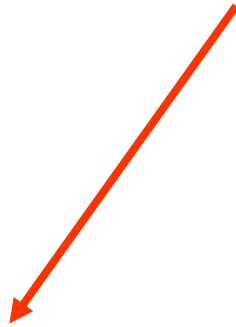
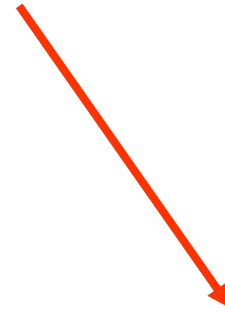


A che servono le piante transgeniche?



Ricerca di base



Applicazioni

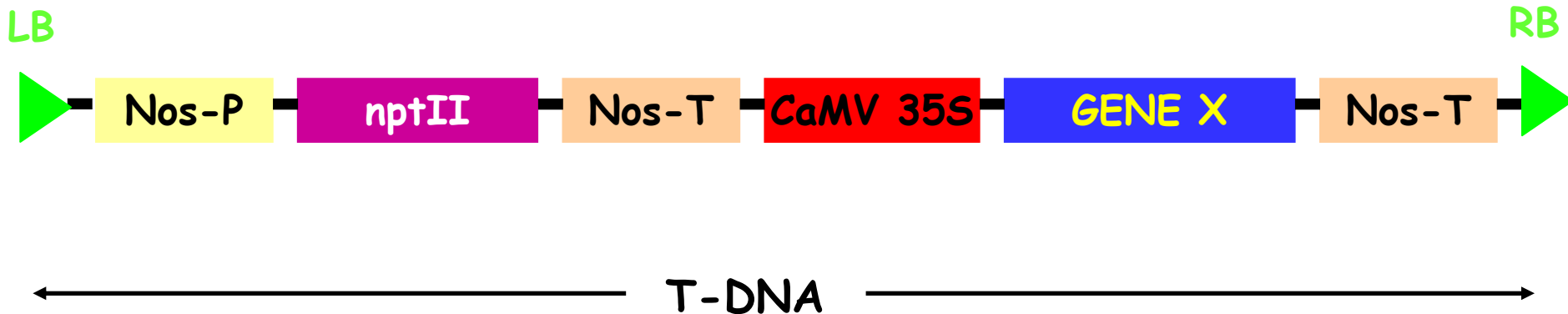
Ricerca di base

Favorire la comprensione e lo studio del ruolo fisiologico di molti geni



Effetti correlati alla sovraespressione o alla repressione di geni di interesse

Sovraespressione di un gene di interesse



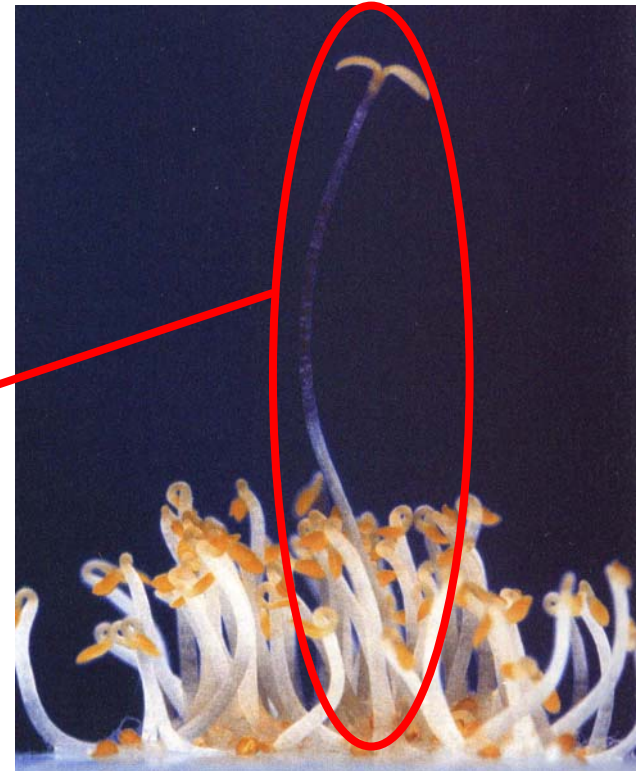
- Trasformazione della pianta
- Analisi del fenotipo
- Saggi biochimico-funzionali

esempio: QUAL E' IL RUOLO DEL GENE ETR1?

Identificazione del gene ETR1 mediante genetica tradizionale

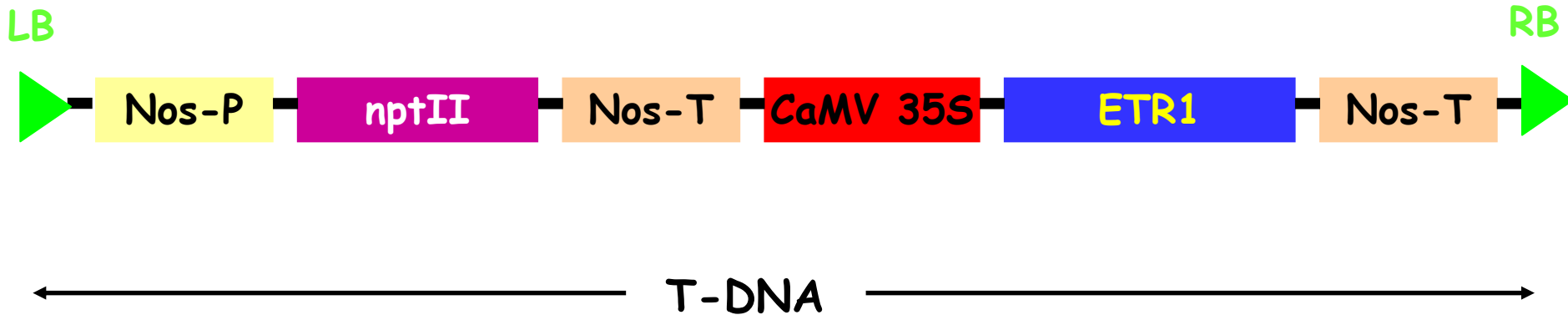
mutazioni del gene ETR1 determinano un fenotipo insensibile all'etilene

assenza di risposta tripla in presenza di etilene



esempio: QUAL E' IL RUOLO DEL GENE ETR1?

conferma della funzione del gene ETR1
mediante sovraespressione



EFFETTO



Aumento della capacità di legare l'etilene



ETR1 è il recettore dell'etilene

esempio:

Sovraespressione del gene per la citochinina ossidasi



la crescita del germoglio
è fortemente inibita

ridotti livelli
di citochinine



maggior
crescita delle
radici

**Le citochinine stimolano lo sviluppo del
germoglio ed inibiscono quello della radice**

Riduzione dell'espressione di un gene

Strategia ANTI-SENSO

5' _____ AGGTCAGTTA _____ 3' **senso**
3' _____ TCCAGTCAAT _____ 5'



mRNA 5' _____ AGGUCAGUUA _____ AAAAAA 3'

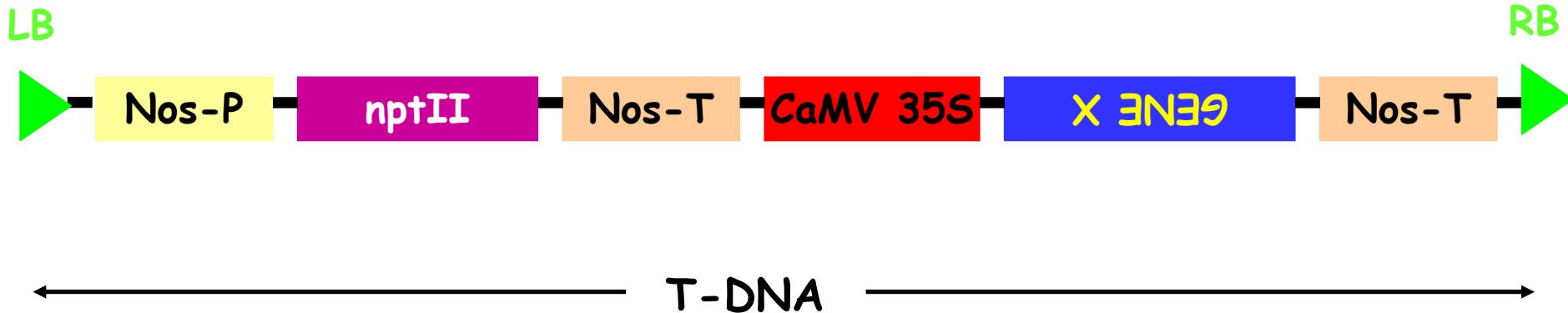
5' _____ TAACTGACCT _____ 3' **anti-senso**
3' _____ ATTGACTGGA _____ 5'



mRNA 5' _____ UAACUGACCU _____ AAAAAA 3'

~~5' _____ AGGUCAGUUA _____ AAAAAA 3'~~
~~3' AAAAAA _____ UCCAGUCAAU _____ 5'~~

Riduzione dell'espressione di un gene di interesse



- Trasformazione della pianta
- Analisi del fenotipo
- Saggi biochimico-funzionali

SILENZIAMENTO GENICO

Gene silencing indotto dal transgene

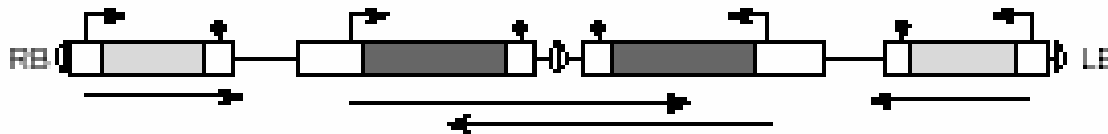
TGS Transcriptional gene silencing

- ▶ Ipermetilazione del DNA
- ▶ Condensazione della cromatina

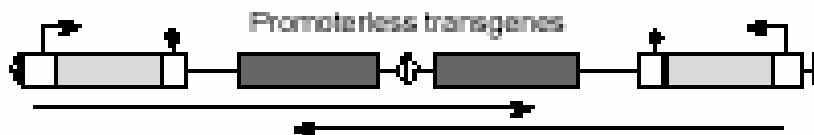
PTGS Post-transcriptional gene silencing

- ▶ co-soppressione

(a) Inverted repeated transgenes



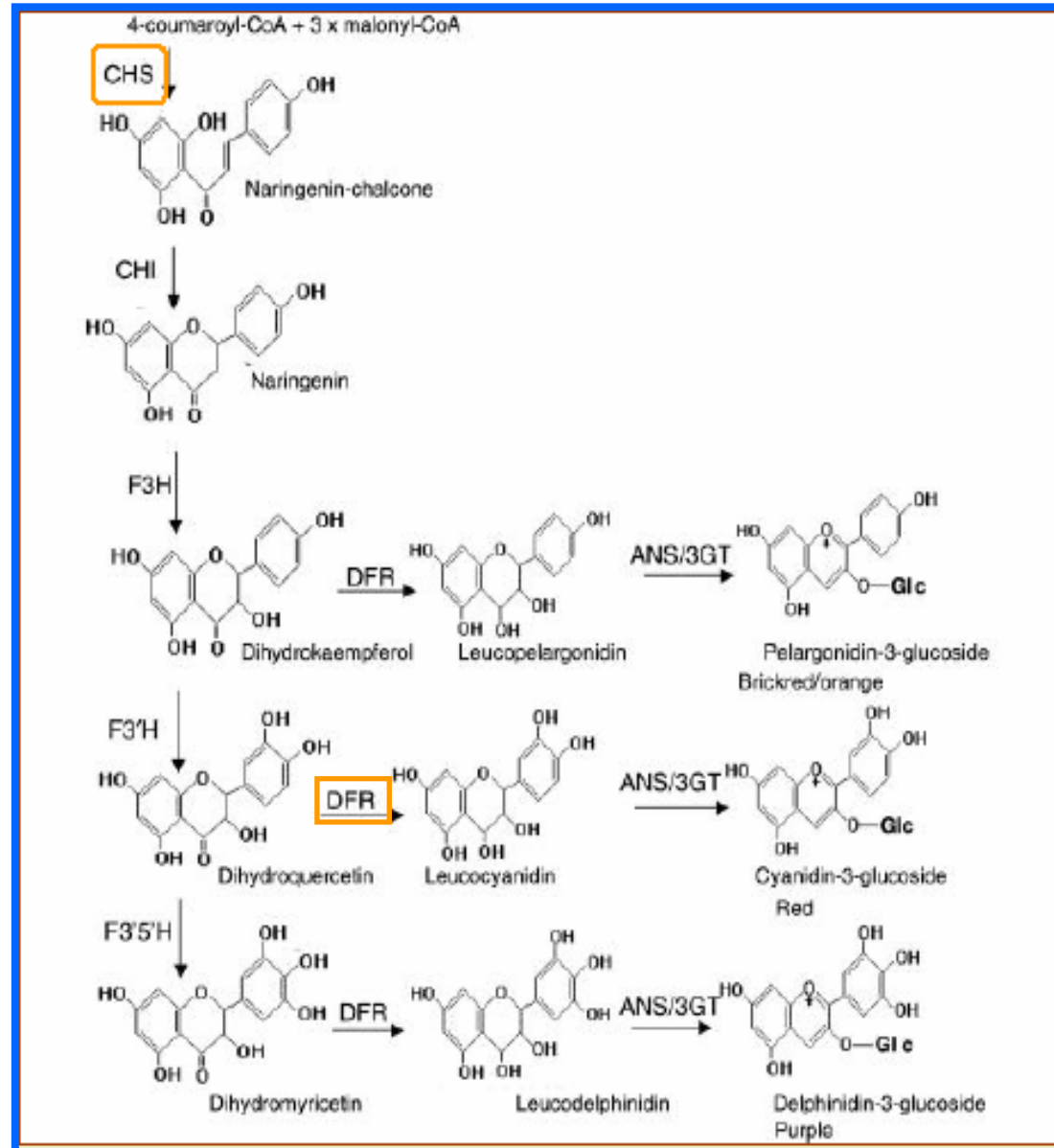
formazione di dsRNA
che vengono degradati



PTGS Post-transcriptional gene silencing

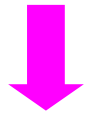
1^a evidenza

Sovraespressione di geni codificanti enzimi della via biosintetica dei flavonoidi in piante di Petunia allo scopo di incrementare il contenuto di **ANTOCIANINE** (pigmenti responsabili della colorazione dei fiori)

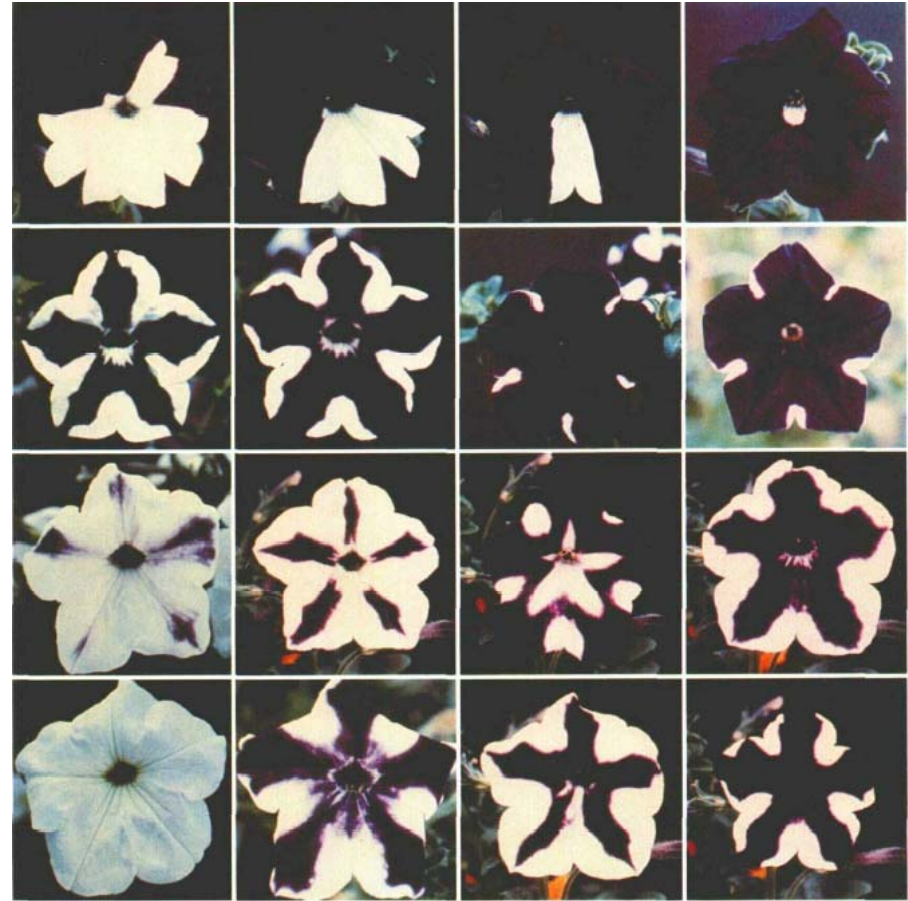


PTGS Post-transcriptional gene silencing

Sovraespressione della Calcone sintasi in Petunia per incrementare la colorazione viola del fiore



Co-soppressione del gene endogeno



Napoli et al. 1990 Plant Cell

PTGS Post-transcriptional gene silencing

Sovraespressione della DFR
(diidroflavonolo-4-reduttasi)



Co-soppressione del
gene endogeno



van der Krol et al. 1990 Plant Cell

RNA interference (RNAi) - **Animali**
(scoperto in *C. elegans*)

Quelling - **funghi**
(*Neurospora crassa*)

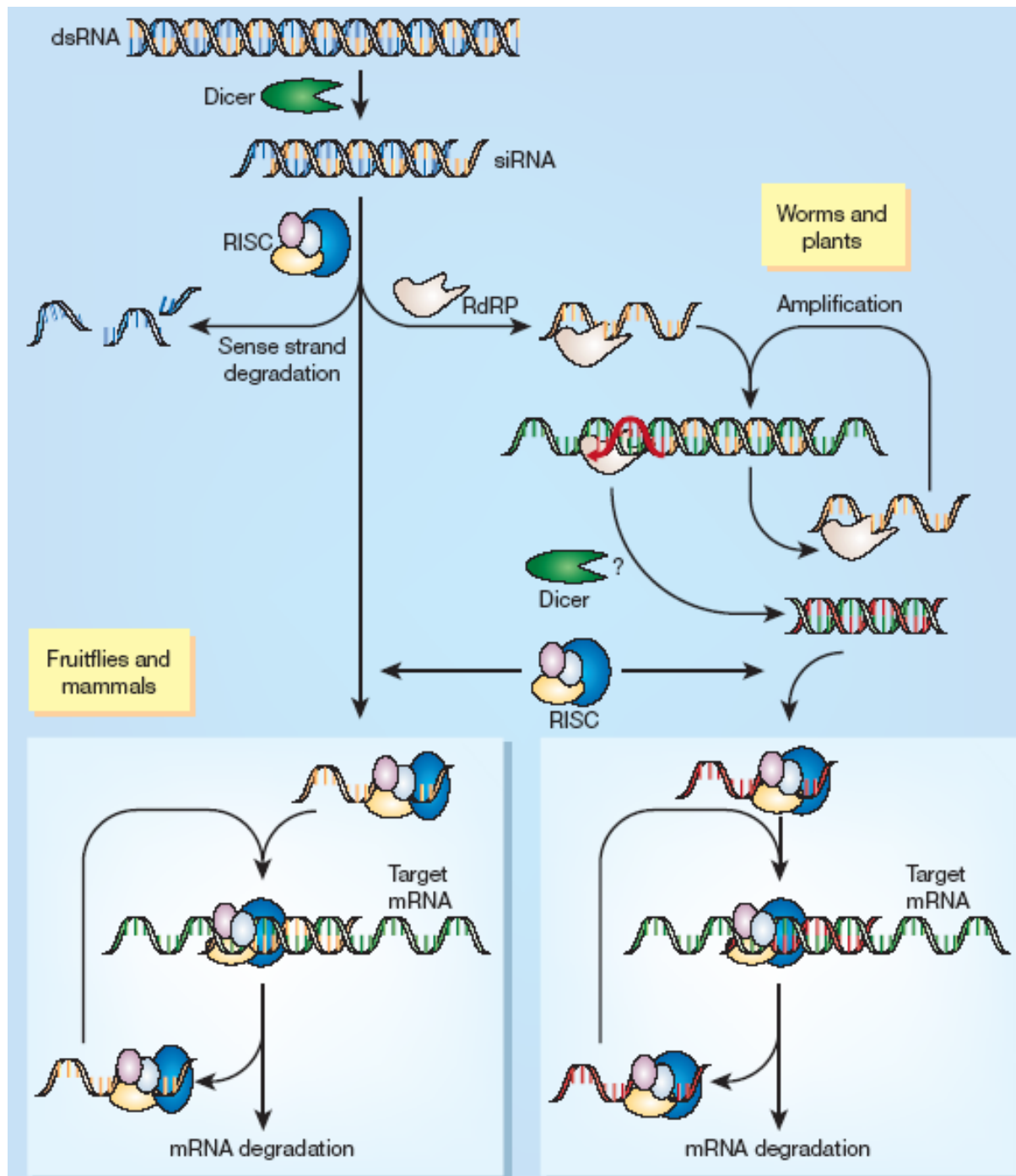
**Post-transcriptional
gene silencing** - **Piante**

meccanismo dell'RNAi

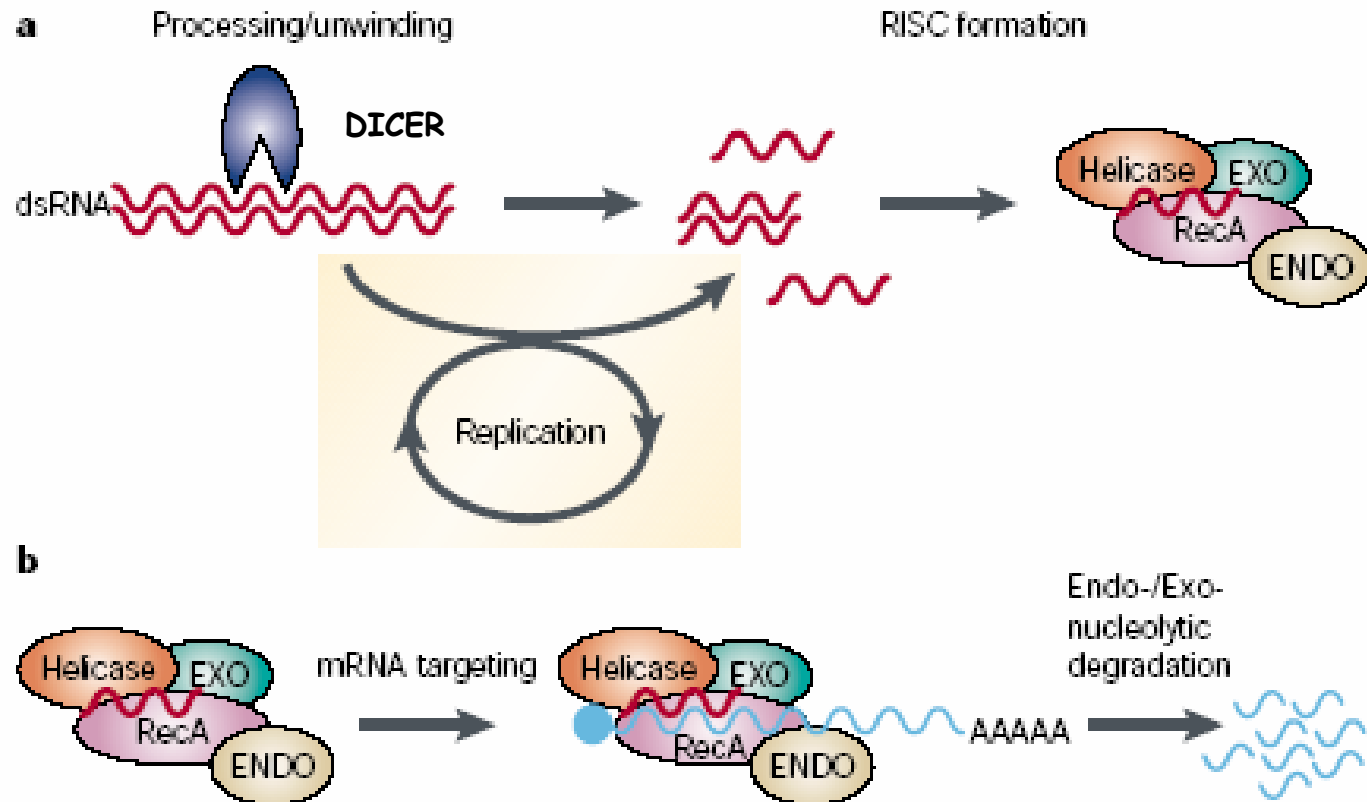
da un RNA a doppio filamento si formano degli **short interfering RNA (siRNA)** ad opera dell'enzima **DICER** che ha un dominio RNasi III

RISC: RNA-induced silencing complex

RdRP: RNA-dependent RNA polymerase
E' responsabile di un meccanismo di amplificazione



meccanismo dell'RNAi



In Arabidopsis sono state identificate proteine DICER-like e proteine ARGONAUTE che fanno parte del RISC

CHE RUOLO HA L'RNAi NELLE PIANTE?

Regolazione dell'espressione genica

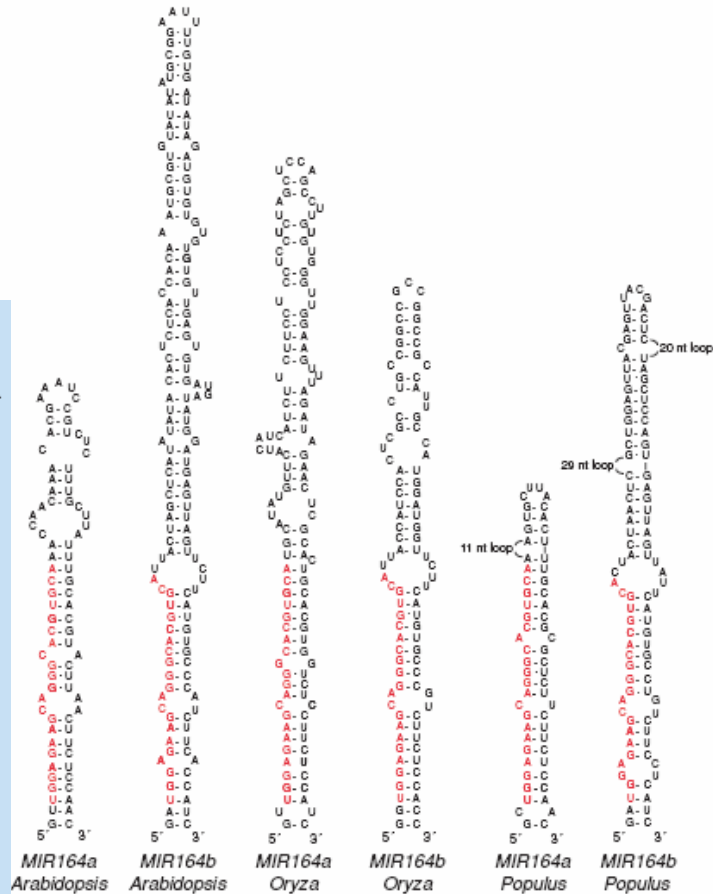
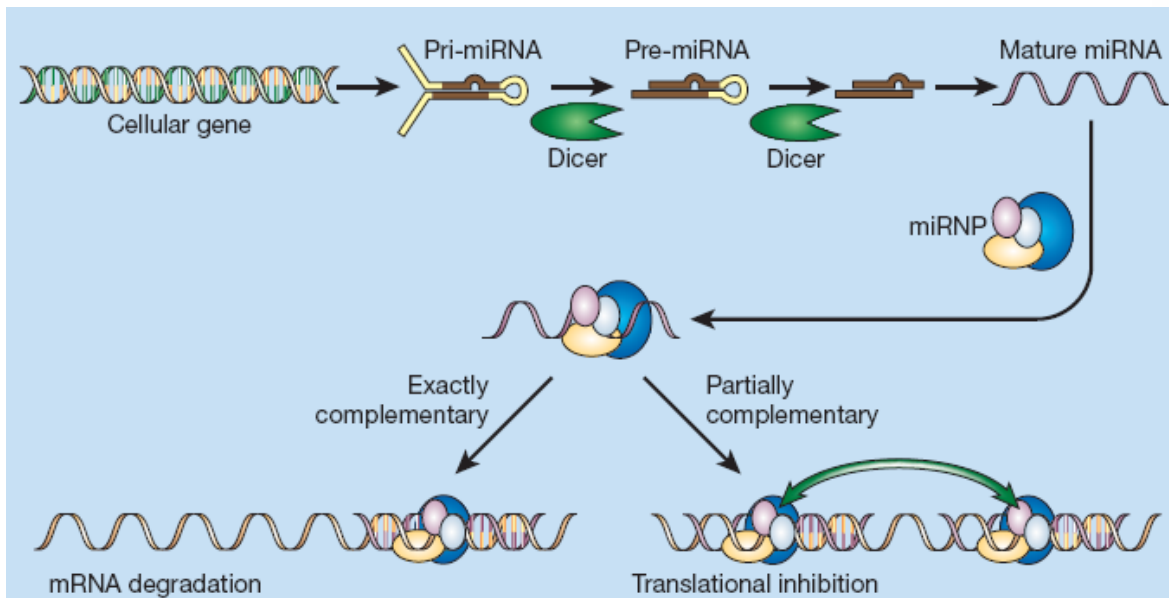
Meccanismo di difesa dall'infezione virale

MicroRNA (miRNA)

Una classe di RNA di circa 22nt codificati dal genoma che appaiandosi a mRNA endogeni ne determina la degradazione impedendo la sintesi proteica



Regolazione dell'espressione genica



miRNA vegetali

CHE RUOLO HA L'RNAi NELLE PIANTE?

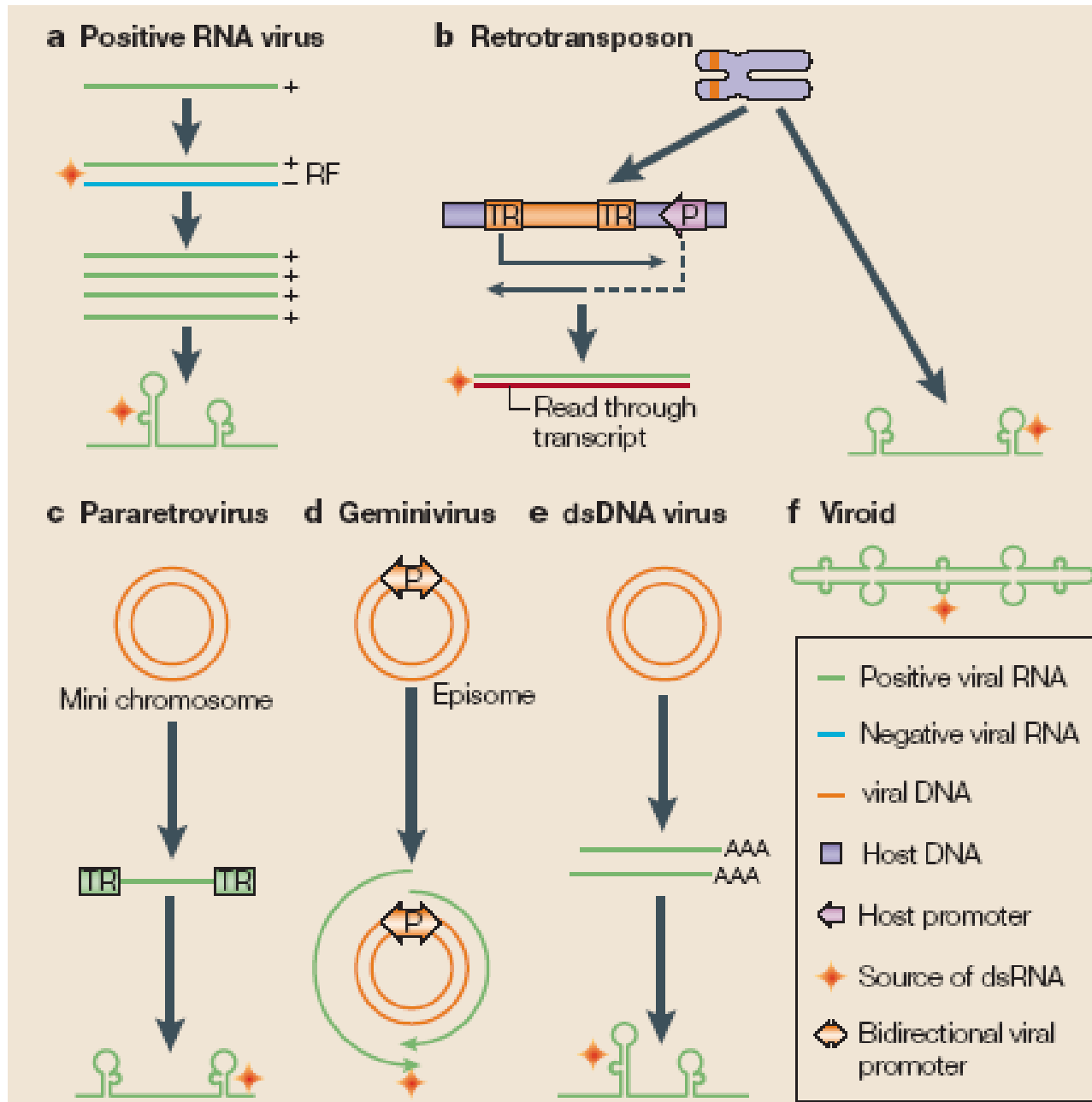
Regolazione dell'espressione genica

Meccanismo di difesa dall'infezione virale

La maggior parte dei virus vegetali sono virus a **ssRNA**

la replicazione avviene ad opera di una
RNA polimerasi RNA-dipendente che
determina la formazione di **dsRNA**

Meccanismo di difesa dall'infezione virale



VIRUS-INDUCED GENE SILENCING

virus vegetali che contengono sequenze omologhe a geni vegetali inducono il silenziamento di tali geni

Mutanti di *Arabidopsis* difettivi nel meccanismo di gene silencing mostrano un'aumentata sensibilità virale

Evoluzione di parte di alcuni virus di proteine di soppressione del VIGS

L'RNA silencing nelle piante ha natura sistemica

SYSTEMIC ACQUIRED SILENCING

piante *35S::Nia2* mostrano co-soppressione

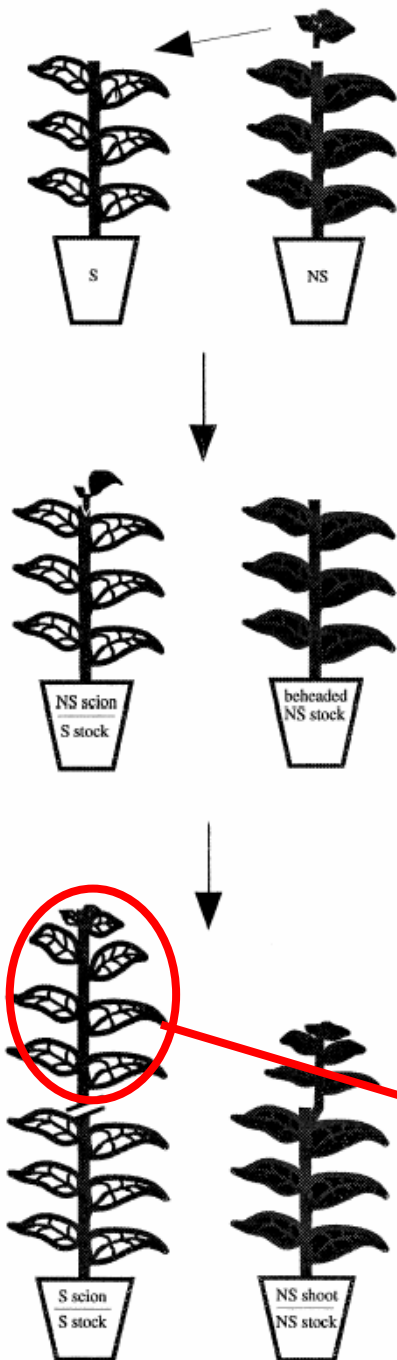


clorosi

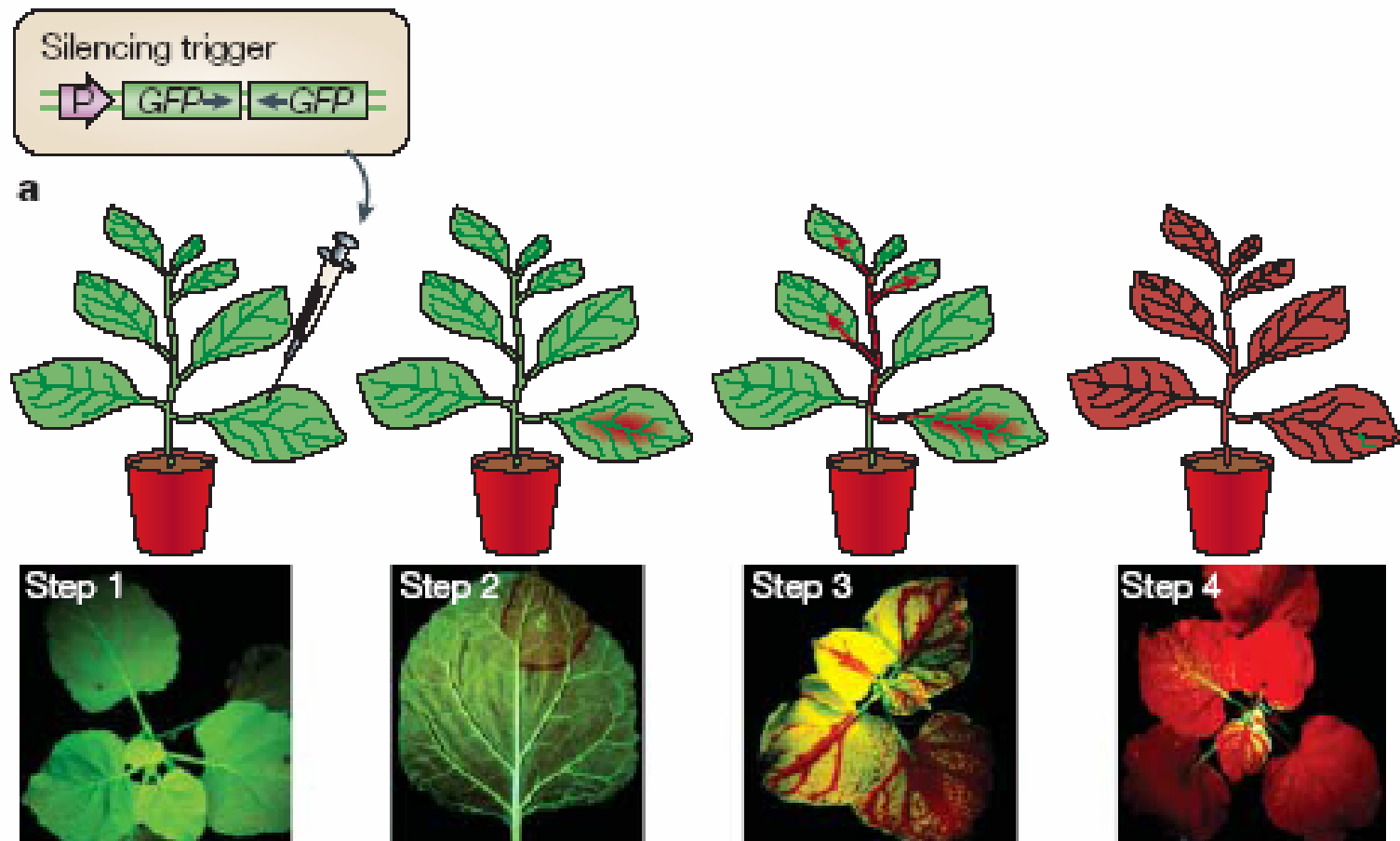
Trasmissione della co-soppressione della nitrato reduttasi in piante innestate

Il silencing è trasmesso da portainnesto silenziato ad innesto non silenziato

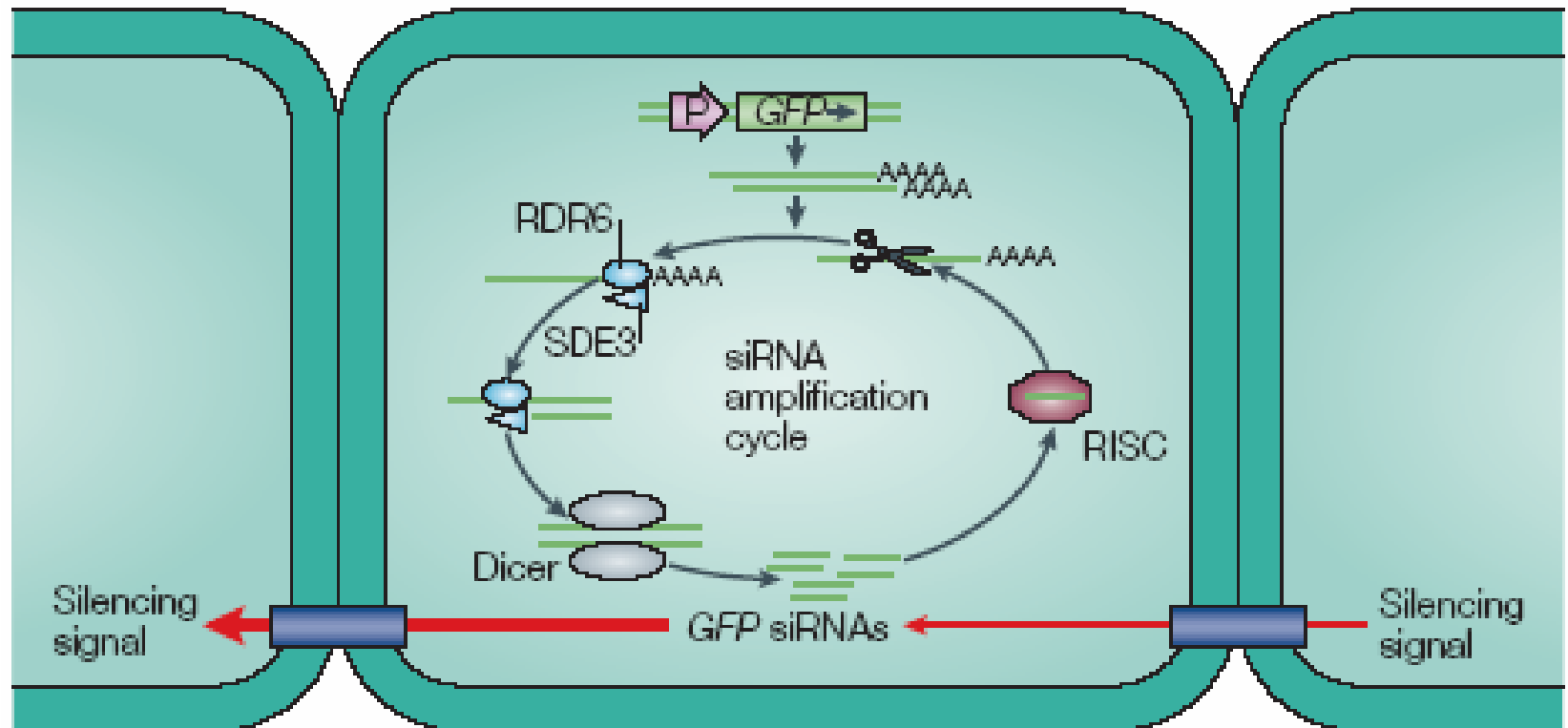
sintomi clorotici (silenziamento della nitrato-reduttasi) sulle foglie sviluppatesi sull'innesto



systemic acquired silencing



Qual è il segnale di silenziamento?



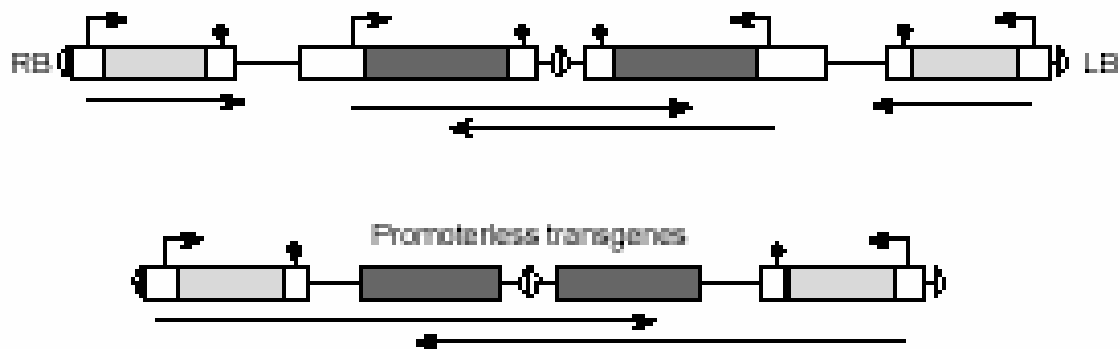
Gli siRNA prodotti diffondono attraverso i plasmodesmi nelle cellule adiacenti

Quindi riassumendo:

Gene silencing indotto dal transgene

si ha la formazione di dsRNA, probabilmente a causa dell'integrazione del transgene ripetuto invertito, che innescano l'RNAi

(a) Inverted repeated transgenes

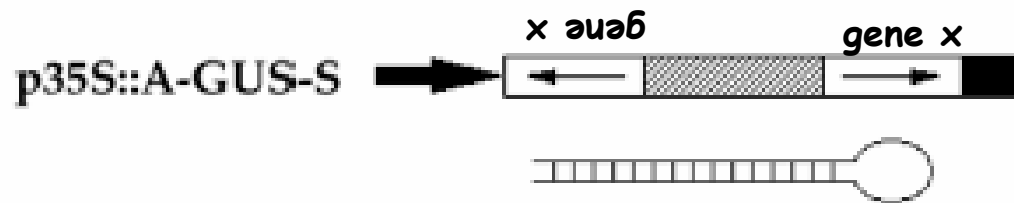


Uso del POST-TRANSCRIPTIONAL
GENE SILENCING (RNAi) per lo
studio della funzione dei geni vegetali

Bloccare l'espressione di un gene endogeno

Studio della funzione dei geni mediante
la genetica inversa

Trasformazione della pianta (*Agrobacterium*, sistema biolistico) con costrutti che determinino la formazione di **dsRNA** capaci di indurre l'RNAi



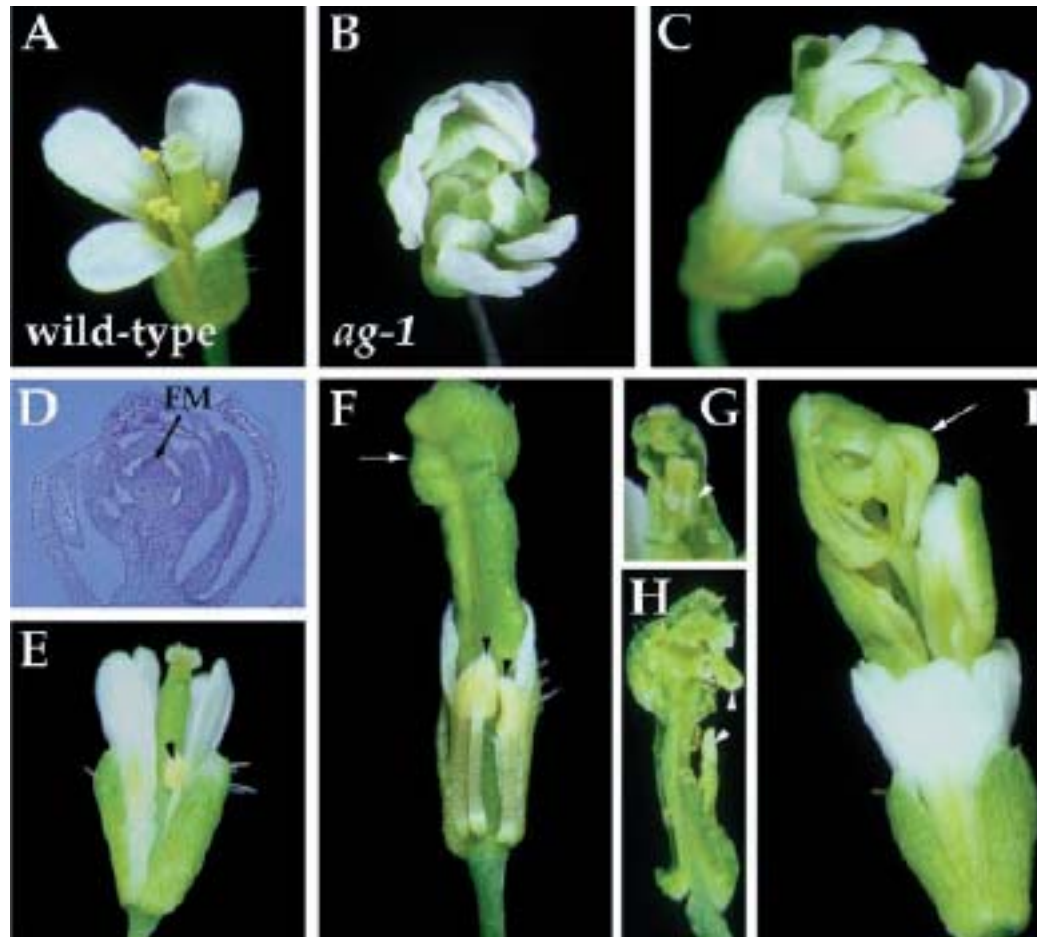
struttura
stem-loop
(hairpin RNA)

ripetizioni invertite separate da uno spacer

hpRNA		55 %
ihpRNA		90 %



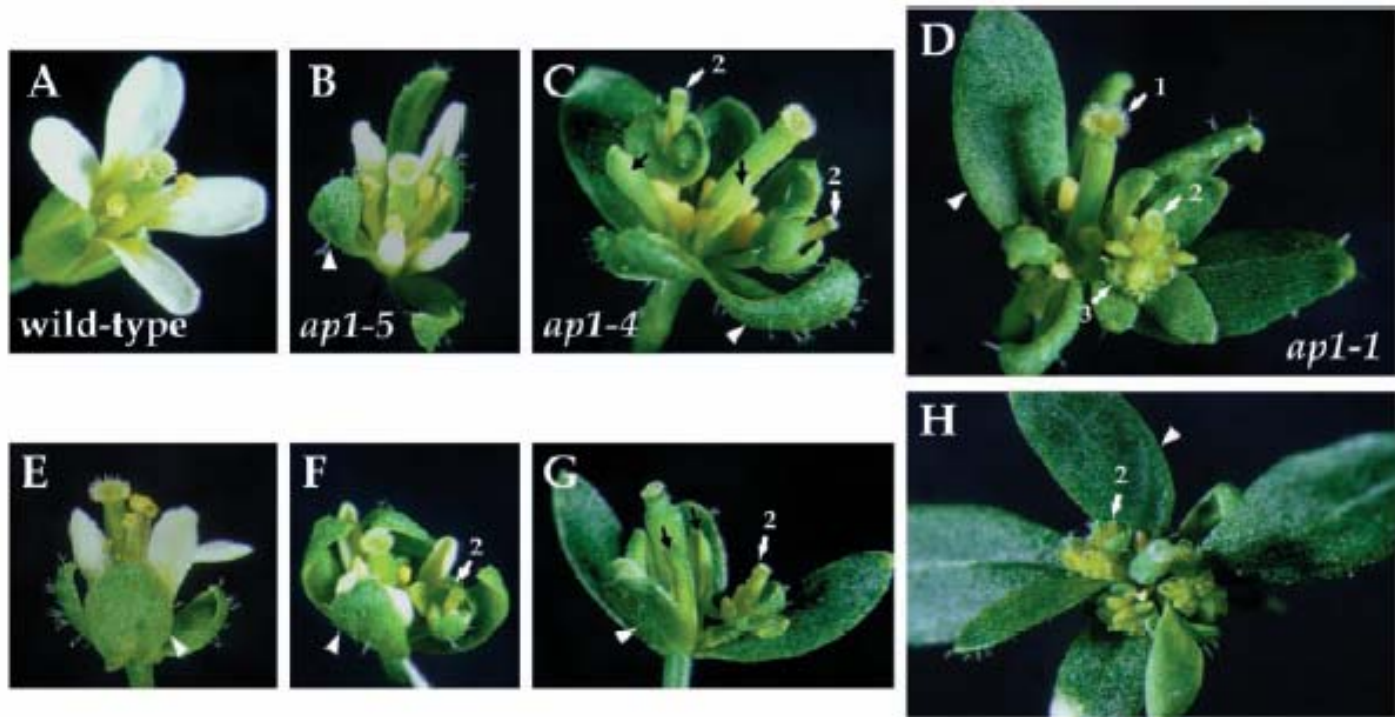
l'uso di un introne come spacer aumenta l'efficienza di PTGS



C-I
RNAi

AGAMOUS

gene coinvolto nello sviluppo del fiore
(identità dell'organo floreale)



RNAi

APETALA

gene coinvolto nello sviluppo del fiore
(identità del meristema floreale)

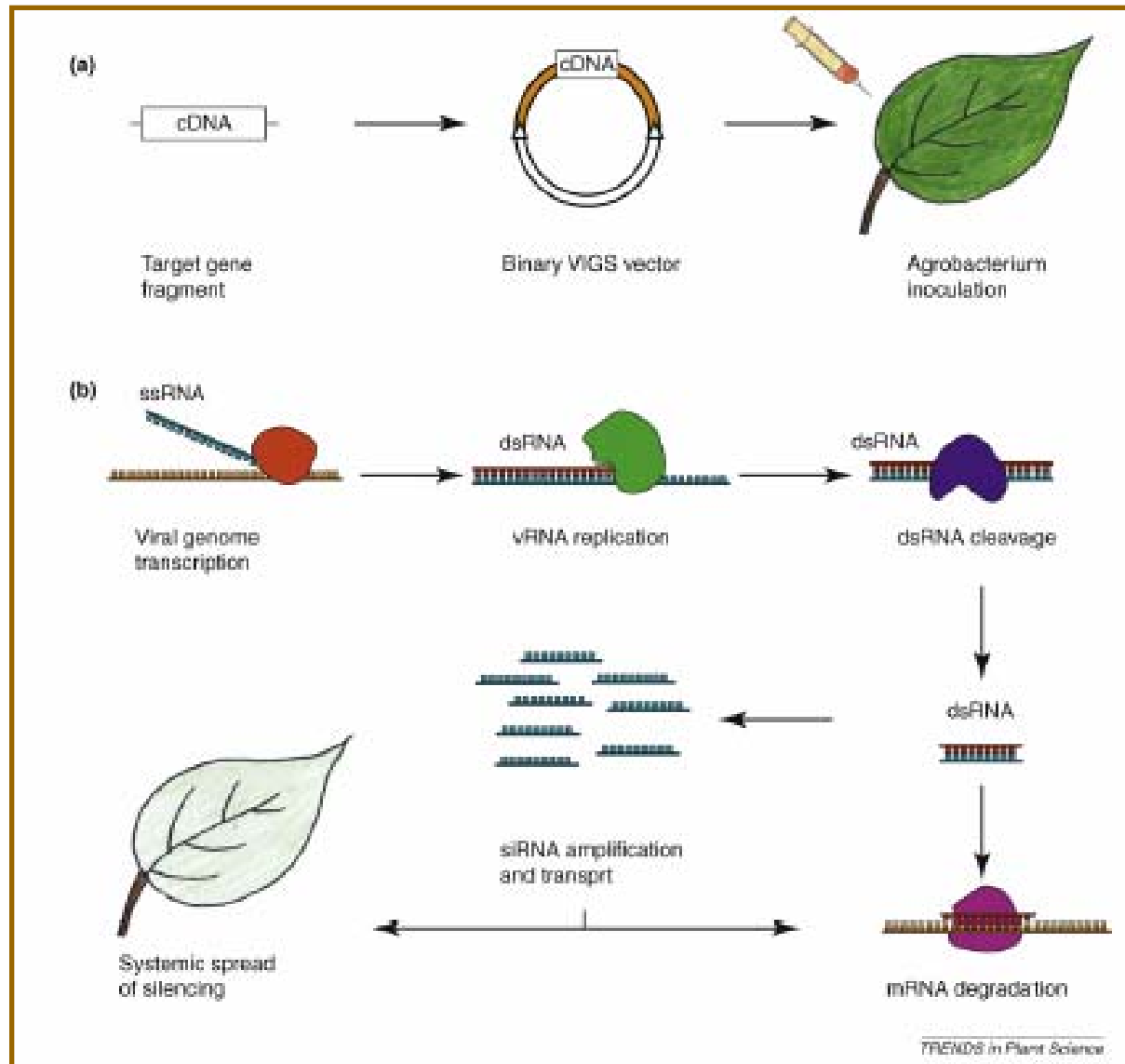
RNA silencing transiente

Un vettore virale con un frammento di DNA omologo ad un gene della pianta può indurre silenziamento del gene



Virus ricombinanti per bloccare
l'espressione di geni endogeni

applicazione del VIGS per bloccare l'espressione di un gene endogeno



Vettori virali

Vector	Species ^a	Viral symptoms	Efficiency ^b	Adopted for large-scale studies	Reference
TMV	<i>N. benthamiana</i>	Severe	Fair; better with antisense Improved with inclusion of direct inverted repeats	Yes	Kumagai <i>et al.</i> (1995), Lacomme <i>et al.</i> (2003), Fitzmaurice <i>et al.</i> (2002)
PVX	<i>N. benthamiana</i>	Moderate	Fair; not persistent	Yes	Ruiz <i>et al.</i> (1998), Lu <i>et al.</i> (2003)
TGMV	<i>N. benthamiana</i>	Variable	Fair; varies with gene silenced, size of insert	No	Kjemtrup <i>et al.</i> (1998), Peele <i>et al.</i> (2001)
TRV	<i>N. benthamiana</i>	Mild	Good; persistent and consistent between experiments	Yes, available for GATEWAY cloning	Ratcliff <i>et al.</i> (2001), Liu <i>et al.</i> (2002b)
	Tomato	Mild	Variable; depends on inoculation technique	Yes, available for GATEWAY cloning	Liu <i>et al.</i> (2002a)
SVISS	Tobacco	Mild	Good; persistent and consistent between experiments	No	Gossele <i>et al.</i> (2002)
BSMV	Barley	Moderate	Fair; depends on target sequence; not persistent Improved with use of direct inverted repeats of targeting sequence	Yes	Holzberg <i>et al.</i> (2002), Lacomme <i>et al.</i> (2003), Fitzmaurice <i>et al.</i> (2002)
CbLCV	<i>Arabidopsis</i>	Moderate in older plants	Fair; effects variable with gene silenced and vector design	No	Turnage <i>et al.</i> (2002)

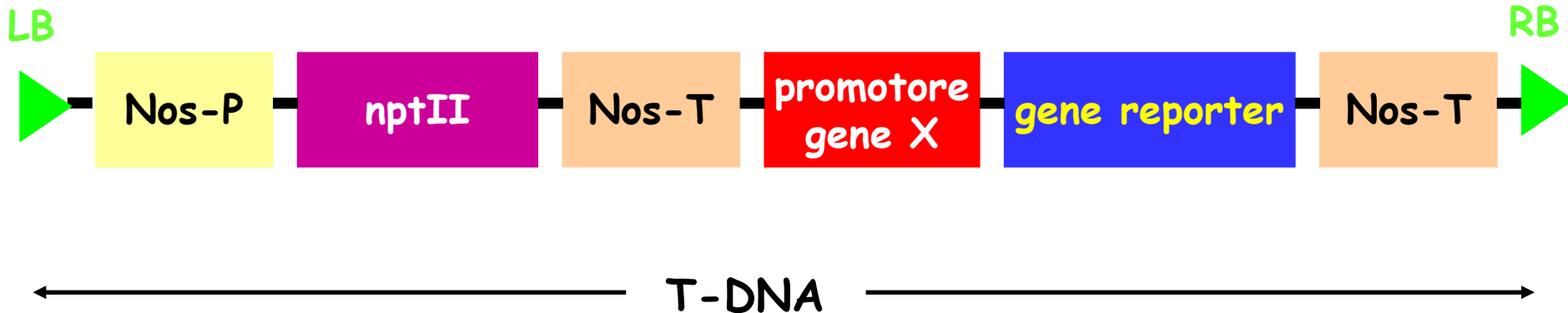
TMV, tobacco mosaic virus; PVX, potato virus X; TGMV, tomato golden mosaic virus; TRV, tobacco rattle virus; SVISS, satellite virus-induced silencing system; BSMV, barley stripe mosaic virus; CbLCV, cabbage leaf curl virus.

^aPlant species in which silencing has been shown to be effective.

^bEfficiency is the percentage of leaf area that shows evidence of silencing and the degree of silencing that occurs.

devono contenere sequenze di almeno 23 nt 100% omologhe al gene da silenziare

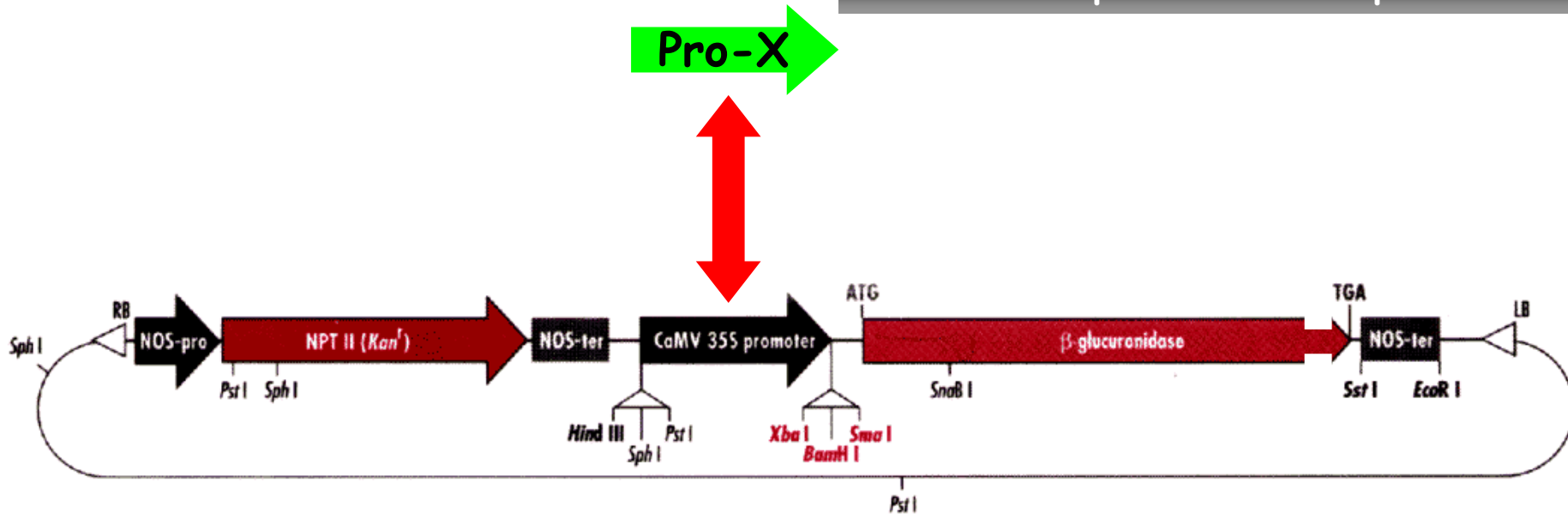
Studio dell'espressione di un promotore



- Trasformazione della pianta
- Analisi dell'espressione del gene reporter

permette di sapere in quale organo o tessuto è espresso il gene X

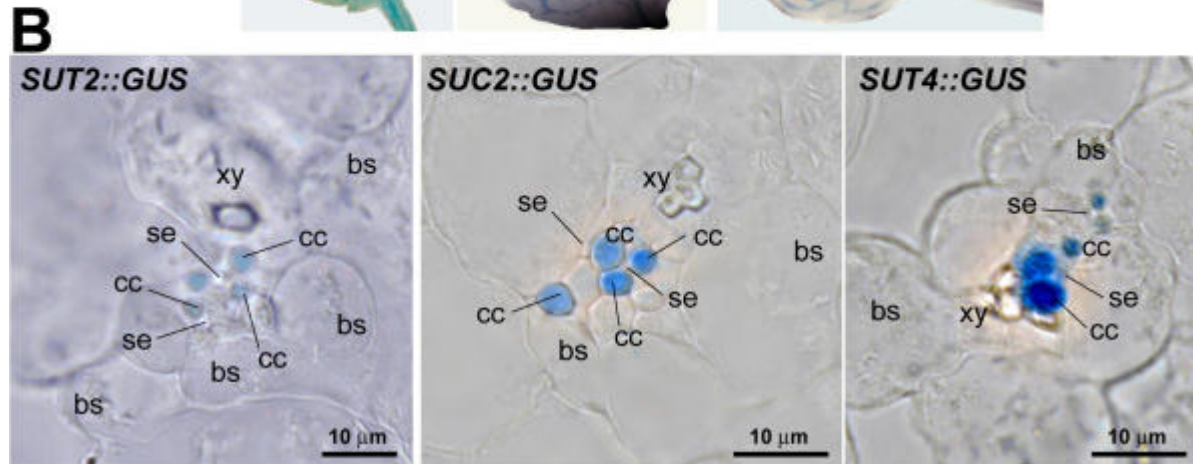
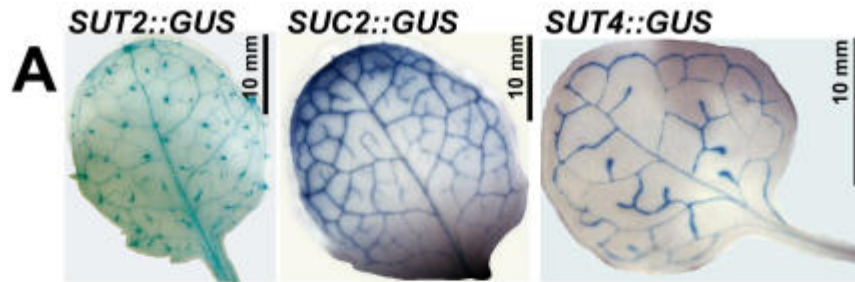
Studio dell'espressione di un promotore



pBI121

.....
 TCT AGA GGA TCC CCG GGT GGT CAG TCC CTT ATG
Xba I BamH I Sma I

from Clontech
 catalogue 1996 / 97



promotori
trasportatori del
saccarosio

espressione
AUX1

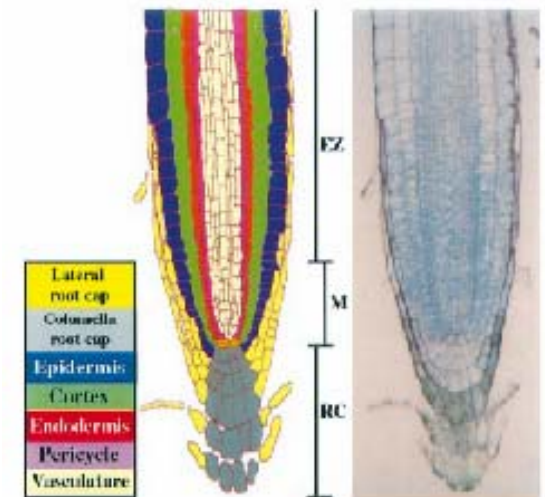


Fig. 5. (A) Schematic illustration of root apical tissues delineating root cap (RC), meristematic (M) and elongation zone (EZ). (B) The *AUX1* promoter drives GUS reporter gene expression within the majority of tissues within the primary root apex, with the exception of the upper three tiers of columella cells within the root cap. Nine-day transgenic *Arabidopsis* seedlings were stained for GUS activity using conditions designed to minimize diffusion (see Materials and methods), embedded, then sectioned and viewed under bright field.

Applicazioni

Principali caratteri ingegnerizzabili

miglioramento nel controllo di agenti patogeni e infestanti



- resistenza a patogeni (virus, batteri e funghi)
- resistenza agli insetti
- tolleranza agli erbicidi

miglioramento delle proprietà agronomiche



- resistenza al freddo
- aumento della tolleranza allo stress idrico
- aumento della tolleranza al sale

miglioramento delle qualità dopo il raccolto



- ritardo nella maturazione dei frutti
- ritardo nella senescenza dei fiori

miglioramento delle qualità nutrizionali



- aumento del contenuto di vitamine
- aumento del contenuto di lisina e amminoacidi solforati

altre applicazioni

- produzione di vaccini
- produzione di proteine di interesse
- produzione di metaboliti secondari