UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale

Biologia Molecolare e Applicata

Caratterizzazione funzionale del gene FUWA in frumento duro

Functional characterization of the FUWA gene in durum wheat

Tesi di Laurea Magistrale di:
Patrizio De Angelis

Relatore
Prof.ssa Anna La Teana

Correlatore
Dr.ssa Raffaella Battaglia

Sessione Febbraio 2023

Anno Accademico 2022/2023

INDICE

1. Introduzione……..…….3
   1.1 Il frumento duro, le origini……...……..……3
   1.2 Rilevanza socioeconomica, rivoluzione verde e sfide del XXI secolo…..……4
   1.3 I regolatori molecolari della resa in frumento duro…..……..……6
   1.4 Caratterizzazione funzionale del gene FUWA in riso……..……..……8
   1.5 Nuove tecnologie di genome editing……..…..……10
   1.6 Stato dell'arte……..…..……15
2. Scopo della tesi…….....17
3. Materiali e metodi…….....18
   3.1 Materiali vegetali……..…18
   3.2 Progettazione di reazioni di PCR per genotipizzazione……..……...…..…18
   3.3 Fenotipizzazione delle piante in serra…….…..…24
   3.4 Raccolta dei semi e fenotipizzazione delle spighe……..…..25
   3.5 Analisi dei caratteri fenotipici della morfologia del seme tramite SmartGrain..…..26
   3.6 Analisi statistica della varianza nella morfologia del seme……..…28
   3.7 Analisi in silico del gene FUWA……..…30
   3.8 Software per gestione e pianificazione di sequenze biologiche primarie…….....33
   3.9 CRISPResso2 e dati provenienti dal MiSeq di Illumina……..…….34
4. Risultati…….39
   4.1 Analisi in silico della struttura del gene FUWA di frumento duro e del suo profilo di espressione…….39
   4.2 Identificazione degli alleli prodotti dal genome editing……..…….51
   4.3 Analisi del gene FUWA-A nelle piante della linea B3890……..….56
   4.4 Caratterizzazione fenotipica delle piante della linea B3890, generazione T1…..…62
5. Discussione ……..74
   5.1 Pro e contro delle nuove tecniche di genome editing……...….77
6. Bibliografia……...79

1. Introduzione

1.1 Il frumento duro, le origini.

Il frumento duro o *Triticum turgidum L. ssp. durum (Desf.)* è una pianta erbacea appartenente alla famiglia delle Poaceae, o anche comunemente conosciute come Graminacee, monocotiledone dunque parte di un raggruppamento di piante angiosperme caratterizzate da un embrione dotato di un solo cotiledone. È un frumento tetraploide (4n=28 cromosomi, genomi AABB) largamente coltivato in tutto il mondo per la produzione di semola, dalla quale vengono prodotti diversi alimenti, tra cui la pasta. La sua storia evolutiva iniziò più di 300.000 anni fa, prima dell'invenzione dell'agricoltura, nella zona montuosa del Karacadag in Turchia sudorientale territorio che si trova all'interno della 'mezza luna fertile' regione che oggi comprende diverse nazioni quali Israele, la Giordania, il Libano, la Siria occidentale, parte della Turchia e si estende, tra il Tigri e l'Eufrate, in Iraq e nell'Ovest dell'Iran dove si pensa che sia nata l'agricoltura.

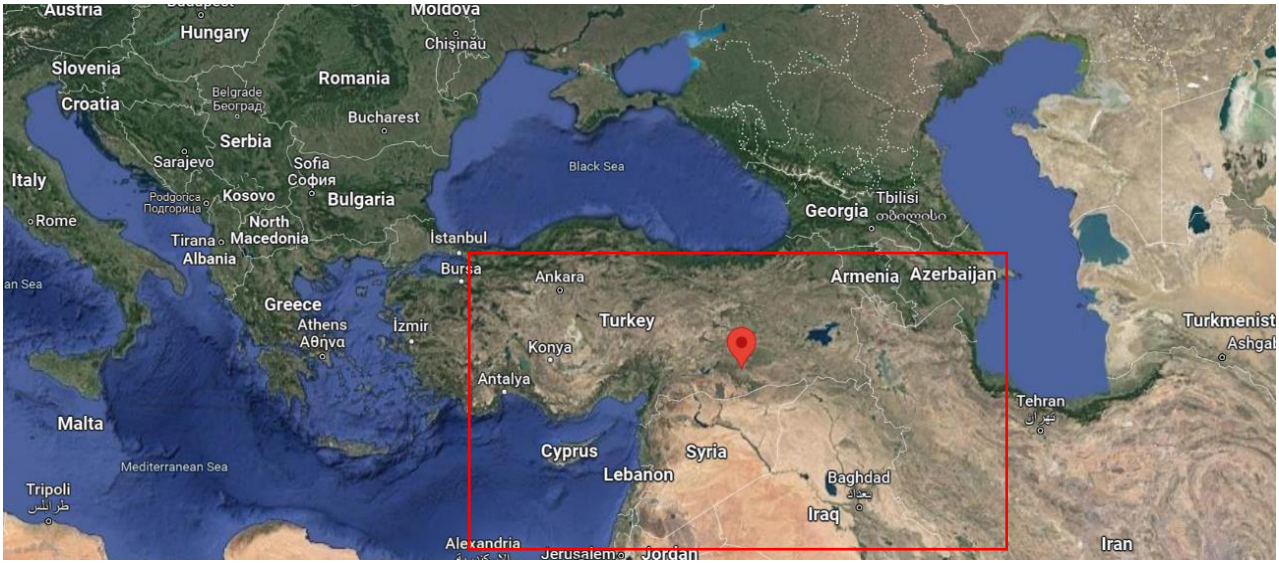


Figura 1 Regione geografica che ha dato origine al frumento duro. Con il puntatore è indicata la zona montuosa del Karacadag

Qui un progenitore selvatico del frumento duro, il Triticum urartu, tramite il processo di allopoliploidizzazione, cioè la fusione del suo intero genoma con quello di una specie del genere Aegilops, molto probabilmente l'Ae.speltoides, è stato ciò che ha portato alla diversificazione durante l'evoluzione delle specie di Triticum, generando il farro selvatico o Triticum dicoccoides in possesso di un genoma tetraploide. Le prove archeologiche indicano che il farro selvatico venne domesticato nella regione della Mezzaluna Fertile 10.000 anni fa. Tramite la graduale domesticazione e selezione vennero privilegiati i caratteri utili all'uomo come, per esempio, la grandezza dei semi, l'appetibilità

dei frutti e quindi i geni legati a questi caratteri, generando il Triticum dicoccum, il farro coltivato, il grano principale dell'agricoltura del neolitico. Mediante una serie di mutazioni genetiche casuali seguite da selezioni il farro coltivato si trasformò in altre specie, tra cui il frumento duro (Matsuoka.,2011).

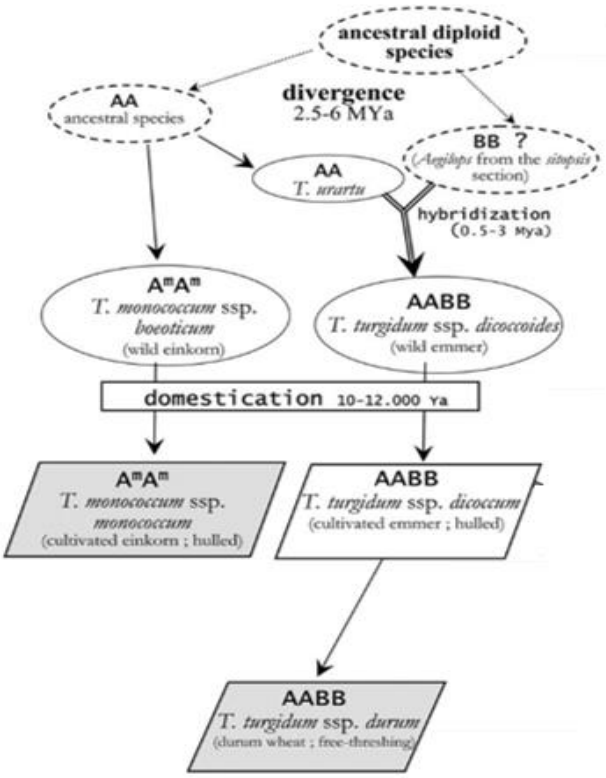


Figura 2 Genealogia del frumento duro con annessa domesticazione.

Figura 3 Nascita del frumento duro a seguito dell'incrocio tra T. urartu ed Ae. speltoides

1.2 Rilevanza socioeconomica, rivoluzione verde e sfide del XXI secolo.

Il frumento svolge un ruolo fondamentale nel nutrire la civiltà umana e nel garantire la sicurezza alimentare globale. Circa il 20% sul totale delle calorie e delle proteine della dieta mondiale sono fornite da questa pianta. Oggi è il cereale più coltivato al mondo con oltre 220 milioni di ettari coltivati ogni anno in un'ampia gamma di condizioni climatiche e in molte regioni geografiche. A seconda delle condizioni agroclimatiche, ogni anno vengono prodotte circa 670 milioni di tonnellate di semola. Il frumento è così diventato una delle colture più importanti per la sicurezza alimentare globale.

Senza quella che oggi viene definita la rivoluzione verde dell'agricoltura, è stato generalmente riconosciuto che ad oggi ci sarebbero stati pesanti deficit alimentari anche in quelli che definiamo

paesi economicamente sviluppati. Negli anni '60 e '70 il fattore che trainò la rivoluzione verde fu lo sviluppo e la diffusione di varietà di frumento e riso a paglia corta e sensibili ai fertilizzanti (Shiferaw et al., 2018).

Uno tra i protagonisti della rivoluzione verde fu l'agronomo Nazareno Strampelli, grazie alla sua brillante intuizione di incrociare piante in possesso dei caratteri che esigevano gli agricoltori, ottenne immensi miglioramenti nella genetica del frumento. Prima del lavoro di Strampelli il frumento era alto circa un metro e mezzo e ciò induceva le piante all'allettamento a seguito dell'azione del vento e delle piogge inducendo gli steli a piegarsi e sovrapporsi con conseguente perdita di raccolto. Strampelli fu il primo a fare ibridazioni per abbassare la statura del frumento attraverso l'incrocio, creando delle nuove varietà denominate "sementi elette", le quali mostrarono rese 3-4 volte superiori rispetto alle piante tradizionali, dai circa 10 quintali per ettaro ai 40 e una varietà superò i 70 quintali, un record che fece il giro del mondo.

Negli ultimi trent'anni la comunità scientifica avvalendosi di modelli matematici sempre più accurati, ha descritto come il clima del Pianeta stia cambiando in modo preoccupante e come le responsabilità di questi cambiamenti sia attribuibile all'attività antropica.

Oggi di fronte a fenomeni climatici sempre più frequenti e devastanti si osserva uno stravolgimento di fattori ambientali tra cui: cambiamenti della temperatura, l'arrivo delle piogge, l'esposizione alla luce, soprattutto nelle regioni temperate dove questi input nella loro alternanza stagionale alterano i normali cicli biologici di piante ed animali, i quali mediante questi input regolano le fasi cruciali della loro vita, dalla riproduzione allo sviluppo.

L'estate del 2022 è stata la più calda della storia in Europa. Il mese di luglio ha fatto registrare 2,26°C in più rispetto alla media italiana dal 1800, anno da cui si registrano i dati.

L'aumentata concentrazione di CO_2 provoca l'innalzamento globale della temperatura che a sua volta rende sempre più frequenti fenomeni di inondazioni, siccità, dissesto idrogeologico, diffusione di malattie, crisi idrica, crisi dei sistemi agricoli e estinzione di specie animali e vegetali. Con la continua crescita della popolazione mondiale, sta diventando sempre più arduo garantire la sicurezza alimentare coltivando le piante con genetiche 'antiche'. Oggi necessitiamo di piante in possesso di genotipi migliorati, più produttive e capaci di mitigare i cambiamenti climatici e ciò è possibile grazie alle tecniche di next generation breeding che, sfruttando le nuove conoscenze sulla struttura e il funzionamento dei genomi vegetali, consentono il trasferimento di geni isolati da specie sessualmente

compatibili o l'introduzione di specifiche mutazioni in predefinite sequenze geniche attraverso tecniche di cisgenesi e di genome editing.

1.3 I regolatori molecolari della resa in frumento duro.

La resa è un carattere molto complesso perché a livello genetico è determinata da un cospicuo numero di loci, i quali interagendo con l'ambiente determinano il fenotipo della pianta. Essendo il frumento un cereale di notevole rilevanza agronomica, la comprensione degli aspetti che determinano un incremento della resa sono il punto cardine al fine di incrementarne la produttività. La resa, intesa come la capacità di produrre granella può essere scomposta in:

- Il numero di piante per unità di superficie coltivata (ha^{-1})
- Il numero di spighe per pianta
- Il numero di spighette per spiga
- Il numero di semi per spighetta
- Il peso di un seme

queste componenti possono essere riassunte con il numero di semi prodotti per superficie coltivata (GN, grain number) e la dimensione del seme (GS, grain size) (Li et al., 2017), la quale è correlata al peso del seme.

L'obiettivo di sviluppare nuove varietà di frumento con resa incrementata e di migliore qualità determina di conoscere quali e quanti geni regolano un carattere, qual è il loro meccanismo d'azione e come la loro espressione comporti la comparsa di un determinato fenotipo. A causa delle difficoltà incontrante nei tentativi di sequenziare il genoma poliploide del frumento, dovute alla sua frequente ridondanza genica ed alla dimensione del suo imponente genoma, gli studi sul frumento sono stati molto rallentati. Oggi grazie alle tecnologie di sequenziamento di seconda generazione NGS in grado di sequenziare moltissimi frammenti di DNA in parallelo, hanno fornito una svolta epocale nel sequenziamento di grandi genomi come quello del frumento, fornendoci così la possibilità di ampliare le nostre conoscenze su questa pianta grazie all'identificazione di geni di interesse attraverso il trasferimento di informazioni da organismi modello come *A. thaliana* e riso.

Ruolo fondamentale nella determinazione della resa dei cereali è dettato dalla dimensione del seme. Sebbene il genoma poliploide del frumento renda difficile l'identificazione di geni coinvolti nel determinare la dimensione del seme, gli scienziati attraverso approcci di genomica traslazionale sono riusciti ad indentificare di più di 40 geni coinvolti nella regolazione della resa (Li et al., 2017).

Nonostante per alcuni di questi geni ancora non siano state chiarite le vie nelle quali operino, la maggior parte di essi può essere ricondotta a tre vie metaboliche principali: la degradazione proteica mediata dal proteasoma, vie di segnalazione ormonale e meccanismi di segnalazione regolati dalle proteine G. Alcuni tra questi geni che controllano la resa codificano per dei regolatori negativi, geni codificanti per proteine che funzionano come 'freni molecolari' impedendo ai semi di accrescersi eccessivamente.

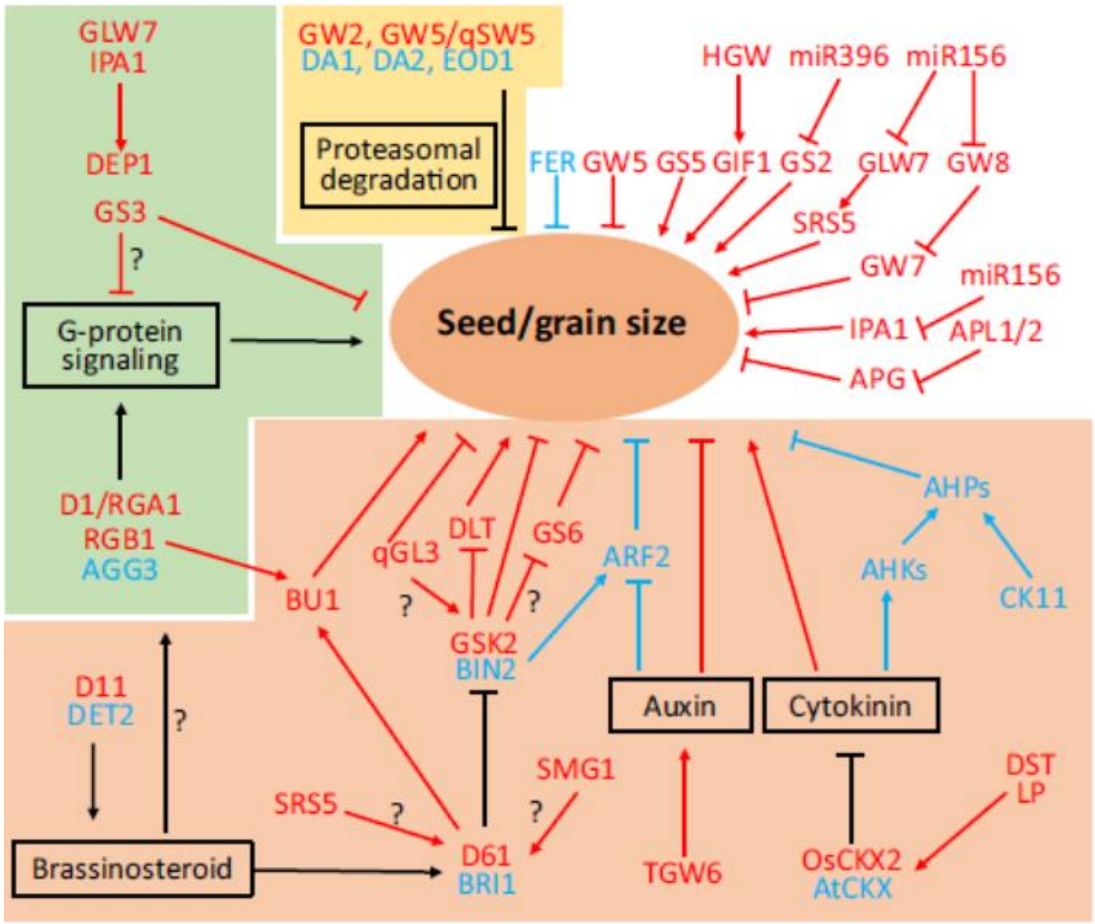


Figura 4 I principali geni coinvolti nella regolazione della dimensione del seme in A. thailana e riso. (Li et al., 2017).

1.4 Caratterizzazione funzionale del gene FUWA in riso

Tra i geni che fungono da regolatori negativi della resa FUWA è un gene di particolare interesse, identificato per la prima volta in riso dal gruppo di Chen et al., (2015). Gli autori per indagare i meccanismi molecolari che regolano la resa in riso, hanno utilizzato la mutagenesi tramite l'etil metansolfonato per generare una popolazione di piante mutanti che mostravano alterazioni importanti di diversi tratti agricoli, tra cui l'architettura della pannocchia e la dimensione del seme. Uno di questi mutanti, *fuwa*, è stato selezionato per aver mostrato alcuni caratteri interessanti, e per rimuovere altre potenziali mutazioni di fondo è stato rincrociato con il wild-type (WT) quattro volte.

Rispetto al WT, le piante mutanti per il gene FUWA mature avevano un'architettura delle spighe più compatta ed eretta, erano leggermente più corte, avevano meno culmi e uno stelo più duro. Il numero di ramificazioni primarie per spiga era paragonabile tra *fuwa* e WT, ma il numero di ramificazioni secondarie per pannocchia erano leggermente ridotti con conseguente riduzione del numero di semi per spiga (Tabella 1). In particolare, i semi *fuwa* erano più larghi, più spessi e più corti rispetto ai semi WT (Tabella 1). Il peso fresco e secco dell'endosperma dei mutanti *fuwa* era significativamente più elevato di quelli del WT dal giorno 9, e ha raggiunto il picco 18 giorni dopo la fecondazione (Figura 5), indicando che *fuwa* aveva un tasso di riempimento del seme più veloce.

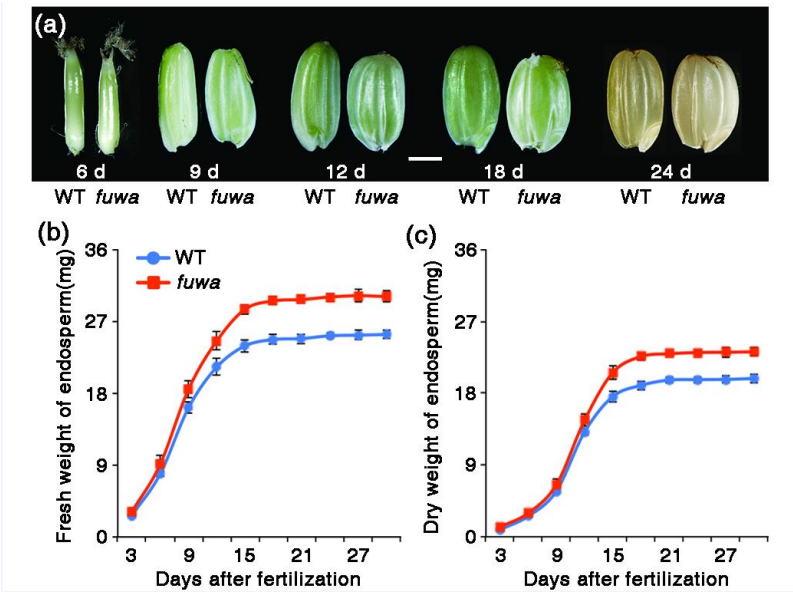


Figura 5 Pesi freschi e secchi dell'endosperma di fuwa. Le piante FUWA mostrano un tasso di riempimento del seme più veloce. (Chen et al.,2015)

Coerentemente con l'aumento della granulometria e del tasso di riempimento del seme, il peso medio di 1000 semi delle piante *fuwa* era superiore del 16,7% rispetto a quello di WT (Tabella 1). Nonostante queste alterazioni la resa per pianta per le piante *fuwa* era paragonabile al WT (Tabella 1). Queste osservazioni suggeriscono che *fuwa* influisce su molteplici caratteri agronomici importanti, in particolare sull'architettura della spiga e sulla granulometria.

Trait	Nipponbare	*fuwa*	*P* value
Plant height (cm)	102.95 ± 4.77	90.03 ± 5.57	3.74×10^{-6}
Tiller number	15.13 ± 2.78	13.77 ± 2.22	3.97×10^{-2}
Panicle length (cm)	20.34 ± 0.50	17.84 ± 0.83	2.89×10^{-20}
Number of primary branches	10.70 ± 0.47	10.87 ± 0.63	0.25
Number of secondary branches	19.23 ± 2.51	16.03 ± 2.85	2.22×10^{-5}
Number of grains per panicle	125.67 ± 8.07	113.80 ± 9.80	3.65×10^{-6}
Grain width (mm)	3.22 ± 0.08	3.72 ± 0.07	1.66×10^{-32}
Grain length (mm)	7.23 ± 0.17	6.80 ± 0.16	1.66×10^{-14}
Grain thickness (mm)	2.18 ± 0.05	2.51 ± 0.07	6.59×10^{-30}
1000-grain weight (g)	22.77 ± 0.15	26.57 ± 0.16	1.50×10^{-6}
Yield per plant (g)	27.14 ± 5.06	26.68 ± 5.08	0.73

All phenotypic data were measured from plants grown in a paddy field with 20 × 30 cm spacing under natural conditions in Beijing, China. Values are means ± SD (n = 30). Student's t test was used to calculate P values.

Tabella 1 Comparazione dei tratti agronomici tra le piante WT e le piante FUWA. (Chen et al., 2015)

Per esaminare le differenze di *fuwa* in modo più dettagliato, gli autori utilizzando le glumelle delle spighette per l'osservazione citologica attraverso il microscopio elettronico a scansione hanno mostrato che le piante *fuwa* avevano più cellule epidermiche nella superficie della glumella della spighetta rispetto al WT. Inoltre, tramite osservazioni di sezioni trasversali della parte centrale della glumella della spighetta hanno mostrato che lo strato esterno di cellule parenchimali nei mutanti *fuwa* era più lungo e conteneva più cellule rispetto a WT, ma c'era solo una diminuzione della lunghezza delle cellule. Con sezioni trasversali del primo internodo hanno dimostrato che i mutanti *fuwa* avevano molti più strati di cellule parenchimali, più cellule sclerenchimatiche e cellule dei fasci vascolari più grandi rispetto al WT, che possono contribuire all'aumento della resistenza meccanica dei culmi. Pertanto, indicano che *fuwa* può limitare la progressione del ciclo cellulare per modulare lo sviluppo delle spighette e del culmo. Per confermare ulteriormente il ruolo di *fuwa* nella regolazione del ciclo cellulare i ricercatori mediante citometria a flusso hanno analizzato lo sviluppo

di spighe di piante *fuwa* e WT, in cui la divisione e l'espansione cellulare sono altamente attive (Ikeda et al., 2004). Gli autori hanno osservato una percentuale inferiore di cellule *fuwa* in fase G1, ma una percentuale maggiore nelle fasi S e G2/M e la percentuale di cellule con contenuto 4C era nettamente aumentato rispetto a WT (Figura 6k-m) suggerendo che più cellule *fuwa* avevano completato la duplicazione del DNA ed erano entrate nella fase di divisione cellulare.

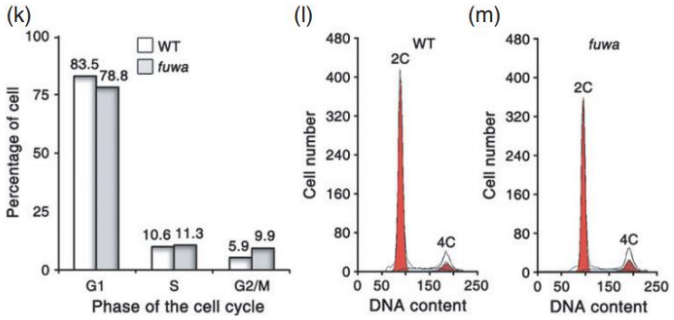


Figura 6 Grafici rappresentanti l'analisi della citometria a flusso. Il maggior numero di cellule FUWA con contenuto 4c sta ad indicare che fuwa interviene nel ciclo cellulare. (Chen et al.,2015)

1.5 Nuove tecnologie di genome editing

Sulla base di questi dati il gene *fuwa* è stato scelto in frumento duro come target per un esperimento di genome editing per studiarne e valutarne gli effetti nella pianta prodotti dall'alterazione della sequenza del gene, con il fine ultimo di migliorarne le caratteristiche qualitative e quantitative. Un regolatore negativo della resa è stimato essere un ottimo target per un esperimento di genome editing sia per la possibilità di visualizzare velocemente gli effetti prodotti sulla dimensione del seme, dovuti alla rottura di questi "freni molecolari", sia per la semplicità di progettazione e attuazione dell'esperimento perché a seguito della rottura del doppio filamento DSB (double strand breaks) c'è una maggior propensione da parte della cellula a utilizzare i meccanismi di NHEJ (non homologous end joined) per la riparazione del danno non necessitando di un meccanismo di riparazione diretta HDR (homologous direct repair) il quale, si avvale di una porzione di DNA complementare al filamento in cui è stato prodotto il DSB, meccanismo molto più complesso da utilizzare in laboratorio. Lo strumento d'elezione per eseguire un tale esperimento di genome editing è CRISPR/Cas.

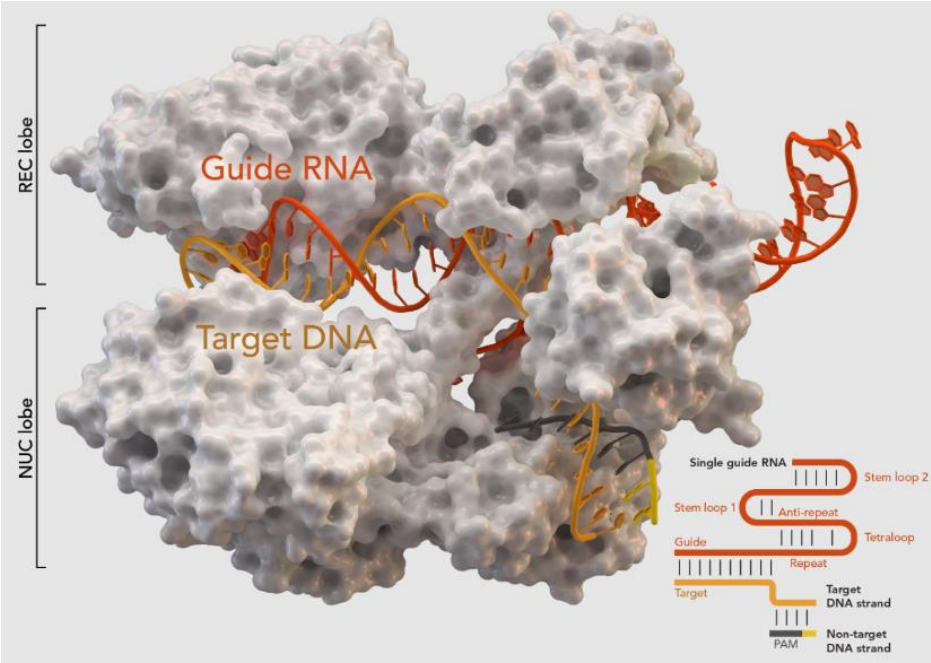


Figura 7 Domini proteici della proteina Cas9 di S. pyogenes complessata con crRNA e tracrRNA. Nishimasu et al.,2015.

Il sistema CRISPR si trova naturalmente negli organismi procariotici, fungendo da meccanismo di difesa contro l'attacco di virus e plasmidi. Si basa sulla scissione guidata da un RNA complementare al DNA bersaglio (estraneo), contrassegnandolo per la successiva degradazione. Rispetto ad altri strumenti di editing genetico che sono stati sviluppati nel corso degli anni, CRISPR è conveniente, estremamente preciso e affidabile, offrendo un'ingegnerizzazione genetica robusta e ad alto rendimento. CRISPR è una famiglia conservata di sequenze ripetitive e raggruppate di DNA che si trovano in circa il 40% dei batteri e il 90% degli archea. Si ritiene che la sequenza lunga 300-500 paia di basi, conservata e ricca di AT a monte del locus CRISPR, ne regoli l'espressione. Ogni array CRISPR è costituito da diverse sequenze ripetitive, che sono tipicamente lunghe 21-48 nucleotidi e spesso formano delle strutture a forcina. Le ripetizioni nell'array CRISPR procariotica sono intervallate da diverse sequenze variabili, note anche come distanziatori, che sono state catturate da precedenti elementi genetici mobili invasori, batteriofagi e plasmidi. Gli RNA CRISPR (crRNAs) sono brevi RNA trascritti dalla matrice CRISPR capaci di guidare le proteine CAS9, con funzione catalitica nucleasica, verso le sequenze bersaglio trovate nel genoma dei patogeni invasori, promuovendone la degradazione. Studi di sequenziamento hanno rivelato che i loci CRISPR nei genomi di varie specie procariotiche hanno conservato sequenze fiancheggianti, che sono state successivamente identificate come geni CAS. Questi geni codificano proteine che hanno una vasta gamma di funzioni catalitiche, come polimerasi, elicasi e nucleasi (Karimi at al.,2018; Karginov et

al.,2010). Esistono 3 tipologie di proteine Cas, i sistemi di tipo 1,2 e 3, ma la classe di maggior utilizzo negli esperimenti di genome editing è la 2, ottenuta da S. pyogenes.

Nel sistema CRISPR di tipo 2, la maturazione del crRNA e la degradazione del DNA bersaglio sono mediate prevalentemente da CAS9, oltre a CAS1 e CAS2. CAS9 contiene almeno due domini nucleasi: RUVC come dominio nucleasico all'estremità amminica e il dominio nucleasico HNH (o simil McrA) nel mezzo della proteina. I domini nucleasi HNH sono particolarmente comuni tra le endonucleasi di restrizione, suggerendo il suo potenziale ruolo nella degradazione della sequenza bersaglio. Nel sistema di tipo 2, la maturazione del pre-crRNA comporta la formazione di tracrRNA con la formazione di un duplice pre-crRNA come passaggio intermedio, seguito dalla scissione del pre-crRNA mediata da CAS9 (Zhang et al.,2013; Zhang,2017).

Il genoma batterico contiene la regione CRISPR costituita da numerose sequenze protospacer uniche che sono complementari alle sequenze di DNA dei virus che hanno precedentemente invaso la cellula. I protospacers si trovano tra brevi sequenze ripetute palindromiche. Una panoramica della degradazione del DNA bersaglio tramite il sistema CRISPR batterico di tipo 2 è mostrata nella figura 8 e nei contenuti di seguito (Karvelis et al.,2013; Hsu et al.,2014).

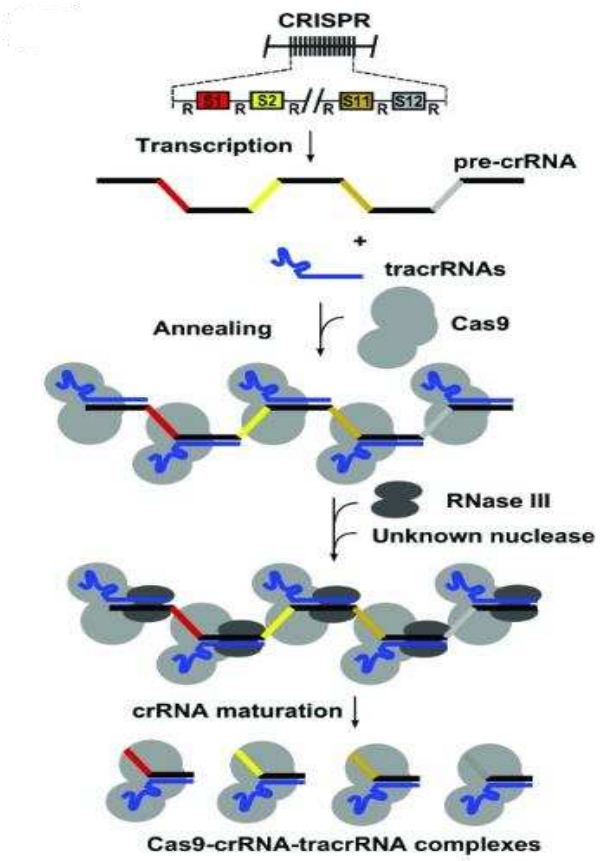


Figura 8 Illustrazione schematica della formazione del complesso crRNA: tracrRNA: Cas9 e degradazione del DNA target attraverso un sistema batterico CRISPR di tipo 2. (Karvelis et al.,2013).

1) La trascrizione della matrice CRISPR produce il precursore CRISPR RNA (pre cr-RNA) reclutando gli enzimi RNAsi 3 e Cas9, il crRNA transattivante (tracrRNA; complementare alla breve sequenza ripetuta palindromica) media la conversione del pre-crRNA in crRNA più piccoli.
2) la nucleasi Cas9 e il tracrRNA formano complessi con i crRNA.
3) i complessi crRNA: tracrRNA: Cas9 si legano a sequenze di DNA complementari al crRNA. La degradazione del DNA target mediata da CRISPR di tipo 2 richiede la presenza di un motivo adiacente al protospacer (PAM) nella sequenza target subito dopo la sequenza di legame del crRNA.
4) dopo il legame del complesso crRNA: tracrRNA: Cas9 al DNA target invasore, Cas9 introduce rotture a doppio filamento vicino alla sequenza PAM.
5) il complesso crRNA: tracrRNA: Cas9 viene rilasciato dal DNA bersaglio.

Oggi per una maggiore efficienza e praticità d'uso, il sistema CRISPR viene guidato da un sgRNA o RNA a guida singola, generato dalla fusione del crRNA e tracrRNA in un unico filamento di RNA capace, grazie alla sua precisione, robustezza e versatilità uniche, di introdurre precise modifiche in qualsiasi locus genico all'interno del genoma.

L'editing del genoma comporta l'uso di tecniche avanzate di biologia molecolare per introdurre modifiche precise in specifici loci del genoma. Le nucleasi a dita di zinco ZNF e le nucleasi effettrici simili ad attivatori di trascrizione TALEN sono state ampiamente utilizzate per più di due decenni, tuttavia, le tecnologie di editing genetico su base CRISPR hanno quasi completamente sostituito ZNF e TALENs. Un'importante caratteristica comune è l'uso di nucleasi sequenza-specifiche (SSN) che introducono DSB in loci specifici.

Le cellule vegetali possiedono sofisticati sistemi di riparazione del DNA che riparano le rotture a doppio filamento introdotte nei loci da SSN. Le rotture a doppio filamento riparate tramite NHEJ possono portare all'inserimento o alla delezione di nucleotidi ed è quindi utile per la generazione di knockout genici. L'uso di SSN per generare colture geneticamente modificate consente l'introduzione di variazioni genetiche benefiche che assomigliano a quelle che si verificano in natura. Inoltre, l'editing del genoma basato su nucleasi specifiche della sequenza richiede molto meno tempo rispetto alla selezione di tratti benefici mediante l'incrocio. Pertanto, l'uso dell'editing del genoma nei moderni programmi di agricoltura e allevamento potrebbe facilitare la produzione robusta e su larga scala di colture migliorate (Gaj et al.,2013; Costa et al.,2017; Zhang et al.,2018).

I genomi delle piante possono essere modificati con successo tramite il trasferimento del complesso sgRNA: Cas9 nelle cellule target. L'espressione del sistema CRISPR nelle cellule vegetali è fattibile utilizzando il promotore specifico dell'RNA polimerasi 3 delle piante, come anche AtU6 di *A. thaliana*, TaU6 di frumento, OsU6/OsU3 di riso o altri. Finora, approssimativamente 20 specie di piante sono state modificate utilizzando la tecnologia CRISPR/Cas9, migliorandone diversi caratteri come la resa, la tolleranza alle malattie e la resistenza a stress abiotici come siccità e salinità (Jaganathan et al.,2018; Borrelli et al.,2018).

Crop	Target gene	Genome editing platform	Function	References
Rice	*OsSWEET13*	TALENs	Enhanced resistance to bacterial blight	Zhou et al. (2015a)
	OsERF922	CRISPR/Cas 9	Enhanced resistance to blast disease	Wang et al. (2016)
	GW2, GW5 and *TGW6*	CRISPR/Cas 9	Improvement of grain weight	Xu et al. (2016)
	CSA	CRISPR/Cas 9	Photoperiod controlled male sterile lines	Li et al. (2016)
	ALS	CRISPR/Cas 9	Enhanced herbicide resistance	Sun et al. (2016)
	SBEIIb and *SBEI*	CRISPR/Cas 9	Generation of high amylose rice	Sun et al. (2017)
	Os09g29100	TALENs	Enhanced resistance to bacterial leaf streak	Cai et al. (2017)
	Hd 2, Hd 4 and *Hd 5*	CRISPR/Cas 9	Early maturity of rice varieties	Li et al. (2017a, b)
Wheat	*MLO*	CRISPR/Cas 9	Resistance to powdery mildew	Wang et al. (2014)
	TaEDR1	CRISPR/Cas 9	Resistance to powdery mildew	Zhang et al. 2017
Maize	*ARGOS8*	CRISPR/Cas 9	Novel variants of *ARGOS8* for drought-tolerance	Shi et al. (2017)
	ZmIPK		Reduction of anti-nutritional compound phytic acid	Liang et al. (2014)
Barley	*HvPM19*	CRISPR/Cas 9	Positive regulation of grain dormancy	Lawrenson et al. (2015)
Soybean	*FAD2-1A* and *FAD2-1B*	TALENs	Improvement of oil quality	Haun et al. (2014)
Tomato	*SlMlo1*	CRISPR/Cas 9	Resistant to powdery mildew	Nekrasov et al. (2017)
	SlWUS	CRISPR/Cas 9	Increased fruit size	Rodríguez-Leal et al. 2017
	SP5G	CRISPR/Cas 9	Day neutrality and early flowering	Soyk et al. (2016)
	SlAGL6	CRISPR/Cas 9	Facultative parthenocarpy	Klap et al. (2017)
Potato	*VInv*	TALENs	Reduction of sugar accumulation	Clasen et al. (2016)
Citrus	*CsLOB1*	CRISPR/Cas 9	Resistance to citrus canker	Jia et al. (2017)

Figura 9 Le varie specie di piante modificate tramite la tecnologia CRISPR/Cas9 e i corrispondenti caratteri migliorati. (Mishra et al., 2018).

In frumento tramite il sistema CRISPR è stata creata la linea TaMLO grazie ad un knockout genico, che ha permesso di sviluppare delle piante resistenti alla malattia dell'oidio causata da *Blumeria graminis*. Attraverso l'utilizzo di 3 sgRNA sotto l'influenza del promotore TaU3, gli scienziati hanno recentemente generato la linea mutante di frumento TaGW2/TaLpx-1/TaMLO per incrementare la produzione colturale, la resistenza al *Fusarium graminearum* e all'oidio (Lino et al.,2018; Jaganathan et al.,2018; Montecillo et al.,2020).

Sebbene l'utilizzo del genome editing utilizzando l'approccio CRISPR presenta numerosi vantaggi rispetto al tradizionale incrocio, diverse sfide restano da affrontare per permettere un ampio utilizzo di CRISPR nelle culture orticole. Limite principale nell'utilizzo della tecnologia CRISPR nelle colture è l'integrazione genica e la potenziale introduzione di mutazioni fuori target, poiché la maggior parte dei metodi di trasporto basati sul DNA richiedono l'integrazione dei vettori nel genoma e ciò produce organismi transgenici, i quali presentando un gene estraneo rientrano nelle restrizioni normative degli

organismi OGM. Questo limite può essere mitigato grazie all'incrocio di queste piante transgeniche con un Wilde-type selezionando poi quegli individui che presentano la mutazione ma hanno perso il costrutto esogeno tramite la segregazione dei caratteri. In contrasto possono essere utilizzati le CRISPR Cas9 ribonucleoproteine RNPs, facilitando l'espressione transiente e riducendo notevolmente la probabilità di eventuali mutazioni fuori target. In particolare, le linee di frumento tenero TaGW2 e TaGASR7 sono state generate utilizzando CRISPR RNPs. Le linee mutanti non mostravano alcuna mutazione fuori target.

I metodi di trasferimento genico maggiormente impiegati nelle piante sono:

- il metodo biolistico, che consiste nello sparare dei microproiettili di un metallo inerte ricoperti di DNA all'interno della cellula;
- *A. tumefaciens* opportunamente ingegnerizzato attraverso l'eliminazione di alcuni segmenti genici contenuti nel suo plasmide Ti che portano alla generazione di masse tumorali nella pianta e la produzione di opine, delle quali il batterio si nutre;
- Virus, solitamente molto efficienti.

Il genome editing basato sul sistema CRIPSR Cas9 ha permesso agli scienziati di generare piante con i caratteri desiderati rapidamente e con precisione senza il bisogno dell'incrocio selettivo tradizionale. Negli ultimi anni CRISPR Cas9 è stato applicato con successo in numerose piante per implementare le caratteristiche morfologiche e per generare colture con un aumentato valore nutrizionale che siano resistenti a stress biotici e abiotici. Visti i rapidi progressi della tecnologia nel campo del genome editing, ci si attende che CRISPR Cas9 trasformerà l'industria del cibo e dell'agricoltura nel vicino futuro.

1.6 Stato dell'arte.

Nel vicino futuro l'agricoltura italiana, come quella mondiale si prefiggono diverse sfide, tra le quali l'incremento delle produzioni, la creazione di specie agricole resilienti ai cambiamenti climatici, l'adozione di pratiche agricole rispettose dell'ambiente e l'interazione con un mercato sempre più globale che porta con sé nuove esigenze dei consumatori. Il progetto WHEADIT attraverso l'utilizzo delle nuove tecniche di genome editing mira ad accelerare il miglioramento genetico dei cereali a paglia, in particolare del frumento duro, una specie significativamente rilevante per il made in italy alimentare, la quale produzione ad oggi non riesce a raggiungere la domanda del mercato italiano.

L'intento finale del progetto è quello di creare una pianta di frumento duro avente un incremento della resa dovuto all'inattivazione genica di due geni scelti da letteratura identificati come regolatori negativi della resa. Attraverso l'incrocio di due piante, una editata per il gene delle citochinina

ossidasi e l'altra per il gene FUWA, si sarebbero poi selezionati, tra la progenie prodotta da quest'incrocio, quegli individui nei quali i due geni editati segregano insieme con il fine di ottenere piante con una resa aumentata.

Il progetto ha avuto come primo step la necessità di trovare dei geni candidati per incrementare la resa in frumento partendo da articoli reperibili in letteratura, scegliendo poi quei geni che secondo gli scienziati hanno mostrato elevata potenzialità nell'interferire con i meccanismi molecolari che regolano la resa, come ad esempio FUWA identificato dalla pianta di riso.

Scelto il gene candidato, si è proceduto con l'identificazione di quest' ultimo nel genoma di frumento duro tramite l'utilizzo di banche dati disponibili sul web e di strumenti bioinformatici. Acquisite informazioni sulla sua sequenza nucleotidica presso il Centro Nazionale di Ricerca di Bari sono stati sviluppati due costrutti, contenenti la tecnologia di genome editing CRISPR Cas9, necessari per il silenziamento nel gene candidato.

Successivamente sono stati trasformati gli embrioni di diverse piante di frumento duro, con i costrutti precedentemente sviluppati, tramite metodo biolistico che consiste nello sparare microproiettili di metalli inerti come oro, iridio o tungsteno ricoperti di DNA all'interno della cellula da trasformare. A questo punto gli embrioni di frumento sono stati posti in un terreno di coltura agarizzato sterile addizionato di nutrienti e di regolatori di crescita e sono stati lasciati in delle camere di crescita con i parametri di temperatura, umidità e intensità luminosa controllati.

Infine, è stata effettuata un'analisi delle piante editate.

2. Scopo della tesi

Il mio lavoro di tesi nasce con l'intento di apprendere la nuova frontiera della biologia, il genome editing, in particolar modo il funzionamento e gli effetti prodotti a seguito dell'utilizzo del sistema CRISPR Cas9 e di come sta cambiando il mondo davanti ad i nostri occhi.

Questo lavoro di tesi fa parte di un importante progetto a livello italiano chiamato WHEADIT in corso presso il Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria-Centro di ricerca di genomica e bioinformatica CREA GB, avente lo scopo di editare alcuni regolatori molecolari della resa in frumento duro al fine di creare nuove cultivar con una resa in granella incrementata. Il mio ruolo nel progetto è stato quello di effettuare una caratterizzazione fenotipica e molecolare di piante di frumento duro appartenenti alla cultivar Svevo a seguito di un esperimento di genome editing del gene FUWA, gene scoperto per la prima volta in riso e identificato come un regolatore negativo della resa determinando un'alterazione nell'architettura della spiga e nella morfologia del seme.

A tale fine è stata eseguita un'analisi in silico delle strutture esone-introne del gene, delle varie isoforme predette e del prodotto genico codificato dal gene FUWA, sono stati analizzati i dati provenienti dal sequenziatore di seconda generazione MiSeq di illumina per individuare eventuali mutazioni prodotte dall'esperimento di editing del genoma ed è stato visualizzato come queste mutazioni influenzano i caratteri agronomici nella pianta di frumento duro, cereale fondamentale per la storia del genere umano il quale ci accompagna e nutre da millenni.

3. Materiali e metodi

3.1 Materiali vegetali

Il DNA utilizzato per i vari esperimenti è stato estratto da 72 piante mutanti di frumento duro appartenenti alla cultivar Svevo. I semi sono stati imbibiti e posti al buio a 4°C per una settimana e una volta germinati sono stati seminati in vaso. Le piante sono state fatte crescere in serra dal mese di novembre al mese di giugno seguendo le naturali condizioni stagionali.

3.2 Progettazione di reazioni di PCR per genotipizzazione.

Gli esperimenti di PCR sono stati eseguiti principalmente per indagare su cosa fosse accaduto nel gene FUWA-A perché dai dati del sequenziamento non era mai presente.

Il primo step è stato la costruzione dei primers, la quale è stata eseguita a mano. I primers sono stati costruiti con l'intento di produrre degli amplificati di PCR che fossero specifici nel distinguere FUWA- A da FUWA-B, inoltre è stato effettuato un BLAST nel genoma del frumento duro presente nel database dell'Ensembl Plants per verificare che non ci fossero troppi siti di appaiamento per i primers datosi che lavorando sul DNA genomico, ed a maggior ragione in quello delle piante, c'è un'alta probabilità di ottenere ampliconi aspecifici.

È di fondamentale importanza durante la progettazione dei primers il calcolo della temperatura di melting (Tm) e della temperatura di annealing (Ta) espresse entrambe in gradi centrigradi. Esse sono state calcolate in automatico dal programma SNAPGENE, ma sono state comunque controllate attraverso la formula empirica utilizzata per il calcolo della Tm°C:

$$Tm = [4(G + C) + 2(A + T)]\ °C.$$

Solitamente per impostare una corretta temperatura di annealing si usa la formula "Tm-5°C", anche se spesso l'utilizzo diretto della sola Tm può comunque portare ad avere ottime rese nella reazione di PCR.

Le reazioni di PCR sono state molteplici e con altrettante varianti relative:

-alle coppie di primer utilizzati;

-alle condizioni di amplificazione;

-al volume di reazione finale.

Come controlli positivi sono state utilizzati 3 DNA genomici di piante wilde-type cv Svevo mentre come controllo negativo è stato inserito nel pozzetto elettroforetico soltanto un'aliquota di mix senza DNA al suo interno.

1° Esperimento di PCR

Obiettivo: amplificazione di una regione di 1567 paia di basi che comprendeva il terzo esone specifica per FUWA-A.

Descrizione dell'esperimento: La mix di reazione è stata eseguita, escludendo i campioni di controllo, su 6 piante mutanti della linea B3890 (5,25,28,29,49,57);

Primers utilizzati:

PRIMER	Sequenza 5' 3'
Primer forward 179	**GATTTCCATCTAACCTTCTACGAGTA**
Primer reverse 181	**CCTAGCAATGGGAGGAACCGGGC**

Tabella 2 Primers utilizzati per il primo esperimento di amplificazione di un frammento di FUWA-A.

Il protocollo prevede l'assemblaggio di una reazione di PCR in un volume finale di 20 µl così composta:

5X Green GoTaq® Flexi Buffer	**4 µl**
25 mM MgCl2	**1 µl**

10 mM dNTP	**0,4 µl**
10 µM Primer Forward 187	**0,4 µl**
10 µM Primer Reverse 188	**0,4 µl**
GoTaq® 5u/µl	**0,125 µl**
H2O	**11,675 µl**
DNA stampo (da 20 a 50 ng)	**2 µl**

Tabella 3 Concentrazioni e volumi per singolo campione dei componenti della mix.

Le condizioni di amplificazione sono state le seguenti e sono state ripetute per 35 cicli:

Denaturazione iniziale	**94°C per 2 minuti**
35 cicli	**94°C per 30 secondi** **58°C per 30 secondi** **72°C per 1 minuto**
Estensione finale	**72°C per 7 minuti**

Tabella 4 Cicli di amplificazione impostati sul termociclatore.

2° Esperimento di PCR

Obiettivo: indagare su cosa fosse accaduto nelle regioni fiancheggianti ai loci al 5' ed al 3' delle guide 1 e 4.

Descrizione dell'esperimento: sono state progettate due coppie di primers diverse, una specifica per la regione al 5'delle guide ed una per la regione al 3' delle guide per i geni FUWA-A e FUWA-B (tabella 1).

La mix di reazione è stata eseguita, escludendo i campioni di controllo, su 6 piante mutanti della linea B3890 (5,25,28,29,49,57);

GENOMA A	**Primer forward**	**Primer reverse**
Regione al 5'	184 CAAACAGTCATCGAAGAATAAAATGATCG	186 GAAGTAAGTAAAGCGGAGCGGAGAAAGC
Regione al 3'	187 GTTTTTCTCTTGCTGTCCACAGTTC	181 CCTAGCAATGGGAGGAACCGGGC

Tabella 5 Primers utilizzati per amplificare i locus adiacenti alle guide nel genoma A.

Lunghezza attesa dell'amplificato per la regione al 5': 526 bp

Lunghezza attesa dell'amplificato per la regione al 3': 672 bp

GENOMA B	Primer forward	Primer reverse
Regione al 5'	185 AGTTTTAGTACCTCAGTATTTTTTTAGGG	186 GAAGTAAGTAAAGCGGAGCGGAGAAAGC
Regione al 3'	187 GTTTTTCTCTTGCTGTCCACAGTTC	188 GGATGCCCTAAATCCAGTTGC

Tabella 6 Primers utilizzati per amplificare i locus adiacenti alle guide nel genoma B.

Lunghezza attesa dell'amplificato per la regione al 5': 411 bp

Lunghezza attesa dell'amplificato per la regione al 3': 491 bp

Il protocollo prevede, sia per l'amplificazione delle regioni al 5' che al 3' di FUWA-A e FUWA-B l'assemblaggio di una reazione di PCR in un volume finale di 25 µl composta da:

5X Green GoTaq® Flexi Buffer	**5 µl**
25 mM MgCl2	**2 µl**
10 mM dNTP	**0,5 µl**
10 µM Primer Forward 185	**0,5 µl**
10 µM Primer Reverse 186	**0,5 µl**
GoTaq®5u/µl	**0,125 µl**
H2O	**14,375 µl**
DNA stampo (da 20 a 50 ng)	**2 µl**

Tabella 7 Concentrazioni e volumi per singolo campione dei componenti della mix.

Parallelamente alle componenti della mix anche le condizioni di amplificazione sono state le stesse per tutti e quattro gli esperimenti (tabella 3) ad eccezione però della seconda fase all'interno dei 35 cicli di amplificazione (evidenziata in rosso) in cui ci sono state diverse variazioni della temperatura di annealing riportate nella tabella 4.

Di seguito riportati i seguenti parametri:

Denaturazione iniziale	**94°C per 1 minuto**
35 cicli	**94°C per 30 secondi** **53°C per 30 secondi** **72°C per 45 secondi**
Estensione finale	**72°C per 7 minuti**

Tabella 8 Cicli di amplificazione impostati sul termociclatore.

R_5'_FUWA-A	**R_3'_FUWA-A**	**R_5'_FUWA-B**	**R_3'_FUWA-B**
55°C per 30 secondi	57°C per 30 secondi	53°C per 30 secondi	55°C per 30 secondi

Tabella 9 Variazioni delle temperature di annealing nei vari esperimenti di PCR. Legenda: R_: regione; 5': regione al 5' delle guide; FUWA-A: gene FUWA nel genoma A; FUWA-B: gene FUWA nel genoma B.

3° Esperimento di PCR

Obiettivo: analisi delle regioni interne alle guide

Descrizione dell'esperimento: sono state progettate due coppie di primers, una specifica per la regione interna alle guide per il gene FUWA-A e l'altra coppia per la regione interna alle guide del gene FUWA-B (tabella 5).

GENOMA A	**Primer forward**	**Primer reverse**
Regione interna	189 GCTTTCTCCGCTCCGCTTTACTTACTTC	181 CCTAGCAATGGGAGGAACCGGGC
GENOMA B	Primer forward	Primer reverse
Regione interna	185 AGTTTTAGTACCTCAGTATTTTTTTAGGG	190 GAACTGTGGACAGCAAGAGAAAAAC

Tabella 10 Coppia di primers per amplificare la regione interna alle guide.

Parametri della reazione per FUWA-A

Denaturazione iniziale	**94°C per 1 minuto**
35 cicli	**94°C per 30 secondi** **60°C per 30 secondi** **72°C per 2 minuti**
Estensione finale	**72°C per 7 minuti**

Tabella 11 Cicli di amplificazione impostati sul termociclatore.

Parametri della reazione per FUWA-B

Denaturazione iniziale	**94°C per 1 minuto**
35 cicli	**94°C per 30 secondi** **53°C per 30 secondi** **72°C per 2 minuti**
Estensione finale	**72°C per 7 minuti**

Tabella 12 Cicli di amplificazione impostati sul termociclatore.

Lunghezza attesa dell'amplificato per FUWA-A: 1917 bp

Lunghezza attesa dell'amplificato per FUWA-B: 1646 bp

I prodotti di PCR attesi sono stati verificati attraverso elettroforesi in gel d'agarosio 1% in TBE 0,5X con Bromuro di Etidio.

Per la preparazione del gel d'agarosio all'1% sono stati aggiunti in una beuta 1 gr di agarosio e 100 ml di buffer TBE 0.5X. Successivamente è stata messa la beuta al microonde portandola ad ebollizione e controllando che l'agarosio si sia ben sciolto nel solvente, si aggiunge poi il Bromuro di Etidio e si agita bene, il gel è così pronto per essere versato in uno stampo contenete un pettine

per la creazione dei pozzetti nei quali verrà caricato l'amplificato di PCR. Deve essere versato da caldo, perché a temperatura ambiente l'agarosio solidifica.

Per visualizzare l'altezza delle bande è stato utilizzato il marcatore GeneRuler 100bp plus.

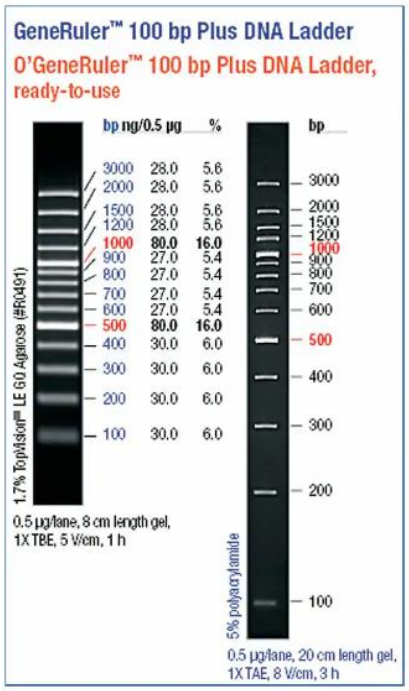


Figura 10 Marcatore GeneRuler 100bp plus.

3.3 Fenotipizzazione delle piante in serra.

Le piante mutanti erano coltivate in serra ognuna nel proprio vaso della capienza di 4L e sono state fenotipizzate iniziando in data 11/04/2022. Sono stati fenotipizzati i seguenti caratteri:

- Numero totale di culmi
- Numero di culmi allo stadio 49, prime ariste visibili
- Numero di culmi allo stadio 51, inizio dell'emersione dell'infiorescenza dalla guaina
- Numero di culmi allo stadio 55, metà dell'infiorescenza emersa dalla guaina
- Numero di culmi allo stadio 57, 70% dell'infiorescenza emersa dalla guaina
- Numero di culmi allo stadio 59, infiorescenza totalmente emersa dalla guaina
- Numero di culmi allo stadio 61, inizio della fioritura con prime antere visibili
- Numero di culmi allo stadio 63, 15% delle antere visibili
- Numero di culmi allo stadio 65, 50% delle antere visibili

- Numero di culmi allo stadio 69, fine della fioritura
- Numero di spighe alla fine della maturazione
- Diametro al culmo principale (mm)
- Altezza del culmo principale allo stadio 59, senza includere la spiga (cm)
- Altezza del culmo principale allo stadio 69, senza includere la spiga (cm)
- Numero di nodi al culmo principale allo stadio 59
- Numero di nodi al culmo principale allo stadio 69
- Lunghezza della foglia a bandiera allo stadio 69
- Larghezza della foglia a bandiera allo stadio 69
- Orientamento della foglia numero 1,2,3 ecc…. al culmo principale
- Lunghezza della foglia numero 1,2,3 ecc…. al culmo principale
- Larghezza della foglia numero 1,2,3 ecc…al culmo principale

Sono stati scelti questi caratteri perché nel frumento sono di elevato interesse agronomico ed anche perché dall'articolo di Chen et al., (2015) avevamo potuto leggere che l'alterazione del gene FUWA in riso aveva comportato degli importanti effetti pleiotropici. Quindi attraverso una vasta gamma di caratteri da tenere sotto controllo e fenotipizzare abbiamo cercato di garantire una copertura più ampia possibile dell'eventuali alterazioni fenotipiche che si sarebbero potute osservare. Le visite in serra venivano effettuate giornalmente, ma le date di campionamento sono state principalmente 5: 11/4/22, 12/4/22, 29/04/22, 6/5/22, 16/5/22.

Tutto ciò è stato effettuato sulla linea di piante mutanti B3890. La linea B3878 non è stata fenotipizzata.

3.4 Raccolta dei semi e fenotipizzazione delle spighe.

Le piante in serra dopo aver terminato le fasi fenologiche nelle quali avviene la maturazione del seme e raggiunta la fase di senescenza erano pronte per essere raccolte per poter eseguire un’analisi di fenotipizzazione delle spighe accompagnata poi dalla raccolta dei semi da quest'ultime. Per ogni

pianta sono state raccolte le spighe una alla volta, prima tagliando con delle forbici da cucina le ariste per facilitare poi il taglio delle spighe ed infine sono state messe in un sacchetto di carta sul quale è stato indicato la linea a cui apparteneva la pianta, il numero della pianta e di quante spighe era possesso. Successivamente le spighe sono state fenotipizzate per i seguenti caratteri: lunghezza della spiga, numero di spighette che componevano la spiga e numero di semi per spiga. A seguito di questa fenotipizzazione le piante sono state raggruppate in 4 classi fenotipiche i base ai dati raccolti distinguendole in: piante con spighe lunghe (9-10 cm) e fertili, piante con spighe corte (6 cm) e fertili, piante con spighe lunghe (9-10 cm) e sterili e piante con spighe corte (6 cm) e sterili. È stato anche possibile creare 3 gruppi di piante divisibili in fertili (più di 20 semi a spiga), semifertili (meno di 20 semi per spiga) e sterili (0 semi per spiga). I semi sono stati raccolti a mano dalle spighe strofinandole vigorosamente una alla volta contro un setaccio in acciaio inox da cucina così evitando che i semi venissero persi, dopo di ciò sono stati contati e stoccati all'interno di un sacchetto di carta successivamente etichettato con linea della pianta, numero della pianta, numero della spiga e numero di semi. Lo stesso procedimento è stato effettuato per ogni spiga.

3.5 Analisi dei caratteri fenotipici della morfologia del seme tramite SmartGrain.

I semi raccolti dalle spighe fertili e semi fertili sono stati misurati tramite il programma SmartGrain (http://www.kazusa.or.jp/phenotyping/smartgrain/index.html), programma che permette di raccogliere i dati fenotipici come lunghezza, ampiezza, circolarità, perimetro e area del seme in modo tale da poter eseguire in un secondo momento un'analisi statistica sui parametri dei semi provenienti da ogni pianta. Si è proceduto partendo da una scannerizzazione dei semi per raccogliere le immagini che sarebbero state poi analizzate dal programma SmartGrain. Lo scanner è stato preparato all'uso posizionando una cornice di cartone nello scanner ed al suo interno sono stati posizionati i semi precedentemente puliti da eventuali glume e sotto la cornice era stato posizionato un foglio in plastica trasparente sul quale erano state disegnate delle tacche corrispondenti alla dimensione di 1 centimetro per poter impostare una scala di misura per il programma. Circa 30 semi per ogni pianta sono stati posti nello scanner all'interno della cornice in cartone, in modo tale che fossero abbastanza distanziati onde evitare che si toccassero producendo dei risultati errati e poi sono stati scannerizzati. Le immagini venivano acquisite in bianco e nero etichettate al computer con numero della linea di mutanti e numero di pianta e successivamente salvate in una cartella.

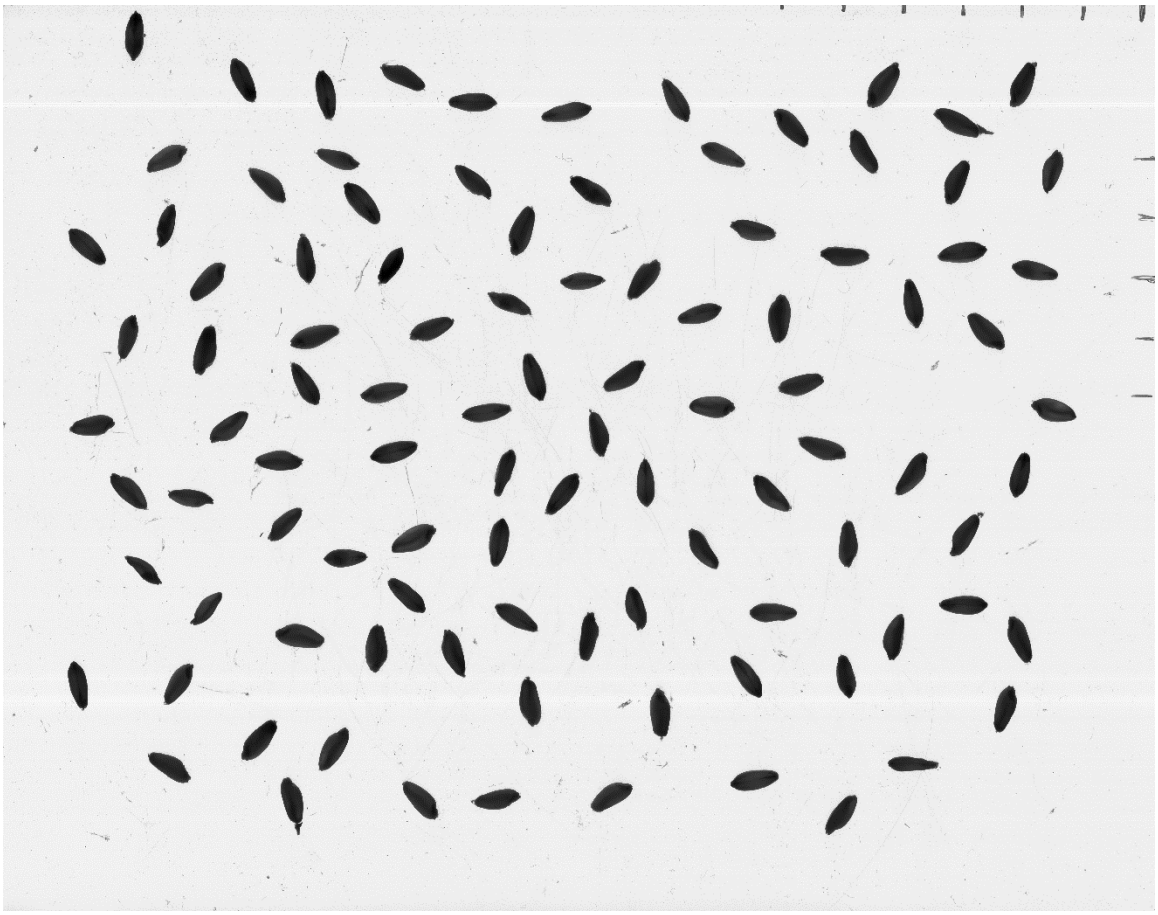


Figura 11 Immagine ottenuta dalla scannerizzazione di un gruppo di semi appartenenti alle piante mutanti della linea B3890.

Infine, le immagini dei semi prodotte dallo scanner sono state esportate ed immesse nel programma SmartGrain nel quale è stato necessario settare la scala di misura corrispondente ad un centimetro e sono state analizzate tutte le immagini per i parametri precedentemente menzionati. I dati analizzati sono stati rilasciati attraverso un file output in formato csv ed elaborati in Excel. Diversi dati provenienti da alcune immagini presentavano dei valori di misurazione anomali, dovuti ad un'interpretazione errata del programma, il quale identificava come semi anche porzioni della cornice in cartone, quindi, le immagini che presentavano le anomalie per alcuni dati sono state nuovamente analizzate una alla volta manualmente e indicando al programma quali erano i semi e quali non.

3.6 Analisi statistica della varianza nella morfologia del seme.

Con i dati relativi alla lunghezza, ampiezza, perimetro, circolarità e area del seme per i semi di ogni pianta, si è proceduto nell'eseguire un'analisi statistica sui dati registrati attraverso il software web SAS studio (https://welcome.oda.sas.com/), con l'intento di trovare dei gruppi di semi in possesso di caratteri statisticamente significativi per la mutazione. Per far funzionare il programma SAS studio è necessario preparare un file Excel contenente i dati su cui abbiamo interesse nell'eseguire l'analisi statistica il quale deve essere strutturato in modo tale da non presentare caselle vuote, non deve contenere punti, ma bensì solo virgole per dividere i numeri decimali, e le intestazioni delle colonne devono essere composte da un'unica parola o sigla. Un qualunque altro tipo di file impostato in modo differente non verrà analizzato dal programma. Primo step consiste nell'eseguire l'upload del file su cui si vuole effettuare l'analisi statistica. Caricato il file nel sito web si aprirà una schermata sulla destra dello schermo per permettere al programma di acquisire i dati del file Excel e per verificare che quest'ultimo non contenga errori. A questo punto è possibile scegliere tra i modelli lineari che tipo di analisi statistica effettuare, nel nostro caso è stata effettuata l'ANOVA ad una via. Scegliendo il tipo di analisi si aprirà una finestra suddivisa in 4 sezioni: dati, opzioni, output ed informazioni. Nella sezione dati va selezionata la cartella nel quale è stato caricato il file Excel da analizzare e vanno impostate la variabile dipendente e la variabile categorica, poi nella sezione opzioni si imposta il test di Levene e come metodo di confronto il metodo di Tukey, impostati tutti i parametri si può procedere con l'eseguire l'analisi. Nei risultati viene prodotto un sommario in cui sono riassunte tutte le informazioni inerenti alle osservazioni effettuate ed alle variabili impostate, inoltre viene mostrato un bar plot che descrive diversi parametri quali: valore minimo dei dati, whisker minimo, primo quartile, mediana, terzo quartile, whisker massimo, valore massimo dei dati, media, deviazione standard, numero di osservazioni e somma dei pesi. A fine pagina viene mostrato un grafico in cui è presente la correzione di Tukey che ci permette di capire se i dati ottenuti sono significativi o non significativi.

Ulteriore analisi statistica ANOVA è stata effettuata confrontando le piante fertili, semifertili e sterili con i caratteri fenotipici raccolti durante la fenotipizzazione quali: numero di culmi, diametro al culmo principale ed altezza al culmo principale.

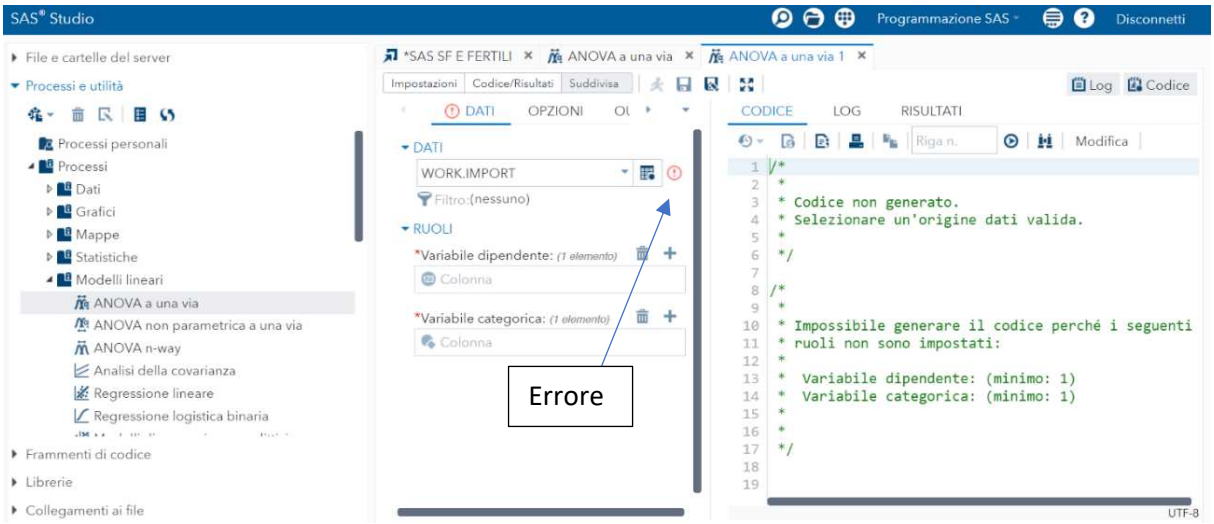


Figura 12 Schermata del programma SAS studio ODA in cui si sta selezionando l'analisi statistica da applicare sui dati precedentemente caricati. Il punto esclamativo all'interno del cerchio ci indica di prestare attenzione, in questo specifico caso ci indica che non sono presenti la variabile categorica e la variabile dipendente.

3.7 Analisi in silico del gene FUWA

Per esaminare la struttura genica di FUWA nella pianta di frumento duro è stato necessario recuperare la sequenza nucleotidica del suo ortologo in riso. Il codice identificativo della sequenza genica OsFUWA (LOC_Os02g13950) riso, ottenuta dall'articolo di Chen et al.,2015, è stato inserito all'interno della banca dati bioinformatica di Ensembl Plants (https://plants.ensembl.org/index.html) la quale ci ha condotto alla pagina dove erano presenti tutte le informazioni riguardo il gene FUWA in riso.

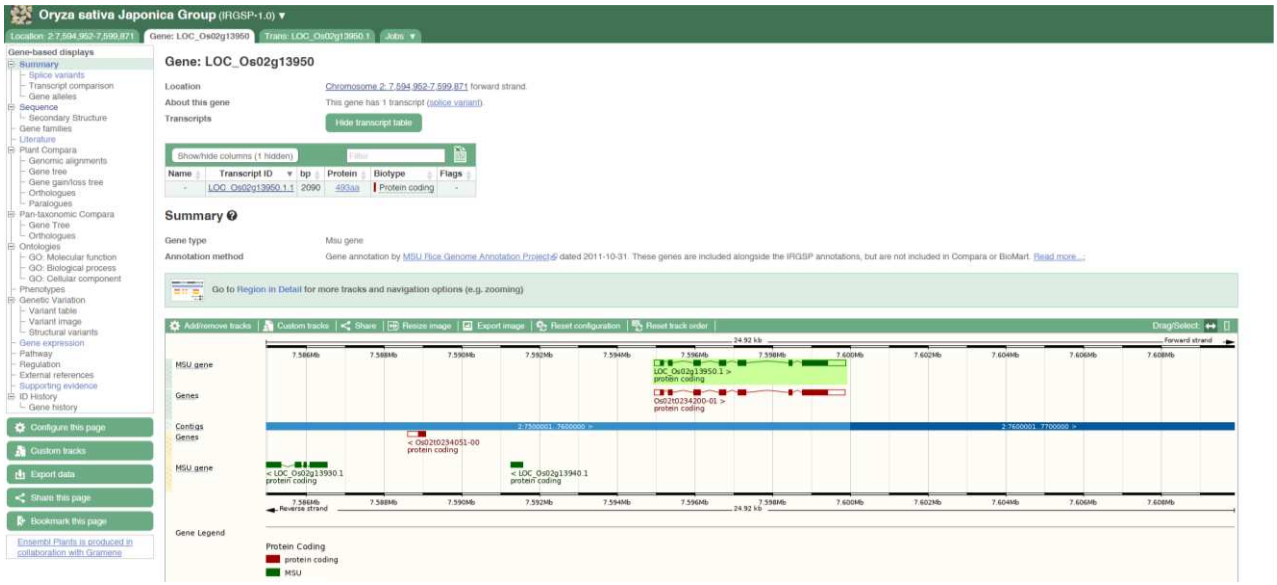


Figura 13 Schermata principale nel database di Ensembl Plants del gene OsFUWA. Nella colonna di sinistra è possibile accedere alla sequenza esoni-introni del gene.

Successivamente è stato possibile recuperare la sequenza esoni-introni del gene di riso, in formato FASTA. Attraverso un BLAST (Basic Local Allignment Search Tool) è stata confrontata contro il genoma di frumento duro presente nella banca dati dell'Ensembl Plants, permettendoci di trovare la sequenza genomica del gene TdFUWA. Essendo questa pianta in possesso di un genoma tetraploide abbiamo ottenuto due sequenze del gene FUWA una per il genoma A (TRITD6Av1G100490 - posizione genomica 6A: 270,171,952-270,190,995) e l'altra per il genoma B (TRITD6Bv1G115800 posizione genomica 6B: 373,410,600-373,420,244), i due geni vengono definiti omeologhi. Nella schermata principale per ogni omeologo erano presenti le informazioni del gene quali:

- la descrizione del prodotto genico (NHL repeat-containing protein G)
- la localizzazione del gene
- i trascritti del gene, 4 per FUWA-B e 3 per FUWA-A.

Per identificare quale tra i trascritti proposti dal genome browser di Ensembl Plants fosse il più simile al trascritto di riso ci si è avvalsi del programma bioinformatico MEGA-X, attraverso il quale è stato utilizzato l'algoritmo di allineamenti multipli di ClustaW impostando per i parametri Gap Open Penalty e Gap Extension Penality rispettivamente i valori 10 e 0.05. La stessa analisi con gli stessi parametri è stata anche eseguita con le sequenze amminoacidiche delle varie isoforme, tradotte con una funzione del software MEGA-X e sono state successivamente allineate tramite l'algoritmo iterativo di MUSCLE.

Figura 14 Schermata del programma Mega-X. In primo piano la finestra aperta a seguito del comando 'ALIGN' in alto a sinistra, nella quale è possibile scegliere che tipo di algoritmo utilizzare per seguire un allineamento multiplo.

Per identificare le regioni trascritte e non tradotte, UTR, sequenze localizzate alle estremità 5' e 3' di un RNA denominate rispettivamente 5' UTR e 3' UTR ci si è avvalsi del database del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/).è stato effettuato un BLAST ,lasciando le impostazioni predefinite del programma, per trovare le EST (expressed sequence tags), che derivano dalla conversione degli mRNA in cDNA quindi in possesso delle regioni UTR. Purtroppo, non esistono EST per il frumento duro nell'NCBI però abbiamo ottenuto diverse EST per altre piante del genere Triticum, le quali a loro volta sono state utilizzate per un allineamento multiplo utilizzando l'algoritmo di ClustaW con i valori dei parametri di Gap Open Penalty e Gap Extension Penality rispettivamente di 10 e 0.05.

Attraverso la piattaforma web InterProScan (https://www.ebi.ac.uk/interpro/result/InterProScan/iprscan5-R20220928-112643-0382-14149844-p1m/) è stata inserita la sequenza amminoacidica di TdFUWA codificata dall'isoforma più simile all'isoforma di riso, sia per il genoma A che per il B, al fine di identificare la sequenza codificante per il dominio funzionale della proteina ed in che esone si trovasse.

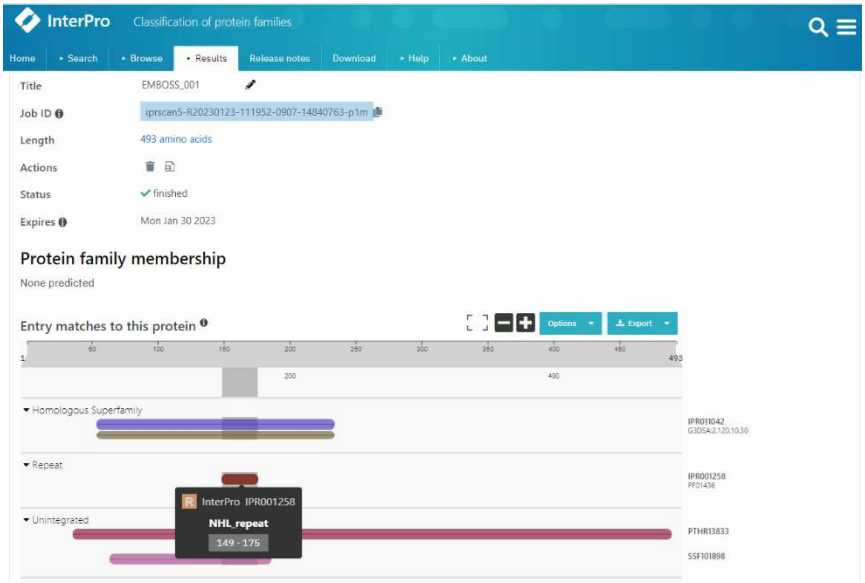


Figura 15 Sezione dei risultati in InterProScan dove è possibile identificare la sequenza amminoacidica codificante per il dominio funzionale della proteina.

Grazie alla piattaforma web expVIP (http://www.wheat-expression.com/) creata per frumento tenero è stato possibile analizzare il profilo trascrizionale del gene FUWA. Non esiste una simile piattaforma per frumento duro, ma essendo quest'ultimo molto vicino filogeneticamente al frumento tenero ci si può avvalere dei dati rilasciati da questo sito. Inizialmente è stata inserita la sequenza genomica di TdFUWA (genoma B) nel sito web, sono stati selezionati gli studi che trattavano dati di RNAseq inerenti al naturale sviluppo della pianta di frumento dalla germinazione alla maturazione del seme, escludendo dati di RNAseq legati allo sviluppo in condizione di stress biotici ed abiotici, poi è stato selezionato il tipo di 'nucleotide databases' per indicare in che formato volevamo ottenere i nostri dati ed è stata effettuata l'analisi BLAST. La sequenza del gene TdFUWA è stata confrontata con il database interno del programma expVIP. Questo ci ha permesso di ottenere dati di RNAseq per ogni stadio fenologico della pianta di frumento tenero visualizzabili su un istogramma ulteriormente modificabile in base al tipo di cultivar, stadio fenologico, età, tessuto e tipo di stress. Inoltre, i dati sono stati scaricati in formato csv ed analizzati in Excel, preventivamente selezionando la visualizzazione dei dati dei trascritti nell'unità di misura count, scelto perché meglio interpretabile in Excel. Nel sito affiliato BAR BIO Analityc Resource (https://bar.utoronto.ca/) sono stati analizzati in quali tessuti ed a quali stadi di sviluppo il gene era maggiormente espresso con una Heatmap.

3.8 Software per gestione e pianificazione di sequenze biologiche primarie.

Per poter lavorare sulla sequenza del gene TdFUWA nei due omeologhi è stato necessario riportare l'intera sequenza genica esoni-introni, recuperata dal genome browser dell'Ensembl Plants, nel programma SNAPGENE utilizzato per creare, modificare e analizzare sequenze di DNA, cDNA e amminoacidiche, nonché di progettare primer e sonde. A tal fine sono stati creati due file SNAPGENE uno per FUWA-A e l'altro per FUWA-B. Nei file sono state inizialmente inserite e salvate le sequenze esoniche ed introniche, reperite dall'Ensembl Plants. Una volta inserite si aprirà una finestra che ci indicherà la lunghezza del segmento che si sta creando, nel quale è possibile cambiare colore, nome ed aggiungere un commento. Queste operazioni sono state eseguite per entrambi i file così da avere una migliore panoramica della struttura dei due geni omeologhi. Successivamente sono stati inseriti i primer utilizzati per creare gli ampliconi dell'esperimento di sequenziamento al MiSeq, sono state poi aggiunte le guide con le rispettive sequenze PAM, la sequenza codificante per il dominio NHL, presente nel 4° esone e tutti gli SNP (polimorfismi a singolo nucleotide) tra i due omeologhi.

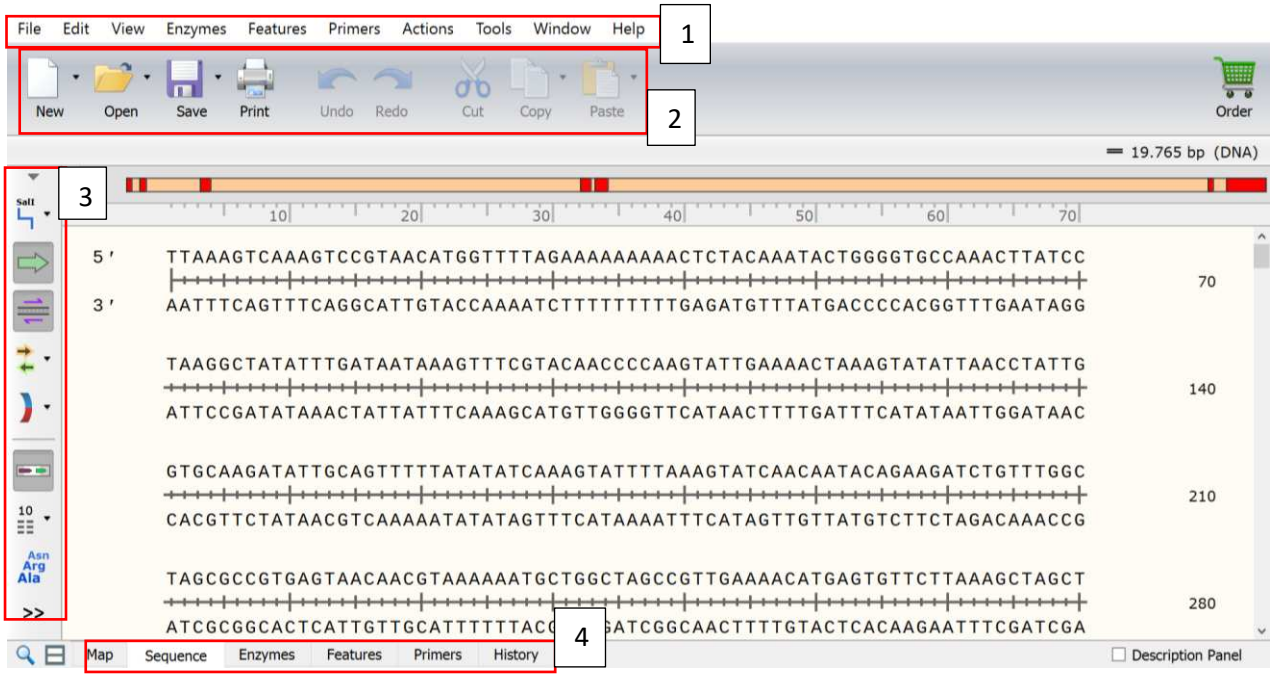


Figura 16 Facciata principale del programma SNAPGENE. Evidenziate in rosso sono mostrate le 4 sezioni di comandi che il programma offre all'utente per lavorare su una sequenza genica o amminoacidica.

3.9 CRISPResso2 e dati provenienti dal MiSeq di Illumina.

I dati del sequenziamento, provenienti dal sequenziatore di seconda generazione MiSeq di illumina, sono stati forniti tramite dei file FASTQ di output (Il formato FASTQ è un formato basato su testo per memorizzare sia una sequenza biologica, solitamente una sequenza nucleotidica, sia i punteggi di qualità corrispondenti. Sia la lettera di sequenza che il punteggio di qualità sono codificati ciascuno con un singolo carattere ASCII per brevità.) e sono stati analizzati tramite il software CRISPResso2, programma progettato per consentire un'interpretazione rapida e intuitiva degli esperimenti di modifica del genoma. Il software ci ha fornito i dati inerenti ad ogni pozzetto della flowcell di Illumina in cui erano stati amplificati e sequenziati gli ampliconi per ogni pianta mutante, attraverso dei link che riportavano alla pagina web del programma.
La prima sezione della pagina di CRIPSResso2 ci illustra attraverso un istogramma il numero di letture nei file FASTQ di input, dopo la preelaborazione e dopo l'allineamento agli ampliconi. Inoltre, sempre in questa sezione c'è un'altra finestra per la visualizzazione dei parametri impostati per la corsa come: la sequenza dell'amplicone, la sequenza di una guida e parametri impostati dall'utente.

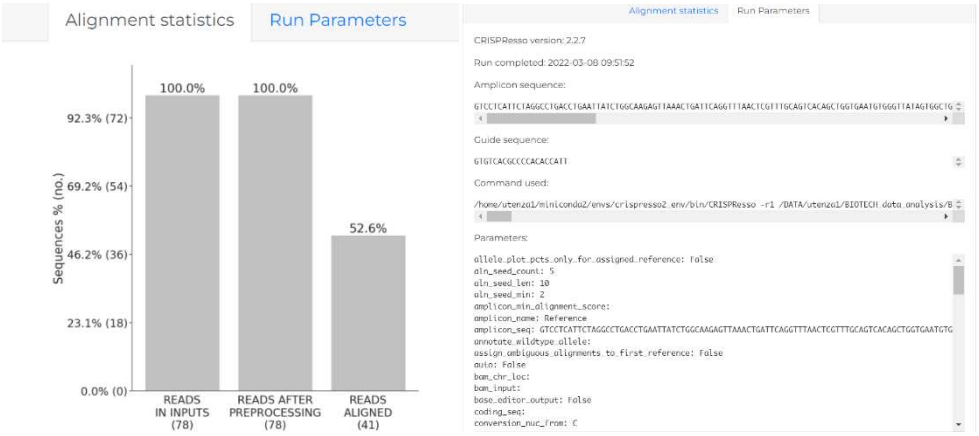


Figura 17 Sulla sinistra è mostrato un Manhattan plot in cui sull'asse delle ascisse sono riportate il numero di reads di input, le reads dopo il processamento e le reads allineate, mentre sull'asse delle ordinate viene mostrata la percentuale occupata dalle sequenze presenti sull'asse delle ascisse. Sulla destra i parametri impostati per il sequenziamento.

Nella seconda sezione sono presenti due grafici che mostrano le frequenze di allineamento e modifica delle letture, determinate dalla percentuale e dal numero di reads della sequenza che mostra alleli non modificati e modificati, visualizzabili o tramite un grafico a torta o un barplot.

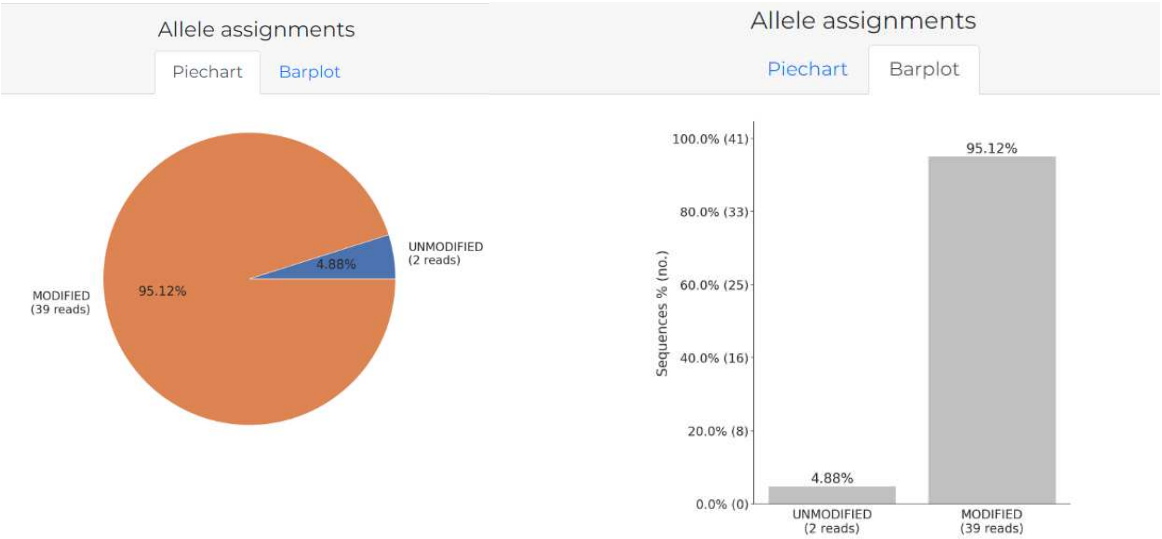


Figura 18 Due differenti grafiche che mostrano le frequenze di allineamento e modifica delle reads prodotte dal sequenziatore.

La terza sezione è composta da due figure:

la prima mostra la distribuzione dei nucleotidi dell'amplicone di riferimento, nel quale viene mostrata la percentuale di ciascuna base osservata nelle letture di sequenziamento (A = verde; C = arancione; G = giallo; T = viola). Le barre nere mostrano la percentuale di letture per le quali quella base è stata eliminata. Le barre marroni tra le basi mostrano la percentuale di letture che hanno un inserimento in quella posizione.

La seconda figura mostra la distribuzione nucleotidica attorno alla sgRNA (single guide) nella quantification window, precedentemente impostata dall'utente.

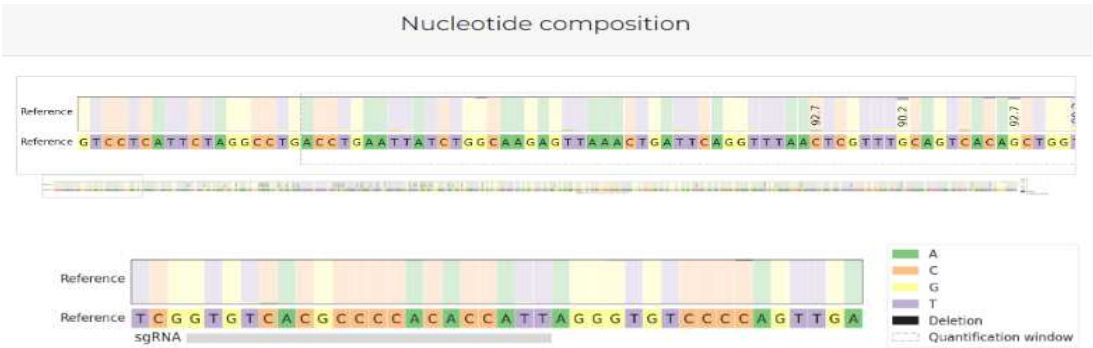


Figura 19 Immagini che mostrano la distribuzione dei nucleotidi nell'amplicone di riferimento sopra ed in prossimità della guida sotto.

Nella quarta sezione sono presenti due finestre. La prima finestra ha un grafico che riassume la distribuzione di frequenza degli alleli con indel (blu) e senza indel (rosso). Nella seconda finestra sono presenti 3 grafici: il pannello di sinistra mostra la distribuzione di frequenza delle modifiche di sequenza che aumentano la lunghezza di lettura rispetto all'amplicone di riferimento perciò classificate come inserzioni (dimensione indel positiva).
Il pannello centrale mostra la distribuzione di frequenza delle modifiche di sequenza che riducono la lunghezza di lettura rispetto all'amplicone di riferimento, classificate come delezioni (dimensione indel negativa).
Nel pannello di destra è mostrata la distribuzione di frequenza delle modifiche di sequenza che non alterano la lunghezza di lettura rispetto all'amplicone di riferimento, classificate come sostituzioni (numero di posizioni sostituite mostrate).

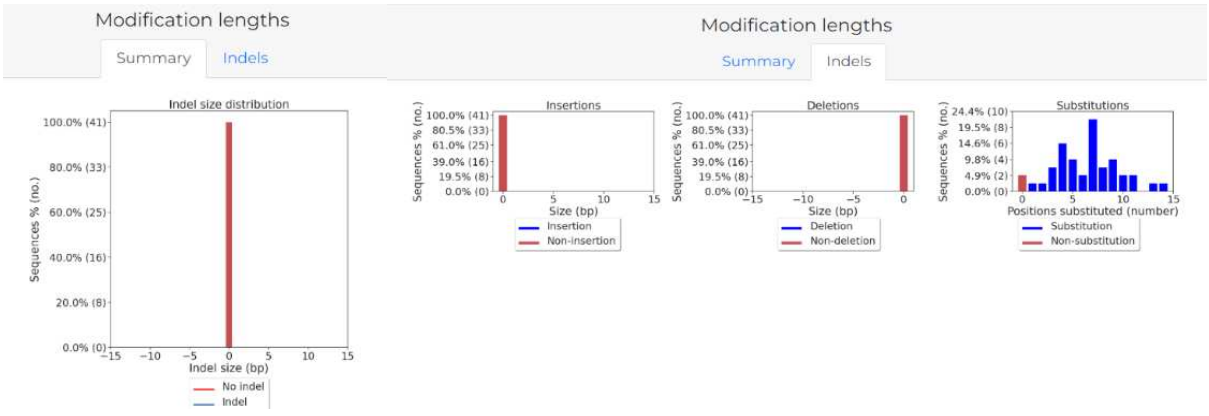


Figura 20 Grafici che riassumono la distribuzione degli alleli contenenti inserzioni, delezioni e sostituzioni.

La quinta sezione ha 4 finestre, nella prima è mostrato un grafico della frequenza combinata di qualsiasi mutazione (inserzioni, delezioni, sostituzioni) lungo l'intero amplicone. Vengono visualizzate anche le modifiche al di fuori della finestra di quantificazione. Nella seconda finestra è descritta la frequenza di inserzioni (rosso), delezioni (viola) e sostituzioni (verde) nell'intero amplicone, comprese le modifiche al di fuori della finestra di quantificazione ovvero una sezione impostata dall'utente in uno specifico locus nella quale si vogliono visualizzare le mutazioni ottenute dall'editing. La terza finestra è uguale alla quarta ma indica solo le modifiche che si sovrappongono alla finestra di quantificazione. Nella quarta finestra sono mostrati due grafici che descrivono la dimensione di inserimento dipendente dalla posizione (a sinistra) e dimensione di eliminazione (a destra), comprese solo le modifiche che si sovrappongono alla finestra di quantificazione.

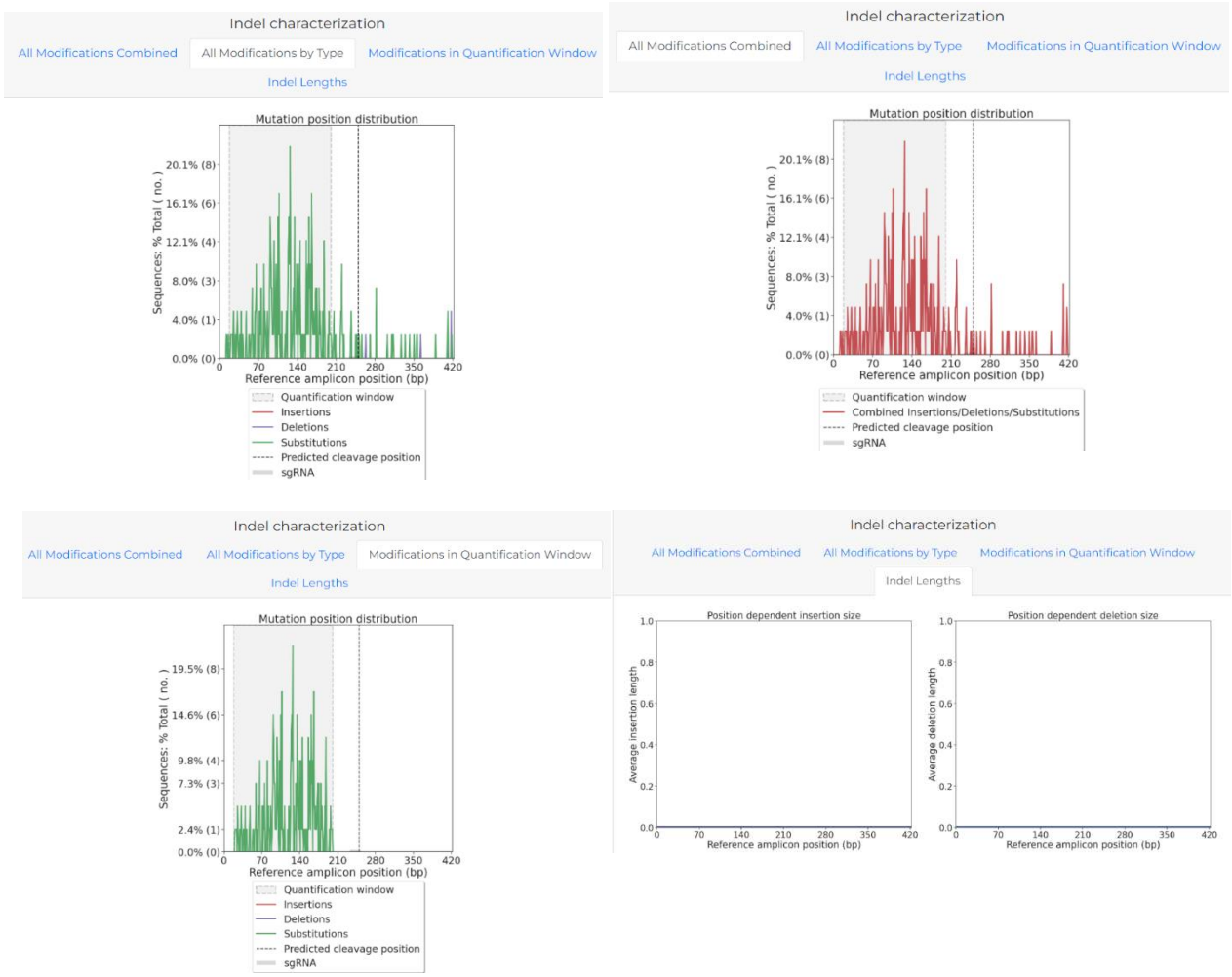


Figura 21 Grafici mostranti la distribuzione di frequenza di mutazioni nell'intero amplicone e nella finestra di quantificazione.

Nella sesta e ultima sezione è presente un Allele plot che consente la visualizzazione della distribuzione degli alleli identificati attorno al sito di taglio per il sgRNA. I nucleotidi sono indicati da colori univoci (A = verde; C = rosso; G = giallo; T = viola). Le sostituzioni sono mostrate in grassetto. I rettangoli rossi evidenziano le sequenze inserite. Le linee tratteggiate orizzontali indicano le sequenze eliminate dall'editing. La linea tratteggiata verticale indica il sito di scissione previsto.

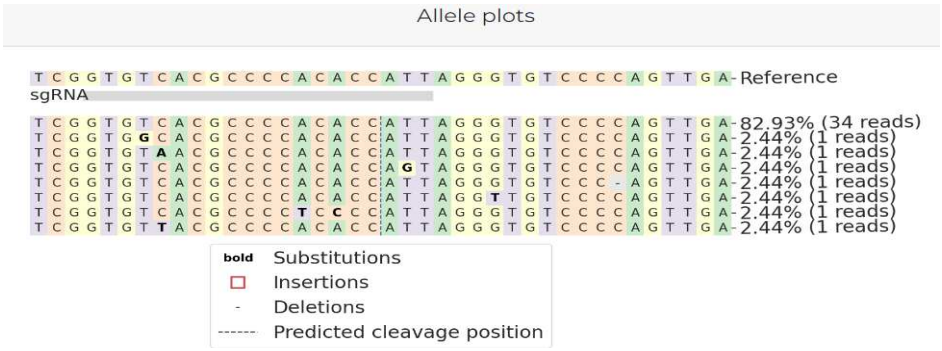


Figura 22 Immagine mostrante la distribuzione degli alleli identificati nel sito di taglio della Cas9.

Tra questi dati fornitici dal software CRISPResso2 sono stati scelti quelli di maggiore interesse quali: il numero di reads allineate e il numero di reads processate, le indel prodotte dall'editing (nel nostro caso delezioni) ricavate dalla distribuzione dei nucleotidi lungo l'amplicone nella terza sezione, ed il genotipo della mutazione ricavato dall'allele plot. Con i dati selezionati è stato creato un file Excel.

Con Expasy translate (https://web.expasy.org/translate/), uno strumento bioinformatico che permette la traduzione di una sequenza nucleotidica (DNA/RNA) in una sequenza proteica, è stato possibile effettuare una predizione delle sequenze amminoacidiche della proteina FUWA a seguito dell'editing, inserendo la sequenza nucleotidica del cDNA delle linee B3890 e B3878.

4.Risultati

4.1 Analisi in silico della struttura del gene FUWA di frumento duro e del suo profilo di espressione

Precedentemente al mio lavoro di tesi, il gene codificante per la proteina FUWA in frumento duro è stato identificato tramite analisi BLAST (Basic Local Alignment Search Tools - https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/). In particolare, è stata utilizzata la sequenza genomica del gene di riso (LOC_Os02g13950 Appendice 1) come query contro la banca dati della sequenza genomica del frumento duro cv Svevo (Maccaferri et al., 2019). Questa analisi ha permesso di indentificare due geni omeologhi sui cromosomi 6A (TRITD6Av1G100490 - posizione genomica 6A: 270,171,952-270,190,995) e 6B (TRITD6Bv1G115800 posizione genomica 6B: 373,410,600-373,420,244); questi geni saranno di seguito indicati come FUWA-A e FUWA-B. La struttura esoni-introni dei geni FUWA-A e FUWA-B è mostrata in Figura 23.

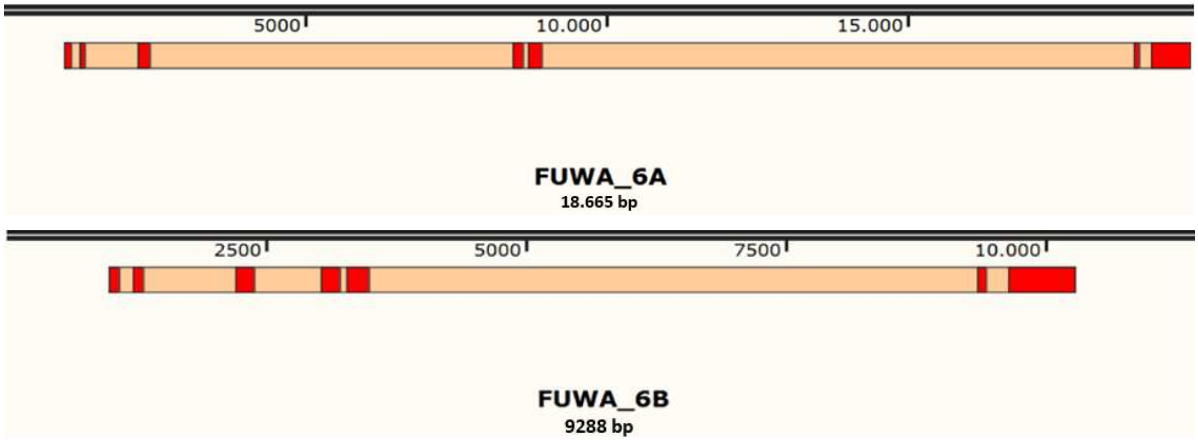


Figura 23 Rappresentazione grafica della struttura dei geni FUWA-A e FUWA-B. Gli esoni sono rappresentati in rosso, gli introni in arancio salmone. I due omeologhi differiscono principalmente per la lunghezza degli introni.

Osservando l'annotazione dei geni FUWA-A e FUWA-B sul genome browser "Ensembl Plants" (https://plants.ensembl.org/Multi/Tools/Blast), è possibile notare che sono predetti 3 trascritti (TRITD6Av1G100490.1, TRITD6Av1G100490.2 e TRITD6Av1G100490.3) per il gene FUWA-A e 4 trascritti per il gene FUWA-B (TRITD6Bv1G115800.1, TRITD6Bv1G115800.2, TRITD6Bv1G115800.3, TRITD6Bv1G115800.4) (Figura 24).

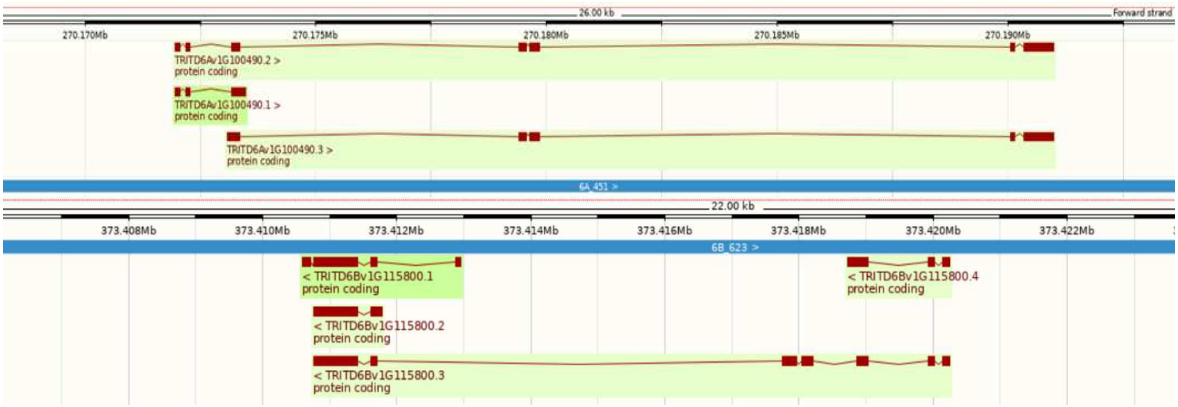


Figura 24 Annotazione dei geni FUWA-A e FUWA-B e rappresentazione grafica delle isoforme predette.

Per capire quale dei trascritti fosse quello più simile al trascritto di riso abbiamo allineato le sequenze codificanti (CDS) delle isoforme di FUWA-A e FUWA-B con la CDS del gene di riso. La figura 25a mostra l'allineamento multiplo, eseguito con l'algoritmo di ClustaW, tra le CDS delle isoforme di FUWA-A e la CDS di OsFUWA. Il risultato ottenuto indica l'isoforma n. 2 (TRITD6Av1G100490.2) come la più simile al trascritto di riso. L' isoforma TRITD6Av1G100490.1 mostra una sequenza con un sito di terminazione precoce rispetto alla CDS di riso, mentre l'isoforma TRITD6Av1G100490.3 presenta un codone di inizio tardivo.

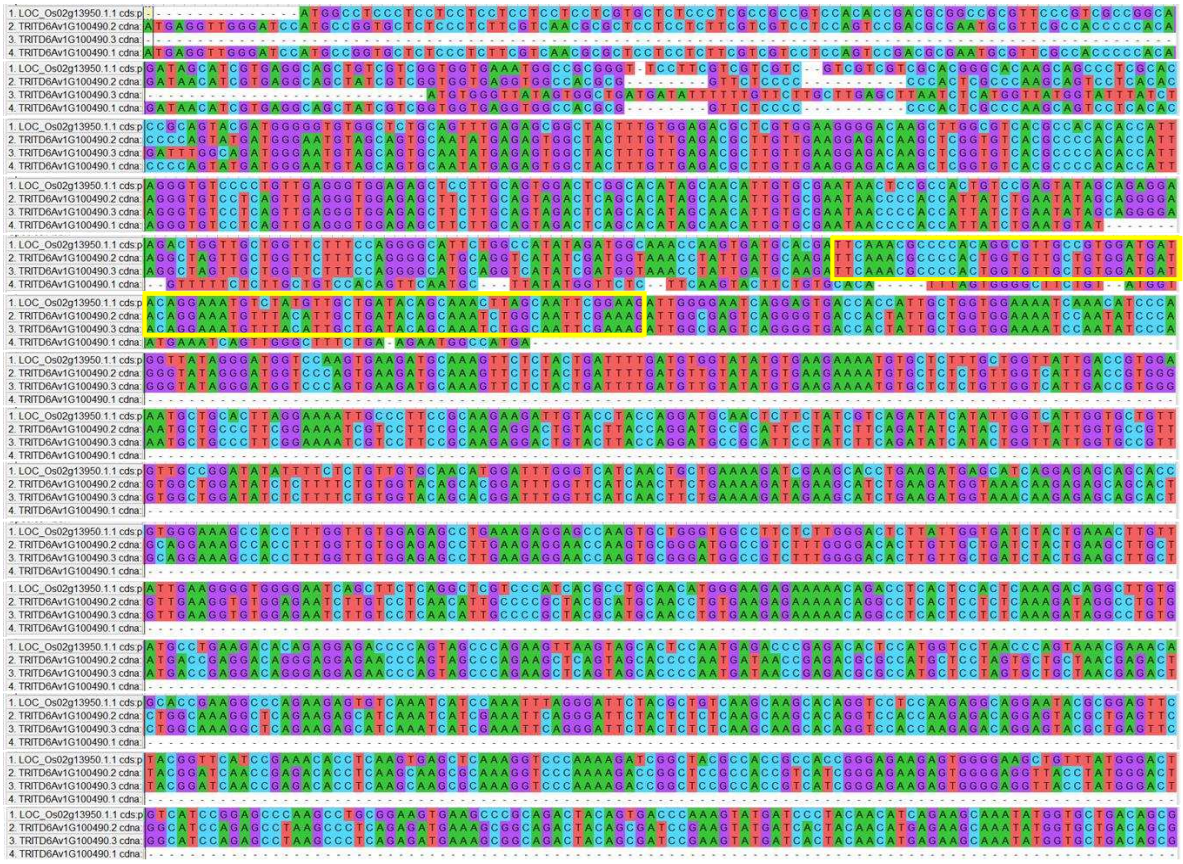


Figura 25a. Allineamento multiplo tra la CDS del gene FUWA di riso e le CDS delle tre isoforme predette per il gene FUWA-A (TRITD6Av1G100490.1, TRITD6Av1G100490.2 e TRITD6Av1G100490.3). Il quadrante evidenziato in giallo indica i nucleotidi codificanti il dominio NHL.

L’allineamento multiplo mostrato in figura 25b è stato eseguito con le CDS delle isoforme di FUWA-B e la CDS di riso, in questo caso l’isoforma n.3 (TRITD6Bv1G115800.3) è quella più simile al trascritto di riso. L’ isoforma TRITD6Bv1G115800.4 mostra una sequenza con un sito di terminazione precoce rispetto alla sequenza di riso, mentre le isoforme TRITD6Bv1G115800.1 e TRITD6Bv1G115800.2 presentano un codone di inizio tardivo.

Figura 25b Allineamento multiplo tra la CDS di riso e le CDS delle quattro isoforme predette per il gene FUWA-B dal genome browser di Ensembl Plants. Nel quadrante evidenziato in giallo è possibile notare la sequenza nucleotidica codificante per il dominio NHL della proteina FUWA.

Ulteriore conferma è stata ottenuta confrontando la sequenza amminoacidica della proteina di riso con le sequenze amminoacidiche delle isoforme predette in frumento duro. Gli allineamenti multipli riportati nelle figure 26a e 26b confermano che la traduzione dell'isoforma TRITD6Av1G100490.2 di FUWA-A (Figura 26a) e quella dell'isoforma TRITD6Bv1G115800.3 di FUWA-B (Figura 26b) sono quelle che mostrano maggiore similarità alla proteina di riso.

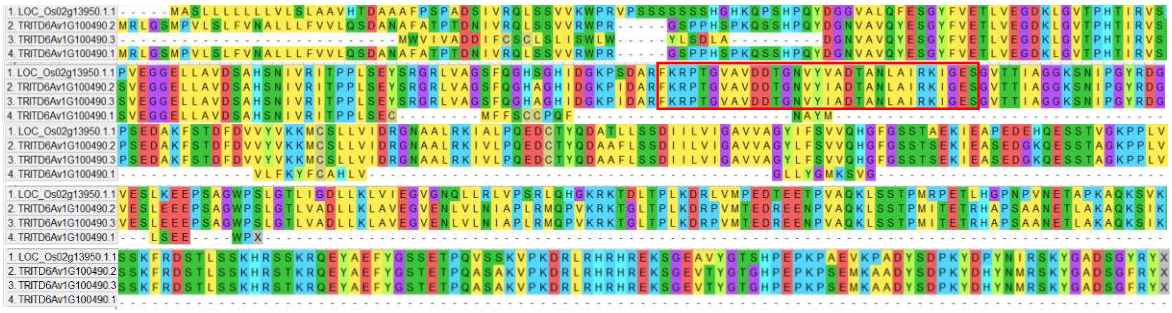


Figura 26a Allineamento multiplo tra le sequenze amminoacidiche della proteina FUWA di riso e le proteine codificate dalle isoforme predette per il gene FUWA-A. Nel riquadro in rosso il dominio proteico NHL

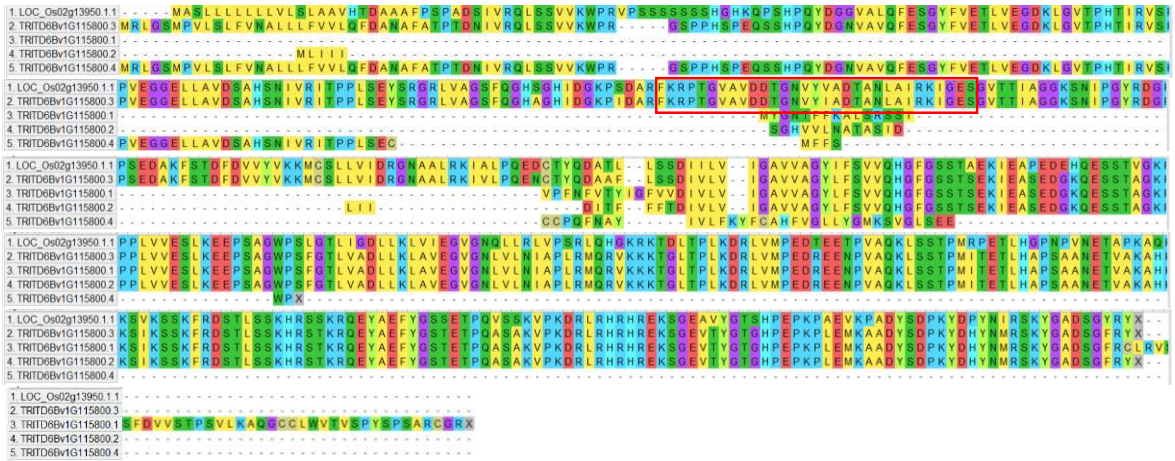


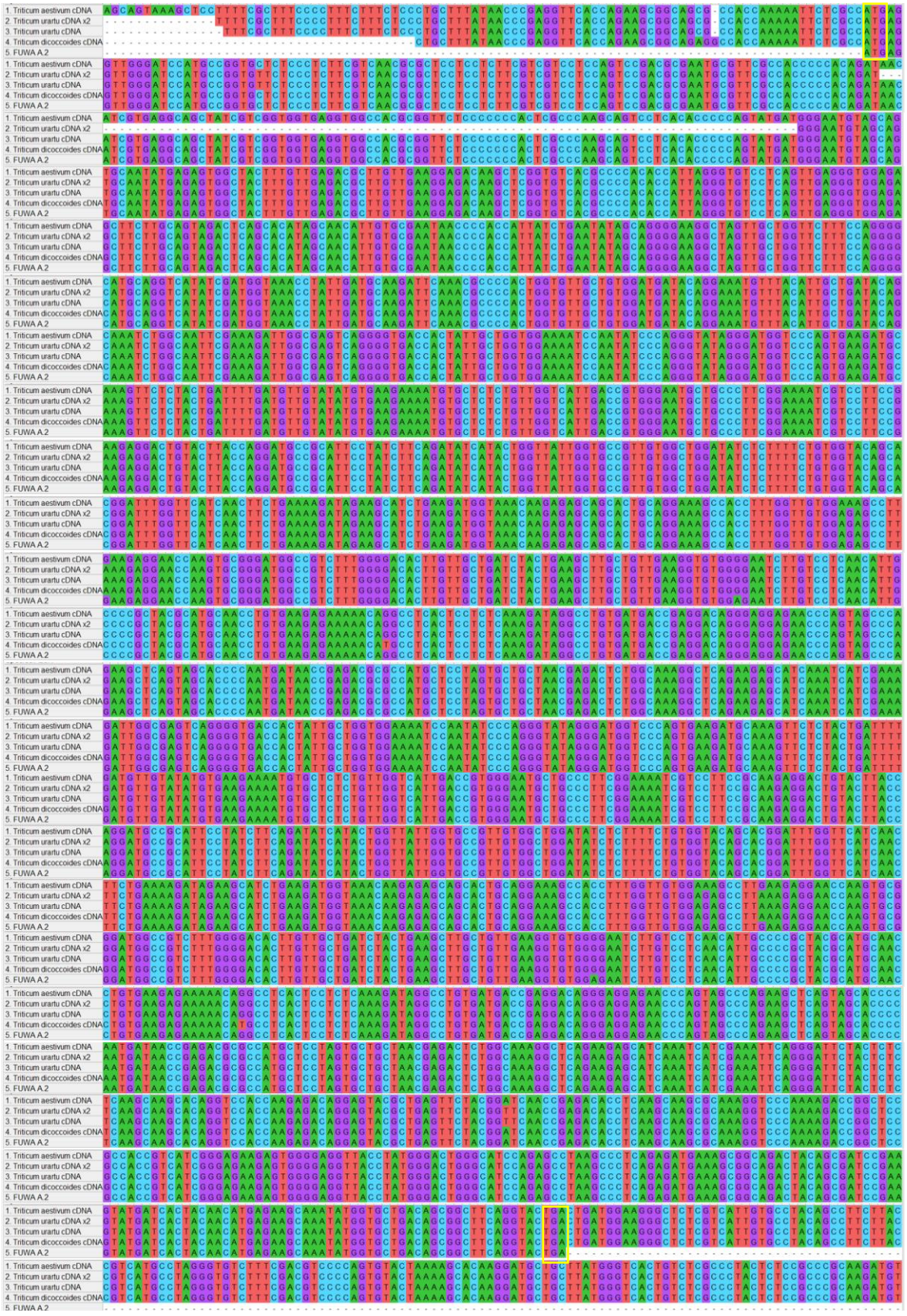
Figura 26b Allineamento multiplo tra le sequenze amminoacidiche della proteina FUWA di riso e le proteine codificate dalle isoforme predette per il gene FUWA-B. Nel riquadro in rosso il dominio proteico NHL.

Abbiamo inoltre deciso di utilizzare la banca dati dei trascritti (Reference RNA sequence) e quella delle sequenze espresse (EST - Expressed Sequence Tags), entrambe disponibili sul sito dell'NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/), sia per verificare l'esistenza di trascritti dei geni FUWA-A e FUWA-B sia per avere informazioni riguardo la lunghezza delle regioni trascritte e non tradotte, 5'-UTR e 3'-UTR. Abbiamo quindi svolto un'analisi BLAST utilizzando come query le isoforme predette per FUWA-A e FUWA-B e selezionando come organismo la tribù delle Triticeae. L'analisi BLAST ha identificato le seguenti EST:

- A Triticum aestivum, uncharacterized LOC123127431 (LOC123127431), mRNA
- Triticum dicoccoides, uncharacterized LOC119321963 (LOC119321963), mRNA

- Triticum urartu, uncharacterized LOC125512997 (LOC125512997), transcript variant X2, mRNA
- Triticum urartu, uncharacterized LOC125512997 (LOC125512997), transcript variant X1, mRNA
- Triticum aestivum, uncharacterized LOC123144525 (LOC123144525), transcript variant X1, mRNA
- Triticum aestivum, uncharacterized LOC123144525 (LOC123144525), transcript variant X2, mRNA
- A Triticum dicoccoides, uncharacterized LOC119316782 (LOC119316782), mRNA

Confrontando diverse EST ottenute dall'NCBI è stato prodotto un allineamento multiplo, dal quale è stato possibile individuare le ipotetiche regioni 5' e 3' UTR (Figura 27a e 27b). Nella banca dati dell'NCBI non abbiamo trovato EST specifiche di frumento duro.


1. Triticum aestivum cDNA
2. Triticum urartu cDNA x2
3. Triticum urartu cDNA
4. Triticum dicoccoides cDNA
5. FUWA A.2

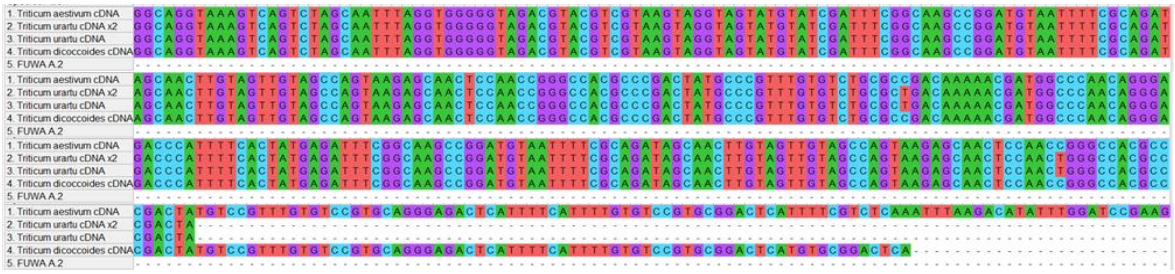


Figura 27a Allineamento multiplo tra le sequenze nucleotidiche dei trascritti identificati nella banca dati delle EST a confronto con l'isoforma TRITD6Av1G100490.2 (FUWA-A.2). In giallo sono evidenziati il codone di start e di stop, a monte e a valle rispetto a questi codoni si trovano le sequenze 5'-UTR e 3'-UTR. Per il T. aestivum e per il T. dicoccoides sono state scelte le EST trascritte dal genoma A.

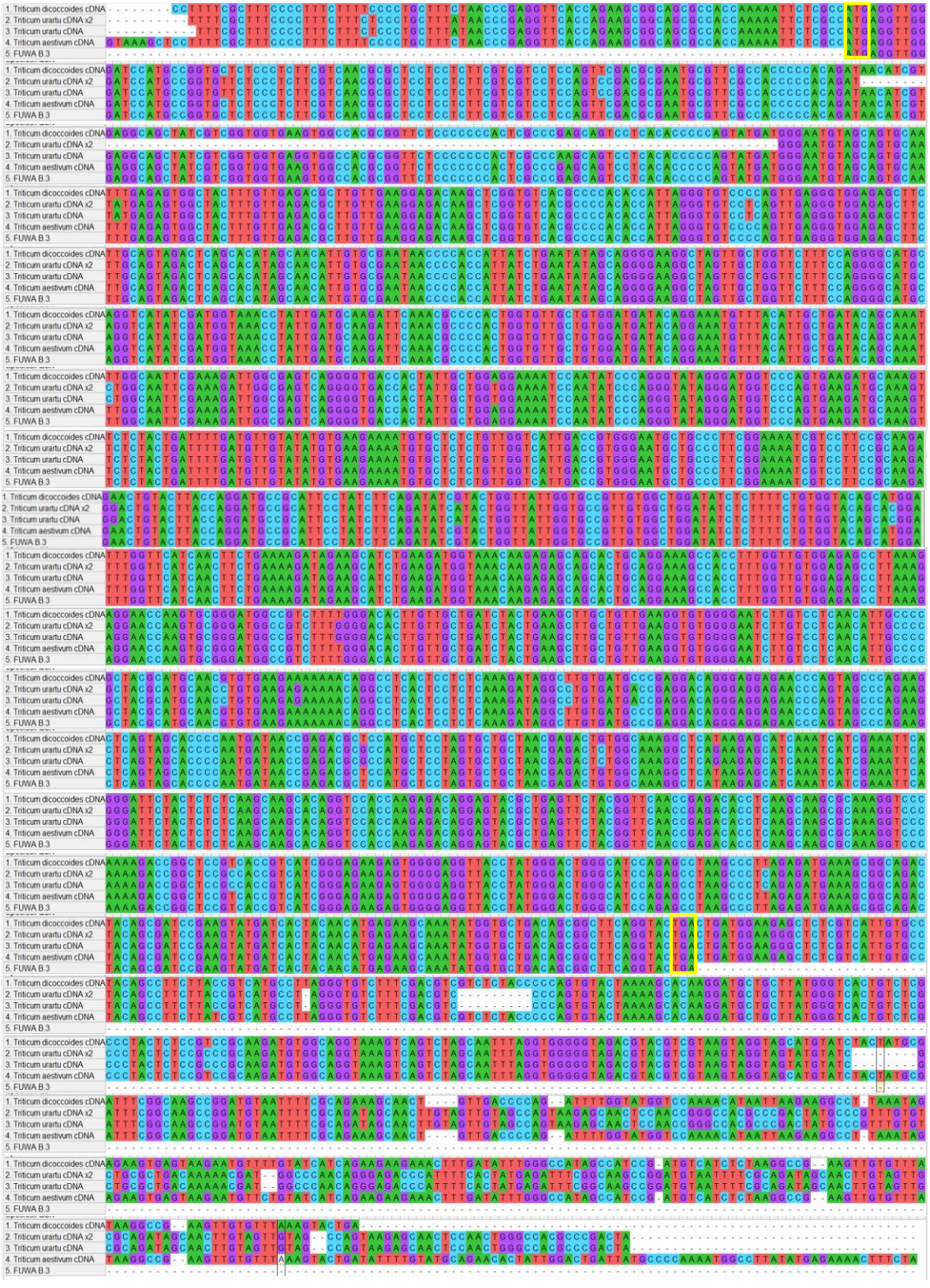


Figura 27b Allineamento multiplo tra le sequenze nucleotidiche dei trascritti identificati nella banca dati delle EST a confronto con l'isoforma FUWA-B.3). In giallo sono evidenziati il codone di start e di stop, a monte e a valle rispetto a questi codoni si trovano le sequenze 5'-UTR e 3'-UTR. Per il T. aestivum e per il T. dicoccoides sono state scelte le EST trascritte dal genoma B.

.

Utilizzando la piattaforma web InterProScan

(https://www.ebi.ac.uk/interpro/result/InterProScan/iprscan5-R20220928-112643-0382-14149844-p1m/) è stata utilizzata la sequenza amminoacidica di 493 amminoacidi codificata dal gene FUWA-B, ricavata dal genome browser di Ensembl Plants, per trovare il dominio funzionale della proteina definito '' NHL repeat-containing protein''il quale è codificato dal quarto esone.

Per avere informazioni riguardo il profilo di espressione del gene FUWA abbiamo utilizzato dati disponibili on-line ottenuti da esperimenti condotti su frumento tenero. Frumento duro e tenero sono infatti due specie molto vicine dal punto di vista filogenetico e ci aspettiamo una elevata conservazione dei meccanismi di regolazione genica. Abbiamo quindi utilizzato la piattaforma web expVIP (http://www.wheat-expression.com/) che consente di visualizzare i dati di espressione ottenuti da diversi esperimenti di sequenziamento dei trascritti (RNA-seq) (Borrill P et al., 2016).Per utilizzare la piattaforma è necessario indicare l'I.D del gene di interesse, ma non conoscendo il codice del gene FUWA in frumento tenero è stato eseguito un BLAST usando come query la sequenza genomica di TdFUWA-B (TRITD6Bv1G115800) in una sezione dedicata all'interno del browser di expVIP (BLAST Scaffold – step 2 in Figura 28) selezionando inoltre il database nucleotidico da cui si vogliono estrapolare i dati (Step 3 in Figura 28), così da ottenere il profilo di espressione del gene omologo in frumento tenero. È consigliato inoltre selezionare gli esperimenti di RNA-seq a cui si è interessati (Step 1 nella Figura 30). Nel nostro caso sono stati selezionati gli esperimenti correlati allo sviluppo della pianta tralasciato quelli condotti in condizioni di stress biotici ed abiotici.

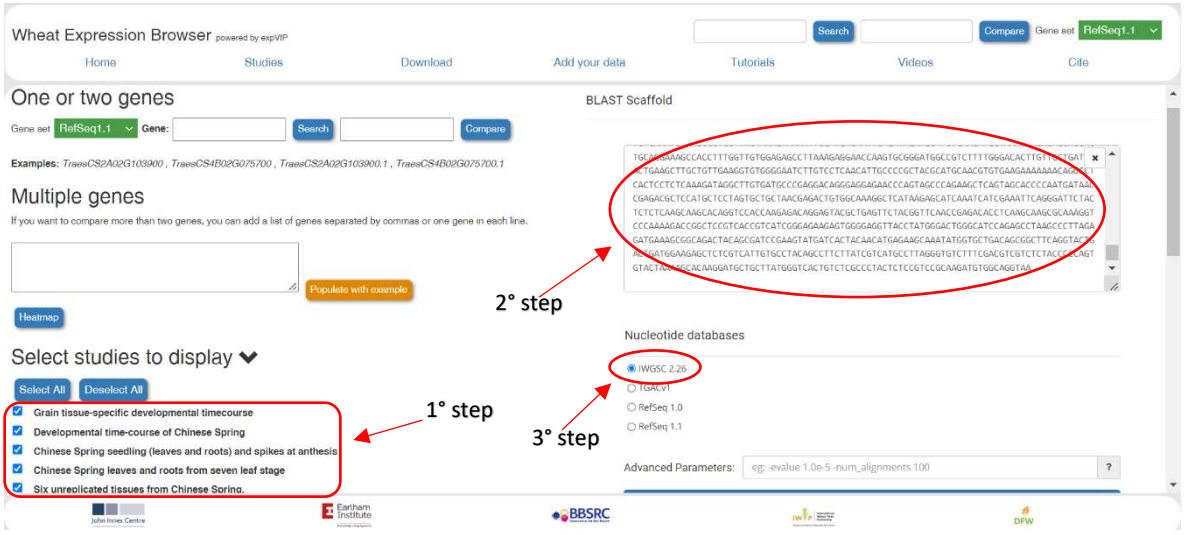


Figura 28 Rappresentazione grafica della piattaforma web expVIP. Nell'immagine sono elencati i tre step principali per l'analisi del profilo trascrizionale di un gene in frumento tenero di cui non si conosce il codice identificativo.

I risultati possono essere visualizzati in diversi modi. Tramite heat-map (figura 29) (in questo esempio sono mostrati i dati dei trascritti provenienti dal genoma B) sono riportati i tessuti e gli stadi di

sviluppo in cui il gene è espresso nell'intervallo di valori indicato nella scala colorimetrica. In particolare, possiamo osservare che agli stadi di sviluppo che vanno dallo stadio di germinazione (seedling stage) allo stadio di pianta a 5 foglie (fifth leaf stage) il gene FUWA è molto espresso a livello dell'apparato radicale, in particolare nei meristemi radicali (root meristem) e negli apici meristematici (shoot meristem) da cui si differenzieranno le spighe. Mentre agli stadi di sviluppo che intercorrono tra lo stadio di foglia bandiera (flaf leaf stage) fino allo stadio di maturazione del seme (ripening) possiamo notare una colorazione rosso accesso, quindi indicante un maggior numero di trascritti in quei tessuti a quegli stadi, in corrispondenza della spiga (full boot), degli internodi dei culmi (shoot axis), dell'ovario (ovary) e del seme che si trova ai primi stadi di maturazione (grain).

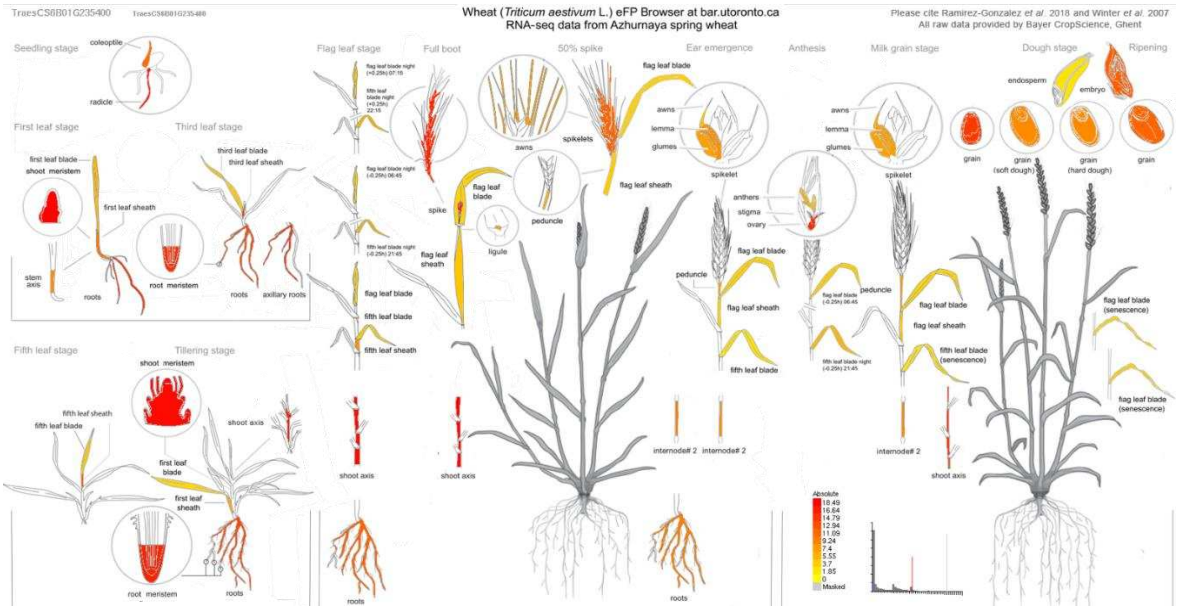


Figura 29 Heat-map della localizzazione tissutale del trascritto del gene FUWA in T. aestivum ai vari stadi fenologici.

In alternativa alla visualizzazione tramite heat-map è possibile conoscere i valori di espressione (qui indicati come "count" ossia "conteggio dei trascritti" nei tessuti selezionati). Nella tabella 1 sono riportati i valori di espressione dei geni FUWA-A (Traes_6AS_1CD9C09DD.1), FUWA-B (Traes_6BL_4B962DA1E.1) e FUWA-D (Traes_6DS_207D94B97.2) di frumento tenero nei tessuti e negli stadi di sviluppo che abbiamo selezionato:

- "High level tissue"indica in maniera macroscopica da quale tessuto sono stati prelevati i campioni successivamente processati per l'analisi di RNA-seq:seme, foglie/culmi, radici e spiga;
- "Tissue" indica in modo più dettagliato il tessuto che è stato analizzato

- “High level age” spiega in modo macroscopico a che stadio di sviluppo si trovava la pianta nel momento in cui è stato prelevato il campione da un determinato compartimento anatomico per l’analisi di RNA-seq: stadio di germinazione, vegetativo e riproduttivo;
- “Age” indica con maggiore precisione lo stadio fenologico della pianta al momento del prelievo del campione di tessuto.

Nelle ultime tre colonne della tabella è riportato il conteggio dei trascritti corrispondenti ai geni FUWA-A, FUWA-B e FUWA-D. La scala di colore delle ultime tre colonne indica in quali tessuti il gene è più espresso e se ci sono differenze di espressione nei geni dei tre genomi. Come si vede nella tabella 1 il gene FUWA è principalmente espresso con un massimo di 2048,88 count allo stadio di Ear emergence (momento in cui è possibile intravedere la punta della spiga fuoriuscire dalla guaina) nei tessuti della spiga nel genoma B, immediatamente seguito dallo stadio di pianta a 7 foglie nei tessuti radicali con 1645,24 count con una maggior prevalenza nel genoma B, nel seme allo stadio di maturazione lattea (milk grain stage) con 1511 count nel genoma B e a 4 giorni dall’inizio della germinazione nella prima fogliolina emersa con 1233 count ancora una volta nel genoma B.

High level tissue	Tissue	High level age	Age	Traes_6AS_1CD9C09DD.1	Traes_6BL_4B962DA1E.1	Traes_6DS_207D94B97.2
				count	count	count
grain	grain	reproductive	2 dpa	415,7365	455,0725	333,691
grain	whole endosperm	reproductive	10 dpa	56,872175	198,7155	115,41235
grain	grain	reproductive	milk grain stage	707,017	1511	862,983
grain	grain	reproductive	14 dpa	86,73045	180,517	121,253
grain	starchy endosperm	reproductive	20 dpa	13,7724925	57,5646	34,412925
grain	whole endosperm	reproductive	20 dpa	37,2371	95,69395	52,318825
grain	aleurone layer	reproductive	20 dpa	162,4733333	233,6055	225,4215
grain	trasfer cells	reproductive	20 dpa	30,5025	128,6038	69,89365
grain	grain	reproductive	30 dpa	416,423	647,6775	256,9
grain	starchy endosperm	reproductive	30 dpa	15,936635	39,08695	27,976375
grain	aleurone layer and starchy endosperm	reproductive	30 dpa	71,759	97,37785	61,86305
leaves/shoots	seedling	seedling	4 days	957,125	1233	1004,87
leaves/shoots	leaf	seedling	seedling stage	189,2445	236,5205	191,2345
leaves/shoots	leaf	vegetative	14 days	38,72454	123,28238	59,9931
leaves/shoots	leaf	vegetative	three leaf stage	191,3038524	538,6492381	283,4279048
leaves/shoots	shoots	vegetative	24 days	17,79548833	49,73788333	34,63325
leaves/shoots	leaf	vegetative	tillering stage	139,154	187,135	148,211
leaves/shoots	shoots	vegetative	fifth leaf stage	41,8685125	113,1590125	69,0974
leaves/shoots	fourth leaf	vegetative	seven leaf stage	380,49675	721,54075	518,2125
leaves/shoots	leaf	vegetative	seven leaf stage	300,08	671,543	413,377
leaves/shoots	stem	vegetative	1 cm spike	500,557	707,23	596,713
leaves/shoots	stem	vegetative	two nodes detectable	352,926	698,1915	525,8825
leaves/shoots	flag leaf	reproductive	Ear emergence	36,5226	132	72,4774
leaves/shoots	stem	reproductive	anthesis	187,967	415,8735	229,1585
leaves/shoots	flag leaf	reproductive	anthesis	25,4085	117	61,5915
leaves/shoots	leaf	reproductive	2 dpa	18,35815	108,17375	53,9679
leaves/shoots	stem	reproductive	milk grain stage	154,926	694,68	340,394
leaves/shoots	flag leaf	reproductive	15 dpa	37,0133	198,679	97,308
leaves/shoots	flag leaf	reproductive	25 dpa	31,8663	123,596	67,538
leaves/shoots	flag leaf	reproductive	30 dpa	10,6584	104	40,3416
roots	roots	seedling	seedling stage	382,7515	498,286	329,9625
roots	roots	vegetative	14 days	272,6398	470,2034	286,3568
roots	roots	vegetative	three leaf stage	432,3256667	704,1413333	469,8663333
roots	roots	vegetative	24 days	30,0125	71,97826667	48,50326667
roots	roots	vegetative	fifth leaf stage	265,334	332,571	244,469875
roots	roots	vegetative	seven leaf stage	835,5973333	1645,243333	834,1586667
roots	roots	reproductive	Flag leaf stage	386,4965	658,1425	395,361
spike	spike	vegetative	two nodes detectable (14 days	608,3515	689,728	647,921
spike	spike	reproductive	Flag leaf stage	448,014	698,495	532,9915
spike	spike	reproductive	Ear emergence	1240,44	2048,88	1068,68
spike	spike	reproductive	anthesis	400,149	560,578	394,273
spike	spike	reproductive	anthesis	265,919	429,215	306,865
spike	spike	reproductive	anthesis	427,156	675,362	456,483
spike	stamen	reproductive	anthesis	356,202	609,796	420,002
spike	pistil	reproductive	anthesis	890,609	728,484	649,307
spike	spike	reproductive	anthesis	393,646	576,112	335,7415
spike	rachis	reproductive	anthesis	16,63283	55,31405	24,55322667

Tabella 13 Quantificazione dell’espressione del gene FUWA nei vari tessuti ai vari stadi fenologici e relativa legenda. LEGENDA dpa: giorni dopo l’antesi; milk grain stage: stadio di maturazione lattea del seme; seedling stage: stadio di germinazione; three leaf stage: stadio di pianta a tre foglie; tillering stage: fase di accestimento; fifth leaf stage: stadio di pianta a 5 foglie; seven leaf stage: stadio di pianta a sette foglie; 1 cm spike: spiga emersa per un centimetro; two nodes detectable: due nodi rilevabili; Ear emergence: punta della spiga visibile; flag leaf stage: stadio della foglia a bandiera; anthesis : antesi.

4.2 Identificazione degli alleli prodotti dal genome editing

Precedentemente al mio lavoro di tesi, è stato svolto un esperimento di trasformazione di embrioni di frumento duro varietà Svevo utilizzando dei costrutti che permettessero di ottenere delle mutazioni nei geni FUWA-A e FUWA-B tramite la tecnica del genome editing. Come descritto nell'introduzione, ogni costrutto conteneva due sgRNA (o guide) come indicato in figura 30.

Figura 30 In verde le coppie di SgRNA che guidano l'endonucleasi Cas9 sul gene FUWA nei loci presenti nell'esone2 e 3 dei geni FUWA-A e FUWA-B.

I costrutti sono stati utilizzati contemporaneamente nell'esperimento di trasformazione al fine di aumentare le probabilità di ottenere delle mutazioni. Il mio lavoro di tesi si è focalizzato sulla caratterizzazione genotipica e morfologica di due linee di trasformanti indipendenti indicate con il codice B3890 e B3878. In particolare, abbiamo analizzato 72 piante della linea B3890 appartenenti alla generazione T1 (indicate come B3890-1 fino a B3890-80), e 51 piante della linea B3878 appartenenti alla generazione T2

Per individuare le piante trasformate e conoscere nel dettaglio la mutazione prodotta è stato svolto un esperimento di sequenziamento degli ampliconi utilizzando il sequenziatore ''MiSeq" di Illumina.

Dal DNA estratto da ogni pianta sono stati quindi prodotti due ampliconi: l'amplicone FUWA-1 contiene la regione riconosciuta dalle guide sgRNA1 e sgRNA2 nei genomi A e B mentre l'amplicone FUWA-2 contiene la regione riconosciuta dalle guide sgRNA3 e sgRNA4 in entrambi i genomi (Figura 31a e 31b). A questo scopo, sono stati disegnate delle coppie di oligonucleotidi che si appaiassero sia sul genoma A che sul genoma B (RB156 e Rb157 in figura 31a e RB158 e RB159 in figura 31b).

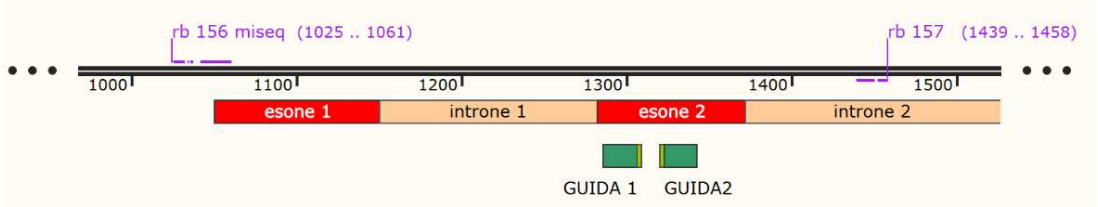


Figura 31a Amplicone 1 prodotto dall'utilizzo dei primer rb156 e rb157.

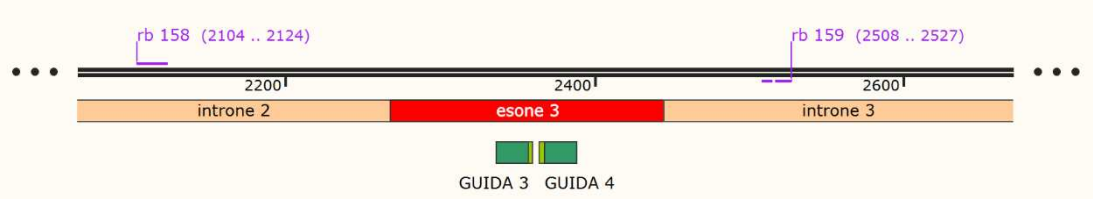


Figura 31b Amplicone 2 prodotto dall'utilizzo dei primer rb158 e rb159.

Il mio lavoro di tesi è iniziato dall'analisi delle sequenze degli ampliconi. A questo scopo, abbiamo utilizzato il software CRISPResso2 che è stato sviluppato appositamente per identificare mutazioni in una regione target indicata dall'operatore. Il software utilizza come input i file di sequenziamento FASTQ grezzi, nel nostro caso provenienti dal MiSeq di Illumina, producendo dei resoconti che descrivono le differenze identificate rispetto alle sequenze di riferimento. A questo scopo, CRISPResso2 allinea le letture di sequenziamento alla sequenza di riferimento evidenziando e quantificando inserzioni, delezioni e mutazioni; questo permette quindi di capire se sia avvenuto editing nel genoma della pianta trasformata e quali alleli sono stati prodotti. I risultati sono riassunti da CRISPResso2 tramite grafici.

I risultati che riportiamo in questo lavoro di tesi riguardano una sola regione genomica indicata come FUWA-2B, il motivo è che i risultati ottenuti per le altre regioni (FUWA-1A; FUWA-1B e FUWA-2A) non sono definitivi e devono essere verificati.
Come si può vedere in figura 32, l'editing ha prodotto due alleli nel gene FUWA-B in corrispondenza della regione riconosciuta dalle guide 3 e 4, identificata come regione FUWA-2B. Abbiamo osservato una delezione di 10 paia di basi negli individui appartenenti alla linea B3890 e di 27 paia di basi negli individui della linea B3878.

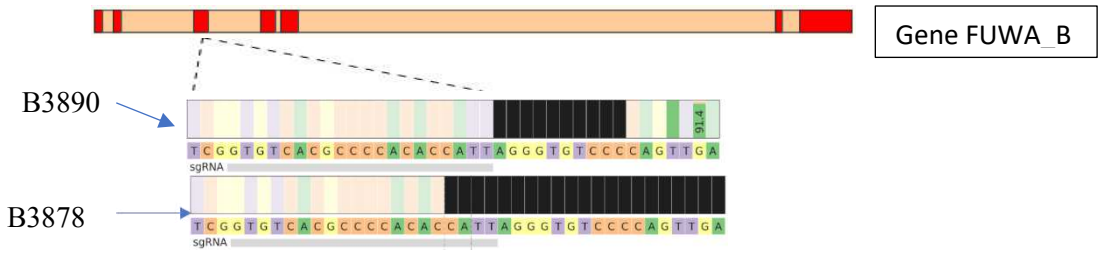


Figura 32 Rappresentazione schematica del gene FUWA-B e delle mutazioni ottenute. I rettangoli neri indicano le basi delete rispetto alla sequenza di riferimento e alla posizione della guida che si appaia nel locus FUWA-2B.

Attraverso l'immagine di Nucleotide Composition viene mostrata dove è avvenuta la mutazione lungo la sequenza dell'amplicone, inoltre, nell'esempio riportato in figura 33a, i rettangoli neri occupano metà della colonna Reference indicando quindi che il 50% degli alleli presentano una delezione, perciò, il locus è in eterozigosi per la mutazione identificata. Negli individui in cui la mutazione è in omozigosi, i rettangoli neri nella colonna Reference occupano l'intera colonna (Figura 33b).

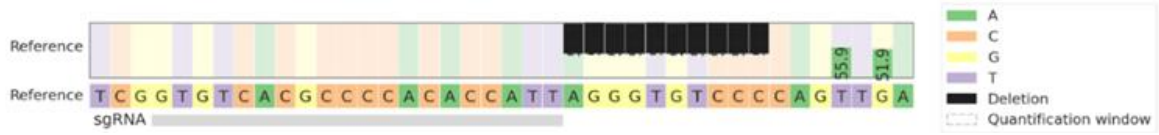


Figura 33a Immagine di Nucleotide Composition mostrante la delezione di 10 paia di basi in eterozigosi in una pianta della linea B3890.

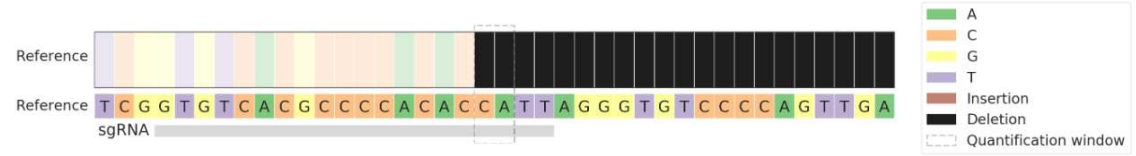


Figura 33b Immagine di Nucleotide Composition mostrante la delezione di 27 paia di basi in omozigosi in una pianta della linea B3878.

Nella rappresentazione schematica di Allele Frequency Table ci ha permesso di visualizzare ed identificare la composizione nucleotidica dei vari alleli in prossimità del sito di taglio della Cas9. Anche in questo grafico è possibile analizzare se la mutazione è in omozigosi o in eterozigosi attraverso l'osservazione delle percentuali degli alleli che presentano o meno la delezione, indicata dalla presenza di trattini. Le differenti reads contenenti sostituzioni a singolo nucleotide (SNP) mostrate in questo grafico e aventi una bassa percentuale di lettura, sono interpretate come errori introdotti durante l'amplificazione o durante la lettura delle sequenze.

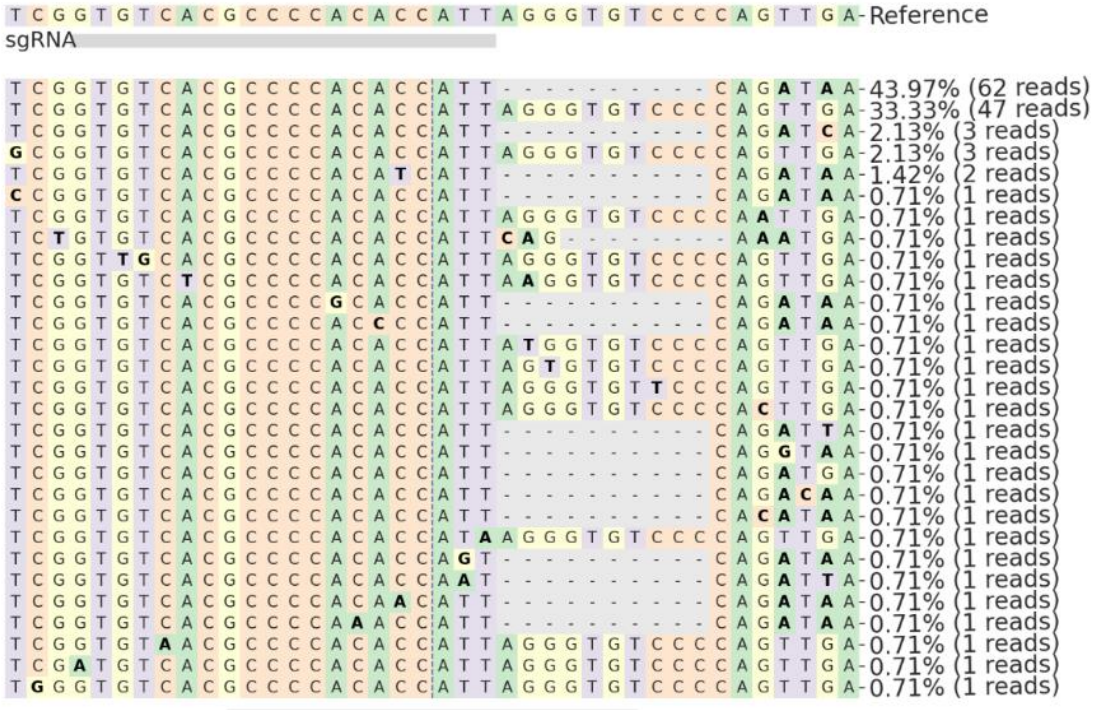


Figura 34a Immagine di Allele Frequancy Table mostrante la delezione di 10 paia di basi in eterozigosi in una pianta della linea B3890. In alto la sequenza di riferimento del gene, in basso le varie reads generate dalla lettura di un cluster di ampliconi.

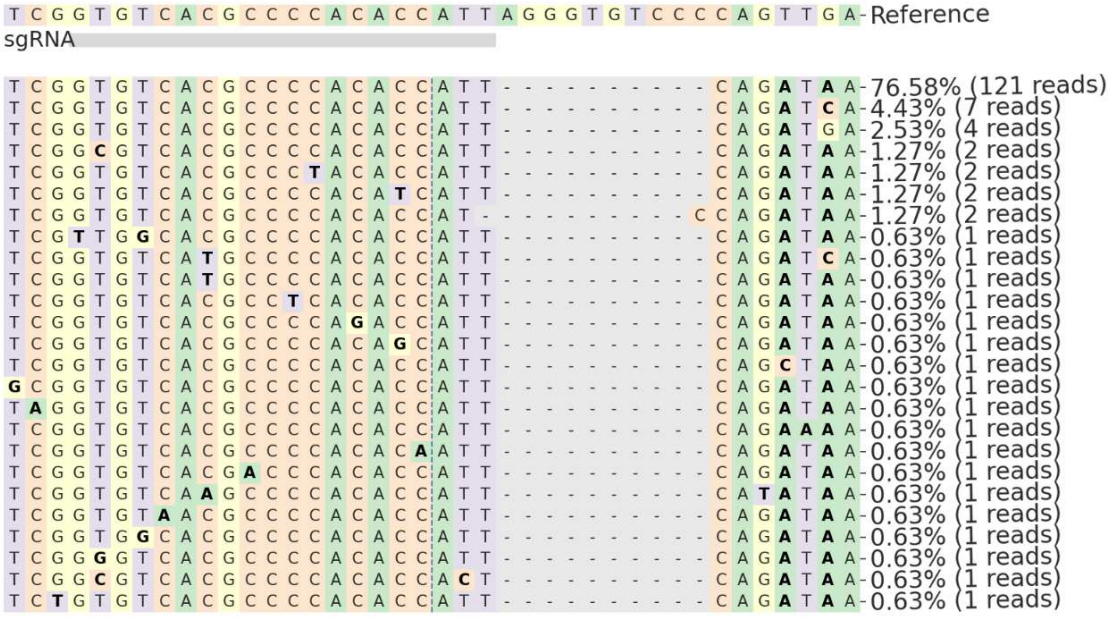


Figura 34b Immagine di Allele Frequency Table mostrante la delezione di 10 paia di basi in omozigosi in una pianta della linea B3890. In alto la sequenza di riferimento del gene, in basso le varie reads generate dalla lettura di un cluster di ampliconi.

I dati ottenuti dal software di CRISPResso2 sono stati organizzati in due file Excel in modo da poter analizzare in un'unica schermata gli alleli prodotti dal genoma editing per entrambe le linee di mutanti;

In totale le delezioni ottenute nella linea di mutanti B3890 per questo locus sono: 32 in eterozigosi, 19 in omozigosi e 13 wild-type in cui non è avvenuta alcuna mutazione
Per la linea di mutanti B3878 abbiamo i dati da 23 piante: 1 wild-type ,22 omozigoti, 0 eterozigoti

Per prevedere come potrebbero essere tradotti gli alleli prodotti dal genome editing nella linea B3890 e nella linea B3978 abbiamo utilizzato la piattaforma web Expasy transale (https://web.expasy.org/translate/) inserendo la sequenza del cDNA rispettivamente della sequenza wild-type, della linea B3890 e della linea B3878. Nell'immagine possiamo notare come per la linea B3890 la proteina prodotta a seguito della delezione di 10 paia di basi comporti l'interruzione della fase di lettura e venga prodotta una proteina tronca mancante del dominio funzionale NHL, mentre ciò non accade alla proteina prodotta a seguito della delezione di 27 paia di basi, anche se la perdita di 27 nucleotidi potrebbe comportare l'alterazione della funzione della proteina attraverso la perdita di una porzione di un dominio proteico, come infatti possiamo notare la proteina è più breve.

Wilde Type

Delezione 10bp

Delezione 27bp

Figura 35 Rappresentazione della predizione delle sequenze amminoacidiche della proteina FUWA con le mutazioni di 10 e 27 bp e senza, generate attraverso il programma Expasy translate. In rosso è evidenziato il dominio NHL.

Delezione 10 bp

Delezione 27 bp

Figura 36 Rappresentazione della predizione delle sequenze amminoacidiche della proteina FUWA con la delezione di 10 e 27 paia di basi utilizzando dei frame di lettura alternativi. Nessuna contiene il dominio NHL.

4.3 Analisi del gene FUWA-A nelle piante della linea B3890

Come descritto nel paragrafo precedente, i dati di sequenziamento degli ampliconi hanno permesso di conoscere quale mutazione fosse avvenuta nel genoma B nel locus codificante per il gene FUWA, per quanto riguarda invece il gene FUWA-A, abbiamo ottenuto solo i dati di sequenziamento di piante wild-type (usate come controllo positivo) mentre non abbiamo ottenuto nessun amplicone dalle trasformate con il costrutto per l'editing.

Abbiamo quindi progettato una serie di reazione di PCR che ci permettessero di amplificare esclusivamente il gene FUWA-A per poi procedere al sequenziamento dell'amplicone prodotto.

La prima reazione di amplificazione è stata svolta utilizzando gli oligonucleotidi indicati in figura 1 (RB 179 e RB 181), da questa reazione di amplificazione ci attendevamo una banda di 1567 paia di basi.

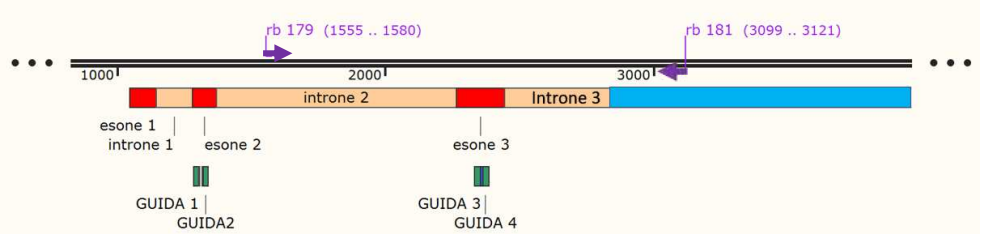


Figura 37 Rappresentazione grafica di una porzione del gene FUWA-A. L'immagine riporta gli esoni in rosso, gli introni in arancione, le guide in verde e la posizione degli oligonucleotidi utilizzati per l'esperimento di amplificazione. Il frammento azzurro corrisponde a una sequenza specifica del gene FUWA-A.

Tramite quest'esperimento abbiamo potuto visualizzare un prodotto di amplificazione solo in corrispondenza dei genomi dei controlli positivi (1°, 2° e 3° campione DNA genomico di Svevo) mentre non abbiamo ottenuto dei prodotti di amplificazione in corrispondenza di un sottogruppo di campioni della linea B3890 indicati con i numeri 5, 25, 28, 29, 49, 57.

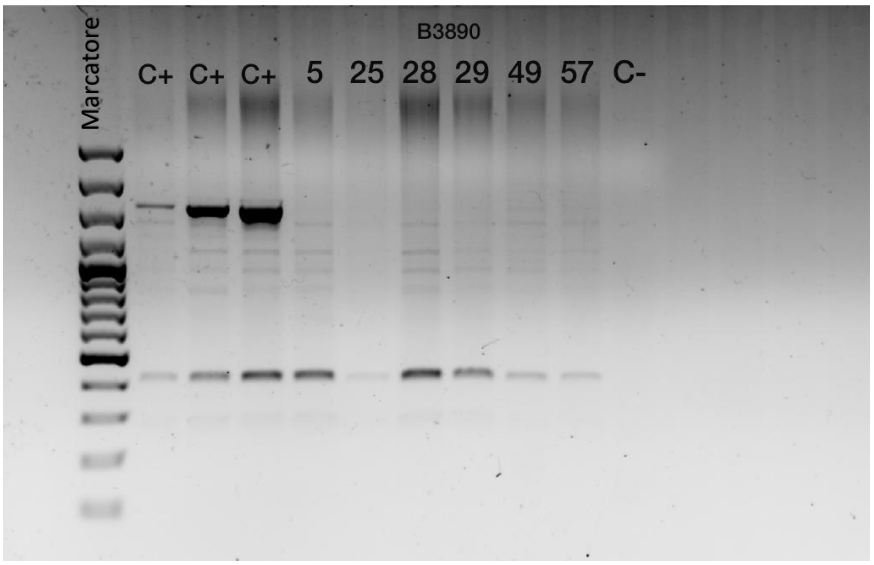


Figura 38 Fotografia del gel elettroforetico mostrante l'amplificazione dei genomi utilizzati come controlli positivi (C+). Assenza di prodotti di amplificazione in corrispondenza dei genomici delle piante appartenenti alla linea B3890 (campioni: 5,25,28,29,49,57). C-indica il controllo negativo. Si osservano inoltre una serie di bande aspecifiche della lunghezza di 450 paia di basi.

Abbiamo quindi ipotizzato che il gene FUWA-A potesse essere mutato a seguito di una delezione come indicato in figura 39. È infatti possibile che sia avvenuto un taglio combinato delle guide seguito da un riarrangiamento tramite NHEJ (Non Homologous End Joined) che ha eliminato una regione del gene FUWA-A di grandezza maggiore rispetto all'amplicone utilizzato per l'esperimento di sequenziamento e comprendente la regione dove si appaia l'oligonucleotide RB 179.

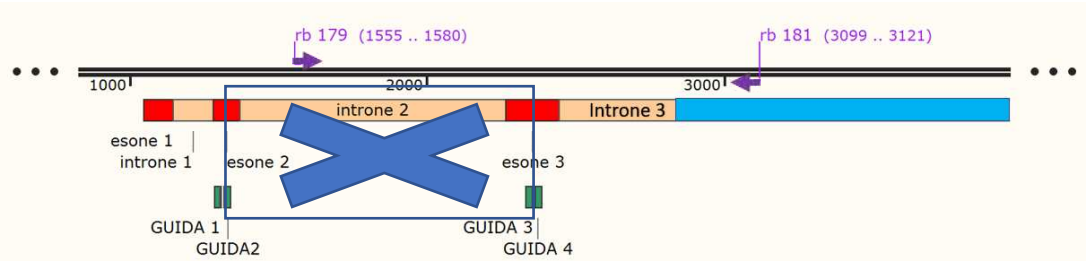


Figura 39 Regione che potrebbe essere stata deleta a seguito di un taglio combinato delle guide.

Per verificare questa ipotesi abbiamo pianificato altri esperimenti di amplificazione. In primo luogo, abbiamo cercato di capire quali regioni del gene FUWA-A fossero rimaste intatte. A questo scopo abbiamo amplificato le regioni al 5' rispetto alle guide 1 e 2 utilizzando gli oligonucleotidi RB184 e RB 186 e al 3' rispetto alle guide 3 e 4 utilizzando gli oligonucleotidi (RB187 e RB181) (Figura

40). Da queste reazioni di amplificazione ci attendevamo una banda di 526 paia di basi usando gli oligonucleotidi RB184 e RB 186 e di 672 paia di basi usando gli oligonucleotidi RB187 e RB181.

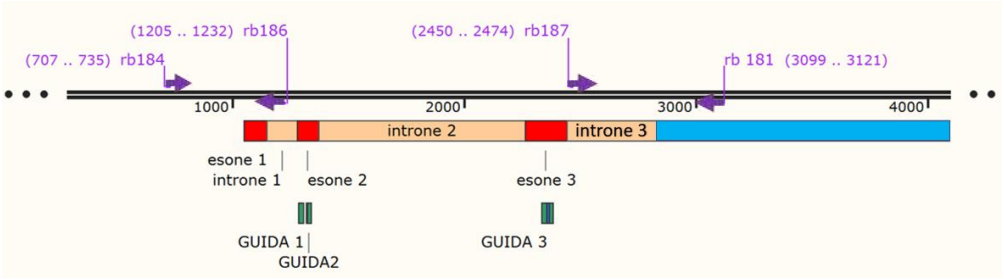


Figura 40 Rappresentazione grafica di una porzione del gene FUWA-A. L'immagine riporta gli esoni in rosso, gli introni in arancione, le guide in verde e la posizione degli oligonucleotidi utilizzati per gli esperimenti di amplificazione delle regioni. Il frammento azzurro corrisponde a una sequenza specifica del gene FUWA-A.

La figura 41 mostra i risultati ottenuti negli esperimenti di amplificazione nel gene FUWA-A.

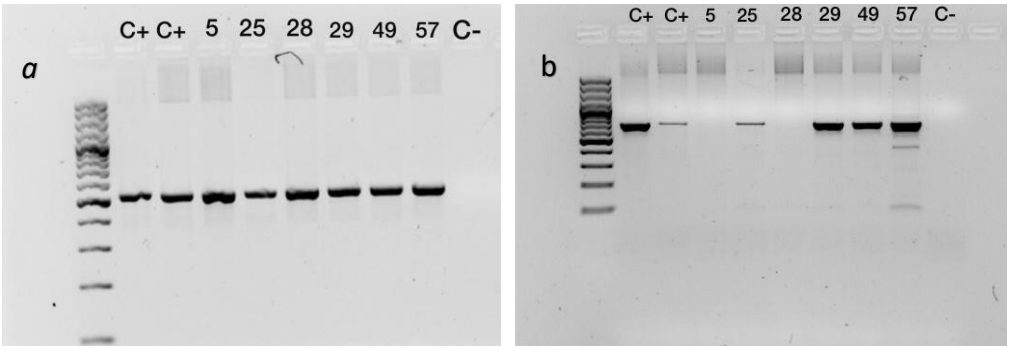


Figura 41 Fotografia dei gel elettroforetici mostrante i risultati del 1° e 2° esperimento di PCR condotto sul genoma A al fine di analizzare le regioni al 5'(a)rispetto alle guide 1 e 2 ed al 3'(b) rispetto alle guide 3 e 4. C+ indica il controllo positivo, C- indica il controllo negativo e 5,25,28,29,49,57 sono i campioni scelti dalla linea B3890.

Gli esperimenti di amplificazione effettuati sul gene FUWA-A sono stati eseguiti anche sul gene FUWA-B (con oligonucleotidi differenti), utilizzandoli come dei controlli positivi perché eravamo già a conoscenza grazie ai dati del sequenziatore della struttura del gene a seguito dell'editing. È stato possibile notare come le dimensioni degli ampliconi ottenuti mediante PCR combacino con i risultati attesi; infatti, gli amplificati derivanti dal primo esperimento hanno una dimensione di 526 bp (Figura 41/a) mentre quelli ottenuti dal secondo hanno una lunghezza di 672 bp (Figura 41/b).

La figura 44a mostra i risultati ottenuti negli esperimenti di amplificazione del gene FUWA-B.

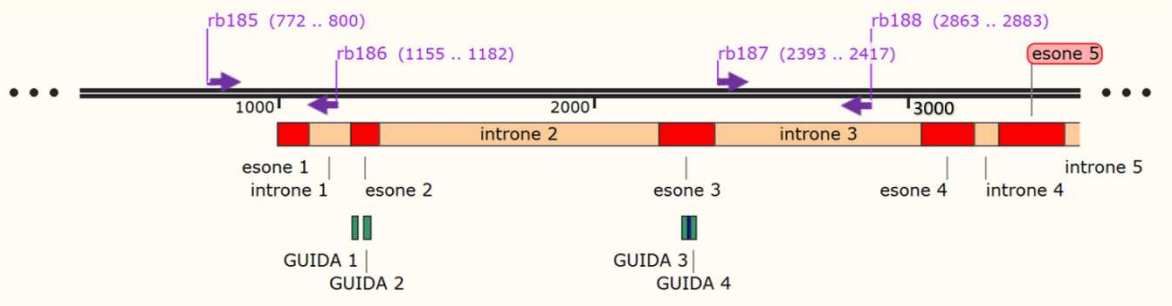


Figura 42a Rappresentazione degli esperimenti di PCR su SNAPGENE per analizzare le regioni fiancheggianti al locus con l'ipotetica delezione. Sono mostranti gli oligonucleotidi progettati per amplificare le regioni al 5' delle guide 1 e 2 ed al 3' delle guide 3 e 4 nel genoma B.

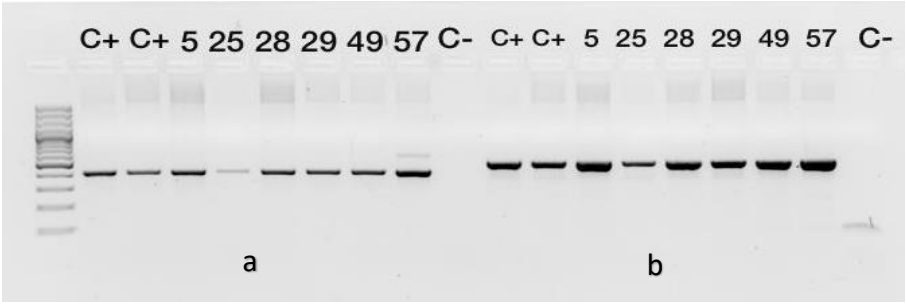


Figura 42b Gel elettroforetici mostranti i risultati del 1° e 2° esperimento di PCR condotto sul genoma B. a) Analisi della regione al 5' delle guide 1 e 2; b) Analisi della regione al 3' delle guide 3 e 4. C+ indica il controllo positivo, C- indica il controllo negativo e 5,25,28,29,49,57 sono i campioni scelti dalla linea B3890.

Anche in questo caso i gel elettroforetici ci hanno mostrato e confermato la presenza di entrambe le regioni fiancheggiati nel genoma B e le rispettive dimensioni attese; La regione al 5' delle guide 1 e 2 (Figura 42b/a) è di 411 paia di basi mentre la regione al 3' delle guide 3 e 4 (Figura 42b/b) misura 491 paia di basi.

La successiva reazione di amplificazione è stata pianificata come rappresentato in figura 43; questa reazione di amplificazione ha avuto lo scopo di capire cosa è avvenuto nella regione compresa tra le guide nel gene FUWA-A. Nelle piante wild-type ci attendiamo degli amplificati di PCR di 1917 paia di basi per il gene FUWA-A e 1646 paia di basi per il gene FUWA-B, mentre nelle piante editate sono possibili diversi risultati:

1) se le regioni interne avessero subito piccole delezioni o nessuna delezione avremmo dovuto ottenere delle bande della lunghezza attesa;
2) se fosse avvenuta una delezione avremmo ottenuto delle bande di una lunghezza inferiore a quanto predetto.

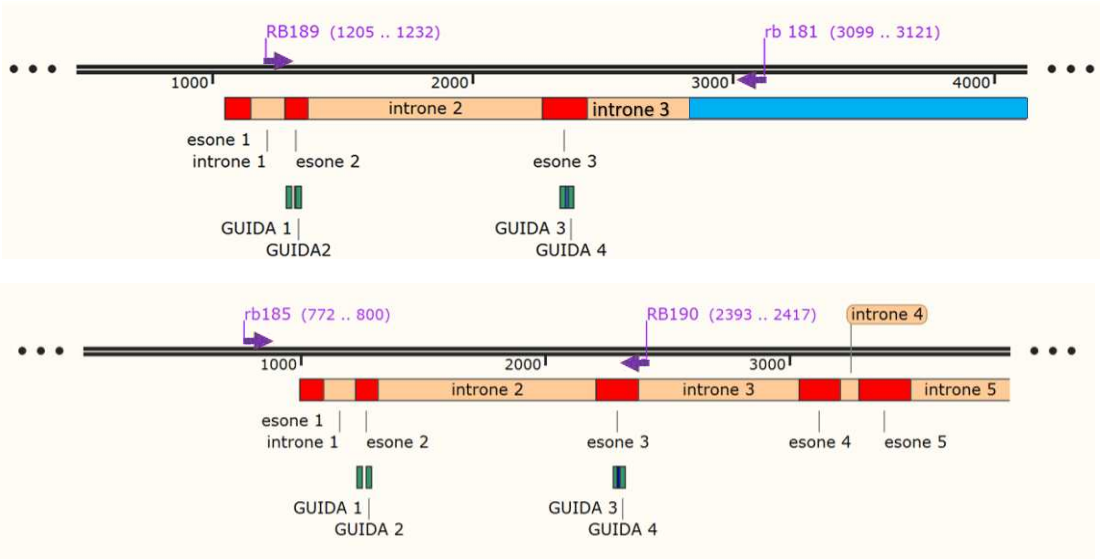


Figura 43 Rappresentazione degli esperimenti di PCR su SNAPGENE per analizzare le regioni interne alle guide 2 e 3. a) Genoma A; b) Genoma B

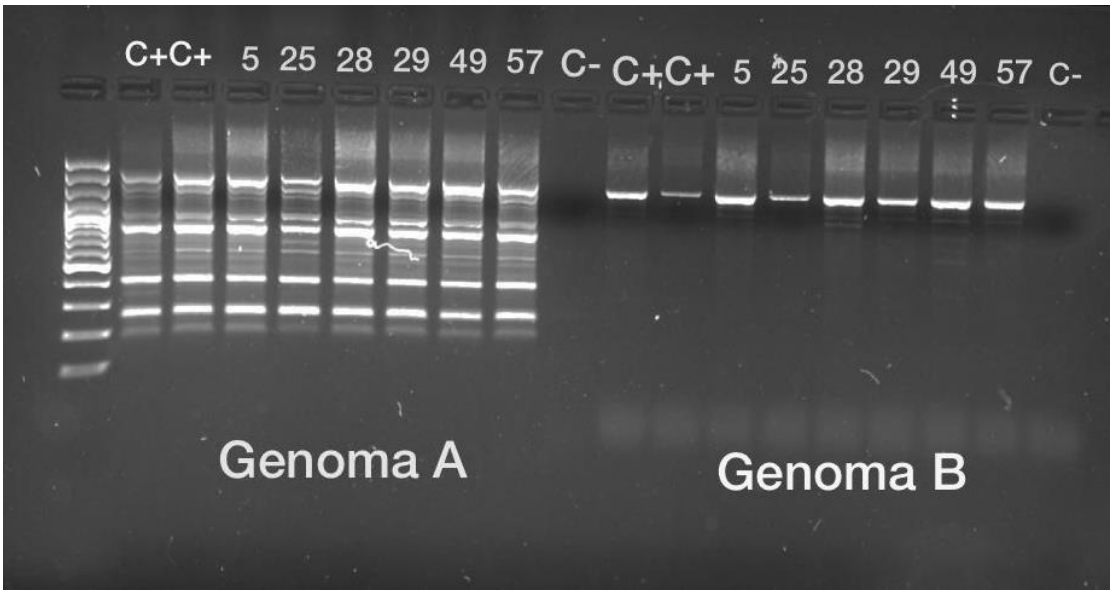


Figura 44 Fotografia del gel elettroforetico del terzo esperimento di PCR mostrante la regione interna dei genomi A e B. Nel genoma A la presenza di molti aspecifici indica la necessità di aumentare la temperatura di annealing; per il genoma B le bande ottenute corrispondono all'altezza attesa. C+ indica il controllo positivo, C- indica il controllo negativo e 5,25,28,29,49,57 sono i campioni scelti dalla linea B3890.

I risultati ottenuti mostrano bande della lunghezza attesa per il gene FUWA-B (da questa corsa elettroforetica non è possibile visualizzare e distinguere la delezione di 10 paia di basi presente nel genoma B), mentre per il gene FUWA-A abbiamo ottenuto molti frammenti di PCR, probabilmente aspecifici; abbiamo quindi svolto una nuova reazione di amplificazione aumentando da 55° C a 60° C la temperatura di appaiamento degli oligonucleotidi.

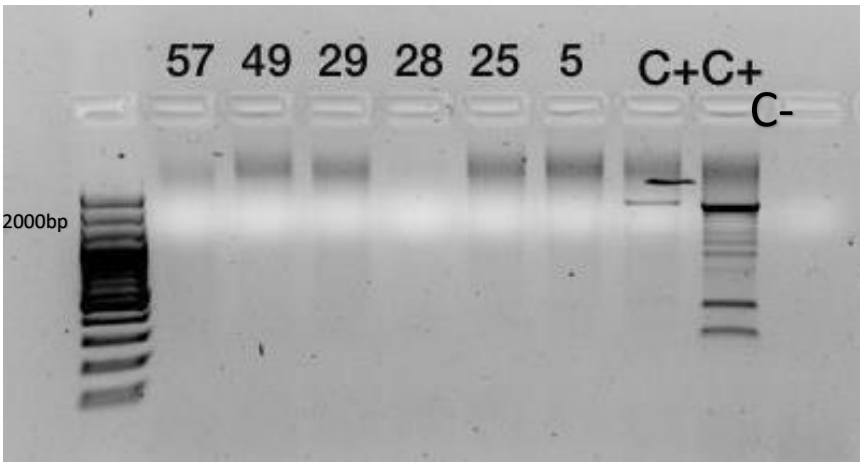


Figura 45 Fotografia del gel elettroforetico nel quale è stata ripetuta la reazione di amplificazione per il genoma A ad una temperatura di appaiamento di 60°. I risultati ci mostrano l'assenza di bande per i mutanti ma la presenza della banda di 1917 bp nei controlli positivi. C+ indica il controllo positivo, C- indica il controllo negativo e 5,25,28,29,49,57 sono i campioni scelti dalla linea B3890.

A seguito del risultato mostrato in figura 45, non abbiamo potuto confermare l'ipotesi che sia avvenuta una delezione nella regione genomica compresa tra le guide nel gene FUWA-A; al contrario, la mancanza di bande per le piante trasformate e la presenza di bande della dimensione attesa nei controlli positivi, suggeriscono un riarrangiamento genomico diverso dalla delezione che abbiamo ipotizzato.

Poiché non ci è stato possibile capire che tipo di modifica sia avvenuta nel gene FUWA-A tramite amplificazione del DNA genomico abbiamo deciso di amplificare e sequenziare il cDNA delle piante trasformate e confrontarlo con le piante wild-type. Questo esperimento è tutt'ora in corso, durante il periodo di tesi ho campionato le infiorescenze delle piante appartenenti alla linea B3890 (generazione T2) e di piante wild-type.

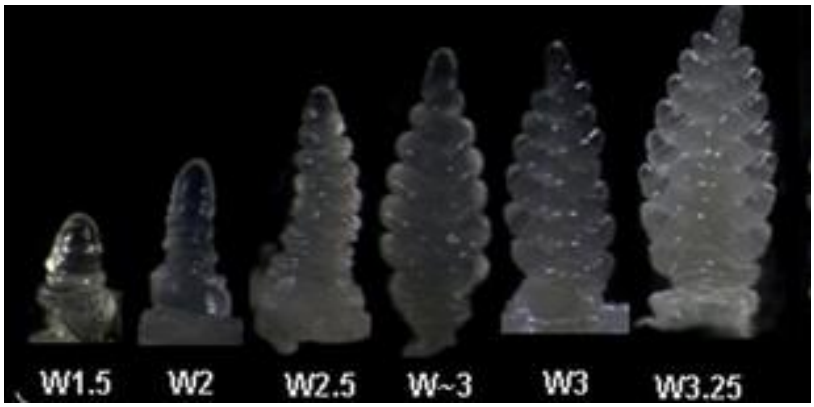


Figura 46 Immagine con scala di Waddington degli stadi di sviluppo del primordio dell'infiorescenza in frumento duro.

4.4 Caratterizzazione fenotipica delle piante della linea B3890, generazione T1

La fenotipizzazione è l'analisi visiva delle caratteristiche morfologiche e funzionali di una pianta. La fenotipizzazione è stata effettuata solo sulla linea B3890, su 72 piante della generazione T1 in cui segrega l'allele *fuwa-b.1*, ossia la delezione di 10 paia basi identificata nell'esperimento di genotipizzazione delle piante editate (immagine 47).

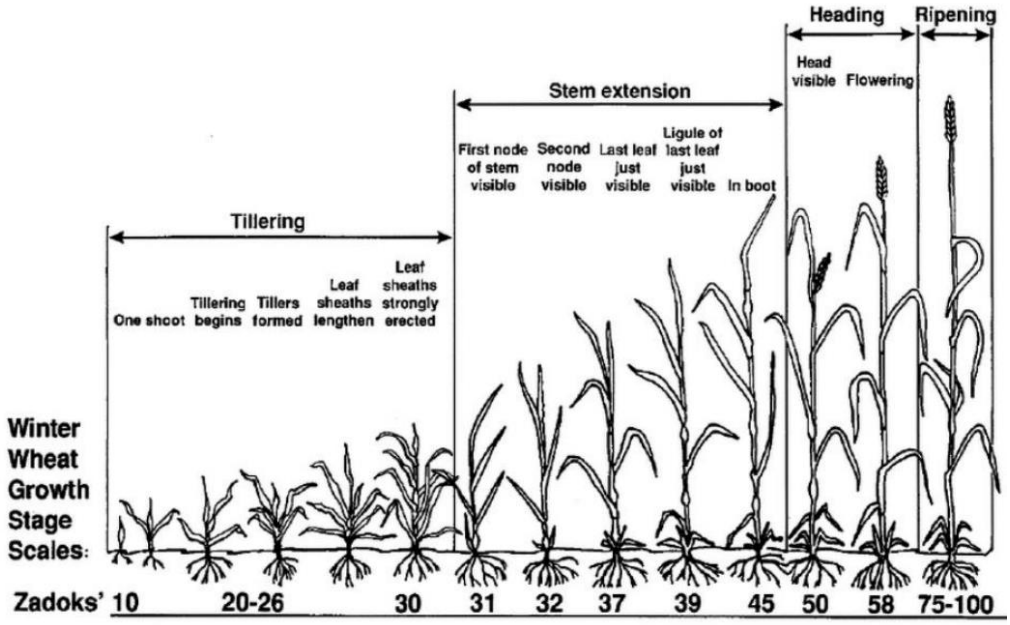


Figura 47 Rappresentazione grafica degli stadi fenologici principali nella scala di Zadoks. Fonte: https://www.itsagroalimentarepuglia.it/wp-content/uploads/Mod-1-Incontro-1-Ecofosiologia-e-tecnica-colturale-del-frumento-Horta-PM-Pubblicazione-Sito.pdf

Facendo riferimento all'articolo di Chen et al., (2015) in riso in cui era stato osservato che la mutazione nel gene OsFUWA aveva effetti pleiotropici, è stato deciso di fenotipizzare i caratteri indicati in tabella 1 a diversi stadi di sviluppo delle piante:

Scala Zadoks	Stadio di sviluppo	Numero di culmi	Numero di spighe	Diametro del culmo	Altezza del culmo principale	Numero di nodi al culmo principale	Dimensioni foglia bandiera
49	prime ariste visibili						
51	inizio dell'emersione dell'infiorescenza dalla guaina						
55	metà dell'infiorescenza emersa dalla guaina						
57	70% dell'infiorescenza emersa dalla guaina						
59	infiorescenza totalmente emersa dalla guaina						
61	inizio della fioritura con prime antere visibili						
63	15% delle antere visibili						
65	50% delle antere visibili						
69	fine della fioritura						
	Maturazione						

Tabella 14 Caratteri fenotipizzati dalla linea di piante mutanti B3890. Le caselle colorate in azzurro indicato che carattere è stato fenotipizzato ed a quale stadio di sviluppo.

La fenotipizzazione è stata svolta nelle seguenti date: 11/04/2022, 12/04/2022, 29/04/2022, 6/05/2022 e 16/05/2022 (I dati della fenotipizzazione sono mostrati nella tabella 15).

Codice pianta 3890	data rilievo	N° culmi totale	N° culmi 49 (ariste spuntano molto e botticella chiusa)	N° culmi 51 (spiga visibile per 1/4)	N° culmi 55 (spiga visibile per metà)	N° 57 (Spiga visibile per 3/4)	N° culmi 59 (Spiga intera visbile)	N° culmi 61	N° culmi 63	N° culmi 65 (Spiga con il 50% delle antere visibili)	69 Flowering complete (Spiga con fuori tutte le antere)	n. di spighe oltre 69	n. di spighe a fine maturazione	n. di semi per spiga (a maturazione)	DIAMETRO culmo principale mm	ALTEZZA del culmo principale al 59, senza includere la spiga cm	ALTEZZA del culmo principale al 69, senza includere la spiga cm	N° NODI al culmo principale	N nodi al 69 solo culmo principale	Lunghezza foglia bandiera (solo culmo principale quando la spiga è a 69)	Larghezza foglia bandiera (solo culmo principale quando la spiga è a 69)
1	11 04 2022	8	1	0	0	3	1	0	0	0		0			3,8			5			
2	11 04 2022	9	0	0	0	3	1	0	0	0		0			6,1			5			
3	11 04 2022	11	0	3	0	1	1	0	0	0		0			4,9			4			
5	11 04 2022	14	0	0	0	0	0	0	0	0		0			6,3			4			
6	11 04 2022	10	2	1	0	2	1	0	0	0		0			5,3			5			
7	11 04 2022	11	1	0	0	0	0	0	0	0		0			4,3			4			
8	11 04 2022	5	3	0	1	0	0	0	0	0		0			6			5			
9	11 04 2022	11	1	0	0	0	0	0	0	0		0			4,6			4			
12	11 04 2022	6	0	1	0	1	3	0	0	0		0			5,5			5			
14	11 04 2022	7	2	0	0	0	0	0	0	0		0			5,7			5			
16	11 04 2022	9	5	0	0	1	0	0	0	0		0			3,6			5			
18	11 04 2022	7	0	2	0	0	4	0	0	0		0			6			5			
19	11 04 2022	9	0	1	0	3	2	0	0	0		0			5,6			5			
20	11 04 2022	11	1	0	0	0	0	0	0	0		0			3,4			4			
21	11 04 2022	10	1	0	0	0	0	0	0	0		0			5			5			
23	11 04 2022	8	4	0	1	0	3	0	0	0		0			4			5			
24	11 04 2022	8	0	3	0	2	3	0	0	0		0			6			5			
25	11 04 2022	10	0	0	0	0	0	0	0	0		0			4			3			
26	11 04 2022	6	0	1	0	1	0	0	0	0		0			4			5			
27	11 04 2022	9	2	0	0	0	0	0	0	0		0			5			5			
28	11 04 2022	8	0	1	0	2	1	0	0	0		0			3,7			5			
29	11 04 2022	10	0	0	0	0	0	0	0	0		0			6			4			
30	11 04 2022	7	1	0	0	0	0	0	0	0		0			5			5			
31	11 04 2022	9	1	0	0	0	0	0	0	0		0			5			4			
32	11 04 2022	9	0	1	0	2	2	0	0	0		0			4,7			5			
33	11 04 2022	9	0	1	0	1	3	0	0	0		0			6			4			
34	11 04 2022	8	0	1	0	0	0	0	0	0		0			4,5			4			
36	11 04 2022	10	0	1	0	3	4	0	0	0		0			4			5			
37	11 04 2022	7	0	1	0	1	1	0	0	0		0			6			5			
38	11 04 2022	8	0	1	0	1	3	0	0	0		0			6			5			
39	11 04 2022	9	2	0	0	2	2	0	0	0		0			6			5			
40	11 04 2022	7	1	1	0	1	3	0	0	0		0			6			5			
41	11 04 2022	8	0	1	0	3	3	0	0	0		0			6			5			
42	11 04 2022	9	1	0	0	0	0	0	0	0		0			6			4			
43	11 04 2022	9	0	2	0	1	1	3	0	0		0			5			4			
44	11 04 2022	5	0	0	0	0	5	0	0	0		0			3			5			
45	11 04 2022	5	0	1	1	0	3	0	0	0		0			5			5			
46	11 04 2022	8	1	0	0	0	0	0	0	0		0			4			5			
47	12 04 2022	8	0	3	0	2	3	0	0	0		0			6			5			
48	12 04 2022	7	1	1	1	0	3	0	0	0		0			6			5			
49	12 04 2022	10	0	3	0	0	0	0	0	0		0			4			4			
50	12 04 2022	9	1	1	0	1	2	0	0	0		0			6			5			
51	12 04 2022	10	1	0	2	0	4	0	0	0		0			6			5			
52	12 04 2022	9	3	1	1	0	3	0	0	0		0			6			5			
53	12 04 2022	8	0	3	1	0	3	0	0	0		0			5			5			
54	12 04 2022	9	2	0	0	0	0	0	0	0		0		1	4			4			
55	12 04 2022	8	1	0	0	0	0	0	0	0		0			4			4			
56	12 04 2022	8	1	0	2	0	2	0	0	0		0			5,5			6			
57	12 04 2022	9	1	1	0	0	0	0	0	0		0			5			4			
58	12 04 2022	9	0	1	0	3	3	1	0	0		0			5			5			
59	12 04 2022	6	0	0	1	0	0	0	0	0		0			5			5			
60	12 04 2022	8	0	0	2	1	3	0	1	0		0			4			5			
61	12 04 2022	10	5	1	0	0	0	0	0	0		0			4			5			
62	12 04 2022	4	2	0	0	1	0	0	0	0		0			4			5			
63	12 04 2022	11	2	0	0	4	3	0	1	0		0			6			5			
64	12 04 2022	11	3	0	0	1	0	0	0	0		0			4			5			
65	12 04 2022	8	0	0	1	0	5	0	0	1		0			6			5			
66	12 04 2022	8	0	1	0	1	5	0	0	1		0			6			5			
67	12 04 2022	8	2	0	1	0	3	0	0	0		0			6			5			
68	12 04 2022	7	0	0	0	1	5	0	0	0		0			6			5			
69	12 04 2022	12	0	1	0	0	0	0	0	0		0			4			4			
70	12 04 2022	8	0	1	0	0	0	0	0	0		0			4			4			
71	12 04 2022	8	0	0	0	1	3	0	0	0		0			5			5			
72	12 04 2022	8	0	1	0	2	0	0	0	0		0			4			5			
73	12 04 2022	6	1	0	1		4	0	0	0		0			5			5			
74	12 04 2022	6	1	0	0	2	3	0	0	0		0			5			5			
75	12 04 2022	7	0	0	2	1	3	0	0	0		0			6			5			
76	12 04 2022	9	0	2	0	1	0	0	0	0		0			6			5			
77	12 04 2022	9	0	2	2	1	0	0	0	0		0			4			5			
78	12 04 2022	6	0	1	0	2	2	1	0	0		0			6			5			
79	12 04 2022	8	0	1	0	2	2	0	1	0		0			6			5			
80	12 04 2022	8	0	0	1	0	2	0	1	0		0			5			5			

Codice pianta 3890	data rilievo	N° culmi totale	N° culmi 49 (ariste spuntano molto e botticella chiusa)	N° culmi 51 (spiga visibile per 1/4)	N° culmi 55 (spiga visibile per metà)	N° 57 (Spiga visibile per 3/4)	N° culmi 59 (Spiga intera visibile)	N° culmi 61	N° culmi 63	N° culmi 65 (Spiga con il 50% delle antere visibili)	69 flowering complete (Spiga con fuori tutte le antere)	n. di spighe oltre 69	n. di spighe a fine maturazione	n. di semi per spiga (a maturazione)	DIAMETRO culmo principale mm	ALTEZZA del culmo principale al 59, senza includere la spiga cm	ALTEZZA del culmo principale al 69, senza includere la spiga cm	N° NODI al culmo principale	N nodi al 69 solo culmo principale	Lunghezza foglia bandiera (solo culmo principale quando la spiga è a 69)	Larghezza foglia bandiera (solo culmo principale quando la spiga è a 69)
1	29 04 2022	8								0	7				3,8		83	5	5	36	2,1
2	29 04 2022	8	1							2	5				6,1		76	5	5	32	1,9
3	29 04 2022	11			1		9								4,9	76		5			
5	29 04 2022	11					10								6,3	73		5			
6	29 04 2022	8					1			5	1				5,3		87	5	5	42	2
7	29 04 2022	8					6								4,3			5			
8	29 04 2022	8					6								6	55		5			
9	29 04 2022	8					6								4,6			5			
12	29 04 2022	6					6								5,5	74		5			
14	29 04 2022	7						7							5,7	79		5			
16	29 04 2022	9						8							3,6	82		5			
18	29 04 2022	6				1				0	4				6			5			
19	29 04 2022	7			1					4	2				5,6		89	5	5	34	2
20	29 04 2022	9					9								3,4	74		5			
21	29 04 2022	9					8								5	70		5			
23	29 04 2022	8						4		4					4	78	78	5	5	29	1,9
24	29 04 2022	8								7	1				6		80	5	5	26	1,9
25	29 04 2022	8					8								4	58		5			
26	29 04 2022	6	1				5								4	63		5			
27	29 04 2022	9					4	4							5	77		5			
28	29 04 2022	8					5	3							3,7	64		5			
29	29 04 2022	8				1	6								6	60		5			
30	29 04 2022	9					6								5			5			
31	29 04 2022	7					7								5	64		5			
32	29 04 2022	9								2	5				4,7		84	5	5	32	2
33	29 04 2022	8						2	6						6	87	87	5	5	22	1,4
34	29 04 2022	10					1	7							4,5	81		5			
36	29 04 2022	10								10					4	80	80	5	5	33	2
37	29 04 2022	9					1	6							6	81		5			
38	29 04 2022	9													6		86	5	5	34	2
39	29 04 2022	7								7	4				6	85	85	5	5	30	1,8
40	29 04 2022	7					6								6			5			
41	29 04 2022	7									7				6		85	5	5	30	1,9
42	29 04 2022	9					4	4							6	74		5			
43	29 04 2022	7								5	2				5		91	5	5	31	1,9
44	29 04 2022	5								5					3		87	5	5	31	2
45	29 04 2022	5								3	2				5		84	5	5	40	1,9
46	29 04 2022	9					7								4			5			
47	29 04 2022	8								4	4				6	0	90	5	5	37	1,8
48	29 04 2022	7						5		2					6	84,5	85	5	5	33	1,8
49	29 04 2022	9					3	6							4			5			
50	29 04 2022	9					9								6	71	71	5	5	26	1,8
51	29 04 2022	12					9								6	84		5			
52	29 04 2022	8					8								6	81,5		5			
53	29 04 2022	8	1				7								5	71	72	5	5	29	2
54	29 04 2022	9					7								4	73		5			
55	29 04 2022	8					4	4							4	74		5			
56	29 04 2022	6					4	2							5,5	85		6			
57	29 04 2022	8	0				8								5	69		5			
58	29 04 2022	8						3		4					5	82	82	5	5	31	1,8
59	29 04 2022	6					5								5	70		5			
60	29 04 2022	7								1	6				4		86	5	5	30	1,9
61	29 04 2022	8					8								4	76		5			
62	29 04 2022	6					3	1							4	68		5			
63	29 04 2022	11					1	6		3	5				6	82	85	5	5	31	2
64	29 04 2022	9					1	7							4	78		5			
65	29 04 2022	7						4		3					6	91	91	5	5	34	2
66	29 04 2022	8						5		3					6	90	90	5	5	35	2
67	29 04 2022	7					1	3		3					6	92	92	5	5	39	1,8
68	29 04 2022	8					5								6	80		5			
69	29 04 2022	9					9								4	69		5			
70	29 04 2022	7					7								4	71		5			
71	29 04 2022	8						6			2				5		94	5	5	33	1,9
72	29 04 2022	7						5		2					4	78		5			
73	29 04 2022	12					6								5	84		5			
74	29 04 2022	7						4		3					5	86	87	5	5	35	1,8
75	29 04 2022	7					6	1							6	73	73	5	5	27	1,8
76	29 04 2022	8					8								6	84		5			
77	29 04 2022	8					7								4	77		5			
78	29 04 2022	7						3		1	2				6		92	5	5	33	1,9
79	29 04 2022	7					1	2		4					6	84	85	5	5	31	1,8
80	29 04 2022	7								4	3				5		92	5	5	33	2

Codice pianta 3890	data rilievo	N° culmi totale	N° culmi 49 (ariste spuntano molto e botticella chiusa)	N° culmi 51 (spiga visibile per 1/4)	N° culmi 55 (spiga visibile per metà)	N° 57 (Spiga visibile per 3/4)	N° culmi 59 (Spiga intera visibile)	N° culmi 61	N° culmi 63	N° culmi 65 (Spiga con il 50% delle antere visibili)	69 Flowering complete (Spiga con fuori tutte le antere)	n. di spighe oltre 69	n. di spighe a fine maturazione	n. di semi per spiga (a maturazione)	DIAMETRO culmo principale mm	ALTEZZA del culmo principale al 59, senza includere la spiga cm	ALTEZZA del culmo principale al 69, senza includere la spiga cm	N° NODI al culmo principale	N nodi al 69 solo culmo principale	Lunghezza foglia bandiera (solo culmo principale quando la spiga è a 69)	Larghezza foglia bandiera (solo culmo principale quando la spiga è a 69)
1	6 05 2022	8									8				3,8		83		5	36	2,2
2	6 05 2022	8													6,1		76		5	32	1,9
3	6 05 2022	11													4,9				5		
5	6 05 2022	11													6,3				5		
6	6 05 2022	8									3				5,3		87		5	42	2
7	6 05 2022	8													4,3				5		
8	6 05 2022	8													6				5		
9	6 05 2022	8													4,6				5		
12	6 05 2022	6													5,5				5		
14	6 05 2022	7													5,7				5		
16	6 05 2022	9													3,6				5		
18	6 05 2022	6													6				5		
19	6 05 2022	7									4				5,6		89		5	34	2
20	6 05 2022	9					9								3,4				5		
21	6 05 2022	9					7								5				5		
23	6 05 2022	8									4				4		78		5	29	1,9
24	6 05 2022	8									3				6		80		5	26	1,9
25	6 05 2022	8													4				5		
26	6 05 2022	6					5								4				5		
27	6 05 2022	9													5				5		
28	6 05 2022	8													3,7				5		
29	6 05 2022	8													6				5		
30	6 05 2022	9				2									5				5		
31	6 05 2022	7													5				5		
32	6 05 2022	9									7				4,7		84		5	32	2
33	6 05 2022	8									4				6		87		5	22	1,4
34	6 05 2022	10													4,5				5		
36	6 05 2022	10									10				4		80		5	33	2
37	6 05 2022	9					3								6				5		
38	6 05 2022	9									7				6		86		5	34	2
39	6 05 2022	7													6		85		5	30	1,8
40	6 05 2022	7													6				5		
41	6 05 2022	7									6				6		85		5	30	1,9
42	6 05 2022	9													6				5		
43	6 05 2022	7									7				5		91		5	31	1,9
44	6 05 2022	5									5				3		87		5	31	2
45	6 05 2022	5									4				5		84		5	40	1,9
46	6 05 2022	9					8								4				5		
47	6 05 2022	8									7				6		90		5	37	1,8
48	6 05 2022	7									2				6		85		5	33	1,8
49	6 05 2022	9						2							4				5		
50	6 05 2022	9													6		71		5	26	1,8
51	6 05 2022	12													6				5		
52	6 05 2022	8					8								6				5		
53	6 05 2022	8					0				3				5		72		5	29	2
54	6 05 2022	9	1				7								4				5		
55	6 05 2022	8													4				5		
56	6 05 2022	6													5,5				5		
57	6 05 2022	8					8								5				5		
58	6 05 2022	8									4				5		82		5	31	1,8
59	6 05 2022	6					5								5				5		
60	6 05 2022	7									7				4		86		5	30	1,9
61	6 05 2022	8													4				5		
62	6 05 2022	6					2								4				5		
63	6 05 2022	11													6		85		5	31	2
64	6 05 2022	9													4				5		
65	6 05 2022	7									4				6		91		5	34	2
66	6 05 2022	8					1				4				6		90		5	35	2
67	6 05 2022	7									3				6		92		5	39	1,8
68	6 05 2022	8					5								6				5		
69	6 05 2022	9					9								4				5		
70	6 05 2022	7													4				5		
71	6 05 2022	8					1								5		94		5	33	1,9
72	6 05 2022	7													4				5		
73	6 05 2022	12													5				5		
74	6 05 2022	7									3				5		87		5	35	1,8
75	6 05 2022	7									2				6		73		5	27	1,8
76	6 05 2022	8													6				5		
77	6 05 2022	8													4				5		
78	6 05 2022	7													6		92		5	33	1,9
79	6 05 2022	7									3				6		85		5	31	1,8
80	6 05 2022	7													5		92		5	33	2

Codice pianta 3890	data rilievo	N° culmi totale	N° culmi 49 (ariste spuntano molto e botticella chiusa)	N° culmi 51 (spiga visibile per 1/4)	N° culmi 55 (spiga visibile per metà)	N° 57 (Spiga visibile per 3/4)	N° culmi 59 (Spiga intera visibile)	N° culmi 61	N° culmi 63	N° culmi 65 (Spiga con il 50% delle antere visibili)	69 Flowering complete (Spiga con fuori tutte le antere)	n. di spighe oltre 69	n. di spighe a fine maturazione	n. di semi per spiga (a maturazione)	DIAMETRO culmo principale mm	ALTEZZA del culmo principale al 59, senza includere la spiga cm	ALTEZZA del culmo principale al 69, senza includere la spiga cm	N° NODI al culmo principale	N nodi al 69 solo culmo principale	Lunghezza foglia bandiera (solo culmo principale quando la spiga è a 69)	Larghezza foglia bandiera (solo culmo principale quando la spiga è a 69)
1	16 05 2022	8									8		8	44 64 60 63 41 48 60 33	3,8		83		5		
2	16 05 2022	8									7		7	57 57 61 34 59 44 32	6,1		76		5		
3	16 05 2022	15									0		7nere	0	4,9		76		5		
5	16 05 2022	10									0		10nere	0	6,3		73		5		
6	16 05 2022	8									8		8	50 38 44 60 18 61 40 52	5,3		87		5		
7	16 05 2022	8									8		8	27 28 29 27 36 26 30 27	4,3		60		5		
8	16 05 2022	5									0		5	40 36 43 23 30	6		55		5		
9	16 05 2022	9									6		6nere	5 5 10 16 11 14	4,6		54		5		
12	16 05 2022	10									?		6nere	2	5,5		74		5		
14	16 05 2022	7									7		7	35 43 37 45 35 48 30	5,7		79		5		
16	16 05 2022	8									8		8	35 25 34 37 39 36 24 36	3,6		82		5		
18	16 05 2022	6									5		6	27 40 0 59 54 71	6		65		5		
19	16 05 2022	7									6		7	37 64 46 64 63 56 47	5,6		89		5		
20	16 05 2022	16					9				0		10nere	0	3,4		74		5		
21	16 05 2022	8					7				0		8nere	0	5		70		5		
23	16 05 2022	8									8		8	40 52 54 61 30 38 43 61	4		78		5		
24	16 05 2022	8									8		8	57 60 50 65 42 44 52 44	6		80		5		
25	16 05 2022	9									8		8	11 5 11 12 8 12 10	4		58		5		
26	16 05 2022	14					5				0		5nere	0	4		63		5		
27	16 05 2022	8									8		8	37 31 30 31 37 25 43 33	5		77		5		
28	16 05 2022	8									7		7	16 14 27 10 9 15 17	3,7		64		5		
29	16 05 2022	9									6		7	10 0 16 12 11 12 13	6		60		5		
30	16 05 2022	23				2					7		9nere	0	5		65		5		
31	16 05 2022	8									7		7	7 7 12 9 13 6 8	5		64		5		
32	16 05 2022	9									9		9	35 62 38 51 45 59 35 30 45	4,7		84		5		
33	16 05 2022	8									8		8nere	15 23 15 39 19 12 35 20	6		87		5		
34	16 05 2022	12									8		8	38 41 36 37 29 38 40 36	4,5		81		5		
36	16 05 2022	9									10		10	60 57 39 52 44 64 42 54 36 47	4		80		5		
37	16 05 2022	11					3				7		10	52 18 13 11 42 52 45 39 60 54	6		81		5		
38	16 05 2022	12					7				0		7	0	6		86		5		
39	16 05 2022	7									7		7	32 54 39 59 37 54 45	6		85		5		
40	16 05 2022	14									0		6	0	6		70		5		
41	16 05 2022	7									7		7	48 50 38 36 50 63 49	6		85		5		
42	16 05 2022	8									8		8	21 19 2031 14 25 28 15	6		74		5		
43	16 05 2022	7									7		7	70 52 58 36 44 43 48	5		91		5		
44	16 05 2022	5									5		5	60 49 63 38 64	3		87		5		
45	16 05 2022	5									5		5	53 60 42 58 60	5		84		5		
46	16 05 2022	18					8				0		8	0	4		63		5		
47	16 05 2022	8									8		8	26 37 40 53 57 48 52 65	6		90		5		
48	16 05 2022	7									9		7	48 60 50 42 59 33 56	6		85		5		
49	16 05 2022	9						2			7		9	31 33 23 26 22 18 30 38 27	4		67		5		
50	16 05 2022	9									0		9	10 8 5 18 2 10 9 9 13	6		71		5		
51	16 05 2022	15									?		10	0	6		84		5		
52	16 05 2022	10					8				0		8	0	6		81,5		5		
53	16 05 2022	8					0				7		7	12 15 12 8 18 23 12	5		71		5		
54	16 05 2022	18	1				7				0		11	0	4		73		5		
55	16 05 2022	9									7		7	28 27 35 32 33 35 28	4		74		5		
56	16 05 2022	6									6		6	39 54 26 40 51 51	5,5		85		5		
57	16 05 2022	25					8				0		8	0	5		69		5		
58	16 05 2022	9									8		8	55 54 61 46 52 38 37 37	5		82		5		
59	16 05 2022	12					5				0		5	0	5		70		5		
60	16 05 2022	7									7		7	66 50 60 49 42 33 47	4		86		5		
61	16 05 2022	8									8		8	32 34 30 32 30 42 31 36	4		76		5		
62	16 05 2022	6					2				4		6	0 0 14 12 10 19	4		68		5		
63	16 05 2022	10									10		10	46 29 52 47 34 36 38 58 69 64	6		82		5		
64	16 05 2022	8									8		8	31 40 37 39 40 40 38 36	4		78		5		
65	16 05 2022	7									7		7	61 51 55 62 67 62 41	6		91		5		
66	16 05 2022	9					1				8		9	55 39 63 53 63 12 36 60 66	6		90		5		
67	16 05 2022	7									6		7	63 45 50 61 34 59 41	6		92		5		
68	16 05 2022	11					5				0		5	0	6		80		5		
69	16 05 2022	14					9				0		9	0	4		69		5		
70	16 05 2022	10									6		7	19 17 30 20 23 23 17	4		71		5		
71	16 05 2022	8					1				6		8	64 49 40 62 43 48 54 46	5		94		5		
72	16 05 2022	7									8		7	39 35 34 39 33 36 38	4		78		5		
73	16 05 2022	14									?		12	0	5		84		5		
74	16 05 2022	7									7		7	37 61 57 34 52 46 42	5		86		5		
75	16 05 2022	7									7		7	14 25 20 9 17 10 10	6		73		5		
76	16 05 2022	13									?		10	0	6		84		5		
77	16 05 2022	7									7		7	41 28 25 27 37 33 26	4		77		5		
78	16 05 2022	7									6		6	44 64 57 66 47 55	6		92		5		
79	16 05 2022	7									7		7	61 65 62 38 44 42 35	6		84		5		
80	16 05 2022	7									7		7	46 54 66 56 41 38 35	5		92		5		

Tabella 15 Dati ottenuti dalla fenotipizzazione

Durante i primi campionamenti nel mese di aprile è stato possibile osservare che circa metà dei mutanti avevano una crescita più lenta, raggiungendo più tardi i vari stadi fenologici rispetto agli altri individui, queste piante mostravano una bassa statura ed alcune sviluppavano un maggior numero di culmi (Figura 48 e Figura 49).

Figura 48 Due piante di frumento duro a confronto durante la prima caratterizzazione fenotipica. Nella pianta di sinistra è possibile osservare una minore statura, ritardo nelle fasi fenologiche dello sviluppo della spiga questo non lo si osserva dalla foto e maggior numero di culmi che le conferiscono un aspetto ''cespuglioso''.

Figura 49 Piante di frumento duro dai vari aspetti fenotipici a confronto.

Durante il campionamento del 16/05/2022 il carattere della bassa statura e la differenza negli stadi di sviluppo non erano più accentuati come nei primi campionamenti.

Osservando i dati della fenotipizzazione abbiamo notato che tra lo stadio Zadoks 57 e 59, in alcune piante era aumentato notevolmente il numero di culmi (tra 11 e 25) (Figura 50). Successivamente, questo gruppo di piante è risultato sterile.

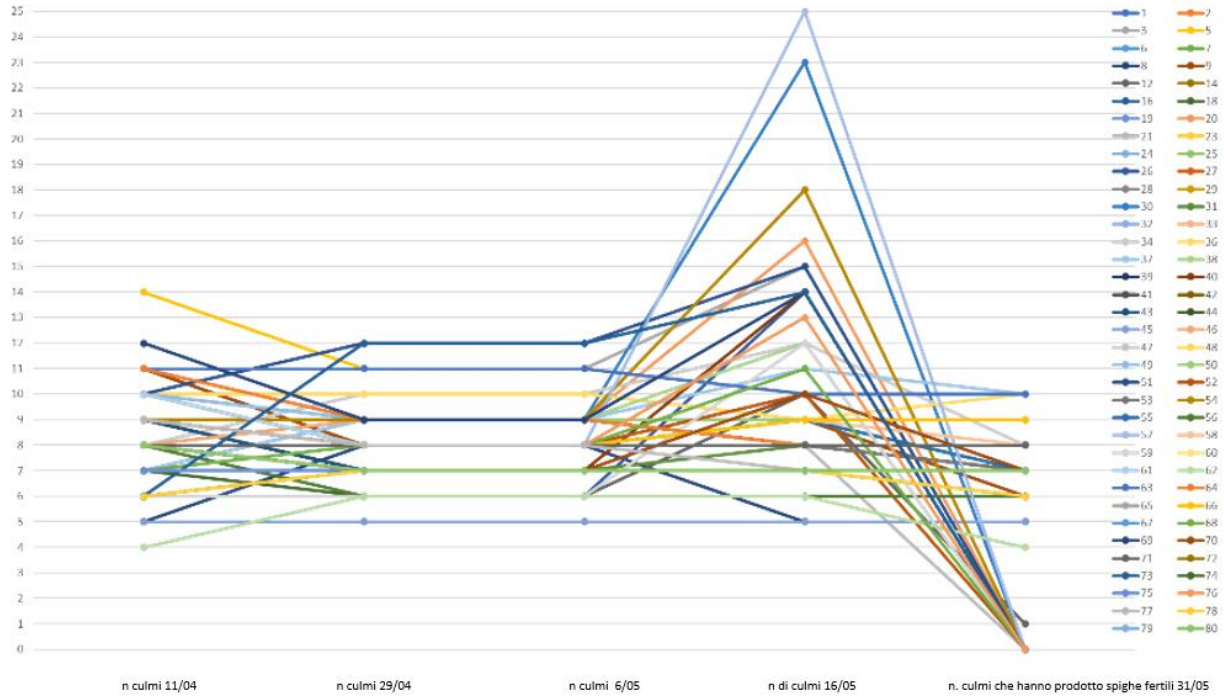


Figura 50 Rappresentazione dell'andamento nello sviluppo del numero di culmi. Sull'asse delle ordinate è rappresentato il numero di culmi, sull'asse delle ascisse il numero dei culmi alle varie date di campionamento. È possibile notare come un gruppo di piante che in data 31/5 possedevano culmi che non hanno prodotto spighe fertili, in data 16/5 avevano un numero di culmi di molto superiore in confronto alle altre.

Quando le piante avevano concluso il loro ciclo vitale sono state raccolte le spighe e sono stati fenotipizzati i seguenti caratteri:

- Numero di semi per spiga
- Lunghezza della spiga
- Numero di spighette per spiga.

Abbiamo potuto creare 4 classi fenotipiche dall'osservazione delle spighe. La prima classe fenotipica mostrava delle spighe lunghe in media 9 cm e fertili ovvero con una media di 46 semi per spiga, le spighe della seconda classe avevano una dimensione ridotta (circa 6 cm) con una media di 11.5 semi per spiga e sono state definite semi-fertili, la terza classe mostrava delle spighe lunghe e sterili e la quarta classe aveva delle spighe corte e sterili (Figura 51).

Figura 51 Classi fenotipiche associate alle spighe, rispettivamente lunghe e fertili, corte e semi fertili, lunghe e sterili, corte e sterili.

Abbiamo quindi cercato di capire se ci fosse una correlazione tra il grado di fertilità delle piante e gli altri fenotipi misurati. A questo scopo abbiamo creato 3 gruppi composti dalle piante fertili, semi-fertili e sterili (gruppo 1, 2 e 3 rispettivamente) e abbiamo calcolato l'ANOVA (Analysis of variance) tramite il programma web SAS studio (https://welcome.oda.sas.com/), rappresentando la variabilità delle misurazioni attraverso i box plot riportati in figura 52 a,b,c. I risultati ottenuti mostrano che le piante sterili sviluppano un numero significativamente maggiore di culmi rispetto alle piante fertili (figura 52a) e sono significativamente più basse (Figura 52b).

Infine, il box plot in figura 52c mostra che non c'è variabilità statisticamente significativa quando si valuta il diametro del culmo principale nei tre gruppi di piante.

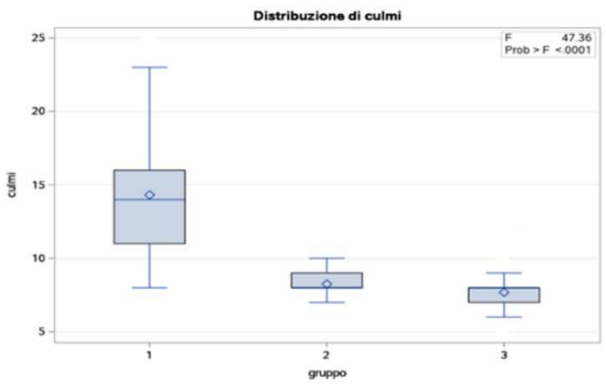


Figura 52a Il box plot mostra la variabilità del numero di culmi per pianta tra 3 gruppi fenotipici di piante. Il gruppo 1° è composto da piante con spighe sterili, il 2° da piante semi fertili, il 3°da piante fertili.

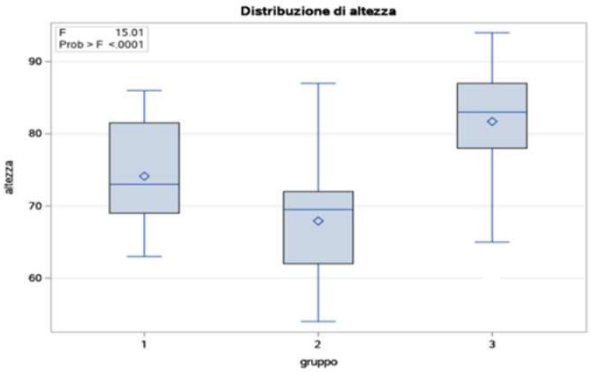


Figura 52b Il box plot mostra la variabilità al culmo principale per pianta tra 3 gruppi fenotipici di piante. Il gruppo 1° è composto da piante con spighe sterili, il 2° da piante semi fertili, il 3°da piante fertili.

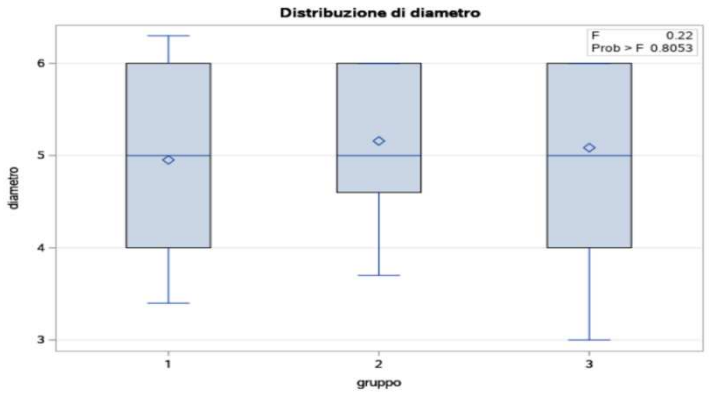


Figura 52c Il box plot mostra la variabilità del diametro del culmo principale per pianta tra 3 gruppi fenotipici di piante. Il gruppo 1° è composto da piante con spighe sterili, il 2° da piante semi fertili, il 3°da piante fertili. Il valore F 0.22 indica che non c'è variabilità statisticamente significativa.

Le dimensioni dei semi raccolti dalle spighe fertili e semi-fertili, sono state poi misurate utilizzando il software SmartGrain (http://www.kazusa.or.jp/phenotyping/smartgrain/index.html) e analizzati utilizzando il software SAS studio. Per i semi di ogni pianta il programma SmartGrain ha misurato

lunghezza, ampiezza, area e perimetro. Successivamente i dati di misurazione sono stati elaborati dal programma SAS studio attraverso un test dell'ANOVA (Analysis of variance). I valori ottenuti da questo test mostrano che esiste una variabilità statisticamente significativa tra le varie piante ma non ci permettono di identificare dei gruppi di piante che siano correlabili alla segregazione della mutazione nel gene FUWA-B.

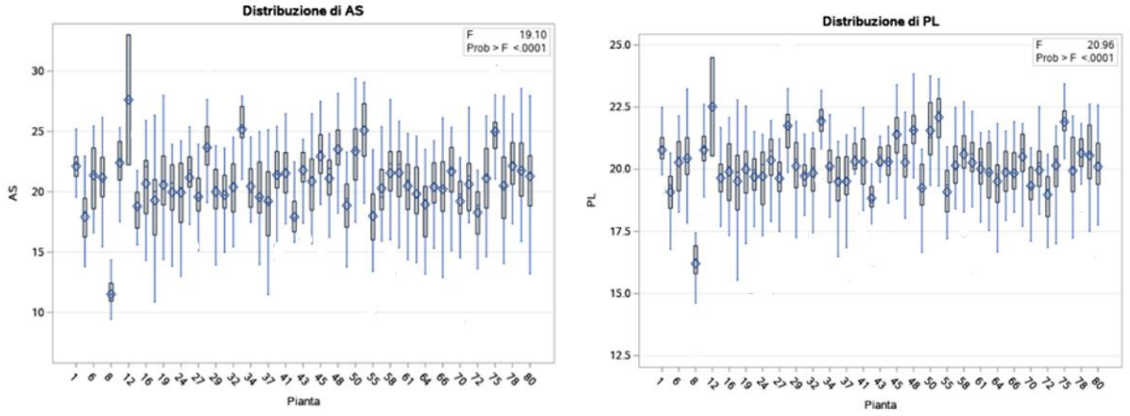


Figura 53a Box plot per analisi della variabilità dell'area (AS) e del perimetro (PL) tra i semi T1 della linea B3890.

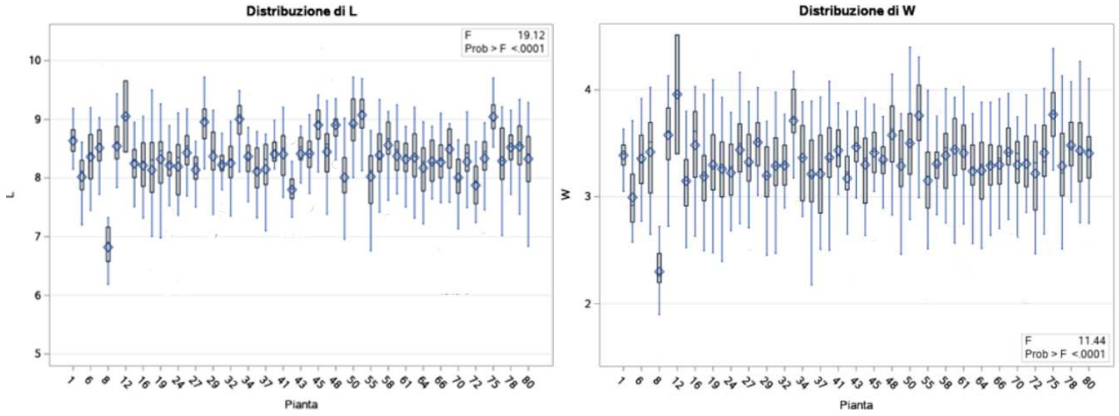


Figura 54b Box plot prodotti con SAS studio per analisi della variabilità della lunghezza (L) e dell'ampiezza (W) tra i vari gruppi di semi.

Abbiamo quindi cercato di capire se la variabilità fenotipica osservata correlasse con la segregazione dell'allele *fuwa-b.1*. La tabella 16 riassume l'osservazione dei dati genotipici in relazione a quelli fenotipici.

Come si può vedere, il rapporto tra individui omozigoti per l'allele fuwa-b.1 e individui eterozigoti o wild-type è maggiore nel gruppo 1, questo ci suggerisce una correlazione tra il fenotipo e la mutazione nel gene FUWA-B ma questa osservazione dovrà essere completata con la valutazione della ipotetica mutazione nel gene FUWA-A.

Gruppo	n. di piante	n. medio di semi per spiga	Segregazione allele *fuwa-b.1* (wild-type:eterozigoti:omozigoti)
1 (piante sterili con un numero di culmi compresi tra 10 e 25)	15	0	2:6:7
2 (Piante semi fertili con un numero di culmi compreso tra 6 a 10)	11	Compreso tra 9 e 22	1:6:4
3 (Piante fertili con un numero di culmi compreso tra 5 a 12)	30	Compreso tra 27 e 49	10:15:5

Tabella 16 Schematizzazione dei dati fenotipici in relazione con i dati genotipici per i tre gruppi di piante sterili, semifertili e fertili.

5. Discussioni

Una maggiore produzione di granella è essenziale per l'allevamento delle colture di cereali perché sono la principale fonte di energia per gli esseri umani e il bestiame (USDA, 2018). Il peso del seme è una componente significativa della resa della granella nei cereali ed è determinato dalla dimensione del seme e dal suo tasso di riempimento (Su et al., 2011).

Pertanto, una maggiore resa è un obiettivo predominante nei programmi di selezione del frumento. La dimensione del seme è una componente molto importante della resa. I semi più grandi non solo sono direttamente correlati alla resa in granella, ma hanno anche effetti favorevoli sul vigore della semina e sulla crescita precoce, promuovendo e stabilizzando così la capacità produttiva. La grande dimensione del seme è stata una caratteristica importante selezionata durante l'addomesticamento e l'allevamento del frumento moderno. Di solito la resa è rappresentata nella pratica del miglioramento genetico delle piante dal peso di mille semi (TGW), determinato principalmente dalla larghezza del seme (GW), dalla lunghezza del seme (GL) e dallo spessore (GT). Tutti e tre gli aspetti sono positivamente correlati con il peso di mille semi (thousand grain weight TGW) (Botwright et al. 2002). Sulla regolazione della resa in frumento sono disponibili poche informazioni ed è ancor meno per il frumento duro. Di recente è stato identificato un nuovo gene, considerato un regolatore negativo della dimensione del seme nella specie modello di riso, il gene FUWA (Chen et al.,2015).

Questo lavoro di tesi si è svolto sulla caratterizzazione morfologica e funzionale del gene FUWA in frumento duro.

Durante l'analisi fenotipica è stato possibile osservare come un gruppo di piante inizialmente in possesso di un numero di culmi compreso tra 9 e 14 ha successivamente mostrato un vertiginoso incremento di quest'ultimi. La particolarità di questo evento è dovuta al fatto che allo stadio fenologico in cui le piante si trovavano, Zadoks 69, avrebbero dovuto destinare la gran parte della loro energia metabolica nella maturazione della spiga piuttosto che nello sviluppo di nuovi culmi laterali, fase fenologica che avviene invece nei primi stadi di sviluppo, come lo stadio Zadoks 30. Inoltre, abbiamo notato che le piante appartenenti a questo specifico gruppo non sono riuscite a portare le spighe a maturazione, divenendo sterili. Nessuna tra le piante che possedevano un aumentato numero di culmi ha portato le spighe a maturazione ad eccezione di una sola spiga che aveva 2 semi, tutte le altre ne avevano 0. È chiara la differenza nella gestione dei culmi tra questo

gruppo di piante e le altre sorelle, suggerendoci che la mutazione del gene FUWA potrebbe aver determinato un'alterazione nei pathway che regolano il ciclo cellulare nel gruppo di piante prese in esame.

Di ulteriore rilevanza nella proteina codificata da FUWA è la presenza del dominio NHL che prende il nome da tre membri fondatori ncl-1,ht2a e lin-41, identificati per la prima volta in animali e identificati come mediatori di interazioni tra proteine-proteine o proteine-RNA (Slack e Ruvkun, 1998).Nelle piante studi funzionali di proteine contenenti dominio NHL sono rari mentre negli animali, le proteine contenenti il dominio NHL sono ampiamente conservate da *Caenorhabditis elegans* all'uomo e hanno dimostrato di regolare la proliferazione e lo sviluppo cellulare (Loedige e Filipowicz,2009). Le cellule staminali nei mutanti delle proteine contenenti il dominio NHL sono più grandi e proliferano indefinitamente, portando alla formazione di tumore cerebrale o ovarico (Sonoda et al., 2001; Neumuller et al.,2008). Partendo da queste informazioni, da quanto osservato durante la fenotipizzazione e dagli studi eseguiti dagli autori in riso e dato che nel mondo molecolare solitamente strutture simili hanno la stessa attività/funzione si potrebbe dedurre che il gene FUWA codifichi per una proteina che svolge un importante ruolo nella regolazione del ciclo cellulare attraverso l'interazione del dominio NHL con RNA messaggeri o con altre proteine coinvolte nei pathway di regolazione di quest'ultimo.

Inoltre, è stato effettuato un matching tra la predizione della strutta proteica di FUWA in riso (codice q6euk9) (prodotta da Alphafold, programma di intelligenza artificiale) e la struttura cristallografica di una proteina contenente il dominio funzionale NHL ,5ex7, identificata in *D. melanogaster* la quale dimostra l'effettiva capacità del dominio NHL di legare mRNA (Macošek et al.,2021). Grazie al matching strutturale eseguito tra le due strutture tramite il programma informatico Chimera ed impostando la matrice di sostituzione BLOSUM 100 è possibile notare in figura 56 come i due domini NHL combacino strutturalmente, il che potrebbe stare ad indicare che anche FUWA potrebbe svolgere il suo ruolo di regolatore del ciclo cellulare grazie all'interazione con alcuni mRNA.

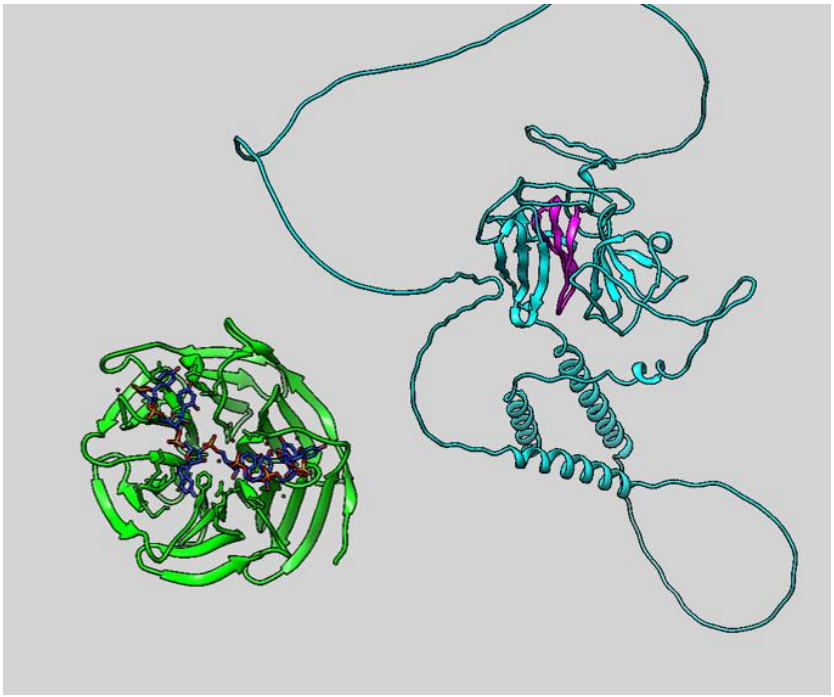


Figura 55 In verde struttura cristallografica della proteina contenente il dominio NHL identificata in D. melanogaster, in azzurro la proteina FUWA di riso ed in magenta il suo dominio NHL.

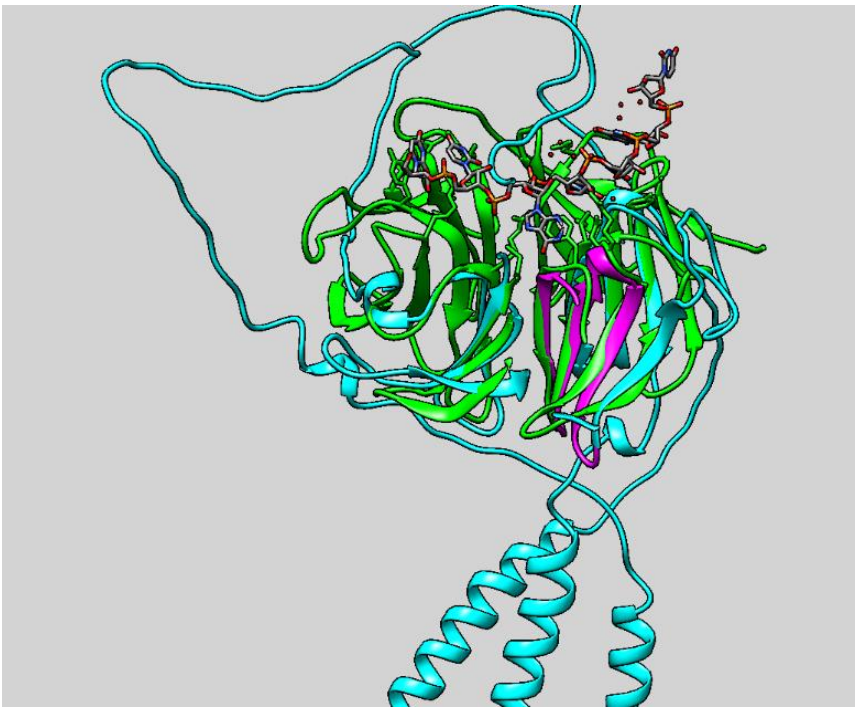


Figura 56 Sovrapposizione strutturale del dominio NHL di FUWA (magenta) con uno dei 3 domini NHL contenuti dalla proteina 5ex7 (verde) di D. melanogaster.

5.1 Pro e contro delle nuove tecniche di genome editing.

Negli ultimi anni tecnologie come nucleasi a dita di zinco ZNFs e le nucleasi effettrici simili a attivatori di trascrizione TALENs sono state migliorate per ottenere rotture del doppio filamento in grado di attivare i meccanismi di riparazione del DNA messi in atto dalla cellula. Una nuova tecnica di genome editing, CRISPR Cas composta dall'unione della proteina Cas9 e di un RNA guida che si appaia al DNA per indicare all'enzima Cas il punto preciso in cui tagliare ha dimostrato essere la migliore tra le tecnologie ad oggi a disposizione grazie alla semplice programmabilità della proteina Cas attraverso una piccola molecola di RNA guida. Questo ha permesso agli scienziati di poter modificare un qualsiasi sito nel genoma di qualunque cellula animale o vegetale con una precisione che non ha precedenti nella storia dell'ingegneria genetica.

Nell'ultima decade il sistema CRISPR/Cas è stato ottimizzato rendendolo possibile di moltissime applicazioni come, la possibilità di utilizzare enzimi Cas diversi dalla canonica Cas9 di *Streptococcus pyogenes*, le quali sono in grado di riconoscere sequenze PAM differenti dalla canonica NGG ; la capacità di mutare un determinato locus genico inducendo inattivazione genica (gene knock-out) anche attraverso traslocazioni o mutazioni puntiformi (single-base editing); è stato utilizzato per editare e manipolare anche molecole di RNA (Pickar-Oliver et al., 2019), anche attraverso la fusione dell'RNA guida con ribozimi al fine di incrementare l'efficienza di taglio (Zhan et al.,2023). Inizialmente sviluppato per organismi animali, CRISPR/Cas è stato rapidamente adottato anche per la ricerca e l'applicazione in altre specie come le piante, consentendo con successo l'individuazione di caratteri agronomici molto importanti nelle piante, in particolare nei cereali (Shan et al., 2014; Kumar et al., 2019). Datosi che rispetto ad altre specie di cereali, il frumento presenta una variabilità genetica limitata a seguito del processo di domesticazione subito in secoli di coltivazione e tecniche di breeding moderno che potrebbero aver contribuito ad un ulteriore limitazione genetica (Dubcovsky et al., 2007; Venske et al., 2019), le nuove tecniche di genome editing sempre più efficienti e precise potrebbero contribuire sia allo sviluppo di cereali con un alta resa, sia ad ampliare la variabilità genetica in frumento.

Uno dei problemi più ardui da affrontare con questa nuova tecnologia è la possibilità che la molecola di RNA guida riconosca sequenze diverse da quello bersaglio, inducendo così la Cas9 ad eseguire tagli in siti del genoma non previsti.

Oltre la possibilità che il taglio venga eseguito in un sito differente da quello atteso non bisogna sottovalutare l'eventualità che i meccanismi di riparazione del DNA messi in atto dalla cellula producano dei riarrangiamenti scorretti creando nuove mutazioni. Mediante l'introduzione di un DSB su due diversi cromosomi è possibile consentire riarrangiamenti cromosomici su larga scala,

ottenendo scambi reciproci di bracci cromosomici (Pacher et al., 2007). Inoltre, l'induzione di due DSB sullo stesso cromosoma può portare a delezioni e inversioni cromosomiche (Lee et al., 2012; Zhou et al., 2014; Ordon et al., 2016) come mostrato in figura 57.

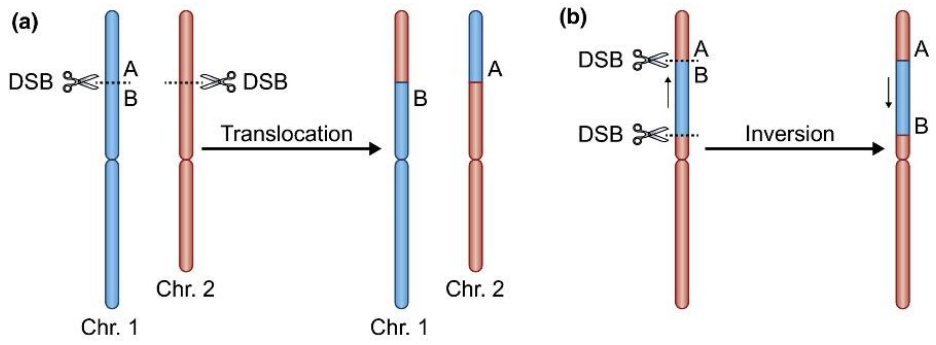


Figura 57 Esempio di immagine che mostra come un multiplo DSB (rottura a doppio filamento) indotto da una qualunque nucleasi, compreso il sistema CRISPR/Cas, possa determinare una traslocazione o inversione genica a seguito dei meccanismi di riparazione che la cellula mette in atto.

6. Bibliografia

Adrian Pickar-Oliver & Charles A. Gersbach. The next generation of CRISPR–Cas technologies and applications. https://doi.org/10.1038/s41580-019-0131-5

Bekele Shiferaw, Melinda Smale, Hans-Joachim Braun, Etienne Duveiller, Mathew Reynolds & Geoffrey Muricho. Crops that feed the world 10. Past successes and future challenges to the role played by wheat in global food security. https://doi.org/10.1007/s12571-013-0263-y

Borrill P, Ramirez-Gonzalez R, Uauy C. expVIP: a Customizable RNA-seq Data Analysis and Visualization Platform. Plant Physiol. 2016 Apr;170(4):2172-86. doi: 10.1104/pp.15.01667. Epub 2016 Feb 11. PMID: 26869702; PMCID: PMC4825114.

Christopher A. Lino,Jason C. Harper,James P. Carney & Jerilyn A. Timlin. Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1474964

Deepa Jaganathan, Karthikeyan Ramasamy, Gothandapani Sellamuthu, Shilpha Jayabalan and Gayatri Venkataraman. CRISPR for Crop Improvement: An Update Review. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00985

Eduardo Venske, Railson Schreinert dos Santos, Carlos Busanello, Perry Gustafson & Antonio Costa de Oliveira. Bread wheat: a role model for plant domestication and breeding. https://doi.org/10.1186/s41065-019-0093-9

F J Slack 1, G Ruvkun. A novel repeat domain that is often associated with RING finger and B-box motifs. DOI: 10.1016/s0968-0004(98)01299-7

Fedor V. Karginov and Gregory J. Hannon. The CRISPR system: small RNA-guided defense in bacteria and archaea. Mol Cell. 2010 Jan 15; 37(1): 7. doi: 10.1016/j.molcel.2009.12.033

Hyung Joo Lee1,2, Jiyeon Kweon1, Eunji Kim, Seokjoong Kim3 and Jin-Soo Kim4. Targeted chromosomal duplications and inversions in the human genome using zinc finger nucleases. doi:10.1101/gr.129635.111

Huanbin Zhou, Bo Liu, Donald P. Weeks, Martin H. Spalding, Bing Yang. Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice. https://doi.org/10.1093/nar/gku806

Hiroshi Nishimasu , Le Cong , Winston X Yan , F Ann Ran , Bernd Zetsche , Yinqing Li , Arisa Kurabayashi , Ryuichiro Ishitani , Feng Zhang , Osamu Nureki. Crystal Structure of Staphylococcus aureus Cas9. DOI: 10.1016/j.cell.2015.08.007

Inga Loedige 1, Witold Filipowicz. TRIM-NHL Proteins Take on miRNA Regulation. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.030

Jana Ordon , Johannes Gantner , Jan Kemna , Lennart Schwalgun , Maik Reschke , Jana Streubel , Jens Boch , Johannes Stuttmann . Generation of chromosomal deletions in dicotyledonous plants employing a user-friendly genome editing toolkit. DOI: 10.1111/tpj.13319

Jake Adolf V. Montecillo, Luan Luong Chu and Hanhong Bae. CRISPR-Cas9 System for Plant Genome Editing: Current Approaches and Emerging Developments. https://doi.org/10.3390/agronomy10071033

Jakub Macošek, Bernd Simon, Johanna-Barbara Linse, Pravin Kumar Ankush Jagtap, Sophie L Winter, Jaelle Foot, Karine Lapouge, Kathryn Perez, Mandy Rettel, Miloš T Ivanović, Pawel Masiewicz, Brice Murciano, Mikhail M Savitski, Inga Loedige, Jochen S Hub, Frank Gabel, Janosch Hennig. Structure and dynamics of the quaternary hunchback mRNA translation repression complex. https://doi.org/10.1093/nar/gkab635.

Joana R. Costa, Ph.D., Bruce E. Bejcek, Ph.D., James E. McGee, Ph.D., Adam I. Fogel, Ph.D., Kyle R. Brimacombe, M.S., and Robin Ketteler, Ph.D. Genome Editing Using Engineered Nucleases and Their Use in Genomic Screening. ncbi.nlm.nih.gov Bookshelf ID: NBK464635PMID: 29165977

Jorge Dubcovsky 1, Jan Dvorak. Genome plasticity a key factor in the success of polyploid wheat under domestication. DOI: 10.1126/science.1143986

Junichiro Sonoda and Robin P. Wharton1. Drosophila Brain Tumor is a translational repressor. doi: 10.1101/gad.870801

Li, Wanlong, e Bing Yang. «Translational Genomics of Grain Size Regulation in Wheat». Theoretical and Applied Genetics, vol. 130, n. 9, settembre 2017, pagg. 1765–71. DOI: 10.1007/s00122-017-2953-x

Maccaferri, M., Harris, N.S., Twardziok, S.O. et al. Durum wheat genome highlights past domestication signatures and future improvement targets. Nat Genet 51, 885–895 (2019). https://doi.org/10.1038/s41588-019-0381-3

Michael Pacher, Waltraud Schmidt-Puchta, Holger Puchta. Two Unlinked Double-Strand Breaks Can Induce Reciprocal Exchanges in Plant Genomes via Homologous Recombination and Nonhomologous End Joining. https://doi.org/10.1534/genetics.106.065185

Mishra, R., and Zhao, K. (2018). Genome editing technologies and their applications in crop improvement. Plant Biotechnol. Rep. 12, 57-68. doi: 10.1007/s11816-018-0472-0

Patrick D. Hsu, Eric S. Lander, Feng Zhang. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010

Philippa Borrill, Ricardo Ramirez-Gonzalez, and Cristobal Uauy *expVIP: a customisable RNA-seq data analysis and visualisation platform* Plant Physiology 2016: pp.15.01667v1-pp.01667.2015. doi: 10.1104/pp.15.01667

Qiwei Shan, Yanpeng Wang, Jun Li & Caixia Gao. Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system. DOI: 10.1038/nprot.2014.157

Ralph A. Neumüller, Joerg Betschinger, Anja Fischer, Natascha Bushati, Ingrid Poernbacher, Karl Mechtler, Stephen M. Cohen & Juergen A. Knoblich. Mei-P26 regulates microRNAs and cell growth in the Drosophila ovarian stem cell lineage. https://doi.org/10.1038/nature07014

Rakesh Kumar, Amandeep Kaur, Ankita Pandey, H. M. Mamrutha & G. P. Singh.CRISPR-based genome editing in wheat: a comprehensive review and future prospects. https://doi.org/10.1007/s11033-019-04761-3

Ricardo Ramirez-Gonzalez, Philippa Borrill et al. *The transcriptional landscape of hexaploid wheat across tissues and cultivars* Science 2018: Vol. 361, Issue 6403, eaar6089. doi:10.1126/science.aar6089

T. L. Botwright, A. G. Condon, G. J. Rebetzke and R. A. Richards. Field evaluation of early vigour for genetic improvement of grain yield in wheat. https://doi.org/10.1071/AR02007

Tautvydas Karvelis,Giedrius Gasiunas,Algirdas Miksys,Rodolphe Barrangou,Philippe Horvath &Virginijus Siksnys. crRNA and tracrRNA guide Cas9-mediated DNA interference in Streptococcus thermophilus. https://doi.org/10.4161/rna.24203

Thomas Gaj, Charles A. Gersbach, Carlos F. Barbas III. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. Published:May 09, 2013DOI:https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.04.004

Virginia M. G. Borrelli, Vittoria Brambilla, Peter Rogowsky, Adriano Marocco and Alessandra Lanubile. The Enhancement of Plant Disease Resistance Using CRISPR/Cas9 Technology. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01245

Yan Zhang, Nadja Heidrich, Biju Joseph Ampattu, Carl W.Gunderson, H. Steven Seifert, Christoph Schoen, Jörg Vogel, Erik J. Sontheimer. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.05.001

Yan Zhang. Pathogens and Disease, Volume 75, Issue 4, June 2017, ftx036, https://doi.org/10.1093/femspd/ftx036

Yi Zheng, Wei Shen, Jian Zhang, Bo Yang, Yao-Nan Liu, Huihui Qi, Xia Yu, Si-Yao Lu, Yun Chen, Yu-Zhou Xu, Yun Li, Fred H. Gage, Shuangli Mi & Jun Yao. CRISPR interference-based specific and efficient gene inactivation in the brain. DOI: 10.1038/s41593-018-0125-1

Yoshihiro Matsuoka. Evolution of Polyploid Triticum Wheats under Cultivation: The Role of Domestication, Natural Hybridization and Allopolyploid Speciation in their Diversification. https://doi.org/10.1093/pcp/pcr018.

Zahra Karimi, Ali Ahmadi, Ali Najafi, and Reza Ranjbar. Bacterial CRISPR Regions: General Features and their Potential for Epidemiological Molecular Typing Studies. Open Microbiol J. 2018; 12: 59–70. Published online 2018 Apr 23. doi: 10.2174/1874285801812010059

Zhenqi Su, Chenyang Hao, Lanfen Wang, Yuchen Dong & Xueyong Zhang. Identification and development of a functional marker of TaGW2 associated with grain weight in bread wheat (Triticum aestivum L.). https://doi.org/10.1007/s00122-010-1437-z