



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE E FORESTALI
DAFNE

Università degli Studi della Tuscia

Via S. Camillo de Lellis ,01100 Viterbo

TESI SPERIMENTALE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN

“BIOTECNOLOGIE PER L’AGRICOLTURA, L’AMBIENTE E LA SALUTE”

(CLASSE LM-7)

“Effetto della soppressione del gene *GW2* sulle rese di
frumento duro”

RELATORE:

Dott. Francesco Sestili

CANDIDATO:

Riccardo Pagliarello

Matr. BIOAMSA/20

CORRELATORE:

Dott.ssa Anna Pucci

CONTRORELATORE:

Prof. Andrea Mazzucato

ANNO ACCADEMICO 2016/17

INDICE

<i>Abstract</i>	p.3
Riassunto.....	p.4
1. Introduzione.....	p.5
1.1. Domesticazione del frumento.....	p.5
1.1.1. Il successo del frumento.....	p.8
1.1.2. Composizione della cariosside.....	p.9
1.1.2.1. Lipidi.....	p.10
1.1.2.2. Amido.....	p.10
1.1.2.3. Contenuto proteico e glutine.....	p.11
1.2. Aumentare le rese.....	p.12
1.3. Geni coinvolti nelle rese.....	p.14
1.3.1. Il gene <i>GW2</i>	p.17
1.3.1.1. TaGW2: la ligasi E3 RING-type.....	p.21
1.4. Il miglioramento genetico.....	p.24
1.4.1. Breeding convenzionale.....	p.24
1.4.2. Mutagenesi.....	p.24
1.4.3. Ingegneria genetica.....	p.25
1.4.3.1. Interferenza dell'RNA (RNAi).....	p.29
1.4.3.2. Nuove frontiere dell'ingegneria genetica.....	p.32
1.4.3.3. La legislazione europea in campo di OGM.....	p.34
2. Scopo dell'elaborato.....	p.37
3. Materiali e metodi.....	p.38
3.1. Materiale vegetale e condizioni di crescita.....	p.38
3.2. Trasformazione genetica per l'ottenimento di piante GW2-RNAi.....	p.38
3.3. Screening delle piante transgeniche.....	p.39
3.4. Estrazione di DNA da foglia.....	p.40
3.5. Screening sul DNA estratto da foglia.....	p.41

3.6. Analisi di espressione (RT-PCR).....	p.42
3.7. Analisi fenotipica delle linee RNAi.....	p.44
3.8. Estrazione dell'amido totale.....	p.44
3.9. Analisi statistica.....	p.45
3.10. Analisi in <i>silico</i>	p.45
4. Risultati e Discussione.....	p.47
4.1 Studio in <i>silico</i> di <i>GW2</i>	p.47
4.2 Primo screening delle piante transgeniche.....	p.51
4.3 Secondo screening delle piante transgeniche.....	p.52
4.4 Analisi di espressione del gene <i>GW2</i> nelle linee RNAi.....	p.53
4.5 Analisi di espressione di probabili geni correlati con <i>GW2</i>	p.56
4.6 Analisi fenotipica delle linee RNAi.....	p.62
5. Conclusioni.....	p.66
6. Bibliografia.....	p.67

Ringraziamenti

Abstract

Wheat (Triticum spp.) is one of the most cultivated cereals in the world due to its adaptability to different environments and the unique biomechanical properties of the gluten proteins. Common wheat (Triticum aestivum ssp. aestivum), is mainly used for making cookies, bread and pastries and constitutes 95% of cultivated wheat, whereas the remaining 5% is durum wheat (Triticum turgidum ssp. durum), that is used for making pasta. Grain weight is a major factor of grain yield in wheat, and the identification of candidate genes is important in the breeding for high-yield. OsGW2 (Grain Weight 2), a gene isolated for the first time in rice (Oryza sativa), has been suggested as a quantitative trait locus for yield. OsGW2 encodes an E3 RING ligase that negatively regulates grain size. TaGW2 has been isolated from wheat and indicated as the ortholog of OsGW2. Here, its function has been investigated using RNA interference (RNAi) to down-regulate GW2 transcript level in durum wheat. The presence of the RNAi construct has been detected in 3 independent transgenic lines by PCR. The three transgenic lines have been characterized at molecular and phenotypic level. GW2 gene expression analysis has shown a drastic reduction of the target transcripts, resulting in a larger grain size. In addition, GW2 suppression has shown pleiotropic effects on key genes of starch biosynthesis (ADP-glucose pyrophosphorylase, AGPase) and some phytohormones (CKX e GA3-ox).

Key words: Grain weight 2 (GW2), durum wheat, wheat genetic improvement, RNA interference (RNAi), yield

Riassunto

Il frumento (*Triticum* spp.) è uno dei cereali più coltivati al mondo. Ciò è possibile grazie alla sua capacità di adattarsi a climi differenti e alle proprietà biomeccaniche delle proteine del glutine. Il frumento tenero (*Triticum aestivum* ssp. *aestivum*) è usato per la produzione di biscotti, pane e dolci e rappresenta il 95% del frumento coltivato. Il rimanente 5% è costituito dal frumento duro (*Triticum turgidum* ssp. *durum*), usato principalmente per produrre pasta. L'identificazione di geni implicati nella regolazione delle dimensioni dei semi è un aspetto importante per il miglioramento genetico del frumento. *OsGW2* (Grain Weight 2), un gene isolato per la prima volta in riso (*Oryza sativa*), è stato identificato come un QTL per la resa. Il gene *GW2* è stato identificato in frumento ed indicato come ortologo di *OsGW2*. Lo scopo di questa Tesi è stato lo studio dell'effetto della soppressione del gene *GW2*, usando la tecnica dell'RNA interference (RNAi), nel frumento duro (cv. Svevo). L'analisi PCR ha permesso di individuare tre linee che hanno integrato stabilmente il costrutto RNAi-GW2. L'analisi di espressione di *GW2* e dei suoi due omeoalleli ha mostrato una drastica riduzione dei livelli dei trascritti target. Inoltre, la soppressione di *GW2* ha causato effetti pleiotropici su geni chiave della biosintesi dell'amido (ADP-glucosio pirofosforilasi, *AGPasi*) e di alcuni fitormoni (*CKX* e *GA3-ox*).

Parole chiave: *Grain Weight 2* (*GW2*), frumento duro, miglioramento genetico, RNA interference (RNAi), resa

1. INTRODUZIONE

1.1 Domesticazione del frumento

Il frumento (*Triticum* spp.) rappresenta uno dei cereali più coltivati al mondo. Ciò è stato possibile grazie alla sua grande capacità di adattarsi a diversi ambienti e alle caratteristiche viscoelastiche degli impasti conferite dalle proteine del glutine. Il 95% del frumento coltivato a livello mondiale è rappresentato dal frumento tenero (*Triticum aestivum* ssp. *aestivum*), utilizzato soprattutto per la produzione di pane e biscotti. Il rimanente 5% è rappresentato da frumento duro (*Triticum turgidum* ssp. *durum*), usato per la produzione di pasta, couscous e pane nel sud Italia.

Se si considerano i dati FAO (<http://faostat.fao.org/>), nel 2016 sono state prodotte 735 milioni di tonnellate (Mt) di frumento (Fig. 1.1), con un consumo annuo pro-capite pari a circa 67 kg. Questi dati mostrano chiaramente che il principale produttore è l'Asia, seguita dall'Europa (Fig. 1.2). In Europa, il maggiore produttore è rappresentato dalla Francia (29 Mt), seguita a sua volta dalla Germania (24 Mt). Per quanto riguarda l'Italia, nel 2016 la produzione ammontava a 8 Mt.

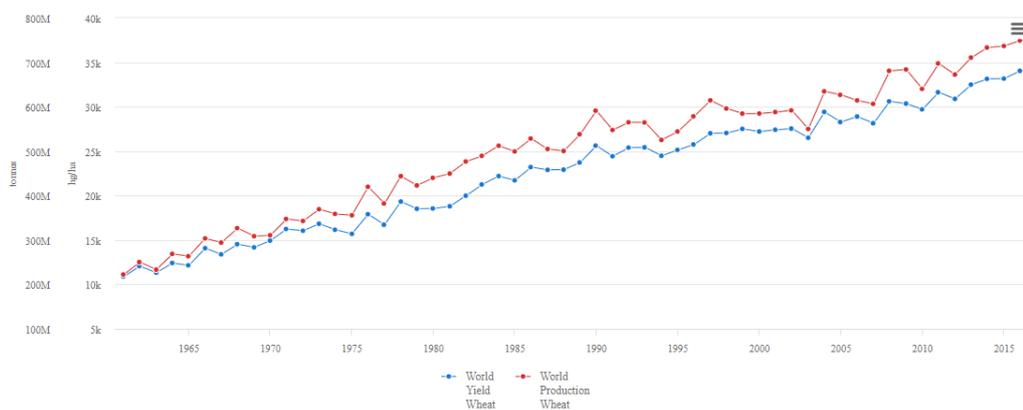


Fig. 1.1 Produzione e resa mondiale di frumento dal 1961 al 2016 (<http://faostat.fao.org/>)

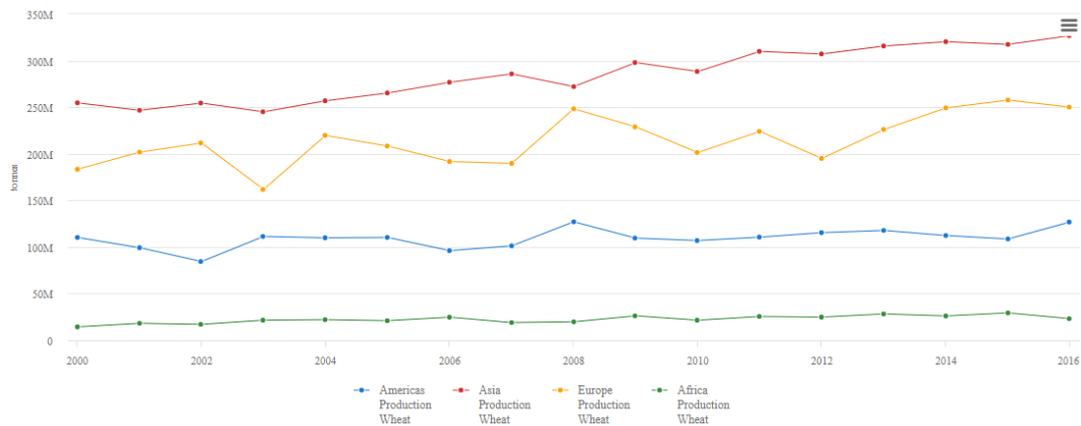


Fig. 1.2 Produzione di frumento nel mondo (dati aggiornati al 2016) (<http://faostat.fao.org/>).

Il passaggio da cacciatori-raccoglitori ad una vita stanziale basata sulla coltivazione e l'allevamento, avvenuto circa 10.000 anni fa, rappresenta il punto di partenza per l'evoluzione della società umana. La domesticazione dell'orzo e del farro, avvenuta nel sud-est della Turchia, portò a quella che oggi noi conosciamo con il nome di "Rivoluzione del Neolitico" (Dubcovsky e Dvorak, 2007; Shewry, 2009) e fu uno degli eventi che contribuì alla domesticazione della famiglia *Triticum*, frutto della scissione della grande famiglia delle *Poaceae*, avvenuta circa 20 milioni di anni fa. Questa separazione ha dato origine agli antenati di mais e sorgo, poi all'orzo, all'avena e infine, alle due famiglie da cui è derivato il frumento, la famiglia dei *Triticum* da una parte e quella *Aegilops* dall'altra. La famiglia *Triticum* era inizialmente costituita da *T. monococcum* ssp. *boeoticum* e *T. urartu* (genoma AA, $2n=14$). Dalla domesticazione del primo è stato ottenuto il *T. monococcum* ssp. *monococcum*, il comune farro monococco, anche detto piccolo farro. L'incrocio interspecifico spontaneo avvenuto circa 300.000 anni fa tra *T. urartu* e una specie selvatica appartenente al genere *Aegilops*, (con molta probabilità *Ae. speltoides* (genoma BB, $2n=14$)), diede origine al primo frumento tetraploide, il *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* (genoma AABB, $2n=28$). Ciò è stato reso possibile grazie a mutazioni genomiche che hanno portato al raddoppiamento dei cromosomi nei gameti. Successivamente l'uomo domesticò il *T. turgidum* ssp. *dicoccon*, (conosciuto comunemente come farro), da cui è derivato l'attuale frumento duro (*T. turgidum* ssp. *durum*). Invece, per quanto riguarda il frumento esaploide *T. aestivum* ssp. *aestivum* (genoma AABBDD), comparve per la prima volta nel nord-est della Turchia circa

9.000 anni fa (Fig. 1.3). Il frumento esaploide è derivato dall'incrocio tra *T. dicoccoides* e *Ae. Squarrosa*, con successiva selezione antropica verso forme più facilmente coltivabili.

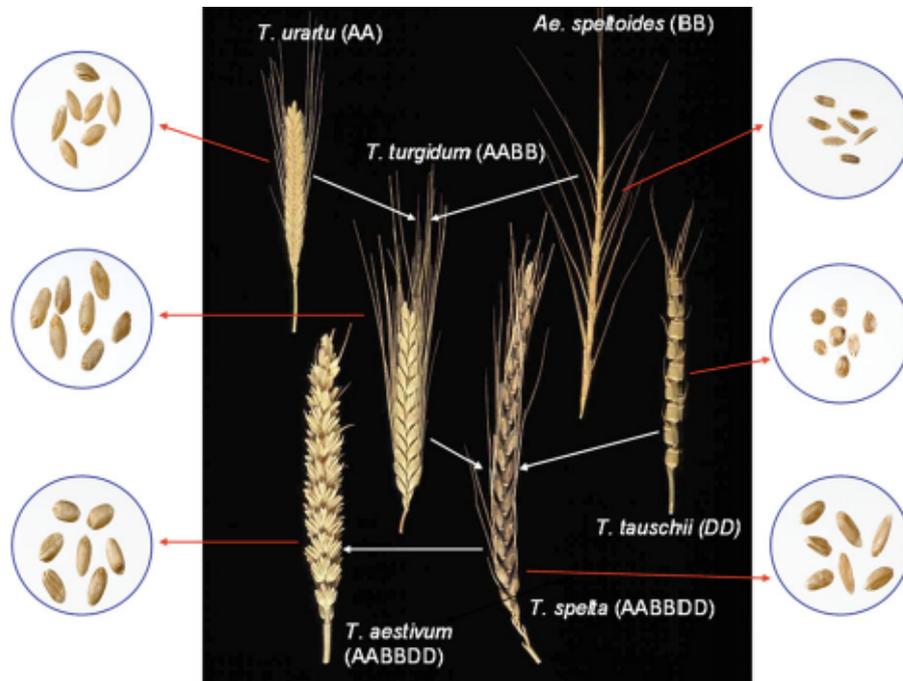


Fig. 1.3 Schema dell'evoluzione e delle relazioni tra frumento tenero e frumento duro (Shewry, 2009).

Le piante domestiche si differenziano dai loro progenitori selvatici per via della selezione di alcuni tratti di interesse. Uno di questi è rappresentato dalla resistenza del rachide delle spighe alla maturità, carattere controllato dal locus *Br* (*brittle rachis*), presente sul cromosoma 3A e 3B (Nalam *et al.* 2006). Un altro tratto selezionato durante la domesticazione fu lo sviluppo di semi nudi (*free-treshing*), in cui le glumette non aderiscono più alla cariosside. Questo carattere è controllato da una mutazione recessiva nel locus *Tg* (*tenacious glume*) e nel locus *Q* (Simmonds *et al.* 2016) (Fig. 1.4). Altri caratteri selezionati nel frumento riguardarono la grandezza dei semi e la ridotta dormienza.

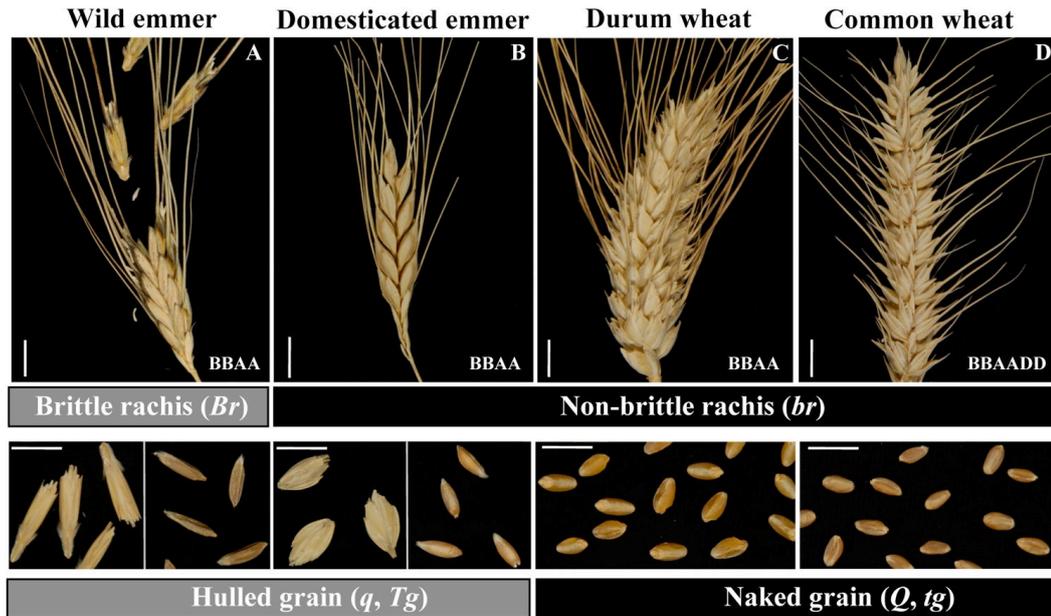


Fig. 1.4 Esempi di caratteri genetici selezionati dall'uomo (Dubcovsky e Dvorak, 2007).

1.1.1 Il successo del frumento

Le specie allopoliploidi, incluso il frumento, si sono originate dall'ibridazione tra diverse specie, dando quindi vita a nuove specie, che possiedono un grande potenziale per adattarsi a diversi tipi di condizioni ambientali (Fig. 1.5). Per il frumento tenero (*T. aestivum*) questo si è tradotto in un miglioramento nella tolleranza allo stress salino e al basso pH, in una maggiore resistenza agli stress biotici e, in definitiva, in un incremento nelle rese. Tutte queste caratteristiche hanno contribuito al suo attuale successo. Il frumento duro è ben adattato al clima mediterraneo, se confrontato con il frumento tenero, ed è alla base della produzione di pasta e di couscous nel Nord Africa. Una delle caratteristiche che ha conferito al frumento un vantaggio su altre specie quali il riso (*Oryza sativa*) e il mais (*Zea mays*), è l'impareggiabile capacità delle farine, che si ottengono dalla molitura della granella, di creare impasti con proprietà viscoelastiche uniche (proprietà dovuta al polimero gluteninico).

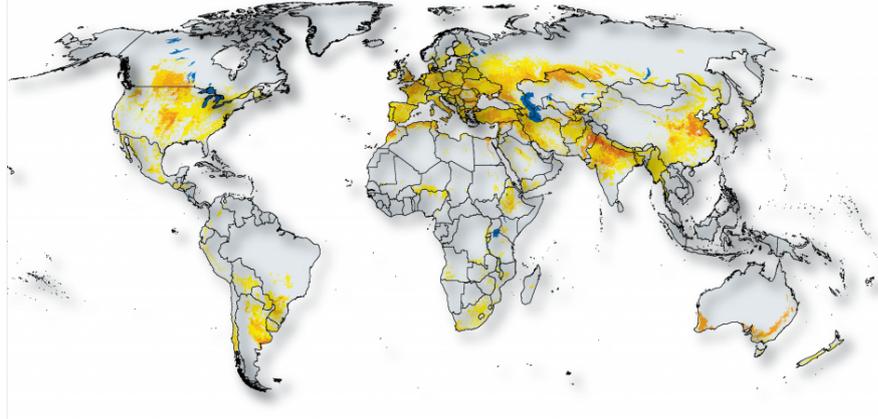


Fig. 1.5 Coltivazione di frumento a livello globale (You *et al.* 2014).

1.1.2 Composizione della cariosside

Il seme del frumento, e più in generale di tutte le specie cerealicole, viene definito cariosside. Le cariossidi di frumento hanno generalmente una lunghezza compresa tra i 5 ed i 9 mm ed un peso compreso tra i 35 e i 50 mg. Circa l'80-85% del seme è costituito dall'endosperma, il 13-17% dalla crusca e il 2-3% dall'embrione (Fig. 1.6) (Belderok *et al.* 2000). Nella cariosside si possono distinguere una parte dorsale, una ventrale e un solco longitudinale. L'embrione si trova ad un'estremità della cariosside ed è separato dall'endosperma dallo scutello, la cui funzione è quella di permettere il passaggio di nutrienti dall'endosperma all'embrione (Frattoni e Valvassori, 1976).

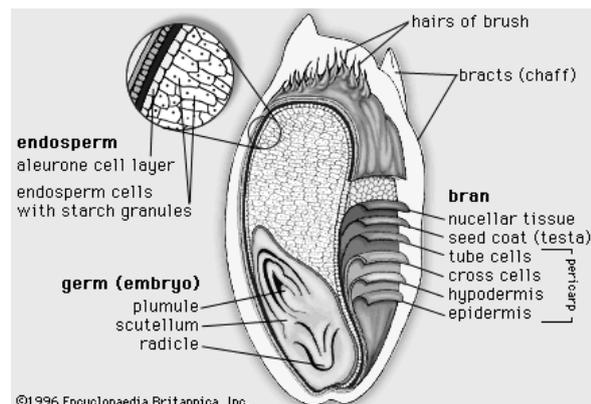


Fig. 1.6 Schematizzazione della cariosside di frumento (<http://www.britannica.com>).

1.1.2.1 Lipidi

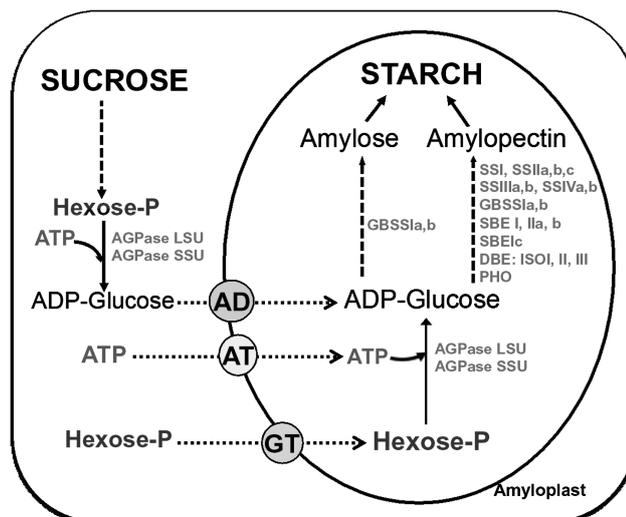
I lipidi hanno un ruolo importante nella qualità dei cibi grazie alla loro capacità di associarsi con le proteine. Tra i precursori usati per la biosintesi di questi, l'acetil-CoA e il malonil-CoA hanno un ruolo centrale. La cariosside di frumento possiede alti livelli di oleato (C18:1), linoleato (C18:2) e palmitato (C16:9) (Šramková *et al.* 2009).

1.1.2.2 Amido

L'amido è un polisaccaride utilizzato come riserva di energia e accumulato all'interno degli amiloplasti dalle piante, ma è anche un'importante fonte di glucosio nella dieta degli esseri umani. L'amido, inoltre, viene utilizzato nell'industria alimentare come addensante ed in altri settori dell'industria "non food" tra cui quello farmaceutico, della plastica e della carta.

Il contenuto in amido della cariosside di frumento è circa il 60-70%. L'amido è costituito da due polimeri di glucosio: l'amilosio e l'amilopectina. Normalmente, nella cariosside è presente il 70-80% di amilopectina e il 20-30% di amilosio. L'amilosio è un polimero glucidico lineare, con legami glucosidici α -(1-4), che vanno a formare una catena di 1000-5000 unità. L'amilopectina presenta invece una struttura più complessa, in cui le catene lineari di glucosio presentano numerose ramificazioni (legami α -(1-6)). La biosintesi dell'amido è un processo complesso, che coinvolge diversi enzimi e un substrato comune, l'ADP-glucosio. L'amilopectina è il risultato dell'attività simultanea degli enzimi noti come amido sintasi (*starch synthase*, SSI, SSII, SSIII), di enzimi responsabili delle ramificazioni (*starch branching enzymes*, SBEI, SBEIIa e SBEIIb) ed enzimi di deramificazione (*debranching enzymes*, DE). L'amilosio è invece sintetizzato dall'azione di un unico enzima, noto come "waxy" o GBSSI (*granule bound starch synthase*) (Fig. 1.7).

Fig. 1.7 *Pathway* della biosintesi dell'amido (Beckles e Thitisaksakul, 2010).



1.1.2.3 Contenuto proteico e glutine

Nel 1924 Osborne fu il primo a classificare le proteine della cariosside in quattro diversi gruppi, basandosi sul loro processo di estrazione e sulla loro solubilità in diversi solventi: albumine (solubili in acqua), globuline (solubili in soluzioni saline diluite), prolammine (solubili in soluzioni contenenti alcol ed acqua) e gluteline (solubili in soluzioni debolmente acide o basiche) (Osborne, 1924). La frazione prolamminica ha un ruolo preponderante sulle proprietà del glutine, soprattutto per quanto riguarda le caratteristiche viscoelastiche. Diversi studi hanno sottolineato la correlazione tra le proteine del glutine, presenti in diversi genotipi e la qualità delle farine prodotte. Inoltre, studi biochimici e biofisici hanno dimostrato una stretta relazione tra la forza dell'impasto e la capacità delle proteine del glutine di formare una struttura polimerica complessa. Le prolammine derivano etimologicamente dal nome latino delle specie in cui sono presenti (ordeine nell'orzo, secaline nelle segale, zeine in mais). Il frumento rappresenta invece un'eccezione. Queste vengono infatti classificate in due gruppi: gliadine e glutenine. Anche se la loro proporzione può variare, le proteine del glutine rappresentano circa l'80% delle proteine totali del seme, di cui il 30% è rappresentato dalle gliadine e il 50% dalle glutenine (Gil-Humanes *et al.* 2011).

Gliadine e glutenine differiscono per le loro proprietà funzionali: le prime contribuiscono all'estensibilità e alla viscosità dell'impasto, le seconde ne influenzano l'elasticità. Le gliadine sono proteine monomeriche classificate in tre tipi strutturali: α -

, γ - e ω -gliadine. I geni che codificano per le gliadine sono localizzati sul braccio corto dei cromosomi 1 e 6, in particolare nei loci *Gli-1* e *Gli-2*, in tutti e tre i genomi (A, B e D).

Le glutenine formano invece dei complessi polimerici costituiti da subunità: ad alto peso molecolare (*high molecular weight*, HMW) e a basso peso molecolare (*low molecular weight*, LMW). Questi polimeri sono stabilizzati da ponti disolfuro interni. I geni che codificano per le HMW sono localizzati sul braccio lungo dei cromosomi 1 (nei loci *Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-D1*). I geni che codificano per le LMW sono invece localizzati sul braccio corto dei medesimi cromosomi.

1.2 Aumentare le rese

Secondo recenti stime, la popolazione mondiale continuerà a crescere e, probabilmente, raggiungerà i 9 miliardi di persone entro la metà del secolo corrente. Questa situazione futura rappresenta una grande sfida per l'umanità, che sicuramente dovrà affrontare questioni riguardanti le modalità con cui si producono le materie prime, i metodi di conservazione e i processi produttivi (Rayfuse e Weisfelt, 2012). Sicuramente una delle problematiche più rilevanti sarà l'incremento della domanda di cibo. Una stima fatta da Ray *et al.* (2013) prevede che la domanda aumenterà tra il 70 e il 100% entro il 2050 (Fig. 1.8). Inoltre, stiamo assistendo ad un aumento della concentrazione di anidride carbonica e al conseguente aumento delle temperature, tutti eventi che influiscono negativamente sul cambiamento climatico globale. Questi eventi potrebbero ripercuotersi sulle rese delle specie attualmente coltivate (Godfray *et al.* 2010).

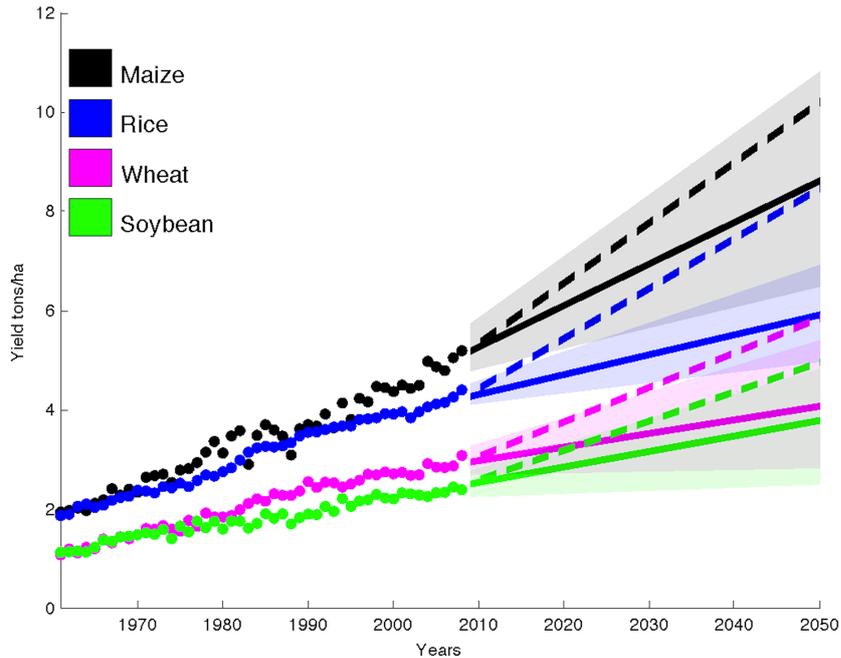


Fig. 1.8 Rese di mais, riso, frumento e soia dal 1961 al 2008. Stima di come dovrebbero aumentare le rese fino al 2050 per soddisfare la richiesta di cibo nel mondo (Ray *et al.* 2013).

Le nuove sfide dell'umanità saranno, quindi, quelle di produrre una maggiore quantità di cibo in modo sostenibile e soprattutto ridurre l'impatto ambientale provocato dalle industrie.

Il miglioramento genetico delle specie vegetali può contribuire a trovare una soluzione al problema delle rese.

La grandezza di un seme è un importante componente agronomica correlata alla resa. Caratteri come la lunghezza e larghezza dei semi sono controllati da QTL (*quantitative trait loci*), ma anche dall'interazione che si instaura tra la pianta e l'ambiente in cui vive: esiste quindi una componente genetica della pianta e una componente ambientale. Negli ultimi anni, usando specie modello e non, sono stati individuati diversi QTL in grado di influenzare la grandezza della cariosside, anche se, in alcuni casi, i meccanismi genetici non sono ancora ben chiari. Ad esempio nel riso il gene *GS3* limita la proliferazione cellulare (Fan *et al.* 2006), mentre *GS5* e *GW8* hanno un effetto positivo sulla larghezza delle cariossidi (Yan *et al.* 2011; Huang *et al.* 2012).

1.3 Geni associati alle rese

L'analisi dei QTL è stata spesso usata come approccio per l'individuazione di geni o famiglie geniche che regolano un determinato carattere di interesse. Riguardo le rese, nell'ultima decade sono stati individuati diversi QTL legati alla dimensione della cariosside.

Ad esempio, in *Arabidopsis* è stato individuato il mutante *da1-1*, in cui la mutazione porta allo sviluppo di una pianta con semi e organi più grandi (Li *et al.* 2008). Nello specifico questo mutante produce dei semi che hanno un peso e una larghezza maggiore se confrontati con il genotipo *wild type*. *DA1* codifica per un recettore dell'ubiquitina che possiede due motivi: UIM (*ubiquitin interacting motif*) e un domino a dita di zinco definito LIM. In definitiva, *DA1* controlla lo sviluppo dei semi e degli organi influenzando la proliferazione cellulare (Li *et al.* 2008).

In *Arabidopsis* è stato identificato un regolatore negativo della grandezza del seme. I mutanti *da2-1* ed *eod/bb* mostrano lo stesso fenotipo: aumento della biomassa e organi più grandi. *DA2* ed *EOD1* (*Big Brother (BB)/Enhancer of DA1*) sono delle ubiquitina-ligasi E3 di tipo RING (*really interesting new gene*), identificate come regolatori negativi della divisione cellulare in *Arabidopsis* (Disch *et al.* 2006; Xia *et al.* 2013). È importante notare che *DA2* e *DA2L* (*DA2-like protein*) di *Arabidopsis* hanno un'elevata similarità di sequenza con il gene *GW2*, di cui si parlerà in seguito all'interno di questa Tesi (Fig. 1.9).

Anche nel mais sono stati individuati geni correlati alle dimensioni della cariosside, tra cui *ZmGW2-CHR4* e *ZmGW2-CHR5* (Li *et al.* 2010). Uno SNP (*single nucleotide polymorphism*) nella regione del promotore del gene *ZmGW2-CHR4* è stato associato ad un seme più largo e ad un maggiore peso dei cento semi (Li *et al.* 2010).

Lo studio effettuato da Shomura *et al.* (2008) ha individuato che una delezione di 1212-bp nel gene *GW5* influenza la larghezza del seme. Un'accurata ricerca sull'attività del gene *GW5* ha permesso di stabilire che non è solo coinvolto nelle dimensioni del seme nel riso Indica e Japonica, ma anche nelle collezioni di germoplasma e nelle varietà di riso comunemente coltivate (Wan *et al.* 2008).

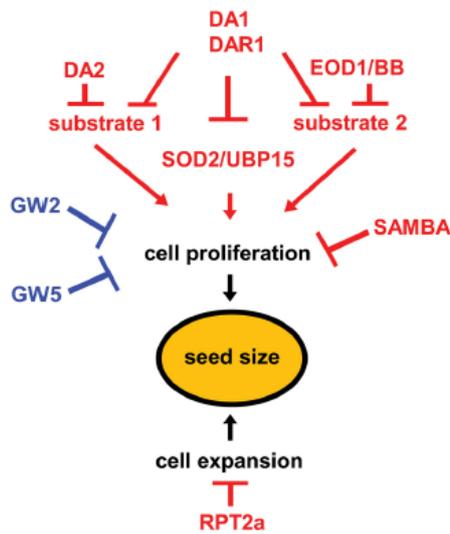


Fig. 1.9 Schema di come DA1 e DA2 controllano la proliferazione cellulare. Si pensa che questi due geni agiscano su un substrato comune (substrato 1). Allo stesso modo Da1 ed EOD1 regolano la divisione cellulare agendo su un target comune (substrato 2). DA1 interagisce inoltre con UBP15, modulando la sua stabilità e controllando in modo diretto la proliferazione cellulare. GW2, GW5 e SAMBA sono coinvolti invece nella diminuzione della proliferazione cellulare in modo diretto. RPT2a regola le dimensioni del seme limitando l'espansione cellulare (Li e Li, 2014).

Nel riso, uno dei maggiori QTL in grado di regolare peso e lunghezza della cariosside è *GS3*, gene localizzato nella regione pericentromerica del cromosoma 3. Fan *et al.* (2006) furono i primi ad effettuare degli studi su questo gene, usando delle linee quasi isogeniche (NIL, *near isogenic line*). Queste linee furono sviluppate incrociando e reincrociando (*backcrossing*) le due varietà Minghui 63 (seme largo) e Chuan 7 (seme piccolo) (Fig. 1.10). Una mutazione di tipo non-senso presente sul gene *GS3* è stata associata alle NIL a seme largo, suggerendo che *GS3* possa agire come un regolatore negativo, per quanto riguarda la dimensione delle cariossidi (Fan *et al.* 2006). Tale mutazione produce un polipeptide tronco all'estremità C-terminale (formato da 178 amminoacidi).



Fig. 1.10 Semi delle cultivar usate nello studio Fan *et al.* (2006).

Sempre nel riso, il gene *GASR7*, che codifica per la proteina Snakin/GASA, è stato associato alla dimensione dei semi. È stato individuato un ortologo di questo gene in *T. urartu* (*TuGASR7*) e *T. aestivum* (*TaGASR7*) (Huang *et al.* 2012), che influenza la lunghezza e il peso dei mille semi. Wang *et al.* (2015) riportano una caratterizzazione di tre distinti omeoalleli di *TaGASR7* nella varietà Chinese Spring di frumento tenero: *TaGASR7-A1*, *TaGASR7-B1* e *TaGASR7-D1*. I tre omeoalleli si trovano rispettivamente sui cromosomi 7A, 7B e 7D. All'interno di questi alleli, la lunghezza del primo e terzo esone risulta conservata, mentre quella del secondo esone e dei due introni è differente. In frumento tenero sono stati identificati due aplotipi *TaGASR7-A1* (H1c e H1g), che differiscono nella regione 5' e 3' (Fig. 1.11). I genotipi con aplotipo H1c mostrano semi più lunghi, un aumento del peso dei mille semi e un incremento nella resa rispetto ai genotipi con aplotipo H1g. Entrambi gli aplotipi non influenzano la larghezza delle cariossidi.

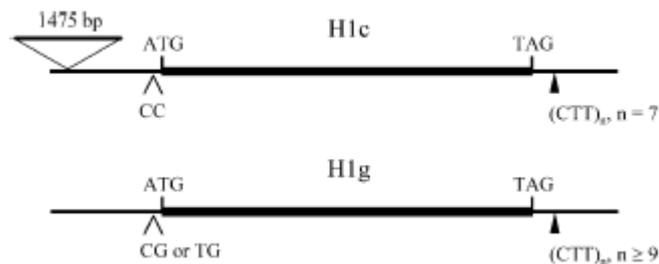


Fig. 1.11 Differenza tra i due aplotipi H1c e H1g. Nell'aplotipo H1c, nella regione 5', è presente un'insertione di 1475 bp a -124 bp a monte del codone di inizio. Inoltre, gli aplotipi H1c e H1g differiscono nei due nucleotidi presenti in posizione -3 e -4 a monte del codone di inizio (in H1c CC mentre in H1g CG) (Wang *et al.* 2015).

1.3.1 Il gene *GW2*

In *Oryza sativa*, è stato dimostrato che il gene *OsGW2* influenza il peso e la larghezza dei semi ed è coinvolto nel loro sviluppo. La funzione del gene *OsGW2* è stata studiata per la prima volta da Song e colleghi (2007). Il gene *GW2* è localizzato sul braccio corto del cromosoma 2 ed è costituito da 8 esoni e 7 intorni (Fig. 1.12) e codifica per una proteina RING-type di 47 kDa che possiede un'attività E3 ubiquitina-ligasi. Song e colleghi individuarono una delezione di 1 bp nell'esone 4 delle varietà WY3 e Oochikara. Questa delezione porta alla formazione di una proteina tronca di 13 kDa. La perdita della funzione del gene *GW2* è stata associata ad un aumento della larghezza, del peso e della resa delle cariossidi; in particolare, è stato dimostrato che la proteina *GW2* regola negativamente la divisione cellulare nel seme.

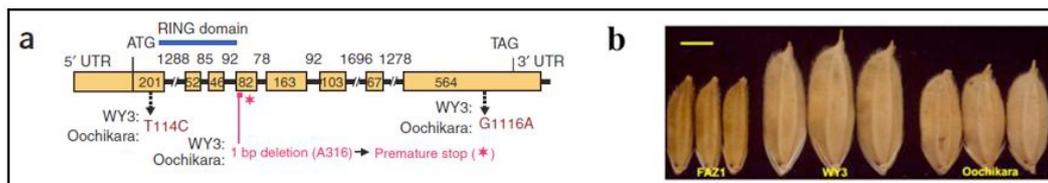


Fig. 1.12 a) Struttura del gene *GW2*; l'asterisco indica il sito in cui è presente la delezione di una base nelle varietà WY3 e Oochikara. **b)** Fenotipi delle cariossidi delle varietà FAZ1 (controllo non mutato), WY3 e Oochikara (Song *et al.* 2007).

Il gene *TaGW2* rappresenta l'ortologo in frumento tenero di *OsGW2* ed è localizzato sul braccio corto del cromosoma 6, vicino al centromero, in tutti e tre i genomi (A, B, D).

La regione codificante è lunga 1,275 bp e codifica per una proteina di 424 amminoacidi, con un dominio funzionale che è altamente conservato con *OsGW2*. L'omologia di sequenza nucleotidica tra *OsGW2* e *TaGW2* risulta essere ~87%, mentre l'identità della sequenza amminoacidica ~88% (Su *et al.* 2011).

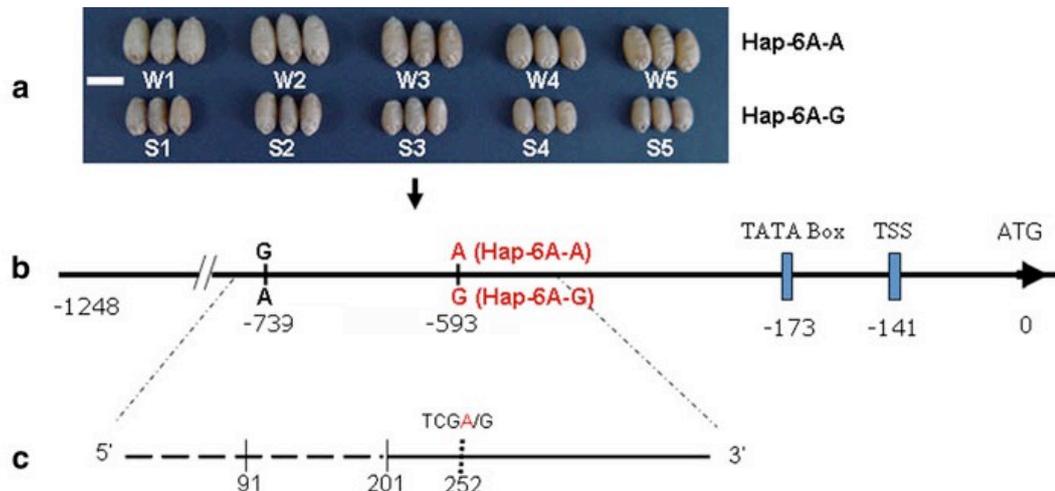


Fig. 1.13 a) Immagine relativa ai due aplotipi Hap-6A-A (-593A e -739G) e Hap-6A-G (-593G e -769A).
 b) Posizione dei due aplotipi nella regione del promotore del gene *TaGW2-6A* (Su *et al.* 2011).

Su *et al.* (2011) individuarono due SNP, nella regione del promotore di *TaGW2-6A*, che portano alla formazione di due aplotipi: Hap-6A-A (-593A e -739G) e Hap-6A-G (-593G e -769A) (Fig. 1.13).

L'aplotipo Hap-6A-A ha un effetto positivo sulle dimensioni del seme e potrebbe essere utilizzato in programmi di miglioramento genetico del frumento. In generale i livelli di espressione di *TaGW2* sono negativamente correlati alla larghezza, alla maturazione della cariosside e alle rese; infatti, l'espressione dei geni *TaGW2* è risultata essere maggiore nelle varietà a seme piccolo con l'aplotipo Hap-6A-G rispetto a quelle a seme grande con aplotipo Hap-6A-A. Comunque, l'aplotipo Hap-6A-G predomina nelle *landraces* (58,28%), mentre Hap-6A-A si ritrova con maggior frequenza nelle varietà moderne (77,42%) (Fig. 1.14).

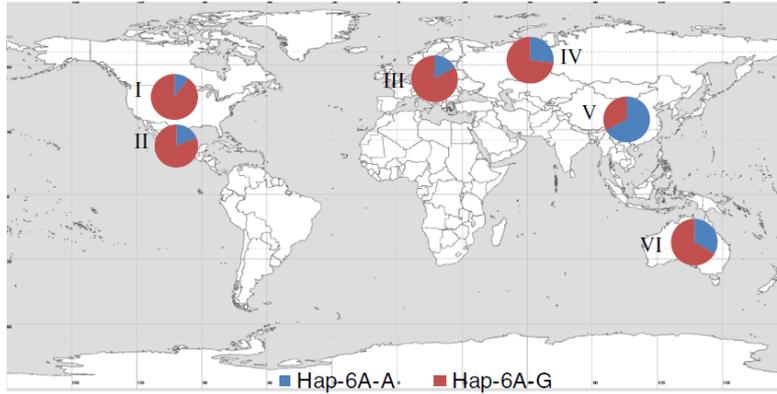


Fig. 1.14 Distribuzione geografica degli aplotipi *TaGW2-6A* in 320 accessioni cinesi, in 374 accessioni europee, in 471 accessioni australiane, in 53 accessioni provenienti dal CIMMYT e in 83 accessioni provenienti dalla Russia (Qin *et al.* 2014).

Un'ulteriore conferma del ruolo di regolatore negativo della divisione cellulare svolto dal gene *TaGW2* è stata fornita dallo studio di Yang *et al.* (2012). All'interno di questo lavoro, gli autori individuarono l'inserzione di una timina nell'esone 8 del gene *TaGW2*, che porta alla formazione di una proteina tronca, costituita da 328 amminoacidi. Questa mutazione è stata associata alla dimensione della cariosside nelle varietà cinesi di frumento tenero Sichuandali, Lankaodali e Wanmai 38 (Fig. 1.15).



Fig. 1.15 Differenza nelle dimensioni dei semi di cinque varietà di frumento (SC Sichuandali, LK Lankaodali, Wm Wanmai 38, CS Chinese Spring, MX Mingxian 169) (Yang *et al.* 2012).

Recentemente Bednarek *et al.* (2012) hanno studiato la funzione del gene *TaGW2* utilizzando la tecnica dell'interferenza dell'RNA per diminuire l'espressione del gene considerato. Le analisi di espressione genica condotte sulle piante transgeniche T₂ hanno evidenziato una drastica riduzione dei livelli di trascritto dei tre omeoalleli (*TaGW2A*, *TaGW2B* e *TaGW2D*) (Bednarek *et al.* 2012). Le analisi fenotipiche condotte sui semi delle linee transgeniche hanno evidenziato una riduzione del volume, della larghezza e dello spessore dei semi rispetto alle piante non trasformate (Fig. 1.16). Da questo studio è emerso, inoltre, che non c'è una differenza significativa nelle piante trasformate riguardo al numero di spighe, al numero di spighette per spiga, alla data di antesi e al numero di semi per spiga.

I risultati sopra riportati sono in netto contrasto con quelli osservati da altri autori sia in frumento (Su *et al.* 2011 e Yang *et al.* 2012) che in riso (Song *et al.* 2007). Gli autori hanno ipotizzato che questa discrepanza possa essere dovuta alla simultanea riduzione dei tre omeoalleli rispetto agli studi condotti solo sull'allele *TaGW2A*.

Uno studio più recente (Hong *et al.* 2014), in cui il gene *TaGW2* è stato silenziato in frumento tenero mediante la tecnica RNAi, ha ottenuto risultati opposti a quelli osservati da Bednarek *et al.* (2012). Le linee transgeniche prodotte hanno mostrato semi di peso e larghezza maggiori rispetto alle piante non trasformate, confermando che la proteina TaGW2 è un regolatore negativo della dimensione del seme.

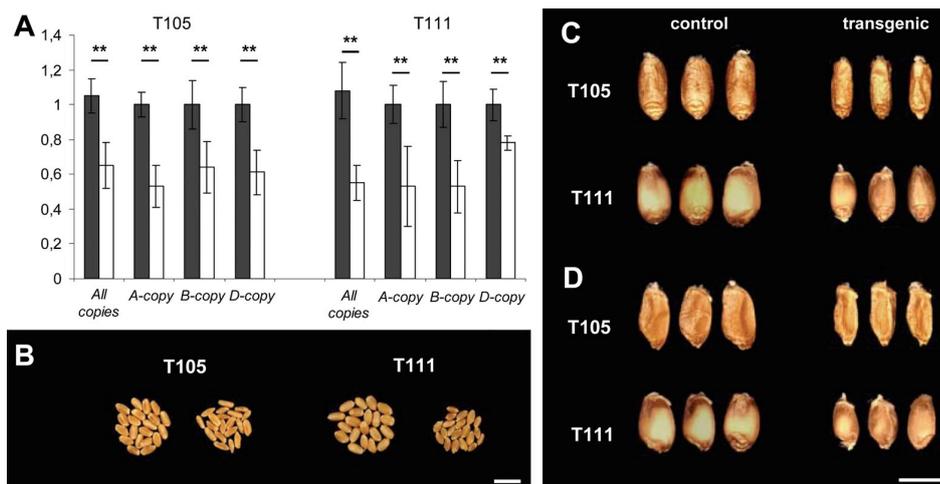


Fig. 1.16 Caratterizzazione molecolare e analisi fenotipica della varietà Réclital studiata in Bednarek *et al.* 2012. **a)** Analisi di espressione delle tre copie del gene *TaGW2* delle due linee transgeniche T105 e T111. **b-c)** analisi fenotipica delle linee transgeniche e del controllo.

I risultati contrastanti ottenuti da Bednarek *et al.* (2012) e Hong *et al.* (2014) possono essere spiegati considerando alcuni importanti fattori: nel primo studio l'intera sequenza del gene *TaGW2* (nucleotidi dal 34 al 1275) è stata usata per creare il costrutto RNAi e quest'ultimo può aver causato il silenziamento di altri geni *off-target* che possiedono anche solo parziale similarità con il gene oggetto di studio. Diversamente, nello studio di Hong *et al.* (2014) è stata usata una sequenza parziale del gene (dal nucleotide 481 al 698). Inoltre, nelle specie poliploidi (il frumento tenero è una specie esaploide, con genoma AABBDD) la funzione di alcuni geni può essere influenzata dal contesto genetico in cui si trovano e questo può essere differente tra diverse varietà (Yan *et al.* 2011).

Altri studi sul gene *TaGW2* hanno individuato nuovi SNP (SNP-988 e SNP-494) all'interno della regione del promotore del gene *TaGW2-A1*. Lo SNP-494 è stato associato al rapporto tra lunghezza e larghezza del seme, alla lunghezza delle spighe, al contenuto proteico nel seme, alla lunghezza del peduncolo e all'altezza della pianta (Jaiswal *et al.* 2015). Ciò suggerisce che *TaGW2-A1* non controlla solo la dimensione delle cariossidi, ma anche altri caratteri agronomici del frumento.

Recentemente sono stati individuati, attraverso lo screening di una popolazione TILLING, diversi mutanti nell'allele *TaGW2-A1*, tra cui una transizione (G>A) nel sito di *splicing* dell'esone 5 (Simmonds *et al.* 2016). Tale transizione è responsabile dell'aumento della larghezza dei semi (+2,8%), del peso dei mille semi (+6,6%) e della lunghezza dei semi (+2,1%), sia nelle linee di frumento tetraploidi che in quelle esaploidi.

1.3.1.1 TaGW2: la ligasi E3 RING-type

Il meccanismo di ubiquitinazione è coinvolto in diversi processi della pianta tra cui, ad esempio, il ritmo circadiano, i processi di segnalazione ormonale, la risposta ai patogeni e agli stress abiotici. Analisi genomiche hanno scoperto che, in *Arabidopsis thaliana*, più di 1400 geni codificano per componenti del proteasoma 26S (Smalle e Vierstra, 2004).

L'ubiquitina è una piccola proteina globulare, formata da 76 residui e con diverse strutture secondarie che portano alla formazione di una cavità interna (Fig. 1.17) (Vierstra, 1996).

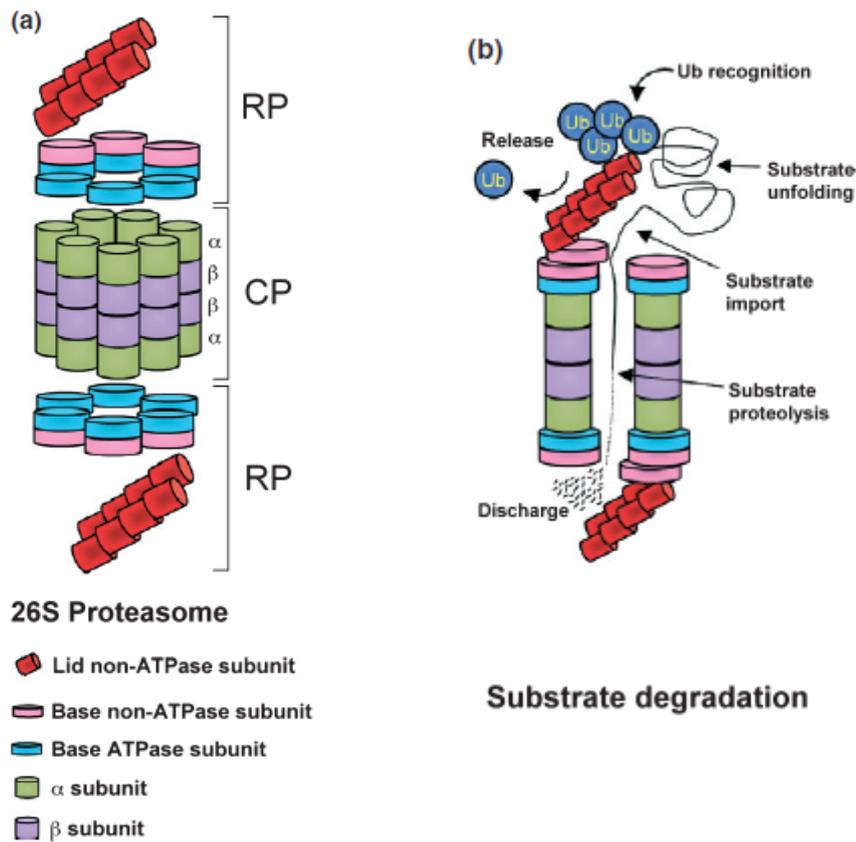


Fig. 1.17 **a)** Struttura tridimensionale del proteasoma 26S: l'anello eptamerico forma una cavità chiamata CP (*core protease*), i subcomplessi Lid e Base formano la componente RP (*regulatory particle*). **b)** Schema riassuntivo delle reazioni che avvengono all'interno del proteasoma 26S durante la degradazione di un substrato (Vierstra, 2009; Sadanandom *et al.* 2012).

L'ubiquitina si lega in modo covalente alle proteine bersaglio, grazie all'attività sequenziale di tre enzimi: l'enzima di attivazione dell'ubiquitina (E1) forma un legame tioestereo con l'estremità C-terminale della glicina, in una reazione che è ATP-dipendente. Sull'ubiquitina attivata agisce poi un enzima di coniugazione (E2), in grado di trasferire l'ubiquitina grazie all'aiuto della ligasi E3. Nello specifico, la ligasi E3

trasferisce l'ubiquitina sui substrati e il numero di molecole che risultano legate a questi, ne definiscono il destino finale, ovvero la degradazione (Fig. 1.18) (Li e Li, 2014).

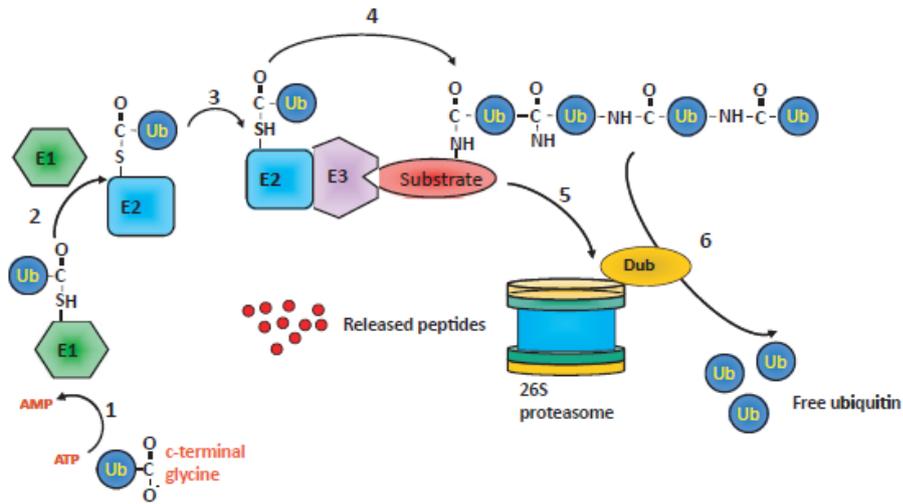


Fig. 1.18 Il processo di ubiquitinazione: 1) E1 catalizza l'attivazione dell'ubiquitina. 2-3) Trasferimento dell'ubiquitina attivata ad E3 tramite E2. 4) Ubiquitinazione iniziale dovuta al complesso ubiquitina-substrato. 5) I substrati legati dall'ubiquitina vengono trasportati al proteasoma. 6) La catena di poli-Ub viene dissociata dall'enzima DUB (*deubiquitinating activity*) del proteasoma (Sadanandom *et al.* 2012).

Recentemente sono stati individuate diverse componenti del processo di ubiquitinazione, coinvolte nella regolazione delle dimensioni degli organi e dei semi (Tabella 1.1).

Tabella 1.1 Lista delle proteine e degli enzimi che regolano la dimensione dei semi.

Table 1 | List of ubiquitin-related proteins involved in seed size control.

Categories	Protein name	Species	Accession number	Reference(s)
Ubiquitin receptors	DA1	<i>Arabidopsis</i>	AT1G19270	Li et al., 2008
	DAR1	<i>Arabidopsis</i>	AT4G36860	Li et al., 2008
E3 ligases	DA2	<i>Arabidopsis</i>	AT1G78420	Xia et al., 2013
	EOD1/BB	<i>Arabidopsis</i>	AT3G63530	Disch et al., 2006; Li et al., 2008
	DA2L	<i>Arabidopsis</i>	AT1G17145	Xia et al., 2013
	GW2	Rice	EF447275	Song et al., 2007
	TaGW2	Wheat	JN896622, JN896623	Su et al., 2011; Bedharek et al., 2012; Yang et al., 2012
	ZmGW2	Maize	EU968771, FJ573211, EU962093	Li et al., 2010
Other regulators	UBP15	<i>Arabidopsis</i>	AT1G17110	Liu et al., 2008; Du et al., 2014
	Rpt2a	<i>Arabidopsis</i>	AT4G29040	Kurepa et al., 2009
	SAMBA	<i>Arabidopsis</i>	AT1G32310	Eloy et al., 2012
	GW5	Rice	AB433345	Shomura et al., 2008; Weng et al., 2008

Esistono due gruppi di ligasi E3, in base alla presenza di domini conservati: HECT e RING (*Really Interesting New Gene*). Il gene *GW2* codifica per una ligasi E3 RING-type, un enzima di 47 kDa. Il dominio RING di *GW2* è caratterizzato dalla presenza di una cisteina in posizione 5 e un'istidina in posizione 6 (C5HC2). Questa caratteristica è comune al dominio RING presente nel frumento e nel mais.

1.4 Miglioramento genetico

L'agricoltura si è evoluta in modo indipendente in diversi luoghi del pianeta circa 10.000 anni fa. Fino a 200.000 anni fa l'uomo viveva come cacciatore-raccogliatore e il passaggio da nomade a sedentario ha permesso la domesticazione di specie selvatiche di animali e piante. Le piante, in particolare, hanno avuto un ruolo centrale nell'evoluzione umana. Ogni specie coltivata è il frutto di migliaia di anni di domesticazione.

1.4.1 Il breeding convenzionale

I nostri antenati domesticarono una piccola porzione di piante, trasformandole in quelle che noi oggi chiamiamo *cultivar*. Questo processo di domesticazione è oggi noto come *breeding* convenzionale. Tale metodologia consiste nell'incrociare e selezionare individui che possiedono dei caratteri utili all'uomo. Uno dei più famosi *breeder* italiani fu Nazareno Strampelli (1866-1942), il primo ad effettuare degli incroci tra piante sessualmente compatibili di frumento. Attraverso diversi incroci, Strampelli riuscì a raddoppiare la resa del frumento senza aumentare l'area coltivata. In passato, la maggior parte dei caratteri veniva selezionato in questo modo (ridurre la dispersione del seme, aumentare la produttività, aumentare la resistenza agli stress, ottenere frutti e semi più grandi o eliminare i semi come nel caso della banana).

1.4.2 Mutagenesi

Il materiale prodotto da Strampelli venne utilizzato da N. Borlaug, A. Bozzini e F. D'Amato che, con la mutagenesi, ottennero una varietà chiamata Creso, con la

caratteristica di non avere un'elevata altezza e la capacità di avere delle elevate rese, anche in condizioni ventose.

La tecnica della mutagenesi usa degli agenti mutageni, di tipo chimico o fisico, in grado di aumentare la frequenza delle mutazioni (Jain, 2010). Grazie a questa tecnica è possibile aumentare la variabilità genetica aumentando il tasso di mutazioni. Alla fine del processo si ottengono degli individui mutanti per una caratteristica di interesse, che potranno poi essere utilizzati nei programmi di breeding.

L'induzione di mutazioni in frumento è stato possibile grazie all'utilizzo di mutageni fisici (raggi X, neutroni accelerati e fasci di ioni) e chimici. Ad esempio, usando un irraggiamento con raggi-X sono state ottenute le varietà "Pusa Lerma" e "Pb C 591", entrambe resistenti alla ruggine.

Tra i mutageni di tipo chimico, quello più utilizzato è l'etil-metansulfonato (EMS), un agente alchilante. Il tasso di mutazioni aumenta in modo lineare con la dose utilizzata e gli individui diploidi risultano meno tolleranti rispetto ai poliploidi (Chopra, 2005).

I mutanti indotti possono essere impiegati sia per studi funzionali sia per realizzare nuove varietà o linee con caratteristiche agronomiche e qualitative superiori rispetto a quelle attualmente commercializzate. La mutagenesi ha diversi vantaggi rispetto all'incrocio classico e all'utilizzo di tecniche "biotech". Innanzitutto, gli agenti mutageni possono essere applicati a qualunque specie vegetale; le mutazioni sono distribuite random sul genoma della specie target; si possono creare linee con alleli mutati in diverso modo.

1.4.3 Ingegneria genetica

Le tecniche di ingegneria genetica consentono di isolare un gene di interesse e di inserirlo all'interno di un organismo. Quando questo gene proviene dalla stessa specie o da specie sessualmente compatibili, si parla di piante "intra-geniche" e "cis-geniche"; se proviene da una specie diversa o sessualmente incompatibile, si parla di piante "trans-geniche". Nel settore delle biotecnologie vegetali sono stati ottenuti ottimi risultati nella produzione di piante resistenti agli insetti, agli erbicidi e alle malattie batteriche, fungine e virali (le cosiddette piante di prima generazione), accanto a piante di seconda

generazione, migliorate per le caratteristiche qualitative, di cui il *golden rice* è l'esempio più noto.

Prima di procedere con la trasformazione, bisogna conoscere la sequenza genica e la funzione del frammento di DNA che si intende utilizzare. Dopo che il gene viene isolato, il frammento ottenuto, chiamato inserto, viene inserito all'interno di un plasmide (o vettore). Questo permette l'integrazione e l'espressione del gene inserito all'interno della pianta ospite. Il vettore deve contenere anche un promotore (costitutivo o inducibile o tessuto specifico) e un terminatore. Inoltre, per facilitare il processo di riconoscimento delle piante GM, si deve usare un opportuno gene marcatore di selezione, anche esso sotto il controllo di un promotore e di un terminatore.

Il processo che porta alla formazione di una pianta transgenica può essere diviso in tre differenti passaggi:

1. Inserimento del gene di interesse all'interno di una pianta ospite;
2. rigenerazione del tessuto trasformato;
3. selezione degli individui che hanno acquisito il costrutto e successive analisi molecolari.

Durante il primo step si possono usare diversi approcci metodologici. Generalmente, si trasformano gli embrioni o i calli. Mentre le cellule batteriche possono essere trasformate facilmente attraverso tecniche come lo *shock* termico¹ o l'elettroporazione², le cellule vegetali possiedono la parete cellulare, che conferisce loro rigidità e protezione. Nella maggior parte dei casi, la trasformazione delle piante viene fatta con il metodo biolistico (*gene gun*), noto anche come bombardamento. Il plasmide viene fatto precipitare (spesso usando CaCl_2) su piccole particelle di tungsteno, platino o oro. Le particelle contenenti il plasmide vengono poi accelerate e dirette, sotto una

¹ *Shock* termico: tecnica di trasformazione di cellule batteriche rese competenti attraverso l'uso di CaCl_2 . Le cellule vengono poste in un contenitore contenente ghiaccio per circa 30 minuti, poi vengono poste ad una temperatura di circa 42°C per 2 minuti. Questo *shock* termico permette l'entrata del plasmide all'interno delle cellule competenti.

² Elettroporazione: tecnica di trasformazione che consiste nell'immersione di cellule in una soluzione contenente DNA. In seguito all'applicazione di un campo elettrico si avrà l'apertura di piccoli pori nella membrana plasmatica, che permettono l'entrata del plasmide.

pressione di elio, sul tessuto vegetale. Lo svantaggio di questo metodo è che spesso vengono inserite nel genoma ospite più copie del plasmide. Un'altra strategia di trasformazione dei tessuti vegetali prevede l'uso di un batterio, l'*Agrobacterium tumefaciens* (Takavar *et al.* 2010). Questo particolare batterio possiede un plasmide chiamato "Ti" (Fig. 1.19), in cui sono localizzati geni legati alla virulenza, geni del catabolismo delle opine, geni che codificano per le opine e per degli oncogeni. Il plasmide Ti possiede un frammento, chiamato T-DNA, che è in grado di integrarsi all'interno del genoma della pianta ospite (Fig. 1.20). Questo plasmide è stato ingegnerizzato in laboratorio, eliminando i geni che codificano per l'auxina e le citochinine, ormoni che provocano un'incontrollata crescita cellulare e lo sviluppo di tumori. Oggi con tale tecnica è possibile trasformare i cereali, anche se risulta più complicata, se paragonata alla trasformazione delle dicotiledoni.

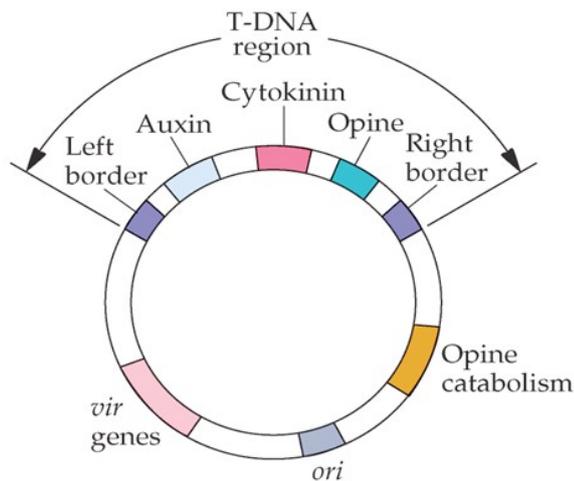


Fig. 1.19 Struttura del plasmide Ti di *Agrobacterium tumefaciens* (<http://slideplayer.com/slide/9362602/>).

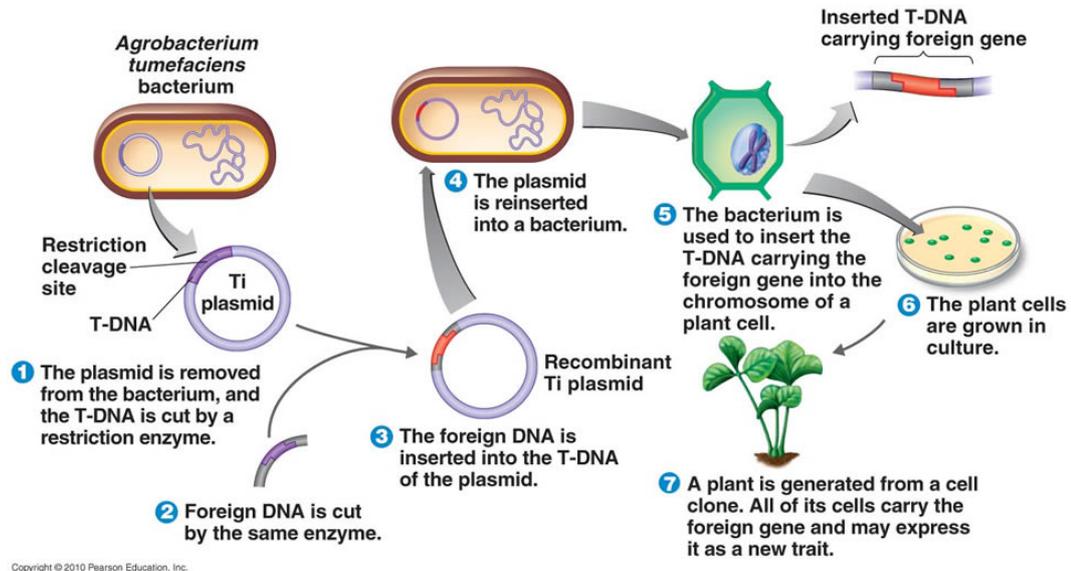


Fig. 1.20 Meccanismo di infezione di *Agrobacterium tumefaciens* (<https://firbank.files.wordpress.com/2014/03/ti-plasmid.jpg>).

Il secondo step è la rigenerazione delle piante trasformate. L'efficienza complessiva della trasformazione dipende dal potenziale di rigenerazione dei tessuti, che sono stati sottoposti al processo di trasformazione. La rigenerazione è uno degli step essenziali per l'ottenimento di piante geneticamente modificate. Dopo la trasformazione, gli embrioni vengono trasferiti all'interno di un terreno di rigenerazione, contenente, di solito, fitormoni ed ormoni sintetici appartenenti alla famiglia delle auxine, in diversa combinazione con citochinine (Gorji *et al.* 2011). Dopo alcune settimane nel terreno di rigenerazione, gli embrioni vengono trasferiti all'interno di un terreno selettivo.

Il terzo passaggio è rappresentato dalla selezione degli individui che hanno acquisito il costrutto e il gene di resistenza, ad un determinato antibiotico o erbicida. Infatti, di solito, il plasmide contiene al suo interno una sequenza che permette di distinguere le piante modificate da quelle che non hanno acquisito il costrutto. Tale distinzione può essere fatta utilizzando dei *marker* di selezione che permettono alla pianta di resistere agli erbicidi, usando ad esempio il gene che codifica la fosfinotricina acetiltransferasi (noto come *bar*), o usando degli antibiotici (un esempio è il gene codificante la neomicina fosfotransferasi o *nptII*) (Danilova, 2007). Dopo la selezione, si possono usare dei geni *reporter* per rilevare l'espressione del gene inserito. Esempi di geni *reporter*

sono il GUS (*uidA*) e la GFP (*green fluorescent protein*) (Prasher, 1992). Infine, l'analisi degli individui che ha subito la trasformazione può essere fatta mediante metodi molecolari: la reazione a catena della polimerasi (PCR) o PCR Real-Time sono alcune delle metodologie che possono essere applicate.

1.4.3.1 Interferenza dell'RNA (RNAi)

La quantità di proteine prodotte da una cellula dipende dalla stabilità e dalla quantità dell'RNA messaggero (mRNA). Una classe di RNA che interagisce con l'mRNA determina la degradazione di questo o l'inibizione della traduzione, attraverso un processo noto come "interferenza dell'RNA" (*RNA-interference* o RNAi) (Baulcombe, 2004). Grazie all'RNAi si può studiare la funzione di un gene semplicemente silenziandolo e osservando il fenotipo che ne deriva. L'RNAi permette di svolgere studi sulla perdita della funzione genica mediante un processo noto come silenziamento genico post-trascrizionale, senza eliminare fisicamente un gene (Hamilton *et al.* 2002).

Le componenti principali che servono per effettuare il silenziamento con il metodo dell'RNAi sono la sequenza di una porzione del gene di interesse, la sintesi di una corrispondente molecola di RNA e un metodo per introdurlo all'interno dell'organismo. Le prime indicazioni riguardo al silenziamento genico con RNAi vennero da Richard Jorgensen nel 1990. Il suo obiettivo era quello di produrre delle petunie più scure, attraverso l'inserimento del gene della calcione sintasi, che codifica per un enzima che porta alla formazione del pigmento viola. Nonostante fossero presenti due copie del gene della calcione sintasi, quella endogena e quella esogena, in alcune piante si aveva la produzione di fiori bianchi, privi di ogni pigmento. L'inserimento del transgene aveva provocato non solo il suo silenziamento ma anche il silenziamento del gene endogeno (tale processo è oggi noto come co-soppressione). Successivamente Guo e Kempthues (1995), usarono un RNA antisenso complementare all'mRNA. In questo caso l'RNA antisenso legava l'mRNA e ne inibiva la traduzione. Con la tecnologia dell'RNA antisenso viene inserita una sequenza complementare e invertita rispetto alla sequenza target. L'RNA prodotto dal gene antisenso andrà ad

ibridare l'RNA messaggero del gene bersaglio, formando un ibrido RNA-RNA che verrà degradato attraverso meccanismi endogeni.

Questa tecnica venne poi impiegata nella prima pianta GM commercializzata, il pomodoro FLAVR SAVR™ (Kramer e Redenbaugh, 1994). In questo pomodoro, prodotto dalla Calgene, è stato silenziato il gene che codifica per la poligalatturonasi (PG) (Brady *et al.* 1985). Poiché la PG idrolizza la pectina, la sua inibizione causa una riduzione dell'ammorbidimento; ciò, in teoria, permette al pomodoro di essere raccolto già maturo senza idealmente arrivare alla marcescenza nel periodo di post-raccolta.

Fire *et al.* (1998) scoprirono che l'RNA senso e antisense formano un RNA a doppio filamento (dsRNA), che è in grado di attivare il processo di silenziamento. Il complesso proteico che porta al silenziamento genico è chiamato RISC (*RNA-induced silencing complex*): quando si aggiunge un dsRNA omologo ad un mRNA si ha l'attività nucleasica di questo complesso. Il complesso RISC contiene un RNA antisense che dirige la nucleasi sull'mRNA. In particolare, il processo di silenziamento viene attivato da un RNA senso e antisense che sono in grado di formare un dsRNA (*double-stranded*). La pianta ospite è in grado di rilevare il dsRNA come alieno e di tagliarlo grazie alla presenza dell'enzima Dicer (Bernstein *et al.* 2001). Si formano così due distinte classi di *small interfering RNA* (siRNA): lunghe e corte. Hamilton *et al.* (2002) furono i primi a proporre la funzione delle due diverse classi di siRNA: i frammenti costituiti da circa 21 nucleotidi sono coinvolti in vie di segnalazione post-trascrizionali che prevedono la degradazione dell'mRNA, i frammenti costituiti da circa 24 nucleotidi sono coinvolti nel meccanismo di silenziamento, attraverso processi di metilazione che coinvolgono il DNA. Quando avviene il taglio del dsRNA si ha l'intervento del complesso RISC (*RNA-induced silencing complex*). Il RISC è costituito da una proteina *argonaute* con attività RNAsica e un dominio PAZ. Il complesso proteico è in grado di individuare l'RNA target e tagliarlo, grazie agli siRNA che fungono da guida (Fig. 1.21).

Nel 2004 furono individuate tre vie di silenziamento dell'RNA nelle piante. La prima via venne individuata all'interno delle cellule infettate da virus: il dsRNA viene considerato dalla cellula come un intermedio della replicazione dell'RNA a singolo filamento di un virus; la seconda via prevede il silenziamento degli RNA messaggeri attraverso i miRNA; la terza via è associata alla metilazione del DNA e alla soppressione della trascrizione.

La tecnica RNAi permette di silenziare contemporaneamente diversi geni di una famiglia multigenica o i diversi alleli all'interno di specie poliploidi, avendo una sequenza target che sia comune ai diversi geni considerati. È importante ricordare che l'effetto dell'RNAi decresce con il passare del tempo e che questo non implica la produzione di una proteina esogena nella pianta modificata.

La tecnica dell'RNAi prevede che si creino dei costrutti in modo da avere una sequenza in grado di formare una struttura dsRNA, nota come shRNA (*small hairpin RNA*). Il costrutto consiste in un promotore, una regione senso e una antisenso (complementare alla regione senso) separate da uno spaziatore e un terminatore. Durante l'espressione all'interno della cellula ospite, l'RNA senso e antisenso sono in grado di formare la shRNA (Fig. 1.22) (Smith *et al.* 2000).

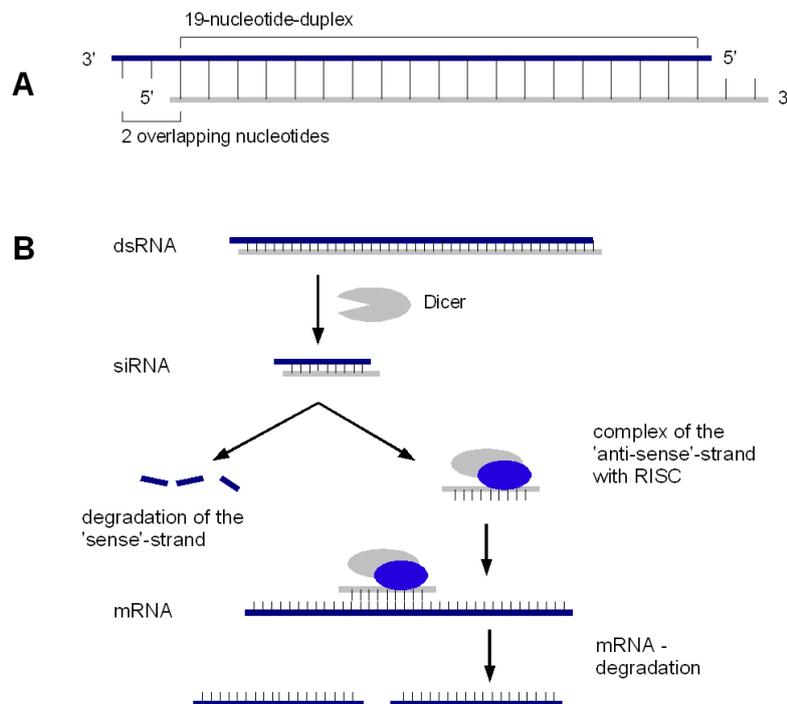


Fig. 1.21 **A.** Struttura degli siRNA. **B.** Meccanismo dell'interferenza dell'RNA (https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3ASiRNA_and_RNAI_english.png).

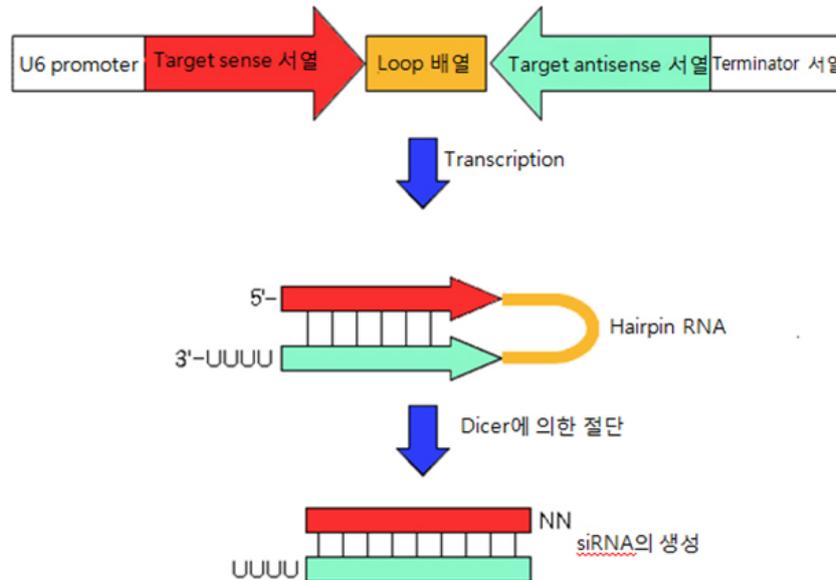


Fig. 1.22 Struttura dell'shRNA (www.takara.co.kr).

1.4.3.2 Nuove frontiere dell'ingegneria genetica

Un altro approccio che può portare al silenziamento genico è dato dalle tecniche di *genome editing*. Questi metodi, che sono in grado di modificare in modo specifico il genoma delle piante, si basano sull'introduzione di rotture del DNA in un locus di interesse, che vengono poi riparate dal sistema endogeno attraverso diversi meccanismi. Le rotture della doppia elica del DNA vengono effettuate da delle nucleasi sito-specifiche, che possono essere suddivise in tre classi: le nucleasi a dita di zinco (ZFN), TALENs e CRISPR/Cas (Fig. 1.23). Le ZFN si legano a una specifica sequenza del DNA e creano un'interruzione a entrambe le estremità. Queste nucleasi artificiali sono però costose e difficili da programmare. Nel 2010 è stata sviluppata una proteina in grado di modificare il genoma: TALEN (attivatore della nucleasi dell'effettore della trascrizione), che utilizza un meccanismo simile alle ZFN ma è più economica e più facile da costruire.

L'approccio di *genome editing* più promettente è quello sviluppato da Jennifer A. Doudna (University of California), Emmanuelle Charpentier (University of Umea) e Feng Zhang (Broad Institute) nel 2014. Il metodo è conosciuto con l'acronimo CRISPR/Cas (brevi ripetizioni palindromiche interspaziate, regolarmente raggruppate). Mentre ZFN e TALEN utilizzano una proteina in grado di riconoscere una sequenza specifica

di DNA, il sistema CRISPR/Cas usa una “guida ad RNA”, molto più facile da programmare rispetto alle proteine TALEN e ZFN, oltre ad essere una tecnologia meno costosa e più efficiente. Questa tecnica consente di eseguire più manipolazioni genetiche nello stesso esperimento, grazie all'utilizzo di differenti RNA guida, che lavora in combinazione con la nucleasi Cas9 (CRISPR/Cas9): l'RNA guida si lega al sito target veicolando la nucleasi Cas9 che taglia entrambi i filamenti del DNA. L'attivazione di sistemi endogeni di riparazione del DNA provocano delle piccole delezioni in corrispondenza del sito in cui è avvenuto il taglio, disattivando il gene bersaglio.

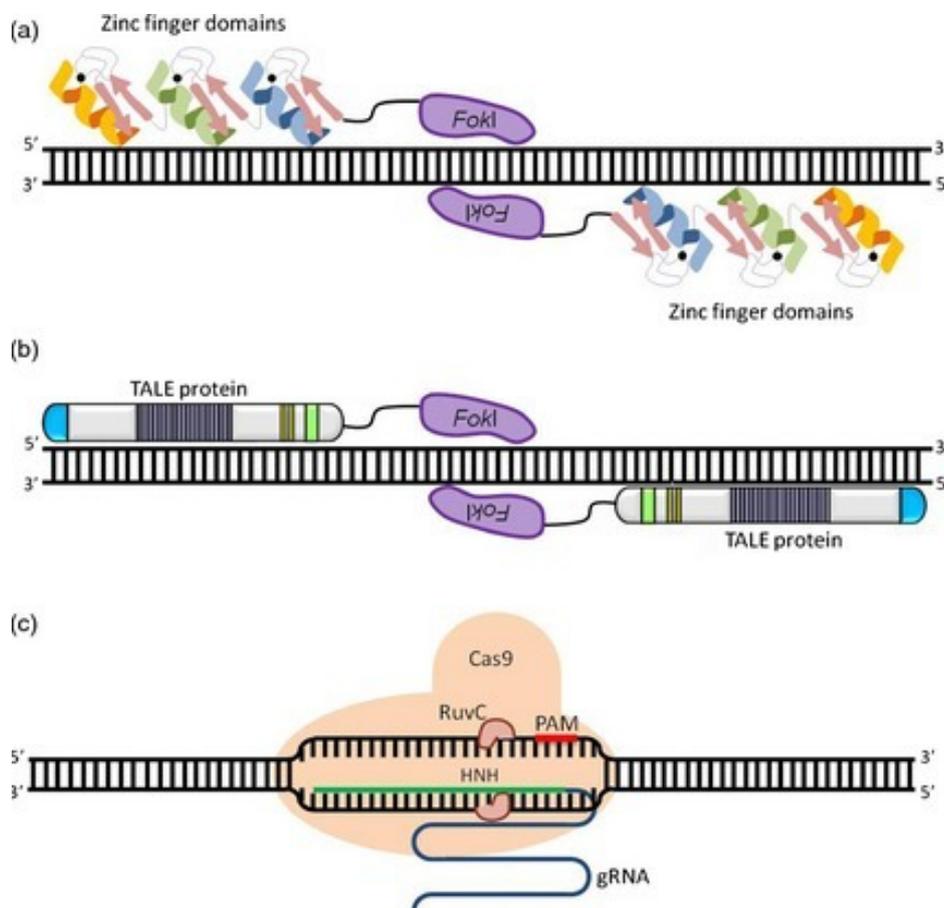


Fig. 1.23 **A.** Struttura ZFN: il dominio a dita di zinco riconosce una sequenza specifica del DNA mentre la nucleasi FokI è in grado di effettuare il taglio della doppia elica **B.** Struttura TALEN: le proteine TALEs riconoscono una sequenza specifica del DNA e la nucleasi FokI effettua il taglio della doppia elica **C.** Struttura CRISPR/Cas9: in blu la guida ad RNA riconosce una sequenza di DNA complementare, la proteina Cas9 effettua il taglio della doppia elica (Mahfouz *et al.* 2012).

I vantaggi nell'utilizzo del *genome editing* sono molteplici: con l'ingegneria genetica i transgeni vengono integrati in modo casuale all'interno del genoma ospite, mentre con il *genome editing* il DNA esogeno può essere integrato in una zona specifica del genoma. Inoltre, la rottura della doppia elica, in assenza di un DNA esogeno (omologo alla sequenza target), può portare alla formazione di mutazioni che influiscono sull'attività genica. In questo modo si possono effettuare degli studi sulla funzione genica o si può intervenire su geni già conosciuti per silenziarli o per regolarne l'espressione.

Le tecniche di *genome editing* possono essere usate per diversi scopi, tra cui la creazione di mutazioni puntiformi o l'inserzione di larghi frammenti di DNA esogeno (in questo caso, a seconda dell'origine di questo frammento di DNA, si può ottenere una pianta cisgenica o transgenica).

Attraverso il *genome editing* si possono creare dei prodotti equivalenti a quelli ottenibili con gli approcci tradizionali (incroci o mutagenesi), ma con un risultato più preciso ed impiegando minor tempo.

1.4.3.3 La legislazione europea sugli OGM

Secondo l'articolo 2 della direttiva 2001/18/CE, un OGM è “...un organismo diverso da un essere umano, il cui materiale genetico è stato modificato in modo diverso da quanto avviene in natura con l'accoppiamento e/o la ricombinazione genetica naturale”. Una definizione più approfondita elenca le tecniche di modificazione genetica:

1. *Tecniche di ricombinazione dell'acido nucleico che comportano alla formazione di nuove combinazioni di materiale genetico mediante inserimento in un virus, un plasmide batterico o qualsiasi altro vettore, di molecole di acido nucleico prodotte con qualsiasi mezzo all'esterno di un organismo, nonché la loro incorporazione in un organismo ospite nel quale non compaiono per natura, ma nel quale possono replicarsi in maniera continua;*
2. *Tecniche che comportano l'introduzione diretta in un organismo di materiale ereditabile preparato al suo esterno, tra cui la microiniezione, la macroiniezione e il microincapsulamento;*
3. *Fusione cellulare (inclusa la fusione di protoplasti) o tecniche di ibridazione per la costruzione di cellule vive, che presentano nuove combinazioni di materiale genico ereditabile, mediante la fusione di due o più cellule, utilizzando metodi non naturali.*

La seconda parte elenca invece le tecniche che non hanno per risultato una modificazione genetica:

1. *La fecondazione in vitro;*
2. *Processi naturali, quali la coniugazione, la trasduzione e la trasformazione;*
3. *Induzione della poliploidia.*

L'articolo 3 presenta delle deroghe secondo cui la direttiva non si applica agli organismi ottenuti con:

1. *La mutagenesi;*
2. *La fusione cellulare (inclusa la fusione di protoplasti) di cellule vegetali di organismi che possono scambiare materiale genetico anche con metodi di riproduzione tradizionali.*

È, di fatto, con questa deroga che, anche se con la mutagenesi si ottiene un organismo che presenta un gene mutato, per legge non è considerato un organismo geneticamente modificato. La definizione “giuridica” sottolinea quindi la modalità tecnica con cui questi organismi sono stati ottenuti, non le loro caratteristiche. Le procedure per richiedere la commercializzazione sono indicate nel regolamento CE 1830/2003 e prevedono una richiesta che deve essere inoltrata all’Autorità competente dello Stato membro. Questo trasmette la domanda all’EFSA. Il parere dell’EFSA viene inoltrato alla Commissione Europea, che ha il compito di approvare o meno la richiesta. L’obbligo di etichettatura è per i prodotti autorizzati all’immissione in commercio che possiedono più dello 0,9% (0,5% per prodotti in via di autorizzazione) di OGM. Tale obbligo non sussiste se la percentuale di OGM è inferiore allo 0,9%, valore che prende in considerazione la presenza di OGM accidentale. In generale, il sistema europeo è stato definito di *regulation and administration*, per la forte presenza del potere pubblico. Questo sistema si contrappone a quello americano, definito come *information and litigation system*. In questo caso l’attenzione del legislatore si basa sul prodotto, non sulla tecnica usata per ottenerlo. Di fatto prodotti identici per proprietà organolettiche, fisiche e chimiche sono regolamentati allo stesso modo (principio di sostanziale equivalenza). In questo modo, la FDA (*Food and Drug Administration*, ente governativo statunitense che si occupa della regolamentazione dei prodotti alimentari e farmaceutici) riconosce come GRAS (*generally recognised as safe*) prodotti biotecnologici simili a prodotti

tradizionalmente commercializzati. Questo approccio “liberale” viene messo in evidenza anche per quanto riguarda l’etichettatura, obbligatoria solo se si dimostra la possibilità che il consumatore finale può essere indotto in errore, o se c’è la possibilità di un rischio per la salute. Infine, per il modello canadese, i *novel foods* devono essere autorizzati in ogni caso, sia che si tratti di organismi ottenuti con le tecniche di ingegneria genetica, sia che si tratti di organismi ottenuti con la mutagenesi. In Italia, a differenza della Spagna, la sperimentazione degli OGM su campo non è permessa. Con la direttiva UE 2015/412 dell’11 marzo 2015, ogni stato può procedere autonomamente nella scelta di coltivare o meno sul proprio territorio OGM approvati in sede europea. Chi, come l’Italia, non desidera coltivarli li può vietare, ma non può più impedire che, nei Paesi favorevoli, questi vengano coltivati. Il fatto che gli OGM, in Italia, non si possano coltivare, non implica che questi non vengano utilizzati. Secondo Pellati Informa (<http://www.pellatiinforma.it>) (agenzia di informazioni di mercato), delle 4 milioni di tonnellate di soia usate dall’industria mangimistica italiana, 3,3 milioni di tonnellate sono OGM, le restanti 650,000 tonnellate sono OGM-*free*. Di queste, solo 550,000 tonnellate sono soia italiana.

2. SCOPO DELL'ELABORATO

Secondo recenti stime, la popolazione mondiale continuerà a crescere, raggiungendo i 9 miliardi entro la metà del secolo corrente. Le nuove sfide dell'umanità saranno, quindi, quelle di produrre una maggiore quantità di cibo in modo sostenibile e, soprattutto, ridurre l'impatto ambientale provocato dalle industrie. L'ottenimento di nuove varietà con un'elevata resa, attraverso il miglioramento genetico, rappresenta una strategia per soddisfare la domanda di cibo dovuta all'aumento della popolazione, ai cambiamenti climatici, alle limitate risorse dei combustibili fossili e all'erosione dei suoli dedicati all'agricoltura. La grandezza di un seme è una componente agronomica correlata alla resa e l'identificazione di geni implicati nella regolazione delle dimensioni dei semi è un aspetto importante per il miglioramento del frumento. Lo scopo di questa Tesi è lo studio dell'effetto della soppressione del gene *GW2* (*Grain Weight 2*), effettuata mediante RNA *interference*, sulle rese della cv di frumento duro Svevo. In particolare, le linee trasformate verranno caratterizzate da un punto di vista fenotipico e molecolare. L'analisi fenotipica riguarderà i caratteri correlati alle rese, come la dimensione dei semi (area, perimetro, lunghezza, larghezza), il peso dei semi e la determinazione dell'amido totale. Da un punto di vista molecolare verrà verificata l'assenza dei trascritti *GW2*. Verrà, inoltre, studiato il profilo di espressione di altri geni con ruoli chiave nella biosintesi dell'amido e nel metabolismo delle citochinine e gibberelline.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Materiale vegetale e condizioni di crescita

All'interno di questo lavoro di Tesi sono state utilizzate 6 linee transgeniche T₃ di frumento duro derivate dalla trasformazione con il costrutto GW2-RNAi della cultivar Svevo (*T. turgidum* ssp. *durum*). Per ogni linea transgenica e per il controllo (cv Svevo) sono state analizzate in totale 10 piante (Tabella. 3.1).

Tutto il materiale vegetale analizzato è stato allevato nelle medesime condizioni. Le piante sono state vernalizzate ad una temperatura di 4°C. Dopo 3 settimane sono state spostate in una camera di crescita a 16/8 ore di fotoperiodo (300 µE m⁻²s⁻¹) a 20-28°C/16-24°C.

Tabella 3.1 Lista delle linee analizzate.

Linee analizzate	Generazione
Svevo	Wild type
IM17-15a	T ₃
IM17-33aII	T ₃
IM17-46	T ₃
IM17-55	T ₃
IM17-59	T ₃
IM17-81	T ₃

3.2 Trasformazione genetica per l'ottenimento di piante GW2-RNAi

Le piante RNAi sono state ottenute attraverso la trasformazione di embrioni immaturi della cultivar Svevo. Per la trasformazione è stato usato il costrutto pRDPT+GW2(RNAi) riportato in figura 3.1. Tale costrutto contiene il promotore e il terminatore endosperma-specifico della subunità gluteninica ad alto peso molecolare Dx5. La regione compresa tra il promotore e il terminatore contiene i frammenti senso e antisenso del gene *GW2*, separati da un introne.

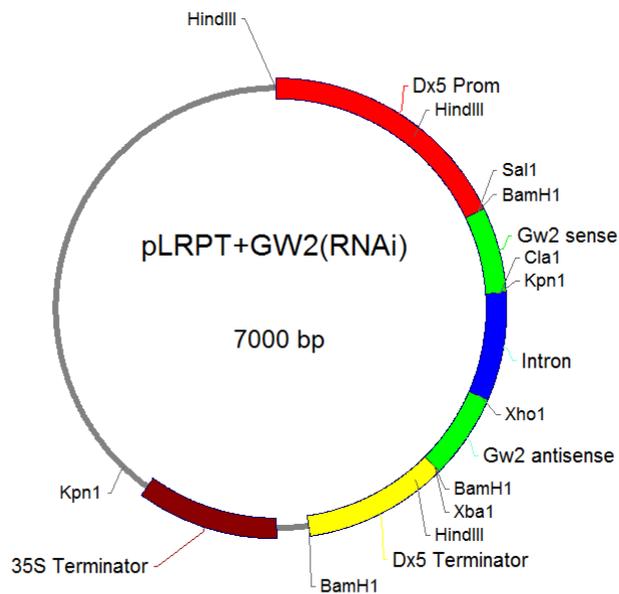


Fig. 3.1 Costrutto utilizzato per la trasformazione delle linee GW2-RNAi.

3.3 Screening delle piante transgeniche

Lo screening delle piante trasformate è stato effettuato usando il kit Phire Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific). Il kit permette di ottenere un amplicone usando una piccola porzione di foglia, senza ricorrere all'estrazione del DNA. Ogni campione di foglia (dal diametro di circa 2 mm) è stato prelevato usando un *puncher* ed è stato inserito all'interno di una provetta sterile da 1,5 ml. Dopo avere aggiunto 20 μ l di buffer di diluizione, ogni campione è stato schiacciato con un puntale sterile fino all'ottenimento di una soluzione di colore verde chiaro. Le provette contenenti i campioni sono state centrifugate a 12.000 rpm per 1 minuto. Questo passaggio consente di separare i residui del frammento di foglia dal surnatante. La reazione di PCR è stata condotta in un volume finale di 20 μ l, costituito da: 0,4 μ l di Phire Hot Start II DNA Polymerase, 10 μ l di 2X Phire Plant PCR Buffer (che include i dNTPs e $MgCl_2$), 0,5 μ l di surnatante (DNA genomico), 0,5 μ M di ciascun primer e H_2O , fino a raggiungere un volume finale pari a 20 μ l. Le condizioni di amplificazione e la sequenza dei primer utilizzati (specifici per il costrutto con cui sono state trasformate le piante) sono riportati nelle tabelle 3.2 e 3.3.

Tabella 3.2 Condizioni di amplificazione usate durante il primo screening. Le fasi di denaturazione, annealing e estensione sono state ripetute per 40 cicli.

Programma di amplificazione	Temperatura	Tempo
Denaturazione iniziale	98°C	5 min
Denaturazione	98°C	5 sec
Annealing	72°C	5 sec
Estensione	72°C	20 sec
Estensione finale	72°C	1 min

Tabella 3.3 Sequenza dei primer usati per amplificare il costrutto pRDPT+GW2(RNAi).

Nome primer	Sequenza
pRDPT Forward	GCAATTCGATGGGGTGCTGCT
pRDPT Reverse	ACCGAATTCCTGCAGCCCGG
Actina Forward	CACTGGAATGGTCAAGGCTG
Actina Reverse	CTCCATGTCATCCCAGTTG

Dopo la reazione di PCR, l'identificazione del frammento amplificato (circa 200 bp) è stata fatta mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1,5%. Le corse elettroforetiche sono state condotte ad un voltaggio massimo di 70V.

I campioni risultati negativi sono stati rianalizzati usando un opportuno protocollo che prevede l'estrazione del DNA.

3.4 Estrazione di DNA da foglia

Il DNA è stato estratto come descritto in D'Ovidio e Porceddu (1996). Il campionamento è stato effettuato prelevando 50-100 mg (circa 1 cm²) di tessuto fogliare, che è stato inserito all'interno di un microtubo sterile e immediatamente posto in azoto liquido. Il campione è stato macinato con un pestello fino ad ottenere una

polvere finissima, a cui sono stati aggiunti 160 μ l di buffer di estrazione (100mM Tris pH 8, 50mM EDTA pH 8, 500mM NaCl) e 32 μ l di SDS 20%. Ogni campione è stato agitato in vortex e poi incubato a 65°C per 10 minuti. Sono stati aggiunti 53,4 μ l di acetato di potassio 5M e, dopo una breve agitazione, i campioni sono stati mantenuti in ghiaccio per 20 minuti. Questo passaggio provoca la precipitazione delle proteine denaturate. Passati i 20 minuti, i campioni sono stati centrifugati a 13.000 rpm per 20 minuti a temperatura ambiente. Al surnatante (circa 250 μ l), dopo essere stato trasferito in provette sterile da 1,5 ml, sono stati aggiunti 200 μ l di isopropanolo freddo, al fine di favorire la precipitazione del DNA. I campioni sono stati centrifugati a 13.000 rpm per 5 minuti e l'isopropanolo è stato rimosso, capovolgendo i tubi su carta assorbente. Il *pellet* è stato lavato con 300 μ l di etanolo al 70% freddo. Il *pellet* è stato, quindi, asciugato in Savant per 15 minuti, risospeso in 20 μ l di H₂O sterile e conservato a 4°C.

3.5 Screening sul DNA estratto da foglia

Il DNA ottenuto con il protocollo descritto nel paragrafo precedente è stato utilizzato come template per le analisi di PCR, usando oligonucleotidi e condizioni di amplificazione descritti nelle tabelle 3.3 e 3.4. La reazione di amplificazione è stata effettuata in un volume finale di 20 μ l, usando 1 μ l di DNA estratto e 19 μ l di mix. Quest'ultima è stata preparata con 0,5 μ M di ciascun primer e 10 μ l di 2X GoTaq® Green Master Mix (Promega). Una coppia di primer che amplifica l'actina è stata utilizzata come controllo per verificare la qualità del DNA genomico estratto. I prodotti di PCR sono stati separati su gel di agarosio, come descritto nel paragrafo 3.3.

Tabella 3.4 Condizioni di amplificazione usate per lo screening effettuato su DNA estratto da foglia. Le fasi di denaturazione, annealing e estensione sono state ripetute per 40 cicli.

Programma di amplificazione	Temperatura	Tempo
Denaturazione iniziale	98°C	2 min
Denaturazione	98°C	1 min
Annealing	60°C	1 min
Estensione	72°C	1 min
Estensione finale	72°C	5 min

3.6 Analisi di espressione (RT-PCR)

L'RNA totale è stato estratto dalle cariossidi immature, 21 giorni post l'antesi (21 DPA). Le spighe campionate sono state inserite all'interno di provette falcon, congelate immediatamente in azoto liquido e conservate a -80°C ; fino al momento di condurre le analisi. Le cariossidi prelevate sono state sfarinate con pestello e mortaio in azoto liquido fino ad ottenere una polvere sottile. L'RNA totale è stato estratto usando il kit Spectrum Plant Total RNA kit (Sigma-Aldrich). L'RNA è stato utilizzato come template per la retrotrascrizione con il QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen). La qualità e quantità del cDNA ottenuto è stata valutata attraverso un'amplificazione con una coppia di primer specifica per l'actina (Tabella 3.5).

L'analisi di espressione quantitativa (Real-Time PCR, qRT-PCR) è stata condotta con lo strumento Bio-Rad CFX 96 Real-Time PCR Detection System, presso il Centro Grandi Attrezzature dell'Università della Tuscia.

In totale, sono state analizzate tre repliche biologiche indipendenti (tre spighe prelevate da tre piante differenti) e per ogni replica biologica sono state effettuate tre repliche tecniche.

Le analisi di qRT-PCR sono state effettuate in un volume totale di $15\ \mu\text{l}$, usando $1\ \mu\text{l}$ di cDNA, $0,5\ \mu\text{M}$ di primer *forward* e *reverse* e 1X di Sso Advanced™ Universal SYBR Green Supermix (BIO-RAD).

Le analisi di espressione sono state condotte su 3 linee transgeniche (IM17-15a, IM17-33aII e IM17-81) e il controllo Svevo. L'espressione relativa (*relative expression*) è stata determinata usando il metodo ΔCt , corretto per l'efficienza dei primer come descritto in Pfaffl (2004). Nello specifico, sono stati usati i valori di espressione relativa riferiti agli alleli *GW2-A* e *GW2-B* (calcolati usando il metodo $2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$ con un Cd pari a 40 cicli) come riferimento per il $\Delta\Delta\text{Ct}$ (Schmittgen e Livak, 2008). Come controllo interno è stato utilizzato il gene dell'actina. Le analisi di espressione sono state condotte usando 3 coppie di primer: una specifica per il gene *GW2*, le altre due per gli omeoalleli (*GW2-A* e *GW2-B*) (TaGW2 4F+4R, TaGW2A QF+QR, TaGW2B QF+QR) (Tabella. 3.5). Usando questo approccio sono stati valutati anche possibili effetti pleiotropici su altri geni candidati, tra cui *CKX1*, *CKX2*, *GA3ox* e *AGPL* (Geng *et al.* 2017) (Tabella 3.5 e 3.6).

Tabella 3.5 Lista dei primer usati nelle analisi di qRT-PCR.

Nome primer	Sequenza
GW2-4F	GCAGAACAATCGCTCCAACA
GW2-4R	GCCAAATCGCTTCCATAACC
GW2A-QF	AAGCATGGGTGCTGCGGAA
GW2A-QR	GTCAGCAAAAAGGCAACGGTA
GW2B-QF	AACGCCACCGTTGCCTGTTA
GW2B-QR	AGAAACAAAACGGCCGAACA
ACTINA F	CACTGGAATGGTCAAGGCTG
ACTINA R	CTCCATGTCATCCCAGTTG
CKX1 F	GTCGTCTACCCGCTCAACAA
CKX1 R	ATCTTCTGGTTCTGCGCCTC
CKX2 F	CCAGAGGAGGAGGAGGTGTTCTAC
CKX2 R	TTGGCCGGACCAAAGTGCTT
GA3ox F	AATGCACCTCAACTGGTACCC
GA3ox R	GAAGAGGTCGCCGACGTTGA
AGPL F	ATTGATGGCAGCCGGGCGT
AGPL R	TCGGTAAGCCGAGGAGAGT

Tabella 3.6 Condizioni di amplificazione usate durante le analisi di qRT-PCR. Le fasi di denaturazione e annealing/estensione sono state ripetute per 40 cicli

Programma di amplificazione	Temperatura	Tempo
Denaturazione iniziale	95°C	3 min
Denaturazione	95°C	10 sec
Annealing/estensione	60°C	30 sec
Curva di melting	+0.5°C	Ogni 5 sec

3.7 Analisi fenotipica delle linee RNAi

Sulle piante in via di sviluppo, non sono stati osservati cambiamenti fenotipici rilevanti tra le piante transgeniche e quelle di controllo Svevo. Le analisi fenotipiche sono state condotte dopo la completa maturazione delle piante. Dato che il costrutto utilizzato è espresso solo nel seme, sono stati considerati i seguenti caratteri:

- numero di spighe per pianta;
- numero di spighe per spiga;
- peso delle spighe (in g);
- area, perimetro, lunghezza e larghezza del seme (in mm);
- peso dei 100 semi (in g);

I parametri riguardanti i semi (area, perimetro, lunghezza e larghezza) sono stati misurati usando il software SmartGrain, come descritto da Tanabata *et al.* (2012) (<http://www.kazusa.or.jp/phenotyping/smartgrain/index.html>). I semi di ogni linea sono stati scansionati con lo scanner Epson Perfection V750 PRO (Epson Italia S.p.A., Milano) usando il software SilverFast v.6.5.0r4e (<http://www.silverfast.com>). Le scansioni sono state effettuate a 600 dpi e le immagini così ottenute sono state salvate in formato TIFF (*tagged image file format*). Ogni immagine è stata convertita da 24-bit a 1-bit (bianco e nero). Il parametro “*input scale value*” è stato mantenuto 0,024mm/pixel.

3.8 Estrazione dell'amido totale

L'amido totale è stato determinato sullo sfarinato ottenuto dopo aver pestellato un singolo seme. Per ogni linea sono state fatte tre repliche biologiche e per ciascun campione biologico, tre repliche tecniche. La determinazione dell'amido totale è stata condotta usando il Total Starch Assay kit (AA/AMG) (Megazyme International), come riportato nel protocollo fornito dal produttore. Il protocollo prevede una degradazione idrolitica dell'amido grazie all'utilizzo di due enzimi (α -amilasi e amiloglucosidasi). Il primo enzima è una endoamilasi, che idrolizza i legami (1,4)- α -D-glucosidici, il secondo è una esoamilasi in grado di idrolizzare i legami (1,4)- α -D-glucosidici, rimuovendo le unità di maltosio dalle estremità non riducenti delle catene. La lettura dell'assorbanza è stata fatta con lo spettrofotometro Lambda 25 UV/VIS

Spectrometer (PerkinElmer) ad una lunghezza d'onda pari a 510 nm, usando il D-glucosio fornito dal kit come controllo.

3.9 Analisi statistica

I dati ottenuti dall'analisi fenotipica sono stati valutati con un approccio statistico. La differenza significativa dei valori considerati è stata misurata a partire dall'analisi di varianza (*one-way* ANOVA), usando il test Tukey HSD (*Honestly Significant Difference*). Valori differentemente significativi sono stati inoltre confermati con i test Scheffè, Bonferroni e Holm, attraverso una comparazione multipla.

Un valore di $p < 0.05$ è stato scelto come criterio di significatività (http://astatsa.com/OneWay_Anova_with_TukeyHSD/).

3.10 Analisi *in silico*

Le sequenze nucleotidiche e amminoacidiche del gene *GW2* (ottenute da studi precedenti, condotti all'interno del laboratorio di Genetica e Biochimica delle proteine vegetali del dipartimento DAFNE dell'Università della Tuscia) sono state utilizzate per le analisi *in silico*. A partire dalle sequenze amminoacidiche del gene *GW2*, sono state effettuate delle ricerche in banca dati NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Tale approccio ha permesso di individuare i geni ortologhi al gene di interesse, all'interno della famiglia delle *Poaceae*. L'analisi filogenetica è stata condotta allineando le sequenze ottenute con BioEdit Sequence Alignment Editor (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). I dati ottenuti dall'allineamento sono stati utilizzati per creare un albero filogenetico usando il programma MEGA7 (<http://www.megasoftware.net/>).

I domini funzionali del gene *GW2* sono stati studiati usando il *tool* bioinformatico ExPASy-Prosite (<http://prosite.expasy.org/>).

Il software “STRING: functional protein association network” (<https://string-db.org/>) è stato usato per studiare, all'interno delle *Poaceae*, i *pathway* in cui è coinvolta la proteina GW2.

La predizione della struttura secondaria della proteina è stata fatta con il programma GOR IV (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html).

Swiss-model (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) è stato utilizzato per creare un modello predittivo tridimensionale della proteina.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Studio *in silico* di *GW2*

Studi antecedenti condotti sulla cultivar di frumento duro Svevo hanno permesso di isolare le sequenze nucleotidiche e amminoacidiche del gene *GW2*, che sono state utilizzate per delle analisi *in silico*. La regione codificante gli omeoalleli *GW2-A* e *GW2-B* ha una dimensione di 1275 bp. I due omeoalleli possiedono un'elevata omologia di sequenza sia a livello nucleotidico (98,35%), sia a livello amminoacidico (96,93%), come risulta chiaramente visibile dalla figura 4.1 e 4.2.

SVGW2A	MGNRIGGRRKAGVEERYTRPQGLYEHRDIDQKKLRKLTLSAKLAPCYPGADDAAGGDLEE	60
SVGW2B	MGNRIGGRRKAGVEERYTRPQGLYEHRDIDQKKLRKLTLSAKLAPCYPGADDAAGGDLEE	60
SVGW2A	CPICFLYPSLNRSKCCSKGICTECFLQMKPHTARPTQCFCKTIPNYAVEYRGVKTKEE	120
SVGW2B	CPICFLYPSLNRSKCCSKGICTECFLQMKPHTARPTQCFCKTIPNYAVEYRGVKTKEE	120
SVGW2A	RSIEQFEEQKVIEAQMRVRQQALQDEEDMKRKRQSRCCSSRTIAPTTEVEYRDICSTSYS	180
SVGW2B	RSIEQFEEQKVIEAQMRVRQQALQDEEDMKRKRQSRCCSSRTIAPTTEVEYRDICSTSYS	180
SVGW2A	VPSYQCTQETECSSSEPCSAQANMRSFHSRHRDDNIDMNIEDMMVMEAIWRSIQEQG	240
SVGW2B	VPSYQCTQETECSSSEPCSAQANMRSFHSRHRDDNIDMNIEDMMVMEAIWRSIQEQG	240
SVGW2A	SIGNPSCGSMFPEQPTIRERQAFVAAPPLEMPHGGFSCAVAAMAEHQPSMDFSYMIGS	300
SVGW2B	SIGNPACGSMFPEQPTICERQAFVAAPPLEIPHPGGFSCAVAAMAEHQPSMDFSYMIGS	300
SVGW2A	SAFPVDFMFRPCNIAGGSMGAAESSPDSWSGIAPSCSRREVVRREEGECSTDHLSEGAEA	360
SVGW2B	SAFPVDFMFRPCNIAGGSMCAVESSPDSWSGIASSCSRREVVRREEGECSTDHWSEGAEA	360
SVGW2A	GTSYAGSDIVVDAGTMLPLPFADNYSMVASHFRPESIEEQMYSMAVSLAEAHGRHTIQG	420
SVGW2B	GTSYAGSDIVVDAGTTPPLPVTDNYSMVASHFRPESIEEQMYSMAVSLAEAHGRHTIQG	420
SVGW2A	LAWL	424
SVGW2B	LAWL	424

Fig. 4.1 Allineamento delle sequenze amminoacidiche di *GW2-A* e *GW2-B* isolate dalla cultivar Svevo. In verde e in celeste sono evidenziati rispettivamente il motivo NES e il dominio RING.

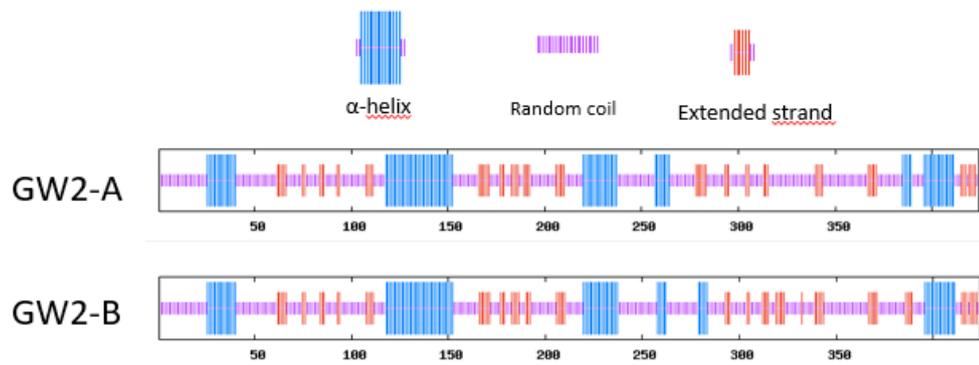


Fig. 4.2 Predizione in GOR IV (Garnier *et al.* 1996) della struttura secondaria di GW2 prodotta dai due omeoalleli GW2-A (in alto) e GW2-B (in basso). L'immagine mette in evidenza l'elevata similarità di sequenza nella struttura proteica secondaria tra GW2-A e GW2-B, soprattutto nella regione N-terminale.

La proteina GW2 è costituita da 424 residui amminoacidici e ha un peso molecolare di circa 47 kDa. Usando il *tool* bioinformatico ExPASy-Prosite, sono stati individuati due domini funzionali, entrambi localizzati nella regione N-terminale della proteina GW2: il dominio RING, costituito da 43 amminoacidi, di cui 9 (8 cisteine ed una istidina) sono fondamentali per la formazione del motivo a dita di zinco (Fig. 4.3 e Fig. 4.4) e un dominio ricco in residui di leucina (LRKLILE), definito come “NES” (*nuclear exportation signal*), responsabile del trasporto della proteina dal nucleo al citosol. Entrambi i domini risultano essere molto conservati sia nei due omeoalleli in frumento duro che nei rispettivi geni ortologhi dei cereali.

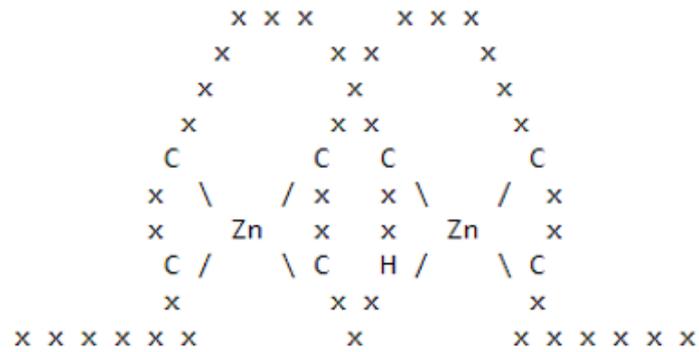


Fig. 4.3 Motivo a dita di zinco del dominio RING. “X” rappresenta un qualsiasi amminoacido del dominio, “C” ed “H” sono rispettivamente le cisteine e l’istidina in grado di formare un legame con lo ione zinco. Il motivo a dita di zinco della proteina GW2 è caratterizzato da un residuo di cisteina in posizione 5 e un residuo di istidina in posizione 6 (C5HC2), anziché da una struttura C4HC3 come descritto in riso da Song *et al.* (2007).



Fig. 4.4 Predizione 3D della proteina GW2 ottenuta con “Swiss-model”.

A partire dalle sequenze amminoacidiche del gene *GW2*, sono state effettuate delle ricerche nella banca dati NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), che hanno permesso di individuare i geni ortologhi al gene di interesse. L'analisi filogenetica è stata condotta allineando le sequenze *GW2* di diverse specie appartenenti alla famiglia delle *Poaceae* (*Hordeum vulgare*, *Oryza sativa*, *Zea mays*, *Sorghum bicolor*, *Brachypodium distachyon*, *Setaria italica*). I risultati ottenuti dall'allineamento sono stati utilizzati per creare un albero filogenetico da cui emerge che le sequenze delle due specie appartenenti alle *Triticeae* (frumento e orzo) sono molto vicine tra di loro, mentre le proteine *GW2* di altri cereali come il sorgo e il mais sono filogeneticamente più lontane (Fig. 4.5).

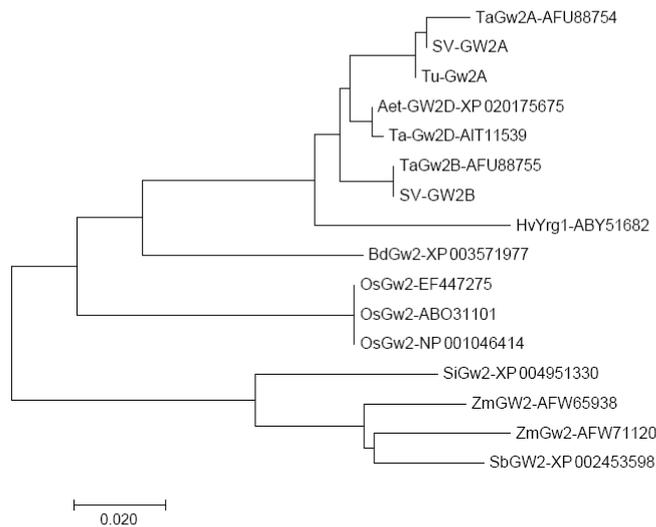


Fig. 4.5 Albero filogenetico basato sulle sequenze delle proteine *GW2* delle principali specie appartenenti alla famiglia delle *Poaceae*.

4.2 Primo screening delle piante transgeniche

In questo studio sono state caratterizzate 6 linee transgeniche di frumento duro, prodotte dal Laboratorio di Genetica e Biochimica delle Proteine Vegetali (DAFNE, Università della Tuscia). Le linee transgeniche considerate sono state prodotte inserendo nel genoma di frumento duro il costrutto GW2-RNAi mediante il metodo biolistico, con l'obiettivo di silenziare il gene *GW2*. In seguito alla trasformazione, sono state ottenute 6 linee transgeniche indipendenti (IM17-15a, IM17-33aII, IM17-46, IM17-55, IM17-59, IM17-81); che sono state avanzate alla generazione T₃. Per individuare le piante transgeniche omozigoti per la presenza del costrutto è stato fatto uno screening preliminare (Fig. 4.6). Tale screening è stato condotto mediante PCR, utilizzando oligonucleotidi specifici per il costrutto come descritto in "Materiali e metodi". Le analisi sono state effettuate con il kit Phire Plant Direct PCR (Thermo Fisher Scientific), che permette di realizzare le amplificazioni senza dover ricorrere all'estrazione del DNA, ma utilizzando come template per la reazione di PCR direttamente un disco fogliare di circa 1-2 mm. Seguendo questa metodologia sono state analizzate 10 piante per ogni linea transgenica.

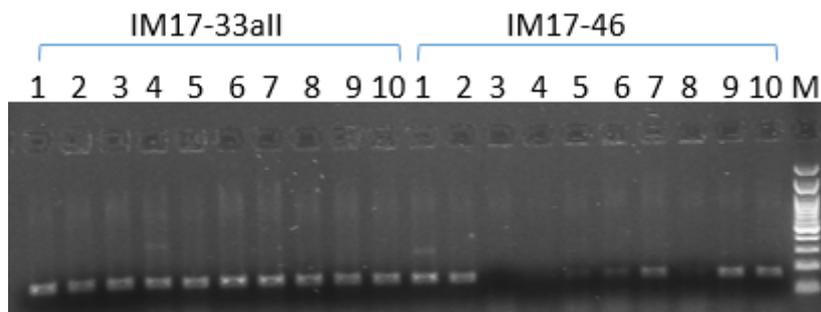


Fig. 4.6 Corsa elettroforetica dei prodotti di PCR delle linee IM17-33aII e IM17-46. Mentre per la linea IM17-33aII è stato ottenuto l'amplicone atteso in tutte e 10 le piante, nella linea IM17-46 il costrutto RNAi non era presente in tutte.

4.3 Secondo screening delle piante transgeniche

Come evidente in Fig. 4.7, non tutti i campioni presentavano un'amplificazione e alcuni di essi mostravano una banda leggera. Il kit utilizzato, non prevedendo l'estrazione del DNA dalla foglia, ha permesso di ridurre i tempi necessari per l'analisi a scapito, tuttavia, dell'efficienza. Per tale ragione le piante in cui non è avvenuta l'amplificazione o che mostravano delle bande meno intense sono state ulteriormente caratterizzate mediante un secondo screening, effettuato con i medesimi oligonucleotidi ma dopo aver fatto l'estrazione del DNA mediante il protocollo descritto in "Materiali e metodi".

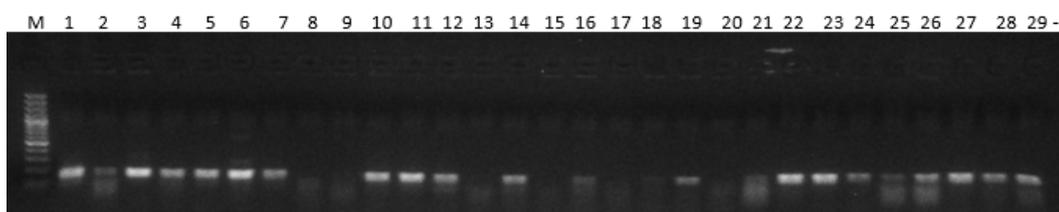


Fig. 4.7 Esempio di corsa elettroforetica di alcuni prodotti di PCR ottenuti nel secondo screening

Complessivamente, l'analisi PCR è stata condotta su un totale di 60 piante, di cui 41 sono risultate positive per lo screening del costrutto e 19 negative (Tabella 4.1). Come atteso, il controllo Svevo non ha prodotto nessun amplificato.

Tabella 4.1 Numero di piante transgeniche risultate positive/negative dopo il primo screening.

Linee RNAi	N° piante positive	N° piante negative
IM17-15a	10/10	0/10
IM17-33aII	10/10	0/10
IM17-46	5/10	5/10
IM17-55	3/10	7/10
IM17-59	3/10	7/10
IM17-81	10/10	0/10

Il secondo screening ha permesso di identificare piante transgeniche che nella prima PCR erano risultate erroneamente negative. Per gli studi descritti nei successivi paragrafi sono state usate le linee IM17-15a, IM17-33aII e IM17-81, che sono risultate omozigoti per la presenza del costrutto GW2-RNAi.

4.4 Analisi di espressione del gene GW2 nelle linee RNAi

Le linee IM17-15a, IM17-33aII, IM17-81 e il controllo Svevo (Tabella 4.2), sono state utilizzate per gli studi riguardanti i livelli di espressione del gene *GW2*. Prima di procedere con l'analisi qRT-PCR, è stata effettuata una retrotrascrizione usando l'RNA estratto da cariossidi immature a 21 DPA (Fig. 4.8).

Tabella 4.2 Linee usate per l'estrazione dell'RNA e successiva retrotrascrizione.

Replica I	Replica II	Replica III
1: Svevo 1 ^a replica	5: Svevo 2 ^a replica	9: Svevo 3 ^a replica
2: IM17-15a 3T3 1 ^a replica	6: IM17-15a 3T3 2 ^a replica	10: IM17-15a 3T3 3 ^a replica
3: IM17-33aII 1T3 1 ^a replica	7: IM17-33aII 1T3 2 ^a replica	11: IM17-33aII 1T3 3 ^a replica
4: IM17-81 1T3 1 ^a replica	8: IM17-81 1T3 2 ^a replica	12: IM17-81 1T3 3 ^a replica

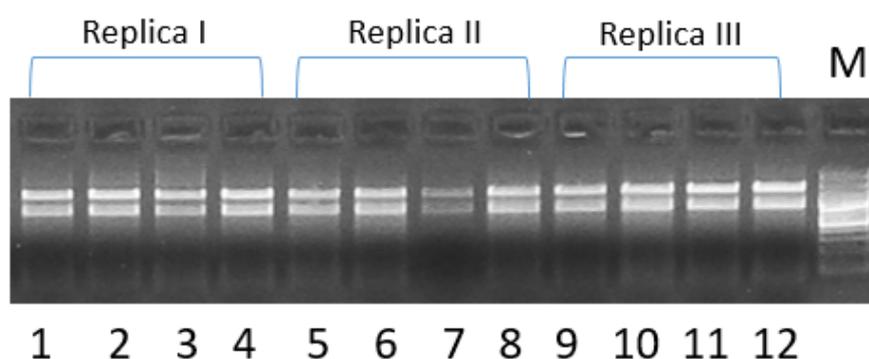


Fig. 4.8 RNA totale estratto dalle cariossidi 21 DPA delle tre linee GW2-RNAi e il controllo Svevo.

Per valutare che la retrotrascrizione fosse avvenuta correttamente, sul cDNA di ogni campione è stata effettuata una PCR con una coppia di primer specifici per l'actina, che produce frammenti attesi di ~200 bp; ciò ha permesso di escludere la presenza di ampliconi aspecifici o di eventuali contaminazioni di DNA genomico (Fig. 4.9).

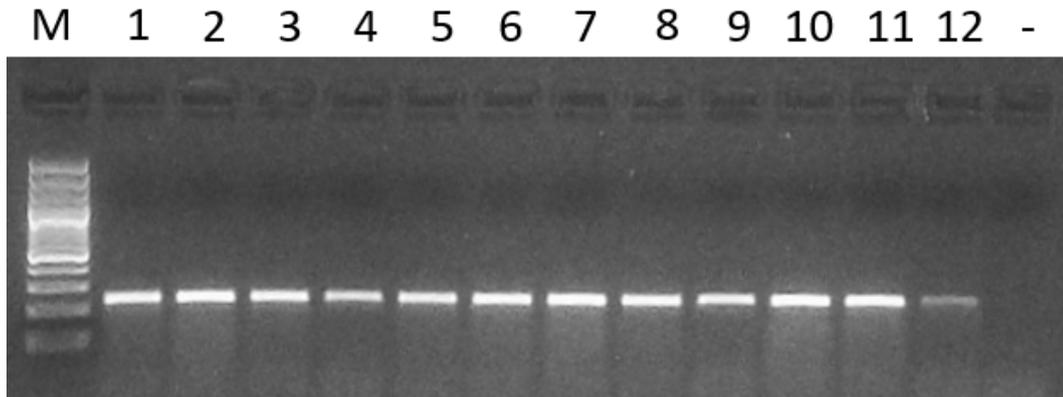


Fig. 4.9 Corsa elettroforetica su gel di agarosio 1,5% dei prodotti PCR del gene dell'actina (secondo l'ordine indicato in Tabella 4.3).

L'analisi di espressione è stata condotta usando tre coppie di primer, una specifica per il gene *GW2* e due specifiche per i due omeoalleli *GW2-A* e *GW2-B*.

Tabella 4.3 Valore di espressione relativa del gene *GW2* e dei suoi due omeoalleli nelle tre linee transgeniche. Per convenzione è stato attribuito al controllo Svevo il valore di 1, corrispondente al 100% di espressione

Linea	<i>GW2</i>	<i>GW2-A</i>	<i>GW2-B</i>
Svevo	1±0,15	1±0,10	1±0,15
IM17-15a	0,24±0,04	0,15±0,07	0,16±0,01
IM17-33aII	0,13±0,02	0,10±0,02	0,09±0,03
IM17-81	0,24±0,07	0,15±0,04	0,14±0,06

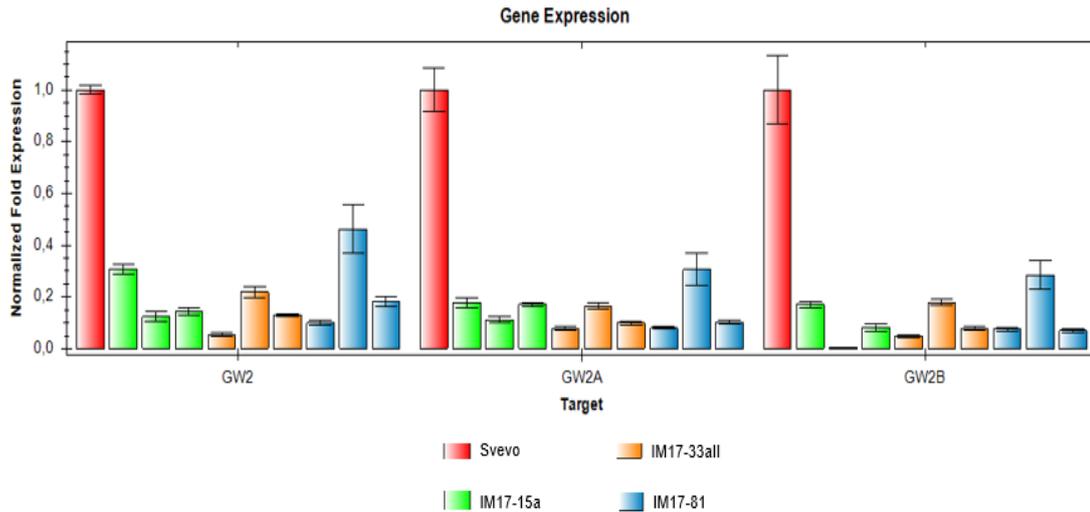


Fig. 4.10 Espressione relativa dei geni *GW2* condotta sulle cariossidi immature (21 DPA) delle linee transgeniche *GW2*-RNAi. Le analisi dei trascritti sono state effettuate su tre repliche biologiche (3 piante indipendenti). Per convenzione al controllo Svevo è stato attribuito il valore di 1, corrispondente al 100% di espressione.

Dal grafico emerge che la presenza del costrutto *GW2*-RNAi ha causato una drastica riduzione dell'espressione dei due omeoalleli *GW2-A* e *GW2-B*, portando alla soppressione dell'espressione del gene *GW2* rispetto al controllo Svevo (Fig. 4.10). Nello specifico l'espressione dei messaggeri è diminuita di un valore compreso tra il 76 e l'87% (Tabella 4.3). L'efficienza del silenziamento è risultata maggiore rispetto a quella ottenuta in frumento tenero da Bednarek *et al.* (2012) (valore medio del 40%) e Hong *et al.* (2014) (59-60%). Nonostante sia presente un'omologia di sequenza del 98% tra i due omeoalleli, l'analisi di espressione ha evidenziato un'efficienza di silenziamento maggiore, anche se leggera, per l'omeoallele *GW2-B*. In particolare, i risultati ottenuti utilizzando le due coppie di primer omeoallele specifiche hanno mostrato una riduzione dell'85-90% dei trascritti dell'allele *GW2-A* e una riduzione dell'84-91% dei trascritti dell'allele *GW2-B*. Questi risultati sono in accordo con quelli ottenuti da Bednarek *et al.* (2012) e Hong *et al.* (2014), i quali osservano una riduzione di tutti e tre gli alleli *GW2* (*GW2-A*, *GW2-B*, *GW2-D*) in frumento tenero, ma con diversi livelli di sotto-regolazione. Nella linea IM17-33aII è stata osservata la maggiore efficienza di silenziamento del gene *GW2* (87%); in questa linea l'espressione degli

omeoalleli *GW2-A* e *GW2-B* è diminuita rispettivamente del 90% e 91%. Le linee IM17-15a e IM17-81 hanno mostrato un'efficienza di silenziamento pressoché identica per il gene *GW2* (76%).

4.5 Analisi di espressione di probabili geni correlati con *GW2*

La proteina *GW2* è stata indicata come una ligasi di tipo E3, un regolatore negativo della trascrizione, coinvolto nel processo di ubiquitinazione (Song *et al.* 2007). Diversi studi hanno messo in evidenza che c'è un'interazione tra alcuni fitormoni responsabili della maturazione dei semi e il sistema di ubiquitinazione UPS (*Ubiquitin-proteasome system*) (Capron *et al.* 2012; Dharmasiri e Estelle, 2004; Santner e Estelle, 2009, 2010); tra questi, ad esempio, le citochinine fanno parte degli ormoni in grado di regolare la divisione cellulare e lo sviluppo dei semi (Yang *et al.* 2002). Le gibberelline sono anch'esse coinvolte nello sviluppo, nella elongazione ed espansione cellulare e nella germinazione dei semi (Pan *et al.* 2013; Stamm *et al.* 2017). Per individuare possibili effetti del silenziamento del gene *GW2* sui trascritti di alcuni geni chiave nel metabolismo delle citochinine e gibberelline e nella sintesi dell'amido, è stata condotta un'analisi di espressione sui seguenti geni: *CKX1*, *CKX2*, *Ga3-ox* e *AGPL* (Fig. 4.11) (Tabella 4.4). I geni *CKX1* e *CKX2* (*cytokinin oxidase/dehydrogenase*) sono responsabili della degradazione delle citochinine, mentre *AGPL* codifica per una delle due subunità dell'enzima ADP-glucosio pirofosforilasi (AGPasi), enzima chiave per la biosintesi dell'amido, in quanto catalizza la trasformazione del glucosio-1-P in ADP-glucosio, che è il substrato per la sintesi dell'amilosio e dell'amilopectina (Huang *et al.* 2014; Song *et al.* 2012). *GA3-ox* (gibberellina 3-ossidasi) è, invece, un gene chiave per la sintesi delle gibberelline.

Tabella 4.4 Valore di espressione relativa dei geni *CKX1*, *CKX2*, *GA3-ox* e *AGPL* delle tre linee transgeniche. Per convenzione viene attribuito al controllo Svevo il valore di 1, corrispondente al 100% di espressione.

Linea	CKX1	CKX2	GA3ox	AGPL
Svevo	1±0,13	1±0,09	1±0,04	1±0,13
IM17-15a	3,23±0,03	0,75±0,04	1,10±0,11	2,33±0,02
IM17-33aII	2,14±0,12	0,50±0,08	0,79±0,08	2,16±0,17
IM17-81	3,04±0,02	0,63±0,12	0,66±0,12	1,68±0,07

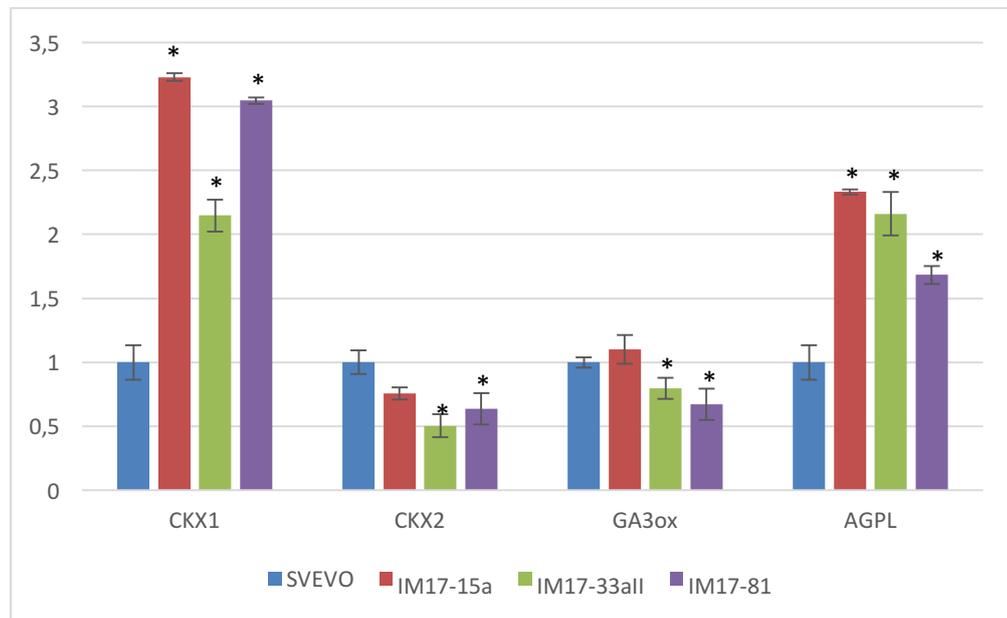


Fig. 4.11 Espressione relativa dei trascritti dei geni *CKX1*, *CKX2*, *Ga3-ox* e *AGPL* nelle cariossidi immature (21 DPA) delle linee transgeniche GW2-RNAi e del rispettivo controllo (cv Svevo). Per convenzione al controllo Svevo è stato attribuito il valore di 1, corrispondente al 100% di espressione. Le barre indicano l'errore standard e l'asterisco le piante transgeniche che differiscono significativamente ($p < 0,05$) dal controllo.

Le analisi hanno evidenziato una sovra-espressione del gene *CKX1* nelle tre linee transgeniche; nello specifico, la sovra-espressione di *CKX1* a 21 DPA variava tra il +114% (IM17-33aII) e il +223% (IM17-15a). Tale risultato è in disaccordo con quanto osservato da Geng *et al.* (2017), i quali trovarono livelli di espressioni più bassi del gene *CKX1* nella linea NIL31 (variante allelica di Lankaodali in cui uno SNP nell'esone 8 del gene *TaGW2-6A* porta alla formazione di una proteina tronca) rispetto al controllo.

Diversamente, *CKX2* è risultato sotto-regolato nelle linee IM17-33aII (-50%) e IM17-81 (-63%). Un trend simile era stato osservato da Geng *et al.* (2017) nella linea NIL31. Una regolazione negativa è stata anche riscontrata per il gene *GAB-ox*, i cui trascritti erano meno abbondanti nelle linee IM17-33aII (-79%) e IM17-81 (-66%). L'espressione del gene *GAB-ox* è stata studiata da Li *et al.* (2017) nella linea NIL31 sopra descritta. Gli autori evidenziarono un andamento non uniforme dell'espressione di questo gene, durante lo sviluppo del seme, tra il controllo e la linea NIL31. Infatti, dalle analisi di espressione emerse una drastica riduzione dei trascritti nella linea NIL31 rispetto al controllo (CS) a 9, 15 e 21 DPA; mentre a 12 DPA i trascritti mostravano un andamento inverso (*GAB-ox* 30 volte più espresso nella NIL31). In tutte le linee transgeniche vi è un aumento significativo dell'espressione di *AGPL*, compreso tra +168% (IM17-81) e +233% (IM17-15a). Coerentemente a quanto osservato nelle linee GW2-RNAi, una up-regolazione del gene *AGPL* è stata osservata da Geng *et al.* (2017), suggerendo una maggior produzione di amido.

Li *et al.* (2017) e Geng *et al.* (2017) hanno proposto due modelli, in cui hanno messo in risalto l'interazione tra la proteina GW2 e gli enzimi coinvolti nel metabolismo di fitormoni (Fig. 4.12 e 4.13).

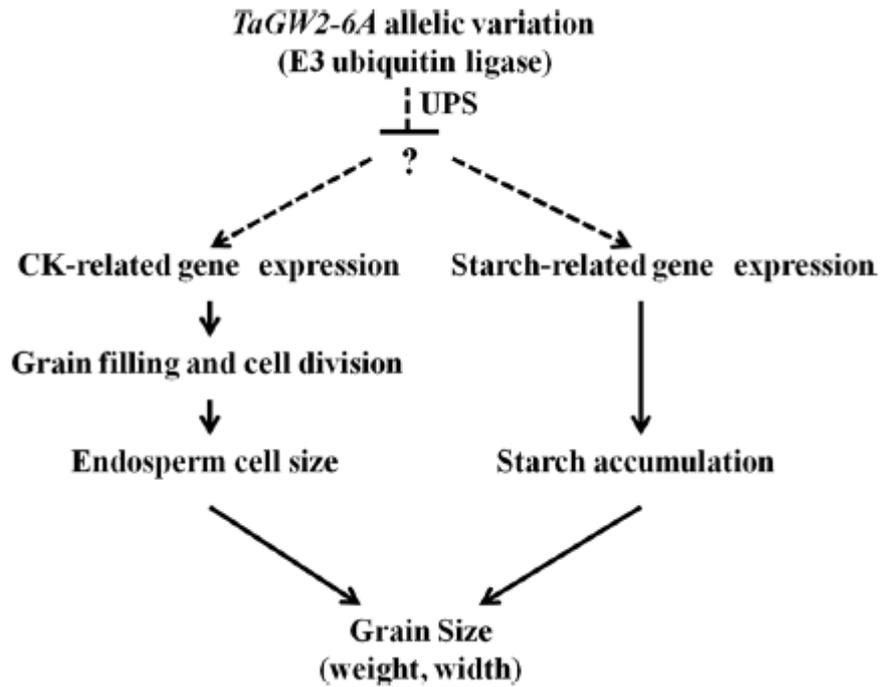


Fig. 4.12 Modello proposto da Geng *et al.* (2017) riguardante il ruolo della proteina GW2 sulla regolazione delle dimensioni e del peso dei semi.

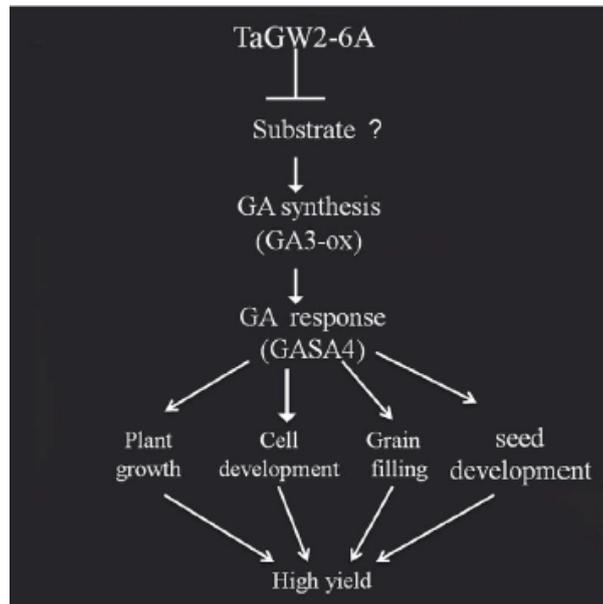


Fig. 4.13 Modello proposto da Li *et al.* (2017). Bassi livelli di espressione di *TaGW2* prevengono la degradazione di un substrato su cui è in grado di agire il sistema UPS. In questo modo si ha una sovraespressione del gene *GA3-ox* e una cascata di reazioni che portano alla maturazione del seme.

Complessivamente, i risultati ottenuti dall'analisi di espressione condotta sui geni che codificano per alcuni fitormoni e su geni chiave nella sintesi dell'amido, indicano una probabile interazione tra la proteina GW2 e tali geni.

Al fine di confermare possibili interazioni tra la proteina GW2 e proteine coinvolte in altri *pathway*, è stato condotto uno studio bioinformatico mediante l'utilizzo del software "STRING: *functional protein association network*", il quale ha messo in evidenza, come suggerito da Geng *et al.* (2017) e Li *et al.* (2017), l'interazione di GW2 con proteine coinvolte nel meccanismo di ubiquitinazione, con dei precursori dei geni *CKX*, con una invertasi (GIF1, coinvolta nella maturazione della cariosside) (Wang *et al.* 2008) e con TGW6 (regolatore negativo della lunghezza dei semi (Ishimaru *et al.* 2013)) (Fig. 4.14). Nel mais, GW2 interagisce con proteine del meccanismo di ubiquitinazione e con *CKX5*. In orzo, *GW2* interagisce con *CKX2*. Dallo studio bioinformatico risulta sempre un'interazione tra *GW2* e i geni *CKX* (Tabella 4.5).

Tabella 4.5 Possibili enzimi/proteine che interagiscono con GW2 in riso e mais identificati mediante il software "STRING".

Organismo	Riferimento	Funzione
<i>Oryza sativa</i>	LOC_Os01g56550.1	Transcription initiation factor IIF beta subunit,
	LOC_Os01g10110.1	Cytokinin dehydrogenase precursor
	LOC_Os12g41220.1	Ubiquitin-conjugating enzyme
	LOC_Os09g12570.1	Ubiquitin-conjugating enzyme
	LOC_Os03g50440.1	Ubiquitin-conjugating enzyme
	LOC_Os04g33740.1	Glycosyl hydrolases
	LOC_Os04g37960.1	Synaptonemal complex protein 2
	LOC_Os06g41850.1	SMP-30/Gluconolacconase
<i>Zea mays</i>	GRMZM2G049091_P01	ATP binding protein
	GRMZM2G071010_P01	Ubiquitin-conjugating enzyme spm2
	GRMZM2G027378_P01	Ubiquitin-conjugating enzyme spm2
	GRMZM2G325612_P01	Cytokinin dehydrogenase 5
	GRMZM2G082191_P01	Non-specific serine/threonine protein kinase

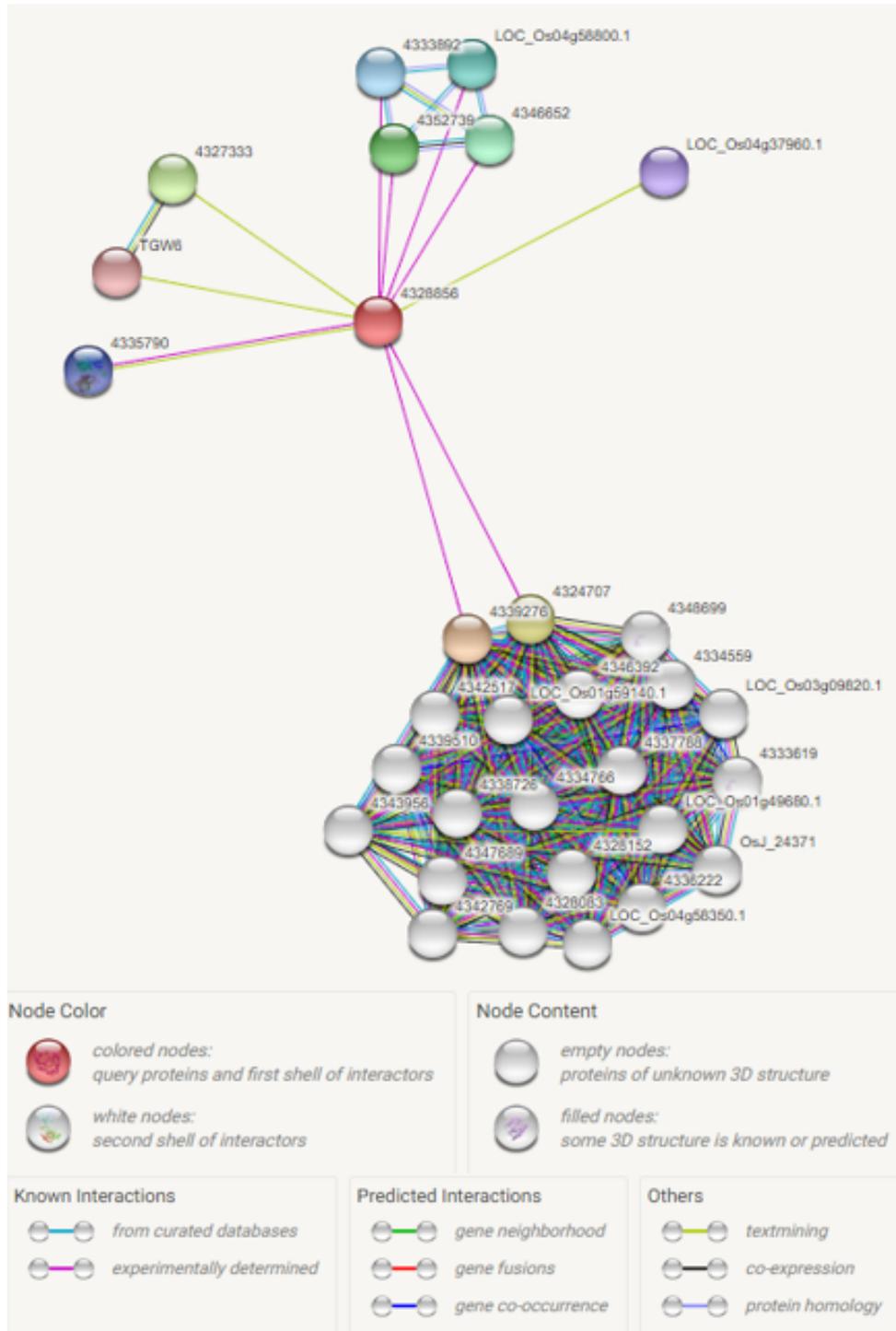


Fig. 4.14 Network delle interazioni della proteina GW2 realizzato con il programma STRING. La proteina GW2 di riso (in rosso) interagisce con diversi fattori di trascrizione e altre proteine che fanno parte del sistema di ubiquitinazione.

4.6 Analisi fenotipica delle linee GW2-RNAi

Come atteso, sulle piante in via di sviluppo non sono stati osservati cambiamenti fenotipici rilevanti tra le linee transgeniche e quelle di controllo Svevo e per tale ragione, le analisi fenotipiche sono state condotte dopo la completa maturazione. Dato che il costrutto utilizzato è espresso solo nel seme, sono stati considerati i seguenti caratteri: numero di spighe per pianta, numero di spighette per spiga, peso delle spighe (in g), area (in mm²), perimetro, lunghezza e larghezza del seme (in mm), peso dei 100 semi (in g) (Tabelle 4.6 e 4.7). È stato eseguito, inoltre, un saggio biochimico per la determinazione dell'amido totale. I risultati sono riportati nelle figure 4.15 e 4.16. La linea IM17-33aII ha mostrato un aumento significativo ($p < 0,05$) del peso dei cento semi, del peso della spiga e del contenuto in amido totale. Per quanto riguarda i caratteri considerati sui semi con l'uso del programma SmartGrain, la stessa linea ha mostrato un aumento significativo dell'area, del perimetro, della lunghezza, della larghezza. Come atteso, avendo usato un costrutto con promotore endosperma-specifico, non sono state riscontrate differenze significative per quanto riguarda il numero di spighe per pianta e il numero di spighette per spiga. In tutte le linee RNAi è stato rilevato un aumento significativo dell'area e della larghezza rispetto al controllo. Il peso della spiga è risultato minore nelle linee IM17-15a e IM17-81 rispetto al controllo. Le linee IM17-15a e IM17-33aII, a differenza della linea IM17-81, hanno mostrato un aumento significativo nel contenuto di amido totale.

Tabella 4.6 Dati relativi all'analisi fenotipica e all'estrazione dell'amido totale. I valori seguiti da lettere diverse sono significativamente differenti rispetto al controllo.

Linee	Peso dei cento semi (g)	Peso spiga (g)	Amido totale (mg/seme)	Spighe per pianta	Spighette per spiga
Svevo	5,42±0,12a	2,58±0,15a	37,85±1,51a	5,72±0,38	12,53±0,43
IM17-15a	5,5±0,11a	1,90±0,12b	53,18±2,91b	7,44±0,69	11,78±0,32
IM17-33aII	6,38±0,14b	3,09±0,12c	49,57±2,50bc	6,00±0,60	13,44±0,27
IM17-81	5,49±0,12a	1,98±0,11b	41,62±2,13ac	6,70±0,42	11,79±0,26

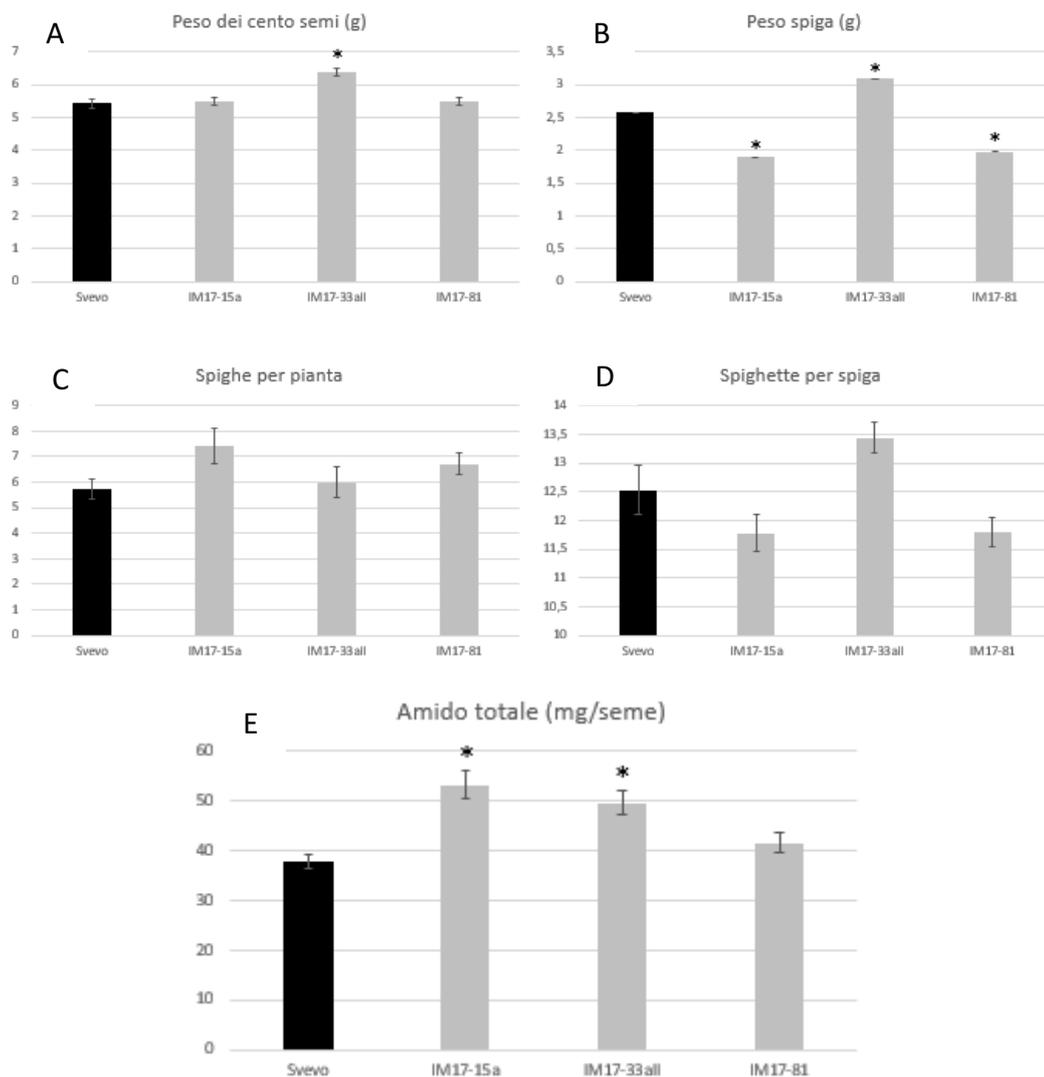


Fig. 4.15 Differenze fenotipiche tra le piante GW2-RNAi e il controllo. Le barre indicano l'errore standard, mentre l'asterisco indica le piante transgeniche che differiscono significativamente dal controllo ($p < 0,05$).

Tabella 4.7 Dati relativi alle dimensioni delle cariossidi ottenuti con il programma SmartGrain. I valori seguiti da lettere diverse sono significativamente differenti rispetto al controllo.

Linee	Area (mm ²)	Perimetro (mm)	Lunghezza (mm)	Larghezza (mm)
Svevo	12,14±0,12a	15,47±0,09a	6,37±0,03a	2,54±0,01a
IM17-15a	13,14±0,14b	15,86±0,09b	6,49±0,04ab	2,66±0,01b
IM17-33aII	13,77±0,10c	16,52±0,07c	6,79±0,03b	2,67±0,01c
IM17-81	12,68±0,13b	15,63±0,09ab	6,37±0,03ab	2,61±0,02d

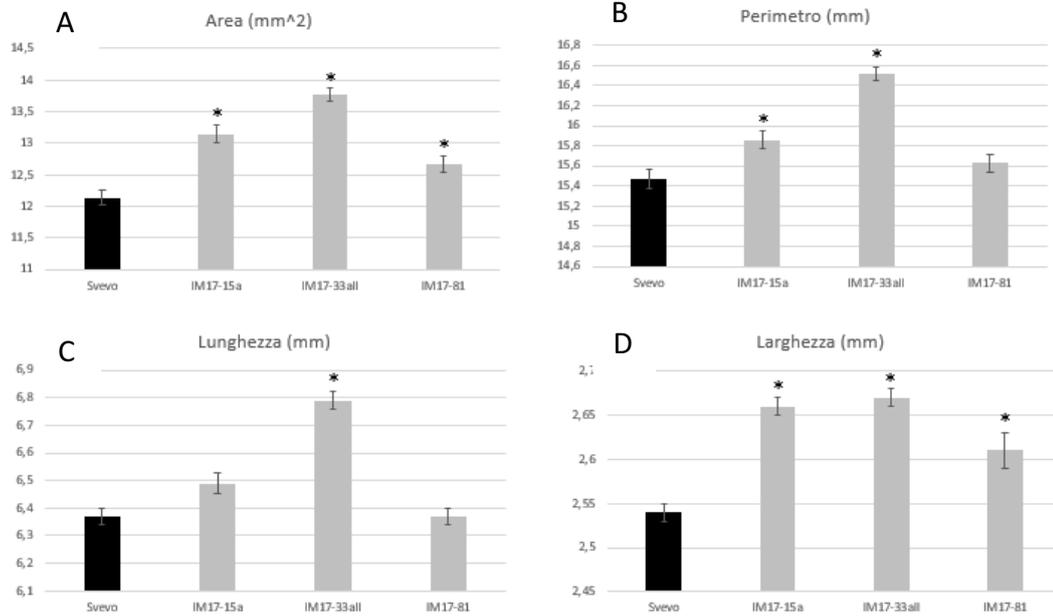


Fig. 4.16 Parametri delle dimensioni del seme misurati con il programma SmartGrain. Le barre indicano l'errore standard e l'asterisco le piante transgeniche che differiscono significativamente ($p < 0,05$) dal controllo.

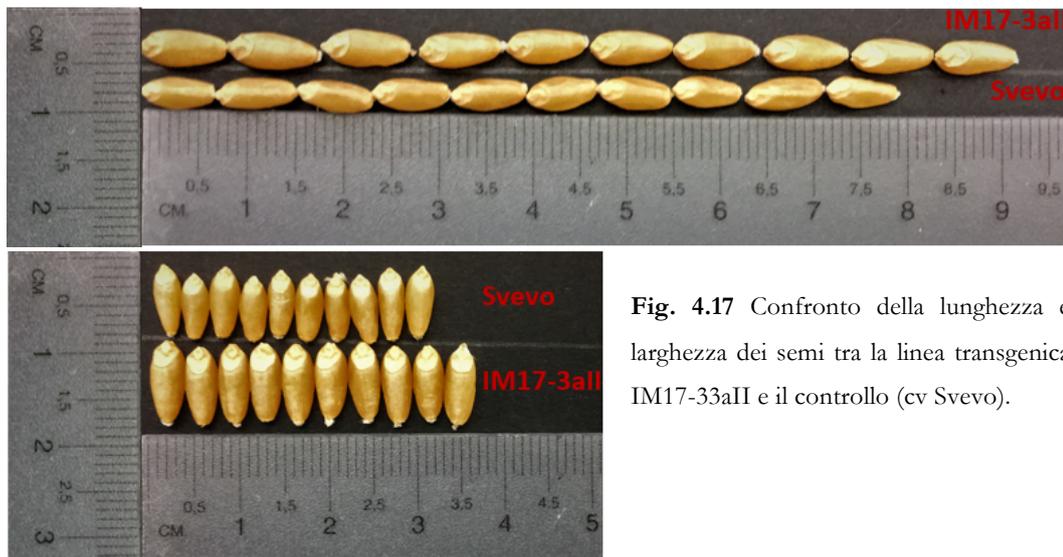


Fig. 4.17 Confronto della lunghezza e larghezza dei semi tra la linea transgenica IM17-33aII e il controllo (cv Svevo).

La sottoregolazione del gene *GW2* nella linea transgenica IM17-33IIa ha portato a dei visibili cambiamenti fenotipici, influenzando le dimensioni del seme in modo positivo (Fig. 4.17). Nelle altre due linee transgeniche considerate, gli effetti fenotipici sono stati meno evidenti, ad eccezione della larghezza aumentata significativamente in tutte le linee. In frumento tenero sono stati condotti diversi studi con l'obiettivo di comprendere la funzione del gene *TaGW2*, ma le conclusioni sono contrastanti. Su *et al.* (2011) e Simmonds *et al.* (2016) associarono il silenziamento dell'omeoallele *GW2-A* (mutanti naturali ed indotti) ad una maggiore dimensione (soprattutto larghezza) del seme, sia in frumento duro sia in frumento tenero. Diversamente Bednarek *et al.* (2012) osservarono una diminuzione delle dimensioni della cariosside in linee transgeniche di frumento tenero in cui il gene *TaGW2* era stato silenziato con la tecnica RNAi. Più recentemente Hong *et al.* (2014) ripeterono l'esperimento di Bednarek e colleghi utilizzando un costrutto RNAi più specifico per il gene *TaGW2* e riscontrarono un'associazione positiva tra la riduzione dell'espressione del gene e il peso e la larghezza delle cariossidi nelle piante transgeniche caratterizzate. I risultati contrastanti ottenuti dai diversi studi permettono di fare delle riflessioni. Gli studi fatti su mutanti naturali ed indotti su frumento tenero e duro si sono focalizzati solo sull'omeoallele *TaGW2A* (escludendo gli altri due, *TaGW2B* e *TaGW2D*), mentre gli studi con RNAi hanno avuto come bersaglio tutti gli omeoalleli. I contrastanti risultati tra i lavori di Bednarek *et al.* (2012) e Hong *et al.* (2014) possono essere dovuti al costrutto utilizzato, al differente livello di silenziamento o alla diversa risposta varietale.

Un'altra spiegazione può essere data dal fatto che nelle specie poliploidi (il frumento tenero è una specie esaploide, con genoma AABBDD), la funzione di alcuni geni può essere influenzata dal contesto genetico in cui si trovano e questo può essere differente tra diverse varietà (Yan *et al.* 2011). I risultati di tutti questi studi suggeriscono che i differenti omeologhi del gene *TaGW2* possono influenzare le rese in modo differente. Infatti, come osservato da Hong *et al.* (2014), l'abbondanza del trascritto dell'omeoallele *TaGW2-A* è negativamente associata alla larghezza dei semi in frumento tenero, mentre i livelli di trascritto di *TaGW2-B* e *TaGW2-D* sembrano avere un effetto opposto.

5. CONCLUSIONI

Lo screening delle linee GW2-RNAi, tramite analisi PCR, ha permesso di individuare 3 linee transgeniche omozigoti per la presenza del costrutto.

L'analisi di espressione delle tre linee positive per il costrutto RNAi ha evidenziato una drastica riduzione dei livelli di trascritto di entrambi gli omeoalleli *GW2* (con un effetto maggiore su quello del genoma B). La linea IM17-33aII ha mostrato la maggiore efficienza di silenziamento del gene *target* (-87% di trascritto).

Complessivamente, i risultati ottenuti dall'analisi di espressione condotta sui geni che codificano per alcuni fitormoni e su geni chiave nella sintesi dell'amido hanno mostrato che il silenziamento del gene *GW2* influenza direttamente l'espressione di alcuni di questi geni (*CKX1*, *CKX2*, *Ga3-Ox* e *AGPL*).

L'amido totale è aumentato significativamente rispetto al controllo nelle linee IM17-15a e IM17-33aII.

Le analisi fenotipiche hanno evidenziato un aumento significativo della larghezza del seme, mentre l'incremento del peso dei cento semi, del perimetro e della lunghezza dei semi è stato significativo solo nella linea IM17-33aII.

I risultati sono ancora preliminari e un approccio su larga scala di trascrittomica o proteomica può fornire nuove informazioni e aiutare a comprendere la funzione della proteina GW2 in frumento duro.

6. BIBLIOGRAFIA

Baulcombe, D. (2004) 'RNA silencing in plants', *Nature*. *Nature*, 16;431(7006):356-63. <http://dx.doi.org/10.1038/nature02874>.

Beckles, D. M. and Thitisaksakul, M. (2010) 'Use of Biotechnology to Engineer Starch in Cereals', *Encyclopedia of Biotechnology in Agriculture and Food*, (February) 1-8. doi: 10.1081/E-EBAF-120051354.

Bednarek, J. *et al.* (2012) 'Down-regulation of the TaGW2 gene by RNA interference results in decreased grain size and weight in wheat', *Journal of Experimental Botany*, 63(16): 5945–5955. <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/ers249>.

Bernstein, E. *et al.* (2001) 'Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference', *Nature*, 409: 363–366. <http://dx.doi.org/10.1038/35053110>.

Brady, C. J. *et al.* (1985) 'Interactions between the amount and molecular forms of pectin, calcium and firmness in tomato fruit', *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 254: 258.

Capron, D. *et al.* (2012) 'Transcriptional profile analysis of E3 ligase and hormone-related genes expressed during wheat grain development', *BMC Plant Biology*, 2012: 12-35. doi: 10.1186/1471-2229-12-35.

Chopra, V. L. (2005) 'Mutagenesis: Investigating the process and processing the outcome for crop improvement', *Current Science*, 89(2): 353-359.

Danilova, S. a. (2007) 'The technologies for genetic transformation of cereals', *Russian Journal of Plant Physiology*, 54(5): 569-581. doi: 10.1134/S1021443707050019.

Dharmasiri, N. and Estelle, M. (2004) 'Auxin signaling and regulated protein

degradation', *Trends in Plant Science*, 9(6): 302-308. doi: 10.1016/j.tplants.2004.04.003.

Disch, S. *et al.* (2006) 'The E3 ubiquitin ligase BIG BROTHER controls Arabidopsis organ size in a dosage-dependent manner', *Current Biology*, 16(3): 272-279. doi: 10.1016/j.cub.2005.12.026.

Dubcovsky, J. and Dvorak, J. (2007) 'Genome Plasticity a Key Factor in the Success of Polyploid Wheat Under Domestication', *Science*, 316(5833): 1862-1866. doi: 10.1126/science.1143986.

Fan, C. *et al.* (2006) 'GS3, a major QTL for grain length and weight and minor QTL for grain width and thickness in rice, encodes a putative transmembrane protein', *Theoretical and Applied Genetics*, 112(6): 1164-1171. doi: 10.1007/s00122-006-0218-1.

Fire, A. *et al.* (1998) 'Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*', *Nature*, 391(6669): 806-811. doi: 10.1038/35888.

Garnier, J., Gibrat, J. F. and Robson, B. (1996) 'GOR secondary structure prediction method version IV', *Methods Enzymol*, 266: 540-553. doi: 10.1002/146518.

Geng, J. *et al.* (2017) 'TaGW2-6A allelic variation contributes to grain size possibly by regulating the expression of cytokinins and starch-related genes in wheat', *Planta*, Volume 246: 1153-1163. <https://doi.org/10.1007/s0042>.

Springer Berlin Heidelberg, 246(6), pp. 1153–1163. doi: 10.1007/s00425-017-2759-8.

Gil-Humanes, J. *et al.* (2011) 'Suppression of gliadins results in altered protein body morphology in wheat', *Journal of Experimental Botany*, 62(12): 4203-4213. doi: 10.1093/jxb/err119.

Gorji, A. H. *et al.* (2011) 'In vitro plant generation of tropical maize genotypes', *Biotechnology*, 16: 52-59.

- Guo, S. and Kempthues, K. J. (1995) 'par- 1, a Gene Required for Establishing Polarity in *C. elegans* Embryos , Encodes a Putative Ser / Thr Kinase That Is Asymmetrically Distributed', *Cell*, 81(4): 611-620. doi: 10.1016/0092-8674(95)90082-9.
- Hamilton, A. *et al.* (2002) 'Two classes of short interfering RNA in RNA silencing', *The EMBO journal*, 21(17): 4671-4679. doi: 10.1093/emboj/cdf464.
- Hong, Y. *et al.* (2014) 'Transcript suppression of TaGW2 increased grain width and weight in bread wheat', *Functional and Integrative Genomics*, 14(2): 341-349. doi: 10.1007/s10142-014-0380-5.
- Huang, B., Hennen-Bierwagen, T. A. and Myers, A. M. (2014) 'Functions of Multiple Genes Encoding ADP-Glucose Pyrophosphorylase Subunits in Maize Endosperm, Embryo, and Leaf', *PLANT PHYSIOLOGY*, 164(2): 596-611. doi: 10.1104/pp.113.231605.
- Huang, R. *et al.* (2012) 'Genetic bases of rice grain shape: So many genes, so little known', *Trends in Plant Science*. Elsevier Ltd, 18(4): 218-226. doi: 10.1016/j.tplants.2012.11.001.
- Ishimaru, K. *et al.* (2013) 'Loss of function of the IAA-glucose hydrolase gene TGW6 enhances rice grain weight and increases yield', *Nature Genetics*. 45: 707-711. <http://dx.doi.org/10.1038/ng.2612>.
- Jain, S. M. (2010) 'Mutagenesis in crop improvement under the climate change', *Romanian Biotechnological Letters*, 15: 88-106.
- Jaiswal, V. *et al.* (2015) 'Identification of novel SNP in promoter sequence of TaGW2-6A associated with grain weight and other agronomic traits in wheat (*Triticum aestivum* L.)', *PLoS ONE*, 10(6): 1-15. doi: 10.1371/journal.pone.0129400.
- Kramer, M. G. and Redenbaugh, K. (1994) 'Commercialization of a tomato with an

antisense polygalacturonase gene: 'The FLAVR SAVR tomato story', *Euphytica*, 79(3): 293-297. doi: 10.1007/BF00022530.

Li, N. and Li, Y. (2014) 'Ubiquitin-mediated control of seed size in plants', *Frontiers in Plant Science*. 5: 1-6. doi: 10.3389/fpls.2014.00332.

Li, Q. *et al.* (2010) 'Relationship, evolutionary fate and function of two maize co-orthologs of rice GW2 associated with kernel size and weight.', *BMC plant biology*, 2010: 10-143. doi: 10.1186/1471-2229-10-143.

Li, Q. *et al.* (2017) 'Influence of TaGW2-6A on seed development in wheat by negatively regulating gibberellin synthesis', *Plant Science*. Elsevier, 263: 226-235. doi: 10.1016/j.plantsci.2017.07.019.

Li, Y. *et al.* (2008) 'Control of final seed and organ size by the *DA1* gene family in *Arabidopsis thaliana*', *Genes & Development*, 22: 1331-1336. doi: 10.1101/gad.463608.spite.

Mahfouz, M. M. *et al.* (2012) 'Targeted transcriptional repression using a chimeric TALE-SRDX repressor protein', *Plant Molecular Biology*. 78(3): 311-321. doi: 10.1007/s11103-011-9866-x.

Nalam, V. J. *et al.* (2006) 'Map-based analysis of genes affecting the brittle rachis character in tetraploid wheat (*Triticum turgidum* L.)', *Theoretical and Applied Genetics*, 112(2): 373-381. doi: 10.1007/s00122-005-0140-y.

Napoli, C. (1990) 'Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans', *the Plant Cell Online*, 2(4): 279-289. doi: 10.1105/tpc.2.4.279.

Pan, S. *et al.* (2013) 'Roles of plant growth regulators on yield, grain qualities and antioxidant enzyme activities in super hybrid rice (*Oryza sativa* L.)', *Rice*, 2013: 6-9.

doi: 10.1186/1939-8433-6-9.

Pfaffl, M. (2004) 'Quantification strategies in real-time PCR Michael W . Pfaffl', *A-Z of quantitative PCR*, 105: 87-112. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s10551-011-0963-1>.

Prasher, D. C. (1992) 'Prasher-Gene-1992-1.Pdf', *Gene*, 111: 229-233. doi: 10.1016/0378-1119(92)90691-H.

Qin, L. *et al.* (2014) 'Homologous haplotypes, expression, genetic effects and geographic distribution of the wheat yield gene TaGW2', *BMC Plant Biology*, 2014: 14-107. doi: 10.1186/1471-2229-14-107.

Ray, D. K. *et al.* (2013) 'Yield Trends Are Insufficient to Double Global Crop Production by 2050', *PLoS ONE*, 1: 8. doi: 10.1371/journal.pone.0066428.

Rayfuse, R. and Weisfelt, N. (2012) 'The Challenge of Food Security', 327: 812-819. doi: 10.4337/9780857939388.

Sadanandom, A. *et al.* (2012) 'The ubiquitin-proteasome system: Central modifier of plant signalling', *New Phytologist*, 196(1): 13-28. doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04266.x.

Santner, A. and Estelle, M. (2009) 'Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling', *Nature*, 459: 1071-1078. doi: 10.1038/nature08122.

Santner, A. and Estelle, M. (2010) 'The ubiquitin-proteasome system regulates plant hormone signaling', *Plant Journal*, 61(6): 1029-1040. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04112.x.

Schmittgen, T. D. and Livak, K. J. (2008) 'Analyzing real-time PCR data by the comparative C T method', *Nature*, 3(6): 1101-1108. doi: 10.1038/nprot.2008.73.

Sestili, F. *et al.* (2010) 'Increasing the amylose content of durum wheat through

silencing of the SBEIIa genes', *BMC Plant Biology*, 10(1)-144. doi: 10.1186/1471-2229-10-144.

Shewry, P. R. (2009) 'Wheat', *Journal of Experimental Botany*, 60(6): 1537-1553. doi: 10.1093/jxb/erp058.

Shomura, A. *et al.* (2008) 'Deletion in a gene associated with grain size increased yields during rice domestication', *Nature Genetics*. 40: 1023-1028. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/ng.169>.

Simmonds, J. *et al.* (2016) 'A splice acceptor site mutation in TaGW2-A1 increases thousand grain weight in tetraploid and hexaploid wheat through wider and longer grains', *Theoretical and Applied Genetics*. 129(6): 1099-1112. doi: 10.1007/s00122-016-2686-2.

Smalle, J. and Vierstra, R. D. (2004) 'Proteolytic pathway'. *Annualreviews*. 55: 555-590 doi: 10.1146/annurev.arplant.55.031903.141801.

Smith, N. A. *et al.* (2000) 'Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs', *Nature*. 407: 319-320. <http://dx.doi.org/10.1038/35030305>.

Song, J., Jiang, L. and Jameson, P. E. (2012) 'Co-ordinate regulation of cytokinin gene family members during flag leaf and reproductive development in wheat', *BMC Plant Biology*, 2012: 12-78. doi: 10.1186/1471-2229-12-78.

Song, X.-J. *et al.* (2007) 'A QTL for rice grain width and weight encodes a previously unknown RING-type E3 ubiquitin ligase', *Nature Genetics*. 5: 623-630. <http://dx.doi.org/10.1038/ng2014>.

Šramková, Z., Gregová, E. and Šturdík, E. (2009) 'Chemical composition and nutritional quality of wheat grain', *Acta Chimica Slovaca*, 2(1): 115-138.

Stamm, P. *et al.* (2017) 'The Transcription Factor ATHB5 Affects GA-Mediated Plasticity in Hypocotyl Cell Growth during Seed Germination', *Plant Physiology*, 173(1): 907-917. doi: 10.1104/pp.16.01099.

Su, Z. *et al.* (2011) 'Identification and development of a functional marker of TaGW2 associated with grain weight in bread wheat (*Triticum aestivum* L.)', *Theoretical and Applied Genetics*, 122(1): 211-223. doi: 10.1007/s00122-010-1437-z.

Takavar, so *et al.* (2010) "*Agrobacterium* Mediated Transformation of Maize(*Zea mays* L.), Islamic Republic of Iran". *Journal of Science*. 21: 21-29.

Tanabata, T. *et al.* (2010) 'Development of Automatic Segmentation Software for Efficient Measurement of Area on the Digital Images of Plant Organs', *Horticultural Research (Japan)*, 9(4): 501-506. doi: 10.2503/hrj.9.501.

Tanabata, T. *et al.* (2012) 'SmartGrain: High-Throughput Phenotyping Software for Measuring Seed Shape through Image Analysis', *Plant Physiology*, 160(4): 1871-1880. doi: 10.1104/pp.112.205120.

'The vegetable proteins. By Thomas B. Osborne. Pp. xiii+154. 2nd edition. Monographs on Biochemistry. London: Longmans green and Co. 1924. Pric 9s. net' (1924) *Journal of the Society of Chemical Industry*. John Wiley & Sons, Ltd, 43(17): 413-452. doi: 10.1002/jctb.5000431704.

Tinland, B. (1996) 'The integration of T-DNA into plant genomes', *Trends in Plant Science*, 1(6): 178-184. doi: 10.1016/1360-1385(96)10020-0.

Vierstra, R. D. (1996) 'Proteolysis in plants: mechanisms and functions.', *Plant molecular biology*, 32(1-2): 275-302. doi: 10.1007/BF00039386.

Vierstra, R. D. (2009) 'The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 10: 385-397.

<http://dx.doi.org/10.1038/nrm2688>.

Wan, Y. *et al.* (2008) 'Transcriptome analysis of grain development in hexaploid wheat', *BMC Genomics*, 9(1): 9-121. doi: 10.1186/1471-2164-9-121.

Wang, E. *et al.* (2008) 'Control of rice grain-filling and yield by a gene with a potential signature of domestication', *Nature Genetics*. Nature Publishing Group, 40: 1370-1374. <http://dx.doi.org/10.1038/ng.220>.

Wang, F. *et al.* (2015) 'Natural variation of TaGASR7-A1 affects grain length in common wheat under multiple cultivation conditions', *Molecular Breeding*, 34(3): 937-947. doi: 10.1007/s11032-014-0087-2.

Xia, T. *et al.* (2013) 'The Ubiquitin Receptor DA1 Interacts with the E3 Ubiquitin Ligase DA2 to Regulate Seed and Organ Size in Arabidopsis', *The Plant Cell*, 25(9): 3347-3359. doi: 10.1105/tpc.113.115063.

Yan, W. H. *et al.* (2011) 'A major QTL, Ghd8, plays pleiotropic roles in regulating grain productivity, plant height, and heading date in rice', *Molecular Plant*. 4(2): 319-330. doi: 10.1093/mp/ssq070.

Yang, J. *et al.* (2002) 'Correlation of cytokinin levels in the endosperms and roots with cell number and cell division activity during endosperm development in rice', *Annals of Botany*, 90(3): 369-377. doi: 10.1093/aob/mcf198.

Yang, Z. *et al.* (2012) 'SNP identification and allelic-specific PCR markers development for TaGW2, a gene linked to wheat kernel weight', *Theoretical and Applied Genetics*, 125(5): 1057-1068. doi: 10.1007/s00122-012-1895-6.

Ringraziamenti

Il mio pensiero di gratitudine va al mio Relatore, il Dott. Francesco Sestili, un insegnante prezioso, che con la sua presenza e le sue mille idee ha saputo consigliarmi nel migliore dei modi.

Ringrazio la Dott.ssa Anna Pucci che, con la sua passione e pazienza, mi ha aiutato tantissimo con gli esperimenti.

Un grandissimo grazie va a Francesco, Linda, Silvio, Giulia, Rocco e ai ragazzi del Laboratorio con cui ho condiviso questa esperienza. Siete un gruppo fantastico!

Desidero inoltre ringraziare tutta la mia famiglia, che ha sempre avuto fiducia in me e mi ha incoraggiato a fare del mio meglio.

Un grandissimo grazie va a Chiara, che con molta pazienza e amore mi è sempre stata vicina.

E infine desidero ringraziare tutti i miei amici, quelli di una vita, che per me ci sono sempre stati, e quelli che quest'avventura universitaria mi ha fatto conoscere.

Febbraio 2018