

PROGETTO DI UNITÀ DI RICERCA - MODELLO B
Anno 2008 - prot. 2008P7YFFA_003

1 - Area Scientifico-disciplinare

05: Scienze biologiche 100%

2 - Coordinatore Scientifico

CRESTI MAURO

Professore Ordinario

Università degli Studi di SIENA

Facoltà di SCIENZE MATEMATICHE FISICHE e NATURALI

Dipartimento di SCIENZE AMBIENTALI

3 - Responsabile dell'Unità di Ricerca

GEROLA PAOLO

Professore Ordinario

12/08/1951

GRLPLA51M12L378H

Università degli Studi INSUBRIA Varese-Como

Dipartimento di BIOLOGIA STRUTTURALE E FUNZIONALE

0332/421410
(Prefisso e telefono)

0332/421500
(Numero fax)

paolo.gerola@uninsubria.it

4 - Curriculum scientifico

Testo italiano

Nato nel 1951. Nel 1974 laurea in Scienze biologiche, nel 1981 ricercatore universitario e dal 1986 prof ordinario di botanica.

Dal 1974 al 1983 sono state condotte ricerche su diversi aspetti del processo fotosintetico in cloroplasti di spinacio: a) la presenza di un trasporto di elettroni all'ossigeno, associato alla sintesi di ATP; b) la diversa composizione dei tilacoidi nelle partizioni e nelle zone esposte allo stroma; c) il ruolo dell'organizzazione granale e della fosforilazione dell'LHCII nella distribuzione dell'energia luminosa fra PSI e PSII; d) il meccanismo coinvolto nella formazione dei grana.

Dal 1983 al 1985 ha lavorato presso l'Università di Odense, DK e l'Università di Leiden, NL, collaborando col prof. Olson e col prof. Amesz in ricerche sui batteri fotosintetici. Durante queste ricerche: a) è stata dimostrata la presenza di un complesso Bchl a-proteina nei clorosomi di Chlorobium, probabilmente coinvolto nel trasferimento di energia fra la Bchl c, localizzata all'interno dei clorosomi, e i centri di reazione presenti nel plasmalemma; b) è stata purificata e sequenziata la proteina più abbondante dei clorosomi; c) è stato studiato il trasferimento di energia all'interno dei clorosomi; d) si sono studiati gli aggregati di Bchl c in vitro, come modelli dell'organizzazione della Bchl c nei clorosomi; e) sono stati paragonati spettroscopicamente i clorosomi di Chlorobium e Chloroflexus.

Studi su tale argomento sono proseguiti, mediante tecniche di ODMR, in collaborazione con l'Università di Padova.

Sono state inoltre condotte ricerche sulla riproduzione nelle piante. Nel 1997 si sono trascorsi sei mesi come visiting professor presso il Plant Cell Biology Research Center dell'Università di Melbourne (Australia), in una collaborazione sullo studio sulla riproduzione sessuale nelle piante, in particolare sulla crescita dei tubetti pollinici in relazione all'autoincompatibilità.

Recentemente studi particolarmente interessanti sono stati condotti sulla cinetica della crescita dei tubetti pollinici in incroci intra- ed inter- specifici ed è stata inoltre osservata la presenza di un inibitore dell'attività glucuronidasi negli stili di Nicotiana.

L'attività di organizzazione dell'attività didattica in qualità di Presidente di Consiglio di Coordinamento Didattico, soprattutto in relazione alla nuova riforma universitaria, ha tuttavia limitato la produzione scientifica di questi ultimi anni, che solo recentemente è stata efficacemente ripresa.

Testo inglese

Born in 1951. In 1974 degree in Biological sciences, in 1983 university researcher and since 1986 full professor in Botany.

Since 1974 to 1983 researches have been performed on different aspects of the photosynthetic process in spinach chloroplasts: a) the presence of an electron transport to oxygen associated to ATP synthesis; b) the different composition of photosynthetic membranes in partitions and stroma exposed regions; c) the physiological function of granal organization and LHCII phosphorylation on energy transfer and PSII photochemical efficiency; d) the mechanism involved in grana formation.

Since 1983 to 1985 researches on photosynthetic green bacteria have been carried on at Odense University (DK) and in Leiden (NL), in collaboration with prof. John Olson and prof. Jan Amesz. During these researches a) it has been demonstrated the presence of a Bchl a-protein complex in the chlorosomes of Chlorobium, probably involved in energy transfer from the Bchl c molecules inside the chlorosomes to the reaction center in the plasmalemma; b) it has been purified and sequenced the most abundant chlorosome protein; c) it has been investigated the energy transfer inside the chlorosomes; d) Bchl c aggregates obtained in vitro have been spectroscopically investigated as possible models of Bchl c organization in the chlorosomes; e) the chlorosomes from Chlorobiaceae and Chloroflexaceae have

been spectroscopically compared.

Researches on these topics, based on the use of ODMR techniques, continued in collaboration with Padova University.

Researches have been also performed on sexual plant reproduction. In 1997 research activity on pollen tube growth in relation to self-incompatibility has been carried on as visiting professor at the Plant Cell Biology Research Center of Melbourne University (Australia).

Recently, interesting studies have been conducted on the kinetic of pollen tubes growth in intraspecific and interspecific crosses and the presence of an inhibitor of β -glucuronidase activity in *Nicotiana* styles has been demonstrated.

However, in the last years the activity as President of the Degree Councils in Biological and Natural Sciences, particularly in relation to university reform in Italy, has severely limited the scientific production, which only recently could be effectively resumed.

5 - Pubblicazioni scientifiche più significative del Responsabile dell'Unità di Ricerca

1. FIOR S, GEROLA P. (2009). A novel method for fluorometric continuous measurement of beta-glucuronidase (GUS) activity using 4-methyl-umbelliferyl-beta-D-glucuronide (MUG) as substrate. *PLANT SCIENCE*, vol. 176; p. 130-135, ISSN: 0168-9452, doi: 10.1016/j.plantsci.2008.10.001
2. PISONI C., VALLINI M., GEROLA P. (2004). Studies on a β -glucuronidase inhibitor present in *Nicotiana* styles. In: *Frontiers in Sexual Plant Reproduction II*, vol. 1, p. 107
3. VALLINI M., PISONI C., GEROLA P. (2004). Analysis of pollen tubes growth in intra- and inter-specific crosses. In: *Frontiers in Sexual Plant Reproduction II*, vol. 1, p. 88
4. VIANELLI A, CATTANEO A.G, GEROLA P., ITOH S (2003). Two step fluorescence quenching in chlorosomes of *Chloroflexus aurantiacus* by ps measurement. *PLANT AND CELL PHYSIOLOGY*, vol. 44s; p. 74, ISSN: 0032-0781
5. GEROLA P., MOL C.A., NEWBIGIN E., LUSH W.M. (2000). Regulation of LAT52 promoter activity during pollen tube growth through the pistil of "*Nicotiana glauca*". *SEXUAL PLANT REPRODUCTION*, vol. 12; p. 347-352, ISSN: 0934-0882
6. TETTAMANTI C., CERABOLINI B., GEROLA P., CONTI A. (2000). Melatonin in officinal plants. *ACTA PHYTOTHERAPEUTICA*, vol. 3; p. 137-144
7. BORREGO C.M., GEROLA P., MILLER M., COX R.P. (1999). Light intensity effects on pigment composition and organisation in the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*. *PHOTOSYNTHESIS RESEARCH*, vol. 59; p. 159-166, ISSN: 0166-8595
8. SCARAMAGLI S., BIONDI S., CAPITANI F., GEROLA P., ALTAMURA M.M., TORRIGIANI P. (1999). Polyamine conjugate levels and ethylene biosynthesis: inverse relationship with vegetative bud formation in tobacco thin layers. *PHYSIOLOGIA PLANTARUM*, vol. 105; p. 367-376, ISSN: 0031-9317
9. CARRARO L., LOMBARDO G., GEROLA P. (1996). Stylar peroxidases and heteromorphic incompatibility reactions in *Primula acaulis* Hill ("thrum" morph). *CARYOLOGIA*, vol. 49; p. 101-112, ISSN: 0008-7114
10. MAINI L., CARRARO L., TORRIGIANI P., LOMBARDO G., GEROLA P. (1995). Cytochemical localization of diamine oxidase in *Helianthus tuberosus* developing tubers. *JOURNAL OF PLANT PHYSIOLOGY*, vol. 146; p. 375-378, ISSN: 0176-1617
11. CARRARO L., GEROLA P., LOMBARDO G., GEROLA F.M. (1990). Pseudo-self-compatibility in ultraviolet irradiated plants of *Primula acaulis* (pin morph"). *JOURNAL OF CELL SCIENCE*, vol. 95; p. 659-665, ISSN: 0021-9533

6 - Elenco dei partecipanti all'Unità di Ricerca

6.1 - Componenti

Componenti della sede dell'Unità di Ricerca

n°	Cognome	Nome	Università/Ente	Qualifica	Disponibilità temporale indicativa prevista	
					1° anno	2° anno
1.	CERABOLINI	Bruno Enrico Leone	Università degli Studi INSUBRIA Varese-Como	Professore Associato confermato	3	3
2.	GEROLA	Paolo	Università degli Studi INSUBRIA Varese-Como	Professore Ordinario	6	6
TOTALE					9	9

Componenti di altre Università / Enti vigilati

Nessuno

Titolari di assegni di ricerca

n°	Cognome	Nome	Università/Ente	Disponibilità temporale indicativa prevista	
				1°	2°

		anno	anno	
1. FIOR	Simone	Università degli Studi INSUBRIA Varese-Como	11	11
TOTALE			11	11

Titolari di borse

Nessuno

6.1 bis Vice-responsabile

6.2 - Altro personale

Nessuno

6.3 - Personale a contratto da destinare a questo specifico Progetto

n° Tipologia di contratto	Costo previsto	Disponibilità temporale indicativa prevista		Note
		1° anno	2° anno	
		1. Assegnista	42.000	
TOTALE	42.000	11	11	

6.4 - Dottorati a carico del PRIN da destinare a questo specifico Progetto

Nessuno

7 - Titolo specifico del Progetto svolto dall'Unità di Ricerca

Testo italiano

Crescita in vitro ed in vivo dei tubetti pollinici: possibile ruolo delle glucuronidasi nel modulare la plasticità della parete e dell'inibitore delle glucuronidasi presente nello stilo nel regolare la crescita dei tubetti pollinici.

Testo inglese

In vitro and in vivo pollen tube elongation: possible role of glucuronidases in modulating pollen tube cell wall plasticity and of the glucuronidase inhibitor present in the style in regulating pollen tube growth

8 - Abstract del Progetto svolto dall'Unità di Ricerca

Testo italiano

Esocitosi ed endocitosi intervengono nella regolazione dei processi di crescita e morfogenesi nelle cellule eucariotiche, in particolare in quelle altamente polarizzate come il tubetto pollinico la cui crescita è localizzata nella regione apicale e avviene attraverso un meccanismo conosciuto come "tip growth" (52). Nella crescita apicale dei pt, oltre al trasporto regolato di vescicole endo - ed eso- citotiche, è necessaria un'azione concertata di enzimi che modifichino la parete (45-48). Recentemente è stata dimostrata la presenza di β -glucuronidasi (GUS) nelle piante ed è stato proposto un loro ruolo nella crescita per distensione e, in particolare, nella formazione dei peli radicali (49). L'allungamento dei peli radicali è caratterizzato da una crescita polarizzata analoga, in meccanismi e regolazione, a quella presente nei pt (52, 53). E' quindi particolarmente interessante investigare la presenza di GUS nel polline e il suo eventuale ruolo nella germinazione e crescita dei tubetti pollinici. Contemporanea analisi proteomica condotta in collaborazione con l'unità di Siena potrà identificare eventuali isoforme proteiche attive nel tubetto in crescita.

Sulla base di sequenze note dei geni GUS in Arabiopsis (51) e Scutellaria (50) studi di biologa-molecolare verranno condotti sull'mRNA estratto dal polline e dai tubetti pollinici, allo scopo di individuare il/i geni GUS espressi nel polline. Questo potrà consentire in futuro esperimenti di silenziamento genico volti allo studio del ruolo del GUS nella maturazione del polline e nella germinazione e crescita dei tubetti pollinici.

Nel nostro laboratorio, è stata inoltre dimostrata la presenza di un inibitore dell'attività glucuronidasica negli stili di Nicotiana (43). Indicazioni preliminari sembrano indicare una sua presenza nello spazio apoplastico e, quindi, un suo possibile ruolo nella regolazione dell'attività GUS associata ai tubetti pollinici e forse della loro crescita. Si intende quindi purificare tale inibitore, caratterizzarlo e studiarne la distribuzione nello stilo in relazione alla crescita dei tubetti pollinici compatibili e incompatibili.

Considerato che dati sperimentali indicano che l'inibitore dell'attività GUS viene internalizzato all'interno dei pt durante la crescita nel tessuto di trasmissione stilare, la caratterizzazione-purificazione dell'inibitore e l'utilizzo di polline trasformato con il costrutto "promotore LAT52-GUS" (espresso specificatamente nel polline) apriranno nuove possibilità per studiare in vitro e semi-vivo il fenomeno di endocitosi, particolarmente rilevante per le interazioni pt-stilo.

Nell'ambito di questo progetto si intendono quindi perseguire i seguenti obiettivi:

- Studio sulla presenza della β -glucuronidasi (GUS) nei tubetti pollinici (pt): sua caratterizzazione, purificazione e investigazione del ruolo svolto nella germinazione e crescita dei tubetti pollinici.
- Purificazione e caratterizzazione dell'inibitore stilare del GUS.
- Analisi della distribuzione dell'inibitore in diverse parti dello stilo, in relazione anche al tipo di impollinazione, e suo utilizzo per investigare il processo di internalizzazione nei tubetti pollinici.

Testo inglese

During differentiation, cells acquire different morphologies, typically by delivering new plasma membrane (PM) and cell wall material through the exocytotic pathway (52). Beside an increase in cell volume this process provides specific sets of proteins for the cell wall and PM. A polarized protein/lipid composition of the PM also implies selective removal/recycling of molecules regulating the polarity of cells and plant development. This process is especially significant for highly specialized cells such as pollen tubes (pt) which grow only at the apex by an extreme form of polar growth, known as tip growth (52).

In addition to regulated exo- and endo- cytosol, tip growth in pt requires a concerted action of cell wall modifying enzymes (45-48). Recently it has been demonstrated that a β -glucuronasi (GUS) is present in plants and it has been proposed that it is involved in root hairs formation (49). As the apical growth in pollen tubes and root hairs share an analogous mechanism (52, 53), it is interesting to investigate the presence of GUS in pollen and its role in pollen tube germination and growth. Proteomic analysis, conducted in collaboration with Siena Unit, will allow to identify GUS isoforms present in "in vitro" grown pollen tubes.

On the basis of GUS gene sequences known in Arabidopsis (51) and in Scutellaria (50) mRNA extracted from tobacco pollen will be analyzed for the identification and sequence of GUS gene/s expressed in pollen. These results will be useful in future functional studies based on gene silencing on the role of GUS in pollen development and in pollen tube germination and growth.

Recently the presence of a GUS inhibitor in the styles of Nicotiana has been demonstrated in our lab (43) manuscript in preparation). Preliminary experiments seem to indicate its presence in the apoplastic space and, thus, a possible role in the regulation of GUS activity in pollen and, perhaps, of their growth. One of the aims of this project is therefore to purify the GUS inhibitor, characterize it and investigate its distribution along the style, in relation to compatible and incompatible pollen tube growth.

Experimental data indicate that GUS inhibitor is internalized inside pollen tubes during their growth along the style. The characterization and purification of stylar GUS inhibitor and the use of pollen expressing transgenic GUS will open the possibility to use a new approach to study "in vitro" and "in semi vivo" the endocytosis in pollen, a process particularly relevant in pistil-pollen tubes interactions.

This research project will therefore pursue the following objectives:

- Study of the presence, localization and role of beta-glucuronidase in pollen and in pollen tubes.
- Purification and characterization of the stylar GUS inhibitor
- Analysis the presence and distribution of GUS inhibitor along the style, also in relation to pollination, and its use for investigating the internalization process in pollen tubes.

9 - Settori di ricerca ERC (European Research Council)

LS Life Sciences

LSI Molecular, cellular and developmental biology: molecular biology, biochemistry, biophysics, structural biology, cell biology, cell physiology, signal transduction and pattern formation in plants and animals

LSI_9 Cell biology and molecular transport mechanisms

LSI_14 Cell signalling and cellular interactions

10 - Parole chiave

Testo italiano

TUBETTO POLLINICO

GLUCURONIDASI

Testo inglese

POLLEN TUBE

GLUCURONIDASES

11 - Stato dell'arte

Testo italiano

La fecondazione nelle Angiosperme richiede la germinazione del polline sullo stigma e la crescita dei tubetti pollinici lungo lo stilo (quando presente) e nell'ovario, fino all'ovulo ed al sacco embrionale, in quella che viene detta fase progamica (1). Nelle Solanaceae, come nella maggior parte delle Angiosperme, la crescita dei tubetti pollinici lungo lo stilo è confinata alla matrice dello spazio intercellulare (IM) del tessuto di trasmissione (TT), che, per le sue architetture, offre costrizioni fisiche che contribuiscono a guidare i tubetti pollinici fino all'ovario (2). In letteratura (3,4) è stato riportato che in diverse specie la crescita dei tubetti pollinici nel pistillo è bifasica: prima più lenta, nello stigma e nella parte più apicale dello stilo, poi 2-5 volte più veloce. Recentemente abbiamo osservato che le due fasi sono separate da una interruzione o forte rallentamento della crescita dei tubetti pollinici (fase lag) (5) ed è stato proposto che il passaggio fra prima e seconda fase possa essere associato al passaggio da una crescita "autotrofa", sostenuta dalle riserve del polline, ad una crescita eterotrofa, basata su molecole presenti nel TT.

L'intera fase progamica dipende da strette interazioni fra polline e pistillo (1,6). Queste interazioni, come anche recentemente osservato (7), iniziano sulla superficie stigmatica e proseguono durante la crescita dei tubetti attraverso la IM del TT e nell'ovario, fornendo la nutrizione e la guida necessarie per raggiungere il sacco embrionale. Processi di riconoscimento sono alla base di tali interazioni e giocano un particolare ruolo nelle specie autoincompatibili (SI). Solanaceae Scrophulariaceae e, Rosaceae condividono lo stesso tipo di processo di incompatibilità gametofitica (SSR-GSI), per mezzo della quale viene impedita l'autofecondazione (8, 9): un singolo locus complesso multiallelico (locus S) è responsabile della GSI e i tubetti pollinici che condividono uno dei due alleli S presenti nello stilo sono riconosciuti come incompatibili e la loro crescita, successivamente la prima fase che non viene alterata, è bloccata o severamente rallentata. Nelle specie SI le interazioni fra tubetti pollinici e TT dipendono pertanto dal tipo di impollinazione: auto- o allo- e in entrambi i casi coinvolgono proteine specificatamente espresse.

Studi condotti in vitro hanno dimostrato che la crescita apicale dei tubetti pollinici coinvolge sia un trasporto di vescicole dal golgi al plasmalemma sia un ritorno di vescicole dal plasmalemma verso il golgi o il sistema vacuolare. Opera quindi un complesso movimento di vescicole eso- ed endo- citotiche che, in vivo, è probabilmente coinvolto nel movimento bidirezionale di molecole fra tubetti pollinici e matrice del TT. Movimento di alcune proteine dalla matrice del TT nella parete dei tubetti pollinici, a ridosso del plasmalemma, è stato osservato in N. tabacum, anche se non vi è evidenza di una loro traslocazione all'interno dei tubetti pollinici. (6, 10, 11, 12). Traslocazione di proteine dalla IM all'interno dei tubetti pollinici è stata invece osservata in N. alata, in relazione al processo di GSI. Infatti RNasi, localizzate nello spazio apoplastico del tessuto di trasmissione stilare, prodotto stilare del locus S (S-RNasi) (13), penetrano all'interno dei tubetti pollinici sia compatibili che incompatibili (14), dove, in questi ultimi, causerebbero la digestione dell'RNA con inibizione della loro crescita.

La specificità di azione delle S-RNasi verso i tubetti pollinici che condividono lo stesso allele S è stata anche recentemente confermata da studi su impollinazioni miste condotte nel nostro laboratorio. Utilizzando polline trasformato con il costruito polline-specifico promotore LAT52 - gene GUS (15,16), si è potuto seguire il destino dei due tipi di tubetti pollinici (compatibile e incompatibile) in impollinazioni miste in Nicotiana alata e si è dimostrate sia l'assenza del cosiddetto (17,18)

effetto "pollen mentor", sia la specificità d'azione dell'autoincompatibilità verso i tubetti "incompatibili".

Recentemente è stato individuato il prodotto del gene *S* del polline. Si tratta di una F-box protein (SFB) (19-23) ed è stato proposto che le due regioni variabili osservate nella regione carbossiterminale del SFB potrebbero essere responsabili per la discriminazione delle S-RNasi derivanti dallo stesso allele *S* presente nel polline (self S-RNasi) o da alleli *S* diversi (non-self S-RNasi). L'F-box protein porterebbe quindi alla ubiquitinazione e successiva degradazione delle non-self S-RNasi, lasciando non ubiquitinate e attive le self-RNasi (24). Questo modello spiegherebbe sia la specificità d'azione delle S-RNasi sia l'osservazione che S-RNasi penetrano anche all'interno dei tubetti pollinici compatibili, pur non inibendone la crescita.

Tuttavia, sebbene sia stato dimostrato che le S-RNasi giocano un ruolo essenziale nella GSI (25-27), diversi risultati indicano che altri fattori sono coinvolti e che, per operare, le S-RNasi devono essere espresse in un "corretto" background genetico (28-36). Il che potrebbe spiegare l'osservazione che, in vitro, le S-RNasi causano una inibizione della crescita dei tubetti pollinici solo parziale, con bassa specificità verso l'allele *S* (37).

Come fattori del background genetico sono state individuate tre proteine (HTB, 120KDa protein, 4936 factor) (30, 38-41), non espressione del locus *S*. In particolare è stato osservato che la proteina di 120KDa, presente nella matrice del TT, che si è visto essere internalizzata nei tubetti pollinici (42), rimane nella membrana di vacuoli al cui interno sono colocalizzate l'S-RNasi internalizzate (41). E' stato proposto che nei tubetti compatibili le S-RNasi rimangono confinate all'interno del sistema vacuolare, mentre nei tubetti incompatibili i compartimenti vacuolari verrebbero digeriti e le S-RNasi rilasciate nel citoplasma, dove eserciterebbero la loro citotossicità. La proteina HTB sarebbe responsabile della dissoluzione dei vacuoli e rilascio delle S-RNasi e verrebbe degradata nei tubetti pollinici compatibili (41). Non è tuttavia chiaro come l'SFB possa selezionare la "compatibilità", in base alla quale viene diversificato il destino dei vacuoli.

Sempre per quanto riguarda i rapporti pistillo-tubetti pollinici, di particolare interesse è stata la recente scoperta effettuata nei nostri laboratori della presenza nello stilo di un inibitore dell'attività glucuronidasi (43). Infatti, nella crescita apicale dei pt, oltre al trasporto regolato di vescicole endo- ed eso- citotiche, è necessaria un'azione concertata di enzimi che modificano la parete, priva, nella zona apicale di crescita, sia di cellulosa che di callosa (44). E' stato proposto che, insieme a poligalatturonidasi e pectato liasi, le pectin-metilesterasi giochino un ruolo chiave nel regolare la plasticità della parete e quindi la crescita direzionale del tubetto pollinico (45-48). Recentemente è stata dimostrata la presenza di β -glucuronidasi (GUS) nelle piante ed è stato proposto un loro ruolo nella crescita cellulare per distensione e, in particolare, nella formazione dei peli radicali (49). A sostegno di tali osservazioni, sulla base della sequenza del gene GUS sequenziato in *Scutellaria* (50), nel genoma di *Arabidopsis* sono stati recentemente individuati tre diversi geni GUS, uno dei quali, portando la sequenza segnale caratteristica per le proteine apoplastiche, potrebbe svolgere la sua funzione nella parete (51). Considerato che è stato ipotizzato che la crescita polare dei peli radicali e dei tubetti pollinici coinvolgano gli stessi meccanismi e processi di regolazione (52, 53), l'enzima GUS potrebbe essere coinvolto anche nella germinazione e crescita dei tubetti pollinici e la presenza dell'inibitore della glucuronidasi nello stilo potrebbe essere correlata ad una eventuale regolazione della loro crescita.

Testo inglese

Fertilisation in angiosperms requires pollen germination on the stigma and growth of the pollen tubes through the style (when it is present) and the ovary towards the embryo sac. This part of the fertilisation process is referred to as the progamic phase (1). In Solanaceae, as in most of angiosperms, pollen tube growth through the style is confined to the intercellular matrix (IM) of the transmitting tissue (TT), which, by its architecture, offer physical constraints which contribute to drive the pollen tubes to the ovary (2). In several species, like *Petunia inflata* and *Nicotiana glauca*, the growth of pollen tubes in the pistil is reported to be biphasic: a slow growth rate during the first few hours after germination in the stigma and the upper part of the style, followed by a 2 to 5-fold increased growth rate (3,4). We recently observed that the two phases are separated by a 2-4 hours interruption in pollen tube growth (lag phase) (5) and it has been proposed that the shift between the two phases might be associated to the change of pollen tubes growth from an "autotrophic" one, sustained by reserves accumulated in the pollen during its development, to an "heterotrophic" one, based on resources provided by the TT.

The whole progamic phase, not only the second phase, depends on close interactions between pollen and pistil (1,6). These interactions, as also recently observed (7), initiate on the stigmatic surface and continue during the growth of the pollen tubes through the IM of the TT and the ovary, supplying them with the nutrition and guidance necessary to reach and penetrate the embryo sac. Recognition processes are

at the basis of such interactions and play a particular role in self-incompatible (SI) species. Solanaceae share with Rosaceae and Scrophulariaceae the same gametophytic self-incompatibility process (GSI), by which inbreeding is avoided (8, 9): a single, multi-allelic complex locus (S-locus) is responsible of self-incompatibility and the pollen tubes sharing one of the two S-allele of the style are recognized as incompatible and their growth is stopped or severely slowed down after the first growth slow phase, which is practically unmodified.

In SI species the interactions between pollen tubes and TT depend thus on the kind of pollination, self or cross. In both cases the biochemical interactions involve proteins and other molecules specifically expressed in pollen and/or TT.

It is known that the polar growth in pollen tubes involves both a movement of vesicles from golgi to plasmalemma and a wayback of vesicles from plasma membrane to golgi and vacuolar system. Therefore a complex movement of eso- and endo- cytotic vesicles operates, which, in vivo, is probably responsible of the bidirectional movement of molecules between the pollen tubes and the intercellular matrix of TT.

Protein movement from the TT intercellular matrix inside the wall of pollen tubes, close to the plasma membrane, has been observed in *N. tabacum* (6, 10, 11, 12). However, no evidence has been presented for their internalization inside the pollen tubes.

In fact it has been demonstrated that RNases, stilar product of the S locus present in the apoplastic space of the TT (S-RNases) (13), are internalized inside both compatible and incompatible pollen tubes (14). A mechanism should act in a way that RNases exert their cytotoxic action only when internalized inside incompatible pollen tubes. The specificity of S-RNases action versus pollen tubes sharing the same S-allele has been recently confirmed by studies on mixed pollinations conducted in our lab. The use of pollen from *Nicotiana glauca* transformed by a construct with GUS as reporter gene under control of a pollen specifically active promoter (15,16) allowed us to follow the fate of two different kind of pollen tubes (compatible and incompatible) in mixed pollinations. It has thus been demonstrated the absence of the previously proposed (17, 18) "pollen mentor effect" and the specificity of action of the rejection mechanism versus self-pollen tubes.

Also the product of S-locus in pollen has been recently determined. It is an F-box protein (SFB) (19-23) and it has been proposed the two variable regions observed at the carboxyl terminus of SFBs might be responsible for the discrimination between self S-RNases (product of the same S-allele) and non-self S-RNases (product of different S-alleles). SFB might ubiquitinate all non-self S-RNases for degradation but specifically interact with self S-RNase to leave it active, leading to the arrest of self-pollen tubes growth (24). This model might explain both the specificity of S-RNase action and the observation that S-RNases penetrate inside compatible pollen tubes, without inhibiting their growth.

However, although S-RNases are essential in GSI (25-27), many experiments indicate that other factors, not associated to the S-locus, are involved and S-RNases have to be expressed in a proper genetic background (28-36). On the other hand, the fact that other factors besides S-RNases are required in GSI can explain the observation that, in "in vitro" system, S-RNases only partially inhibit *N. glauca* pollen tubes growth and exhibit mild S-allele specificity (37).

Three stilar proteins (HTB, a 120KDa protein and the 936 factor) not associated to the S locus and essential in GSI have been identified (30, 38-41). It has been demonstrated that, after internalization, the 120 KDa protein and the S-RNases colocalize in the same vacuolar compartment: the 120KDa protein in the membrane of the vacuole and the S-RNases inside it (41). It has been proposed that in compatible pollen tubes S-RNases remain confined (and than inactive) inside the vacuolar compartment while in the incompatible pollen tubes the vacuoles dissolve and the S-RNases are released in the cytoplasm, where they exert their cytotoxic action. HTB protein seems to be involved in vacuole breakdown and it is degraded in the compatible pollen tubes. In this model the specificity of action of S-RNases is associated to their compartmentalization. SFB might be involved in HTB degradation (41). However it is not clear how it is verified the matching of S-RNase and SFB (the stilar and pollen products of S-locus) which should determine the incompatibility of the pollen tube.

Another interesting aspect in relation to pollen tubes - pistil interactions is the discovery in our lab of the presence of an inhibitor of β -glucuronidase activity in the style (43).

In fact, in addition to regulated exo- and endo- cytoskeleton, tip growth in pt requires a concerted action of cell wall modifying enzymes. It has been proposed that the pectin-methylesterases, together with polygalacturonidases and pectate-liases, play an essential role in modulating the wall plasticity of pollen tubes and, therefore, their polar growth (45-48). Recently it has been demonstrated that β -glucuronidases (GUS) are present in plants and it has been proposed that they are involved in cell elongation and, particularly, in root hairs formation (49). In agreement with such observations, on the basis of the GUS gene sequence determined in *Scutellaria* (50), three different GUS genes have been identified in the *Arabidopsis* genome. One of them contains the signal sequence characteristic for apoplastic proteins and, therefore, might explicate its action in the cell wall (51). As it has been hypothesized that the apical growth in pollen tubes and root hairs share the same mechanism (52, 53) GUS might be involved also in pollen tubes germination and growth and the presence of GUS inhibitor in the style might be related to a possible regulation of pollen tubes growth.

12 - Riferimenti bibliografici

- 1) de Graaf BJJ, Derksen JWM and Mariani C (2001) *Sex Plant Reprod.* 14:41-55
- 2) Lush WM (1999) *Trends Plant Sci* 4: 413-418
- 3) Lubliner N, Singh-Cundy DT and A. Singh-Cundy (2003) *Sex Plant Reprod.* 15: 243-253
- 4) Stephenson AG, Travers SE, Mena-Ali JI and Winsor JA (2003) *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 358: 1009-1018
- 5) Vallini M, Pisoni C and Gerola PD (2004) *Frontiers in Sexual Plant Reproduction II*, Albany (USA).
- 6) Cheung AY, Wu HM, di Stilio V, Glaven R, Chen C, Wong E, Ogdahl J and Estavillo A (2000) *Ann Bot* 85: 29-37

- 7) Busot GY, McClure B, Ibarra-Sanchez CP, Jimenez-Duran K, Vazquez-Santana S and Cruz-Garcia F (2008) *J Exp. Bot.* 59: 3187-3201
- 8) Wang Y, Wang X, Skirpan AL and Kao TH (2003) *J Exp. Bot.* 54: 115-122
- 9) Cruz-Garcia F, Hancock C.N. and McClure B. (2003) *J Exp. Bot.* 54: 123-130
- 10) Wu HM, Wang H and Cheung AY (1995) *Cell* 82: 395-403
- 11) de Graaf BH, Knulman BA, Derksen J and Mariani C (2003) *J Exp. Bot.* 54: 55-63
- 12) de Graaf BHJ, Knulman BA, van der Werden GM, Feron R, Derksen J and Mariani C (2004) *Sex Plant Reprod.* 16: 245-252
- 13) McClure BA, Haring V., Ebert PR, Anderson MA, Simpson RJ, Sakiyama F, Clarke AE (1989) *Nature* 342: 955-957
- 14) Luu D-T, Qin X, Morse D and Cappadocia M (2000) *Nature* 407, 649-651
- 15) Tell D, Yamaguchi J and McCormick S (1990) *Development* 109: 705-713
- 16) Gerola PD, CA Mol, E Newbiggin and WM Lush (2000) *Sex Plant Reprod* 12, 347-352
- 17) Ramulu KS, Bredemeijer Gmm, Dijkuis P, de Nettancourt D and Schibilla H (1979) *Theor.Appl.Genet.* 54: 215-218
- 18) Knox RB, Galet M and Dumas C (1987) *Intl Rev Cyt* 107: 315-332
- 19) Ushijima K, H Sassa, AM Dandekar, TM Gradziel, R Tao and H Hirano (2003) *Plant Cell* 15: 771-781
- 20) Yamane H., K Ikeda, K Ushijima, H Sassa, and R Tao (2003) *Plant Cell Physiol.* 44: 764-769
- 21) Romero C, Vilanova S, Burgos L, Martinez-Calvo J, Vicente M, Llacer G and Badenes ML (2004) *Plant Mol Biol* 56: 145-157
- 22) Ushijima K, Yamane H, Watari A, Kakehi E, Ikeda K, Hauck NR, Iezzoni AF and Tao R (2004) *Plant J* 39: 573-586
- 23) Sijacic P, Wang X, Skirpan AL, Wang Y, Dowd PE, McCubbin AG, Huang S and Kao TH (2004) *Nature* 429:302-305
- 24) Hua Z and Kao TH (2008) *Plant J* 54: 1094-1104
- 25) Huang S, HS Lee, B Karunanandaa and TH Kao (1994) *Plant Cell* 6: 1021-1028
- 26) Lee HS, S Huang and TH Kao (1994) *Nature* 367: 560-563
- 27) Murfett J, TL Atherton B Mou, CS Gasser and BA McClure (1994) *Nature* 367: 563-566
- 28) Carraro L, G Lombardo and FM Gerola (1986) *J.Cell Sci.* 82: 1-10
- 29) Murfett J, Strabala TJ, Zurek DM, Mou B, Beecher B and McClure B (1996) *The Plant Cell* 8: 943-958
- 30) McClure BA, Mou B, Canevascini S and Bernatzky R (1999) *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 96, 13548-13553.
- 31) McClure BA, Cruz-Garcia F, Beecher BS and Sulaman W (2000) *Ann Bot* 85: 113-123
- 32) Cruz-Garcia F, CN Hancock and B McClure (2002) *J Exper. Bot.* 54, 123-130
- 33) Kondo K, Yamamoto M, Matton DP, Sato T, Hirai M, Norioka S, Hattori T and Kowyama Y (2002) *Plant J.* 29, 627-636.
- 34) Kondo K, Yamamoto M, Itahashi R, Sato T, Egashira H, Hattori T and Kowyama Y (2002) *Plant J.* 30, 143-154.
- 35) O'Brien M, Kapfer C, Major G, Laurin M, Bertrand C, Kondo K, Kowyama Y and Matton DP (2002) *Plant J.* 32, 985-996
- 36) Beecher B, Zurek D and McClure B (2001) *Sex Plant repr.* 14: 69-76
- 37) Gray JE, BA McClure, I Bönig, MA Anderson and AE Clarke (1991) *Plant Cell* 3: 271-283
- 38) McClure BA, Cruz-Garcia F, Beecher BS and Sulaman W (2000) *Anal Bot* 85:113-123
- 39) O'Brien M, Kapfer C, Major G, Laurin M, Bertrand C, Kondo K, Kowyama Y and Matton DP (2002) *Plant J* 32:1-12
- 40) Hancock CN, Kent L, BA McClure (2005) *Plant J* 43:716-723
- 41) Goldraij A, Kondo K, Lee CB, Hancock CN, Sivaguru M, Vazquez-Santana S, Kim S, Philips TE, Cruz-Garcia F and McClure B (2006) *Nature* 439: 805-810
- 42) Lind JL, Bonig I, Clarke AE and Anderson MA (1996) 9: 75-86
- 43) Pisoni C., Vallini M., Todeschini M. and Gerola P. (2004) *Frontiers in Sexual Plant Reproduction II*, Albany (USA).
- 44) Ferguson C et al. (1998) *Planta* 206 : 452-460
- 45) Bosch JIE et al.(2005) *Plant Physiol.* 138 : 1334-1346
- 46) Jiang L et al.(2005) *Plant Cell* 17 : 584-596
- 47) Tian GW et al.(2006) *Dev. Biol.* 294 : 83-91
- 48) Krichevsky A et al.(2007) *Dev. Biol.* 303 : 405-420
- 49) Sudan C, Prakash S, Bhomkar P, Jain S and Balla-Sarin N. (2006) *Planta* 224: 853-864
- 50) Sasaki K, Taura F, Shoyama Y and Morimoto S (2000) *J Biol Chem* 275: 27466-27472
- 51) Woo HH, Jeong BR, Hirsch AM and Hawes MC (2007) *Sc Direct* 90: 143-153
- 52) Hepler et al (2001) *Ann rev Cell Dev Biol* 17: 159-187
- 53) Cole RA and Fowler JE (2006) *Curr Opin Plant Biol* 9: 579-588
- 54) Jefferson RA (1987) *Plant Mol Biol Rep* 5: 387-405
- 55) Fior S, Vianelli a and Gerola PD (2009) *Plant Sci* 176: 130-135
- 56) Kim D-H, Jin Y-H, Park J-B and Kobashi K (1994) *Biol Pharm Bull* 17: 443-445
- 57) Bahieldin A, Eissa HF, Mahfouz HT, Dyer WE, Madkour MA and Qu R (2005) *Plant Cell Tiss Org Cult* 82: 11-17
- 58) Joshi CS and Priya ES (2007) *Pharm Biol* 45, 363-365
- 59) Cervone et al.(1987) *PlantPhysiol.*85: 631-637.58a
- 60) Cheung AY, Wang H and Wu HM (1995) *Cell* 82, 383-393

13 - Descrizione del programma e dei compiti dell'Unità di Ricerca

Testo italiano

Questo progetto di ricerca affronta tre diversi aspetti inerenti il meccanismo di crescita apicale nei tubetti pollinici e le interazioni tubetti pollinici - stilo. È stato osservato che nella crescita apicale dei pt è necessaria un'azione concertata di enzimi, quali poligalatturonidasi, pectato liasi e pectin-metilsterasi, che regolano la plasticità della parete e quindi la crescita direzionale del tubetto pollinico (45-48).

Recentemente è stato proposto che la β -glucuronidasi (GUS) sia coinvolta nella crescita per distensione e nella formazione dei peli radicali (49). Considerato che analoghi meccanismi sono coinvolti nella crescita apicale dei peli radicali e dei tubetti pollinici (52, 53), si investigherà la presenza del GUS nel polline e il suo eventuale ruolo nella germinazione e crescita dei tubetti pollinici.

Verrà inoltre intrapreso un approccio di tipo biologico-molecolare basato sull'analisi dell'mRNA estratto dal polline e dai tubetti pollinici, mediante il quale si intende individuare il/i geni GUS espressi nel polline. Questo potrà consentire in futuro esperimenti di silenziamento genico volti allo studio del ruolo del GUS nella maturazione del polline e nella germinazione e crescita dei tubetti pollinici.

Nel nostro laboratorio si è inoltre dimostrata la presenza di un inibitore del GUS nello stilo di Nicotiana (5). Tale inibitore verrà quindi purificato e caratterizzato e ne verrà analizzata la distribuzione ai diversi livelli stilari, in relazione al tipo di impollinazione (auto o allo impollinazione in *N. alata*, specie auto-incompatibile). Questo consentirà di verificare una eventuale relazione fra la crescita dei tubetti pollinici ed un suo eventuale ruolo nella regolazione della crescita dei tubetti pollinici lungo lo stilo.

Utilizzando polline trasformato con il costrutto polline specifico LAT52-GUS verrà inoltre investigata la penetrazione dell'inibitore dell'attività GUS nei tubetti pollinici cresciuti in vitro e, mediante tecniche in semi-vivo, si potranno anche verificare eventuali cambiamenti associati alla crescita lungo lo stilo nella capacità dei tubetti pollinici di internalizzare macromolecole.

Nell'unità di ricerca, mentre il coordinatore copre le competenze di tipo biochimico ed istochimico, il giovane ricercatore (Simone Fior) con le competenze già acquisite potrà dare, in collaborazione con l'Unità di Siena, il necessario contributo all'individuazione del gene GUS espresso nel polline.

Riassumendo questo progetto è volto ad investigare tre aspetti distinti:

1) Presenza, localizzazione e ruolo delle Beta-glucuronidasi (GUS) nel polline e nei tubetti pollinici

2) Purificazione e caratterizzazione dell'inibitore stilare del GUS.

3) Analisi della distribuzione dell'inibitore in diverse parti dello stilo, in relazione anche al tipo di impollinazione, e suo utilizzo per investigare il processo di internalizzazione nei tubetti pollinici.

1) Presenza, localizzazione e ruolo delle Beta-glucuronidasi (GUS) nel polline e nei tubetti pollinici

La presenza del GUS nel polline e nei tubetti pollinici verrà investigata sia mediante tecniche istochimiche sia mediante dosaggio fluorimetrico in estratti opportunamente ottenuti. I tubetti pollinici di *N.tabacum* e *N.alata* verranno cresciuti in vitro secondo metodologia di routine. Per l'analisi istochimica verrà utilizzato sia il 5-bromo-4-chloro-3-indolyl acetato, substrato di largo utilizzo che per azione del GUS forma un precipitato blu, sia l'ELF97 (Mol.Probes), ideato per evidenziare l'attività glucuronidasi su GEL di elettroforesi. Quest'ultimo come prodotto della reazione forma un precipitato fluorescente che, mediante un metodo messo a punto nel nostro laboratorio, può essere utilizzato per l'evidenziamento istochimico del GUS. L'utilizzo dell'ELF97 come substrato consentirà l'analisi al microscopio confocale e, quindi, una più precisa localizzazione dell'attività enzimatica nel polline e nei tubetti pollinici.

Estratti verranno inoltre ottenuti dai granuli di polline o dai tubetti pollinici cresciuti in vitro e l'attività GUS verrà misurata a diversi pH mediante fluorimetria, utilizzando il 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronic acid come substrato. A questo scopo nel nostro laboratorio si è messo a punto un metodo che, a differenza di quello riportato in letteratura (54), consente la misura dell'attività enzimatica durante il procedere della reazione (55). Questo consentirà di misurare rapidamente la velocità di reazione in più campioni e in diverse condizioni sperimentali, verificandone la linearità nel tempo.

Allo scopo di analizzare la presenza del GUS anche "in vivo", l'attività verrà dosata in estratti stilari ottenuti da pistilli non impollinati o impollinati, raccolti a tempi diversi dopo l'impollinazione. In quest'ultimo caso, mediante colorazione con blu di anilina si verificherà la presenza dei tubetti pollinici in pezzetti prelevati a diversi livelli dello stilo, analizzando la possibile correlazione con l'attività GUS misurata.

L'eventuale ruolo giocato dal GUS nella germinazione-crescita dei pt potrà essere studiato "in vitro" utilizzando diversi inibitori disponibili commercialmente, quali il saccharo-1-4-lactone (49), la silimarina o la tectorigenina (56, 57), oppure l'inibitore stilare purificato.

L'analisi del genoma in Arabidopsis ha consentito di individuare tre diversi geni GUS, che sembrano avere anche un destino cellulare diverso (due di membrana e uno extracellulare). Questi geni hanno mostrato zone conservate, con una identità di sequenza nucleotidica pari a circa il 50% con il gene GUS sequenziato in Scutellaria.

La conoscenza delle sequenze consentirà di studiare il/i gene/i GUS espressi nel polline. Per la difficoltà di prelevare il polline da Arabidopsis, gli esperimenti verranno condotti su tabacco, pianta modello più idonea per condurre studi sul polline. Allo scopo mRNA verrà estratto dal polline e il cDNA sarà ottenuto mediante trascrizione inversa. Più coppie di primer degenerati verranno disegnate mediante analisi delle sequenze conservate note in Arabidopsis (51a) e Scutellaria (50a) e verranno utilizzate per individuare il/i gene/i espresso nel polline. Le classiche tecniche di biologia molecolare (PCR, RACE, clonaggio, sequenziamento) verranno utilizzate al fine di arrivare alla sequenza completa del gene.

Questo risultato costituisce la base di futuri esperimenti di silenziamento genico mediante i quali si potrà condurre uno studio di funzione specifico del gene GUS nel polline.

Questa parte del progetto verrà condotta in collaborazione con l'unità dell'Università di Siena, presso la quale sono già stati condotti studi di analisi dell'mRNA del polline di tabacco, e saranno utili le competenze in biologia molecolare acquisite da Fior nei precedenti lavori.

2) Purificazione e caratterizzazione dell'inibitore stilare del GUS e studio della sua presenza e distribuzione nello stilo in relazione al tipo di impollinazione.

Purificazione dell'inibitore.

In letteratura è riportata l'individuazione di inibitori dell'attività GUS di natura non proteica (), mentre una proteina è responsabile dell'inibizione dell'attività galatturonidasi osservata in diverse piante (58).

Due diversi approcci verranno quindi seguiti per purificare l'inibitore stilare.

Enzima GUS commerciale ottenuto da E.coli (pH optimum neutro) o da Helix pomatia (pH optimum acido) verrà utilizzato per verificare l'attività inibitoria nell'estratto stilare e durante le diverse tappe di purificazione.

Nel primo tipo di approccio, stili verranno raccolti, liofilizzati e sottoposti ad una serie di estrazioni in ordine crescente di polarità (cicloesano, diclorometano, acetato di etile, acetone, n-butanolo, metanolo, acqua). I diversi estratti verranno portati a secco, risospesi negli opportuni solventi (DMSO o Formamide per gli estratti dal cicloesano al metanolo e tampone fosfato pH7 o acetato pH5 per l'estratto in acqua) e quindi testati per la loro attività inibitoria. Gli estratti contenenti la maggior attività inibitoria potranno essere ulteriormente purificati mediante opportuna cromatografia su colonna (gravitazionale e/o HPLC) e l'attività inibitoria verrà testata nei diversi picchi eluiti.

Nel secondo tipo di approccio verrà seguito il metodo riportato in letteratura per la purificazione dell'inibitore della beta-galatturonidasi, basato su colonna di affinità (58a). Nel metodo riportato, l'estratto vegetale viene caricato a pH acido su colonna di Sepharose 4B attivato con CNBr contenente legato l'enzima galatturonidasi e, dopo lavaggi, l'inibitore viene eluito a pH neutro. Analoga colonna di affinità, con legato l'enzima GUS di E. coli disponibile commercialmente, verrà quindi utilizzata per legare l'inibitore presente nell'estratto stilare di Nicotiana. Per quanto riguarda l'eluizione, esperimenti preliminari indicano tuttavia che l'inibitore del GUS si lega all'enzima e ne inibisce l'attività anche a pH neutro. Pertanto pH più alcalini e/o variazioni della forza ionica dovranno essere utilizzati per l'eluizione dell'inibitore dalla colonna. Elettroforesi su gel o cromatografia su colonna (FPLC o HPLC) potranno essere utilizzati, se necessario, per ulteriore purificazione dell'inibitore.

Caratterizzazione dell'inibitore

L'inibitore purificato verrà caratterizzato dal punto di vista enzimatico (tipo di inibizione, Ki, optimum di pH di inibizione, ecc.). Se attività GUS è associata al polline, l'inibitore verrà caratterizzato dal punto di vista enzimatico sia verso il GUS di E. Coli (solitamente usato come gene reporter nelle piante) sia verso il GUS estratto dal polline di Nicotiana. Se, analogamente all'inibitore della β -galatturonidasi, si tratta di un polipeptide, verrà inviato a ditta esterna per ottenere la sequenza aminoacidica della zona NH₂-terminale e di frammenti interni.

3) Analisi della distribuzione dell'inibitore in diverse parti dello stilo, in relazione anche al tipo di impollinazione, e suo utilizzo per investigare il processo di internalizzazione nei tubetti pollinici. Utilizzando le piante di N.alata trasformate col costrutto LAT52-GUS si è precedentemente osservato che, durante la crescita lungo lo stilo, attività GUS è evidenziabile istochimicamente nei pt solo nella parte alta dello stilo (16). Dosaggio fluorimetrico dell'attività GUS in estratti stilari ha invece rivelato che l'enzima GUS è presente nei tubetti pollinici anche nella parte bassa dello stilo. L'incapacità di osservare istochimicamente l'attività GUS potrebbe essere dovuta alla penetrazione dell'inibitore all'interno dei pt stessi. La presenza dell'attività GUS nei pt nella parte alta dello stilo potrebbe essere quindi dovuta o all'assenza dell'inibitore in tale tratto stilare o ad una differenza nella capacità dei pt di internalizzare proteine nelle diverse parti dello stilo o, come proposto nel caso dell'internalizzazione delle S-RNasi nel processo di incompatibilità gametofittica (41), in un diverso destino delle molecole internalizzate dai pt nella parte alta e bassa dello stilo. Innanzitutto, si intende quindi analizzare la presenza dell'inibitore negli estratti ottenuti a diversi livelli stilari. A questo scopo l'attività dell'enzima GUS commerciale verrà misurata fluorimetricamente in presenza e assenza degli estratti ottenuti ai diversi livelli stilari.

La presenza dell'inibitore ai diversi livelli verrà inoltre analizzata in stili di N. alata prelevati a tempi diversi dopo auto ed allo-impollinazione. Contemporaneamente verrà esaminato, mediante colorazione con blu di anilina, la distribuzione dei tubetti pollinici lungo lo stilo e verrà esaminata un eventuale relazione fra il tipo di impollinazione e la presenza dell'inibitore.

Una volta purificato, l'inibitore potrà essere utilizzato per paragonare la sua internalizzazione in tubetti pollinici cresciuti "in vitro" e in "semi vivo". Verrà usato polline da piante trasformate col costrutto LAT52-GUS.

Negli esperimenti in vitro si verificherà sia se l'inibitore aggiunto al mezzo di crescita inibisce la germinazione ed allungamento dei tubetti pollinici, sia se inibisce l'attività GUS espressa al loro interno. Negli esperimenti in "semi vivo", dopo impollinazione i "tubetti pollinici GUS" saranno lasciati sfocciare dallo stilo exciso (59) nel terreno di crescita in presenza o assenza dell'inibitore del GUS. Lo stilo verrà exciso a diversi livelli: sotto lo stemma, dove i tubetti si allungano durante la prima fase di crescita, e ad altri due livelli: uno subito sotto la zona della "fase di lag" e l'altro a metà dello stilo, dove i tubetti sono in "crescita eterotrofa". Da questo esperimento informazioni potranno essere ottenute su eventuali cambiamenti indotti dalla crescita lungo lo stilo nella capacità dei pt di internalizzare macromolecole (proteine qualora l'inibitore del GUS sia una proteina) o nel loro destino dopo internalizzazione. Infatti l'attività GUS nel polline trasformato LAT52-GUS è facilmente rilevabile istochimicamente nei pt (15, 16, 54) e la sua assenza indicherà chiaramente non solo l'internalizzazione dell'inibitore all'interno dei tubetti ma anche la sua presenza nel citoplasma, dove è localizzato l'enzima GUS. Di più difficile interpretazione sarà la mancanza di effetto dell'inibitore sull'attività GUS presente nei tubetti. Questo infatti potrà essere dovuto sia alla non penetrazione dell'inibitore all'interno dei tubetti che alla sua penetrazione, seguita però dal suo confinamento all'interno delle vescicole endocitiche e del sistema vacuolare, come osservato per le S-RNasi nei tubetti compatibili. Esperimenti con anticorpi preparati verso l'inibitore, soprattutto se si tratta di polipeptide, potranno chiarire tale punto. Inoltre, gli anticorpi potranno essere anche utilizzati in esperimenti di colocalizzazione con i vari tipi di nanogold (positivo, negativo, neutro) o con il marcatore fluorescente del plasmalemma FM4-64 da condursi in collaborazione con l'unità di Milano. Questi esperimenti potranno chiarire la via di internalizzazione eventualmente utilizzata.

Tutta la strumentazione necessaria per condurre il progetto di ricerca descritto è già disponibile, sia per quanto riguarda le attrezzature più costose, quali il microscopio elettronico, il microscopio confocale e il sistema HPLC e FPLC, sia per tutta la strumentazione di base, compresi i sistemi di elettroforesi, il microscopio ottico stereo e il microscopio ottico a epifluorescenza Olympus IX51, con camera digitale Nikon per registrazione delle immagini.

Testo inglese

This project approaches three different aspects concerning the mechanism involved in the apical growth of pollen tubes and their interactions with the style.

The first one concerns the role of enzymes in modulating cell wall plasticity, as a prerequisite for cell distension and pollen tube elongation. Recently it has been proposed that β -glucuronidase (GUS) is involved in root hairs formation (49). As it has been proposed that similar mechanisms are involved in elongation of pollen tubes and root hairs (52, 53), we will investigate the presence of GUS in pollen and its role in pollen tube germination and elongation.

mRNA extracted by pollen grains and/or pollen tubes will also be analyzed in order to detect and sequence GUS gene/s expressed in pollen. This will allow future functional studies by gene silencing on the role of GUS in pollen development and in pollen tube germination and growth.

The GUS inhibitor reported to be present in Nicotiana style (5) will also be purified and characterized. The analysis of its distribution at different stylar levels and in relation to the type of impollination will allow to verify a possible in vivo role of GUS inhibitor in pollen tube growth regulation.

By using pollen tubes expressing the pollen specific LAT52-GUS promoter (GUS-pollen), it will also be possible to investigate GUS inhibitor internalization inside "in vitro" and "in semi-vivo" grown pollen tubes. These experiments will allow to investigate changes in the internalization properties of pollen tubes during their pollen tube growth along the style.

In the research unit, the biochemical and histochemical expertises are covered by the coordinator, while a young researcher (Simone Fior), in collaboration with Siena group, will give a consistent contribution to the identification of GUS genes expressed in pollen.

Summarizing, this project will investigate three different aspects:

1- The presence, localization and role of beta-glucuronidase in pollen and in pollen tubes.

2- Purification and characterization of the GUS inhibitor

3- Analysis of the presence and distribution of GUS inhibitor along the style, also in relation to pollination, and its use to investigate the internalization process in pollen tubes.

1-1- The presence, localization and role of beta-glucuronidase in pollen and in pollen tubes.

The presence of GUS in pollen and in pt will be investigated by histochemistry and by fluorimetric assays in pt extracts. Pollen tubes will be "in vitro" grown, according routine protocols. The 5-bromo-4-chloro-3-indolyl acetate, widely used as GUS substrate, will be employed for the histochemical analysis, as it will be used ELF97 (Mol.Probes), compound originally designed to detect the glucuronidase activity in electrophoretic gels. Whereas in the case of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl acetate a blue precipitate is formed, in the latter case a fluorescent compound is the product of the reaction. In our lab a protocol was set up which allow the use of ELF97 in histochemical analysis and, therefore, a higher detail in the localization of the enzymatic activity by confocal microscopy will be obtained.

GUS activity in extracts obtained by pollen grains and by "in vitro" grown pollen tubes, will be analysed at different pH, by a fluorimetric method, using the 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronic acid as the substrate. Enzyme activity will be measured by a continuous assay procedure set up in our lab (55). This new method allows a fast measure of GUS activity in a higher number of samples and in different conditions, with concomitant check of the linearity of the reaction.

In order to analyse the presence of GUS in vivo, the activity will be tested in stylar extracts obtained from not pollinated and pollinated pistils, collected at different times after pollination. In the last case, anyline blue staining will verify the presence of pt in the different style segments and the presence of pt will be related to the measured GUS activity.

The role of GUS during pollen germination and pt growth will be studied by using different GUS inhibitors as the saccharo-1-4-lactone (49), the silymarin (56) or the purified stylar inhibitor.

Genome analysis in Arabidopsis allowed to detect three different GUS genes, which seem to have a different cellular fate (two membrane proteins and one extracellular)(51). Analysis of genes sequences revealed conserved sequences, with 53-54% nucleotide sequence identity with the GUS coding region of Scutellaria. On the basis of the conserved regions it will be possible to detect the GUS gene expressed in pollen. Due to the difficulties to collect Arabidopsis pollen, the experiments will be performed in *N. tabacum*, a model plant for pollen studies. mRNA will be extracted from pollen or pollen tubes and cDNA will be obtained by reverse transcription. Appropriate primers chosen according the conserved regions gathered from Arabidopsis and Scutellaria GUS sequences (50, 51) will allow to detect the GUS genes expressed in tobacco pollen. Basic molecular biology techniques (PCR, RACE, cloning, sequencing) will be used to get the complete sequence of GUS cDNA.

The obtained GUS sequence will allow future studies by gene silencing on the functional role of GUS in pollen development and pollen tube germination and growth. This part of the research project will be performed in collaboration with Siena University and the skills acquired by Simone Fior in previous researches will be very useful.

The presence of GUS in tobacco pollen will also be investigated in collaboration with Siena Unit by proteomic analysis. This approach will allow to verify the GUS isoforms present in "in vitro" grown pollen tubes.

2- Purification and characterization of the GUS inhibitor and analysis of its presence and distribution in the style in relation to pollination.

Purification of GUS inhibitor

In literature it has been reported that GUS inhibitor activity is associated to non-proteinaceous factors (56-58), while a peptide is responsible of β -galacturonidase activity inhibition (59). Two different approaches will be therefore used to purify the stylar GUS inhibitor.

Commercial GUS from *E. Coli* (neutral optimum pH) and *H. pomatia* (acidic optimum pH) will be used to test GUS inhibitor activity.

Styles will be collected, lyophilized and passed through several extraction steps, in an order of increasing polarity (cyclohexane, dichloromethane, ethyl acetate, acetone, n-butanol, methanol, water). The different extracts will be dried, suspended in the appropriate solvents (DMSO or Formamide for the extracts in cyclohexane - methanol and Pi buffer or acetate buffer for the extract in water) and tested for GUS inhibitor activity. The extracts characterized by high inhibitor activity will be further purified by HPLC.

The affinity column protocol reported in literature for the purification of the peptidic inhibitor of β -galacturonidase activity (59) will also be used. A CNBr-activated-Sepharose 4B column with bound commercial GUS from *E. Coli* will be used to bind the GUS inhibitor present in the *Nicotiana* stylar extract. Alkaline pHs and/or changes in ionic strength will be used to elute the GUS inhibitor from the column. Gel electrophoresis or column chromatography will be used, if necessary, for further purification steps.

GUS inhibitor characterization

The purified inhibitor will be enzymatically characterized (kind of inhibition, K_i , optimum pH for inhibition, ecc.). If GUS activity is associated to the pollen, the inhibitor will be enzymatically characterized both versus the *E. coli* GUS (commonly used as gene reporter in plants) and versus the GUS extracted by pollen.

If the inhibitor is a peptide, it will be sent to a company for NH₂ terminal region and internal fragments sequencing.

3- Analysis of the presence and distribution of GUS inhibitor along the style, also in relation to pollination, and its use to investigate the internalization process in pollen tubes.

In a previous work we observed that in *Nicotiana* styles pollinated by GUS-pollen GUS activity is histochemically detectable only in the upper part of the style and in the ovary, while it is absent in the lower part of the style (16).

This observation was interpreted as due to differential regulation of LAT52 promoter activity along the style.

Fluorimetric measurement of GUS activity in style extracts revealed that GUS is present also in GUS-pollen tubes growing in the lower part of the style. The failure in histochemical staining of GUS activity in the lower part of the style might be therefore due to GUS inhibitor penetration inside the pollen tubes. Three different hypothesis might explain the histochemical staining observed in the higher part of the style, i.e. 1) the GUS inhibitor is not present, or 2) it is not internalized by the pollen tubes, or 3) it remains confined in the vacuolar system.

First of all the presence of the GUS inhibitor will be analyzed at different stylar levels. To this aim, commercial GUS activity will be fluorimetrically measured in the presence or absence of stylar extracts. The presence of the GUS inhibitor will also be analyzed at the different levels in *N. alata* styles at different times after auto- or allo- pollination. The presence of pollen tubes at the different stylar level will also be examined by aniline blue staining in order to examine a possible correlation between compatible/incompatible pollen tube growth and GUS inhibitor presence.

When purified, GUS inhibitor will also be used to compare its internalization in "in vitro" and "in semi vivo" grown pollen tubes.

Pollen from plants transformed with LAT52-GUS will be used. In "in semi-vivo" experiments, following pistil pollination GUS-pollen tubes will be let growing outside excised styles (59), in the growth medium in the presence or absence of the GUS inhibitor. The style will be excised at different levels: under the stigma, where pollen tubes elongate during the first "autotrophic" phase, and at two different levels: one under the lag phase region and one at the middle of the style, where pollen tubes grow by nutrient uptake from the TT. This kind of experiment will help to understand if the growth along the style changes the internalization properties of pollen tubes or the fate of internalized molecules. In fact GUS activity is easily histochemically detectable in "in vitro" grown GUS-pollen (15, 16, 54) and its absence will indicate GUS inhibitor internalization into the pollen tube cytoplasm, where GUS is present. It will be more difficult to explain the observation of histochemically detected GUS activity in the pollen tubes in the presence of GUS inhibitor in the growing medium. In fact two different possibilities can explain this observation. Or the GUS inhibitor is not internalized by pollen tubes or it is confined inside the vacuolar compartment. Experiments with antibodies raised against the purified GUS inhibitor (especially if it is a protein) will allow to clarify this aspect.

Moreover GUS inhibitor antibodies, if available, will also be used to investigate the colocalization of GUS inhibitor with different kinds of nanogold (positive, negative and neutral) or with the FM4-64 in internalization experiments performed in collaboration with Milano unit. These experiments will allow to get further information on the internalization pathway in pollen tubes.

All the instruments required for the research project are already available: electron microscope, confocal microscope, HPLC and FPLC systems and all the basic instruments, like electrophoretic apparatus, stereo microscope and epifluorescence microscope Olympus IX51 equipped with a Nikon digital camera for image acquisition.

14 - Descrizione delle attrezzature già disponibili ed utilizzabili per la ricerca proposta

Testo italiano

n°	anno di acquisizione	Descrizione
1.	2007	Microscopio Laser Confocale (Leica)
2.	2001	Sistema Agilent per HPLC
3.	1994	Microscopio elettronico a trasmissione Jeol JEM10.10
4.	1994	Ultracentrifuga Beckman L80 con rotori ad angolo fisso e swinging out.
5.	1994	Sistemi Waters per HPLC e FPLC.

Testo inglese

n°	anno di acquisizione	Descrizione
1.	2007	Confocal Laser Scanning Microscope (Leica)
2.	2001	Agilent system for HPLC
3.	1994	Transmission electron microscope Jeol JEM 10.10
4.	1994	Beckman L80 ultracentrifuge equipped with fixed angle and swinging out rotors.
5.	1994	Waters systems for HPLC and FPLC.

15 - Descrizione delle Grandi attrezzature da acquisire (GA)

Testo italiano

Nessuna

Testo inglese

Nessuna

16 - Mesi persona complessivi dedicati al Progetto

	Numero	Disponibilità temporale indicativa prevista		Totale mesi persona
		1° anno	2° anno	
<i>Componenti della sede dell'Unità di Ricerca</i>	2	9	9	18
<i>Componenti di altre Università/Enti vigilati</i>	0			
<i>Titolari di assegni di ricerca</i>	1	11	11	22
<i>Titolari di borse</i>	<i>Dottorato</i>	0		
	<i>Post-dottorato</i>	0		
	<i>Scuola di Specializzazione</i>	0		
<i>Personale a contratto</i>	<i>Assegnisti</i>	1	11	11
	<i>Borsisti</i>	0		
	<i>Altre tipologie</i>	0		
<i>Dottorati a carico del PRIN da destinare a questo specifico progetto</i>	0	0	0	0
<i>Altro personale</i>	0			
TOTALE	4	31	31	62

17 - Costo complessivo del Progetto dell'Unità articolato per voci

Voce di spesa	Spesa in Euro	Descrizione dettagliata (in italiano)	Descrizione dettagliata (in inglese)
Materiale inventariabile	5.000	Acquisto di nuova macchina per PCR e componenti integrative per microscopio ottico	New thermal cycler PCR and integrating components for optical microscope
Grandi Attrezzature	0		
Materiale di consumo e	25.000	Reagenti, vetreria, manutenzione strumenti, spese	Reagents, glasses, instruments assistance, other basic

funzionamento (comprensivo di eventuale quota forfettaria)		<i>varie di funzionamento, quota forfettaria università</i>	<i>expenses and aliquot for general expenses</i>
Spese per calcolo ed elaborazione dati			
Personale a contratto	42.000	<i>Posizione post-doc con esperienze di tipo biochimico - biologico molecolare</i>	<i>Post-doc position for researcher with experience in biochemistry and molecular biology</i>
Dottorati a carico del PRIN da destinare a questo specifico progetto	0		
Servizi esterni	4.000	<i>Anticorpi, sequenziamento mediante spettrometro di massa</i>	<i>antibodies, peptide sequencing by MS/MS</i>
Missioni	4.000	<i>Spese di viaggio e soggiorno per partecipazione a congressi, per incontri fra le unità di ricerca e per svolgere ricerche presso sedi esterne</i>	<i>Travelling and living expenses to attend national and international congresses, for meetings between the research units and for research periods at external structures</i>
Pubblicazioni (*)	500	<i>pubblicazioni su riviste internazionali</i>	<i>publications on international journals</i>
Partecipazione / Organizzazione convegni (*)	2.000	<i>spese di iscrizione ai congressi</i>	<i>congress fees</i>
Altro (voce da utilizzare solo in caso di spese non riconducibili alle voci sopraindicate)	500	<i>trasporto materiale mediante corriere</i>	<i>delivering of particular material</i>
Subtotale	83.000		
Costo convenzionale	7.000		
Totale	90.000		

Tutti gli importi devono essere espressi in Euro arrotondati alle centinaia

(*) sono comunque rendicontabili le spese da effettuare per pubblicazioni e presentazione dei risultati finali della ricerca nei dodici mesi successivi alla conclusione del progetto, purché le relative spese siano impegnate entro la data di scadenza del progetto e purché le pubblicazioni e la presentazione dei risultati avvengano entro nove mesi dalla conclusione del progetto.

18 - Prospetto finanziario dell'Unità di Ricerca

Voce di spesa	Importo in Euro
a.1) finanziamenti diretti, disponibili da parte di Università/Enti vigilati di appartenenza dei ricercatori dell'unità operativa	
a.2) finanziamenti diretti acquisibili con certezza da parte di Università/Enti vigilati di appartenenza dei ricercatori dell'unità operativa	20.000
a.3) finanziamenti connessi al costo convenzionale	7.000
b.1) finanziamenti diretti disponibili messi a disposizione da parte di soggetti esterni	
b.2) finanziamenti diretti acquisibili con certezza, messi a disposizione da parte di soggetti esterni	
c) cofinanziamento richiesto al MIUR (max 70% del costo complessivo)	63.000
Totale	90.000

19 - Certifico la dichiarata disponibilità e l'utilizzabilità dei finanziamenti a.1) a.2) a.3) b.1) b.2)

SI

Firma _____

I dati contenuti nella domanda di finanziamento sono trattati esclusivamente per lo svolgimento delle funzioni istituzionali del MIUR. Incaricato del trattamento è il CINECA- Dipartimento Servizi per il MIUR. La consultazione è altresì riservata al MIUR - D.G. della Ricerca -- Ufficio IV -- Settore PRIN, alla Commissione di Garanzia e ai referee scientifici. Il MIUR potrà anche procedere alla diffusione dei principali dati economici e scientifici relativi ai progetti finanziati. Responsabile del procedimento è il coordinatore del settore PRIN dell'ufficio IV della D.G. della Ricerca del MIUR.

Firma _____

Data 12/02/2009 ore 16:48

ALLEGATO

Curricula scientifici dei componenti il gruppo di ricerca

Testo italiano

1. **FIOR Simone**

Curriculum:

Curriculum vitae
SIMONE FIOR

DATI PERSONALI

Nome: Simone Fior
Data di nascita: 10 Novembre 1978
Cittadinanza: Italiana
Indirizzo:
Casa Via Gozzi 95
21100 Varese (VA, Italy)

Lavoro Dip. di Biologia Strutturale e Funzionale
Università degli Studi dell'Insubria
Via Dunant 3 - 2110 Varese (VA, Italy)

e-mail: simone.fior@uninsubria.it

FORMAZIONE

2007 - 2009 Dip. di Biologia Strutturale e Funzionale
Università dell'Insubria - Varese
Post-doc in Biologia Vegetale

2003 - 2007 Dip. di Biologia - Università di Milano
Dottorato di Ricerca in Biologia Vegetale

Votazione: Eccellente

Titolo della Tesi di Dottorato: "Phylogenetic studies in the Caryophyllaceae (Caryophyllales), with emphasis on *Moehringia* L.: its taxonomy, systematics and character evolution." Il progetto è stato condotto in collaborazione con l'Università di Stoccolma.
La Tesi di Dottorato è stata discussa il 22 Gennaio 2007

2002 - 2003 Dip. di Biologia - Università di Milano

Borsa di Studio

Titolo del progetto: "Studio della biodiversità nelle Alpi Marittime mediante l'utilizzo di marcatori molecolari".

1998 - 2003 Università Statale di Milano

Corso di Laurea in Scienze Naturali

Votazione: 110/110 e Lode

Tesi di Laurea condotta presso l'Università di Stoccolma dal titolo: "Phylogeny, taxonomy and systematic position of *Clethra* (Clethraceae, Ericales) with notes on biogeography: evidence from plastid and nuclear DNA sequences".

La Tesi di Laurea è stata discussa il 14 Aprile 2003.

2001 Stockholm University - Svezia

Programma Erasmus

Studente Erasmus per la durata di sei mesi presso l'Università di Stoccolma dove ho seguito corsi e brevi progetti di ricerca in Botanica Sistemica ed Etologia.

ESPERIENZA DI RICERCA

Febbraio 2007 - Febbraio 2009 Dip. Di Biologia Strutturale e Funzionale

Università dell'Insubria - Varese

Supervisor: Paolo Gerola

Post-doc

Oggetto della mia recente attività di ricerca è lo studio del ruolo dell'enzima β -glucuronidasi (GUS) nelle piante, e della sua attività in relazione a quella di inibitori recentemente scoperti in diversi organi. Inoltre, l'effetto di tali inibitori sull'enzima GUS codificato dal gene di *E. coli* è valutato in relazione al vasto utilizzo di quest'ultimo come gene reporter in piante trasformate.

Novembre 2003 - Gennaio 2007 Dip. Di Biologia

Università di Milano

Supervisors: Per Ola Karis (Stockholm University)

e Francesco Sala (Università di Milano)

Dottorato di Ricerca

Oggetto del mio Dottorato di Ricerca è stato lo studio della sistematica della famiglia delle Caryophyllaceae con particolare attenzione alla filogenesi ed evoluzione dei caratteri nel genere *Moehringia*. Il progetto è stato condotto in stretta collaborazione con l'Università di Stoccolma e sotto la supervisione di P. O. Karis. In particolare, ho costruito la filogenesi molecolare ad oggi più completa delle Caryophyllaceae includendo un numero significativo di rappresentanti dei diversi gruppi tassonomici, ed i risultati ottenuti hanno portato ad importanti considerazioni sulla classificazione della famiglia. In seguito, la ricerca si è incentrata sulla filogenesi del genere *Moehringia*, prodotta sulla base dell'informazione proveniente da dati molecolari e morfologici. Scopo del lavoro era lo studio dell'evoluzione delle numerose specie endemiche delle Alpi appartenenti al genere: i risultati ottenuti hanno permesso di proporre un'ipotesi in relazione agli ultimi eventi di glaciazione. Inoltre, lo studio delle relazioni filogenetiche con i rappresentanti più vicini del genere *Arenaria* insieme all'analisi di strutture anatomiche di rilevante importanza tassonomica ha portato ad una reinterpretazione dell'omologia dei caratteri

fondamentali che contraddistinguono il genere. Sulla base di questi risultati, la classificazione di *Moehringia* è stata rivisitata e la tassonomia corretta. Durante il Dottorato di Ricerca, ho inoltre partecipato ad un progetto incentrato sullo studio dei processi di sviluppo che regolano la forma di crescita anomala di *Streptocarpus rexii* (Gesneriaceae). In questo lavoro, ho partecipato all'osservazione ed interpretazione di strutture anatomiche durante lo sviluppo dei meristemi, nonché all'analisi di ibridazioni in-situ a diversi stadi di sviluppo della pianta.

Ottobre 2005 - Novembre 2005 The Swedish Museum of Natural History

Stoccolma - Svezia

Supervisor: Prof. Arne A. Anderberg

Dottorato di Ricerca

Durante il Dottorato di Ricerca ho ottenuto una borsa di studio finanziata dal Progetto SYNTHESYS per l'utilizzo dell'erbario e delle strutture ad esso correlate presso The Swedish Museum of Natural History. Durante questo periodo ho studiato i caratteri morfologici delle specie appartenenti a *Moehringia* e di alcuni rappresentati del genere *Arenaria*, sotto la supervisione del Prof. Arne A. Anderberg. Questo ha permesso di compilare un data set morfologico incluso nelle analisi filogenetiche.

Febbraio 2004 - Marzo 2004 The Swedish Museum of Natural History

Stoccolma - Svezia

Supervisor: Prof. Mari Källersjö

Dottorato di Ricerca

Durante il Dottorato di Ricerca ho ottenuto una borsa di studio finanziata dal Progetto HIGHLAT presso il Molecular Systematics Lab di The Swedish Museum of Natural History sotto la supervisione del Prof. Mari Källersjö. Durante questo periodo ho impostato il lavoro di laboratorio e prodotto parte dei dati molecolari necessari per le analisi filogenetiche.

Aprile 2003 - Novembre 2003 Dip di Biologia

Università di Milano

Supervisor: Francesco Sala

Borsa di Studio

Titolo del progetto: "Studio della biodiversità nelle Alpi Marittime mediante l'utilizzo di marcatori molecolari". Scopo del lavoro è stata la valutazione della variabilità genetica all'interno di alcuni gruppi tassonomici scelti all'interno dell'hot-spot di biodiversità del Mediterraneo delle Alpi Marittime. Il progetto è stato co-finanziato dalla fondazione Bussolera-Branca.

Aprile 2002 - Settembre 2002 Dip. di Botanica

Stockholm University - Svezia

Supervisors: Per Ola Karis and Prof. Arne A. Anderberg

Tesi di Laurea

L'oggetto del mio lavoro di Tesi è stato lo studio della sistematica del genere *Clethra* (Clethraceae, Ericales). E' stata costruita una filogenesi del genere sulla base di dati molecolari che ha portato a formulare un'ipotesi sulla biogeografia del gruppo di interesse. Il lavoro è stato condotto presso l'Università di Stoccolma.

Pubblicazioni:

◆ FIOR S., VIANELLI A., GEROLA PD (2009). A novel method for fluorometric continuous measurement of P-glucuronidase (GUS) activity using 4-methyl-umbelliferyl-beta-D-glucuronide (MUG) as substrate. *PLANT SCIENCE*, vol. 176; p. 130-135, ISSN: 0168-9452

◆ FIOR S., KARIS P.O (2007). Phylogeny, evolution and systematics of *Moehringia* (Caryophyllaceae) as inferred from molecular and morphological data: a case of homology re-assessment. *CLADISTICS-THE INTERNATIONAL JOURNAL OF THE WILLI HENNIG SOCIETY*, vol. 23; p. 362-372, ISSN: 0748-3007

◆ MANTEGAZZA R., MLLER M., HARRISON C.J., FIOR S., DE LUCA C., SPADA A (2007). Anisocotily and meristem initiation in an unorthodox plant, *Streptocarpus rexii* (Gesneriaceae). *PLANTA*, vol. 225; p. 653-663, ISSN: 0032-0935

◆ FIOR S., KARIS P.O., MINUTO L., CASAZZA G., SALA F (2006). Molecular phylogeny of the Caryophyllaceae (Caryophyllales) inferred from chloroplast *matK* and nuclear rDNA ITS sequences. *AMERICAN JOURNAL OF BOTANY*, vol. 93; p. 399-411, ISSN: 0002-9122

◆ MINUTO L., FIOR S., ROCCOTIELLO E., CASAZZA G (2006). Seed morphology in *Moehringia* L. and its taxonomic significance in comparative studies within the Caryophyllaceae. *PLANT SYSTEMATICS AND EVOLUTION*, vol. 262; p. 189-208, ISSN: 0378-2697

◆ FIOR S., KARIS P.O., ANDERBERG A.A (2003). Phylogeny, taxonomy, and systematic position of *Clethra* (Clethraceae, Ericales) with notes on biogeography: evidence from plastid and nuclear DNA sequences. *INTERNATIONAL JOURNAL OF PLANT SCIENCES*, vol. 164; p. 997-1006, ISSN: 1058-5893

Testo inglese

1. FIOR Simone

Curriculum:

Curriculum vitae

SIMONE FIOR

PERSONAL DETAILS

Name: Simone Fior

Date of Birth: 10 November 1978

Citizenship: Italian

Address:

Home: Via Gozzi 95
21100 Varese (VA, Italy)
Work: Dept. of Structural and Functional Biology
University of Insubria
Via Dunant 3 - 21100 Varese (VA, Italy)

e-mail: simone.fior@uninsubria.it

EDUCATION

2007 - 2009 Dept. of Structural and Functional Biology
University of Insubria - Varese - Italy
Post-doc in Plant biology

2003 -2007 Dept. of Biology, Milan Univeristy - Italy
Ph.D in Plant Biology

Evaluation: Excellent

Title of the thesis: "Phylogenetic studies in the Caryophyllaceae (Caryophyllales), with emphasis on *Moehringia* L.: its taxonomy, systematics and character evolution". The project was conducted in collaboration with Stockholm University.

Doctoral Thesis was discussed 22 January 2007.

2002 - 2003 Dept. of Biology, Milan Univeristy - Italy

Pre-doctoral fellowship

Title of the project: "Study of the biodiversity of the Maritime Alps by means of molecular markers".

1998 - 2003 State University of Milan - Italy

Academic degree in Natural Sciences

Evaluation: 110/110 with honor

Practical thesis conducted at Stockholm University entitled: "Phylogeny, taxonomy and systematic position of *Clethra* (Clethraceae, Ericales) with notes on biogeography: evidence from plastid and nuclear DNA sequences".

Degree Thesis was discussed 14 March 2003.

2001 Stockholm University - Sweden

Erasmus Program

Six-months Erasmus Program at Stockholm University where I attended courses and conducted short-term research projects in Plant Systematics and Animal Behavior.

ACADEMIC RESEARCH TRAINING

February 2007 - February 2009 Dept. of Structural and Functional Biology

University of Insubria - Varese - Italy

Supervisor: Paolo Gerola

Post-doctoral position

The topic of my recent research is the role of the β -glucuronidase (GUS) enzymes in plants, and the investigation of its activity in relation to inhibitors discovered in various plant organs. The effect of such inhibitor on the GUS enzyme encoded by the *E. coli* gene is also investigated, in relation to its extensive use as a reporter gene in plant transformation experiments.

November 2003 - January 2007 Dept. Of Biology

University of Milan - Italy

Supervisors: Per Ola Karis (Stockholm University)

and Francesco Sala (Milan University)

Ph.D. Position

The topic of my Ph.D. was the study of the systematics of the angiosperm family Caryophyllaceae with particular emphasis on the phylogeny and character evolution of the genus *Moehringia*. The project was conducted in strict collaboration with Stockholm University and under the supervision of P. O. Karis. In particular, I produced the largest molecular phylogeny of the Caryophyllaceae that included a significant number of representatives of the subfamilial taxa and the results had useful implication for the classification of the family. Subsequently, I focused on the phylogeny of the genus *Moehringia*, for which I produced a phylogeny based on both molecular and morphological data. The study aimed to investigate the evolution of the large number of Alpine endemic species belonging to the genus, and the results obtained formed a basis to suggest a sound hypothesis in relation to the recent glaciation events. Furthermore, the study of the phylogenetic relationships with the close ally *Arenaria* combined with the analyses of anatomical structures with taxonomic significance led to a reassessment of the homology of the key feature used to recognize the genus. Following these results, the classification of the genus was revised and taxonomic rearrangements were proposed.

During my Ph.D., I also took part in a project focusing on the study of the developmental process regulating the growth form of the unorthodox plant *Streptocarpus rexii* (Gesneriaceae). In this research, I participated in the interpretation of the mechanisms regulating meristem formation and development by means of anatomical observations and in-situ hybridization analyses of gene expression.

October 2005 - November 2005 The Swedish Museum of Natural History

Stockholm - Sweden

Supervisor: Prof. Arne A. Anderberg

Ph.D. Position

During my Ph.D I got a SYNTHESYS grant to use the herbarium facilities at The Swedish Museum of Natural History, where I studied the morphology of the species of *Moehringia* and representatives of *Arenaria* under the supervision of Prof. Arne A Anderberg. This provided the information used to compile a morphological data set included in the phylogenetic analyses.

February 2004 - March 2004 The Swedish Museum of Natural History

Stockholm - Sweden

Supervisor: Prof. Mari Källersjö

Ph.D. Position

During my Ph.D. I got a HIGHLAT grant to use the facilities of the Molecular Systematics Lab of the Swedish Museum of Natural History, where I started to produce molecular data to include in the phylogenetic analyses under the supervision of M. Källersjö.

April 2003 - November 2003 Dept. Of Biology

University of Milan - Italy

Supervisors: Francesco Sala (Milan University)

Pre-doctoral position

The project entitled "Study of the biodiversity of the Maritime Alps by means of molecular markers" was founded by the Bussolera-Branca Foundation. The aim of the project was the evaluation of genetic variability within selected taxa in the Mediterranean biodiversity hot-spot of the Maritime Alps.

April 2002 - September 2002

Dept. Of Botany

Stockholm University - Sweden

Supervisors: Per Ola Karis and Prof. Arne A. Anderberg

Degree Project

The topic of my practical thesis work was the study of the systematics of the genus *Clethra* (Clethraceae, Ericales). A phylogeny of the genus was produced as inferred from molecular data, and the results allowed for considerations on the biogeography of the group. The study was conducted at Stockholm University.

Publicazioni:

◆ FIOR S., VIANELLI A, GEROLA PD (2009). A novel method for fluorometric continuous measurement of P-glucuronidase (GUS) activity using 4-methyl-umbelliferyl-beta-D-glucuronide (MUG) as substrate. *PLANT SCIENCE*, vol. 176; p. 130-135, ISSN: 0168-9452

◆ FIOR S., KARIS P.O (2007). Phylogeny, evolution and systematics of *Moehringia* (Caryophyllaceae) as inferred from molecular and morphological data: a case of homology re-assessment. *CLADISTICS-THE INTERNATIONAL JOURNAL OF THE WILLI HENNIG SOCIETY*, vol. 23; p. 362-372, ISSN: 0748-3007

◆ MANTEGAZZA R, MLLER M, HARRISON C.J, FIOR S., DE LUCA C, SPADA A (2007). Anisocotly and meristem initiation in an unorthodox plant, *Streptocarpus rexii* (Gesneriaceae). *PLANTA*, vol. 225; p. 653-663, ISSN: 0032-0935

◆ FIOR S., KARIS P.O, MINUTO L, CASAZZA G, SALA F (2006). Molecular phylogeny of the Caryophyllaceae (Caryophyllales) inferred from chloroplast *matK* and nuclear *rDNA ITS* sequences. *AMERICAN JOURNAL OF BOTANY*, vol. 93; p. 399-411, ISSN: 0002-9122

◆ MINUTO L, FIOR S., ROCCOTIELLO E, CASAZZA G (2006). Seed morphology in *Moehringia L.* and its taxonomic significance in comparative studies within the Caryophyllaceae. *PLANT SYSTEMATICS AND EVOLUTION*, vol. 262; p. 189-208, ISSN: 0378-2697

◆ FIOR S., KARIS P.O, ANDERBERG A.A (2003). Phylogeny, taxonomy, and systematic position of *Clethra* (Clethraceae, Ericales) with notes on biogeography: evidence from plastid and nuclear DNA sequences. *INTERNATIONAL JOURNAL OF PLANT SCIENCES*, vol. 164; p. 997-1006, ISSN: 1058-5893