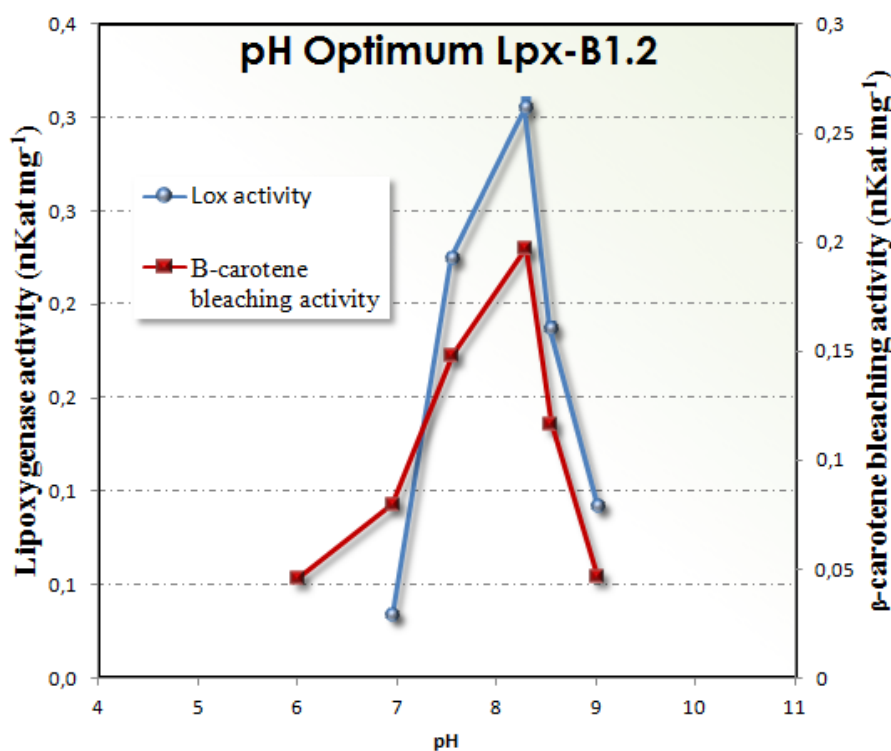


Figura 98. *Optimum* di pH della Lpx-B1.2. Sia la reazione primaria sull'acido linoleico (linea blu) che quella di *bleaching* del β -carotene (linea rossa) mostrano un valore massimo di attività a pH 8.3.

Contrariamente all'altra forma di LOX, in questo caso il pH ottimale della reazione di lipossigenazione si sovrappone a quello del *bleaching* del carotenoide. Inoltre il rapporto quantitativo tra la reazione secondaria di degradazione del β -carotene e quella primaria di produzione degli idroperossidi risulta molto più elevato, pari quasi al 40%. L'efficienza di *bleaching* dei carotenoidi da parte degli idroperossidi prodotti da questa isoforma enzimatica sembrerebbe dunque di gran lunga maggiore rispetto a quella osservata per la Lpx-2.

Determinazione dei parametri cinetici della Lpx-B1.2

Misurando l'attività dell'enzima in funzione della variazione della concentrazione del linoleato tra 0 e 500 μM è stata quindi valutata dell'affinità della lipossigenasi per il substrato. Dai dati ottenuti (Figura 99) si è calcolata una K_M per l'acido linoleico pari a $661 \pm 25 \mu\text{M}$. Non trattandosi di un enzima purificato all'omogeneità elettroforetica, non è stato invece possibile desumere la massima velocità di catalisi.

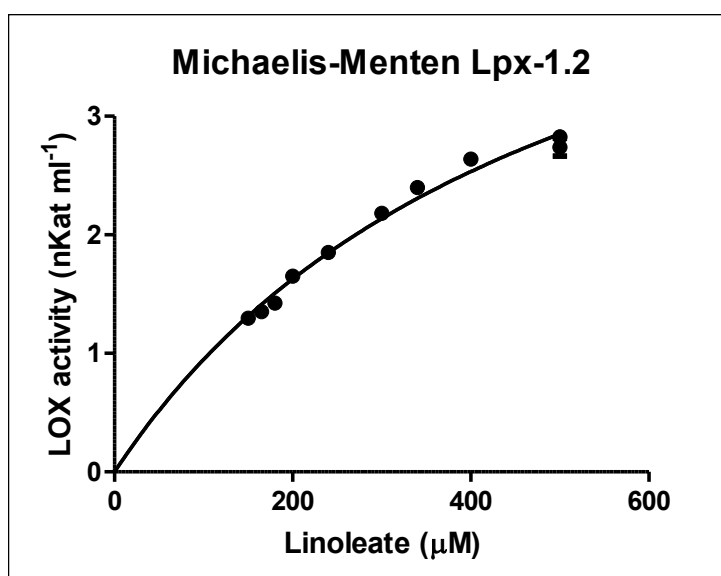


Figura 99. Grafico di Michaelis-Menten dei doppi reciproci nel caso della Lpx-B1.2.

Determinazione della stabilità termica e della energia di attivazione

Relativamente all'effetto della temperatura sull'attività enzimatica, i dati ottenuti sono stati riassunti in Figura 100.

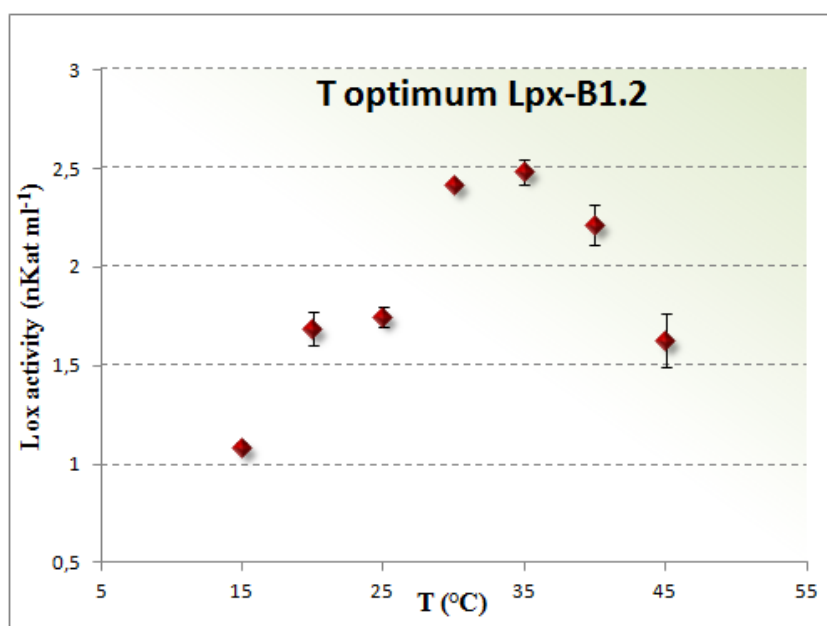


Figura 100. Relazione tra attività e temperatura nel caso della Lpx-B1.2. Come si può osservare, l'enzima mostra la massima attività a temperature comprese tra 30 e 35 $^{\circ}\text{C}$.

In accordo con la sua estrema labilità, l'enzima inizia a evidenziare le conseguenze della denaturazione termica a temperature bassissime, tra 28 e 32°C. Di conseguenza, la Lpx-B1.2 mostra la massima efficienza catalitica a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Dal punto di vista delle conseguenze nei processi di lavorazione del grano duro, tale forma di LOX presenta dunque un'attività pari a circa metà del valore massimo a temperature di 20-25°C, ottimali per il processo di pastificazione. L'energia di attivazione della reazione catalitica, calcolata tramite la formula di Arrhenius, risulta pari a $32 \pm 4 \text{ KJ mol}^{-1}$, nettamente inferiore a quella precedentemente rilevata per la Lpx-2. I valori relativi alla caratterizzazione delle proprietà funzionali della Lpx-B1.2 sono riassunti in Tabella 3.

Property	Lpx-B1.2
Km (linoleic acid)	$662 \pm 25 \mu\text{M}$
T optimum	$35 \pm 2 ^\circ\text{C}$
pH optimum	8.3

Tabella 3. Tabella riassuntiva delle proprietà della Lpx-B1.2.

3.1.7. Espressione del gene *Lpx-B1.2* e conseguenti livelli di attività specifica in risposta al trattamento delle cellule con sostanze ad azione ormonale

Per verificare se anche l'attività della Lpx-B1.2 sia modulata dagli ormoni, l'esperimento descritto per la Lpx-2 è stato eseguito anche per questa isoforma. Anche in questo caso la misurazione dell'attività specifica della Lpx-B1.2 è stata effettuata in triplicato a 24 e 48 ore dopo il trattamento, mentre la valutazione dei livelli di espressione mediante PCR semi-quantitativa si riferisce all'RNA estratto dopo 24 ore. I risultati sono presentati in Figura 101.

Analogamente con quanto visto per la Lpx-2, anche questa isoforma viene stimolata dal trattamento con acido jasmonico e con il metil-jasmonato; al contrario, il trattamento con l'etefphon, composto solubile che una volta penetrato nelle cellule libera etilene, mostra un effetto molto più blando, una differenza confermata anche dall'analisi molecolare. Si può quindi ipotizzare che l'enzima appartenga alle 9-LOX non cloroplastiche coinvolte nella risposta all'attacco patogeno (Blee, 2002; Figura 102).

3.1.8. Differente efficienza di *bleaching* del β -carotene da parte di Lpx-B1.2 e Lpx-2

La differenza più eclatante emersa nel corso degli esperimenti di caratterizzazione delle due lipossigenasi riguarda la diversa efficienza di degradazione del β -carotene. Tale differenza viene messa in evidenza in Figura 103, in cui è mostrato il rapporto stechiometrico tra la reazione primaria di produzione degli idroperossidi e il conseguente livello di degradazione del carotenoide. Questo potrebbe dipendere da una diversità nella natura degli idroperossidi prodotti dalle due forme isoenzimatiche. Come ipotizzato sulla base delle evidenze sperimentali ottenute, la Lpx-B1.2 dovrebbe essere una lipossigenasi di tipo 1 e quindi produrre in maggioranza 9-HPOD, mentre la Lpx-2 dovrebbe generare in prevalenza 13-HPOD.

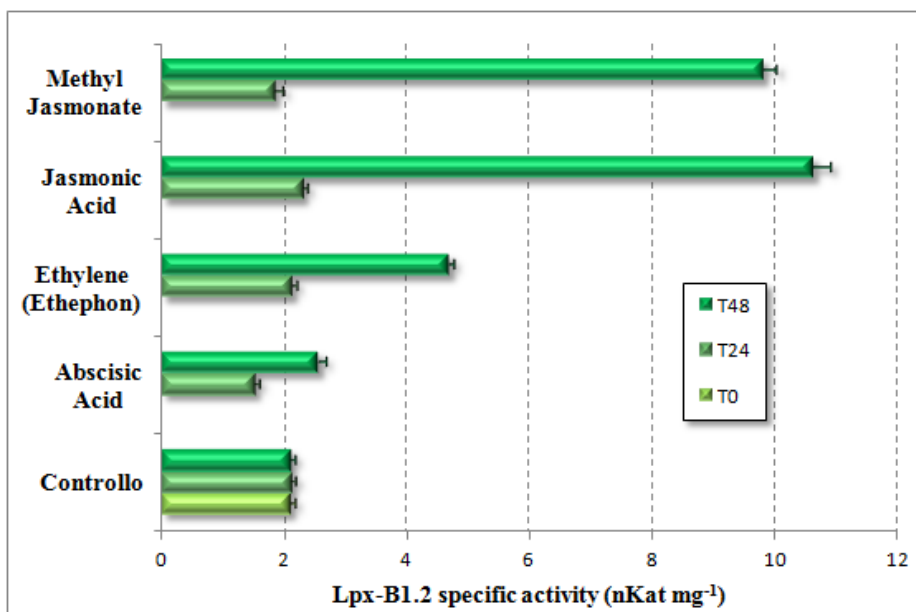
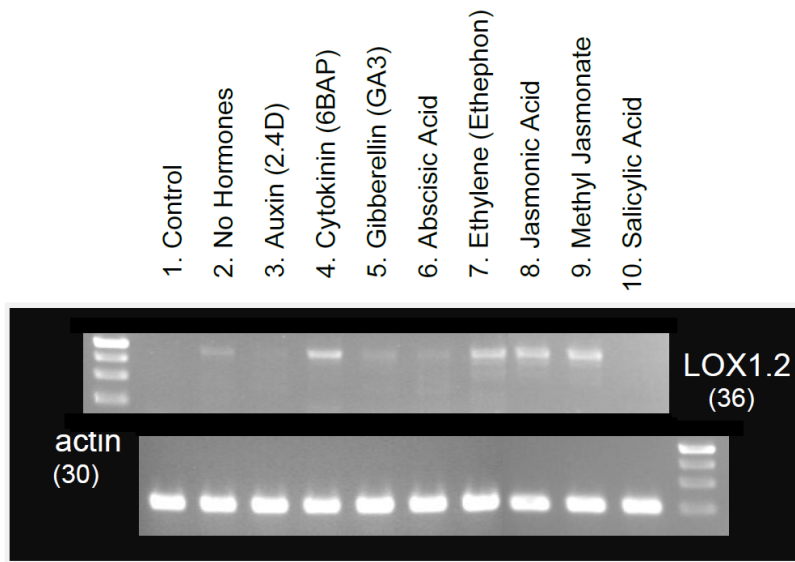


Figura 101. Analisi dell'espressione del gene *Lpx-B1.2* di grano duro in risposta alla trattamento con sostanze a attività ormonale, stimato mediante PCR semi-quantitativa dopo retrotrascrizione dell'mRNA isolato dalle colture 24 ore dopo i diversi trattamenti. Tra parentesi sono indicati i cicli di amplificazione usati per massimizzare le differenze tra i diversi cDNA (pannello superiore). Nel pannello inferiore sono riportati i livelli di attività specifica dell'enzima a 24 e 48 ore dal trattamento.

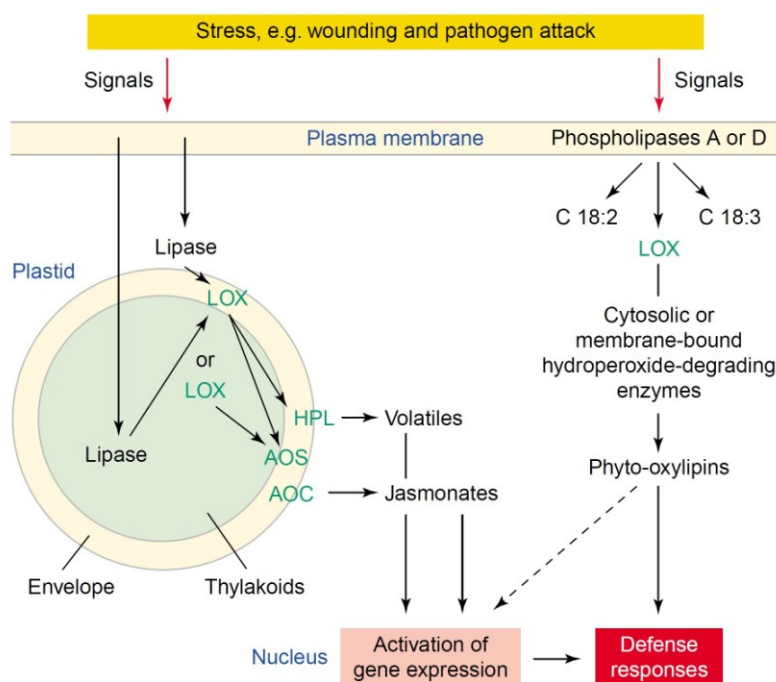


Figura 102. Schema raffigurante i possibili ruoli delle lipossigenasi nella risposta allo stress meccanico o all'attacco patogeno (Blee, 2002). La *Lpx-B1.2* potrebbe essere coinvolta nella produzione di ossilipine in grado di agire in tali condizioni come molecole di difesa.

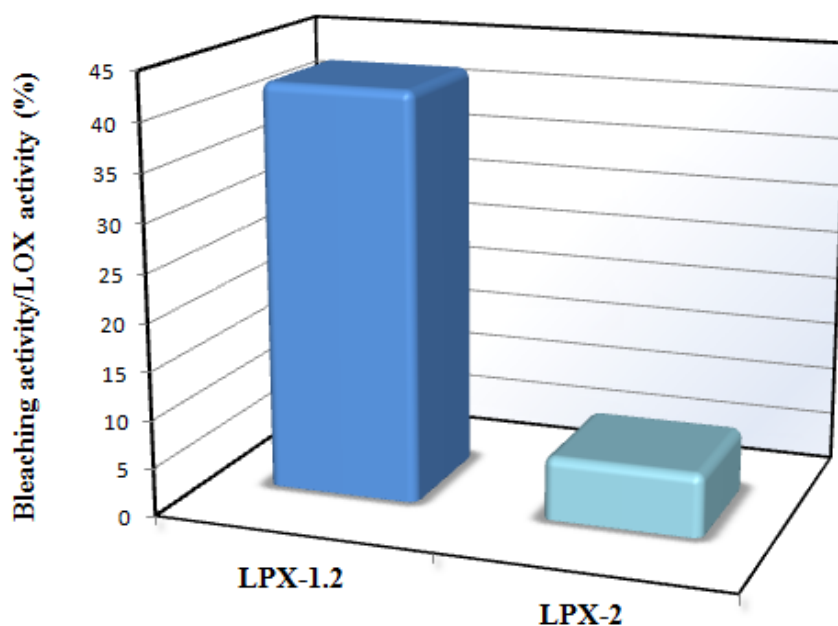


Figura 103. Rapporto stechiometrico tra la reazione secondaria di degradazione del β -carotene e quella primaria di produzione degli idroperossidi per le due isoforme di lipossigenasi oggetto del presente studio.

3.1.9. Evidenza in favore della presenza in cellule di grano duro di un *enzima secondario* capace di metabolizzare gli idroperossidi prodotti dalle Lpx e catalizzare ad alta efficienza il *bleaching* del β -carotene

Per verificare tale ipotesi, cioè che i prodotti delle due lipossigenasi di grano duro possano avere una diversa efficienza nel determinare il *bleaching* del β -carotene, tale reazione è stata misurata in estratti grezzi. Considerando che in tali preparati l'attività dell'isoforma-1 rappresenta circa il 20-25% dell'attività LOX complessiva e che le due forme isoenzimatiche hanno un rapporto stechiometrico tra la reazione secondaria di degradazione del β -carotene e quella primaria di produzione degli idroperossidi di circa il 40 e il 5%, il valore atteso avrebbe dovuto essere di poco superiore a quello dell'isoforma-2, e comunque intermedio rispetto a questi due valori. Al contrario dell'atteso, però, il risultato ottenuto (un rapporto stechiometrico pari a $50.2 \pm 1.2\%$) è molto simile a quello precedentemente riportato per la LpxB-1.2.

Un simile dato sembra suggerire che anche gli idroperossidi generati dalla Lpx-2, se prodotti nell'estratto grezzo, siano in grado di catabolizzare il carotenoide con un'alta efficienza. Tale comportamento potrebbe essere spiegato dalla presenza, sia negli estratti grezzi che nel preparato semi-purificato con cui è stata eseguita la caratterizzazione dell'isoforma-1, di un *enzima secondario* capace di metabolizzare i prodotti delle lipossigenasi e generare a sua volta metaboliti in grado di catalizzare in maniera più efficiente il *bleaching* del β -carotene rispetto agli idroperossidi.

Per avvalorare tale ipotesi si è verificata la presenza di un enzima in grado di degradare i prodotti delle lipossigenasi. A tal fine gli 13S-H(P)ODE sono stati generati utilizzando una lipossigenasi di soia disponibile commercialmente (Sigma L6632-1). Una volta prodotti, l'enzima è stato allontanato mediante ultrafiltrazione e gli idroperossidi sono stati impiegati come substrato per verificare la presenza di un enzima in grado di metabolizzarli. Analizzando le frazioni ottenute per frazionamento a scambio ionico di estratti grezzi su colonna di DEAE-Sephacel si è in effetti ottenuto evidenza della presenza di uno o più enzimi capaci di metabolizzare gli 13S-H(P)ODE nel materiale non trattenuto dalla resina (Figura 104). Il risultato spiegherebbe perfettamente la differenza tra l'isoforma-2, purificata quasi all'omogeneità elettroforetica, e l'isoforma-1, che co-eluisce in scambio anionico con questo *enzima secondario*. Che la metabolizzazione degli 13S-H(P)ODE non sia una reazione inversa di quella catalizzata dalle LOX sembra provato sia dai dati di letteratura, che non avvalorano la reversibilità della reazione, sia dal fatto che tale attività non viene evidenziata nelle frazioni in cui è presente l'isoforma-2.

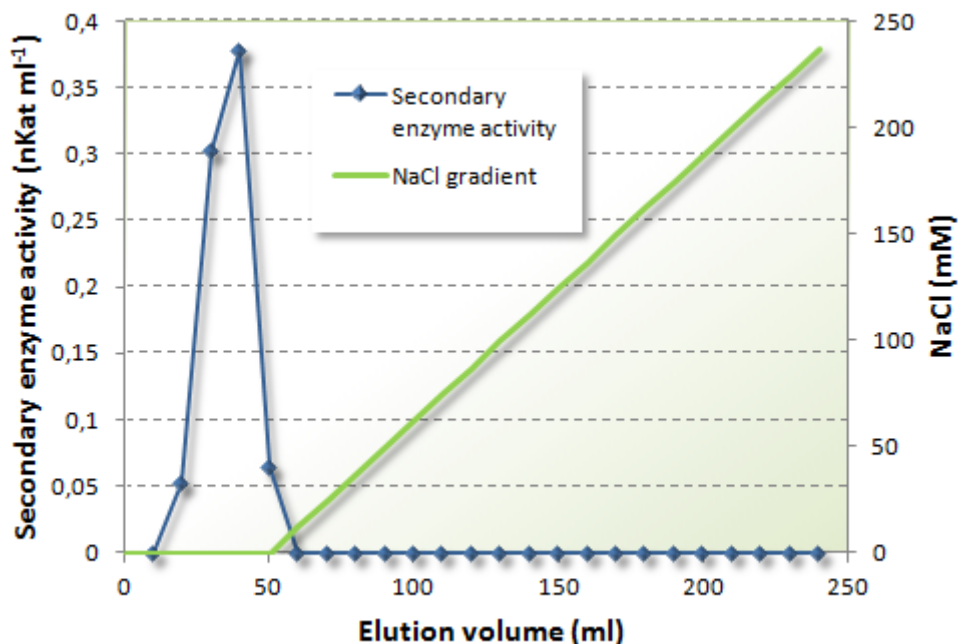


Figura 104. Profilo di eluizione in cromatografia a scambio anionico su colonna di DEAE-Sephacel dell'*enzima secondario* presente nella coltura cellulare di grano duro della cv. Ofanto e capace di metabolizzare gli 13S-H(P)ODE.

Per cercare di separare comunque l'enzima secondario dalla LpxB-1.2, si sono frazionati estratti grezzi mediante cromatografia a gel filtrazione su una colonna di resina Sephacryl S200, in modo tale da poter trarre anche indicazioni riguardanti la massa molecolare relativa del primo. Come risulta evidente dal profilo di eluizione riportato in Figura 105, l'*enzima secondario* viene in tal modo parzialmente risolto dalle due forme di Lpx. Il confronto con il profilo di eluizione di marcatori a peso molecolare noto ha permesso di stimare la sua massa relativa intorno ai 110 kDa. Anche con questa tecnica cromatografica, inoltre, si ha evidenza di un solo picco di attività enzimatica capace di metabolizzare i prodotti delle lipossigenasi, anche se tale picco non può essere attribuito in maniera certa a un solo enzima.

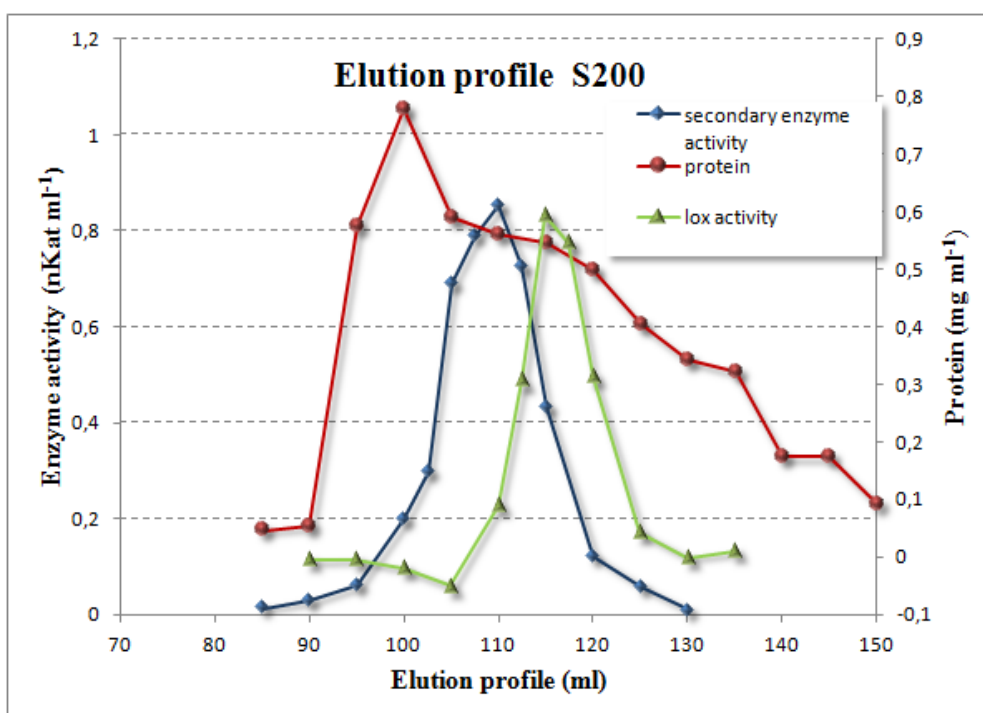


Figura 105. Profilo di eluizione ottenuto per frazionamento di estratti grezzi da cellule in coltura di grano duro mediante cromatografia a gel filtrazione su colonna di Sephacryl S200. Si può notare la risoluzione della attività lipossigenasica da quella responsabile della metabolizzazione degli 13S-H(P)ODE.

Per ottenere una ulteriore verifica, sono state effettuate alcune prove con la LOX ricombinante di soia disponibile commercialmente. Dati di letteratura indicano che gli idroperossidi prodotti dalla LOX di soia presentano una ridotta capacità di causare il *bleaching* dei carotenoidi, con un rapporto stechiometrico tra la reazione lipossigenasica primaria e quella del catabolismo del β -carotene inferiore al 15% anche in condizioni ottimali (Wu *et al.*, 1999). Anche nelle condizioni sperimentali utilizzate nel presente lavoro, l'enzima ricombinante ha in effetti evidenziato una efficacia di *bleaching* molto bassa, pari a circa il 7% della produzione di idroperossidi. Se però allo stesso preparato veniva aggiunta una piccola aliquota di una frazione ottenuta per gel filtrazione e contenente l'*enzima secondario*, si determinava un notevole innalzamento del rapporto stechiometrico fino ad arrivare a valori vicini al 40% (Figura 106). Analogamente a quello osservato per la Lpx-2 di grano, anche con la LOX1 di soia l'efficienza di degradazione dei carotenoidi aumenta dunque di quasi dieci volte in presenza di questo enzima.

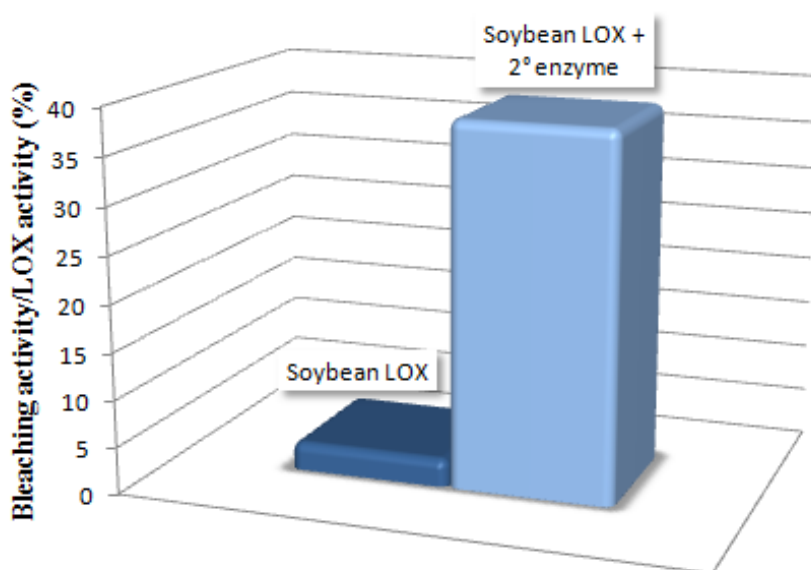


Figura 106. Rapporto stechiometrico tra il *bleaching* dei carotenoidi e la reazione lipossigenasica da parte della LOX di soia in assenza (sinistra) o in presenza (destra) dell'enzima secondario parzialmente purificato e risolto dalle LOX endogene di grano per gel filtrazione.

Questi risultati sembrano dunque rafforzare la possibilità che la presenza di un enzima finora non caratterizzato svolga un ruolo cruciale nella degradazione dei carotenoidi in grano. Questa scoperta aprirebbe nuove prospettive nella selezione di genotipi con ridotta attività di *bleaching* dei carotenoidi e nella messa a punto del processo di produzione della pasta al fine di ottenere un prodotto finale con un elevato contenuto di questi fitonutrienti.

Gli idroperossidi prodotti dalle LOX sono molecole altamente reattive e tossiche per la cellula, e devono essere rapidamente metabolizzati. A questo scopo vi sono una serie di enzimi (Figura 107) quali l'idroperossido liasi (HPL), l'allene ossido sintasi (AOS), la divinil etere sintasi (DES), perossigenasi (POS), idroperossido reductasi (HR) e epossidi alcool sintasi (EAS) capaci di utilizzare gli H(P)ODE come substrati per produrre molecole classificate come ossilipine. Alcuni di questi enzimi come la HPL, la AOS e la DES sono tra loro connessi e formano una classe di citocromi P450, denominata CYP74 (Matsui *et al.*, 1996), specializzata nel metabolismo degli idroperossidi derivanti dai PUFAs. Questi enzimi si contraddistinguono dalle altre proteine appartenenti ai citocromi P450 in quanto non necessitano di legare l'ossigeno molecolare, ma sono in grado di utilizzare gli idroperossidi come donatori e fonte di equivalenti riducenti. Un'altra importante caratteristica di questa classe di proteine è che non necessita di alcun cofattore, come a esempio NADH e NADPH, per svolgere la propria attività metabolica (Mosblech, 2009).

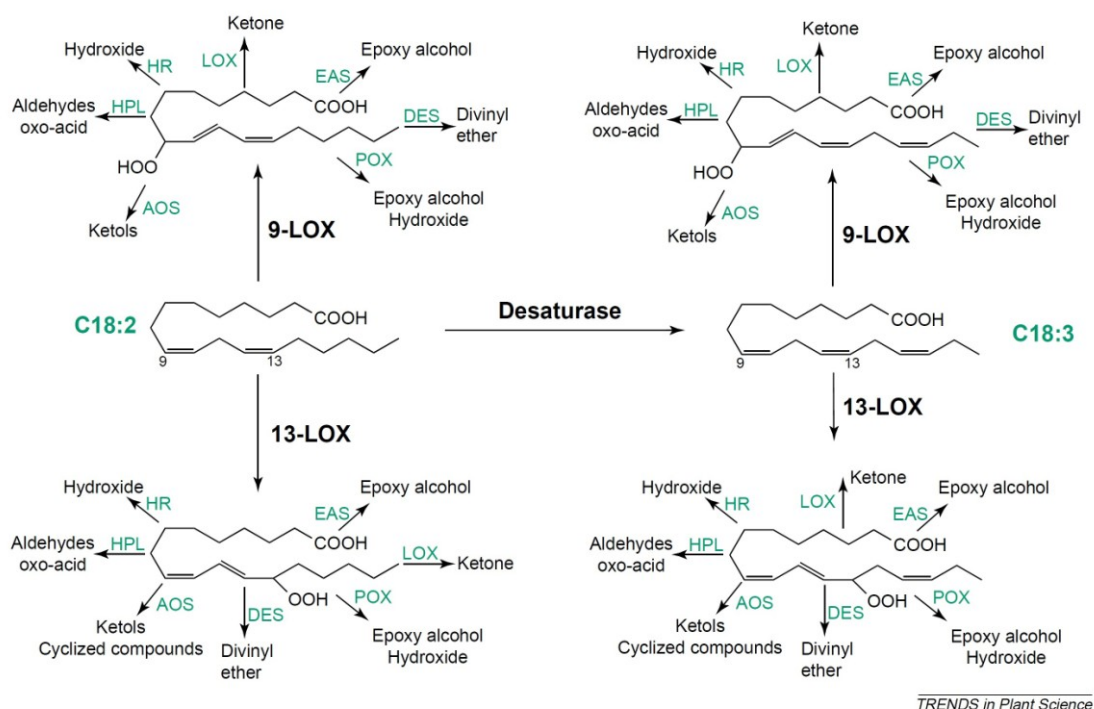


Figura 107. Enzimi coinvolti nel metabolismo degli idroperossidi prodotti dalle LOX e classi di molecole generate: idroperossido liasi (HPL), allene ossido sintasi (AOS), divinil etere sintasi (DES), perossigenasi (POS), idroperossido reductasi (HR) e epossicoalcol sintasi (EAS) (Blee, 2002).

L'identificazione di quale tra queste attività possa coincidere con l'*enzima secondario* evidenziato nel presente lavoro potrebbe contribuire in modo significativo a chiarire il meccanismo d'azione della co-ossidazione, che a oggi non è stato ancora del tutto delucidato (Chedea e Jisaka, 2013). Visto che in passato alcuni studi hanno evidenziato una maggiore efficienza di *bleaching* del β -carotene quando vengono generati cheto e idrossi-acidi grassi rispetto ad altri prodotti della via delle lipossigenasi (Casey e Hughes, 2004), i principali candidati potrebbero essere ritenuti l'idroperossido reductasi, che genera idrossidi, e la perossigenasi.

3.1.10. Livelli di attività enzimatica delle Lpx e dell'*enzima secondario* in semi di vari genotipi di grano duro

La definizione della identità dell'*enzima secondario* esula gli scopi e i tempi di questo studio. Allo scopo di ottenere comunque una prima indicazione sui livelli della sua attività specifica nei semi, è stato effettuato un ulteriore esperimento prendendo in considerazione i semi di tre differenti *cultivars* appartenenti ciascuna a uno dei tre aplotipi LOX di grano duro (Verlotta *et al.*, 2010): Trinakria, appartenente all'aplotipo I con elevati valori di attività lipossigenasica e di *bleaching* del β -carotene; Tresor, facente parte dell'aplotipo II con valori di YPC intermedi; Ofanto che, come ricordato, appartiene all'aplotipo III, quello più moderno. Dopo aver preparato estratti grezzi dai semi, è stata quantificata sia l'attività LOX complessiva che il livello di metabolizzazione degli 13S-H(P)ODE, generati come descritto per mezzo della LOX ricombinante di soia. Come atteso, l'attività specifica lipossigenasica è risultata molto bassa in Ofanto, quasi ai limiti della rilevabilità, media in Tresor e elevata nel genotipo Trinakria (Figura 108).

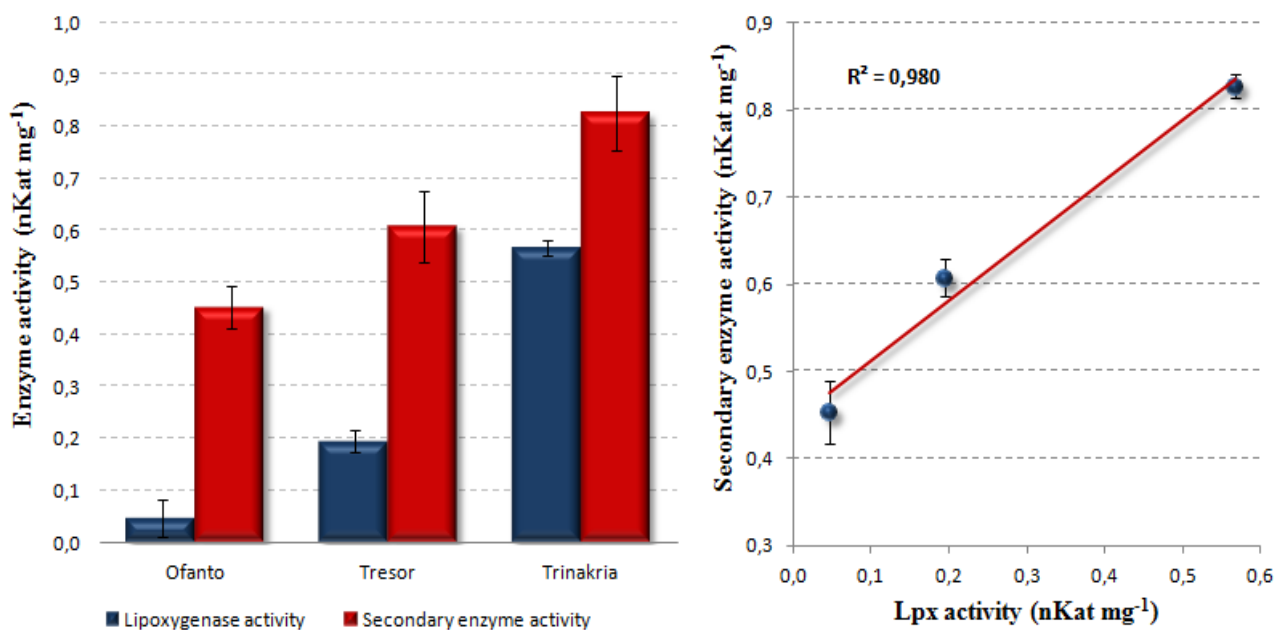


Figura 108. Gli aplotipi I (*Trinakria*), II (*Tresor*) and III (*Ofanto*) sono associati rispettivamente a un basso, intermedio e alto contenuto di carotenoidi nei semi maturi. I grafici raffigurano i livelli di attività enzimatica (pannello di sinistra) e la correlazione tra l'attività lipossigenasica e quella dell'enzima *secondario* (pannello di destra) in estratti grezzi da seme delle tre varietà.

Come si può osservare, i valori di attività specifica dell'enzima *secondario* sembrano mostrare lo stesso andamento delle LOX: infatti in *Trinakria* i livelli di tale enzima sono molto elevati, per decrescere progressivamente in *Tresor* e *Ofanto*. Una simile correlazione potrebbe essere spiegata da una co-regolazione dei rispettivi geni, o semplicemente da una induzione dell'enzima che metabolizza gli 13S-H(P)ODE proporzionale al loro tasso di produzione all'interno della cellula. Il dato ottenuto in questo esperimento deve essere considerato come assolutamente preliminare, anche in considerazione del fatto che solo un genotipo è stato analizzato per ognuno dei 3 aplotipi LOX di grano. Se confermato su un campione più ampio, il risultato potrebbe aprire nuove prospettive nella *breeding* per l'ottenimento di genotipi a basso grado di degradazione dei carotenoidi, impiegabili nella filiera della pasta per un miglioramento delle proprietà salutistiche e commerciali del prodotto.

3.2. Diossigenasi in frutti di pesce

Sebbene in letteratura siano presenti numerosi studi riguardanti la caratterizzazione delle *carotenoid cleavage dioxygenases* (CCD), poche informazioni sono disponibili relativamente alla sottoclasse 4 (CCD4). In pesce si è ipotizzato che i livelli di attività della CCD4, più che quelli degli enzimi della via biosintetica, possano rappresentare il fattore-chiave nella determinazione del livello finale di carotenoidi presente nel frutto (Brandi *et al.*, 2011). All'inizio di questo lavoro tale ipotesi era però interamente basata su dati molecolari relativi alla misurazione dei livelli di trascrizione del gene in genotipi isogenici con un'unica mutazione che influiva sulla colorazione della polpa del frutto. Non era infatti disponibile alcun protocollo di saggio affidabile che consentisse una misurazione dell'attività *in vitro* di questo enzima. In effetti, tentativi preliminari per evidenziare attività di *bleaching* del β -

carotene in estratti da polpa e da buccia di pesca non hanno sortito alcun risultato. Per cercare di mettere a punto delle condizioni sperimentali in grado di evidenziare l'attività della CCD4, si è deciso di utilizzare come controllo positivo l'enzima di una specie affine, purificato mediante espressione eterologa del corrispondente gene.

3.2.1. Espressione eterologa della CCD4 di *Malus domestica*

In un lavoro effettuato da Huang e collaboratori (2009) era stato da poco descritto il clonaggio, l'espressione eterologa e una preliminare caratterizzazione della CCD4 di melo (*MdCCD4*). Anche se il pesco non era stato ancora completamente sequenziato, una analisi *in silico* mediante *BlastP* usando la CCD4 di melo come *query* ha permesso di ottenere la sequenza del gene di interesse (*sbjct*), e ha evidenziato una elevata identità tra le sequenze amminoacidiche delle proteine delle due specie (Figura 109).

Identities	Positives	Gaps
456/526(87%)	496/526(94%)	1/526(0%)
Score	Expect	Method
953 bits(2463)	0.0	Compositional matrix adjust.
Query 39	NNASTFTAAKQ-TVSALPAVIFNALDDDFINSFIDPPVKPSVDPRHVLSHNFAPVEELPPT	97
Sbjct 38	NNASTF+AAK+ T LPAVIFNALDD IN+FIDPP++PSVDP+HVLS+NFAPV+ELPPT	97
Query 98	ECEIIHGSLPPCLDGAYIRNGPNPQYLPRGPYHLLDGDGMLHSVRISSGGRAVLCSRYVKT	157
Sbjct 98	ECEII GSLPPCLDGAYIRNGPNPQYLPRGPYHL DGDGMLHSVRISS GRVLCSRYVKT	157
Query 158	YKYTVERDARHPILPNFFSSFNGLTASATRGALSAARVLTGQYNPANGIGLANTSLAFFG	217
Sbjct 158	YKYTIERDAGYPILPSVFSGFNGLTASATRGALSAARVFTGQYNPANGIGLANTSLAFFG	217
Query 218	DRLYALGESDLPYSLRLTNSGDIETLGRHDFDGKLSMNMTAHPKIDPDTGEAFAFRYGF	277
Sbjct 218	++LYALGESDLPYSLRLTNSGDI+TLGRHDFDGKL M+MTAHPKIDP+TGEAFAFRYG +	277
Query 278	RPFLTYFRFDSNGVKQPDVPIFSMVTPTFLHDFAITKKHAI FADIQIGLNLDIMITKRAT	337
Sbjct 278	PFLTYFRFD+NG KQPDVPIFSMVT+FLHDFAITKK+AIF DIQIG+N IDMITK A+	337
Query 338	PFGLDPSKVPRIGVIPRYAKDESEMRWFVEVPGFNGVHATNAWDEDDAIVMVAPNVL	397
Sbjct 338	SAEH P GLDPSKVPRIGVIPRYAKDE+EMRWF+VPGFN +HA NAWDE+DAIVMVAPN+LSAEH	397
Query 398	PVGLDPSKVPRIGVIPRYAKDETEMRWFVDPGFNI IHAINAWDEDDAIVMVAPNIL	397
Query 398	VLERVDLVHCLVEKVRIDLKTGIVTRQSISTRNLDFAVINPAYLGRKNKYVYAAVGDMP	457
Sbjct 398	+ER+DL+H VEKVRIDLKTGIV+RQ ISTRNLDFAV NPAY+G+KNKYVYAAVGDMP	457
Query 458	TMERMDLIHASVEKVRIDLKTGIVSRQPISTRNLDFAVFNPAYVGKKNKYVYAAVGDMP	457
Query 458	KISGVVKLDVSNVEHKECIVASRMFGPGCYGGEFFVAREPENPEADEDNGFLVSYVHDE	517
Sbjct 458	KISGVVKLDVSNVEHKECIVASRMFGPGCYGGEFFVAREPENPEADED+G++V+YVHDE	517
Query 518	KISGVVKLDVSNVEHKECIVASRMFGPGCYGGEFFVAREPENPEADEDGYYVVTYVHDE	517
Query 518	KAGESRFLVMDAKSPQLDIVAAVRMPRRVPYGFHGLFVRESDLNNL 563	563
Sbjct 518	KAGES FLVMDAKSP+LDIVA VR+PRRVPYGFHGLFV+ESDLN L 563	563

Figura 109. Confronto tra la sequenza amminoacidica della CCD4 di melo e la proteina di pesco, identificata mediante *BlastP* in banche dati disponibili online.

Visto l'elevato grado di similarità (94%) e di identità (87%) tra le due proteine, si è deciso di richiedere il costrutto contenente il gene *MdCCD4* al prof. Huang, in modo da utilizzare la proteina ricombinante per la messa a punto di un saggio di attività *in vitro*. Nel

lavoro citato, infatti, la CCD4 di melo era stata solo parzialmente caratterizzata grazie ad un approccio *in vivo* mediante co-espressione dei geni della biosintesi dei carotenoidi in *E. coli*. In tali condizioni la *MdCCD4* sembrava in grado di catalizzare la scissione del β -carotene producendo β -ionone, mentre non era risultata degradare l'8'-apo- β -caroten-8'-ale (Huang *et al.*, 2009b).

Una volta ottenuto dal prof. Huang il vettore di espressione pGEX contenente il gene *CCD4* di *Malus domestica* posto sotto il controllo di un promotore inducibile dal trattamento con IPTG e fuso con una parte del gene per la glutatione transferasi (GST), il costrutto è stato utilizzato per trasformare il ceppo BL21(DE3)pLysS di *Escherichia coli*, reso competente con la metodologia del calcio cloruro. Dopo induzione dell'espressione della proteina eterologa, l'estratto grezzo ottenuto dalle cellule batteriche è stato caricato su una colonna contenente una resina che presenta una capacità di legame della GST fino a 5-10 mg mL⁻¹. Dopo un abbondante lavaggio con tampone di estrazione per ottenere l'eluizione di tutte le proteine non in grado di legarsi specificamente alla resina, l'enzima di interesse è stato desorbito per affinità mediante passaggio di aliquote di tampone a pH 9.0 contenenti concentrazioni crescenti (da 1 a 9 mM) di glutatione ridotto (GSH) (Figura 110).

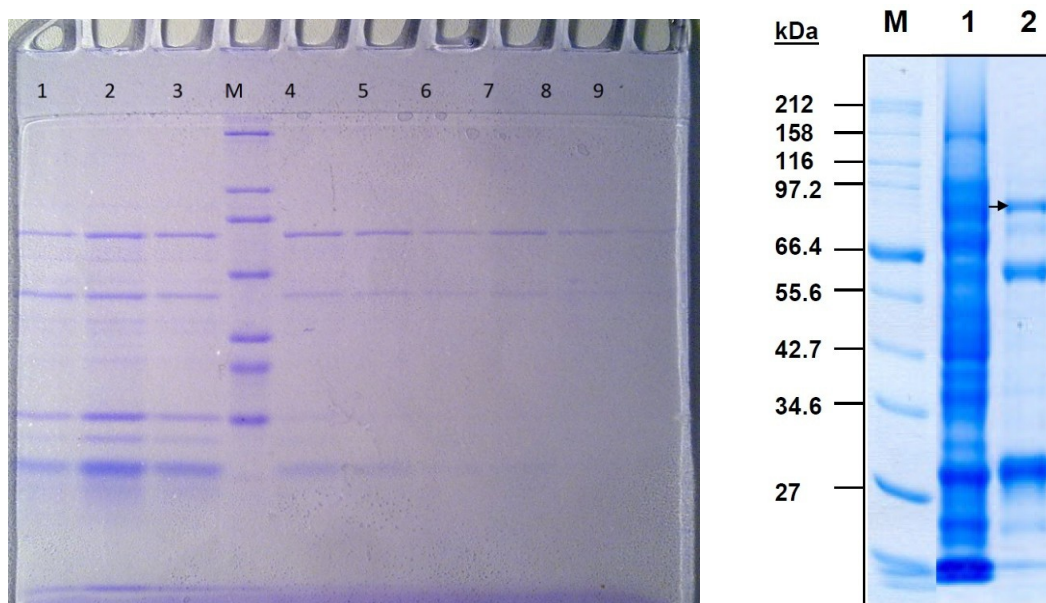


Figura 110. Analisi elettroforetica in gel di poliacrilammide all'8% delle frazioni ottenute dall'eluizione della colonna di GSH-agarosio con varie concentrazioni di GSH (da 1 a 9 mM). A destra, l'analoga purificazione descritta dal gruppo del prof. Huang (2009a).

I risultati ottenuti sono molto simili a quelli riportati dal gruppo che aveva descritto il clonaggio del gene (Huang *et al.*, 2009a): oltre alla banda di interesse, di massa molecolare relativa pari a 88 kDa che deriva dalla somma della sequenza dedotta per la CCD4 e del frammento a essa fuso della GST, si nota la presenza di molte bande contaminanti di peso molecolare inferiore, che potrebbero derivare dalla parziale idrolisi della proteina di fusione. L'impiego di un protocollo di eluizione *stepwise* con concentrazioni crescenti di GSH ha però consentito di ottenere delle frazioni (dalla 4 alla 8) in cui all'analisi densitometrica la proteina di interesse costituiva la frazione predominante. Tali frazioni sono state ulteriormente purificate mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (FPLC).

3.2.1.1. Purificazione della MdCCD4 all'omogeneità elettroforetica

Il preparato semi-purificato è stato quindi trattato con trombina bovina a una concentrazione finale di 1.8 U mg^{-1} al fine di determinare l'idrolisi del frammento di GST. Al termine della digestione, l'analisi elettroforetica ha mostrato la completa scomparsa della banda a 88 kDa (Figura 111, prima *lane* del pannello B), evidenziando il completamento dell'idrolisi. Il campione è stato allora frazionato per cromatografia a scambio anionico su colonna MonoQ 5.5, eluendo le proteine con un gradiente da 0 a 500 mM NaCl. Il profilo di eluizione in tal modo ottenuto è presentato in Figura 111.

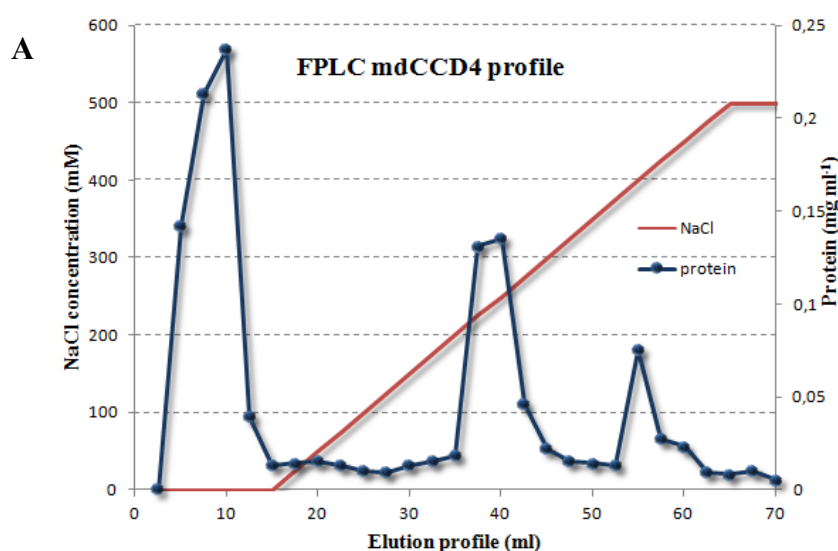
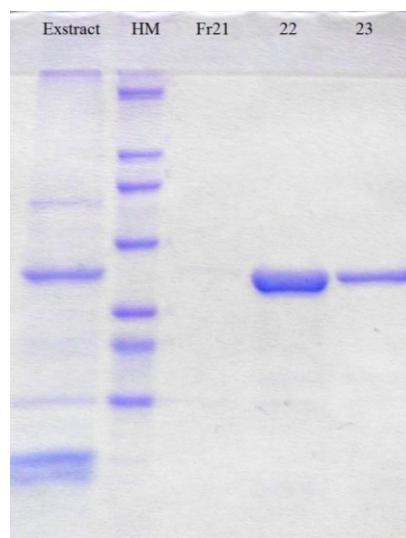
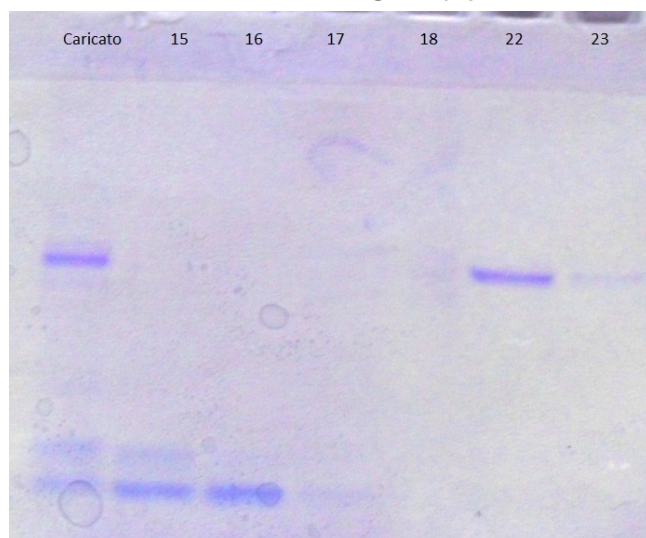


Figura 111A. Profilo di eluizione del preparato purificato per affinità su colonna di GSH agarosio dopo trattamento con trombina e frazionamento su colonna MonoQ 5.5. Oltre al materiale non trattenuto sono presenti due picchi proteici nelle frazioni 15-16 e 22-23.



B e C. Analisi mediante SDS-PAGE su gel all'8% delle frazioni ottenute, caricate tal quale (B) o dopo concentrazione mediante ultrafiltrazione su filtri con *cut-off* di 10 kDa (C).

L'analisi elettroforetica mostra che il picco maggiore nelle frazioni 15-16 coincide con il frammento idrolizzato della GST, mentre quello nelle frazioni 22-23 contiene una proteina con un coefficiente di ritardo compatibile con una massa di 60 kDa, il valore atteso per la MdCCD4. Tale proteina all'analisi densitometrica corrisponde a più del 95% del totale, ma rimangono presenti alcune bande contaminanti di peso molecolare minore. Queste sono state successivamente eliminate mediante un ulteriore passaggio per FPLC su una colonna per gel filtrazione di Superose 12. Il preparato ottenuto è stato utilizzato per le prove di rilevazione dell'attività enzimatica.

3.2.1.2. Saggi di attività *in vitro* della MdCCD4

Estratti preparati da cellule di *E. coli* trasformate con il costrutto contenente la diossigenasi di melo e indotte per 3 ore con 1 mM IPTG, e dai corrispondenti controlli negativi non indotti, sono stati incubati fino a 8 ore al buio in presenza di 0.5 μM FeSO_4 e 15 μM β -carotene. A tempi crescenti sono state misurate le variazioni nello spettro di assorbimento dei carotenoidi (tra 400 e 550 nm). In tal modo si è potuto osservare un significativo *bleaching* del β -carotene rispetto ai controlli, con una attività proporzionale al tempo (Figura 112).

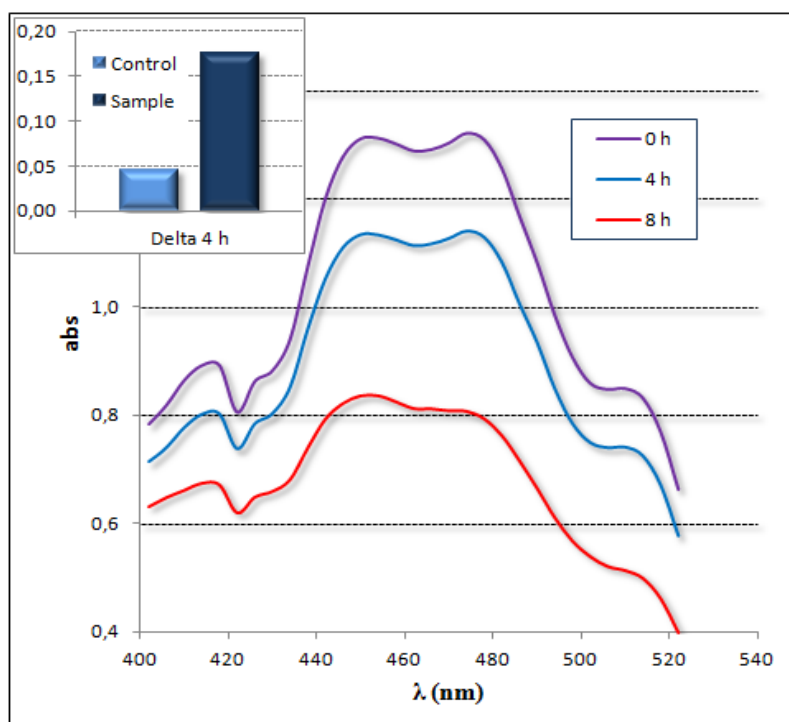


Figura 112. Attività *in vitro* di degradazione del β -carotene da parte di estratti grezzi di *E. coli* contenenti la CCD4 di *Malus domestica*. La concentrazione del substrato diminuisce nel tempo a una velocità superiore rispetto a quella evidente in estratti da cellule non indotte.

Se il medesimo saggio veniva condotto con l'enzima purificato, la diminuzione della assorbanza nel blu risultava però indistinguibile da quella dei controlli contenenti solo tampone, dovuta al decadimento spontaneo del β -carotene. Per verificare se ciò fosse dovuto a una perdita di attività durante il processo di purificazione, la prova è stata ripetuta anche sul preparato ottenibile con la sola cromatografia per affinità su colonna di GSH-agarosio, con i controlli contenenti un ugual volume di tampone addizionato con 3 mM GSH, utilizzato per il distacco della CCD4 dalla resina. Anche in questo caso, comunque, nessuna attività di *bleaching* è risultata rilevabile.

Visto che il catabolismo dei carotenoidi produce intermedi ancora in grado di assorbire la luce alle lunghezze d'onda vicine a 460 nm, il saggio spettrofotometrico utilizzato potrebbe non evidenziare tale produzione, essendo in grado di seguire solo la completa distruzione del substrato. In effetti per la CCD4 di melo sono stati descritti risultati che suggeriscono che essa possa essere in grado di catalizzare la scissione del β -carotene producendo 8'-apo- β -caroten-8'-ale e il volatile 9-apo- β -caroten-9-one (β -ionone), ma non di procedere alla successiva idrolisi dell'8'-apo- β -caroten-8'-ale, capace anch'esso di assorbire la luce blu (Huang *et al.*, 2009b). In tal caso, il saggio adottato avrebbe dato risultati sottostimati. Per ovviare a tale inconveniente è stata sviluppata una metodica di saggio mediante HPLC che consente la determinazione quantitativa di substrato e prodotto. Si è a tal fine proceduto al frazionamento della miscela di reazione per RP-HPLC su una colonna Zorbax C18. L'iniezione di standard a concentrazione nota di β -carotene e apocarotenale ha permesso di identificare la relazione quantitativa tra concentrazione della sostanza e area del corrispondente picco. Per l'esecuzione di queste analisi è però risultato necessario procedere all'estrazione in fase organica dei carotenoidi, per

evitare le interferenze determinate dagli altri composti presenti nella miscela di saggio. L'aggiunta di miscele equimolari o di concentrazioni complementari dei due composti alla miscela di reazione ha portato all'ottenimento delle rispettive rette di taratura (Figura 113), evidenziando una buona linearità tra concentrazione e area dei picchi ottenuti in un ambito di concentrazioni comprese tra 3 e 15 μM .

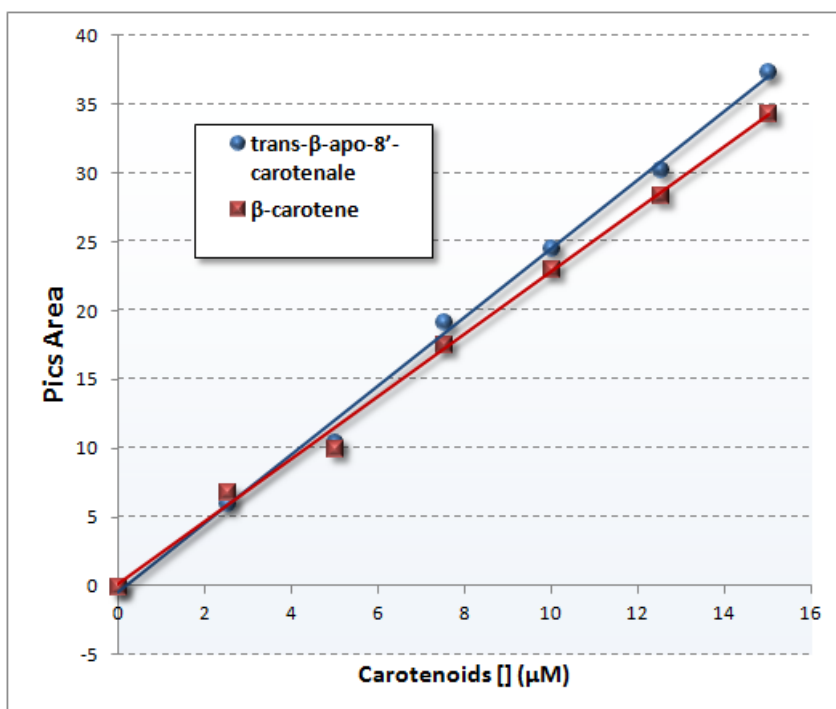


Figura 113. Retta di calibrazione del metodo di saggio basato sull'estrazione in fase organica di substrati e prodotti e loro analisi mediante RP-HPLC, ottenuta utilizzando standard puri di β -carotene (linea rossa) e *trans*- β -apo-8'-carotenale (linea blu).

Il metodo è stato quindi applicato al saggio d'attività condotto su estratti grezzi preparati da cellule indotte, al tempo 0 e dopo 5 ore di incubazione. I risultati ottenuti sono mostrati in Figura 114, dove il primo picco è quello del *trans*- β -apo-8'-carotenale.

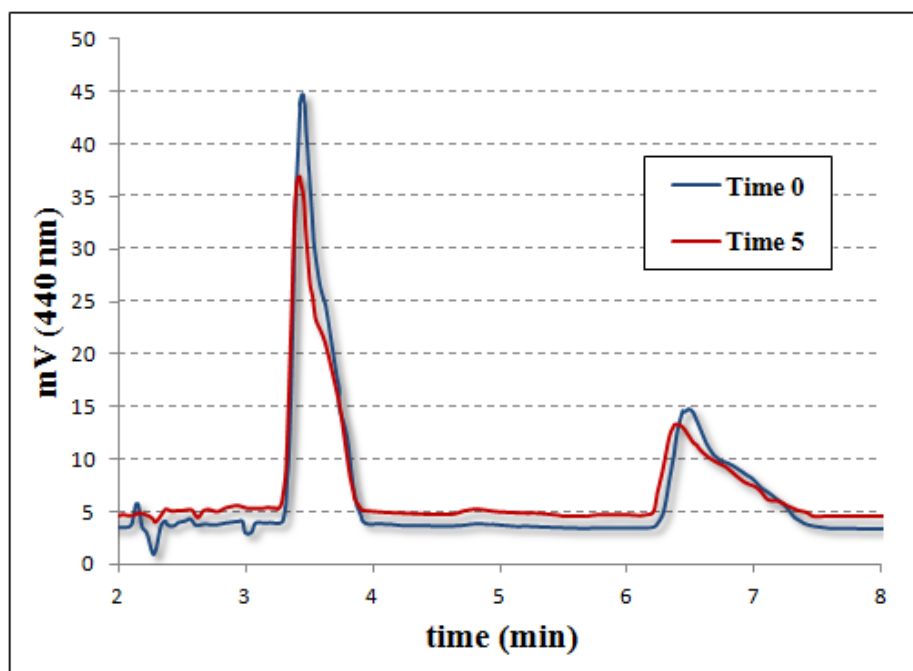


Figura 114. Metabolizzazione dei carotenoidi da parte della CCD4 di *Malus domestica*. L'enzima purificato per affinità da cellule di *E. coli* indotte con IPTG è stato incubato per 5 ore con β -carotene e *trans*- β -apo-8'-carotenale. Le miscele di reazione sono state quindi estratte con cloroformio e, dopo evaporazione del solvente, i residui sono stati analizzati per RP-HPLC. I dati suggeriscono che l'enzima sia in grado di metabolizzare entrambi i composti.

In queste condizioni l'enzima mostra attività catalitica nei confronti di entrambi i substrati utilizzati. Contrariamente a quanto riportato in letteratura (Huang *et al.*, 2009a), il substrato preferenziale della *MdCCD4* purificata sembra essere il trans- β -apo-8'-carotenale e non il β -carotene. Ad ogni modo, l'efficienza della reazione risulta bassissima, molto inferiore a quella evidenziata incubando estratti grezzi (Figura 112), considerando che la quantità di enzima contenuto in questi ultimi corrispondeva a meno di un ventesimo della quantità di enzima puro incubato nella prova riportata in Figura 114. Questo insieme di risultati sembra suggerire che l'enzima necessiti di uno o più cofattori per funzionare al meglio, cofattori presenti negli estratti grezzi di cellule di *E. coli* ma eliminati durante il passaggio in cromatografia per affinità. Un'altra possibilità è che l'enzima possa agire all'interno di un complesso multienzimatico che viene a formarsi nel sistema eterologo di espressione; quando questo viene disgregato nel corso della purificazione, la diossigenasi non lavora più in modo ottimale. Quale che sia la motivazione del basso livello di efficienza catalitica nei preparati purificati, il sistema di saggio sembra comunque capace di fornire una misurazione quantitativa dell'attività della CCD4.

3.2.2. Saggi enzimatici *in vitro* su cromoplasti purificati dalla polpa dei frutti di pesco

Per poter saggiare con tale metodo l'attività della CCD4 di pesco era comunque necessario disporre di preparati arricchiti dell'attività di interesse, vista la bassa efficienza catalitica evidenziata anche in estratti in cui l'enzima di melo era presente in elevate quantità. Dati di letteratura sembrano indicare per la CCD4 una localizzazione funzionale all'interno del cloroplasto, in particolare nei plastoglobuli (Figura 115), dove sembra avvenire almeno in parte anche la sintesi dei carotenoidi (Rubio *et al.*, 2008; Bréhélin *et al.*, 2007). Si è pertanto messo a punto un metodo per il rapido ottenimento di preparati parzialmente purificati di cromoplasti, la principale forma di plastidi presente nei frutti di pesco.

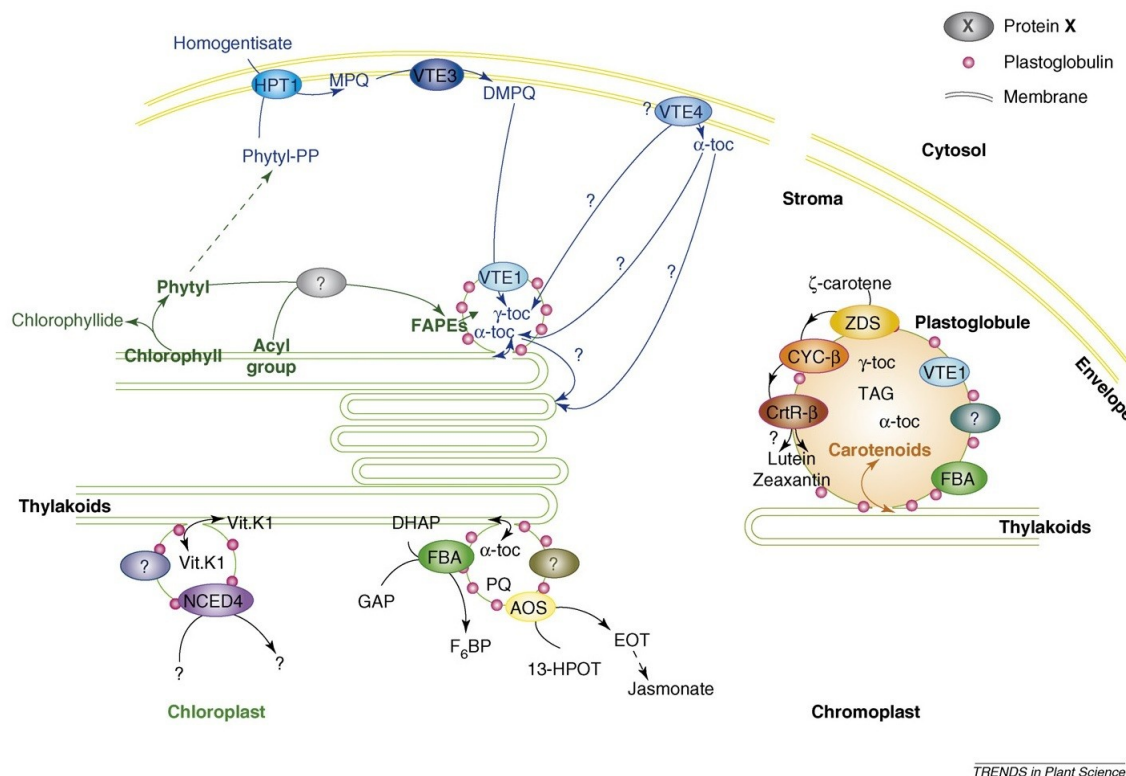


Figura 115. Localizzazione della CCD4 nel plastoglobulo di *A. thaliana*. La diossigenasi 4 (NCED4) è stata identificata in una analisi proteomica dei plastoglobuli insieme a altri enzimi coinvolti nel metabolismo dei carotenoidi. È stata avanzata l'ipotesi che essi possano interagire in un complesso sovraenzimatico (Bréhélin *et al.*, 2007).

I saggi enzimatici effettuati utilizzando tali preparati e seguendo il *bleaching* del β -carotene alla lunghezza d'onda di 460 nm hanno in effetti mostrato un'attività lineare nel tempo e proporzionale alla quantità di proteine (Figura 115).

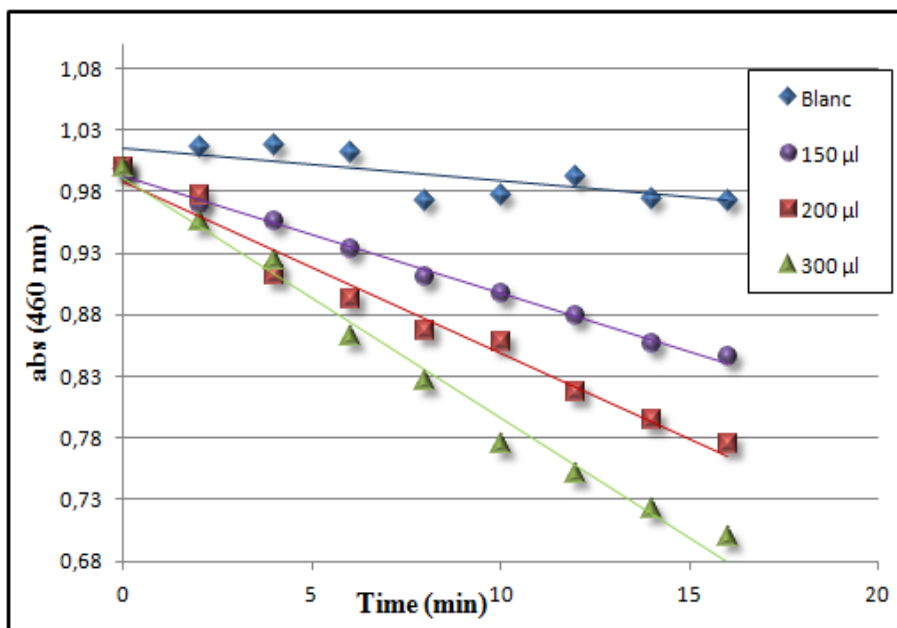


Figura 115. *Time drive* della reazione di *bleaching* del β -carotene da parte di estratti ottenuti per lisi dei cromoplasti purificati dalla polpa di frutti di pesco. I saggi mostrano un'attività lineare nei primi 15 min e proporzionale alla quantità di proteine incubate.

L'attendibilità del saggio è stata confermata tramite analisi in HPLC delle miscele di reazione, che ha mostrato la progressiva diminuzione del substrato (Figura 116). All'idrolisi del β -carotene non è però corrisposta la comparsa di altri picchi in grado di assorbire la luce blu, suggerendo che l'attività della diossigenasi possa rappresentare il passaggio limitante nell'ossidazione dei carotenoidi.

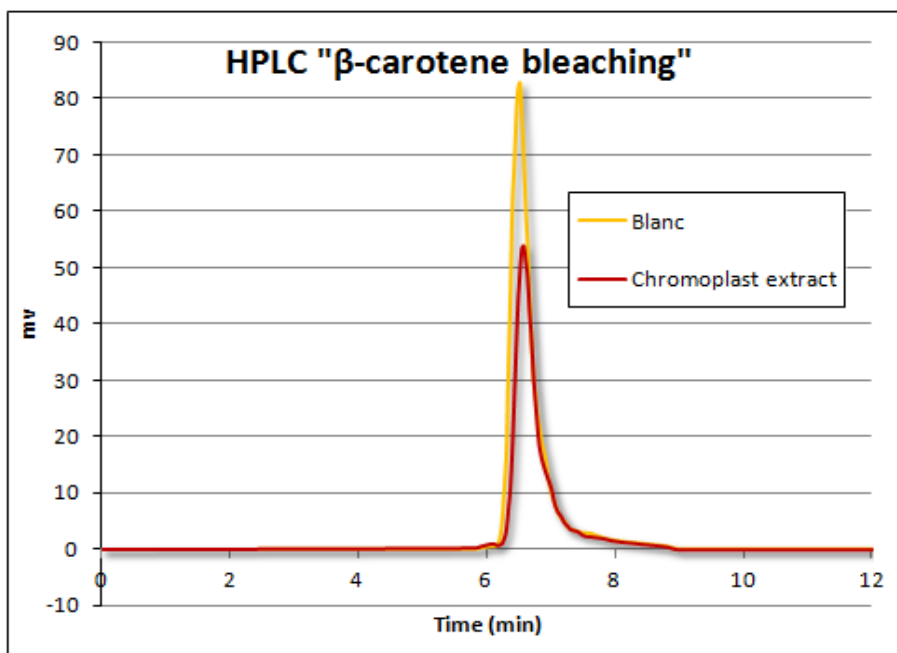


Figura 116. Cromatogramma ottenuto analizzando per RP-HPLC la miscela di reazione dopo l'incubazione di estratti ottenuti da cromoplasti di pesco. La quantità di β -carotene diminuisce sensibilmente rispetto al controllo ottenuto incubando estratti paralleli inattivati per 10 min a 98°C.

Nonostante i numerosi tentativi, non si è però mai riusciti a ottenere una sia pur parziale purificazione degli enzimi responsabili di tale reazione. Il frazionamento cromatografico degli estratti ha sempre comportato la completa scomparsa dell'attività. L'osservazione che tale perdita avveniva anche per semplice trattamento dei preparati con dosi di detergenti inferiori

alla concentrazione micellare critica sembra rafforzare la possibilità che l'attività possa procedere mediante *substrate channeling* in un complesso multienzimatico formato da alcune delle proteine presenti nei plastoglobuli del cromoplasto (Figura 115).

3.2.3. Livelli di attività di *bleaching* del β -carotene in frutti di diversi genotipi di pesco

Il protocollo sperimentale in tal modo messo a punto è stato applicato ai materiali forniti dal CRA di Forlì, costituiti da frutti a diversi stadi di maturazione di due coppie isogeniche in cui a seguito di una singola mutazione nel gene della CCD4 si è determinata la variazione del colore della pasta, da gialla a bianca (RedHaven e RedHaven bianca) o viceversa (Caldesi e Cristina 2000) (Adami *et al.*, 2013). I frutti ai diversi stadi di sviluppo sono stati raccolti nel corso della primavera-estate 2012 e immediatamente congelati.

3.2.3.1. Il sistema isogenico RedHaven - RedHaven Bianca

Inizialmente è stata effettuata l'analisi della coppia di genotipi RH, a polpa gialla, e RHB, a polpa bianca, per la quale era già disponibile una caratterizzazione chimica e molecolare nei vari stadi di maturazione del frutto: S1 (circa 35 giorni dopo l'impollinazione [dap]), S2 (circa 50 dap), S3 (circa 90 dap) e S4 (122 dap; Figura 41) (Brandi *et al.*, 2011).

Nonostante l'elevata identità a livello nucleotidico la sequenza amminoacidica predetta per la CCD4 di pesco risulta molto più breve rispetto all'ortologo di melo (427 residui contro 591). Questa differenza è dovuta alla presenza di un microsatellite (CT)₈ a monte del codone di inizio, non presente nella sequenza della *MdCCD4*, che produce uno slittamento della trascrizione, impedendo la corretta traduzione della proteina. Successive analisi hanno evidenziato la presenza nel germoplasma di pesco di due alleli che presentano un polimorfismo in questo microsatellite: il primo [(CT)₈], corrispondente alla sequenza presente nel *database* del genoma di pesco, con un microsatellite di 201 bp, e un secondo [(CT)₇] più corto di 2 bp. La sequenza amminoacidica predetta utilizzando il microsatellite (CT)₇, che ripristina il corretto *frame shift*, risulta essere di 597 aa, molto simile a quella di melo. Una ricerca effettuata con marcatori specifici per i suddetti microsatelliti ha permesso di verificare che entrambe queste linee isogeniche sono eterozigoti e possiedono entrambi gli alleli (CT)₇ e (CT)₈. Vi è però una differenza sostanziale: il genotipo a polpa gialla presenta una inserzione di 6263 bp all'interno dell'introne, con una sequenza molto simile a un retrotrasposone LTR (*Gypsy-like*), che è assente invece in RHB. Visto che il fenotipo a polpa bianca risulta essere dominante su quello giallo, i due alleli sono stati associati al colore del mesocarpo e denominati y1 (per l'allele (CT)₈) e y2 (per l'allele (CT)₇ contenente l'inserzione). L'allele y1 è presente in entrambi i genotipi, mentre nel fenotipo bianco y2 è retro-mutato in W1, che manca del retrotrasposone: la sua riattivazione determinerebbe la produzione di una forma (più) attiva di CCD4, determinando il *bleaching* dei carotenoidi.

I risultati ottenuti mediante l'analisi dei cromoplasti isolati dalla polpa dei frutti ai quattro diversi stadi di sviluppo, riassunti in Figura 117, hanno evidenziato un diverso *pattern* di attività specifica nel corso del processo di sviluppo del frutto delle due varietà. Nel genotipo giallo l'attività di *bleaching* del β -carotene rimane relativamente costante per tutto il processo di maturazione, per crescere nello stadio finale, mentre in quello bianco si notano livelli elevati di attività enzimatica nella fase iniziale, che calano poi gradualmente, fino a scomparire quasi completamente nel frutto maturo.

Comparando i dati ottenuti con quelli relativi al contenuto di carotenoidi nella polpa (Brandi *et al.*, 2011) si può notare una certa correlazione tra il livello di attività specifica e la presenza dei substrati (Figura 118): nel genotipo a polpa gialla il livello di *bleaching* rimane costante per crescere nello stadio S4, dove la concentrazione di substrato è maggiore.

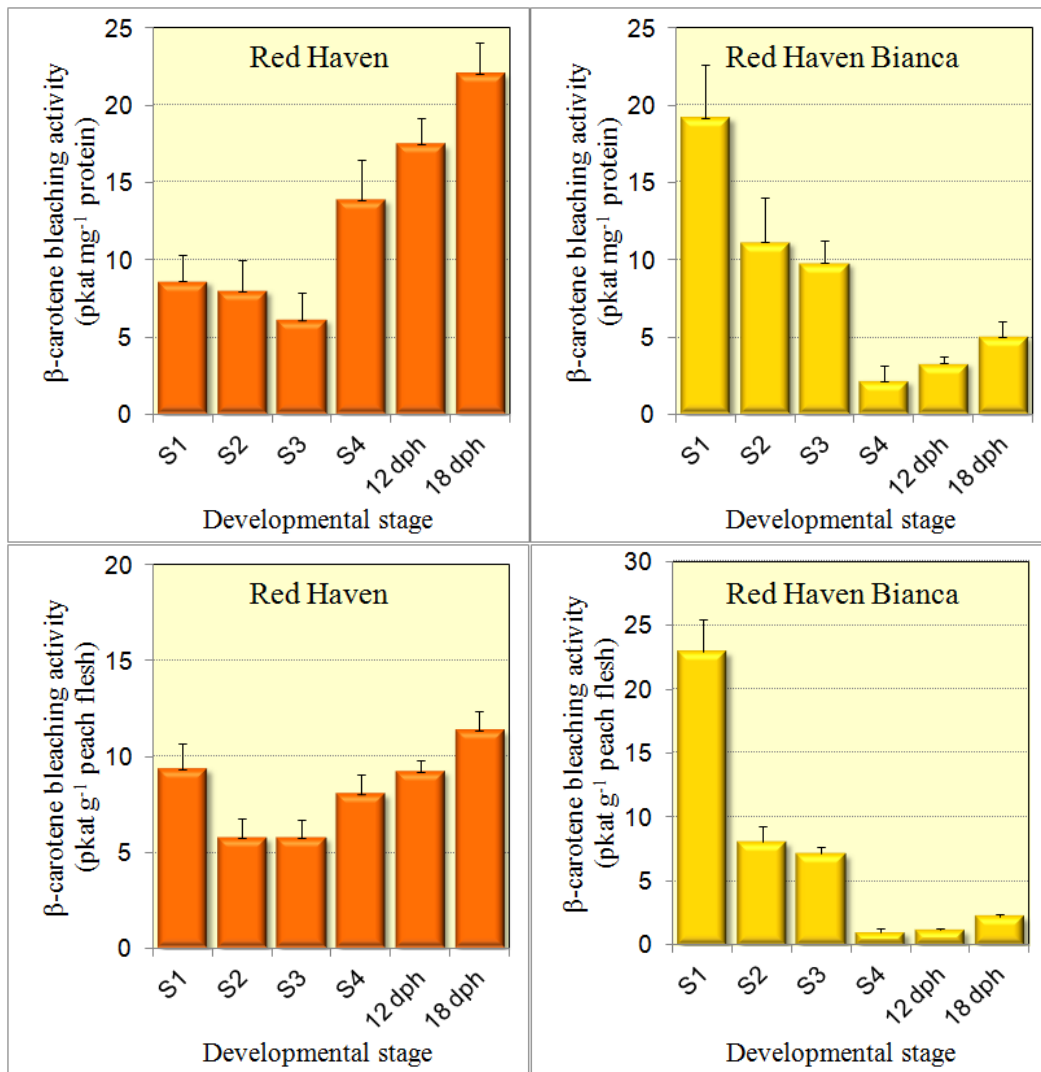
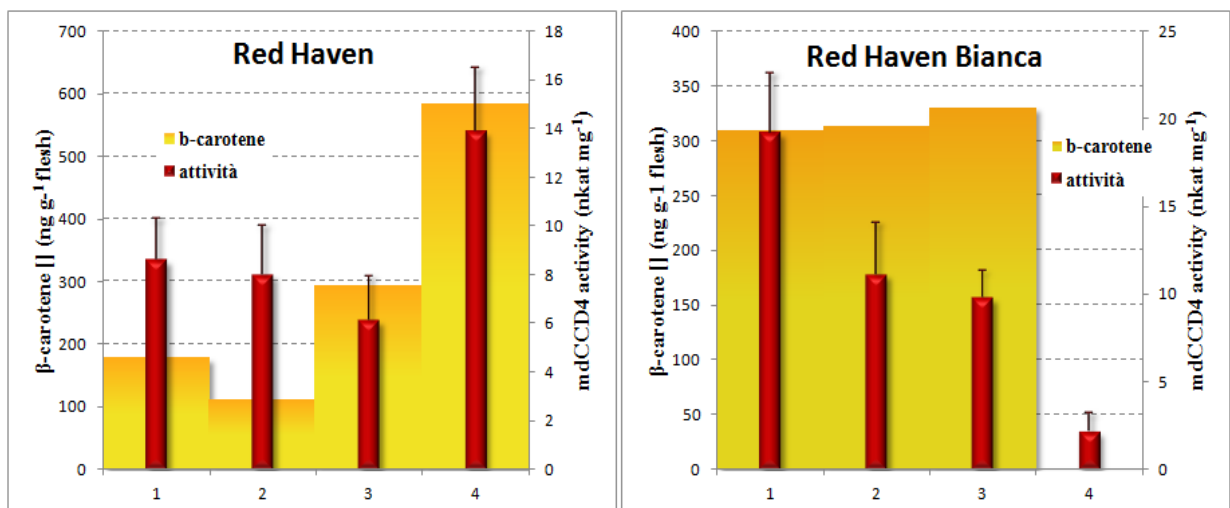


Figura 122. Livelli di attività di *bleaching* dei carotenoidi nei cromoplasti isolati da frutti di RH e RHB raccolti in diverse fasi di maturazione. I risultati sono sia espressi in rapporto alle proteine totali, sia normalizzati rispetto alla biomassa del frutto. Tutti i dati riportati rappresentano la media \pm SE ottenuta dall'analisi di 5 repliche indipendenti; dph, *days post harvest*.



Viceversa, in RHB gli alti livelli di attività nelle fasi iniziali dello sviluppo del frutto, quando il β -carotene è presente in concentrazioni elevate, diminuiscono in modo drastico nelle fasi tardive, dove la presenza dei substrati scompare. Il quadro generale ottenuto da questo primo esperimento sembrerebbe indicare una induzione dell'attività enzimatica proporzionale alla concentrazione di β -carotene nel frutto, tenendo presente però che i livelli di attività rapportati ai grammi di peso fresco sono decisamente maggiori ($P < 0.05$) nel genotipo a polpa bianca dove allo stadio S1 raggiungono circa i 15 pKat g⁻¹. L'ipotesi che i livelli di attività della CCD4 siano più alti in tessuti dove sono presenti elevati livelli di carotenoidi è coerente con i risultati ottenuti in alcuni lavori su altre specie, come a esempio in *C. sativus* (Rubio *et al.*, 2008) e in petali e tuberi di patata (Campbell *et al.*, 2010), dove si è dimostrato che il livello di espressione è finemente correlato alla disponibilità di substrato.

3.2.3.1.1. Induzione di anticorpi policlonali contro la *PpCCD4* e analisi immunologica dei cromoplasti isolati dai frutti di pesco

I dati ottenuti non erano però in accordo con quanto descritto in precedenza sullo stesso sistema, cioè che i livelli di RNA messaggero per la CCD4 erano più elevati nel genotipo RHB che in RH proprio nelle fasi terminali del processo di sviluppo (Brandi *et al.*, 2011). Tale discrepanza potrebbe essere dovuta a una diversa stabilità dell'enzima, una volta prodotto. In alternativa, però, la stessa differenza avrebbe potuto dipendere dalla presenza nei cromoplasti di altri enzimi in grado di catalizzare il *bleaching* del β -carotene. Il saggio utilizzato, infatti, non consente di attribuire con certezza alla CCD4 l'attività misurata. Per ottenere maggiori indicazioni relativamente al fatto che i risultati ottenuti nel sistema RH-RHB potessero essere riferiti effettivamente alla *PpCCD4*, si è tentato di rilevare fisicamente la presenza della proteina. A tal fine, si sono indotti anticorpi policlonali specifici per tale enzima. Non disponendo della proteina purificata, sulla base della sequenza dedotta da quella genica sono stati disegnati due diversi peptidi immunogenici, che sono stati sintetizzati da un *service* esterno (Proteogenix, Schiltigheim, France):

- PEPTIDE1: cys-GLDPSKVPRIGVIPR [MW 1707.08]
- PEPTIDE2: cys-IRNGPNPQYLPRGPY [MW 1845.12]

Entrambi i peptidi presentano una lunghezza pari a 15 amminoacidi, più una cisteina iniziale, e hanno un grado di purezza superiore al 95%. Essi sono stati inoltre coniugati con la *Keyhole limpet hemocyanin* (KLH), una proteina capace di incrementarne l'immunogenicità. Con questi preparati sono stati immunizzati quattro topi (2 esemplari per ciascun peptide), gentilmente messi a disposizione dal Prof. Ottorino Belluzzi (Università di Ferrara). Dopo 3 iniezioni, da ogni animale sono stati ottenuti circa 2 mL di antisiero, che è stato utilizzato per effettuare dei *Western blot* sugli estratti di cromoplasti di pesco. Malgrado diversi tentativi, utilizzando anche diverse metodologie di estrazione della frazione proteica, non si è riusciti a ottenere una banda singola quantificabile del peso molecolare atteso in quanto la proteina non permeava nel gel di poliacrilammide, ma rimaneva intrappolata nello *stacking gel*. Gli estratti sono stati allora sottoposti ad analisi immunologica in condizioni non denaturanti mediante *dot-blot*, adsorbendo direttamente i preparati goccia a goccia sulla nitrocellulosa non idratata. L'intensità delle bande è stata misurata tramite l'ausilio del *software* "ImageJ", e i risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli relativi all'attività di *bleaching* del β -carotene analizzata sugli stessi preparati (Figura 119).

Una correlazione statisticamente significativa è stata riscontrata tra l'attività enzimatica misurata con il saggio *in vitro* e il segnale ottenuto con l'analisi immunologica. Tali risultati sembrerebbero dunque confermare che l'attività evidenziata con il saggio di *bleaching* del β -carotene sia effettivamente attribuibile alla diossigenasi.

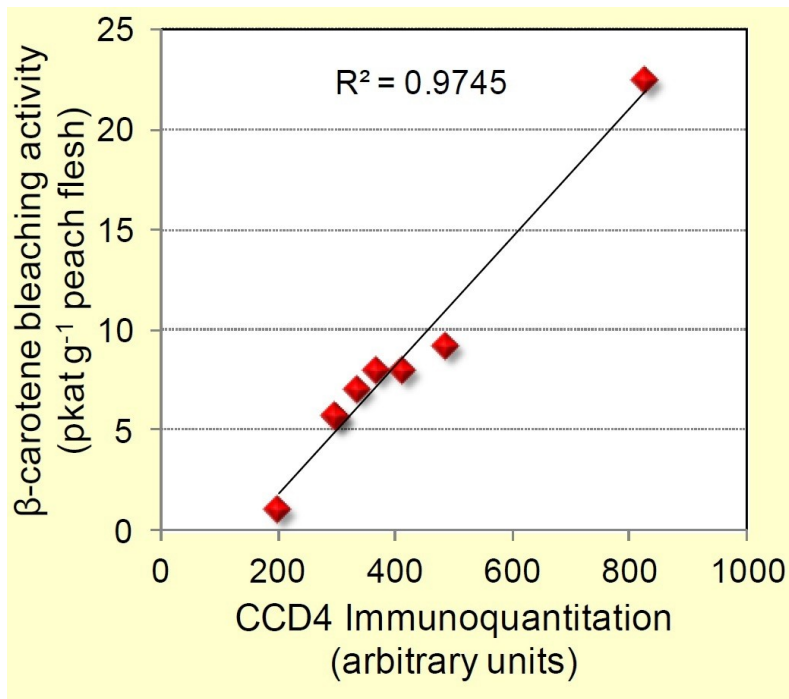


Figura 119. Gli anticorpi policlonali ottenuti in topo contro peptidi sintetici disegnati sulla base della sequenza aminoacidica dedotta della *PpCCD4* sono stati utilizzati per l'analisi degli estratti di cromoplasti isolati dai frutti a vari stadi dello sviluppo. I risultati ottenuti sono stati espressi in funzione di quelli ottenuti sui medesimi campioni con il saggio del *bleaching* del β-carotene.

3.2.3.2. Il sistema isogenico Cristina - Caldesi 2000

Visti i riscontri positivi a favore della capacità del protocollo impiegato di fornire informazioni quantitative sull'attività della CCD4, le analisi sono state estese ad altri due genotipi di pesche, Cristina e Caldesi. Anche questi costituiscono un sistema isogenico composto da una *cultivar* a polpa bianca (Caldesi 2000) e dal suo mutante a polpa gialla (Cristina). Nessuno dei due genotipi possiede l'inserzione LTR: Caldesi 2000 è eterozigote per la lunghezza dei microsatelliti (y1, W1), mentre Cristina è omozigote per l'allele y1. L'allele W1 codifica per una proteina di 597 amminoacidi putativamente funzionale, mentre in Cristina una mutazione consistente di un'aggiunta di una unità ripetuta causa la mutazione di W1 in y1. Il conseguente *frame shift* causa la trascrizione di un mRNA troncato (Adami *et al.*, 2013).

In Caldesi 2000 sono stati riscontrati livelli di attività specifica molto bassi (Figura 120), con un *trend* che li vede ulteriormente calare in modo progressivo nel corso del processo di maturazione. Al contrario nel genotipo a polpa bianca i livelli di attività enzimatica risultano essere molto più elevati, con un picco massimo di oltre 60 pKat mg⁻¹ di proteine allo stadio S4 ($P < 0.01$). I dati ottenuti sembrano dunque in accordo con quelli genetici, anche se nel genotipo Cristina non dovrebbe essere riscontrabile neppure una bassa attività dal momento che esso non dovrebbe possedere alcun allele funzionale codificante la diossigenasi.

3.2.3.3. Il genotipo ancestrale Yumyeong

Per ottenere ulteriori informazioni, si è deciso infine di analizzare i livelli di attività enzimatica presenti nel genotipo ancestrale Yumyeong. Tale genotipo possiede due alleli funzionali W1, codificanti per la proteina completa di 597 aa. Per esso non è stato però possibile ottenere una quantità di materiale sufficiente a permettere una adeguata replicazione delle misure. Sono state quindi effettuate solo 1 o 2 prove per ogni stadio di sviluppo, e i risultati -non presentati- sono stati considerati solo come una indicazione di massima. In accordo con le attese, comunque, nei frutti di questa *cultivar* sono stati riscontrati valori di *bleaching* del β-carotene molto elevati, superiori a quelli di tutti gli altri genotipi analizzati.

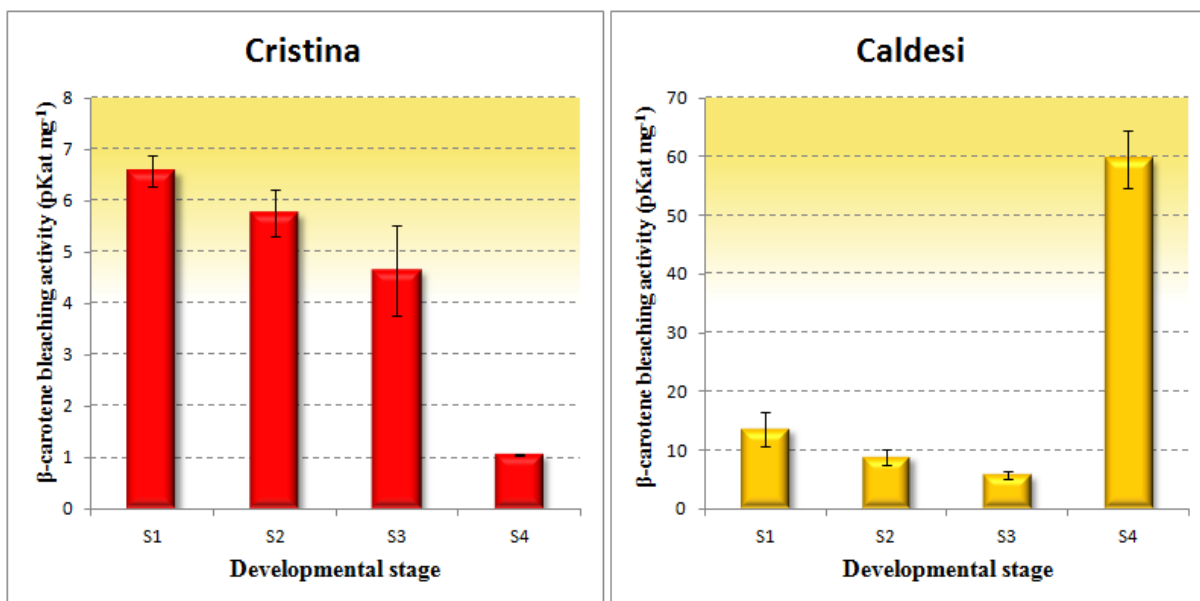


Figura 120. Livelli di attività di *bleaching* dei carotenoidi nei cromoplasti isolati da frutti di Cristina e Caldesi 2000 raccolti in diverse fasi di maturazione. I risultati sono stati normalizzati sulla base della biomassa estratta. Tutti i dati rappresentano la media \pm SE ottenuta dall'analisi di 5 repliche indipendenti.

Solo successivamente alla esecuzione della maggior parte delle analisi descritte, il sistema allelico della CCD4 in pesco è stato definito in dettaglio (Falchi *et al.*, 2013; Adami *et al.*, 2013). Il quadro generale che è stato delineato è che in passato il pesco avesse frutti a polpa bianca per la presenza di due alleli funzionali e, quindi, di elevati livelli di attività di *bleaching* dei carotenoidi. Una serie sequenziale di mutazioni avrebbe in seguito portato all'origine di genotipi intermedi (Caldesi 2000) e a polpa gialla (RH e Cristina), dove la proteina non viene prodotta, o viene trascritta in maniera non ottimale. Infine, eventi di retromutazione in alcuni genotipi moderni, come RHB, avrebbe ripristinato trascrizione di almeno un allele funzionale, generando nuovamente delle *cultivars* con frutti a polpa bianca. Per verificare se i dati ottenuti con il saggio *in vitro* di *bleaching* del β -carotene fossero compatibili con questo quadro complessivo, la media dei valori di attività specifica ottenuti per ciascun genotipo è stata confrontata con il numero e la *qualità* degli alleli funzionali presenti (Figura 121).

Il genotipo ancestrale Yumyeong presenta i livelli di attività specifica più alti, con valori che si avvicinano a 50 pkat mg⁻¹ di proteine. Caldesi 2000, derivante da un genotipo ancestrale ma con un solo allele W1 funzionale, ha un'attività media pressochè dimezzata, che si attesta intorno ai 25 pkat mg⁻¹. Il genotipo ad alto contenuto di carotenoidi nel frutto, Cristina, che possiede due alleli non funzionali y1, è quello che evidenzia i valori di attività di *bleaching* più bassi, quasi ai limiti della rilevabilità. Per quanto riguarda il sistema Red Haven-Red Haven Bianca, il genotipo giallo presenta livelli leggermente inferiori rispetto a quello a polpa bianca, ma l'attività riscontrata è superiore a quella osservata in Cristina. Complessivamente, dunque, i dati enzimatici sembrano compatibili con quelli genetici. È vero che in Red Haven non dovrebbero essere presenti livelli rilevabili di mRNA della *PpCCD4*. Questa incongruenza potrebbe però indicare che l'inserzione del retrotrasposone non blocchi completamente la trascrizione del gene e la successiva traduzione corretta della proteina. In alternativa, pur avendo l'analisi immunologica evidenziato una buona correlazione tra la presenza della CCD4 e i valori di attività di *bleaching* nei preparati, la rilevazione di un livello basale di attività anche in un genotipo in cui la CCD4 non dovrebbe essere presente potrebbe indicare che altri enzimi, non ancora identificati, possano contribuire al metabolismo dei carotenoidi all'interno dei cromoplasti.

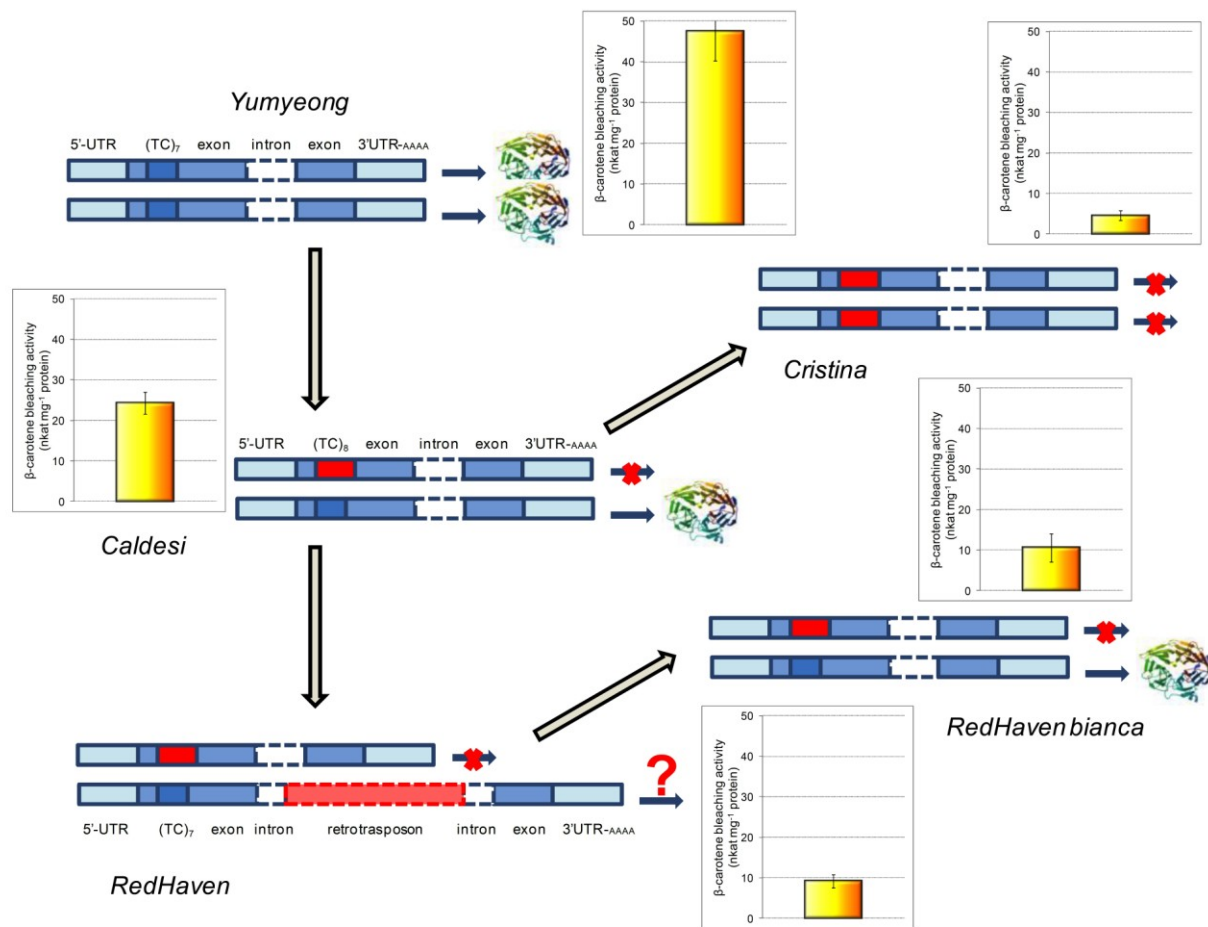


Figura 121. Livelli medi di attività di *bleaching* del β -carotene in cromoplasti di alcune *cultivars* rappresentative di pesco (istogramma) in relazione al modello genetico degli alleli della CCD4 descritto in questa specie (Falchi *et al.*, 2013; Adami *et al.*, 2013).

3.2.4. Attività di *bleaching* del β -carotene in tuberi di patata

Lo sviluppo di un metodo di saggio che possa fornire dati sui livelli degli enzimi coinvolti nel catabolismo dei carotenoidi presenta un indubbio interesse per i programmi di selezione di *cultivar* di specie agrarie con un accresciuto contenuto di questi fitonutrienti. Su richiesta dei coordinatori del progetto ALISAL, l'analisi del *bleaching* del β -carotene è stata pertanto applicata anche ai cromoplasti ottenuti da tuberi di patata di genotipi con diversa colorazione. I materiali sono stati forniti dal dott. Giuseppe Mandolino (Centro di Ricerca per le Colture industriali di Bologna) e sono stati congelati in azoto liquido e conservati a -20°C fino all'utilizzo. Sono stati analizzati materiali di 9 differenti genotipi, caratterizzati da pasta bianca (Chacoense, Daifla), gialla (Yema de Huevo, Papapura, ISCI-105) e arancio (Mayan Gold, 7M6, 2R4, ISCI-503).

Come per il riso in Estremo Oriente, anche per la patata la presenza di livelli molto bassi di β -carotene determina in Sudamerica problemi di avitaminosi e conseguenti disturbi della vista. Per questo diversi gruppi hanno tentato di ingegnerizzare questa specie per ottenere *cultivar* con un più elevato accumulo di carotenoidi. Piante trasformate con il gene *CrtB* del batterio *Erwinia uredovora*, codificante per una fitoene sintasi, hanno mostrato un aumento dell'accumulo dei carotenoidi totali di 7 volte in un genotipo a polpa bianca (Desiree) e di circa 3 volte in uno a polpa arancio (Mayan Gold), raggiungendo una concentrazione pari a $78 \mu\text{g g}^{-1}$ di peso secco (Ducreux *et al.*, 2005). Con l'inserimento di una breve via metabolica costituita da tre geni (*CrtB*, fitoene desaturasi *CrtI* e *CrtY*) della via

biosintetica dei carotenoidi di *Erwinia* sotto il controllo del promotore tubero-specifico *PAT* si sono ottenuti tuberi a pasta gialla intensa, denominata "*golden potato*", che mostra un contenuto di carotenoidi totali 20 volte maggiore rispetto al *wild type* ($114 \mu\text{g g}^{-1}$) e un contenuto di β -carotene di $47 \mu\text{g g}^{-1}$, 3600 volte più alto rispetto al controllo non trasformato (Diretto *et al.*, 2007a). Visto che l'utilizzo di piante geneticamente modificate trova però delle forti resistenze nell'opinione pubblica, la caratterizzazione delle basi della variabilità naturale esistente a questo proposito nel germoplasma di patata potrebbe permettere di ottenere risultati simili attraverso metodi tradizionali di *breeding*.

I risultati ottenuti applicando il protocollo messo a punto e caratterizzato in pesco ai diversi genotipi di patata sono riassunti in Figura 122. Nei genotipi a pasta bianca (Chacoense e Daifla) l'attività di *bleaching* risulta essere più elevata rispetto a quelli a polpa gialla e arancio ($P < 0.01$). Tutti i genotipi a polpa colorata presentano infatti livelli di attività almeno dimezzata rispetto a Daifla e sei volte inferiori rispetto a Chacoense. Questo dato sembrerebbe indicare un possibile ruolo della CCD4 nell'accumulo dei carotenoidi anche nel tubero di patata. Tra i genotipi colorati l'unica eccezione è data dal genotipo Mayan Gold, che è quello maggiormente ricco in carotenoidi; esso presenta infatti valori di attività enzimatica rilevanti: questo dato sembra indicare che anche in alcune *cultivars* colorate, dove la via di sintesi di tali composti è incrementata, il catabolismo è ancora attivo.

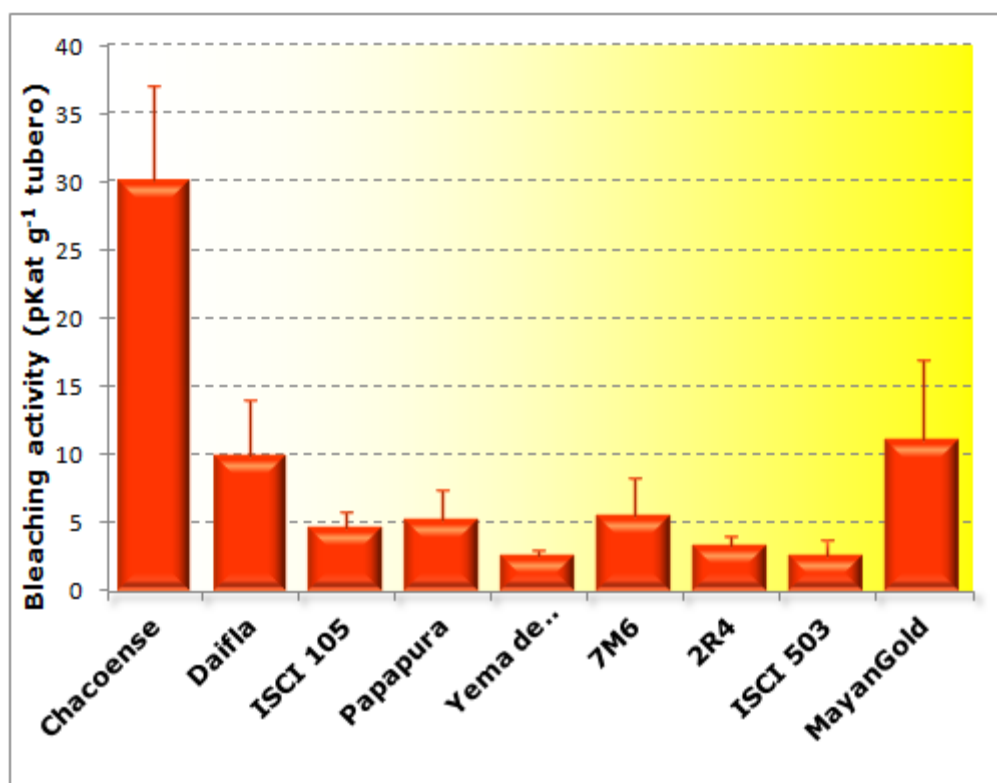


Figura 122. Livelli medi di attività di *bleaching* del β -carotene in cromoplasti isolati dalla polpa del tubero di alcune *cultivars* rappresentative di patata. I genotipi sono posizionati nel grafico in base al contenuto di carotenoidi nel tubero maturo, dalla più bianca (Chacoense) a quella a maggior concentrazione di tali pigmenti (Mayan Gold).

Bisogna sottolineare che questi risultati sono del tutto preliminari, poichè relativi a una singola determinazione -pur se replicata- su materiali non omogenei. Non è infatti disponibile alcuna informazione sulle possibili variazioni dei livelli di attività in funzione dell'età dei tuberi, elemento che in patata può essere estremamente rilevante visto che essi vengono

spesso conservati a bassa temperatura per lungo tempo prima di essere consumati. Inoltre, contrariamente a quanto era stato possibile in pesco, in questo caso non si trattava di analizzare sistemi isogenici che differissero solo per il carattere di interesse, ma di esaminare materiali geneticamente del tutto diversi, addirittura appartenenti a 3 specie diverse (*Solanum tuberosum*, *S. pureja* e *S. chacoense*). In simili condizioni, dunque, è più che plausibile che più di un meccanismo possa agire in genotipi diversi per determinare lo stesso genotipo.

A maggior ragione, però, l'aver evidenziato una buona correlazione tra l'attività di *bleaching* e il contenuto di carotenoidi nei diversi materiali sembra suggerire che l'attività catabolica giochi un ruolo fondamentale anche in patata ai fini della determinazione dei livelli di questi composti nella pasta del tubero. Se questo fosse confermato, un processo di *breeding* mirato alla selezione di bassi livelli della CCD4, o il suo silenziamento mediante tecniche di ingegneria genetica, potrebbe fornire le basi per l'ottenimento di patate ricche di questi metaboliti secondari. Fino ad oggi, al contrario, tale obiettivo è stato perseguito quasi esclusivamente mediante la stimolazione della via di sintesi (Diretto *et al.*, 2007a).

A sostegno della potenzialità di tale approccio, un incremento dei livelli di carotenoidi nei tuberi è stato in effetti ottenuto mediante l'espressione del gene *Or* di cavolfiore, che codifica per una proteina che sembra stimolare la differenziazione dei plastidi in cromoplasti; questa tecnica ha permesso di aumentare fino a 10 volte il loro accumulo rispetto al controllo (Lopez *et al.*, 2008). In un altro lavoro, realizzato da Campbell e collaboratori (2010), è stato studiato il livello di espressione della CCD4 in due *cultivars* a polpa bianca e in altrettante a polpa gialla, rilevando livelli di espressione più elevati nei genotipi a basso contenuto di carotenoidi. Abbassando questi livelli attraverso la tecnica dell'RNAi si sono ottenuti tuberi con un contenuto di carotenoidi a 5.6 volte maggiore rispetto al *wild type*. Tale effetto è stato osservato solamente nei tuberi e nei petali, mentre in altri organi, come foglie e radici, la repressione della CCD4, pur evidente, non ha determinato nessuna variazione. Questo potrebbe dipendere dal modo in cui i carotenoidi vengono accumulati nei tessuti verdi (nei cloroplasti) rispetto ai tuberi e ai petali, dove i cloroplasti differenziano in cromoplasti. Oltre alla variazione nel contenuto di carotenoidi, nelle piante transgeniche si è osservato un fenotipo molto simile a quello che si verifica in tuberi conservati al freddo intervallati da periodi a alte temperature: una forma allungata nei tuberi, spesso concatenati tra loro. Questo dato potrebbe indicare un ruolo dei prodotti derivanti dall'attività della CCD4 in risposta a particolari tipi di stress, come ad esempio l'esposizione ad alte temperature.

In conclusione, quindi, sembra che si possa affermare che la CCD4 rappresenti un ottimo *target* per l'incremento dell'accumulo di carotenoidi anche nei tuberi di patata.

3.3. Enzimi-chiave nella sintesi dei polifenoli in grano

Tra i composti bioattivi presenti nei vegetali in grado di apportare benefici sulla salute umana vi sono i polifenoli; le antocianine, in particolare, rappresentano un'importante fonte di flavonoidi idrofili con elevata attività antiossidante. La presenza di questi composti in frutta, verdura, cereali e prodotti alimentari trasformati è molto attraente per il consumatore e il colore rosso o blu dovuto a un elevato contenuto di antociani sembra aumentare la fiducia dell'acquirente e, di conseguenza, il valore commerciale del prodotto. Il fabbisogno giornaliero di questi composti nella dieta è stato stimato tra 3 e 215 mg (de Pascual-Teresa *et al.*, 2010), ma anche nelle ricche economie occidentali, probabilmente a causa di una insufficiente educazione alimentare, spesso tali livelli non sono raggiunti. Tra i vegetali ricchi in polifenoli che potrebbero contribuire a incrementare le dosi assunte dalla popolazione vi sono i grani pigmentati. Il grano viola, in particolare, potrebbe essere una fonte importante di antocianine (Bustos *et al.*, 2012) se lo si sostituisse al grano bianco nell'alimentazione quotidiana. Tra tutti i frumenti, quelli con pericarpo viola sono in grado di soddisfare al meglio queste esigenze, tenendo conto che hanno un elevato contenuto di antociani (principalmente

cianidina 3-glucoside), in un intervallo di concentrazioni compreso tra 34 e 500 mg kg⁻¹ (Abdel-Aal e Hucl, 1999). Tuttavia, come l'accumulo e la concentrazione finale di antocianine sia regolata nei semi è ancora sconosciuta, così come la regolazione degli enzimi-chiave coinvolti in tale processo. L'individuazione degli enzimi limitanti la sintesi delle antocianine e la loro caratterizzazione porterebbe sia a una migliore comprensione del controllo del metabolismo dei flavonoidi, sia a una più efficace selezione assistita di genotipi di frumento con maggiore contenuto di questi fitonutrienti.

I principali enzimi candidati che potrebbero permettere di incrementare il flusso carbonioso verso la produzione di antociani sono la PAL, la CHS e la F3'5'H (Gonzali *et al.*, 2009), che risultano in genere fortemente *up*-regolati nei genotipi viola (Butelli *et al.*, 2008; Chiu *et al.*, 2010). Al fine di garantire livelli elevati di scheletri carboniosi attraverso la via dei flavonoidi è però anche necessario verificare che non diventi limitante il flusso nella via dello scichimato, *pathway* comune che porta alla biosintesi dei tre amminoacidi aromatici e a tutti i metaboliti secondari che da essi derivano.

3.3.1. Messa a punto dei saggi enzimatici

Si è quindi proceduto alla messa a punto delle metodiche di saggio di cinque enzimi putativamente responsabili del controllo della biosintesi dei fenoli, usando come sistema sperimentale cellule in sospensione liquida di grano duro della *cultivar* Ofanto. Per quanto riguarda la DAHP sintasi e la PAL sono stati ottimizzati saggi spettrofotometrici: per il primo enzima la sintesi *in vitro* del DAHP è stata seguita attraverso un saggio chimico, mentre per il secondo si è seguita la conversione della fenilalanina in acido cinnamico mediante lettura diretta nell'UV. Per gli altri 3 enzimi, non essendo possibile utilizzare delle metodiche spettrofotometriche, la quantificazione della loro attività ha richiesto la separazione di substrati e/o prodotti per analisi mediante HPLC delle miscele di reazione.

3.3.2. La DAHP sintasi

I geni che codificano per il primo enzima della via dello scichimato sono indotti in risposta a diversi stress sia biotici che abiotici, condizioni che richiedono la sintesi massiva di composti fenolici per proteggere la pianta (Weaver e Herrmann, 1997; Herrmann e Weaver, 1999). Tuttavia, i dati di microarray presenti in letteratura hanno mostrato che i fattori di trascrizione selezionati e utilizzati per ingegnerizzare l'accumulo di antociani stimolano la trascrizione della maggior parte dei geni strutturali coinvolti nella via di sintesi dei fenilpropanoidi, ma non hanno effetto su quelli della via dello scichimico (Laitinen *et al.*, 2008). Esiste quindi la possibilità che nei genotipi viola la produzione di fenilalanina possa risultare un fattore limitante, e che l'attività della DAHP sintasi possa rappresentare un *collo di bottiglia* nel flusso di carbonio che porta alla produzione di antocianine. Per questo enzima nelle piante, a differenza di batteri e lieviti, non sono stati inoltre chiariti i meccanismi di regolazione alla base dell'omeostasi dei tre prodotti intermedi (fenilalanina, tirosina e triptofano) e dell'interazione tra metabolismo primario e metabolismo secondario.

3.3.2.1. Separazione cromatografica delle isoforme citosolica e cloroplastica della DAHP sintasi da cellule in coltura di *N. plumbaginifolia*

Nel caso della DAHP sintasi si è deciso di procedere alla caratterizzazione dell'enzima usando come sistema sperimentale una coltura cellulare della specie modello *Nicotiana plumbaginifolia*. Erano infatti disponibili dati preliminari ottenuti su questo sistema nell'ambito di un precedente lavoro (Forlani *et al.*, 1996, 1999) che avrebbero facilitato la verifica della possibilità di utilizzare condizioni di saggio specifiche, in grado di discriminare

tra le diverse forme presenti in genere nei vegetali superiori. Nelle piante, infatti, l'attività della DAHP sintasi è stata riscontrata sia nel citosol che nel plastidio: la prima isoforma utilizza come substrato preferenziale la glicolaldeide e come cofattore il Co^{2+} , mentre la seconda metabolizza esclusivamente l'E4P in presenza di Mn^{2+} (Ganson *et al.*, 1986). Tuttavia, a causa della possibilità di utilizzare triosi a tassi più elevati rispetto all'eritroso-4-fosfato (Doong *et al.*, 1992a) e la sua espressione scarsamente correlata con la modulazione della via di sintesi dell'acido corismico (Mori *et al.*, 2000), l'enzima cobalto-dipendente sembra essere coinvolto in altre vie metaboliche (Herrmann, 1995). Inizialmente è stato messo a punto un protocollo di separazione di tali isoforme basato sulla cromatografia a scambio ionico (Figura 123).

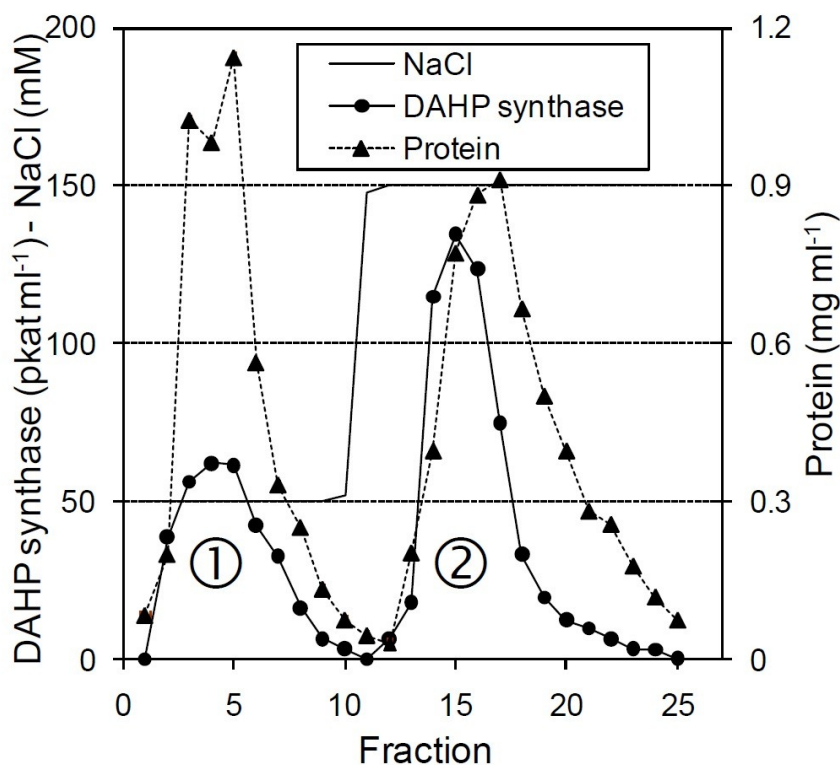


Figura 123.
 Risoluzione di due forme isoenzimatiche della DAHP sintasi mediante cromatografia a scambio anionico di estratti cellulari di *N. plumbaginifolia*.

Per identificare queste forme si sono utilizzate le due metodologie di saggio che dovrebbero discriminare tra le due attività, dal momento che la forma plastidiale dell'enzima non dovrebbe mostrare la capacità di usare come substrato la glicolaldeide (Doong *et al.*, 1992). I risultati ottenuti (Figura 124) hanno in effetti permesso di identificare come enzima citosolico l'attività non trattenuta dalla colonna (*pool 1*), e come la forma plastidiale quella trattenuta (*pool 2*). Gli stessi dati, però, hanno evidenziato che -almeno per gli enzimi di *N. plumbaginifolia*- la specificità delle condizioni non è assoluta: la forma citosolica mostra una attività pari a circa un quinto dell'attività massima anche con la miscela di reazione ottimale per la forma cloroplastica, e quest'ultima utilizza la glicolaldeide con una efficienza pari quasi al 50% di quella evidenziata con il substrato naturale, E4P. Ne deriva l'impossibilità, ai fini di una corretta quantificazione dei rispettivi livelli di attività, di poter ricorrere all'analisi di estratti grezzi. Nel proseguo del lavoro, quindi, i livelli di attività specifica sono stati quantificati previa separazione fisica delle due forme dell'enzima mediante cromatografia liquida.

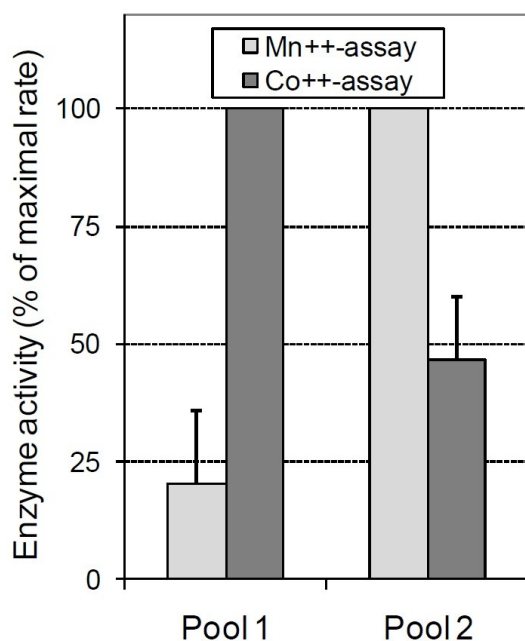


Figura 124. Identificazione della DAHP sintasi citosolica (*pool 1*) e plastidiale (*pool 2*) attraverso l'utilizzo di saggi enzimatici specifici per ciascuna isoforma.

3.3.2.2. L'andamento dei livelli di attività specifica della DAHP sintasi lungo il ciclo di crescita della coltura di *N. plumbaginifolia* evidenzia la presenza di due forme cloroplastiche

Utilizzando questa procedura, i livelli di attività della forma cloroplastica sono stati determinati durante le fasi di crescita della coltura cellulare. I dati ottenuti, riassunti in Figura 125, mostrano un profilo bifasico che è risultato altamente riproducibile. L'attività specifica è estremamente bassa nelle cellule quiescenti, ma aumenta rapidamente in modo transiente dopo il reinocolo. Successivamente si ha evidenza di un secondo aumento dell'attività enzimatica, coincidente con l'inizio della fase di crescita esponenziale. Infine, anche se le cellule si trovano ancora in fase di divisione attiva, i livelli mostrano un progressivo abbassamento, tornando a valori appena rilevabili.

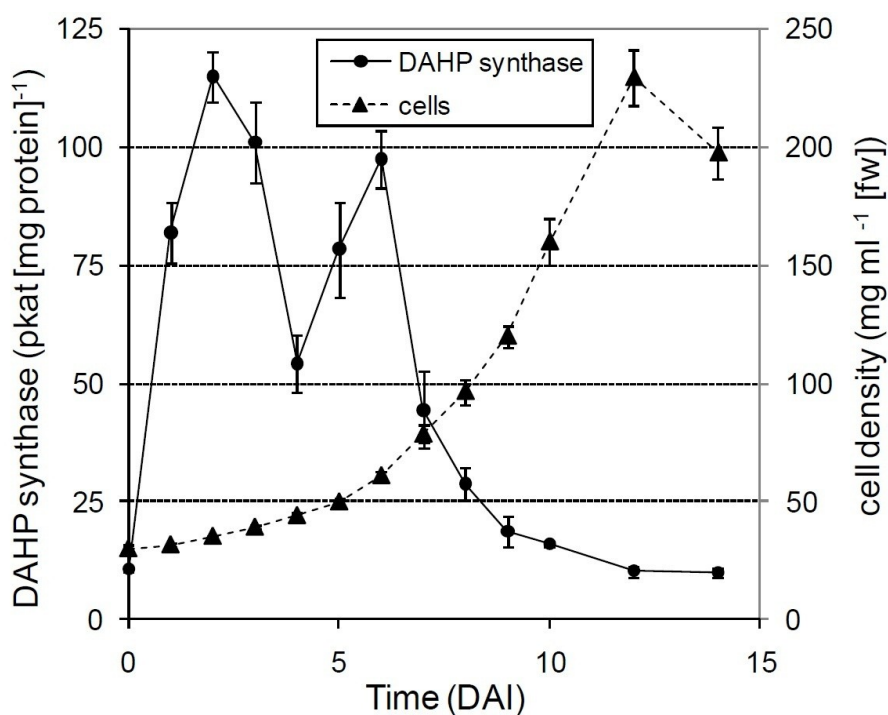


Figura 125. Livelli di attività enzimatica dell'isoforma plastidiale della DAHP sintasi durante il ciclo di crescita della coltura cellulare di *N. plumbaginifolia*. DAI, days after the inoculum.

I risultati ottenuti potrebbero dipendere dalla presenza di un solo enzima, che mostra una complessa regolazione a livello trascrizionale determinando livelli molto differenti di proteina nelle varie fasi di crescita del ciclo della coltura, oppure indicare la presenza di due diversi isoenzimi. Per ottenere ulteriori informazioni a riguardo, gli estratti di cellule raccolte a 2, 4 e 6 giorni dopo l'inoculo sono stati frazionati per cromatografia a scambio anionica per mezzo di un gradiente lineare di forza ionica. Attraverso queste condizioni è stato possibile risolvere almeno in parte due diversi picchi di attività DAHP sintasica Mn^{2+} dipendente (Figura 126). La ricromatografia separata dei due pool ottenuti ha mostrato la presenza di un singolo picco nella stessa posizione del cromatogramma (risultati non mostrati). I risultati, presi nel loro insieme, sembrano dunque suggerire che il *pattern* bifasico mostrato in Figura 125 possa dipendere dall'espressione differenziale di due isoforme plastidiali della DAHP sintasi.

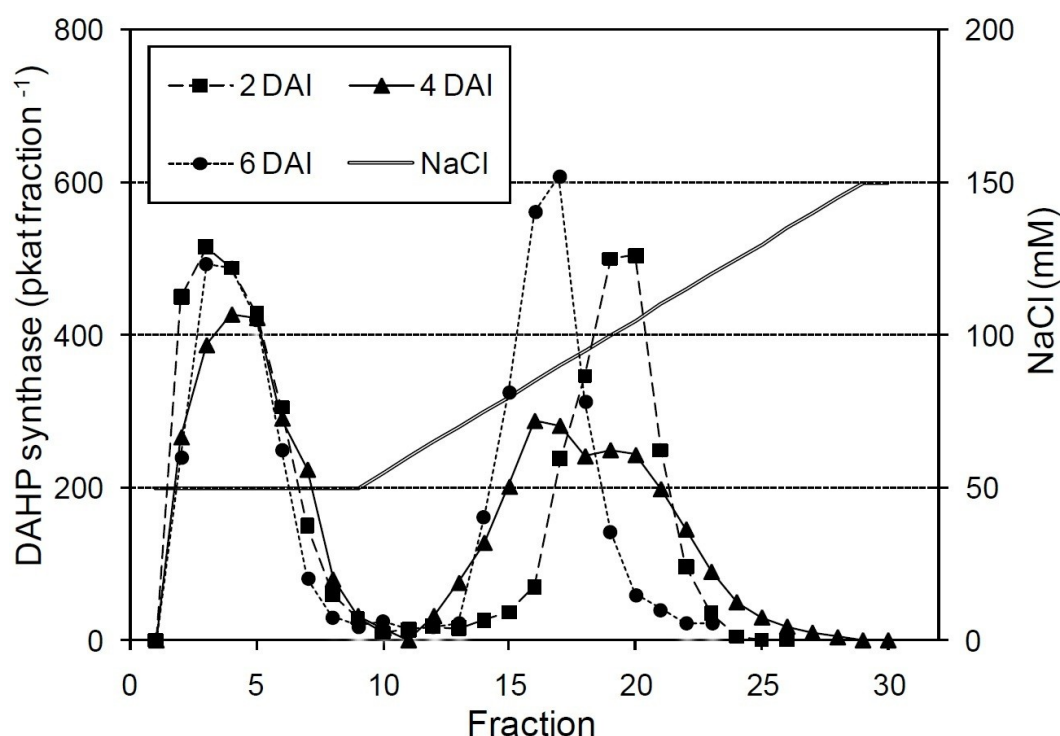


Figura 126. Profili di eluizione della attività della DAHP sintasi ottenuti mediante frazionamento su colonna di estratti preparati con cellule raccolte 2, 4 e 6 giorni dal reinoculo. Se la forma citosolica dell'enzima non viene trattenuta, l'analisi dell'eluato ottenuto mediante un gradiente lineare di forza ionica evidenzia la presenza di due picchi della forma stimolata dal Mn^{2+} , dato che sembra indicare l'esistenza di due isoforme cloroplastiche.

Utilizzando il protocollo messo a punto, la modulazione dei livelli di enzima è stata studiata in risposta a variazioni dei livelli intracellulari dei tre amminoacidi aromatici, incrementati o ridotti rispettivamente tramite la somministrazione esogena di fenilalanina, tirosina e triptofano, o il trattamento con dosi subletali dell'erbicida glifosato. Tali livelli sono variati in accordo con un meccanismo di repressione dell'espressione genica da prodotto finale. L'espressione di una delle due isoforme è stata però prevenuta solo quando le cellule sono state contestualmente trattate con glutamina, suggerendo che un meccanismo di *sensing* basato sui livelli di questo aminoacido possa essere alla base dell'induzione della DAHP sintasi in condizioni di carenza da azoto. Questi risultati, non riportati in dettaglio poichè

ottenuti nell'ambito di un altro lavoro di tesi, sembrano dunque suggerire che elevati livelli di concimazione azotata possano ridurre il flusso carbonioso nella via dello scichimico, portando in conseguenza a un ridotto accumulo di antociani e proantocianidine nei semi.

3.3.2.3. Analisi dell'espressione dei geni della DAHP sintasi cloroplastica in coltura cellulare di *N. plumbaginifolia*

Per ottenere ulteriori riscontri a favore di questo meccanismo bisognerebbe disporre degli strumenti per effettuare un'analisi dell'espressione dei due geni codificanti la DAHP sintasi stimolata dal Mn^{2+} in risposta alle fluttuazioni del contenuto amminoacidico. Fino a oggi due geni per forme cloroplastiche della DAHP sintasi sono stati descritti in alcune specie vegetali: *Arabidopsis* (*AtDHS1* e *AtDHS2*; Keith *et al.* 1991), patata (*StshkA* e *StshkB*; Dyer *et al.* 1990; Zhao e Herrmann 1992) e pomodoro (*LeDHS1* e *LeDHS2*; Görlach *et al.* 1995). In tutte queste specie un isogene è risultato trascritto ad alti livelli in risposta a stress meccanico, all'attacco di patogeni (Dyer *et al.* 1989; Keith *et al.* 1991) e al trattamento con elicitori. L'aumento della trascrizione di questo gene è spesso accompagnata da un'induzione simultanea della PAL: una delle due isoforme della DAHP sintasi sembra quindi coinvolta nella risposta a fattori di stress esterni in modo da produrre i composti fenolici necessari per la difesa della pianta da tali condizioni. Anche in riso sono stati identificati 2 geni codificanti la forma cloroplastica (*OsDAHPS1* and *OsDAHPS2*) (Sato *et al.* 2006) localizzati rispettivamente nei cromosomi 7 e 3. La sequenza amminoacidica di queste 2 isoforme contiene regioni altamente conservate rispetto a quelle identificate in *Arabidopsis*, patata e pomodoro. Nello stesso lavoro è stato dimostrato come solo il gene codificante una delle due isoforme, la *OsDAHPS1*, venga indotto per la sintesi di fenilpropanoidi, mentre l'altro (*OsDAHPS2*) non subisce induzione, avvalorando l'ipotesi che l'altra proteina sia legata alla produzione costitutiva degli amminoacidi necessari per la sintesi proteica.

L'analisi delle sequenze codificanti queste due forme di DAHP sintasi cloroplastica (Tabella 4) ha permesso di identificare dei domini altamente conservati ma non condivisi dalle due famiglie geniche in modo da poter disegnare dei *primers* potenzialmente in grado di discriminare tra le due isoforme. Questo approccio si è reso necessario poichè gli ortologi non sono stati sinora neppure parzialmente sequenziati nè in *N. plumbaginifolia* nè in *Nicotiana tabacum*.

Organismo	Nome	Sequenza genica	Famiglia
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>AtDHS1</i>	M74819	A
	<i>AtDHS2</i>	M74820	B
<i>Solanum lycopersicum</i>	<i>LeDHS1</i>	Z21792	B
	<i>LeDHS2</i>	Z21793	A
<i>Solanum tuberosum</i>	<i>StshkA</i>	J05191	A
	<i>StshkB</i>	M95201	B
<i>Oryza sativa</i>	<i>OsDAHPS1</i>	AB122057	A
	<i>OsDAHPS2</i>	AB122058	B

Tabella 4. Coppie di isogeni della DAHP sintasi utilizzate nell'analisi *in silico*.

Attraverso l'utilizzo dei programmi informatici *ClustalW2* per l'allineamento e lo studio dell'identità delle sequenze e *PriFi* per la progettazione dei *primers*, sono state disegnate due coppie di *primers* specifici per ogni famiglia genica (Tabella 5). Tali *primers* sono stati costruiti anche con l'intento di ottenere dei frammenti di amplificazione di elevate dimensioni, in modo da poter procedere anche al parziale sequenziamento dei due geni.

Coppie di primers per la DAHP sintasi (Famiglia A)				
	Sequence (5' ->3')	Length	Tm	
Primer pair 1				
Forward	ATGGCTGGGCAATTTGCAAAGCC	23	59.44	GC 52.17%
Reverse	ATGCACTCTGTGACGTTTTGGCCTG	25	60.17	GC 52.00%
product length = 890				
Primer pair 2				
Forward	AGCTGCCGAGTTACAGGGGAGACA	24	61.19	GC 58.33%
Reverse	ATGCACTCTGTGACGTTTTGGCCTG	25	60.17	GC 52.00%
product length = 832				

Coppie di primers per la DAHP sintasi (Famiglia B)				
Primer pair 1:				
Forward	GAAGCTTGGTGAGGCTGCATTGGG	24	60.53	GC 58.33%
Reverse	GTCATGCACATCGAAGAAAGCTCG	25	59.03	GC 52.00%
product length = 998				
Primer pair 2:				
Forward	GCGGAGCCATCCAAGACTGCAG	22	60.11	GC 63.64%
Reverse	GCACATCGAAGAAAGCTCGGACCTC	25	59.90	GC 56.00%
Product length = 1168				

Tabella 5. Coppie di *primers* putativamente specifici per ognuna delle due famiglie di geni codificanti per forme cloroplastiche della DAHP sintasi.

Per validare i *primers*, l'RNA totale è stato estratto da cellule raccolte in differenti fasi del ciclo cellulare. Dopo retro-trascrizione, aliquote pari a 50 ng di cDNA sono state usate per la reazione di PCR con le 4 coppie di *primers*. Miscele di reazione parallele sono state allestite con primers per i geni *housekeeping* dell'actina e della gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GADPDH), in modo da correggere per eventuali differenze nel processo di sintesi del cDNA. I risultati hanno mostrato in tutti i casi la comparsa dei prodotti di amplificazione attesi. Nelle Figure 127 e 128 vengono mostrati i gel relativi alle coppie che, in ognuno dei due casi, hanno evidenziato la migliore efficienza di amplificazione

Il confronto tra i due diversi *patterns* e l'assenza di contaminazione crociata dei diversi prodotti permette di concludere che le coppie di *primers* siano effettivamente in grado di amplificare selettivamente i due geni. Per quanto riguarda i *primers* disegnati per discriminare la *famiglia A*, le differenti intensità dell'amplificato sembrano mostrare una elevata espressione del gene immediatamente dopo il reinocolo della coltura, per poi decrescere gradualmente (Figura 127). Relativamente ai *primers* per la *famiglia B*, i segnali più forti sono invece quelli ottenuti dal cDNA preparato da cellule in fase esponenziale di crescita.

Sulla base di questo insieme di dati e al confronto con quelli riportati in Figura 125, l'isoforma 1 è stata identificata con il gene *DAHPsA*, l'isoforma 2 con il gene *DAHPsB*.

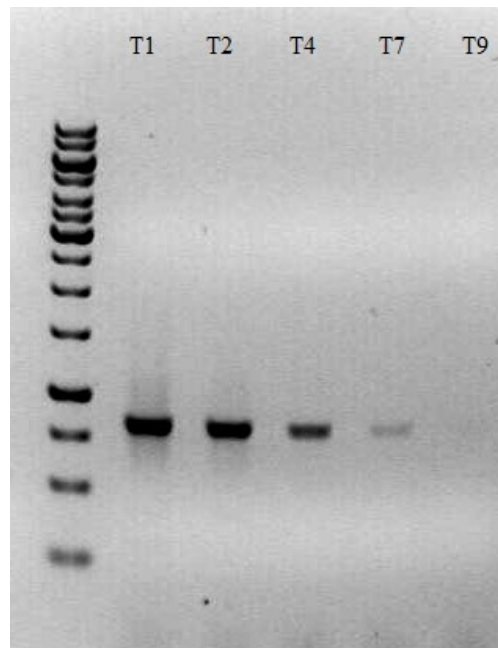


Figura 127. Prodotti di amplificazione, ottenuti dal cDNA proveniente da cellule di *N. plumbaginifolia* raccolte a tempi crescenti dopo il reinocolo della coltura, mediante l'uso della coppia 2 di primers per la *Famiglia A* delle forme cloroplastiche della DAHP sintasi.

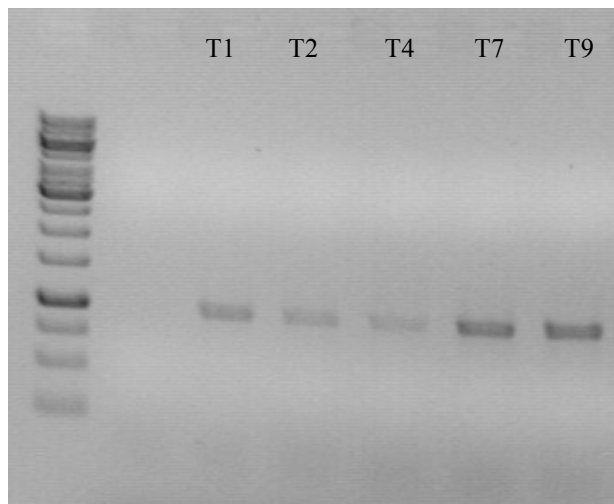


Figura 128. Prodotti di amplificazione, ottenuti dal cDNA proveniente da cellule di *N. plumbaginifolia* raccolte a tempi crescenti dopo il reinocolo della coltura, mediante l'uso della coppia 1 di primers per la *Famiglia B* delle forme cloroplastiche della DAHP sintasi.

3.3.2.4. Sequenza dei geni della DAHP sintasi cloroplastica di *N. plumbaginifolia*

Gli amplificati ottenuti sono stati quindi fatti sequenziare da un *service* esterno (BMR Genomics, Padova) in modo da verificare ulteriormente la specificità dei *primers* e ottenere maggiori informazioni sui due geni. Le bande ottenute mediante PCR sono state excise dal gel, purificate e inviate alla ditta. Le sequenze nucleotidiche ottenute, e quelle amminoacidiche corrispondenti all'*open reading frame* corretto, vengono riportate nelle Figure 129 e 130. Le sequenze amminoacidiche sono state infine utilizzate per effettuare un'analisi BLASTP con quelle presenti nel database di "UNIPROT" utilizzando il software di NCBI. I dati ottenuti (Tabella 6) hanno evidenziato elevati valori di identità e positività nei confronti delle DAHP sintasi appartenenti alle relative famiglie, confermando l'attribuzione delle due forme di *N. plumbaginifolia*. Nel loro insieme i risultati avvalorano quindi la presenza nei vegetali di più forme cloroplastiche dell'enzima, soggette a differente regolazione trascrizionale.

<i>Protein</i>	<i>Family</i>	<i>Identities</i>	<i>Positives</i>	<i>Gaps</i>	<i>Score</i>
Sequenza 1					
NtDAHPs1	A	247/261 (95%)	255/261 (97%)	0	531
StshkA	A	246/241 (94%)	251/261 (96%)	0	525
LeDHS2	A	245/261 (94%)	251/261 (96%)	0	524
OsDAHPS1	A	229/261 (88%)	248/261 (95%)	1	499
AtDHS1	A	223/261 (85%)	240/61 (91%)	0	485
Sequenza 2					
LeDHS1	B	291/299 (97%)	296/299 (98%)	0	620
StshkB	B	290/299 (97%)	295/299 (98%)	0	618
AtDHS2	B	262/299 (88%)	282/299 (94%)	0	561
OsDAHPS2	B	263/301 (87%)	284/301 (94%)	2	560

Tabella 6. Analisi mediante BLASTP delle sequenze delle due forme cloroplastiche di DAHP sintasi di *Nicotiana plumbaginifolia* con quelle presenti nel database *UNIPROT*.

3.3.3. Gli enzimi coinvolti nella sintesi delle antocianine sono espressi a bassissimi livelli sia in cellule in coltura che in semi maturi di grano

I protocolli di saggio messi a punto per la DAHP sintasi, quelli già disponibili per la PAL (Giberti *et al.*, 2012) e quelli tratti dalla letteratura per calcone sintasi, antocianidina sintasi e antocianidina reductasi sono stati quindi applicati all'analisi di estratti preparati da cellule in coltura della *cultivar* Ofanto. Tranne che per la DAHP sintasi, per cui non sono comunque state ottenute evidenze a favore della presenza di più forme cloroplastiche (dati non presentati), i livelli di attività specifica sono risultati estremamente modesti, ai limiti della sensibilità dei metodi. Tale possibilità era attesa, dal momento che le cellule in coltura in genere non esprimono se non a bassissimi livelli le vie metaboliche coinvolte nel metabolismo secondario. Per cercare di superare questo ostacolo le cellule sono state trattate con elicitori fungini (Giberti *et al.*, 2012), condizione in cui ci si può aspettare di ottenere un incremento del flusso carbonioso nelle vie che portano alla sintesi di fitoalessine. Tale aumento, valutato attraverso la determinazione dei livelli della PAL, è risultato però solo transiente (Figura 131). Tale risultato negativo può plausibilmente essere attribuito al fatto che tali preparati erano stati ottenuti da patogeni specifici di riso (Giberti *et al.*, 2012) e mais (Forlani, 2002), e non da ceppi virulenti di patogeni di grano, che non è stato possibile ottenere dalle altre unità operative coinvolte nel progetto ALISAL.

In attesa che fossero raccolti i materiali sperimentali su cui era stata programmata la determinazione dei livelli di attività (i semi immaturi a diversi stadi di sviluppo), i protocolli di saggio sono stati applicati anche a estratti da seme secco di alcuni genotipi, pigmentati (Sebesta Blu 1, Word Seed3, MP3, ELS 6404-140-2 e ELS 6404-115-5) e non (Preco e ELS 6404-116-1), forniti dal Centro di ricerca per la genomica e la postgenomica animale e vegetale con sede a Fiorenzuola d'Arda. I livelli di DAHP sintasi, estremamente bassi, non hanno mostrato differenze significative tra genotipi. Quelli di calcone sintasi, antocianidina sintasi e antocianidina reductasi sono risultati in tutti i casi al di sotto dei limiti di sensibilità dei metodi (dati non mostrati).

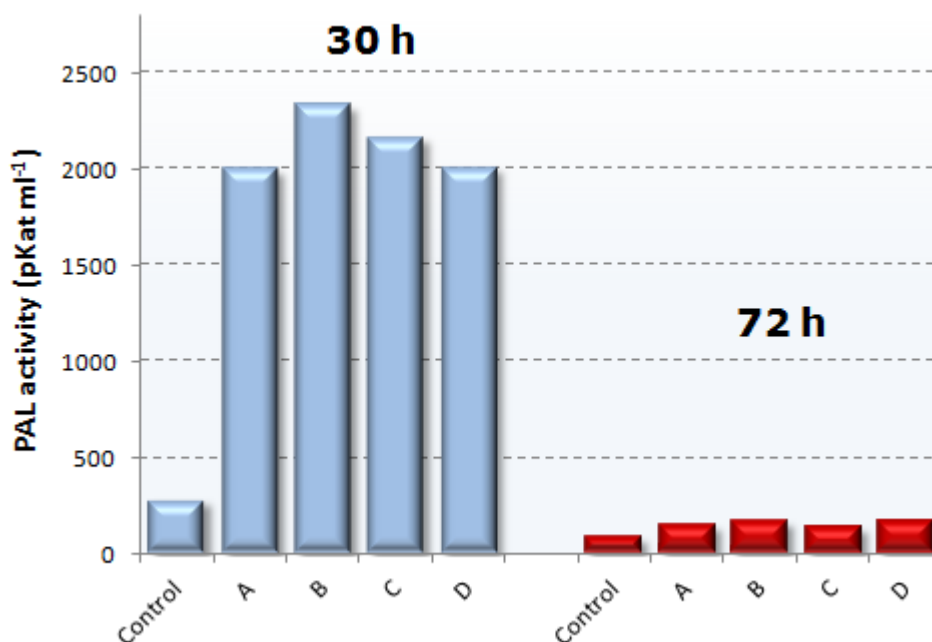


Figura 131. Livelli di attività specifica della PAL in estratti preparati da cellule in coltura di grano a tempi crescenti dopo il trattamento con elicitori preparati da patogeni fungini di riso (Giberti *et al.*, 2012) e mais (Forlani, 2002). A 30 ore si nota un significativo incremento, che però 72 ore dopo il trattamento risulta quasi completamente revertito.

Relativamente alla PAL, sono stati invece misurati valori di attività specifica notevolmente diverse, ma senza che vi fosse una qualsivoglia relazione con l'accumulo di antocianine o proantocianidine negli stessi materiali (Figura 132).



Figura 132. Livelli di attività della PAL in estratti preparati da semi maturi di diversi genotipi di grano, pigmentati e non. I dati sono stati posti a paragone con il corrispondente contenuto di antocianine e antocianidine (dati cortesemente forniti dal Dr. A. Gianinetti, CRA-GPG, Fiorenzuola).

3.3.4. In semi immaturi di genotipi pigmentati sia di grano tenero che di grano duro i livelli di attività specifica della PAL mostrano *patterns* differenti da quelli evidenziabili in genotipi non pigmentati

Un quadro del tutto differente è però emerso quando l'analisi è stata effettuata su campioni raccolti nel corso delle fasi di riempimento della granella, forniti nel luglio 2013 dal Dr. Pasquale DeVita (Centro di Ricerca per la Cerealicoltura, Foggia). Se nel caso di DAHP sintasi, calcone sintasi, antocianidina sintasi e antocianidina reduttasi i risultati non si sono discostati da quelli ottenuti sul seme secco, un dato interessante è emerso per la PAL. Nei genotipi pigmentati di grano tenero sono stati infatti evidenziati livelli pressoché doppi di attività specifica rispetto al genotipo non pigmentato già dalla fase lattea (Figura 133).

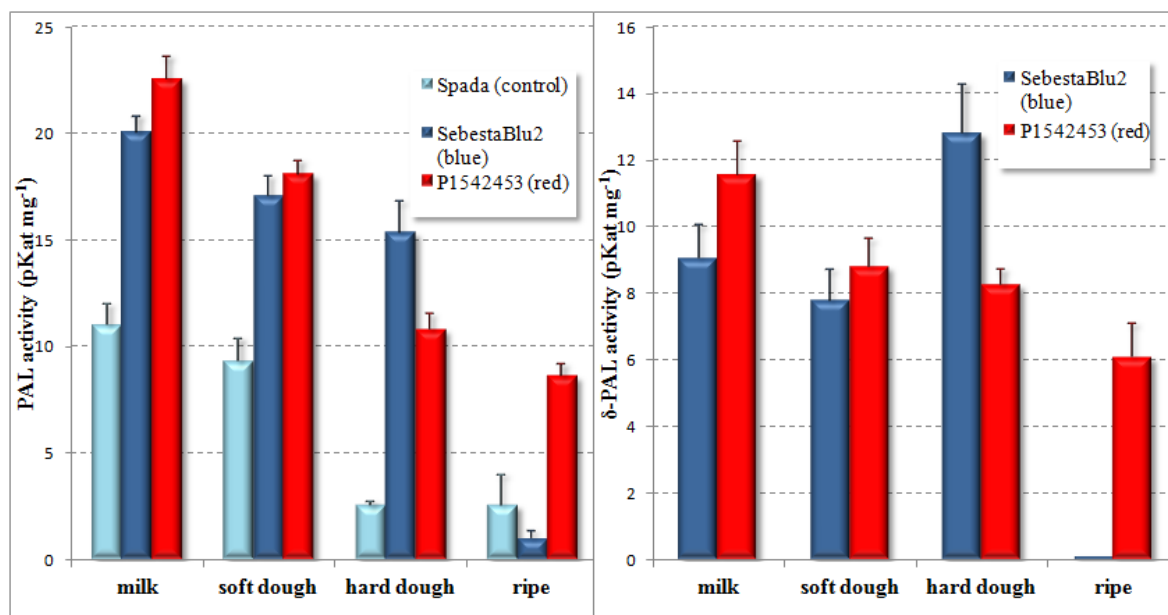


Figura 133. I livelli di attività specifica della PAL in semi immaturi di un genotipo non pigmentato (Spada) sono stati confrontati con quelli di un genotipo con aleurone blu (Sebesta Blue 2) e di uno con pericarpo rosso (P1542453). La *cultivar* blu accumula in maggior parte antocianine, mentre quella rossa è ricca in proantocianidine. Il pannello di sinistra riporta i valori assoluti di attività, mentre quello di destra mostra le differenze rispetto al genotipo di riferimento. I dati sono espressi come media \pm SE di tre o più repliche indipendenti.

Se si considera che il tessuto in cui antocianine e proantocianidine sono prodotti non rappresenta che una piccola frazione del seme, in esso i livelli dell'enzima dovrebbero quindi essere decine di volte superiori a quelli basali. Nel genotipo blu i livelli si mantengono elevati sino alla fase tardiva di maturazione cerea, mentre in fase fisiologica scendono al di sotto di quelli, già bassi, presenti nella varietà di riferimento. Nel genotipo rosso, al contrario, l'attività specifica della PAL è risultata elevata anche in fase fisiologica.

Un quadro simile, ma con alcune differenze, è stato ottenuto anche in grano duro. Durante la fase iniziale, di maturazione lattea, i livelli di attività in genotipi pigmentati non sono risultati differenti da quelli presenti nel riferimento non pigmentato. Una differenza significativa è stata invece evidenziata a partire dalla precoce fase cerea (Figura 134). Anche in questo caso nel genotipo viola l'attività è tornata a livelli basali nella transizione tra la fase cerea e quella fisiologica, mentre nel genotipo rosso essa si è mantenuta sempre significativamente elevata.

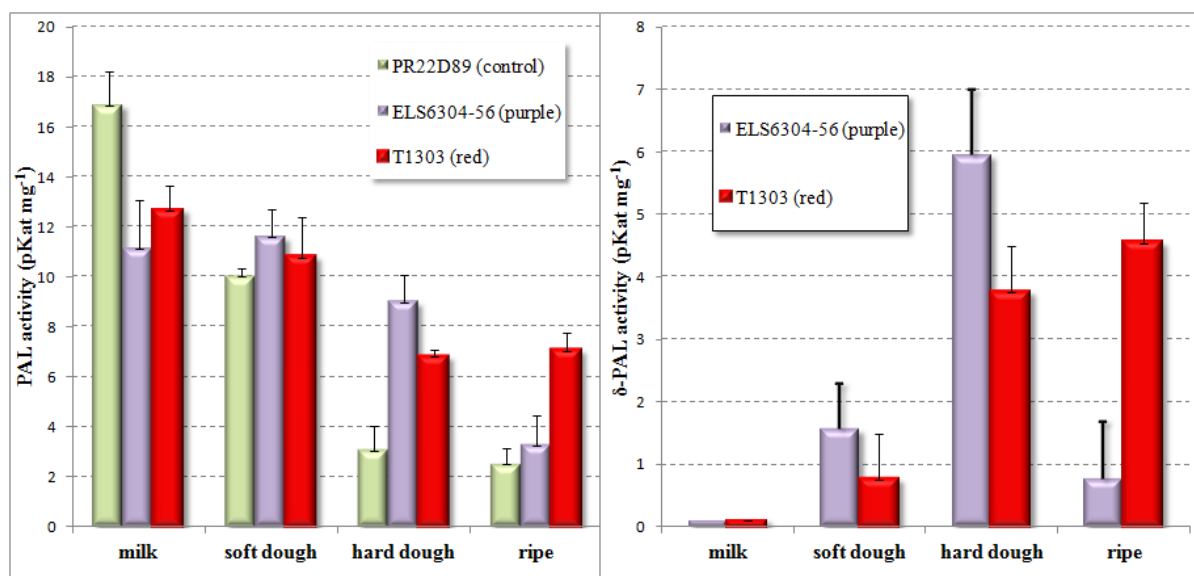


Figura 134. I livelli di attività specifica della PAL in semi immaturi di un genotipo non pigmentato (PR22D89) sono stati confrontati con quelli di un genotipo con aleurone viola (ELS6304-56) e uno con pericarpo rosso (T1303). La *cultivar* viola accumula principalmente antocianine, mentre quella rossa è ricca in proantocianidine. Il pannello di sinistra riporta i valori assoluti di attività, mentre quello di destra mostra le differenze rispetto al genotipo di controllo. I dati sono espressi come media \pm SE di tre o più repliche indipendenti.

Visto l'esiguo numero di genotipi su cui queste determinazioni sono state condotte, i dati devono necessariamente essere considerati preliminari. Nondimeno, il fatto che gli stessi andamenti siano stati sostanzialmente evidenziati sia in grano tenero che in grano duro sembra avvalorare che questi *trends* siano collegati alla capacità di accumulo dei fitonutrienti nei genotipi pigmentati. In particolare, la determinazione dei livelli della PAL durante la fase cerosa sembra rappresentare un tratto distintivo in questo senso, con la possibilità di discriminare varietà produttrici di antocianine rispetto a quelle che accumulano proantocianidine sulla base del fatto che una elevata attività specifica si mantenga anche con la transizione alla fase fisiologica.

Una volta confermati su un insieme più numeroso di varietà, questi risultati potrebbero dunque rappresentare uno strumento efficace per la selezione di genotipi con un accresciuto contenuto di fenoli nel seme. Dal momento che in genere sono presenti in ogni genoma numerosi geni codificanti per diverse forme di PAL, l'individuazione di quale sia in particolare indotto in queste fasi nei genotipi pigmentati fornirebbe un gene candidato per programmi di selezione assistita. Un simile risultato è stato ottenuto in riso per la tolleranza al patogeno *Magnaporthe oryzae*, per cui elevati livelli di espressione del gene *PAL04* coincidono con una maggiore resistenza all'infezione fungina (Giberti *et al.*, 2012).

4. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

I dati ottenuti nell'ambito del presente studio hanno consentito di ottenere dei riscontri originali rispetto al ruolo di alcuni enzimi nell'accumulo di fitonutrienti nei tessuti edibili di specie di interesse agrario, come grano e pesco.

La purificazione di due forme di lipossigenasi di grano duro e la loro caratterizzazione biochimica, nonché lo studio della loro espressione lungo la curva di crescita della coltura, hanno permesso la loro identificazione come Lpx-2, un enzima appartenente alla categoria delle 13-LOX non cloroplastiche coinvolte principalmente nella mobilitazione dei lipidi di riserva durante la germinazione del seme, e Lpx-B1.2, una 9-LOX probabilmente coinvolta nella risposta iper-sensibile della pianta, nell'ambito della quale agisce metabolizzando gli acidi grassi delle membrane plastidiali. I risultati ottenuti suggeriscono comunque per entrambe un possibile ruolo nella risposta della pianta all'attacco patogeno. La determinazione delle loro proprietà cinetiche ha mostrato modeste differenze relativamente a ottimo di pH e affinità per il linoleato ma, a parità di produzione di idroperossidi, una del tutto differente attività di *bleaching* dei carotenoidi, e un diverso ottimo di pH per le due reazioni. Le indagini effettuate a riguardo hanno permesso di chiarire che la diversa efficienza di *bleaching* era in realtà dovuta alla compresenza di un enzima capace di utilizzare come substrato gli idroperossidi. L'aggiunta di tale enzima, parzialmente purificato, a una LOX pura disponibile commercialmente ne ha aumentato l'efficienza di ossidazione del β -carotene dall'1 al 36%. Tali evidenze, sin qui non descritte in letteratura, potrebbero aprire nuove prospettive per la selezione di genotipi con ridotta attività catabolica e la messa a punto del processo di pastificazione, ai fini di ottenere un prodotto finale con un elevato contenuto di questi fitonutrienti.

L'espressione eterologa della CCD4 di melo e la sua caratterizzazione *in vitro* hanno permesso di ottenere evidenze della sua capacità di catalizzare il *bleaching* del β -carotene, pur se a livelli molto modesti, e di utilizzare con maggiore efficienza il principale prodotto di reazione, il *trans*- β -apo-8'-carotenale. Se confermato sull'enzima di altre specie vegetali, questo risultato potrebbe confutare la teoria che vede la CCD1 coinvolta nella produzione dei composti volatili a partire dalla dialdeide, e la CCD4 responsabile solamente dell'idrolisi iniziale del carotenoide. È stato d'altra parte messo a punto un protocollo per la rapida purificazione di cromoplasti dalla polpa dei frutti di pesco, su cui è stato possibile evidenziare un significativo *bleaching* del β -carotene. L'attività è stata confermata mediante analisi per HPLC, che ha mostrato la progressiva scomparsa del substrato ma senza che a questo corrispondesse la comparsa di altri picchi, suggerendo che l'attività delle diossigenasi possa rappresentare il passaggio limitante nell'ossidazione dei carotenoidi. Nonostante i numerosi tentativi, non è stato possibile effettuare una sia pur parziale purificazione degli enzimi responsabili, dal momento che il frazionamento cromatografico degli estratti ha comportato la totale scomparsa della attività. L'osservazione che tale perdita avviene anche per semplice trattamento dei preparati con dosi di detergenti inferiori alla concentrazione micellare critica ha portato a rafforzare l'ipotesi di un complesso multienzimatico in cui la CCD4 trovi collocazione funzionale. Il protocollo di saggio è stato applicato a genotipi isogenici di pesco in cui, a seguito di una singola mutazione, si è determinata la variazione del colore della pasta, da gialla a bianca e viceversa. I risultati hanno evidenziato un diverso *pattern* di attività specifica nel corso del processo di sviluppo del frutto. La possibilità che l'attività misurata sia proprio quella della CCD4 è stata avvalorata dall'immunoanalisi condotta con anticorpi policlonali indotti in topo contro peptidi immunogenici disegnati sulla base delle sequenze delle CCD4 di pesco e melo. Nel loro insieme i dati sono risultati compatibili con il sistema allelico della *PpCCD4*, dettagliatamente caratterizzato nel frattempo a livello molecolare. Il

saggio messo a punto sembra dunque rappresentare la prima metodica mai descritta per la quantificazione dell'attività della CCD4 in estratti da tessuti vegetali. Il suo utilizzo, vista la complessità del sistema genico, potrebbe rappresentare un metodo molto più rapido e affidabile di quello molecolare per la futura selezione di genotipi con ridotti livelli di attività e, quindi, con maggiori concentrazioni di carotenoidi.

La messa a punto e l'applicazione di metodi di saggio per 5 enzimi putativamente responsabili del controllo del flusso carbonioso nella via metabolica che porta alla sintesi di antocianine e proantocianidine ha portato alla individuazione di due isoforme a localizzazione plastidiale della DAHP sintasi nella specie-modello *Nicotiana plumbaginifolia*, che sono state parzialmente sequenziate e la cui espressione differenziale è stata seguita lungo il ciclo di crescita della coltura. Quando i livelli di attività specifica sono stati misurati in estratti da seme secco di alcuni genotipi, pigmentati e non, quelli della DAHP sintasi, estremamente bassi, non hanno mostrato differenze significative. Quelli di calcone sintasi, antocianidina sintasi e antocianidina reductasi sono risultati al di sotto dei limiti di sensibilità dei metodi. Relativamente alla PAL, invece, sono stati misurate attività specifiche notevolmente diverse, ma senza che vi fosse una qualsivoglia relazione con la produzione e l'accumulo di fenoli. Un quadro del tutto differente è però emerso quando l'analisi è stata effettuata su campioni raccolti durante le fasi di riempimento della granella. Se nel caso degli altri enzimi i risultati non si sono discostati da quelli ottenuti sul seme secco, un *pattern* estremamente interessante è emerso per la PAL. Nei genotipi pigmentati di grano tenero livelli pressochè doppi di attività specifica rispetto al controllo non pigmentato sono stati infatti misurati già dalla fase lattea. Se si considera che il tessuto in cui antocianine e proantocianidine sono prodotti non rappresenta che una piccola frazione del seme, in esso i livelli dell'enzima devono risultare decine di volte superiori a quelli basali. Nel loro insieme i risultati, sicuramente da approfondire in futuro in modo da estendere le determinazioni a un insieme più numeroso di varietà, potrebbero dunque fornire preziose indicazioni per la selezione di genotipi con un accresciuto contenuto di fenoli nel seme. La determinazione dei livelli della PAL durante la fase cerosa sembra infatti rappresentare un discriminante in questo senso, con la possibilità di distinguere varietà produttrici di antocianine rispetto a quelle che accumulano proantocianidine sulla base del fatto che una elevata attività specifica si mantenga anche con la transizione alla fase fisiologica. Visto che diverse isoforme della PAL sono presenti in grano, sarebbe interessante indagare quali siano responsabili delle diversità riscontrate, verificandone l'espressione nelle varie fasi dello sviluppo del seme e nei vari genotipi.

In tutti e tre i casi, dunque, i risultati ottenuti hanno permesso di identificare un possibile marcatore per discriminare varietà con un accresciuto contenuto di carotenoidi e fenoli, e di mettere a punto le relative metodiche di saggio per stimarne la presenza nei tessuti vegetali. In futuro la determinazione dei livelli di attività specifica dell'enzima che utilizza gli idroperossidi prodotti dalla LOX per il *bleaching* del β -carotene, della CCD4 nei cromoplasti e della PAL nei diversi stadi di maturazione del seme potrebbero rappresentare un utile strumento per il *breeding* assistito di genotipi con maggiori livelli di questi fitonutrienti.

5. BIBLIOGRAFIA

- Abdel-Aal, E. S. M., & Hucl, P. (2003). Composition and stability of anthocyanins in blue-grained wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*, 2174–2180.
- Abdel-Aal, E. S. M., Young, J. C., & Rabalski, I. (2006). Anthocyanin composition in black, blue, pink, purple, and red cereal grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*, 4696–4704.
- Abdel-Aal, E., Young, J., Rabalski, I., Hucl, P., & Fregeau-Reid, J. (2007). Identification and quantification of seed carotenoids in selected wheat species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 787–794.
- Abdel-Aal, E.-S. M., & Hucl, P. (1999). A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. *Cereal Chemistry*, *76*(3), 350–354.
- Achnine, L., Blancaflor, E. B., Rasmussen, S., & Dixon, R. A. (2004). Colocalization of L-phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase for metabolic channeling in phenylpropanoid biosynthesis. *The Plant Cell*, *16*, 3098–3109.
- Acosta, I. F., Laparra, H., Romero, S. P., Schmelz, E., Hamberg, M., Mottinger, J. P., ... Dellaporta, S. L. (2009). Tasselseed1 is a lipoxygenase affecting jasmonic acid signaling in sex determination of maize. *Science (New York, N.Y.)*, *323*(5911), 262–5.
- Adami, M., Franceschi, P., Brandi, F., Liverani, A., Giovannini, D., Rosati, C., ... Tartarini, S. (2013). Identifying a carotenoid cleavage dioxygenase (ccd4) gene controlling yellow/white fruit flesh color of peach. *Plant Molecular Biology Reporter*, *31*(5), 1166–1175.
- Agnetti, G., Bordoni, a, Angeloni, C., Leoncini, E., Guarnieri, C., Caldarera, C. M., ... Hrelia, S. (2005). Green tea modulation of inducible nitric oxide synthase in hypoxic/reoxygenated cardiomyocytes. *Biochimie*, *87*(5), 457–60.
- Agustí, J., Zapater, M., Iglesias, D. J., Cercós, M., Tadeo, F. R., & Talón, M. (2007). Differential expression of putative 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenases and abscisic acid accumulation in water stressed vegetative and reproductive tissues of citrus. *Plant Science*, *172*(1), 85–94.
- Aiello, L. C., & Wheeler, P. (1995). The expensive-tissue hypothesis the brain and the digestive evolution. *Current Anthropology*, *36*(2), 199–221.
- Aksamit-Stachurska, A., Korobczak-Sosna, A., Kulma, A., & Szopa, J. (2008). Glycosyltransferase efficiently controls phenylpropanoid pathway. *BMC Biotechnology*, *8*(25).
- Albert, N. W., Davies, K. M., Lewis, D. H., Zhang, H., Montefiori, M., Brendolise, C., ... Schwinn, K. E. (2014). A conserved network of transcriptional activators and repressors regulates anthocyanin pigmentation in eudicots. *The Plant Cell*, *26*, 962–80.
- Alquézar, B., Zacarías, L., & Rodrigo, M. J. (2009). Molecular and functional characterization of a novel chromoplast-specific lycopene beta-cyclase from *Citrus* and its relation to lycopene accumulation. *Journal of Experimental Botany*, *60*(6), 1783–97.
- Al-sane, K. O., Povero, G., & Perata, P. (2011). Anthocyanin tomato mutants: Overview and characterization of an anthocyanin-less somaclonal mutant. *Plant Biosystems*, *145*(2), 436–444.
- Annunziata, A., & Vecchio, R. (2011). Factors affecting italian consumer attitudes toward functional foods. *AgBioForum*, *14*(1), 20–32.
- Arai, S. (1996). Studies on functional foods in Japan-state of the art. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *60*(1), 9–15.
- Aubert, C., Ambid, C., Baumes, R., & Gunata, Z. (2003). Investigation of bound aroma constituents of yellow-fleshed nectarines (*Prunus persica* L. Cv. *Springbright*). Changes in bound aroma profile during maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*, 6280–6286.

- Auldridge, M. E., Block, A., Vogel, J. T., Dabney-Smith, C., Mila, I., Bouzayen, M., ... Klee, H. J. (2006a). Characterization of three members of the *Arabidopsis* carotenoid cleavage dioxygenase family demonstrates the divergent roles of this multifunctional enzyme family. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 45(6), 982–93.
- Auldridge, M. E., McCarty, D. R., & Klee, H. J. (2006b). Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(3), 315–21.
- Bachmann, Y. I. F., Ho, A., M., & Kindl, H. (1998). All three acyl moieties of trilinolein are efficiently oxygenated by recombinant His-tagged lipid body lipoxygenase in vitro. *FEBS Letters*, 431, 433–436.
- Bagnaresi, P., Cattivelli, L., Trono, D., & Ranalli, P. (2009). Strategie per l'accumulo nelle piante di prodotti di interesse nutrizionale e industriale. *Le Piante Industriali per Una Agricoltura Multifunzionale*.
- Bakhshi, D., & Arakawa, O. (2006). Induction of phenolic compounds biosynthesis with light irradiation in the Tesh of red and yellow apples. *Journal of Applied Horticulture*, 8(2), 101–104.
- Baldermann, S., Kato, M., Fleischmann, P., & Watanabe, N. (2012). Biosynthesis of α - and β -ionone, prominent scent compounds, in flowers of *Osmanthus fragrans*. *Acta Biochimica Polonica*, 59(1), 79–81
- Baldermann, S., Naim, M., & Fleischmann, P. (2005). Enzymatic carotenoid degradation and aroma formation in nectarines. *Food Research International*, 38, 833–836.
- Bannenberg, G., Martínez, M., Hamberg, M., & Castresana, C. (2009). Diversity of the enzymatic activity in the lipoxygenase gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Lipids*, 44(2), 85–95.
- Bell, E., Creelman, R. A., & Mullet, J. E. (1995). A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Biology*, 92, 8675–8679.
- Bertazzini M. (2009). Ottimizzazione della produzione di biomassa algale: caratterizzazione della composizione di due ceppi di *Arthrospira* sp. cresciuti a diversi valori di irradianza. Tesi di laurea in Biotecnologie Agro-Industriali, Università di Ferrara.
- Billiau, A., & Matthys, P. (2001). Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *Journal of Leukocyte Biology*, 70, 849–860.
- Blée, E. (2002). Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends in Plant Science*, 7(7), 315–322.
- Blot, W. J., Taylor, P. R., Guo, W., Dawsey, S., Wang, G. Q., Yang, C. S., ... Li, G. Y. (1994). Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population. *Journal of the National Cancer Institute*, 86(21), 1645–1648.
- Booker, J., Auldridge, M., Wills, S., McCarty, D., Klee, H., & Leyser, O. (2004). MAX3/CCD7 is a carotenoid cleavage dioxygenase required for the synthesis of a novel plant signaling molecule. *Current Biology : CB*, 14(14), 1232–1238.
- Bordoni, A., Hrelia, S., Angeloni, C., Giordano, E., Guarnieri, C., Caldarrera, C. M., & Biagi, P. L. (2002). Green tea protection of hypoxia/reoxygenation injury in cultured cardiac cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(2), 103–111.
- Borrelli, G. M., De Leonardi, a. M., Fares, C., Platani, C., & Di Fonzo, N. (2003). Effects of modified processing conditions on oxidative properties of semolina dough and pasta. *Cereal Chemistry*, 80(2), 225–231.
- Borrelli, G. M., De Leonardi, a. M., Platani, C., & Troccoli, a. (2008). Distribution along durum wheat kernel of the components involved in semolina colour. *Journal of Cereal Science*, 48(2), 494–502.
- Borrelli, G. M., Troccoli, A., Fonzo, N. Di, & Fares, C. (1999). Durum wheat lipoxygenase activity and other quality parameters that affect pasta color. *Cereal Chemistry*, 76(3), 335–340.
- Botella-Pavía, P., Besumbes, O., Phillips, M. a, Carretero-Paulet, L., Boronat, A., & Rodríguez-Concepción, M. (2004). Regulation of carotenoid biosynthesis in plants: evidence for a key role

- of hydroxymethylbutenyl diphosphate reductase in controlling the supply of plastidial isoprenoid precursors. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 40(2), 188–99.
- Bouvier, F., Dogbo, O., & Camara, B. (2003a). Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annatto). *Science (New York, N.Y.)*, 300(5628), 2089–2091.
- Bouvier, F., Isner, J.-C., Dogbo, O., & Camara, B. (2005). Oxidative tailoring of carotenoids: a prospect towards novel functions in plants. *Trends in Plant Science*, 10(4), 187–194.
- Bouvier, F., Suire, C., Mutterer, J., & Camara, B. (2003b). Oxidative remodeling of chromoplast carotenoids: identification of the carotenoid dioxygenase CsCCD and CsZCD genes involved in *Crocus* secondary metabolite biogenesis. *The Plant Cell*, 15(1), 47–62.
- Bouwmeester, H. J., Roux, C., Lopez-Raez, J. A., & Bécard, G. (2007). Rhizosphere communication of plants, parasitic plants and AM fungi. *Trends in Plant Science*, 12(5), 224–230.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Brandi, F., Bar, E., Mourgues, F., Horvath, G., Turcsi, E., Giuliano, G., ... Rosati, C. (2011). Study of “Redhaven” peach and its white-fleshed mutant suggests a key role of CCD4 carotenoid dioxygenase in carotenoid and norisoprenoid volatile metabolism. *BMC Plant Biology*, 11(1), 24.
- Brash, A. R. (1999). Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *Journal of Biological Chemistry*, 274(34), 23679–23682.
- Brash, A. R., & Song, W. (1996). Detection, assay, and isolation of allene oxide synthase. *Methods in Enzymology*, 272, 250–259.
- Braun, L., & Cohen, M. (2010). Herbs & Natural Supplements: an evidence-based guide. *Third Edition*.
- Bréhélin, C., Kessler, F., & van Wijk, K. J. (2007). Plastoglobules: versatile lipoprotein particles in plastids. *Trends in Plant Science*, 12(6), 260–266.
- Brill, F. (2009). Literature review : The role of carotenoids as functional foods in disease prevention and treatment. *Nutrition*, 1–17.
- Brogna, S., & Wen, J. (2009). Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) mechanisms. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(2), 107–113.
- Browse, J. (2009). The power of mutants for investigating jasmonate biosynthesis and signaling. *Phytochemistry*, 70(13-14), 1539–1546.
- Burbidge, A., Grieve, T. M., Jackson, A., Thompson, A., McCarty, D. R., & Taylor, I. B. (1999). Characterization of the ABA-deficient tomato mutant notabilis and its relationship with maize Vp14. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 17(4), 427–431.
- Burbulis, I. E., & Winkel-Shirley, B. (1999). Interactions among enzymes of the *Arabidopsis* flavonoid biosynthetic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(22), 12929–12934.
- Burkhardt, P. K., Beyer, P., Wünn, J., Klöti, a, Armstrong, G. a, Schledz, M., ... Potrykus, I. (1997). Transgenic rice (*Oryza sativa*) endosperm expressing daffodil (*Narcissus pseudonarcissus*) phytoene synthase accumulates phytoene, a key intermediate of provitamin A biosynthesis. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 11(5), 1071–1078.
- Bustos, D. V., Riegel, R., & Calderini, D. F. (2012). Anthocyanin content of grains in purple wheat is affected by grain position, assimilate availability and agronomic management. *Journal of Cereal Science*, 55(3), 257–264.
- Butelli, E., Titta, L., Giorgio, M., Mock, H.-P., Matros, A., Peterek, S., ... Martin, C. (2008). Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors. *Nature Biotechnology*, 26(11), 1301–1308.

- Buzzini, P., Arapitsas, P., Goretti, M., Branda, E., Turchetti, B., Pinelli, P., ... Romani, A. (2008). Antimicrobial and antiviral activity of hydrolysable tannins. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 8(12), 1179–1187.
- Caldelari, D., Wang, G., Farmer, E. E., & Dong, X. (2011). *Arabidopsis* lox3 lox4 double mutants are male sterile and defective in global proliferative arrest. *Plant Molecular Biology*, 75(1-2), 25–33.
- Campbell, R., Ducreux, L. J. M., Morris, W. L., Morris, J. A., Suttle, J. C., Ramsay, G., ... Taylor, M. A. (2010). The metabolic and developmental roles of carotenoid cleavage dioxygenase 4 from potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Physiology*, 154(October), 656–664.
- Cappelli, P., & Vannucchi, V. (2005). *Chimica degli alimenti, conservazione e trasformazioni, terza edizione, Zanichelli*, 582–611.
- Carrera, a, Echenique, V., Zhang, W., Helguera, M., Manthey, F., Schragar, A., ... Dubcovsky, J. (2007). A deletion at the Lpx-B1 locus is associated with low lipoxygenase activity and improved pasta color in durum wheat (*Triticum turgidum* ssp. *durum*). *Journal of Cereal Science*, 45(1), 67–77.
- Carretero-Paulet, L., Cairó, A., Botella-Pavía, P., Besumbes, O., Campos, N., Boronat, A., & Rodríguez-Concepción, M. (2006). Enhanced flux through the methylerythritol 4-phosphate pathway in *Arabidopsis* plants overexpressing deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase. *Plant Molecular Biology*, 62(4-5), 683–695.
- Casey, R., & Hughes, R. K. (2004). Recombinant lipoxygenases and oxylipin metabolism in relation to food quality. *Food Biotechnology*, 18(2), 135–170.
- Cazzonelli, C. I., & Pogson, B. J. (2010). Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science*, 15(5), 266–274.
- Cazzonelli, C. I., Cuttriss, A. J., Cossetto, S. B., Pye, W., Crisp, P., Whelan, J., ... Pogson, B. J. (2009). Regulation of carotenoid composition and shoot branching in *Arabidopsis* by a chromatin modifying histone methyltransferase, SDG8. *The Plant Cell*, 21(1), 39–53.
- Chahinian, H., Sias, B., & Carriere, F. (2000). The C-terminal domain of pancreatic lipase: functional and structural analogies with c2 domains. *Current Protein & Peptide Science*, 1, 91–103.
- Chauvin, A., Caldeleri, D., Wolfender, J. L., & Farmer, E. E. (2013). Four 13-lipoxygenases contribute to rapid jasmonate synthesis in wounded *Arabidopsis thaliana* leaves: a role for lipoxygenase 6 in responses to long-distance wound signals. *New Phytologist*, 197, 566–575.
- Chedea, V. S., & Jisaka, M. (2013). Lipoxygenase and carotenoids: a co-oxidation story. *African Journal of Biotechnology*, 12(20), 2786–2791.
- Chen, G., Hackett, R., Walker, D., Taylor, A., Lin, Z., & Grierson, D. (2004). Identification of a specific isoform of tomato lipoxygenase (tomlox) involved in the generation of fatty acid-derived flavor compounds 1. *Plant Physiology*, 136(September), 2641–2651.
- Chiu, L.-W., Zhou, X., Burke, S., Wu, X., Prior, R. L., & Li, L. (2010). The purple cauliflower arises from activation of a MYB transcription factor. *Plant Physiology*, 154(November), 1470–1480.
- Cho, J. Y., Kim, A. R., Jung, J. H., Chun, T., Rhee, M. H., & Yoo, E. S. (2004). Cytotoxic and proapoptotic activities of cynaropicrin, a sesquiterpene lactone, on the viability of leukocyte cancer cell lines. *European Journal of Pharmacology*, 492(2-3), 85–94.
- Christensen, S. a, Nemchenko, A., Borrego, E., Murray, I., Sobhy, I. S., Bosak, L., ... Kolomiets, M. V. (2013). The maize lipoxygenase, ZmLOX10, mediates green leaf volatile, jasmonate and herbivore-induced plant volatile production for defense against insect attack. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 74(1), 59–73.
- Chung, H. S., Koo, A. J. K., Gao, X., Jayanty, S., Thines, B., Jones, a D., & Howe, G. a. (2008). Regulation and function of *Arabidopsis* JASMONATE ZIM-domain genes in response to wounding and herbivory. *Plant Physiology*, 146(March), 952–964.

- Coffa, G., Imber, A. N., Maguire, B. C., Laxmikanthan, G., Schneider, C., Gaffney, B. J., & Brash, A. R. (2005). On the relationships of substrate orientation, hydrogen abstraction, and product stereochemistry in single and double dioxygenations by soybean lipoxygenase-1 and its Ala542Gly mutant. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(46), 38756–38766.
- Coffa, G., Schneider, C., & Brash, A. R. (2005). A comprehensive model of positional and stereo control in lipoxygenases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338(1), 87–92.
- Connors, C.H. (1920). Some notes on the inheritance of unit characters in the peach. *Proceedings American Society of Horticultural Science*, 16, 24–36.
- Craft, N. E. (1992). Carotenoid reversed-phase high-performance liquid chromatography methods: Reference compendium. *Methods in Enzymology*, 213, 185–205.
- Cranfield, J., Henson, S., & Masakure, O. (2011). Factors affecting the extent to which consumers incorporate functional ingredients into their diets. *Journal of Agricultural Economics*, 62(2), 375–392.
- Creelman, R. A., & Mullet, J. E. (1997). Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48, 355–381.
- Croft, K., Juttner, F., & Slusarenko, A. (1993). Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Plant Physiology*, 101, 13–24.
- Croteau, R., Kutchan, T. M., & Lewis, N. G. (2000). Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, 1250–1318.
- Cseke, L. J., Kirakosyan, A., Kaufman, P. B., Warber, S. L., Duke, J. A., & Brielmann, H. L. (2006). Natural products from plants (second edition). *Taylor & Francis Group, CRC Press*.
- Cunningham, F. X., & Gantt, E. (2001). One ring or two? Determination of ring number in carotenoids by lycopene epsilon-cyclases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(5), 2905–2910.
- Cuttriss, A. J., Chubb, A. C., Alawady, A., Grimm, B., & Pogson, B. J. (2007). Regulation of lutein biosynthesis and prolamellar body formation in *Arabidopsis*. *Functional Plant Biology*, 34(8), 663–672.
- D'Ambrosio, C., Giorio, G., Marino, I., Merendino, A., Petrozza, A., Salfi, L., ... Cellini, F. (2004). Virtually complete conversion of lycopene into β -carotene in fruits of tomato plants transformed with the tomato lycopene β -cyclase (tlcy-b) cDNA. *Plant Science*, 166(1), 207–214.
- Dainese, E., Angelucci, C. B., Sabatucci, A., De Filippis, V., Mei, G., & Maccarrone, M. (2010). A novel role for iron in modulating the activity and membrane-binding ability of a trimmed soybean lipoxygenase-1. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 24(6), 1725–1736.
- Davison, P. a, Hunter, C. N., & Horton, P. (2002). Overexpression of beta-carotene hydroxylase enhances stress tolerance in *Arabidopsis*. *Nature*, 418(6894), 203–206.
- De la Rosa, L. A., Alvarez-Parilla, E., & Gonzales-Agiular, G. A. (2009). Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value and Stability, *Ames, IA*: , 2009.
- De Pascual-Teresa, S., Moreno, D. a, & García-Viguera, C. (2010). Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: a review of current evidence. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(4), 1679–1703.
- De Simone, V., Menzo, V., De Leonardis, A. M., Maria Ficco, D. B., Trono, D., Cattivelli, L., & De Vita, P. (2010). Different mechanisms control lipoxygenase activity in durum wheat kernels. *Journal of Cereal Science*, 52(2), 121–128.
- Della Penna, D., & Pogson, B. J. (2006). Vitamin synthesis in plants: tocopherols and carotenoids. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 711–38.

- Dermen, H., & Stewart, R. (1973). Ontogenetic study of floral organs of peach (*Prunus persica*) utilizing cytochimeral plants. *American Journal of Botany*, 60(3), 283–291.
- Deruère, J., Römer, S., D'Harlinge, A., Backhause, R., Kuntz, M., & Camara, B. (1994). Fibril assembly and carotenoid overaccumulation in chromoplasts: a model for supramolecular lipoprotein structures. *The Plant Cell ...*, 6, 119–133.
- Devi, M. K. A., Gondi, M., Sakthivelu, G., Giridhar, P., Rajasekaran, T., & Ravishankar, G. a. (2009). Functional attributes of soybean seeds and products, with reference to isoflavone content and antioxidant activity. *Food Chemistry*, 114(3), 771–776.
- Di Venere, A., Salucci, M. L., van Zadelhoff, G., Veldink, G., Mei, G., Rosato, N., ... Maccarrone, M. (2003). Structure-to-function relationship of mini-lipoxygenase, a 60-kDa fragment of soybean lipoxygenase-1 with lower stability but higher enzymatic activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(20), 18281–18288.
- Diretto, G., Al-Babili, S., Tavazza, R., Papacchioli, V., Beyer, P., & Giuliano, G. (2007a). Metabolic engineering of potato carotenoid content through tuber-specific overexpression of a bacterial mini-pathway. *PLoS One*, 2(4), e350.
- Diretto, G., Welsch, R., Tavazza, R., Mourgues, F., Pizzichini, D., Beyer, P., & Giuliano, G. (2007b). Silencing of beta-carotene hydroxylase increases total carotenoid and beta-carotene levels in potato tubers. *BMC Plant Biology*, 7, 11.
- Doderer, A., Kokkelink, I., van der Veen, S., Valk, B. E., Schram, a W., & Douma, C. (1992). Purification and characterization of two lipoxygenase isoenzymes from germinating barley. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1120(1), 97–104.
- Dogbo, D. O., Gogbeu, S. J., Yao, K. A., Zohouri, G. P., Mamyrbekova-Bekro, J. A., & Bekro, Y. A. (2012). Comparative activities of phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase and phenolic compounds accumulated in cassava elicited cell. *African Crop Science Journal*, 20(2), 85–94.
- Donaldson, J. M. I., MC Govern, T. P., & Ladd, T. L. (1990). Floral attractants for *Cetoniinae* and *Cutelinae* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Journal of economic entomology*, 83(4), 1298–1305.
- Doong, R. L., Gander, J. E., Ganson, R. J., & Jensen, R. A. (2010). The cytosolic isoenzyme of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase in *Spinacia oleracea* and other higher plants: extreme substrate ambiguity and other properties. *Physiologia Plantarum*, 84(3), 351–360.
- Drewnowski, a, & Gomez-Carneros, C. (2000). Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: a review. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 72(6), 1424–1435.
- Ducreux, L. J. M., Morris, W. L., Hedley, P. E., Shepherd, T., Davies, H. V, Millam, S., & Taylor, M. a. (2005). Metabolic engineering of high carotenoid potato tubers containing enhanced levels of beta-carotene and lutein. *Journal of Experimental Botany*, 56(409), 81–89.
- Dun, E. a, Brewer, P. B., & Beveridge, C. a. (2009). Strigolactones: discovery of the elusive shoot branching hormone. *Trends in Plant Science*, 14(7), 364–372.
- Duong-Ly, K. C., & Gabelli, S. B. (2014). Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation. *Methods in Enzymology*, 541, 85–94.
- Dyer, E., Herrmann, K. M., Weaver, L. M., Kuhn, N., Weller, C., & Lafayette, W. (1990). A cDNA Encoding 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonate Synthase from *Solanum tuberosum* L. *Biochemistry*, 29(3), 1608–1614.
- Dyer, W. E., Henstrand, J. M., Handa, a K., & Herrmann, K. M. (1989). Wounding induces the first enzyme of the shikimate pathway in *Solanaceae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(19), 7370–7373.
- Engelmann, N. J., Clinton, S. K., & Erdman, J. W. (2011). Nutritional aspects of phytoene and phytofluene, carotenoid precursors to lycopene. *Advances in Nutrition*, 2, 51–61.

- Erickson, H. P. (2009). Size and shape of protein molecules at the nanometer level determined by sedimentation, gel filtration, and electron microscopy. *Biological Procedures Online*, 11(1), 32–51.
- Falchi, R., Vendramin, E., Zanon, L., Scalabrin, S., Cipriani, G., Verde, I., ... Morgante, M. (2013). Three distinct mutational mechanisms acting on a single gene underpin the origin of yellow flesh in peach. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 175–187.
- Falcone Ferreyra, M. L., Rius, S. P., & Casati, P. (2012). Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science*, 3(September), 222.
- Faust, M., & Timon, B. (1995). Origin and dissemination of peach. *Horticultural Review*, 17, 331–379.
- Fester, T., Maier, W., & Strack, D. (1999). Accumulation of secondary compounds in barley and wheat roots in response to inoculation with an arbuscular mycorrhizal fungus and co-inoculation with rhizosphere bacteria. *Mycorrhiza*, 8, 241–246.
- Feussner, I., & Wasternack, C. (2002). The lipoxygenase pathway. *Annual Review of Plant Biology*, 53(1), 275–297.
- Feussner, I., Bachmann, A., Ho, M., & Kindl, H. (1998). All three acyl moieties of trilinolein are efficiently oxygenated by recombinant His-tagged lipid body lipoxygenase in vitro. *FEBS Letters*, 431, 433–436.
- Feussner, I., Hause, B., Vörös, K., Parthier, B., & Wasternack, C. (1995). Jasmonate-induced lipoxygenase forms are localized in chloroplasts of barley leaves (*Hordeum vulgare* cv. *Salomé*). *The Plant Journal*, 7(6), 949–957.
- Feussner, I., Kühn, H., & Wasternack, C. (2001). Lipoxygenase-dependent degradation of storage lipids. *Trends in Plant Science*, 6(6), 268–273.
- Feussner, I., Wasternack, C., Kindl, H., & Kühn, H. (1995). Lipoxygenase-catalyzed oxygenation of storage lipids is implicated in lipid mobilization during germination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(25), 11849–11853.
- Ficco, D. B. M., De Simone, V., Colecchia, S. A., Pecorella, I., Platani, C., Nigro, F., ... De Vita, P. (2014a). Genetic variability in anthocyanin composition and nutritional properties of blue , purple and red bread (*Triticum aestivum* L.) and durum (*Triticum turgidum* L. spp. *turgidum* var. *durum*) wheats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 8686–8695.
- Ficco, D. B. M., Mastrangelo, A. M., Trono, D., Borrelli, G. M., De Vita, P., Fares, C., ... Papa, R. (2014b). The colours of durum wheat: A review. *Crop and Pasture Science*, 65, 1–15.
- Finocchiaro, F., Ferrari, B., & Gianinetti, a. (2010). A study of biodiversity of flavonoid content in the rice caryopsis evidencing simultaneous accumulation of anthocyanins and proanthocyanidins in a black-grained genotype. *Journal of Cereal Science*, 51(1), 28–34.
- Fischer, a M., Dubbs, W. E., Baker, R. a, Fuller, M. a, Stephenson, L. C., & Grimes, H. D. (1999). Protein dynamics, activity and cellular localization of soybean lipoxygenases indicate distinct functional roles for individual isoforms. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 19(5), 543–554.
- Flagella, Z. (2006). Qualità nutrizionale e tecnologica del frumento duro. *Italian Journal of Agronomy*, 1, 203–239.
- Floss, D. S., & Walter, M. H. (2009). Role of carotenoid cleavage dioxygenase 1 (CCD1) in apocarotenoid biogenesis revisited. *Plant Signaling & Behavior*, 4(3), 172–175.
- Floss, D. S., Schliemann, W., Schmidt, J., Strack, D., & Walter, M. H. (2008). RNA interference-mediated repression of MtCCD1 in mycorrhizal roots of *Medicago truncatula* causes accumulation of C27 apocarotenoids, shedding light on the functional role of CCD1. *Plant Physiology*, 148(3), 1267–1282.
- Forlani, G. (2002). Differential expression of 5-enol-pyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase in elicitor-treated, cultured maize cells. *Functional Plant Biology*, 29, 1483–1490.

- Forlani, G., Lejczak, B., & Kafarski, P. (1996). N-pyridyl-aminomethylene-bisphosphonic acids inhibit the first enzyme in the shikimate pathway, 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *55*, 180–188.
- Forlani, G., Lejczak, B., & Kafarski, P. (1999). The herbicidally active compound N-2-(6-methylpyridyl)-aminomethylene bisphosphonic acid inhibits in vivo aromatic biosynthesis. *Journal of Plant Growth Regulation*, *18*(2), 73–79.
- Frank, H. A., & Cogdell, R. J. (1996). Carotenoids in photosynthesis, *63*(3), 257–264.
- Fraser, P. D., Romer, S., Shipton, C. a, Mills, P. B., Kiano, J. W., Misawa, N., ... Bramley, P. M. (2002). Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit-specific manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(2), 1092–1097.
- Fray, R., Wallace, A., Fraser, P., Valero, D., Hedden, P., Bramley, P. M., & Grierson, D. (1995). Constitutive expression of a fruit phytoene synthase gene in transgenic tomatoes causes dwarfism by redirecting metabolites from the gibberellin pathway. *The Plant Journal*, *8*(5), 693–701
- Fukamatsu, Y., Tamura, T., Hihara, S., & Oda, K. (2013). Mutations in the CCD4 carotenoid cleavage dioxygenase gene of yellow-flesh peaches. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *77*(12), 2514–2416.
- Fuller, M. a, Weichert, H., Fischer, a M., Feussner, I., & Grimes, H. D. (2001). Activity of soybean lipoxygenase isoforms against esterified fatty acids indicates functional specificity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *388*(1), 146–154.
- Galvano, F., La Fauci, L., Vitaglione, P., Fogliano, V., Vanella, L., & Felgines, C. (2007). Bioavailability, antioxidant and biological properties of the natural free-radical scavengers cyanidin and related glycosides. *Annali dell'Istituto Superiore Di Sanità*, *43*(4), 382–393.
- Ganson, R. J., D'Amato, T. a, & Jensen, R. a. (1986). The two-isozyme system of 3-Deoxy-d-arabino-Heptulosonate 7-Phosphate synthase in *Nicotiana glauca* and other higher plants. *Plant Physiology*, *82*, 203–210.
- Garbus, I., Carrera, A. D., Dubcovsky, J., & Echenique, V. (2009). Physical mapping of durum wheat lipoxygenase genes. *Journal of Cereal Science*, *50*(1), 67–73.
- George, K., Durante, M., Wu, H., Badhwar, G., & Cucinotta, F. A. (2001). Chromosome aberrations in the blood lymphocytes of astronauts after space flight. *Radiation Research*, *156*(6), 731–738.
- Gerhardt, B., Fischer, K., Balkenhohl, T. J., Pohnert, G., Kuhn, H., Wasternack, C., & Feussner, I. (2005). Lipoxygenase-mediated metabolism of storage lipids in germinating sunflower cotyledons and β -oxidation of (9Z, 11E, 13S)-13-hydroxy-octadeca-9, 11-dienoic acid by the cotyledonary glyoxysomes. *Planta*, *220*(6), 919-930.
- Giberti, S., Berteà, C. M., Narayana, R., Maffei, M. E., & Forlani, G. (2012). Two phenylalanine ammonia lyase isoforms are involved in the elicitor-induced response of rice to the fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*. *Journal of Plant Physiology*, *169*(3), 249–54.
- Giberti, S., Funck, D., & Forlani, G. (2014). Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductase from *Arabidopsis thaliana*: Stimulation or inhibition by chloride ions and feedback regulation by proline depend on whether NADPH or NADH acts as co-substrate. *New Phytologist*, *202*, 911–919.
- Gil, M. I., Tomas-Barberan, F. A., Hess-Pierce, B., & Kader, A. A. (2002). Antioxidant capacities, phenolic compounds, carotenoids, and vitamin C contents of nectarine, peach, and plum cultivars from California. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 4976–4982.
- Glauser, G., Grata, E., Dubugnon, L., Rudaz, S., Farmer, E. E., & Wolfender, J. L. (2008). Spatial and temporal dynamics of jasmonate synthesis and accumulation in *Arabidopsis* in response to wounding. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(24), 16400–16407.
- Glória, M. B. a., Grulke, E. a., & Gray, J. I. (1993). Effect of type of oxidation on beta-carotene loss and volatile products formation in model systems. *Food Chemistry*, *46*(4), 401–406.

- Gomez-Lobato, M. E., Civello, P. M., & Martínez, G. a. (2012). Expression of a lipoxygenase encoding gene (BoLOX1) during postharvest senescence of broccoli. *Postharvest Biology and Technology*, *64*(1), 146–153.
- Gomez-Roldan, V., Fermas, S., Brewer, P. B., Puech-Pagès, V., Dun, E. a, Pillot, J.-P., ... Rochange, S. F. (2008). Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature*, *455*(7210), 189–94.
- Gonzali, S., Mazzucato, A., & Perata, P. (2009). Purple as a tomato: towards high anthocyanin tomatoes. *Trends in Plant Science*, *14*(5), 237–241.
- Görlach, J., Raesecke, H. R., Rentsch, D., Regenass, M., Roy, P., Zala, M., ... Schmid, J. (1995). Temporally distinct accumulation of transcripts encoding enzymes of the prechorismate pathway in elicitor-treated, cultured tomato cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*(8), 3166–3170.
- Grossman, S., & Zakut, R. (1979). Determination of the activity of lipoxygenase (lipoxidase). *Methods of Biochemical Analysis*, *25*, 303–329.
- Gundlach, H., Muller, M. J., Kutchan, T. M., & Zenk, M. H. (1992). Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*, 2389–2393.
- Hamberg, M., Sanz, A., & Castresana, C. (2002). α -Dioxygenase , a new enzyme in fatty acid metabolism. *International Congress Series*, *1233*, 307–317.
- Hause, B., Weichert, H., Höhne, M., Kindl, H., & Feussner, I. (2000). Expression of cucumber lipid-body lipoxygenase in transgenic tobacco: lipid-body lipoxygenase is correctly targeted to seed lipid bodies. *Planta*, *210*(5), 708–714.
- Havecker, E., Gao, X., & Voytas, D. (2004). The diversity of LTR retrotransposons. *Genome Biology*, *5*(6).
- He, Y., Fukushige, H., Hildebrand, D. F., & Gan, S. (2002). Evidence supporting a role of jasmonic acid in *Arabidopsis* leaf senescence. *Plant Physiology*, *128*(3), 876–884.
- Heath, J. J., Cipollini, D. F., & Stireman III, J. O. (2012). The role of carotenoids and their derivatives in mediating interactions between insects and their environment. *Arthropod-Plant Interactions*, *7*(1), 1–20.
- Heitz, T., Bergey, D., & Ryan, C. (1997). A gene encoding a chloroplast-targeted lipoxygenase in tomato leaves is transiently induced by wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Physiology*, *114*, 1085–1093.
- Hentschel, V., Kranl, K., Hollmann, J., Lindhauer, M. G., Bohm, V., & Bitsch, R. (2002). Spectrophotometric determination of yellow pigment content and evaluation of carotenoids by high-performance liquid chromatography in durum wheat grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 6663–6668.
- Herrmann, K. (1995). The shikimate pathway: early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *The Plant Cell*, *7*(July), 907–919.
- Herrmann, K. M., & Weaver, L. M. (1999). The shikimate pathway. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, *50*, 473–503.
- Himi, E., Maekawa, M., & Noda, K. (2011). Differential expression of three flavanone 3-hydroxylase genes in grains and coleoptiles of wheat. *International Journal of Plant Genomics*, *2011*, 1–11.
- Hirawan, R., Diehl-Jones, W., & Beta, T. (2011). Comparative evaluation of the antioxidant potential of infant cereals produced from purple wheat and red rice grains and LC-MS analysis of their anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*, 12330–12341.
- Hirschberg, J. (2001). Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Current Opinion in Plant Biology*, *4*(3), 210–218.
- Hodgson, J. M., & Croft, K. D. (2010). Tea flavonoids and cardiovascular health. *Molecular Aspects of Medicine*, *31*(6), 495–502.

- Holtman, W. L., Van Duijn, G., Sedee, N., & Douma, a. C. (1996). Differential expression of lipoxygenase isoenzymes in embryos of germinating barley. *Plant Physiology*, *111*(2), 569–576.
- Horbowicz, M., Kosson, R., Grzesiuk, A., & Dębski, H. (2008). Anthocyanins of fruits and vegetables - their occurrence, analysis and role in human nutrition. *Vegetable Crops Research Bulletin*, *68*, 5–22.
- Hornung, E., Walther, M., Kühn, H., & Feussner, I. (1999). Conversion of cucumber linoleate 13-lipoxygenase to a 9-lipoxygenating species by site-directed mutagenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(7), 4192–4197.
- Howe, G. a, & Jander, G. (2008). Plant immunity to insect herbivores. *Annual Review of Plant Biology*, *59*(June), 41–66.
- Howitt, C. a., & Pogson, B. J. (2006). Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. *Plant, Cell and Environment*, *29*(3), 435–445.
- Hsieh, C. C., & McDonald, C. E. (1984). Isolation of lipoxygenase isoenzymes from flour of durum wheat endosperm. *Cereal Chemistry*, *61*(5), 392–398.
- Huang, F. C., Horváth, G., Molnár, P., Turcsi, E., Deli, J., Schrader, J., ... Schwab, W. (2009b). Substrate promiscuity of RdCCD1, a carotenoid cleavage oxygenase from *Rosa damascena*. *Phytochemistry*, *70*(4), 457–464.
- Huang, F. C., Molnár, P., & Schwab, W. (2009a). Cloning and functional characterization of carotenoid cleavage dioxygenase 4 genes. *Journal of Experimental Botany*, *60*(11), 3011–3022.
- Huang, J., Cai, M., Long, Q., Liu, L., Lin, Q., Jiang, L., ... Wan, J. (2014). OsLOX2, a rice type I lipoxygenase, confers opposite effects on seed germination and longevity. *Transgenic Research*, *23*, 643–655.
- Hughes, R., Domenico, S. De, & Santino, A. (2009). Plant cytochrome CYP74 family: biochemical features, endocellular localisation, activation mechanism in plant defence and improvements for industrial applications. *ChemBioChem*, *10*(7), 1122–1133.
- Isaacson, T., Ronen, G., Zamir, D., & Hirschberg, J. (2002). Cloning of tangerine from tomato Reveals a Carotenoid Isomerase essential for the production of β -carotene and canthophylls in plants. *The Plant Cell*, *14*(February), 333–342.
- Iuchi, S., Kobayashi, M., Taji, T., Naramoto, M., Seki, M., Kato, T., ... Shinozaki, K. (2001). Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, *27*(4), 325–533.
- Iuchi, S., Kobayashi, M., Taji, T., Naramoto, M., Seki, M., Kato, T., ... Shinozaki, K. (2001). Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, *27*(4), 325–333.
- Ivanov, I., Heydeck, D., Hofheinz, K., Roffeis, J., O'Donnell, V. B., Kuhn, H., & Walther, M. (2010). Molecular enzymology of lipoxygenases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *503*(2), 161–174.
- James, C. (2012). Global status of commercialized biotech/GM crops: 2012. *ISAAA Briefs*, (44).
- Jayaraj, J., Devlin, R., & Punja, Z. (2008). Metabolic engineering of novel ketocarotenoid production in carrot plants. *Transgenic Research*, *17*(4), 489–501.
- Jefferies, R. a., & Mackerron, D. K. L. (1987). Effect of second growth on the quality of tubers as seed in the cultivar record. *Potato Research*, *30*(2), 337–340.
- Jiang, Z. Y., Hunt, J. V, & Wolff, S. P. (1992). Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Analytical Biochemistry*, *202*(2), 384–389.

- Jung, W., Yu, O., Lau, S. M., O'Keefe, D. P., Odell, J., Fader, G., & McGonigle, B. (2000). Identification and expression of isoflavone synthase, the key enzyme for biosynthesis of isoflavones in legumes. *Nature Biotechnology*, *18*(2), 208–212.
- Kato, M. (2012). Mechanism of carotenoid accumulation in citrus fruit. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, *81*(3), 219–233.
- Kato, M., Matsumoto, H., Ikoma, Y., Okuda, H., & Yano, M. (2006). The role of carotenoid cleavage dioxygenases in the regulation of carotenoid profiles during maturation in citrus fruit. *Journal of Experimental Botany*, *57*(10), 2153–2164.
- Keith, B., Dong, X. N., Ausubel, F. M., & Fink, G. R. (1991). Differential induction of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase genes in *Arabidopsis thaliana* by wounding and pathogenic attack. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *88*(19), 8821–8825.
- Khlestkina, E. K., Röder, M. S., & Börner, A. (2009). Mapping genes controlling anthocyanin pigmentation on the glume and pericarp in tetraploid wheat (*Triticum durum* L.). *Euphytica*, *171*, 65–69.
- Kinross, J. M., Darzi, A. W., & Nicholson, J. K. (2011). Gut microbiome-host interactions in health and disease. *Genome Medicine*, *3*(14).
- Kloer, D. P., & Schulz, G. E. (2006). Structural and biological aspects of carotenoid cleavage. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, *63*(19-20), 2291–2303.
- Knapp, M. J., & Klinman, J. P. (2003). Kinetic studies of oxygen reactivity in soybean lipoxygenase-1. *Biochemistry*, *42*(39), 11466–11475.
- Knievel, D. C., Abdel-Aal, E. S. M., Rabalski, I., Nakamura, T., & Hucl, P. (2009). Grain color development and the inheritance of high anthocyanin blue aleurone and purple pericarp in spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Cereal Science*, *50*(1), 113–120.
- Kolomiets, M. V, Hannapel, D. J., Chen, H., Tymeson, M., & Gladon, R. J. (2001). Lipoxygenase is involved in the control of potato tuber development, *13*(March), 613–626.
- Kostyn, K., Szatkowski, M., Kulma, A., Kosieradzka, I., & Szopa, J. (2013). Transgenic potato plants with overexpression of dihydroflavonol reductase can serve as efficient nutrition sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*, 6743–6753.
- Kris-Etherton, P., Hecker, K., Bonanome, M., Coval, S., Binkoski, A., Hilpbert, K., ... Etherton, T. (2002). Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American Journal of Medicine*, *113*(9b), 71–88.
- Krystallis, A., & Chrysochou, P. (2012). Do health claims and prior awareness influence consumers' preferences for unhealthy foods? The case of functional children's snacks. *Agribusiness*, *28*(1), 86–102.
- Kuzin, A., Lyubomirskaya, N. V, Khudaibergenova, B. M., Ilyin, Y. V, & Kim, A. I. (1994). Precise excision of the retrotransposon gypsy from the forked and cut loci in a genetically unstable *D. melanogaster* strain. *Nucleic Acids Research*, *22*(22), 4641–4645.
- Laitinen, R. a E., Ainasoja, M., Broholm, S. K., Teeri, T. H., & Elomaa, P. (2008). Identification of target genes for a MYB-type anthocyanin regulator in *Gerbera hybrida*. *Journal of Experimental Botany*, *59*(13), 3691–3703.
- Laizet, Y., Pontier, D., Mache, R., & Kuntz, M. (2004). Subfamily organization and phylogenetic origin of genes encoding plastid lipid-associated proteins of the fibrillin type. *Journal of Genome Science and Technology*, *3*(1), 19–28.
- Le Moigne, V. (2011). Absence of amplification role of the protein KLH on antibody response generated by a MAP *Staphylococcus aureus* enterotoxin A (SEA) peptide comparing with the corresponding monomeric peptide. *Journal of Immunological Methods*, *365*(1-2), 110–117.

- Lefsrud, M. G., Kopsell, D. a., Kopsell, D. E., & Curran-Celentano, J. (2006). Irradiance levels affect growth parameters and carotenoid pigments in kale and spinach grown in a controlled environment. *Physiologia Plantarum*, *127*(4), 624–631.
- Li, F., Vallabhaneni, R., & Wurtzel, E. T. (2008a). PSY3, a new member of the phytoene synthase gene family conserved in the Poaceae and regulator of abiotic stress-induced root carotenogenesis. *Plant Physiology*, *146*(3), 1333–1345.
- Li, F., Vallabhaneni, R., Yu, J., Rocheford, T., & Wurtzel, E. T. (2008b). The maize phytoene synthase gene family: overlapping roles for carotenogenesis in endosperm, photomorphogenesis, and thermal stress tolerance. *Plant Physiology*, *147*(3), 1334–1346.
- Li, J., Ou-Lee, T., Raba, R., Amundson, R. G., & Last, R. L. (1993). *Arabidopsis* flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation. *The Plant Cell journal*, *5*(February), 171–179.
- Li, J., Zhu, Z., & Gerendás, J. (2008). Effects of nitrogen and sulfur on total phenolics and antioxidant activity in two genotypes of leaf mustard. *Journal of Plant Nutrition*, *31*(9), 1642–1655.
- Liavonchanka, A., & Feussner, I. (2006). Lipoxygenases: occurrence, functions and catalysis. *Journal of Plant Physiology*, *163*(3), 348–357.
- Liu, R. H. (2013). Dietary bioactive compounds and their health implications. *Journal of Food Science*, *78*(Suppl 1), A18–25.
- Liu, S., & Han, B. (2010). Differential expression pattern of an acidic 9/13-lipoxygenase in flower opening and senescence and in leaf response to phloem feeders in the tea plant. *BMC Plant Biology*, *10*(1), 228.
- Lois, L. M., Rodríguez-Concepción, M., Gallego, F., Campos, N., & Boronat, a. (2000). Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, *22*(6), 503–513.
- Lopez, A. B., Van Eck, J., Conlin, B. J., Paolillo, D. J., O'Neill, J., & Li, L. (2008). Effect of the cauliflower or transgene on carotenoid accumulation and chromoplast formation in transgenic potato tubers. *Journal of Experimental Botany*, *59*(2), 213–223.
- López-Ráez, J. a, Kohlen, W., Charnikhova, T., Mulder, P., Undas, A. K., Sergeant, M. J., ... Bouwmeester, H. (2010). Does abscisic acid affect strigolactone biosynthesis? *The New Phytologist*, *187*(2), 343–54.
- Lukaszewicz, M., Matysiak-Kata, I., Skala, J., Fecka, I., Cisowski, W., & Szopa, J. (2004). Antioxidant capacity manipulation in transgenic potato tuber by changes in phenolic compounds content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(6), 1526–1533.
- Lundquist, P. K., Poliakov, A., Bhuiyan, N. H., Zybailov, B., Sun, Q., & van Wijk, K. J. (2012). The functional network of the *Arabidopsis* plastoglobule proteome based on quantitative proteomics and genome-wide coexpression analysis. *Plant Physiology*, *158*(3), 1172–1192.
- Ma, G., Zhang, L., Matsuta, A., Matsutani, K., Yamawaki, K., Yahata, M., ... Kato, M. (2013). Enzymatic formation of β -citraurin from β -cryptoxanthin and Zeaxanthin by carotenoid cleavage dioxygenase4 in the flavedo of citrus fruit. *Plant Physiology*, *163*(2), 682–695.
- Maccarrone, M., Zadelhoff, G. Van, Veldink, G. A., Vliegenthart, J. F. G., & Finazzi-agro, A. (2000). Early activation of lipoxygenase in lentil (*Lens culinaris*) root protoplasts by oxidative stress induces programmed cell death. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, *267*, 5078–5084.
- Mahajan, M., Ahuja, P. S., & Yadav, S. K. (2011). Post-transcriptional silencing of flavonol synthase mRNA in tobacco leads to fruits with arrested seed set. *PloS One*, *6*(12), e28315.
- Mallikarjuna, N., Kranthi, K., Jadhav, D. R., Kranthi, S., & Chandra, S. (2004). Influence of foliar chemical compounds on the development of *Spodoptera litura* (Fab.) in interspecific derivatives of groundnut. *Journal of Applied Entomology*, *128*(5), 321–328.
- Mann, G., & Batt, C. W. (1969). The molecular weights of bovine thrombin and its primary autolysis products. *The Journal of Biological Chemistry*, *244*(43), 6555–6557.

- Markwell, J., Bruce, B. D., & Keegstra, K. (1992). Isolation of a carotenoid-containing sub-membrane particle from the chloroplastic envelope outer membrane of pea (*Pisum sativum*). *The Journal of Biological Chemistry*, 267(20), 13933–13937.
- Maru, Y., Afar, D. E., Witte, O. N., & Shibuya, M. (1996). The dimerization property of glutathione S-transferase partially reactivates Bcr-Abl lacking the oligomerization domain. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 15353–15357.
- Mascie-Taylor, C. G. N., & Karim, E. (2003). The burden of chronic disease. *Science (New York, N.Y.)*, 302(5652), 1921–1922.
- Mathieu, S., Terrier, N., Procureur, J., Bigey, F., & Günata, Z. (2005). A carotenoid cleavage dioxygenase from *Vitis vinifera* L.: functional characterization and expression during grape berry development in relation to C13-norisoprenoid accumulation. *Journal of Experimental Botany*, 56(420), 2721–2731.
- Matsubara, K., Kaneyuki, T., Miyake, T., & Mori, M. (2005). Antiangiogenic activity of nasunin, an antioxidant anthocyanin, in eggplant peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(16), 6272–6275.
- Matsui, K., Shibutani, M., Hase, T., & Kajiwara, T. (1996). Bell pepper fruit fatty acid hydroperoxide lyase is a cytochrome P450 (CYP74B). *FEBS Letters*, 394, 21–24.
- May, C., Ho, M., Gnau, P., Schwennesen, K., & Kindl, H. (2000). The N-terminal b-barrel structure of lipid body lipoyxygenase mediates its binding to liposomes and lipid bodies. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 267, 1100–1109.
- McCullough, M. L., Feskanich, D., Stampfer, M. J., Giovannucci, E. L., Rimm, E. B., Hu, F. B., ... Willet, W. C. (2002). Diet quality and major chronic disease risk in men and women: moving toward improved dietary guidance. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76, 2161–2271.
- McQuate, G. T., & Peck, S. L. (2001). Enhancement of attraction of alpha-ionol to male *Bactrocera latifrons* (Diptera: Tephritidae) by addition of a synergist, cade oil. *Journal of Economic Entomology*, 94(1), 39–46.
- Meyer, M., Tomchick, D. R., & Klinman, J. P. (2008). Enzyme structure and dynamics affect hydrogen tunneling: The impact of a remote side chain (I553) in soybean lipoyxygenase-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, (4), 1146–1151.
- Minor, W., Steczko, J., Stec, B., Otwinowski, Z., Bolin, J. T., Walter, R., & Axelrod, B. (1996). Crystal structure of soybean lipoyxygenase L-1 at 1.4 Å resolution. *Biochemistry*, 35(33), 10687–10701.
- Miremadi, F., & Shah, N. (2012). Applications of inulin and probiotics in health and nutrition. *International Food Research Journal*, 19(4), 1337–1350.
- Misawa, N., Yamano, S., Linden, H., Felipe, M. R., Lucas, M., Ikenaga, H., & Sandmann, G. (1993). Carotenoid biosynthesis gene *crtl* in transgenic plants showing an increase of β -carotene biosynthesis activity and resistance to the bleaching herbicide norflurazon. *The Plant Journal*, 4(5), 833–840.
- Mori, T., Sakurai, M., & Sakuta, M. (2000). Changes in PAL, CHS, DAHP synthase (DS-Co and DS-Mn) activity during anthocyanin synthesis in suspension culture of *Fragaria ananassa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 62, 135–139.
- Morris, W. L., Ducreux, L. J. M., Hedden, P., Millam, S., & Taylor, M. A. (2006). Overexpression of a bacterial 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase gene in potato tubers perturbs the isoprenoid metabolic network: implications for the control of the tuber life cycle. *Journal of Experimental Botany*, 57(12), 3007–3018.
- Mosblech, A., Feussner, I., & Heilmann, I. (2009). Oxylipins: Structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(6), 511–517.
- Mueller, M. J. (2004). Archetype signals in plants: the phytoprostanes. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(4), 441–448.

- Muir, S. R., Collins, G. J., Robinson, S., Hughes, S., Bovy, a, Ric De Vos, C. H., ... Verhoeyen, M. E. (2001). Overexpression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavonols. *Nature Biotechnology*, *19*(5), 470–474.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, *15*, 473–497.
- Naested, H., Holm, A., Jenkins, T., Nielsen, H. B., Harris, C. a, Beale, M. H., ... Mundy, J. (2004). Arabidopsis VARIEGATED 3 encodes a chloroplast-targeted, zinc-finger protein required for chloroplast and palisade cell development. *Journal of Cell Science*, *117*(Pt 20), 4807–4818.
- Nautiyal, C. S., Govindarajan, R., Lavania, M., & Pushpangadan, P. (2008). Novel mechanism of modulating natural antioxidants in functional foods: involvement of plant growth promoting Rhizobacteria NRRL B-30488. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(12), 4474–4481.
- Ohmiya, A. (2009). Carotenoid cleavage dioxygenases and their apocarotenoid. *Molecular Biology*, *358*, 351–358.
- Ohmiya, A., Kishimoto, S., Aida, R., Yoshioka, S., & Sumitomo, K. (2006). Carotenoid cleavage dioxygenase (CmCCD4a) contributes to white color formation in chrysanthemum petals. *Plant Physiology*, *142*(3), 1193–1201.
- Op den Camp, R. G. L., Przybyla, D., Ochsenbein, C., Laoi, C., Chanhong, K., Danon, A., ... Apel, K. (2003). Rapid induction of distinct stress responses after the release of singlet oxygen in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *15*, 2320–2332.
- Paine, J. a, Shipton, C. a, Chaggar, S., Howells, R. M., Kennedy, M. J., Vernon, G., ... Drake, R. (2005). Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content. *Nature Biotechnology*, *23*(4), 482–487.
- Palermo, M., Colla, G., Barbieri, G., & Fogliano, V. (2013). Polyphenol metabolite profile of artichoke is modulated by agronomical practices and cooking method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(33), 7960–7968.
- Parisi, M., Troccoli, A., Pentangelo, A., Colecchia, S. A., Perrone, D., D’Onofrio, B., ... Giordano, I. (2009). Rese e qualità del pomodoro in Campania e Puglia. *L’informatore Agrario*, *2*, 53–58.
- Park, H., Kreunen, S. S., Cuttriss, A. J., DellaPenna, D., & Pogson, B. J. (2002). Identification of the carotenoid isomerase provides insight into carotenoid biosynthesis, prolamellar body formation, and photomorphogenesis. *The Plant Cell*, *14*, 321–332.
- Parker, M. W., Lo Bello, M., & Federici, G. (1990). Crystallization of glutathione S-transferase from human placenta. *Journal of Molecular Biology*, *213*(05), 221–222
- Pastore, D., Trono, D., Padalino, L., Simone, S., Valenti, D., Di Fonzo, N., & Passarella, S. (2000). Inhibition by α -tocopherol and L-ascorbate of linoleate hydroperoxidation and β -Carotene bleaching activities in durum wheat semolina. *Journal of Cereal Science*, *31*, 41–54.
- Phillips, M. a, León, P., Boronat, A., & Rodríguez-Concepción, M. (2008). The plastidial MEP pathway: unified nomenclature and resources. *Trends in Plant Science*, *13*(12), 619–23.
- Pinto, M. D. C., Tejada, A., Duque, A. L., & Macías, P. (2007). Determination of lipoxygenase activity in plant extracts using a modified ferrous oxidation-xylene orange assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(15), 5956–5959.
- Poltronieri, P., Bonsegna, S., De Domenico, S., & Santino, A. (2011). Molecular mechanisms in plant abiotic stress response. *Stress Physiology*, *48*, 15–24.
- Porta, H., & Rocha-sosa, M. (2002). Update on plant lipoxygenases. Physiological and molecular Features. *Plant Physiology*, *130*, 15–21.
- Porta, H., Rueda-Benítez, P., Campos, F., Colmenero-Flores, J. M., Colorado, M. C., Covarrubias, A. A., & Rocha-Sosa, M. (1999). Analysis of lipoxygenase mRNA accumulation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during development and under stress conditions. *Plant and Cell Physiology*, *40*(8), 850–858.

- Pourcel, L., Irani, N. G., Lu, Y., Riedl, K., Schwartz, S., & Grotewold, E. (2010). The formation of Anthocyanic Vacuolar Inclusions in *Arabidopsis thaliana* and implications for the sequestration of anthocyanin pigments. *Molecular Plant*, 3(1), 78–90.
- Prior, R. L., & Cao, G. (1999). Antioxidant capacity and polyphenolic components of teas: implications for altering in vivo antioxidant status. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 220(4), 255–261.
- Qin, X., & Zeevaart, J. a. (1999). The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(26), 15354–15361.
- Quattrocchio, F., Wing, J. F., van der Woude, K., Mol, J. N., & Koes, R. (1998). Analysis of bHLH and MYB domain proteins: species-specific regulatory differences are caused by divergent evolution of target anthocyanin genes. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 13(4), 475–488.
- Rahman, R. N. Z. R. A., Zakaria, I. I., Salleh, A. B., & Basri, M. (2012). Enzymatic properties and mutational studies of chalcone synthase from *Physcomitrella patens*. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(8), 9673–9691.
- Rance, I., Fournier, J., & Esquerre-Tugaye, M.-T. (1998). The incompatible interaction between *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* race 0 and tobacco is suppressed in transgenic plants expressing antisense lipoxygenase sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(11), 6554–6559.
- Rao, a V., & Rao, L. G. (2007). Carotenoids and human health. *Pharmacological Research: The Official Journal of the Italian Pharmacological Society*, 55(3), 207–216.
- Reddy, S., Swapna, L., Ramesh, T., Singh, T., Vijayalaxma, N., & Lavanya, R. (2011). Bacteria in oral health—probiotics and prebiotics a review. *International Journal of Biological and Mediacal Research*, 2(4), 1226–1233.
- Rickert, K. W., & Klinman, J. P. (1999). Nature of hydrogen transfer in soybean lipoxygenase 1: separation of primary and secondary isotope effects. *Biochemistry*, 38, 12218–12228.
- Roberfroid, M. B. (2002). Global view on functional foods: European perspectives. *The British Journal of Nutrition*, 88 Suppl 2, S133–8.
- Robinson, D., Wu, Z., Domoney, C., & Casey, R. (1995). Lipoxygenases and the quality of foods. *Food Chemistry*, 54, 33–43.
- Rodrigo, M. J., Alquézar, B., Alós, E., Medina, V., Carmona, L., Bruno, M., ... Zacarías, L. (2013). A novel carotenoid cleavage activity involved in the biosynthesis of *Citrus* fruit-specific apocarotenoid pigments. *Journal of Experimental Botany*, 64(14), 4461–4478.
- Rodríguez-Concepción, M., & Boronat, A. (2002). Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiology*, 130(November), 1079–1089.
- Rodríguez-Villalón, A., Gas, E., & Rodríguez-Concepción, M. (2009). Colors in the dark: a model for the regulation of carotenoid biosynthesis in etioplasts. *Plant Signaling & Behavior*, 4(10), 965–967.
- Royo, J., León, J., Vancanneyt, G., Albar, J. P., Rosahl, S., Ortego, F., ... Sanchez-Serrano, J. J. (1999). Antisense-mediated depletion of a potato lipoxygenase reduces wound induction of proteinase inhibitors and increases weight gain of insect pests. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 1146–1151.
- Royo, J., Vancanneyt, G., Perez, A. G., Störmann, K., Rosahl, S., & Sanchez-Serrano, J. J. (1996). Characterization of three potato lipoxygenases with distinct enzymatic activities and different organ-specific and wound-regulated expression patterns. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 21012–21019.

- Rubio, A., Santaella, M., Go, M. D., Orzaez, D., & Granell, A. (2008). Cytosolic and plastoglobule-targeted carotenoid dioxygenases from *Crocus sativus* are both involved in β -ionone release. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(36), 24816–24825.
- Rubio-Moraga, A., Rambla, J. L., Fernández-de-Carmen, A., Trapero-Mozos, A., Ahrazem, O., Orzaez, D., ... Gómez-Gómez, L. (2014). New target carotenoids for CCD4 enzymes are revealed with the characterization of a novel stress-induced carotenoid cleavage dioxygenase gene from *Crocus sativus*. *Plant Molecular Biology*, 86(4-5), 555–569.
- Rusterucci, C., Montillet, J.L., Agnel, J.P., Battesti, C., Alonso, B., Knoll, a., ... Triantaphylides, C. (1999). Involvement of Lipoxygenase-dependent Production of Fatty Acid Hydroperoxides in the Development of the hypersensitive cell death induced by cryptogin on tobacco leaves. *Journal of Biological Chemistry*, 274(51), 36446–36455.
- Saitoh, K., Onishi, K., Mikami, I., Thidar, K., & Sano, Y. (2004). Allelic diversification at the C (OsC1) locus of wild and cultivated rice: Nucleotide changes associated with phenotypes. *Genetics*, 168(2), 997–1007.
- Sandmann, G., Römer, S., & Fraser, P. D. (2006). Understanding carotenoid metabolism as a necessity for genetic engineering of crop plants. *Metabolic Engineering*, 8(4), 291–302.
- Sato, K., Mase, K., Nakano, Y., Nishikubo, N., Sugita, R., Tsuboi, Y., ... Katayama, Y. (2006). 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase is regulated for the accumulation of polysaccharide-linked hydroxycinnamoyl esters in rice (*Oryza sativa* L.) internode cell walls. *Plant Cell Reports*, 25(7), 676–688.
- Schaller, F., Schaller, A., & Stintzi, A. (2005). Biosynthesis and metabolism of jasmonates. *Journal of Plant Growth Regulation*, 23(3), 179–199.
- Schmidt, H., Kurtzer, R., Eisenreich, W., & Schwab, W. (2006). The carotenase AtCCD1 from *Arabidopsis thaliana* is a dioxygenase. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(15), 9845–9851.
- Schwartz, S. H. (1997). Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of *Maize*. *Science*, 276(5320), 1872–1874.
- Schwartz, S. H., Qin, X., & Loewen, M. C. (2004). The biochemical characterization of two carotenoid cleavage enzymes from *Arabidopsis* indicates that a carotenoid-derived compound inhibits lateral branching. *Journal of Biological Chemistry*, 279(45), 46940–46945.
- Schwartz, S. H., Qin, X., & Zeevaart, J. a. (2001). Characterization of a novel carotenoid cleavage dioxygenase from plants. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(27), 25208–25211.
- Sergeant, M. J., Li, J.-J., Fox, C., Brookbank, N., Rea, D., Bugg, T. D. H., & Thompson, A. J. (2009). Selective inhibition of carotenoid cleavage dioxygenases: phenotypic effects on shoot branching. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(8), 5257–2564.
- Shakya, R., & Navarre, D. a. (2006). Rapid screening of ascorbic acid, glycoalkaloids, and phenolics in potato using high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(15), 5253–5260.
- Shen, J., Tieman, D., Jones, J. B., Taylor, M. G., Schmelz, E., Huffaker, A., ... Klee, H. J. (2014). A 13-lipoxygenase, TomloxC, is essential for synthesis of C5 flavour volatiles in tomato. *Journal of Experimental Botany*, 65(2), 419–428.
- Sheng, J., Luo, Y., & Wainwright, H. (2000). Studies on lipoxygenase and the formation of ethylene in tomato. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 75(1), 69–71.
- Shewmaker, C., Sheehy, J., Daley, M., Colburn, S., & Ke, D. (1999). Seed-specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 20(4), 401–412.
- Shi, X. M., Chen, F., Yuan, J. P., & Chen, H. (1997). Heterotrophic production of lutein by selected *Chlorella* strains. *Journal of Applied Phycology*, 9, 445–450.

- Shih, C. H., Chu, H., Tang, L. K., Sakamoto, W., Maekawa, M., Chu, I. K., ... Lo, C. (2008). Functional characterization of key structural genes in rice flavonoid biosynthesis. *Planta*, *228*(6), 1043–1054.
- Shin, Y.-M., Park, H.-J., Yim, S.-D., Baek, N.-I., Lee, C.-H., An, G., & Woo, Y.-M. (2006). Transgenic rice lines expressing maize C1 and R-S regulatory genes produce various flavonoids in the endosperm. *Plant Biotechnology Journal*, *4*(3), 303–315.
- Shiojiri, K., Kishimoto, K., Ozawa, R., Kugimiya, S., Urashimo, S., Arimura, G., ... Takabayashi, J. (2006). Changing green leaf volatile biosynthesis in plants: An approach for improving plant resistance against both herbivores and pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(45), 16672–16676.
- Shipp, J., & Abdel-Aal, E. (2010). Food applications and physiological effects of anthocyanins as functional food ingredients. *The Open Food Science Journal*, *4*, 7–22.
- Shoeva, O. Y., Gordeeva, E. I., & Khlestkina, E. K. (2014). The regulation of anthocyanin synthesis in the wheat pericarp. *Molecules*, *19*, 20266–20279.
- Simkin, A. J., Schwartz, S. H., Auldridge, M., Taylor, M. G., & Klee, H. J. (2004b). The tomato carotenoid cleavage dioxygenase 1 genes contribute to the formation of the flavor volatiles beta-ionone, pseudoionone, and geranylacetone. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, *40*(6), 882–892.
- Simkin, A. J., Underwood, B. a, Auldridge, M., Loucas, H. M., Shibuya, K., Schmelz, E., ... Klee, H. J. (2004a). Circadian regulation of the PhCCD1 carotenoid cleavage dioxygenase controls emission of beta-ionone, a fragrance volatile of petunia flowers. *Plant Physiology*, *136*(3), 3504–3014.
- Simkin, A. J., Zhu, C., Kuntz, M., & Sandmann, G. (2003). Light-dark regulation of carotenoid biosynthesis in pepper (*Capsicum annuum*) leaves. *Journal of Plant Physiology*, *160*(5), 439–43.
- Simonetti, P., Pietta, P., & Testolin, G. (1997). Polyphenol content and total antioxidant potential of selected Italian wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*, 152–1155.
- Sirtori, C., Lovati, M., Manzoni, C., Castiglioni, S., Duranti, M., Magni, C., ... Arnoldi, A. (2004). Proteins of white lupin seed, a naturally isoflavone-poor legume, reduce cholesterolemia in rats and increase LDL receptor activity in HepG2 cells. *Biochemical and Molecular Actions of Nutrients*, *134*, 18–23.
- Slavin, J. (2003). Impact of the proposed definition of dietary fiber on nutrient databases. *Journal of Food Composition and Analysis*, *16*(3), 287–291.
- Somel, M., Creely, H., Franz, H., Mueller, U., Lachmann, M., Khaitovich, P., & Pääbo, S. (2008). Human and chimpanzee gene expression differences replicated in mice fed different diets. *PLoS One*, *3*(1), e1504.
- Srinivasan, P. R., & Sprinson, D. B. (1959). 2-Keto-3-deoxy-D-arabo-heptonic acid 7-phosphate synthetase. *Journal of Biological Chemistry*, *234*, 716–722.
- Stålberg, K., Lindgren, O., Ek, B., & Höglund, A.-S. (2003). Synthesis of ketocarotenoids in the seed of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, *36*(6), 771–779.
- Subbiah, M. T. R. (2008). Understanding the nutrigenomic definitions and concepts at the food - genome junction. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, *12*(4), 229–235.
- Szakály, Z., Szente, V., Kövér, G., Polereczki, Z., & Szigeti, O. (2012). The influence of lifestyle on health behavior and preference for functional foods. *Appetite*, *58*(1), 406–413.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2010). *Plant Physiology*. *Plant Physiology*, fifth edition.
- Tan, B.-C., Joseph, L. M., Deng, W.-T., Liu, L., Li, Q.-B., Cline, K., & McCarty, D. R. (2003). Molecular characterization of the *Arabidopsis* 9-cis epoxycarotenoid dioxygenase gene family. *The Plant Journal*, *35*(1), 44–56.

- Tanaka, Y., Sasaki, N., & Ohmiya, A. (2008). Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, *54*(4), 733–749.
- Tanwar, B., & Modgil, R. (2012). Flavonoids: dietary occurrence and health benefits. *Spatula DD - Peer Reviewed Journal on Complementary Medicine and Drug Discovery*, *2*, 59–68.
- Tayeh, C., Randoux, B., Vincent, D., Bourdon, N., & Reignault, P. (2014). Exogenous trehalose induces defenses in wheat before and during a biotic stress caused by powdery mildew. *Phytopathology*, *104*(3), 293–305.
- Thurnher, M., Nussbaumer, O., & Gruenbacher, G. (2012). Novel aspects of mevalonate pathway inhibitors as antitumor agents. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *18*(13), 3524–3531.
- Titta, L., Trinei, M., Stendardo, M., Berniakovich, I., Petroni, K., Tonelli, C., ... Giorgio, M. (2010). Blood orange juice inhibits fat accumulation in mice. *International Journal of Obesity*, *34*(3), 578–588.
- Trocchi, A. (2000). Mini review: durum wheat quality: a multidisciplinary concept. *Journal of Cereal Science*, *32*(2), 99–113.
- Tsuda, T., Ueno, Y., Yoshikawa, T., Kojo, H., & Osawa, T. (2006). Microarray profiling of gene expression in human adipocytes in response to anthocyanins. *Biochemical Pharmacology*, *71*(8), 1184–1197.
- Turner, G. W., Grimes, D., & Lange, B. M. (2011). Soybean vegetative lipoxygenases are not vacuolar storage proteins. *Functional Plant Biology*, *38*(10), 778–787.
- Tuteja, N. (2007). Abscisic Acid and abiotic stress signaling. *Plant Signaling & Behavior*, *2*(June), 135–138.
- Uauy, R., Corvalan, C., & Dangour, A. D. (2009). Conference on “Multidisciplinary approaches to nutritional problems”. Rank Prize Lecture. Global nutrition challenges for optimal health and well-being. *The Proceedings of the Nutrition Society*, *68*(1), 34–42.
- Van de Staaij, J., de Bakker, N. V. J., Oosthoek, a, Broekman, R., van Beem, a, Stroetenga, M., ... Rozema, J. (2002). Flavonoid concentrations in three grass species and a sedge grown in the field and under controlled environment conditions in response to enhanced UV-B radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, *66*(1), 21–29.
- Van Hoof, A., & Green, P. J. (2006). In nonsense-mediated mRNA decay. *NMD in Plants*, 167–172.
- Van Mechelen, J. R., Schuurink, R. C., Smits, M., Graner, a, Douma, a C., Sedee, N. J., ... Valk, B. E. (1999). Molecular characterization of two lipoxygenases from barley. *Plant Molecular Biology*, *39*(6), 1283–1298.
- Verdan, A., Wang, H., & García, C. (2011). Iron binding of 3-hydroxychromone, 5-hydroxychromone, and sulfonated morin: implications for the antioxidant activity of flavonols with competing metal binding sites. *Journal of Inorganic Biochemistry*, *105*(10), 1324–1322.
- Vergari, F., Tibuzzi, A., & Basile, G. (2010). An overview of the functional food market: from marketing issues and commercial players of future demand from life in space. *Bio-Farms for Nutraceuticals: Functional Food and Safety Control by Biosensors*, 308–321.
- Verlotta, A., De Simone, V., Mastrangelo, A. M., Cattivelli, L., Papa, R., & Trono, D. (2010). Insight into durum wheat Lpx-B1: a small gene family coding for the lipoxygenase responsible for carotenoid bleaching in mature grains. *BMC Plant Biology*, *10*(263).
- Vishnevetsky, M., & Ovadis, M. (1999). Carotenoid sequestration in plants: the role of carotenoid-associated proteins. *Trends in Plant Science*, *4*(6), 232–235.
- Vogel, J. T., Tan, B., McCarty, D. R., & Klee, H. J. (2008). The carotenoid cleavage dioxygenase 1 enzyme has broad substrate specificity, cleaving multiple carotenoids at two different bond positions. *The Journal of Biological Chemistry*, *283*(17), 11364–11373.
- Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant*, *3*(1), 2–20.

- Walker, P., Rhubart-Berg, P., McKenzie, S., Kelling, K., & Lawrence, R. S. (2007). Public health implications of meat production and consumption. *Public Health Nutrition*, 8(4), 348–356.
- Wang, C., & Shu, Q. (2007). Fine mapping and candidate gene analysis of purple pericarp gene Pb in rice (*Oryza sativa* L.). *Chinese Science Bulletin*, 52, 3097–3104.
- Wang, X. (2011). Structure, function, and engineering of enzymes in isoflavonoid biosynthesis. *Functional & Integrative Genomics*, 11(1), 13–22.
- Wasson, A., Pellerone, F., & Mathesius, U. (2006). Silencing the flavonoid pathway in *Medicago truncatula* inhibits root nodule formation and prevents auxin transport regulation by rhizobia. *The Plant Cell Online*, 18(July), 1617–1629.
- Wasternack, C. (2007). Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany*, 100(4), 681–697.
- Watillon, B., Kettmann, R., Arredouani, A., Hecquet, J. F., Boxus, B., & Arsene, B. (1998). Apple messenger RNAs related to bacterial lignostilbene dioxygenase and plant SAUR genes are preferentially expressed in flowers. *Plant molecular biology*, 36(6), 909–915.
- Watts, K. T., Mijts, B. N., Lee, P. C., Manning, A. J., & Schmidt-Dannert, C. (2006). Discovery of a substrate selectivity switch in tyrosine ammonia-lyase, a member of the aromatic amino acid lyase family. *Chemistry & Biology*, 13(12), 1317–1326.
- Weaver, L. M., & Herrmann, K. M. (1997). Dynamics of the shikimate pathway in plants. *Trends in Plant Science*, 2(97), 346–351.
- Weber, H., Chételat, A., Caldelari, D., & Farmer, E. E. (1999). Divinyl ether fatty acid synthesis in late blight-diseased potato leaves. *The Plant Cell*, 11, 485–493.
- Weichert, H., Kolbe, A., Kraus, A., Wasternack, C., & Feussner, I. (2002). Metabolic profiling of oxylipins in germinating cucumber seedlings lipooxygenase-dependent degradation of triacylglycerols and biosynthesis of volatile aldehydes. *Planta*, 215(4), 612–619.
- Welford, R. W. D., Turnbull, J. J., Claridge, T. D. W., Schofield, C. J., & Prescott, A. G. (2001). Evidence for oxidation at C-3 of the flavonoid C-ring during anthocyanin biosynthesis. *Chemical Communications*, (18), 1828–1829.
- Welsch, R., Wüst, F., Bär, C., Al-Babili, S., & Beyer, P. (2008). A third phytoene synthase is devoted to abiotic stress-induced abscisic acid formation in rice and defines functional diversification of phytoene synthase genes. *Plant Physiology*, 147(1), 367–380.
- West, K. P., Katz, J., Khatri, S. K., Leclercq, S. C., Pradhan, E. K., Sharada, R., ... Connor, P. B. (1999). General practice mortality related to pregnancy in Nepal. *British Medical Journal*, 318, 570–575.
- Williamson, J., Peace, C., Bliss, F. A., Garner, D. T., & Crisosto, C. H. (2006). Evidence for a single locus controlling flesh color, senescent leaf color, and hypanthium color in peach. *Journal of the American Horticultural Science*, 131(2), 256–260.
- Wilson, R. a, Gardner, H. W., & Keller, N. P. (2001). Cultivar-dependent expression of a maize lipooxygenase responsive to seed infesting fungi. *Molecular Plant-Microbe Interactions : MPMI*, 14(8), 980–987.
- Winkel-Shirley, B. (2001). Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology*, 126(2), 485–493.
- Winterhalter, P., & Rouseff, R. (2001). In a carotenoid-derived aroma compounds: an introduction. *In a Carotenoid-Derived Aroma Compounds*, (1), 1–17.
- Wu, Z., Robinson, D. S., Hughes, R. K., Casey, R., Hardy, D., & West, S. I. (1999). Co-oxidation of β -carotene catalyzed by soybean and recombinant pea lipooxygenases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(12), 4899–4906.
- Wurbs, D., Ruf, S., & Bock, R. (2007). Contained metabolic engineering in tomatoes by expression of carotenoid biosynthesis genes from the plastid genome. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 49(2), 276–88.

- Xie, D.Y., Sharma, S. B., & Dixon, R. A. (2004). Anthocyanidin reductases from *Medicago truncatula* and *Arabidopsis thaliana*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 422(1), 91–102.
- Yang, G. H., Li, B., Gao, J. W., Liu, J. Z., Zhao, X. Q., Zheng, Q., ... Li, Z. P. (2004). Cloning and expression of two chalcone synthase and a flavonoid 3'5'-hydroxylase 3'-end cDNAs from developing seeds of blue-grained wheat involved in anthocyanin biosynthetic pathway. *Acta Botanica Sinica*, 46(May 2003), 588–594.
- Yang, X.Y., Jiang, W.J., & Yu, H.J. (2012). The lipoxygenase (LOX) family genes during fruit development, abiotic stress and hormonal treatments in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *International Journal of Molecular Sciences*, 13(2), 2481–2500.
- Ye, X., Al-Babili, S., Klöti, a, Zhang, J., Lucca, P., Beyer, P., & Potrykus. (2000). Engineering the provitamin a (-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science*, 287(5451), 303–305.
- Youn, B., Sellhorn, G. E., Mirchel, R. J., Gaffney, B. J., Grimes, H. D., & Kang, C. (2006). Crystal structures of vegetative soybean lipoxygenase VLX-B and VLX-D, and comparisons with seed isoforms LOX-1 and LOX-3. *Proteins*, 65(4), 1008–1020.
- Ytterberg, A., Peltier, J., & Wijk, K. Van. (2006). Protein profiling of plastoglobules in chloroplasts and chromoplasts. A surprising site for differential accumulation of metabolic enzymes. *Plant Physiology*, 140(March), 984–997.
- Zeven, A. C. (1991). Wheats with purple and blue grains: a review. *Euphytica*, 56, 243–258.
- Zhang, J., Subramanian, S., Stacey, G., & Yu, O. (2009). Flavones and flavonols play distinct critical roles during nodulation of *Medicago truncatula* by *Sinorhizobium meliloti*. *The Plant Journal*, 57(1), 171–183.
- Zhang, Y., Vareed, S. K., & Nair, M. G. (2005). Human tumor cell growth inhibition by nontoxic anthocyanidins, the pigments in fruits and vegetables. *Life Sciences*, 76(13), 1465–1472.
- Zhao, J., & Herrmann, K. M. (1992). Cloning and sequencing of a second cDNA encoding from *Solanum tuberosum* L. *Plant Gene Register*, 100, 1075–1076.

SAMUELE GIBERTI

PUBLICATION LIST 2011-2014

ISI-ranked research papers

- 1) **Giberti S.**, Berteza C.M., Narayana R., Maffei M.E. and Forlani G.* (2012) Two phenylalanine ammonia lyase isoforms are involved in the elicitor-induced response of rice to the fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*. *J. Plant Physiol.* *169*, 249–254.
- 2) Forlani G.*, Bertazzini M., **Giberti S.**, Wieczorek D., Kafarski P. and Lipok J. (2013) Sublethal detergent concentrations increase metabolization of recalcitrant polyphosphonates by the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* *20*, 3263–3270.
- 3) Teixeira R.R.*, Pereira W.L., Campos Tomaz D., Marques De Oliveira F., **Giberti S.** and Forlani G.* (2013) Synthetic analogues of the natural compound cryphonectric acid interfere with photosynthetic machinery through two different mechanisms. *J. Agric. Food Chem.* *61*, 5540–5549.
- 4) Forlani G.*, Berlicki Ł., Duò M., Dziędziła G., **Giberti S.**, Bertazzini M. and Kafarski P. (2013) Synthesis and evaluation of effective inhibitors of plant δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductase. *J. Agric. Food Chem.* *61*, 6792–6798.
- 5) Demuner A.J., Barbosa L.C.A.*, Mendes Miranda A.C., Carvalho Geraldo G., Moreira da Silva C., **Giberti S.**, Bertazzini M. and Forlani G.* (2013) The fungal phytotoxin alternariol 9-methyl ether and some of its synthetic analogues inhibit the photosynthetic electron transport chain. *J. Nat. Prod.* *76*, 2234–2245.
- 6) **Giberti S.**, Funck D. and Forlani G.* (2014) Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductase from *Arabidopsis thaliana*: stimulation or inhibition by chloride ions and feed-back regulation by proline depend on whether NADPH or NADH acts as co-substrate. *New Phytol.* *202*, 911–919.
- 7) Forlani G.*, Bertazzini M. and **Giberti S.** (2014) Differential accumulation of γ -aminobutyric acid in elicited cells of two rice cultivars showing contrasting sensitivity to the blast pathogen. *Plant Biol.* *16*, 1127–1132.

Congress abstracts

- 1) Forlani G., **Giberti S.** and Bertazzini M. (2011) Purification and properties of *Malus domestica* carotenoid cleavage dioxygenase 4. *Atti del Congresso Congiunto AGI-SIBV-SIGA, Assisi*, 3A.11.
- 2) **Giberti S.**, Bertazzini M. and Forlani G. (2011) Lipoxygenase activity in *Triticum durum*: differential properties of enzyme forms. *Atti del Congresso Congiunto AGI-SIBV-SIGA, Assisi*, 8.13.
- 3) Petrollino D., Liboni M., **Giberti S.**, Berlicki L., Kafarski P., Forlani G. (2011) Phytotoxicity of pyrroline-5-carboxylate reductase inhibitors. *Atti del Congresso Congiunto AGI-SIBV-SIGA, Assisi*, 6A-41.
- 4) Duò M., **Giberti S.** and Forlani G. (2012) Post translational regulatory mechanisms for plant δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductase. *Atti del XII Congresso della Federazione It. di Scienze della Vita, Roma*, P19.8, 119.
- 5) Forlani G., Bertazzini M. and **Giberti S.** (2012) Phenolic metabolism in durum wheat genotypes producing anthocyanin pigmented seeds. *Atti del XII Congresso della Federazione It. di Scienze della Vita, Roma*, P19.9, 119.

- 6) **Giberti S.**, Bertazzini G. and Forlani G. (2012) Subcellular localization and hormone-regulated expression of durum wheat lipoxygenases. Atti del XII Congresso della Federazione It. di Scienze della Vita, Roma, P19.12, 120.
- 7) Milan D., Bertazzini M., **Giberti S.** and Forlani G. (2012) Effects of amino acid analogues on plant metabolism: β -pyrazol-yl-L-alanine. Atti del XII Congresso della Federazione It. di Scienze della Vita, Roma, P19.19, 121.
- 8) Forlani G., Bertazzini M. and **Giberti S.** (2012) ROS scavenging systems in italian rice genotypes showing differential tolerance to salt stress. Proceed. of the Int. Workshop on Crop Improvement in a Changing Environment. Venice, 1.10.
- 9) **Giberti S.** and Forlani G. (2013) Enzymatic bleaching of health-promoting carotenoids in durum wheat. Atti del V Congresso della Società Italiana di Biologia Vegetale, Foggia, PVI-03, 48.
- 10) Forlani G. and **Giberti S.** (2013) Carotenoid cleavage dioxygenase 4 in chromoplasts of white and yellow-fleshed peach genotypes. Atti del V Congresso della Società Italiana di Biologia Vegetale, Foggia, PVI-04, 48
- 11) Bertazzini M., **Giberti S.**, Funck D. and Forlani G. (2014) Salts modulate δ^1 -pyrroline-5-carboxylate metabolism in rice. Atti del XIII Congresso della Federazione Ital. di Scienze della Vita, Pisa, P19.3, 97.