



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
FACOLTÀ DI AGRARIA

Dipartimento di Agronomia Ambientale e Produzioni Vegetali

TESI DI LAUREA IN BIOTECNOLOGIE AGRARIE

**L'USO DELLA GENOTIPIZZAZIONE MOLECOLARE IN AMBITO
VEGETALE**

Relatore: Dott.ssa Serena Varotto

Dipartimento di Agronomia Ambientale e Produzioni Vegetali

Correlatore: Dott. Cristian Forestan

Dipartimento di Agronomia Ambientale e Produzioni Vegetali

Laureando: Emanuele Trevisan

Matricola n.: 560803

ANNO ACCADEMICO 2009 - 2010

INDICE

1	ABSTRACT	1
2	INTRODUZIONE	2
2.1	I MUTANTI SPONTANEI	2
2.2	I MUTANTI CHIMICI.....	3
2.3	I MUTANTI INSERZIONALI	3
2.4	I MUTANTI TRANSGENICI.....	5
2.5	CASO DI STUDIO I: MUTANTI SPONTANEI DI MAIS PER IL TRASPORTO DELL'AUXINA	6
2.6	CASO DI STUDIO II: I MUTANTI INSERZIONALI PER REGOLATORI EPIGENETICI.....	10
2.7	CASO DI STUDIO III: LA LINEA OGM Mon810	11
3	SCOPO DELLA TESI	13
4	MATERIALI E METODI	15
4.1	MATERIALE VEGETALE	15
4.2	TERRENI DI CRESCITA.....	15
4.3	ESTRAZIONE E PURIFICAZIONE DNA.....	15
4.3.1	PROTOCOLLO PER IL KIT DNEASY	15
4.3.2	PROTOCOLLO PER L'ESTRAZIONE DI DNA ATTRAVERSO DNA MICROLYSIS	17
4.4	ESTRAZIONE RNA	17
4.5	CORSA ELETTROFORETICA	18
4.6	PCR E DISEGNO DEI PRIMERS	19
4.7	RT-PCR	25
4.8	ESTRAZIONE E PURIFICAZIONE DI FRAMMENTI DI DNA DA GEL DI AGAROSIO.....	26
4.9	CLONAGGIO NEL VETTORE pCRII-TOPO (Invitrogen).....	27
4.10	PCR-COLONIES.....	28
4.11	MINI PREP.....	29
4.12	SEQUENZIAMENTO	29
5	RISULTATI E DISCUSSIONI.....	31
5.1	CASO DI STUDIO I: MUTANTI SPONTANEI DI MAIS PER IL TRASPORTO DELL'AUXINA	31
5.2	CASO DI STUDIO II: I MUTANTI INSERZIONALI PER REGOLATORI EPIGENETICI.....	37
5.3	CASO DI STUDIO III: LA LINEA OGM Mon810	42
6	CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE	49
7	BIBLIOGRAFIA.....	51
8	RINGRAZIAMENTI.....	55

1 ABSTRACT

The Polymerase Chain Reaction (PCR) is a molecular biology technique to amplify a single or few copies of a piece of DNA across several orders of magnitude, generating thousands to millions of copies of a particular DNA sequence. Developed in 1983 by Kary Mullis, PCR is now a routinely and often indispensable technique used in medical and biological research labs for a variety of applications. These include DNA cloning for sequencing, DNA-based phylogeny, or functional analysis of genes; the diagnosis of hereditary diseases; the identification of genetic fingerprints (fingerprinting and genotyping), and the detection and diagnosis of infectious diseases. Its use in so many applications is mainly due to its flexibility, velocity and reproducibility.

We developed and used three different PCR-based approaches to genotype, identify and characterize three different typology of maize mutation in spontaneous, insertional and transgenic mutants.

In the first case PCR have been used to verify if a mutation in the auxin efflux carries *ZmPIN1a* could be responsible of the *semaphore1* mutant phenotype. This spontaneous mutant present several auxin related defects and maps closely to the *ZmPIN1a* position. We amplify, cloned and sequenced the candidate gene coding sequence from mutant plants: based on the preliminary results no mutation has been detected in the *ZmPIN1a* CDS, contradicting our initial hypothesis.

More successful have been the two following cases: PCR have been indeed use for the identification of epigenetic mutant obtained by Mu transposition in a segregant population and to verify the presence of transgenic plants carrying the stem corn borer resistance in a maize field. Insertional mutant genotyping has been carried out using primer combinations on the Mu terminal inverted repeats (TIR) and on the flanking gene sequences, while for GMOs detection primers have been designed on the construct cassette.

These results are just the first steps into different research projects that want to study auxin transport and epigenetic regulation of maize development, but allowed us to assess the power and the plasticity of the PCR in plant research. Furthermore, the forensic genetics case clearly shows how molecular biology techniques can be useful also in not research-related circumstances.

2 INTRODUZIONE

Il mais (*Zea mays*) è tra le piante ad interesse agronomico più coltivate al mondo. Il suo utilizzo spazia dall'uso negli insilati per animali da allevamento all'utilizzo nella dieta umana fino alla produzione di materie plastiche biodegradabili e all'utilizzo in biofermentatori per la produzione di biogas. Si stima che nel 2020 la domanda di mais aumenterà del 50% rispetto al 1995 (Pingali, 2001). L'importanza agronomica di questa specie va quindi di pari passo con l'importanza della ricerca scientifica: la ricerca ha portato nel corso degli anni a migliorarne la produttività introducendo l'uso di ibridi, varietà maschiosterili e varietà transgeniche, e ora mira a far diventare questa coltura indipendente da stress abiotici come salinità, sbalzi termici e siccità. Anche per la sua grande importanza economica, la comunità scientifica si è spesa per arrivare alla definizione completa del suo genoma (Schnable et al., 2009).

Nel corso degli anni le tecniche di biologia molecolare, genica e genomica sono diventate strumenti importantissimi per la ricerca e hanno permesso di ottenere e caratterizzare mutanti di *Zea mays* in breve tempo. La genetica del mais ha infatti una lunga storia che inizia dall'identificazione dei mutanti nei primi anni del 1900. La separazione dei fiori maschili dai fiori femminili, facilitando le impollinazioni incrociate, ha permesso di ottenere più facilmente popolazioni di mappaggio (Bortiri et al. 2006). Per questi e molti altri motivi il mais possiede una mappa genetica da oltre settant'anni, questo a sua volta ha reso possibile l'isolamento di mutazioni spontanee in popolazioni più o meno naturali, l'induzione di mutazioni casuali attraverso mutagenesi chimica (per esempio tramite EMS), la mutagenesi inserzionale (inducendo lo spostamento di trasposoni all'interno del genoma), per arrivare al silenziamento, all'overespressione e all'inserimento di specifici geni mediante trasformazione genetica delle piante e quindi l'ottenimento di individui transgenici.

2.1 I MUTANTI SPONTANEI

Le mutazioni spontanee dominanti vengono normalmente e facilmente identificate in base al fenotipo, per questo motivo i mutanti dominanti, anche se più rari, sono i più facilmente studiabili. D'altro canto le mutazioni dominanti, nella stragrande maggioranza dei casi, non producono progenie per analisi successive essendo la mutazione letale. Al contrario, i mutanti recessivi sono duecento volte più frequenti rispetto ai dominanti, anche se inizialmente il loro fenotipo è mascherato dall'eterozigosi provocata dall'allele non mutato e dunque bisogna operare delle autofecondazioni e selezionare per individuare i fenotipi mutanti (M. G. Neuffer et al., 1980). Per quanto riguarda il mais, negli ultimi cent'anni, diverse istituzioni americane si sono occupate (e si occupano tutt'ora) dell'identificazione e mantenimento di mutanti spontanei di mais (MaizeGDB, <http://www.maizegdb.org/>; Maize Genetics Corporation Stock Center,

<http://maizecoop.cropsci.uiuc.edu/>). Molti di questi sono stati caratterizzati a livello genetico attraverso la tecnica del “*positional cloning*” che prevede, attraverso lo studio di popolazioni di mappaggio, l’identificazione di marcatori molecolari strettamente associati alla mutazione. Il tratto di genoma tra i due marcatori può quindi essere facilmente sequenziato da librerie BAC (Bortiri et al., 2006). Attualmente il recente sequenziamento del genoma di mais e le numerose mappe genetiche disponibili hanno permesso di svincolarsi da questo procedimento lungo e dispendioso. Conoscendo infatti la posizione di mappa di una determinata mutazione è possibile risalire indirettamente al/ai gene/i presenti in tale regione cromosomica e verificare la presenza di eventuali mutazioni a carico di tali geni dal *background* mutante. Dato l’enorme numero di geni presenti in ristrette regioni cromosomiche la scelta del gene candidato viene ovviamente fatta in base al fenotipo del mutante e a conoscenze derivanti dallo studio di altre specie quali *Arabidopsis thaliana* o riso.

2.2 I MUTANTI CHIMICI

Nella prima parte del secolo scorso la tecnica maggiormente utilizzata per produrre linee mutanti di mais era quella di trattare le cariossidi o il polline di mais con EMS (Etil metanosulfonato). Questa tecnica chimica permette l’ottenimento di mutanti senza grandi difficoltà, ma non fornisce indicazioni per successive analisi di tipo genetico.

2.3 I MUTANTI INSERZIONALI

I trasposoni, o elementi trasponibili sono sequenze di DNA che possono spostarsi da un sito ad un altro del genoma interrompendo, alle volte, sequenze codificanti. Le trasposizioni vengono distinte in tre tipi. Il primo tipo prevede l’escissione dell’elemento dal suo sito in un cromosoma e il suo inserimento in un’altra posizione. L’escissione e l’inserzione sono catalizzati da un’enzima chiamato trasposasi. Il secondo tipo implica la replicazione del DNA dell’elemento trasponibile. Una proteina, la trasposasi, codificata dall’elemento stesso, funge da mediatore nell’inserzione tra l’elemento e il potenziale sito d’inserzione. Durante questa interazione, l’elemento si replica, una copia di questo si inserisce nel nuovo sito mentre l’altra rimane nel sito originario. Il terzo tipo prevede che la trasposizione venga mediata da una trascrittasi inversa. Quest’enzima usa l’RNA dell’elemento come stampo per sintetizzare le molecole di DNA che vengono così inserite in nuovi siti cromosomici (Principi di genetica, Snustad et al., 2010). Per quanto riguarda i vegetali un tipo di trasposizione molto diffusa è la prima ed è anche quella di cui fanno parte gli elementi trasponibili Ac/Ds scoperti in mais da Barbara McClintock (The origin and behavior of mutable loci in maize,

1950). Successivamente alla scoperta della McClintock molti sono stati i trasposoni scoperti ed identificati in mais e uno di questi è il trasposone Mu (*Mutator*). Questo trasposone, identificato nel 1978, codifica per una trasposasi che riconoscono l'elemento Mu a livello delle due estremità terminali ripetute ed invertite (TIR) di circa 220bp. Gli elementi trasponibili Mu, in particolare si inseriscono prevalentemente a livello di sequenze codificanti, rappresentando un ottimo mezzo per la mutagenesi casuale. Dato che la trasposizione avviene molto tardi nello sviluppo, al punto che il gametofito normalmente contiene mutazioni indipendenti, è sufficiente utilizzare il polline di una linea Mu attiva per impollinare un'infiorescenza femminile di una pianta "recipiente". In aggiunta, poiché gli elementi Mu raramente si excidono, le mutazioni causate da questo elemento trasponibile sono ereditabili (Lisch D et al., 1995; China F. Lunde et al., 2003).

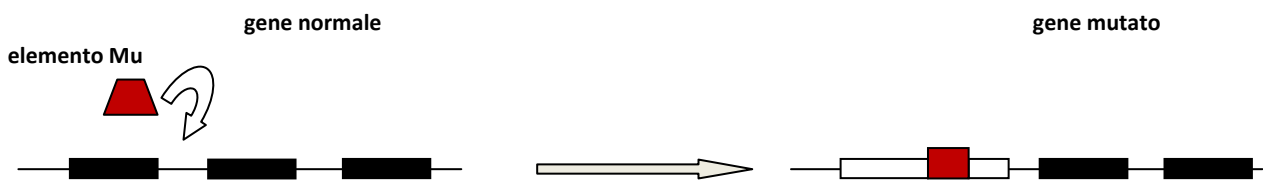


Figura 2.1: Inserimento casuale di Mu all'interno di un gene

Lo screening di mutanti così ottenuti è possibile attraverso due vie: attraverso la *forward genetics* ovvero l'osservazione delle piante alla ricerca di fenotipi mutanti interessanti o attraverso la *reverse genetics* e l'applicazione della reazione a catena della polimerasi (PCR). In questo caso primers disegnati sulle sequenze TIR vengono utilizzati in combinazione con primers gene-specifici, per individuare eventuali inserzioni a carico di un gene di interesse (Bensen et al.1995;Das and Martienssen 1995;Chuck et al. 1998;Hanley et al. 2000). Infatti, nella progenie mutante, con ogni pianta che porta la trasposizione in un locus differente, è possibile, conoscendo la sequenza del trasposone risalire alla sequenza delle regioni fiancheggianti l'inserzione, e di conseguenza alla sequenza del gene interrotto. Questo approccio è limitato dalla conoscenza delle sequenze del trasposone, ma è molto più veloce e attendibile del primo. Diverse organizzazioni e aziende private hanno sviluppato negli anni vaste collezioni di mutanti Mu e queste sono uno strumento molto utile per studi sulla funzione dei geni e per progetti di genomica.

2.4 I MUTANTI TRANSGENICI

Nonostante il mais sia una specie recalcitrante alla trasformazione genetica mediata da *Agrobacterium*, diverse metodologie sono state comunque messe a punto per ottenimento di mutanti transgenici. Questi normalmente prevedono l'over-espressione o il silenziamento di un gene endogeno oppure l'inserimento di geni esogeni che consentono l'ottenimento di particolari caratteri o performance produttive. Negli organismi vegetali, nei primi due casi i mutanti vengono soprattutto utilizzati per conoscere la funzione dei geni mentre nel terzo caso si entra nel mondo degli organismi geneticamente modificati (OGM). In tutti i casi l'approccio è lo stesso e implica la preparazione di un costrutto che contenga un promotore, la sequenza da far esprimere, un terminatore e un marker per la selezione dei trasformati. Questo costrutto deve poi essere inserito nel genoma dell'organismo attraverso infezione con *Agrobacterium* o con metodi fisici quali la trasformazione biolistica. La differenza sostanziale tra i due tipi di mutanti sta nel fatto che i mutanti di mais che permettono un'overespressione o un silenziamento di un gene rimangono normalmente in un ambiente confinato, mentre i mutanti transgenici sono coltivati in campo aperto con conseguenti problemi di coesistenza tra queste colture e le colture tradizionali. I mutanti transgenici di *Zea mays*, all'anno 2009, sono i secondi OGM più coltivati al mondo (40 milioni di ha) dopo la soia (70 milioni di ha), ma vengono coltivati più di cotone (15 milioni di ha) e colza (7 milioni di ha). I 40 milioni di ha di mais biotech coltivato rappresenta il 26% del mais coltivato a livello mondiale (fonte ISAAA, <http://www.isaaa.org/>). Le principali caratteristiche che si sono ottenute in queste linee dalle rispetto a quelle tradizionali sono la resistenza agli erbicidi e agli insetti. La linea MON810 (YieldGard®) è stata la prima linea OGM ad essere stata autorizzata per la coltivazione in Europa nel 1988 ed è una delle linee più coltivate. Presenta all'interno del proprio genoma il gene codificante la delta endotossina CryI(A), naturalmente presente in *Bacillus thuringiensis*, che una volta all'interno dell'insetto ne distrugge la membrana peritrofica intestinale uccidendolo. La proteina CryI(A) è attiva specificamente contro i lepidotteri ed in particolare contro le larve di piralide, un insetto che può determinare perdite di produzione fino al 20% e per il quale la lotta chimica è molto costosa e complicata (figura 2.2).

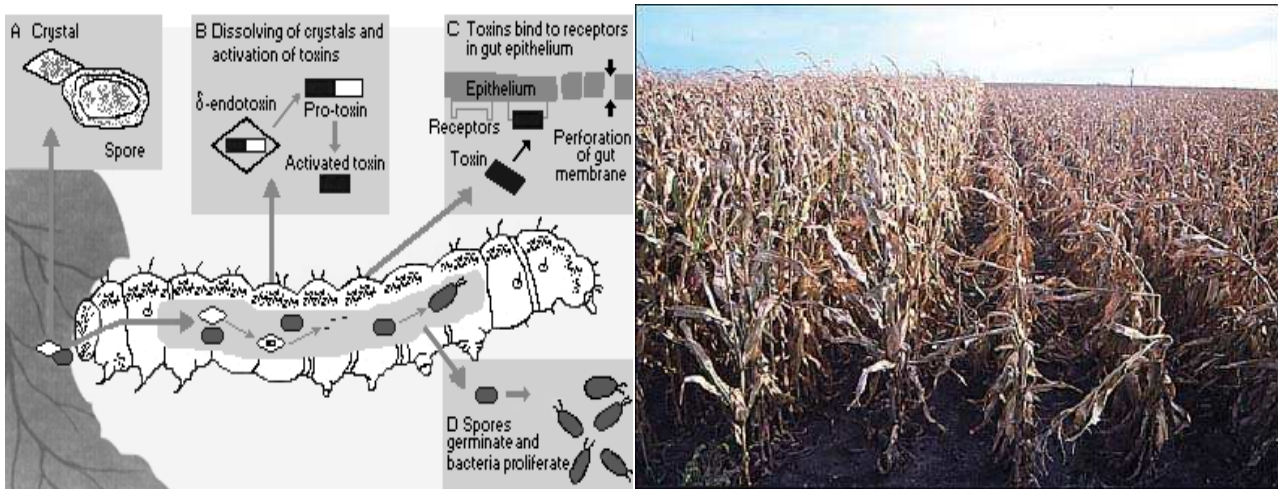


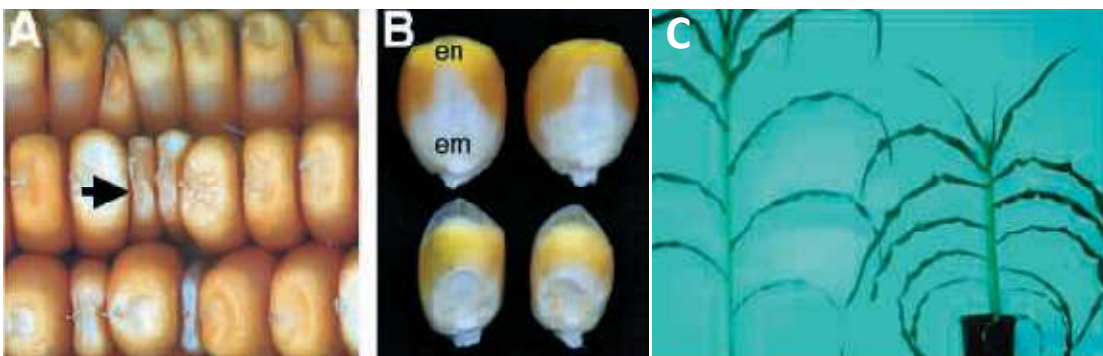
Figura 2.2 :Meccanismo di funzionamento di CryI(A) in piralide e differenza tra mais MON810 e mais tradizionale

2.5 CASO DI STUDIO I: MUTANTI SPONTANEI DI MAIS PER IL TRASPORTO DELL'AUXINA

L'auxina è stato il primo ormone vegetale ad essere scoperto ed è coinvolto nella regolazione di tutto lo sviluppo delle piante. Infatti oltre a controllare i processi di divisione e distensione cellulare, regola l'organogenesi, il differenziamento dei tessuti vascolari, la dominanza apicale, l'embriogenesi e la formazione delle radici laterali. L'auxina è inoltre coinvolta nei fenomeni di crescita direzionale, anche chiamati tropismi, in risposta a stimoli esterni quali la luce e la gravità. L'auxina è una molecola mobile e il suo trasporto polarizzato permette lo scambio d'informazioni tra cellule, tessuti e organi della pianta; è quindi la sua distribuzione differenziale (massimi e minimi di concentrazione) in determinati tessuti o cellule e in diverse fasi dello sviluppo che controlla e regola tutti i processi prima elencati. Il ruolo dei trasportatori di auxina è quindi di fondamentale importanza nel controllo dello sviluppo delle piante e recenti studi hanno chiarito quanto complicati siano i meccanismi di regolazione alla base di questo trasporto. Studi biochimici e di biologia molecolare, condotti principalmente nella pianta modello *Arabidopsis thaliana*, hanno evidenziato che l'efflusso, mediato dalle proteine PIN, è lo step limitante il trasporto polare dell'auxina. Le proteine PIN sono proteine integrali di membrana e la loro distribuzione asimmetrica a livello di specifici lati della membrana plasmatica è responsabile della polarizzazione del flusso di auxina e della creazione di gradienti di concentrazioni in specifici tessuti o cellule.

In *A. thaliana* sono stati identificati 8 geni *PIN* che sono coinvolti in diversi aspetti dello sviluppo pre- e post-embriionale. Geni ortologhi ai *PIN* di *A. thaliana* sono stati successivamente clonati in *Oryza sativa* (Paponov et al., 2005; Xu et al., 2005; Wang et al., 2009), *Brassica juncea* (Ni et al., 2002) e *Zea mays* (Carraro et al., 2006; Forestan et al., 2010). Nel nostro laboratorio, sono stati infatti recentemente isolati e caratterizzati tre geni di mais ortologhi ad *AtPIN1*, chiamati *ZmPIN1a*, *ZmPIN1b*, *ZmPIN1c*. Analisi di espressione a livello di trascritti e proteine hanno dimostrato che i carrier di efflusso dell'auxina svolgono un ruolo fondamentale nel controllo dello sviluppo di questa monocotiledone, già dalle prime fasi dell'embriogenesi fino al differenziamento delle infiorescenze. Purtroppo il ruolo di questi trasportatori non è ancora stato analizzato a livello funzionale a causa delle difficoltà di ottenere specifici mutanti per questi geni attraverso trasformazione genetica. Il recente sequenziamento del genoma di mais ha però permesso di mappare i tre geni *ZmPIN1* su ristrette regioni rispettivamente dei cromosomi 9, 5 e 4 (Forestan et al., 2010) e attraverso lo studio di mappe genetiche è stato osservato che nelle vicinanze dei geni *ZmPIN1a* e *ZmPIN1b* mappano due mutanti, *semaphore1* e *brachytic3*, che presentano dei fenotipi potenzialmente associabili a difetti di efflusso dell'auxina.

Il mutante *semaphore1* (*sem1*; Scanlon et al., 2002) presenta numerose alterazioni dello sviluppo pre- e post-embriionale (Figura 2.3). Se il difetto più evidente a carico di questo mutante è la riduzione dell'altezza delle piante causata dalla diminuzione della crescita per distensione cellulare degli internodi, dettagliate analisi hanno mostrato anomalità anche a carico delle cariossidi. Sia l'endosperma sia l'embrione di cariossidi omozigoti sono infatti più piccoli e deformati e difetti sono stati osservati anche a carico dell'apparato radicale e dei tessuti vascolari (Scanlon et al., 2002).



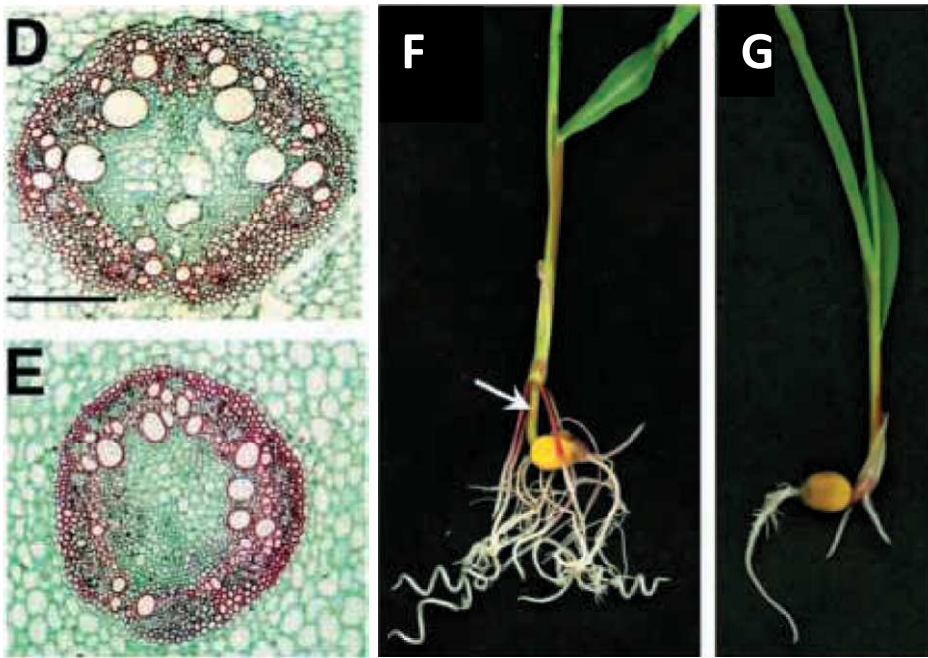


Figura 2.3 : Mutanti Sem1 che presentano degli evidenti difetti nelle cariossidi e nello sviluppo del fusto. A)Cariossidi di pannocchia di *sem1*. B)Cariossidi non mutanti a confronto con cariossidi di *sem1*che possiedono endosperma ed embrione più piccoli. C)Fusto di pianta non mutante e fusto di *sem1* a confronto. D e E)Sezione trasversale di ipocotile di un non-mutante e di *sem1*. F e G)Sviluppo radicale di plantula non mutante e *sem1* (Scanlon et al., 2002)

Studi fisiologici hanno inoltre mostrato nei mutanti *sem1* una sensibile riduzione del trasporto basipeto di auxina, quindi all'apice vegetativo verso la base del fusto. Questa osservazione, aggiunta al fenotipo del mutante che mette assieme molti difetti collegabili al trasporto auxinico e alla vicinanza di mappa ci hanno fatto ipotizzare che una mutazione a carico del gene *ZmPIN1a* possa essere responsabile del fenotipo *sem1*.

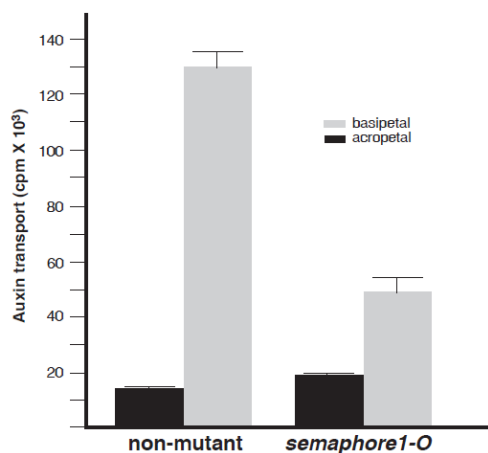


Figura 2.4 : Trasporto auxinico in una linea non mutante e nel mutante *sem1* (Scanlon et al., 2002)

La stessa ipotesi è stata fatta anche per quanto riguarda il gene *ZmPIN1b* e il mutante *brachytic3* (*br3*), sebbene le informazioni su questo mutante siano molto ridotte. *br3* infatti appartiene, con *br1* e *br2*, ad un gruppo di mutanti che presentano internodi molto corti, basse stature, foglie più scure e sono insensibili a trattamenti con giberelline, auxine e brassinosteroidi. Solo il mutante *br2* è stato dettagliatamente caratterizzato a livello fenotipico e molecolare (Multani et al., 2003; figura 2.5), evidenziando che il nanismo e i difetti di differenziamento dei tessuti vascolari sono dovuti anche in questo caso ad una riduzione del trasporto auxinico causato da una mutazione a carico di un trasportatore di efflusso dell'auxina della famiglia MDR/PGP (Multi-Drug Resistance / P-glycoproteins).

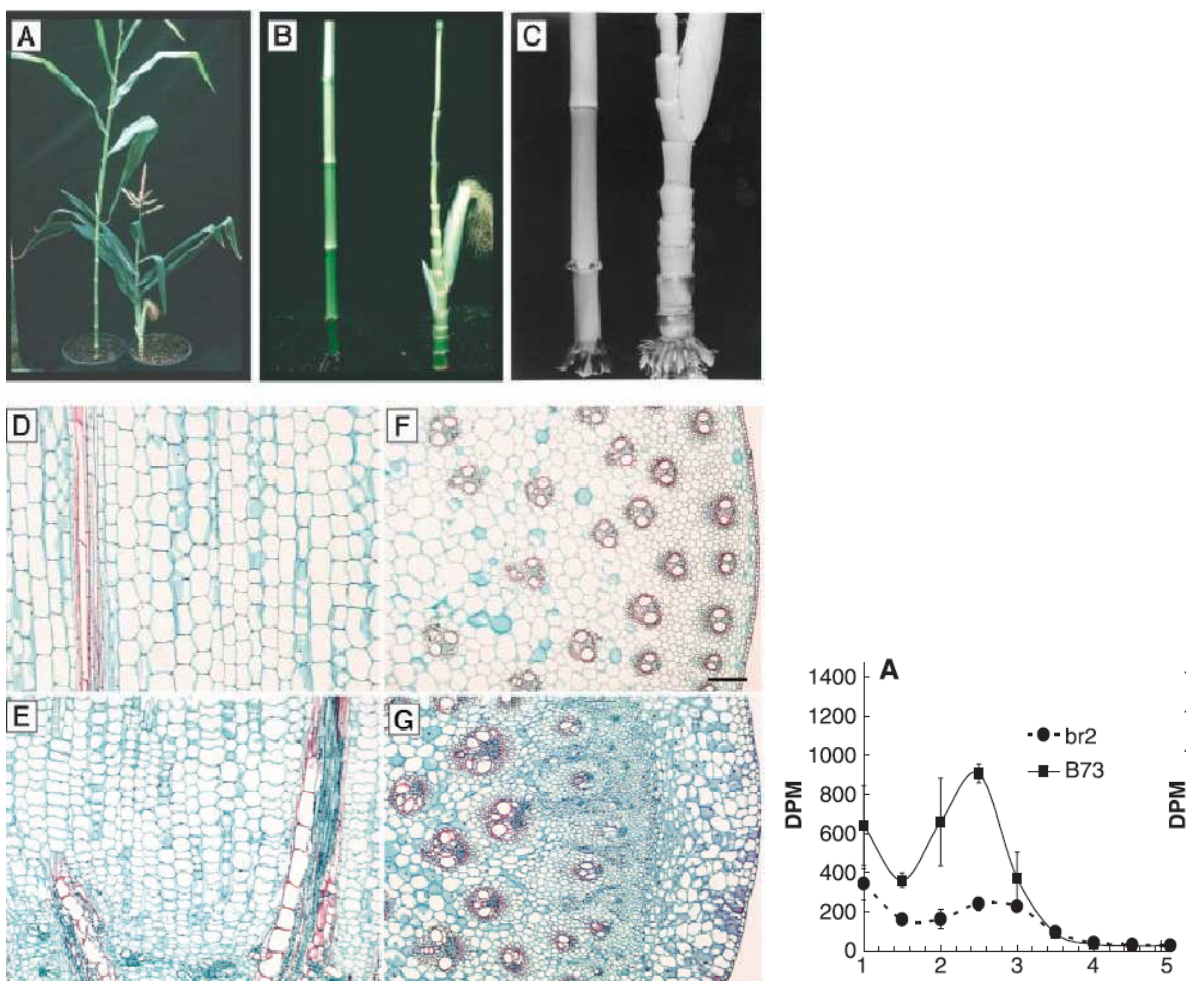


Figura 2.5 : A),B) e C)Confronto fra fenotipi di piante B73 a sinistra e piante *br2* con internodi compatti a destra. Sezione longitudinale di fusto rappresentanti cellule del primo internodo di *wild type*(D) e *br2*(E). Sezione trasversale di fusto rappresentanti cellule del primo internodo di *wild type*(F) e *br2*(G). Grafico rappresentante il trasporto auxinico nel primo internodo, in mutanti *br2* e wild type B73 in crescita luminosa (Multani et. al., 2003)

Più recentemente il tentativo di produzione di doppi mutanti br2br3, ha mostrato un fenotipo ancora più severo nel doppio mutante rispetto ai due singoli mutanti, con alterazioni molto spesso letali anche a carico dell'embrione (Cassani et al., 2009), suggerendo che anche la mutazione br3 possa coinvolgere il trasporto auxinico.

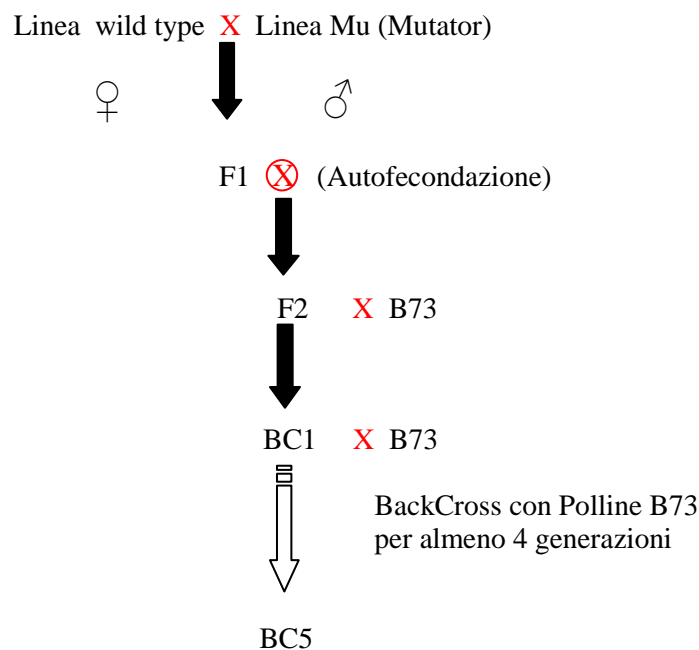
2.6 CASO DI STUDIO II: I MUTANTI INSERZIONALI PER REGOLATORI EPIGENETICI

L'epigenetica può essere definita come lo studio dei cambiamenti della regolazione genica e fenotipici che non dipendono da modificazioni nella sequenza primaria del DNA. Negli ultimi anni è infatti stato chiaramente dimostrato che modificazioni epigenetiche quali la metilazione del DNA, le modificazioni delle code istoniche e la presenza di varianti istoniche possono agire a livello della cromatina per alterare e regolare spazialmente e temporalmente l'espressione genica, specialmente in risposta a fattori ambientali. Queste modificazioni, portano quindi alla creazione di nuova variabilità genetica che può essere ereditata nella progenie, rappresentando una fonte importante di variabilità utilizzabile per nuovi programmi di miglioramento genetico delle piante di interesse agrario.

Nell'ambito del progetto AENEAS, finanziato dall'Unione Europea, il nostro gruppo di ricerca e i numerosi partner stranieri sono particolarmente interessati all'identificazione dei meccanismi genetico-molecolari che portano alla formazione di questa variabilità genetica in risposta a stress ambientali e a come questa venga ereditata stabilmente nella progenie. Questi studi vengono svolti in parallelo in *Arabidopsis thaliana* e in *Zea mays*, avvalendosi di particolari tecniche che permettono lo studio della metilazione del DNA (sequenziamento in seguito a conversione con Bisolfito - BI-Seq) e lo studio delle modificazioni istoniche (Chromatin Immuno-Precipitation - ChiP). In quest'ottica la disponibilità di specifici mutanti a carico di geni che regolano/controllano queste modificazioni epigenetiche (epiregolatori) è di fondamentale importanza, specialmente in mais, e lo *screening* di una libreria di mutanti inserzionali Mu di proprietà di una *company* partner del progetto ha permesso l'identificazione di tre linee mutanti per due diversi epiregolatori.

In particolare in due linee Mu è stata identificata un'inserzione a carico del gene di mais *CHR120*, putativo ortologo del gene *MOM* di *Arabidopsis*, coinvolto nella regolazione del silenziamento genico attraverso la metilazione del DNA, sebbene non direttamente implicato nella metilazione stessa. Una terza linea Mu presenta invece un'inserzione a carico del gene codificante per una deacetilasi istonica (HDA108) che quindi controlla la condensazione della cromatina.

Queste linee mutanti inserzionali sono state ottenute attraverso la fecondazione di una infiorescenza femminile wt con polline derivante da una linea in cui il trasposone Mu è particolarmente attivo (Figura 2.6). In questo modo ogni individuo della progenie presenterà inserzioni indipendenti a carico di geni diversi.



Purtroppo attraverso questa procedura si ottengono mutanti in un *background* ibrido ed è quindi necessario procedere con almeno 5 reincroci sulla linea B73, linea di riferimento per il mais di cui è stato completamente sequenziato il genoma, prima di passare poi all'autofecondazione delle linee BC5 per avere la mutazione in stato di omozigosi. Durante tutti questi incroci è necessario seguire la segregazione della mutazione attraverso la genotipizzazione di ogni singolo individuo secondo un protocollo che prevede l'utilizzo della reazione a catena della polimerasi.

2.7 CASO DI STUDIO III: LA LINEA OGM Mon810

Gli organismi geneticamente modificati (OGM) ad oggi sono al centro di parecchie discussioni ed interessi e non tutti gli stati ne accettano la commercializzazione e l'uso. Attualmente, benché l'Unione Europea abbia autorizzato la coltivazione di organismi geneticamente modificati, la legislazione nazionale è alquanto lacunosa. Chi volesse coltivare queste piante infatti deve ottenere una specifica autorizzazione dal Ministero delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali, ma il Ministero stesso non ha di fatto approvato le linee guida per concedere tali autorizzazioni. Di fatto,

la coltivazione di OGM in Italia non è autorizzata anche se non esplicitamente vietata. Questa situazione ha portato alcuni agricoltori a seminare ugualmente alcuni appezzamenti di mais OGM, scatenando un vespaio di polemiche e l'apertura di un'inchiesta da parte delle autorità giudiziarie che hanno affidato al nostro gruppo la perizia su un appezzamento probabilmente coltivato con mais OGM della linea MON810.

Le varietà transgeniche autorizzate alla coltivazione presentano cassette geniche così costituite: sequenza promotore – sequenza codificante – sequenza terminatore. La registrazione delle varietà per la coltivazione richiede che le sequenze componenti la cassetta genica siano note allo scopo di poter prontamente identificare ciascuna varietà transgenica. Per fare ciò il metodo universalmente approvato è l'amplificazione della cassetta attraverso l'applicazione della reazione a catena della polimerasi (PCR). Questa tecnica diagnostica può dare dei risultati in merito alla quantità di prodotto transgenico (Real Time PCR, nel caso si vogliano verificare contaminazioni) o semplicemente a livello qualitativo (PCR "end point"). La prassi per eseguire le indagini di identificazione prevede il disegno di primer sulle diverse cassette che consentono quindi di discriminare le diverse varietà geneticamente modificate.

La linea MON810 è stata ingegnerizzata per ottenere la produzione di una tossina batterica (CryI) che conferisce resistenza alle larve di lepidotteri (in particolare la piralide) e presenta, oltre al gene che codifica per questa tossina, anche il promotore costitutivo del virus del mosaico del cavolfiore (P-CaMV 35S), l'introne del gene hsp70 di mais e il terminatore NOS (figura 2.7). Su queste sequenze sono stati disegnati primer specifici utilizzati per le nostre indagini.



Figura 2.7 : Cassetta genica di Mon810

3 SCOPO DELLA TESI

Il lavoro di questa tesi ha previsto la genotipizzazione di tre tipi di mutanti di mais. Da decenni *Zea mays* e suoi mutanti sono al centro di parecchi studi e dunque la letteratura fornisce molto materiale a riguardo. Nonostante ciò solo da alcuni anni, con la conoscenza delle prime tecniche di biologia molecolare, la genetica di questi mutanti è stata conosciuta con maggiore dettaglio. Il *genotyping* molecolare, ed in particolare quello che utilizza la PCR, viene adottato da una decina d'anni. È stato scelto di utilizzare la PCR per la precisione, efficienza, duttilità e riproducibilità di questa tecnica, anche se i tre tipi di mutanti di *Zea mays* hanno richiesto delle variazioni nella tecnica. L'uso di specifici primers infatti ha dapprima permesso di identificare e studiare la segregazione di tre mutanti inserzionali in cui il trasposone Mu si è integrato all'interno dei geni codificanti per una deacetilasi istonica (HDA108) e di un gene coinvolto nei meccanismi di metilazione del DNA (CHR120). In un caso di genetica forense invece la PCR ha permesso di individuare un campo in cui era stato seminato mais transgenico esprimente una tossina di origine batterica che conferisce resistenza ai lepidotteri (Monsanto 810). Infine si sta verificando se i fenotipi dei mutanti spontanei *semaphore1 (sem1)* e *brachytic3 (br3)* possano essere dovuti a mutazioni rispettivamente a carico dei carriers di efflusso dell'auxina ZmPIN1a e ZmPIN1b.

4 MATERIALI E METODI

4.1 MATERIALE VEGETALE

Le estrazioni di DNA e RNA sono state eseguite a partire da foglie di piante di mais. Per quanto riguarda i mutanti CHR120 e HDA108, *la company* che ci ha fornito le cariossidi è la Biogemma. Le piante sono state coltivate in campo o in serra con aggiunta di luce artificiale quando necessario. Le linee mutanti *br3* e *sem1* erano state oggetto di studi precedenti in questo laboratorio e il loro DNA ed RNA erano stati precedentemente estratti e conservati a -80°C. La putativa linea MON810 è stata coltivata in località Fanna (PN) e da questo luogo sono stati prelevati i campioni: sono stati fatti quattro campionamenti per ciascuna delle cinque zone in cui è stato ipoteticamente suddiviso il terreno a coltura.

4.2 TERRENI DI CRESCITA

- **LB Medium:** triptone 10 g/l; estratto di lievito 5 g/l; NaCl 10g/l; agar 15g/l; pH 7. Al terreno LB liquido aggiungendo 15g/l di microagar otteniamo un terreno LB solido. Per la selezione dei trasformati è stata utilizzata l'ampicillina a concentrazione finale 100 µg/ml. Prima dell'uso sono stati aggiunti alle piastre 40µl di X-Gal (40 mg/ml) e, quando necessario, 10µl di IPTG (0,1M).
- **Terreno S.O.C. (Super Optimal Broth with Catabolite repression):** 2% Tryptone, 0.5% estratto di lievito, 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM MgCl₂, 10mM MgSO₄ e 20 mM glucosio.

4.3 ESTRAZIONE E PURIFICAZIONE DNA

Il DNA genomico dei vari mutanti utilizzato per le reazioni di PCR è stato estratto utilizzando un kit (DNeasy® - QIAGEN) e una soluzione di lisi (microLYSIS®-PLUS - Microzone Ltd) a seconda delle necessità.

4.3.1 PROTOCOLLO PER IL KIT DNEASY

Il DNA genomico dei mutanti *sem1*, *br3* e delle piante transgeniche è stato estratto a partire da 0,1 g di foglie giovani in attiva divisione, precedentemente raccolte e congelate a -80°C, seguendo il protocollo della ditta QiAgen di seguito riportato:

- Pestellare e polverizzare il materiale vegetale con continue aggiunte di azoto liquido e trasferire il campione in una eppendorf;
- Aggiungere 400 µl di Buffer AP1, 4 µl di RNasi in ogni eppendorf ed incubare 10 minuti a 65°C, invertendo le eppendorf ogni 2-3 minuti durante l'incubazione: questo passaggio serve a lisare tessuti e cellule vegetali;
- Aggiungere 130 µl di Buffer AP2, agitare e porre in ghiaccio per 5 minuti al fine di far precipitare proteine e polisaccaridi;
- Centrifugare per 5 minuti a 14000rpm per rimuovere i lisati più grossolani quali componenti di parete e membrane cellulari;
- Trasferire il lisato nella colonnina QIAshredder del kit e centrifugare per 2 minuti a 14000rpm al fine di rimuovere i detriti cellulari più piccoli;
- Trasferire la frazione liquida, senza disturbare il pellet, in una nuova eppendorf;
- Aggiungere in questa eppendorf per ogni volume di frazione liquida 1,5 volumi di Buffer AP3/E addizionato di etanolo al fine di precipitare il DNA;
- Pipettare 650 µl del mix ottenuto in una colonnina DNeasy del kit ;
- Centrifugare a 8000 rpm per 1 minuto e eliminare il centrifugato;
- Ripetere il passo precedente con la soluzione rimanente;
- Porre la mini colonnina, che ora contiene DNA, in una nuova provetta e aggiungere 500 µl di Buffer AW (addizionato di etanolo) per lavare il DNA;
- Centrifugare per 1 minuto a 8000rpm ed eliminare il liquido;
- Aggiungere nuovamente 500 µl di Buffer AW nella colonnina del kit e centrifugare per 2 minuti a 20000rpm al fine di eliminare l'etanolo;
- Eliminare il liquido e ripetere la medesima centrifugata a vuoto per eliminare tutti gli eventuali residui di etanolo;
- Trasferire la colonnina in una eppendorf nuova e aggiungere 100 µl di Buffer AE;
- Incubare per 5 minuti a 15-25°C e centrifugare per 1 minuto a 8000rpm per eluire il DNA genomico;
- Ripetere il passaggio precedente trasferendo l'eluizione dalla eppendorf alla colonnina;
- Il DNA genomico è ora pronto per essere utilizzato, ma prima ne viene determinata la quantità e la qualità attraverso in una corsa elettroforetica su gel di agarosio.

4.3.2 PROTOCOLLO PER L'ESTRAZIONE DI DNA ATTRAVERSO DNA MICROLYSIS

Al fine di estrarre il DNA genomico da foglie di mais che presentano presunta mutagenesi inserzionale è stata usata una soluzione di lisi chiamata MICROLYSIS-PLUS che consente il rilascio di una piccola quantità di DNA genomico (non purificato) da una minima quantità di tessuto vegetale. Il protocollo è il seguente:

- Raccogliere una sezione di 2x1 mm della foglia più giovane della pianta e trasferirla in microamp;
- Aggiungere 20µl di soluzione di microlisi e cercare, per quanto possibile, di distruggere con l'aiuto di un puntale la sezione di foglia;
- Porre i campioni in termociclatore dove rimarranno overnight a 65°C;
- Il giorno seguente impostare il termociclatore per i seguenti step:
 - .1. 65°C per 15 minuti
 - .2. 96°C per 2 minuti
 - .3. 65°C per 4 minuti
 - .4. 96°C per 1 minuto
 - .5. 65°C per 1 minuto
 - .6. 96°C per 30 sec
 - .7. Hold a 20°C

Attraverso questo ciclo termico il DNA genomico viene rilasciato in soluzione ed è pronto per una eventuale PCR. Data la bassa resa di questa estrazione è inutile controllarlo attraverso elettroforesi.

4.4 ESTRAZIONE RNA

Per l'estrazione del RNA totale dai diversi tessuti di *Zea mays* è stato utilizzato il kit "RNeasy Plant Mini Kit" (QiAgen), seguendo il protocollo fornito dalla ditta. Tutto il materiale necessario per l'estrazione (mortaio, pestello, spatoline, etc...) è stato precedentemente sterilizzato in stufa a secco a 180°C per almeno 6 ore. Anche in questo caso siamo partiti da diversi tessuti precedentemente raccolti e congelati a -80°C, seguendo il seguente protocollo:

- Polverizzare 0,1 g di tessuto vegetale con mortaio e pestello con continue aggiunte di azoto liquido, fino ad ottenere una polvere impalpabile che deve essere trasferita in un tubino eppendorf da 2 ml precedentemente raffreddato in azoto liquido.
- Aggiungere al campione 450 μ l di Buffer RLT e 4,5 μ l di β -Mercaptoetanololo vorticando vigorosamente per rompere tutti gli aggregati vegetali.
- Procedere trasferendo il lisato direttamente in una colonnina QIAshredder e centrifugando 2 minuti a massima velocità in una minicentrifuga.
- Trasferire il lisato così purificato attraverso la colonnina in un nuovo tubino ed aggiungere 225 μ l di etanolo, mescolando delicatamente mediante inversione. In questo modo si ottiene la precipitazione del RNA che non verrà pellettato, ma fatto legare ad una membrana silicea.
- Trasferire il campione in una colonnina RNeasy e centrifugato per 15 secondi a 12.000 rpm,
- Aggiungere 700 μ l di Buffer RW1 alla colonnina e centrifugare nuovamente per 15 secondi a 12.000 rpm.
- A questo punto si trasferisce la colonnina con legato l'RNA in un nuovo tubo da microcentrifuga e si procede con due lavaggi utilizzando per ciascuno 500 μ l Buffer RPE e centrifugando sempre per 15 secondi a 12.000 rpm.
- Eliminare tutti i residui di etanolo con un'ulteriore centrifuga a vuoto a 14.000 rpm per 1 minuto.
- Eluire l'RNA dalla colonnina con 40 μ l di H₂O DEPC mediante centrifugazione per 1 minuto a 12.000 rpm prima di controllare qualità e concentrazione del RNA estratto mediante corsa su gel di agarosio all'1% e analisi allo spettrofotometro.

4.5 CORSA ELETTROFORETICA

L' elettroforesi è una tecnica che permette la separazione delle molecole biologiche in base al loro peso molecolare, permettendo inoltre di stimarne anche quantità e qualità. Questa tecnica viene utilizzata di routine per quantificare e verificare la qualità del DNA e RNA estratto e per controllare le dimensioni dei frammenti amplificati tramite PCR. L'elettroforesi sfrutta la carica netta, positiva o negativa, che le molecole biologiche hanno una volta poste in una particolare soluzione salina. Se sottoposte al passaggio di corrente elettrica le molecole tenderanno a migrare verso l'elettrodo con carica opposta rispetto a quella propria, separandosi in base al loro peso molecolare in quanto le molecole più grandi migreranno più lentamente rispetto a quelle più piccole. Il DNA, che ha una carica netta negativa, tenderà quindi a migrare verso l'anodo che presenta carica positiva.

Utilizzando marcatori di peso molecolare e concentrazione nota (1 Kb Plus DNA Ladder - Invitrogen) è inoltre possibile stimare le dimensioni e le concentrazioni dei nostri campioni, derivanti da estrazioni di DNA, di RNA o da reazioni di PCR. L'elettroforesi viene normalmente condotta su gel di agarosio al 1% in tampone TAE 1X (1g di agarosio in 100 ml di TAE 1X). Per la colorazione degli acidi nucleici è stato utilizzato il colorante SybrSafe (Invitrogen). Il gel solido viene immerso nel tampone TAE 1X della vaschetta dove avviene la corsa. Quindi si possono caricare nel gel i campioni da controllare, preparati aggiungendo acqua demineralizzata e gel loading buffer (blu di bromofenolo). La corsa viene condotta con un voltaggio che dipende dalle dimensioni del gel, circa 100V ogni 10 cm di gel.

4.6 PCR E DISEGNO DEI PRIMERS

La Reazione a Catena della Polimerasi o PCR è una tecnica che permette l'amplificazione esponenziale di frammenti di DNA sfruttando la capacità di sintesi del DNA dell'enzima DNA polimerasi che permette una duplicazione di tipo semiconservativa. Questo enzima infatti è in grado di sintetizzare copie multiple di una sequenza specifica di DNA racchiusa tra due brevi tratti di sequenza nota, su cui sono stati disegnati degli inneschi (primers) specifici. La PCR prevede l'alternarsi ciclica di tre fasi:

- **Denaturation:** fase di denaturazione della doppia elica di DNA a 94/95 °C per 30/60”;
- **Annealing:** fase in cui i primers si attaccano alle due estremità del frammento da amplificare. Normalmente viene condotta a 55/60° C a seconda del contenuti in G-C dei primers, per 30/60”;
- **Extension:** fase in cui la DNA polimerasi sintetizza i nuovi filamenti di DNA.

La polimerasi utilizzata nelle reazioni di PCR è stata isolata nei primi anni ottanta dal microrganismo *Thermus aquaticus*, identificato nelle pozze di acqua calda del parco nazionale di Yellowstone, negli Stati Uniti. Questo batterio che quindi vive normalmente a temperature di circa 75°C possiede una DNA polimerasi altamente termostabile, che quindi non viene degradata durante la prima fase di denaturazione del DNA, in cui si deve lavorare a temperature di circa 95°C. Questa DNA polimerasi è stata denominata Taq polimerasi e ha un optimum di attività a 72°C, temperatura a cui normalmente viene condotta la fase di extension. L'esecuzione di queste reazioni cicliche a diverse temperature richiede un termociclatore (GeneAmp®PCR System 9700 Applied Biosystems)

in cui impostare tempi e temperature che devono essere applicati alla miscela la cui composizione può variare a seconda delle diverse applicazioni specifiche. Il termociclatore solitamente viene impostato nella seguente maniera:

1. 95°C per 5'
 2. 95°C per 1'
 3. 58-60°C per 30''
 4. 72°C per 1'-3'
 5. 72°C per 12'
 6. 4°C
- } I cicli vengono ripetuti circa 35 volte

Solitamente la PCR viene condotta per circa 35-40 cicli, alla fine dei quali normalmente si ottengono più di un miliardo di copie del tratto di DNA di interesse compreso tra i due primer forward e reverse.

Il mix tipico di una reazione di PCR è composto da:

- Buffer di reazione: specifico per ogni enzima e un mix di sali e ha la funzione di mantenere il pH ideale per il funzionamento della Taq.
- MgCl₂ o MgSO₄: lo ione Mg²⁺ è un cofattore necessario per il corretto funzionamento della polimerasi, inoltre influenza la specificità dei primers e favorisce l'inserimento dei dNTPs. È importante dosare correttamente la quantità di Mg²⁺ in quanto un eccesso di questo cofattore rende molto aspecifica l'attività della polimerasi.
- dNTPs: sono i mattoni da costruzione per la sintesi del filamento di DNA.
- Primers Forward e Reverse.
- Taq DNA polimerasi.
- Additivi per PCR: sono sostanze eterogenee per natura (DMSO, Betaine, etc) con la comune capacità di destabilizzare i filamenti del DNA rendendo più facile la denaturazione di regioni ricche in GC che tendono a formare strutture secondarie molto stabili o rendendo più specifico l'attacco dei primers.

La composizione standard è riassunta nella seguente tabella (Tabella 4.1):

COMPONENTI	CONCENTRAZIONE NEL MIX	VOLUME (50µL)
Buffer 10X (Invitrogen)	1X	5 µL
MgCl₂ 25 mM	1,5/2,5 mM	3/5 µL
Primer Fw 10µM	0,4µM	2 µL
Primer Rev 10µM	0,4µM	2 µL
dNTPs mix 10mM	200 µM	1 µL
DNA stampo	50/100ng	Variabile
Taq polimerasi (5U/µl)	2,5 unità	0,5 µL
H₂O sterile		A volume

Tabella 4.1 : Tabella riassuntiva dei componenti base di una PCR

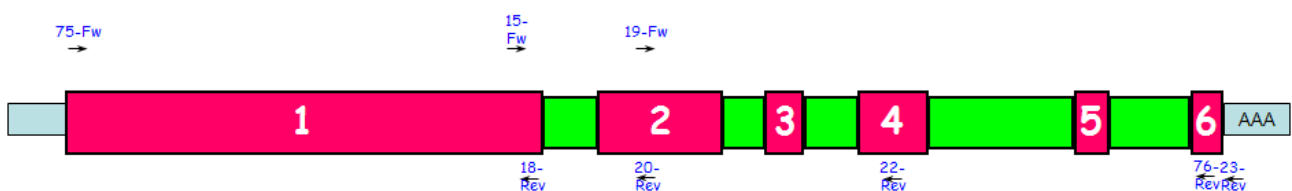
Le dimensioni dei frammenti amplificati vengono controllate tramite elettroforesi su gel d'agarosio come descritto in precedenza. Qualora la PCR non avesse dato i risultati attesi, sono state modificate le condizioni standard cercando di aumentare la resa o la specificità della reazione a seconda delle necessità. In particolare per ottimizzare i risultati siamo andati ad agire sulle seguenti variabili:

- la concentrazione di MgCl₂ che può rendere più o meno specifica l' amplificazione;
- la quantità di DNA di partenza;
- la temperatura di annealing che influenza la specificità di attacco dei primers;
- la durata dei diversi passaggi della PCR a seconda della lunghezza del frammento;
- il numero di cicli per aumentare o ridurre il numero di frammenti sintetizzati;
- il tipo di DNA polimerasi che può essere più adatta a templati difficili o lunghi.

Nella maggior parte delle reazioni di PCR è stata usata la Taq DNA Polymerase (Invitrogen), con l'aggiunta di alcuni composti per rendere migliore e più specifica l'amplificazione. Nel nostro caso abbiamo utilizzato prevalentemente l'additivo BioStab PCR Optimizer Sigma®, osservando un netto aumento delle prestazioni dell'enzima.

I primer utilizzati nelle diverse amplificazioni sono stati disegnati in modo diverso per i tre diversi tipi di mutanti studiati. Per l'amplificazione dei geni *ZmPIN1a* e *ZmPIN1b* dai mutanti spontanei *sem1* e *br3* sono stati utilizzati dei primer precedentemente disegnati nel nostro laboratorio per l'isolamento di questi geni nel wild-type. Questi primer sono generalmente lunghi 25-27 nucleotidi, presentano una % di GC attorno al 60% e una temperatura di melting superiore ai 60°C. Sono inoltre stati analizzati attraverso un software in grado di evidenziare se formano harping o dimeri tra di loro verificando quindi la loro stabilità. Le sequenze dei primer sono le seguenti e consentono l'amplificazione di due frammenti lunghi circa 2.700 paia di basi da DNA genomico e di 1800 nucleotidi da cDNA:

ZmPIN1a



75- ZmPIN1a-ATG Fw

ATG ATC ACC GGC ACG GAC TTC TA

Lenght= 27nt

%GC= 55,6%

T_M (Empirica)= 84°C

T_M (OligoAnalyzer)= 67,2°C

15- ZmPIN1a Gap Fw

GCA GGG CAA GGC GAA CAA GTA CGG CCA G

Lenght= 28nt

%GC= 64,3%

T_M (Empirica)= 92°C

T_M (OligoAnalyzer)= 68,3°C

18- ZmPIN1a Ins Rev

GGC GAC GGC CAT GCG GAC CTC CTT GAC

Lenght= 27nt

%GC= 70,4%

T_M (Empirica)= 92°C

T_M (OligoAnalyzer)= 70,1°C

19- ZmPIN1a Es2 Fw

CGC AGG GGA ATG CAG GCG CCG

Lenght= 21nt

%GC= 76,2%

T_M (Empirica)= 74°C

T_M (OligoAnalyzer)= 68,7°C

20- ZmPIN1a Es2 Rev

CGG CGC CTG CAT TCC CCT GCG

Lenght= 21nt

%GC= 76,2%

T_M (Empirica)= 74°C

T_M (OligoAnalyzer)= 68,7°C

22- ZmPIN1a Es4 Rev

AAA GGA GGC GGC GGC CAT GAC G

Lenght= 22nt

%GC= 68,2%

T_M (Empirica)= 74°C

T_M (OligoAnalyzer)= 67,0°C

23- ZmPIN1a 3UTR Rev

CGC TGT TGG CCT GCG GGA ACG AGC AGC

Lenght= 27nt

%GC= 70,4%

T_M (Empirica)= 92°C

T_M (OligoAnalyzer)= 70,8°C

76- ZmPIN1aTGA Rev

CAG CCC CAT CAG GAT GTA GTA CAC CAG

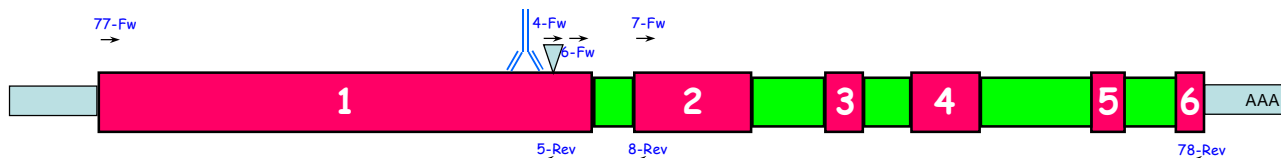
Lenght= 27nt

%GC= 55,6%

T_M (Empirica)= 84°C

T_M (OligoAnalyzer)= 62,5°C

ZmPIN1b



77- ZmPIN1bFw Gateway

CACC ATG ATT ACG GGG ACG GAC TTC TA

Lenght= 27nt

%GC= 51,9%

T_M (Empirica)= 82°C

T_M (OligoAnalyzer)= 63,7°C

4- ZmPIN1b INS Fw

CTC TCC CCG TGG TGA ATG CGA CGT CCG

Lenght= 27nt

%GC= 66%

T_M (Invitrogen)= 84°C

T_M (Semplificata)= 90°C

5- ZmPIN1b INS Rev

CGG ACG TCG CAT TCA CCA CGG GGA GAG

Lenght= 27nt

%GC= 66%

T_M (Invitrogen)= 84°C

T_M (Semplificata)= 90°C

6- ZmPIN1b FINECLONE Fw

AGG ACC TCC ACA TGT TCG TCT GGA GC

Lenght= 26nt

%GC= 57%

T_M (Invitrogen)= 79°C

T_M (Semplificata)= 82°C

7- ZmPIN1b ESONE2 Fw

CCA GCC TCA TCG GCG TCA TCT GGT CGC

Lenght= 27nt

%GC= 66%

T_M (Invitrogen)= 84°C

T_M (Semplificata)= 90°C

8- ZmPIN1b ESONE2 Rev

GCG ACC AGA TGA CGC CGA TGA GGC TGG

Lenght= 27nt

%GC= 66%

T_M (Invitrogen)= 84°C

T_M (Semplificata)= 90°C

78- ZmPIN1bRev Gateway

CAG GCC GAG CAG GAT GTA GTA GAC GA

Lenght= 26nt

%GC= 57,7%

T_M (Empirica)= 82°C

T_M (OligoAnalyzer)= 63,4°C

Per la verifica delle potenziali piante transgeniche sono invece stati utilizzati dei primer riportati in letteratura, precedentemente utilizzati per gli stessi studi e accettati per la rilevazione degli OGM dagli enti legislatori. Sono state scelte diverse combinazioni di primer su sequenze normalmente presenti nei costrutti utilizzati per la trasformazione (questo per dimostrare che si tratti

effettivamente di piante OGM) e altre combinazioni invece specifiche per alcuni transgeni in modo da verificare di quale linea transgenica si tratti, come esemplificato in Figura 4.1 e 4.2

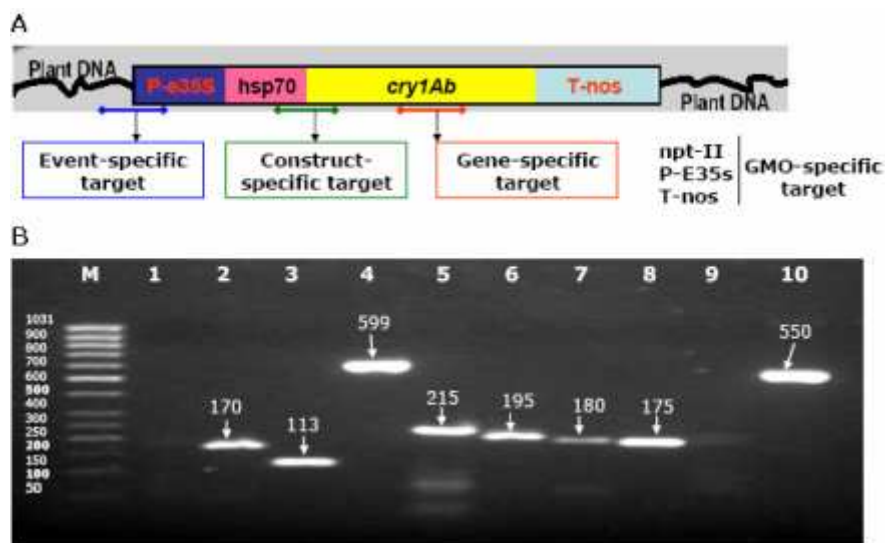


Figura 4.1 : A) Schema del costrutto utilizzato per l’ottenimento della linea transgenica MON810, e riportante le diverse combinazioni di primers utilizzate per la rilevazione di tale linea e di altri transgeni in mais. B) Gel elettroforetico riportante le bande amplificate tramite PCR utilizzando le combinazioni sopra descritte.

Primer pair	NCBI Acc. No.	Sequence (5’–3’)	Amplicon (bp)
Event specific (maize genome – P-e35S)	AY326434	F1= 5'- tcg aag gac gaa gga ctc taa cg -3' R1= 5'- tcc atc ttt ggg acc act gtc g - 3'	170
Construct specific (hsp70 – cry1Ab)		F2= 5'-gat gcc ttc tcc cta gtg ttg a-3' R2= 5'-gga tgc act cgt tga tgt ttg-3'	113
Gene specific (<i>cry1Ab</i>)		F3= 5'- cct ggg cct cgt gga cat cat ct -3' R3= 5'- tcg ggt agg tgc ggg agt cgt agt -3'	599
<i>hmgA</i> – maize specific	AJ131373	F7= 5'-gaa atc cct gag cga gtc ggt a-3' R7= 5'-gcg atg gcc ttg ttg tac tcg a-3'	175

Figura 4.2 : Sequenze dei primers utilizzati per la verifica della natura delle potenziali piante transgeniche.

Per la verifica dei mutanti in cui il trasposone Mu si è inserito all’interno dei geni HDA108 e CHR120 sono stati invece utilizzati sulla sequenza di questi geni in combinazione con un primer

sulla sequenza del trasposone. Le sequenze non possono essere riportate in quanto di proprietà dell'azienda (BIOGEMMA) che ha prodotto i mutanti stessi.

4.7 RT-PCR

La reazione Reverse Transcriptase-PCR (RT-PCR) è una tecnica in cui l'RNA messaggero viene retrotrascritto in una molecola di DNA complementare (cDNA) che può essere usato come stampo, e quindi amplificato, in una reazione di PCR. La tecnica prevede prima la retrotrascrizione dell'RNA in cDNA e la successiva amplificazione del cDNA.

Come la Taq polimerasi, anche l'enzima retro-trascrittasi necessita di un innesco a cui aggiungere nucleotidi al 3'. Esistono principalmente tre categorie di primers possibili:

- Primer OligodT che si lega al polyA presente in tutti i messaggeri maturi, dopo la retrotrascrizione si ottengono i cDNA full length di tutti i messaggeri;
- Random Primers, che invece consentono di ottenere diversi frammenti parziali di cDNA a partire da un unico mRNA;
- Primer reverse specifico gene specifico, GPS, che dovrebbe consentire la produzione di un unico cDNA, quello di interesse, e non del mix come nei due casi precedenti.

Nel nostro caso è stato utilizzato un primer OligodT e l'enzima trascrittasi inversa SuperScript III-Invitrogen per retrotrascrivere RNA estratti da germinelli, foglie, radici, infiorescenze e cariossidi a diversi stadi di sviluppo.

La reazione di retrotrascrizione inizia con la preparazione di un mix di reazione contenente RNA, dNTPs, H₂O e il primer (Tabella 4.3). Il mix è stato incubato a 65°C per 5 minuti allo scopo di denaturare tutte le strutture secondarie dell'RNA. Successivamente per cristallizzare la situazione pongo in ghiaccio per 1 minuto.

COMPONENTE	QUANTITÀ
RNA	1µg
dNTPs 10mM	1µl
Primers	500mg
H ₂ O	A volume(13 µl)

Tabella 4.3 : Mix di retrotrascrizione

Passato il minuto, al campione sono stati aggiunti l'enzima con il suo buffer specifico, il DTT (ditiotreitolo) che ottimizza il lavoro della trascrittasi inversa e un inibitore delle RNAasi (Invitrogen). Il mix così ottenuto è stato incubato per 60 minuti a 50°C. Il campione è stato trasferito a 70°C per 15 min in modo tale da inattivare l'enzima e quindi conservato a -20°C fino al suo utilizzo. Il cDNA così ottenuto è stato utilizzato in reazioni di PCR per l'amplificazione dei cDNA dei geni *ZmPIN1a* e *ZmPIN1b*.

4.8 ESTRAZIONE E PURIFICAZIONE DI FRAMMENTI DI DNA DA GEL DI AGAROSIO

Dopo l'amplificazione dei geni *ZmPIN1a* e *ZmPIN1b* nei due mutanti spontanei, e dopo l'amplificazione eseguita nei putativi mutanti transgenici e la corsa elettroforetica è stato necessario estrarre e purificare dal gel le bande che hanno le dimensioni desiderate per verificarne la sequenza attraverso clonaggio in vettori plasmidici e sequenziamento. A questo scopo è stato utilizzato il kit QIAquick Gel Extraction, di cui si riporta il protocollo.

1. Tagliare la banda di interesse dal gel con l'aiuto di un bisturi, eliminando la maggior parte del gel in eccesso. Si trasferisce quindi il frammento di gel in una eppendorf e lo si pesa.
2. Aggiungere 3 volumi di buffer QG a ciascun volume di gel (100mg di gel corrispondono a 100 µl di soluzione).
3. Incubare a 50°C per 10 minuti, agitando ogni 2-3 minuti vigorosamente fino al completo scioglimento del gel.
4. Aggiungere 1 volume di isopropanolo, mescolare e trasferire la soluzione nella colonnina fornita col kit QIAquick.
5. Centrifugare per 1 minuto a massima velocità, eliminare lo scarto e riporre la colonnina nello stesso tubino. In questa fase il DNA si lega alla membrana della colonnina.
6. Aggiungere altri 500 µl di buffer QG, ricentrifugare e eliminare nuovamente la soluzione.
7. Aggiungere 750 µl di buffer PE e centrifugare per 1 minuto. Per rimuovere tutti i residui di etanolo dalla colonnina viene fatta una ulteriore centrifuga a vuoto.
8. Eluire il DNA con 30 µl di buffer EB, centrifugando sempre per un minuto.
9. La resa della purificazione viene valutata attraverso corsa elettroforetica su gel agarosio. I campioni così purificati sono stati sequenziati direttamente (amplificati da ipotetica linea transgenica) o dopo il clonaggio in vettori plasmidici (geni *ZmPIN1* amplificati da mutanti *sem1* e *br3*).

4.9 CLONAGGIO NEL VETTORE pCRII-TOPO (Invitrogen)

I frammenti di DNA delle dimensioni attese, ottenuti attraverso le diverse applicazioni della tecnica di PCR e purificati dopo corsa su gel di agarosio sono stati clonati in vettori plasmidici commerciali usati poi per trasformare cellule batteriche competenti. Queste saranno poi fatte moltiplicare in coltura liquida prima di estrarre i plasmidi che verranno mandati a sequenziare. I clonaggi sono stati eseguiti utilizzando il kit *TOPO*[®] *TA-Cloning* (Invitrogen) che sfrutta il meccanismo di clonaggio TA. La Taq polimerasi utilizzata nella reazione di PCR è dotata di attività 3' transferasica: aggiunge all'estremità 3' dei frammenti sintetizzati delle singole Adenine che nella reazione di clonaggio si appaiano alle Timine terminali al sito di policlonaggio del vettore (vedi Figura 4.3).

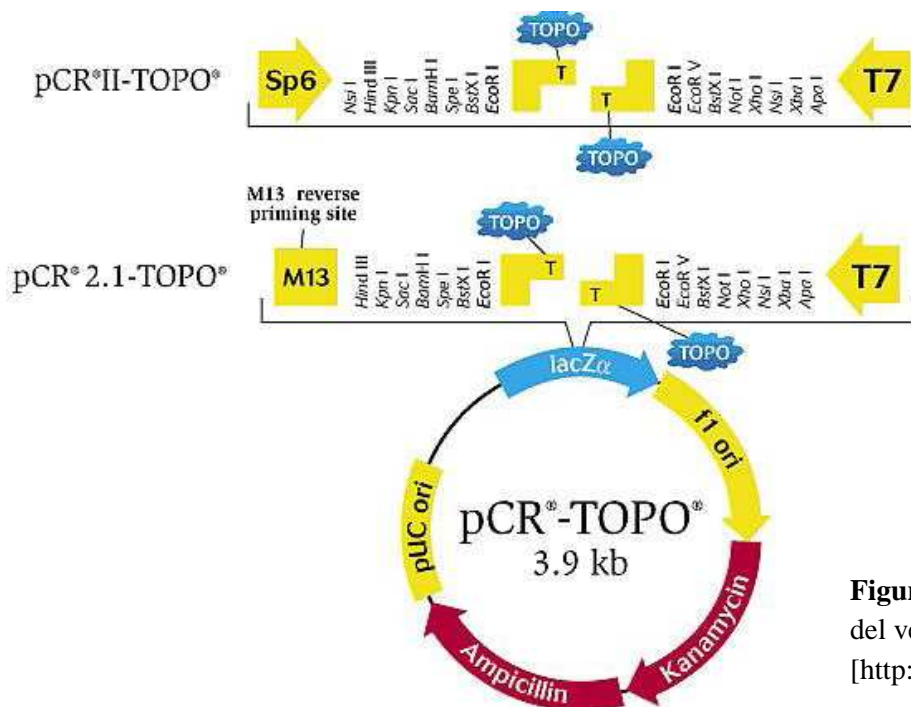


Figura 4.3 : Mappa circolare e polylinker del vettore pCR-TOPO
[<http://products.invitrogen.com>]

L'attività ligasica tra inserto e vettore è garantita dalla Topoisomerasi I legata covalentemente al vettore; questo rende la reazione di ligazione molto rapida ed efficiente rispetto al altri kit di ligazione che invece prevedono l'aggiunta della T4 DNA Ligasi al mix di ligazione. Infatti per la ligazione basta incubare il seguente mix di ligazione, preparato secondo le indicazioni del produttore, per 5-30 minuti a temperatura ambiente:

- Frammento di DNA 4 µl
- Salt Solution 1 µl
- TOPO[®] Vector 1 µl

I vettori plasmidici in cui sono stati ligati i frammenti di interesse sono stati usati per trasformare attraverso shock termico cellule di *E. coli* chimicamente competenti TOP10 (Invitrogen), che permette il trasferimento del plasmide all'interno della cellula. Le cellule vengono fatte sciogliere in ghiaccio e poi un'aliquota di 25 μ l di cellule competenti viene messa in tubini con 5 μ l di prodotto di ligazione. I tubini vengono incubati 30 minuti in ghiaccio, prima di procedere allo shock termico a 42°C per 45 secondi e al trasferimento immediato in ghiaccio per 2 minuti, dopo i quali vengono aggiunti 150 μ l di SOC Medium a temperatura ambiente. Le cellule così trasformate vengono incubate in agitazione a 37°C per un'ora circa mantenendo il tubo in orizzontale. A questo punto si piastra in terreno solido LB (Tryptone 10 g/l; Estratto di lievito 5 g/l; NaCl 10g/l; Agar 15g/l; pH 7) più Ampicillina (100 mg/l) per la selezione dei cloni trasformati. Prima di procedere a piastrare le cellule trasformate, le piastre vengono addizionate con 40 μ l di X-Gal (40mg/ml). Questo permette di discriminare, attraverso lo screening bianco/blu, le colonie che portano l'insero clonato nel plasmide da quelle in cui il plasmide si è semplicemente richiuso su se stesso. Il frammento clonato infatti va ad interrompere l'Open Reading Frame del gene per la β -Galattosidasi (*lacZ*), che invece viene trascritta e tradotta se il plasmide ri-circularizza. L'enzima attivo idrolizza il substrato cromogenico X-Gal, rendendo queste colonie di colore blu/verde, mentre le colonie in cui il plasmide porta l'insero restano bianche. Sono stati piastrati 20 μ l e i rimanenti 160 μ l; le piastre sono state incubate a crescere capovolte, "overnight" a 37°C e il giorno successivo è stata verificata la presenza dell'insero delle dimensioni attese, attraverso PCR-colonies, nelle colonie che sono risultate bianche.

4.10 PCR-COLONIES

La presenza dell'insero e la dimensione dello stesso nelle colonie bianche cresciute nelle piastre vengono verificate attraverso PCR colonies, ovvero una PCR in cui il DNA template viene sostituito da una colonia batterica. La colonia batterica da testare viene pescata direttamente dalla piastra con un puntale poi immerso nella Microamp contenete il mix di reazione. In questo caso per l'amplificazione si usano i primers M13 Forward e M13 Reverse disegnati sul poly-linker del plasmide stesso e non i primers gene specifici con cui è stato amplificato il frammento. Per non perdere i cloni, lo stesso puntale è stato strisciato su una piastra, suddivisa in regioni, e incubata a 37°C. Il prodotto di PCR è stato controllato con corsa elettroforetica su gel di agarosio. Verificata la dimensione del frammento, i cloni positivi sono stati fatti crescere overnight in agitazione a 37°C in LB liquido + Ampicillina, per poi procedere alla purificazione del DNA plasmidico.

4.11 MINI PREP

Il protocollo delle mini prep prevede una serie di centrifugazioni, risospensioni e lavaggi con lo scopo di recuperare il plasmide contenente il frammento di interesse. Questo è il protocollo usato:

- ✓ prelevare 1,5 ml di coltura batterica liquida e metterli in una eppendorf da 1,5ml;
- ✓ centrifugare la coltura batterica a max rpm a rt per 1-2 min;
- ✓ eliminare il surnatante (raccolto e buttato nei rifiuti batterici da autoclave) e lasciare la eppendorf capovolta su un foglio di carta per farla asciugare dal brodo di coltura;
- ✓ risospendere il pellet in 100µl di Soluzione I (10mM Tris-HCl pH 8.00; 1mM EDTA pH 8.00), aiutandosi con il puntale
- ✓ aggiungere 200µl di Soluzione II (NaOH 0.2 N; SDS 1%) e mescolare delicatamente invertendo il tubino 10 volte, senza vortexare;
- ✓ incubare per due minuti a temperatura ambiente;
- ✓ aggiungere 150µl di Soluzione III (Potassio Acetato 3M; Acido Acetico Glaciale 11,5 ml/100ml) e mescolare fino a rendere omogenea la soluzione;
- ✓ centrifugare a 14.000rpm per 7-10 minuti a temperatura ambiente;
- ✓ trasferire la fase liquida surnatante in una nuova eppendorf ;
- ✓ aggiungere 800µl di etanolo assoluto e mescolare invertendo il tubino;
- ✓ centrifugare a 14.000rpm per 7-10 minuti e rimuovere il surnatante;
- ✓ lavare il pellet con 200µl di etanolo 70% e ricentrifugare per 7 minuti a 14.000rpm;
- ✓ rimuovere il surnatante e lasciare la eppendorf aperta affinché evapori tutto l'etanolo;
- ✓ risospendere il pellet in 25µl di H₂O sterile;
- ✓ controllare 1µl di plasmide su gel

4.12 SEQUENZIAMENTO

I frammenti di PCR e i plasmidi ottenuti dalla purificazione con mini prep sono stati inviati al Servizio di sequenziamento del DNA della BMR Genomics di Padova. I campioni per il sequenziamento vengono preparati in tubini da 200 µl in cui si uniscono 500 mg di DNA plasmidico e 6,4 pmoli del primer con cui si vuole fare il sequenziamento. Questo mix viene disidratato mettendo il tubino nel termociclatore a 65°C e quindi inviato al centro di sequenziamento, che fornirà i file con cromatogramma e sequenza in formato *abi*, leggibili con il software Chromas. Le sequenze sono state allineate tra di loro, attraverso il programma ClustalW e DNASTAR, ottenendo dei *contig* utili per le analisi successive. I *contig* sono poi stati utilizzati per interrogare le banche dati nucleotidiche e proteiche per verificarne l'omologia attraverso l'algoritmo Blast..

5 RISULTATI E DISCUSSIONI

5.1 CASO DI STUDIO I: MUTANTI SPONTANEI DI MAIS PER IL TRASPORTO DELL'AUXINA

Negli ultimi anni numerosi studi sull'auxina e sul suo trasporto polare hanno dimostrato l'importanza fondamentale dei trasportatori auxinici, e in particolare dei carrier di efflusso, nel regolare molteplici aspetti dello sviluppo delle piante. Questi studi sono stati condotti principalmente sulla pianta modello *Arabidopsis thaliana* e ora si sta cercando di trasferire le conoscenze accumulate in piante di interesse agrario. Il nostro gruppo di ricerca ha isolato tre geni che codificano per trasportatori della famiglia PIN (*ZmPIN1a*, *ZmPIN1b* e *ZmPIN1c*). Lo studio della loro espressione ha confermato il ruolo che possiedono nel controllo dello sviluppo embrionale e vegetativo di questa monocotiledone. Per confermare e avvalorare queste scoperte è di fondamentale importanza un dato funzionale che ancora non si possiede: un mutante in grado di confermare che la mancanza o il malfunzionamento del gene renda la pianta incapace di svolgere le naturali funzioni di controllo dello sviluppo mediate dall'auxina. A questo scopo abbiamo iniziato la caratterizzazione dei due mutanti spontanei di mais, *semaphore1* (*sem1*) e *brachytic3* (*br3*) che presentano fenotipi riconducibili all'alterazione del trasporto auxinico e che localizzano nella stessa sub-regione cromosomica di, rispettivamente, *ZmPIN1a* e *ZmPIN1b*.

sem1

Per la caratterizzazione del mutante *sem1* abbiamo dapprima verificato l'espressione di *ZmPIN1a* in piante mutanti. A questo scopo sono state condotte RT-PCR su RNA estratto da foglie di piante omozigoti *sem1* e piante wild type per comparare i livelli di espressione di questo gene (Figura 5.1).

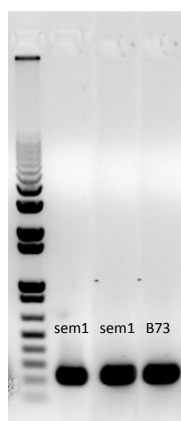


Figura 5.1: RT-PCR di RNA di foglie di mais. L'espressione in *sem1* e B73 di *ZmPIN1a* è risultata la stessa

Nonostante quest'analisi sia solo semiquantitativa, non sono state osservate evidenti alterazioni dei livelli di espressione di *ZmPIN1a* livello delle foglie.

A questo punto, per verificare che una mutazione a carico della sequenza del gene *PIN1a* possa portare ad una proteina non funzionale e quindi essere responsabile di questo fenotipo abbiamo amplificato *ZmPIN1a* utilizzando come template DNA genomico e cDNA ottenuti da mutanti omozigoti. Per l'amplificazione sono stati utilizzati primers precedentemente disegnati e impiegati per il clonaggio del gene dal wild type. Per il DNA genomico sono state utilizzate cinque combinazioni di primers per amplificare dei tratti successivi e parzialmente sovrapponibili del gene in quanto, essendo più lungo di 3000bp, risultava complicata l'amplificazione per intero. Per il cDNA, invece, utilizzando due diverse combinazioni di primers è stato possibile amplificare l'intera sequenza codificante di 1806 paia di basi (Figura 5.2).

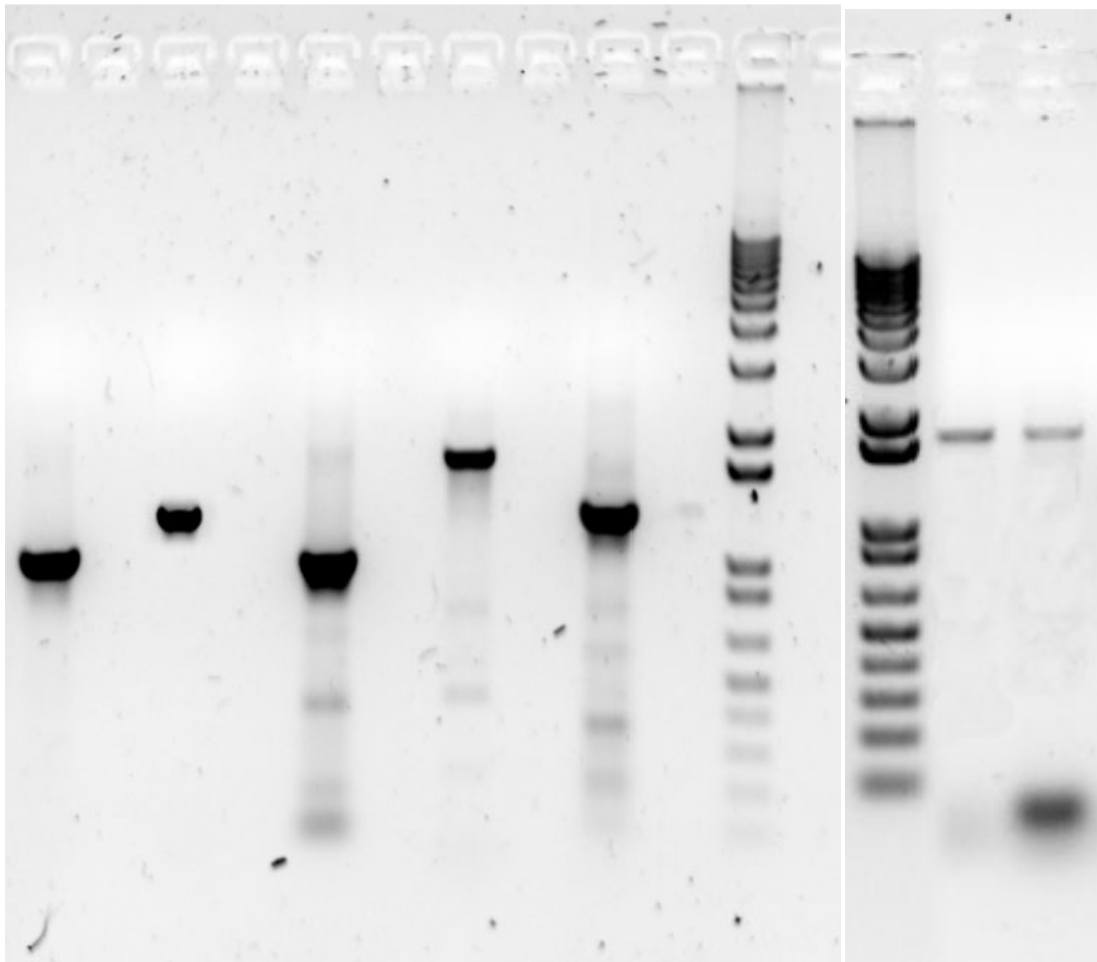


Figura 5.2: Amplificazione di DNA genomico (G1-G5) e di cDNA (cDNA1 e cDNA2) del gene *ZmPIN1a* di piante di mais

DNA genomico					
Primers		Ampificato atteso(bp)	Ampificato ottenuto(bp)	Clonaggio	Cloni positivi
Fw	Rw				
75	18	1116	1116	---	---
75	20	1383	1383	✓	✓
15	22	1055	1055	---	---
15	23	1807	1807	✓	---
19	23	1326	1326	---	---
cDNA					
75	76	1803	1803	---	---
75	23	1830	1830	✓	✓

Tabella 5.1 : La tabella riassume gli amplificati di cDNA e di DNA genomico di *ZmPIN1a*

I due frammenti amplificati da cDNA e le due combinazioni più lunghe ottenute da DNA genomico (G2 e G4) sono stati purificati da gel e clonati in vettori plasmidici (kit *TOPO[®] TA-Cloning*). La presenza dell'inserto e la dimensione dello stesso nelle colonie cresciute nelle piastre sono state verificate attraverso PCR-colonies: purtroppo solo dalla combinazione genomica n°2 e dalla combinazione cDNA n°2 sono stati ottenuti dei cloni positivi dai quali è stato isolato il DNA plasmidico attraverso mini prep (Tabella 5.1). I plasmidi sono quindi stati sequenziati avvalendoci del servizio di sequenziamento del DNA della BMR Genomics di Padova. Il sequenziamento è dapprima stato eseguito con il primer universale M13Rev sulla sequenza del plasmide. Una volta confermato che si trattava di sequenze di *ZmPIN1a*, è stato utilizzato anche il primer M13Fw e un primer interno per avere la sequenza completa dei cloni cDNA. Abbiamo infatti concentrato la nostra attenzione su questi cloni visto che contengono l'intera sequenza codificante sulla quale poter identificare eventuali mutazioni.

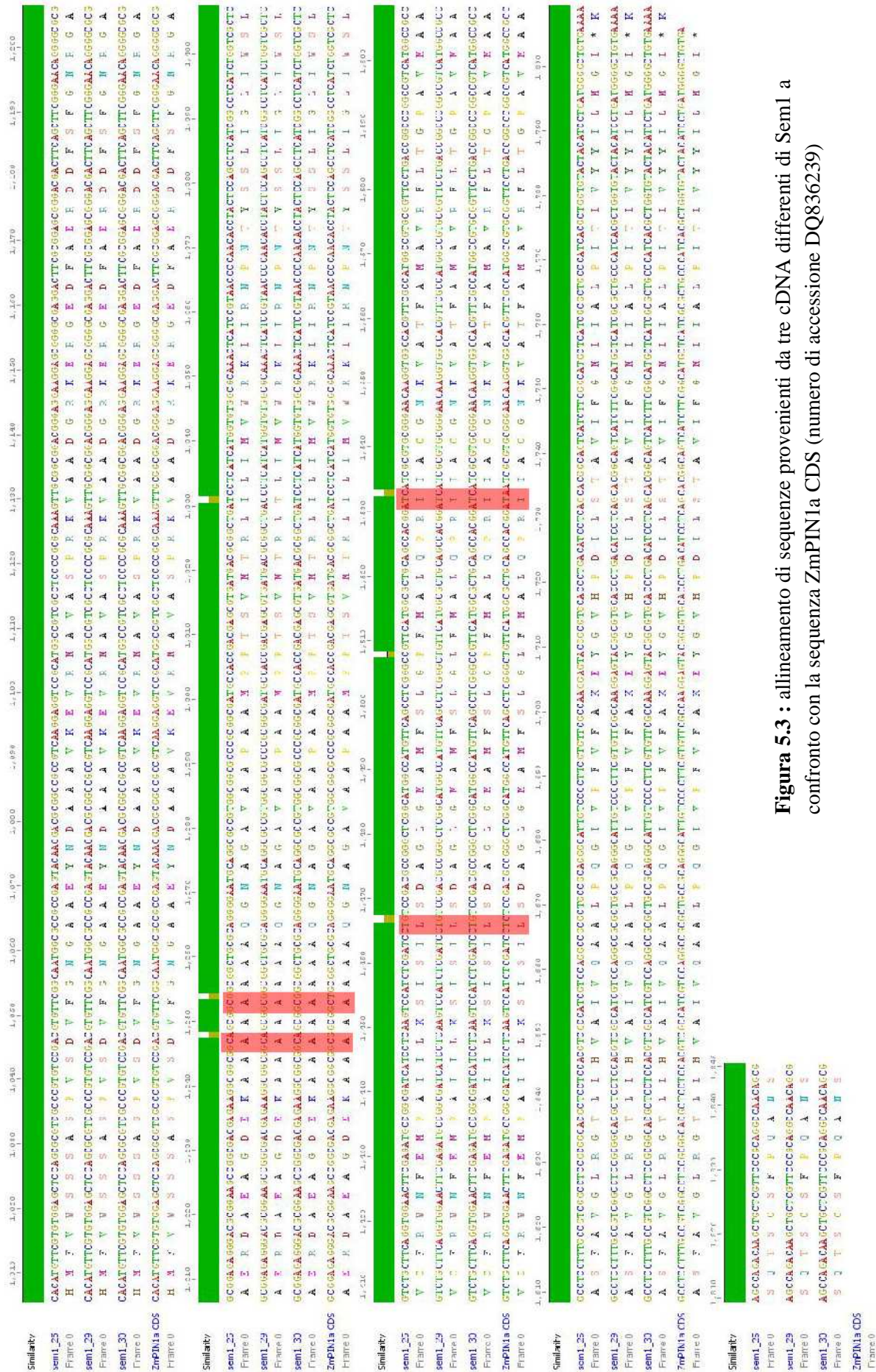


Figura 5.3 : allineamento di sequenze provenienti da tre cDNA differenti di Sem1 a confronto con la sequenza ZmPIN1a CDS (numero di accessione DQ836239)

Le tre sequenze ottenute da ciascun clone sono state analizzate con il software Chromas e poi assemblate in una sequenza unica con il programma Seq-man (Lasergene - DNASTAR). I contig così ottenuti sono quindi stati allineati tra di loro e con la sequenza della CDS di ZmPIN1a (numero di accessione DQ836239) con il software Geneious per verificare la presenza di mutazioni (Figura 5.3). Nei tre cloni analizzati sono state identificate otto mutazioni puntiformi che però non risultano modificare la sequenza proteica. Infatti tutte le modificazioni identificate (Tabella 5.2) riguardano la terza base del codone e quindi, grazie alla degenerazione del codice genetico risultano essere ininfluenti a livello di traduzione.

Posizione Mutazione	264	519	603	852	1248	1254	1467	1533
Codone WT	GCA	GCC	GGC	ACG	GCG	GCT	CTC	ATA
Codone <i>sem1</i>	GCC	GCA	GGG	ACT	GCA	GCG	CTG	ATC
AA WT	Alanina	Alanina	Glicina	Threonina	Alanina	Alanina	Leucina	Isoleucina
AA <i>sem1</i>	Alanina	Alanina	Glicina	Threonina	Alanina	Alanina	Leucina	Isoleucina

Tabella 5.2 : tabella che riassume le mutazioni puntiformi di ZmPIN1a in Sem1 rispetto alla sequenza del gene ZmPIN1a caratterizzata nel nostro laboratorio.

In questa prima analisi non sono state prese in considerazione alcune mutazioni osservate solo in uno o due dei tre cloni amplificati. Queste potrebbero derivare da errori della polimerasi durante l'amplificazione oppure essere dovute al fatto che l'amplificazione è stata fatta da cDNA ottenuto da più piante sorelle ma forse non perfettamente geneticamente uniformi.

Queste prime analisi anche se preliminari e potenzialmente migliorabili, suggeriscono quindi che il fenotipo del mutante *semaphore1* che non sia imputabile a mutazioni a carico del gene *ZmPIN1a*.

br3

Per quanto riguarda il mutante *brachytic3* si sta seguendo lo stesso approccio appena descritto. Analisi di espressione condotte da altri ricercatori hanno mostrato che il mutante non presenta alterazioni nei livelli di espressione di ZmPIN1b. Stiamo procedendo quindi con l'amplificazione e il clonaggio della sequenza codificante a partire da cDNA e DNA genomico e i primi risultati saranno disponibili entro la fine di questo mese.

5.2 CASO DI STUDIO II: I MUTANTI INSERZIONALI PER REGOLATORI EPIGENETICI

All'interno del progetto AENEAS (Acquired Enviromental Epigenetics Advances: from Arabidopsis to maize) il nostro gruppo di ricerca è particolarmente interessato allo studio del ruolo che i fattori ambientali hanno nella creazione di nuova variabilità epigenetica e all'ereditabilità di questa variabilità. Per fare ciò la disponibilità di mutanti per specifici epiregolatori è di fondamentale importanza. Con la collaborazione di Biogemma, nota azienda internazionale che si occupa di miglioramento genetico di specie vegetali, sono stati ottenuti dei mutanti inserzionali di mais inducendo la trasposizione dell'elemento Mu. Tra tutti i mutanti ottenuti ne sono stati selezionati tre; di questi due hanno l'inserzione a livello del gene CHR120, gene indirettamente responsabile del mantenimento del silenziamento delle sequenze metilate, mentre il terzo mostra l'inserzione nel gene HDA108, il quale codifica una deacetilasi istonica. Tutte e tre le linee mostrano l'inserzione del trasposone a livello del primo esone dei due geni, come mostrato in figura 5.4.

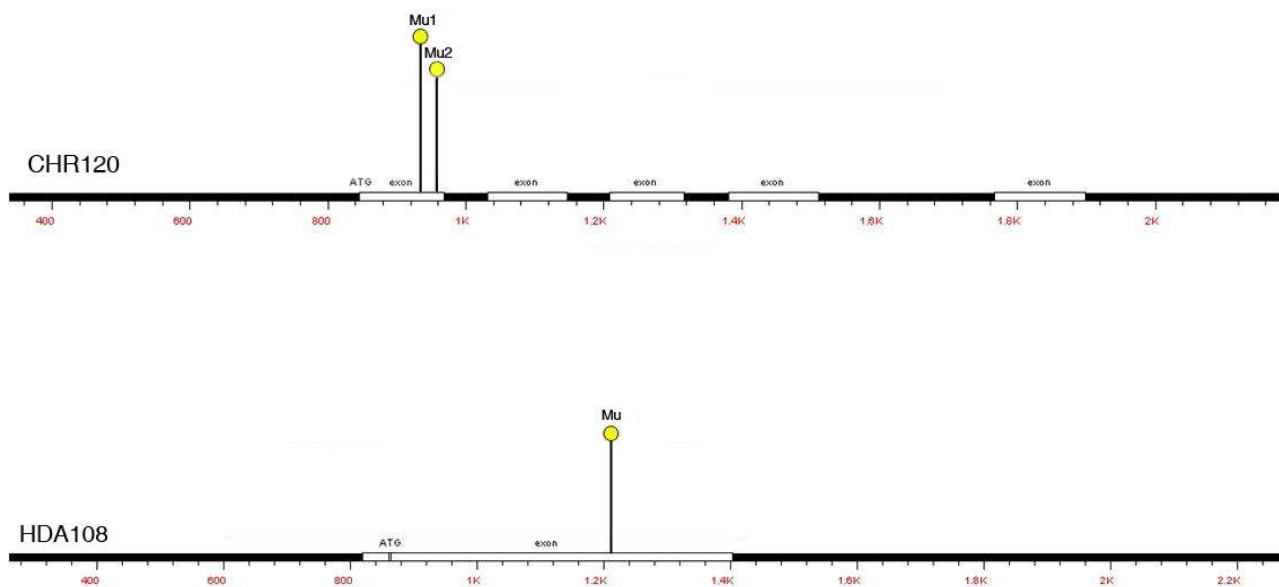


Figura 5.4: schema dei geni CHR120 e HDA108 con le inserzioni dell'elemento Mu

La procedura di ottenimento delle linee mutanti, già descritta in sezione 2.6 e in figura 2.6, ha fatto sì che i mutanti abbiano un genotipo completamente ibrido e quindi, prima di procedere con i nostri studi di genetica funzionale, è necessario introdurre la mutazione nel *background* omozigote della linea B73: per far questo si sta procedendo a successivi reincroci dei mutanti con piante B73, per almeno 5 generazioni. Alla fine saranno poi effettuate delle autofecondazioni dei mutanti per portare la mutazione allo stato di omozigosi. Visto che dopo ogni incrocio è necessario identificare i

mutanti all'interno della progenie, abbiamo sviluppato, insieme alla *company*, un protocollo rapido per la genotipizzazione di un alto numero di piante. Questo protocollo si basa sull'isolamento del DNA genomico da piccoli frammenti fogliari e su una successiva PCR utilizzando un primer sul gene d'interesse e uno sul trasposone. Dal momento che il trasposone possiede sequenze invertite e ripetute (TIR) alle estremità di circa 200bp, i primers disegnati con queste sequenze possono funzionare sia come forward che come reverse, in combinazione con primers gene-specifici. Un primer disegnato sulle regioni TIR è quindi stato testato con diversi primer disegnati a monte (forward) e a valle (reverse) del sito d'inserzione delle tre linee. Queste prime PCR sono state eseguite su piante che avrebbero dovuto mostrare una segregazione 2Mu:1wt. In figura 5.5 e in tabella 5.3 si possono vedere i risultati ottenuti da questi test dei primers.

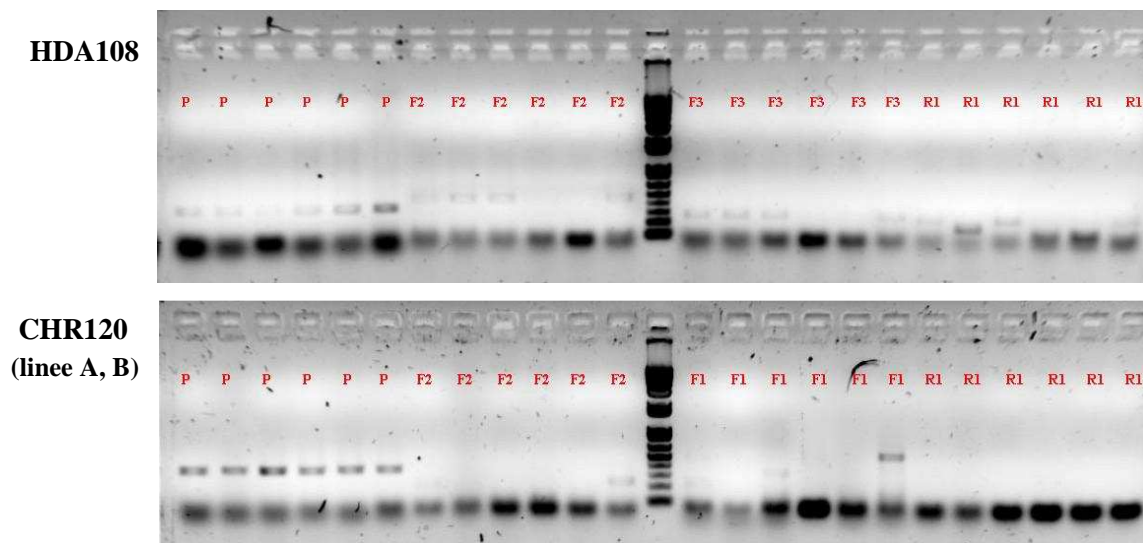
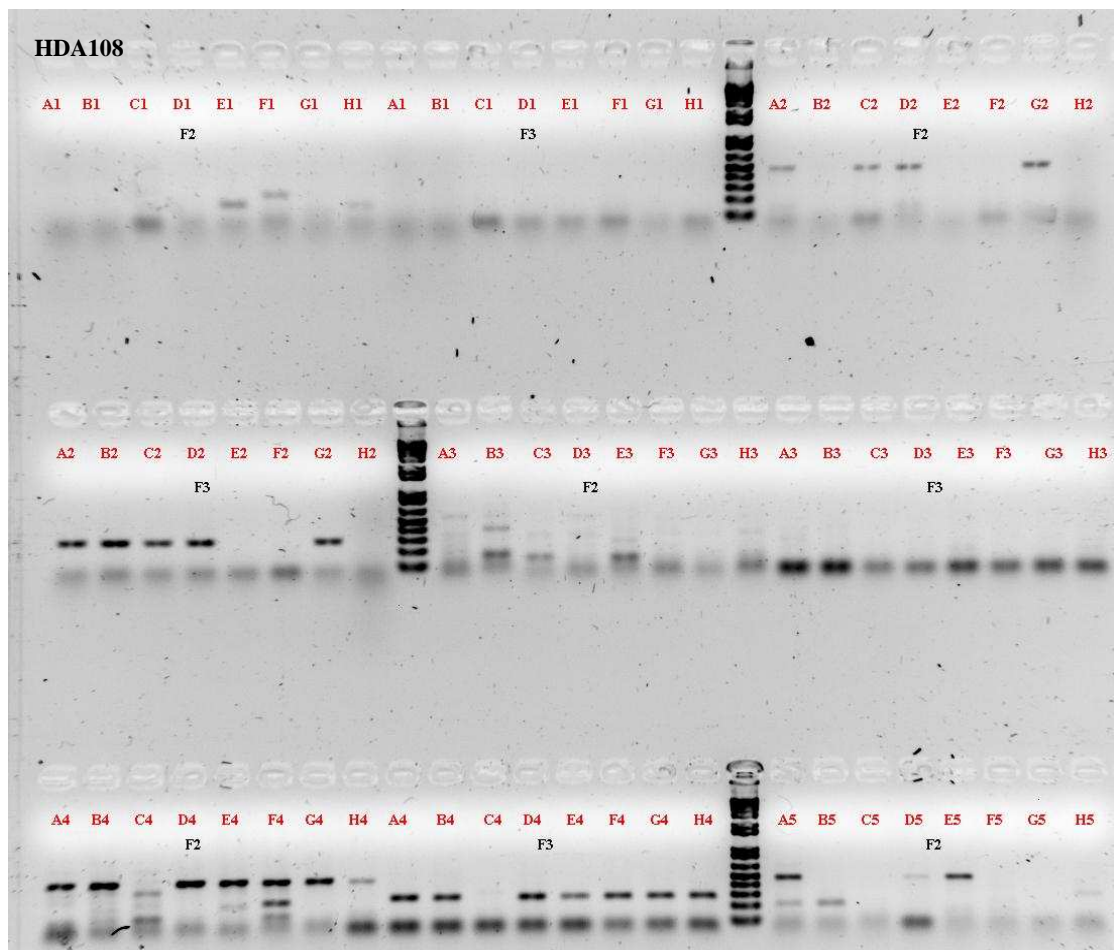


Figura 5.5 : Gel elettroforesi che mostra le combinazioni di primers testati per l'amplificazione di HDA108(1°gel) e CHR120 (2°gel, linea A prime due piante e linea B le restanti 4). P=controllo positivo; F3, F2, F1, R1= combinazioni primers.

Mutanti	HDA108			CHR120			
	Comb.Primers	F2	F3	R1	F2	F1	R1
Amplificato atteso(bp)		500	300	200	200	500	300
Amplificato ottenuto(bp)		500	300	200	200	500	---
Piante mutanti		1, 2, 3, 6	1, 2, 3, 6	1, 2, 3, 6	1, 6	1, 6	---

Tabella 5.3 : Test eseguiti su diverse combinazioni di primers per l'amplificazione di *ZmPIN1a* nelle linee HDA108 e CHR120.

Per quanto riguarda i mutanti HDA108, tutte le tre combinazioni hanno funzionato bene, sono stati ottenuti, come previsto, frammenti di 500bp, 300bp e 200bp rispettivamente per le combinazioni F2, F3 e R1. Tutte e tre le combinazioni mostrano che le piante 1, 2, 3 e 6 presentano l'inserzione. Per le linee CHR120, invece, solamente le prime due combinazioni di primers (F2 e F1) hanno funzionato mentre la terza (R1) non ha dato amplificati ed è stata esclusa dagli esperimenti successivi. I frammenti ottenuti sono di 200bp per la combinazione F2 e di 500bp per la F1. Solo le piante 1 e 6 mostrano la presenza del trasposone e hanno dato frammenti delle dimensioni attese. Come controllo positivo è stato utilizzato un gene per cui i primers funzionano bene. Una volta ottimizzato il protocollo e scelte le combinazioni di primers con cui lavorare sono state genotipate un centinaio di piante (Figura 5.5), progenie di un primo incrocio da B73 e linee Mu. Sfortunatamente le piante madri utilizzate in questo incrocio non sono state precedentemente controllate per la presenza del trasposone e quindi nella progenie di diverse piante si dovrebbero osservare due situazioni opposte: 50% Mu / 50% wt se la pianta madre era mutante e invece 100% di progenie wt se la pianta madre era wt. Per dare robustezza ai risultati si è deciso di utilizzare due diverse combinazioni di primers e di considerare mutanti solo le piante da cui si abbia avuto amplificazione in entrambi i casi.



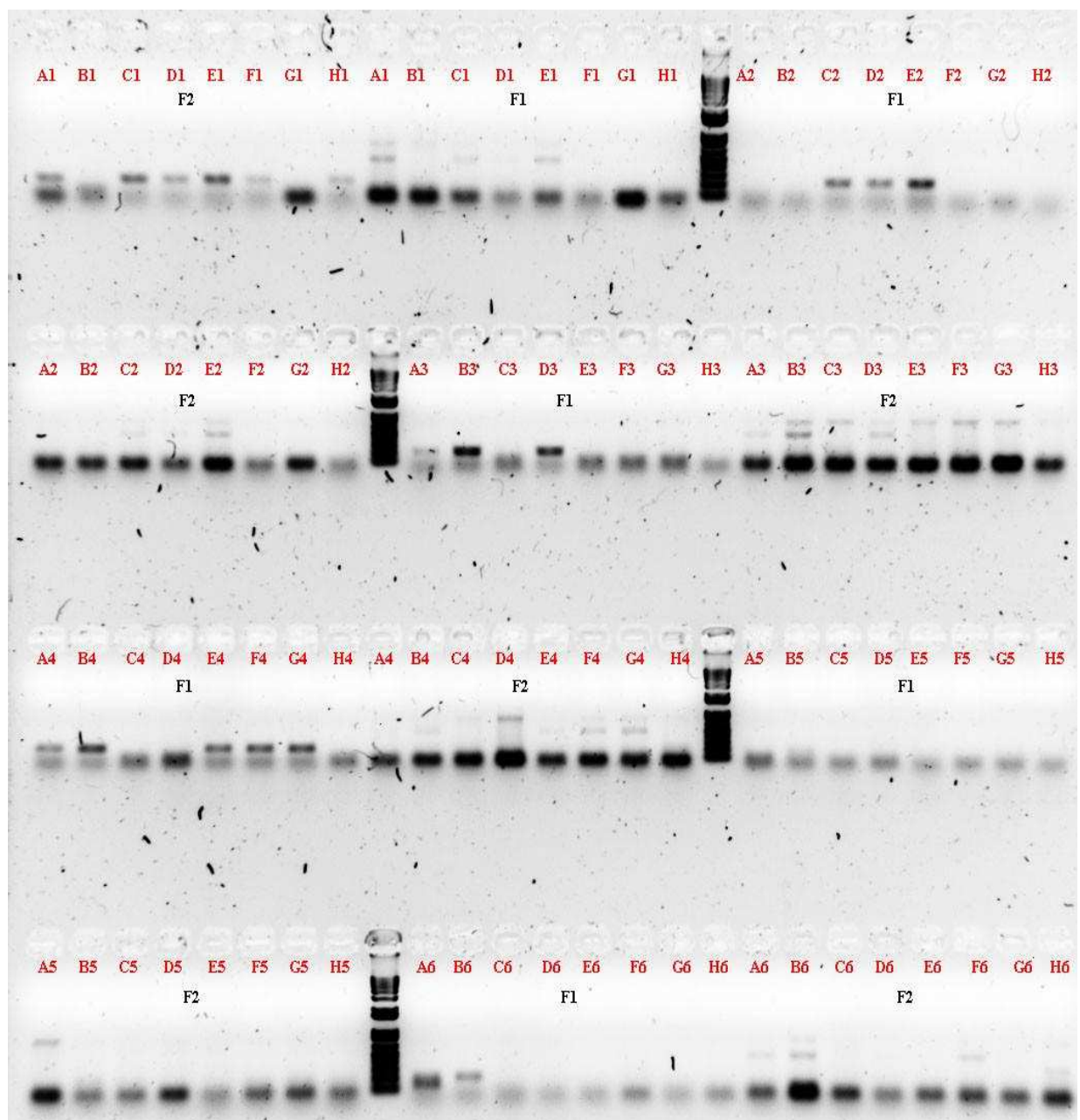
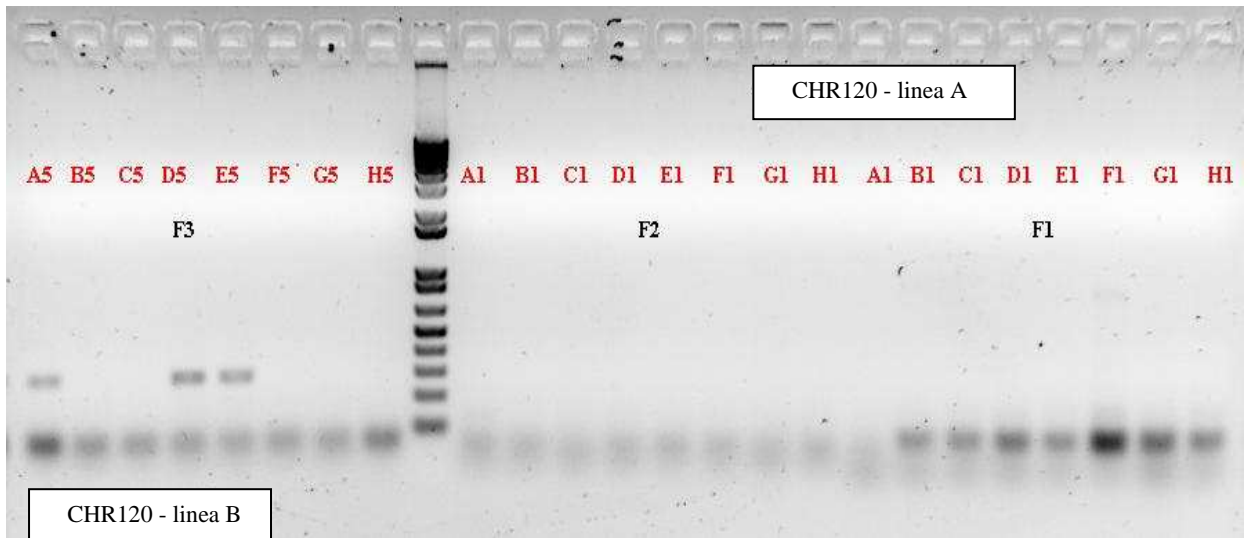


Figura 5.5 : Gel elettroforesi che mostrano i campioni positivi (mutanti) e i campioni negativi (non mutanti);le lettere indicano le otto piante mentre i numeri progressivi la pianta madre di provenienza;F1,F2,F3 indicano le combinazioni dei primer. Il primo e il secondo gel prendono in esame il mutante HDA108. Le piante positive per entrambe le combinazioni di primers risultano: A2, C2, D2, G2, A4, B4, D4, E4, F4, G4, H4 e A5, D5, E5. Totali positive HDA108= 14 piante. Parte del secondo gel prende invece in considerazione la prima linea mutante per il gene CHR120, dove non sono state identificate piante mutanti. Nel terzo gel sono invece riportati i risultati del *genotyping* della seconda linea mutante per il gene CHR120. Le piante positive risultano: A1, C1, D1, E1, C2, D2, E2, A3, B3, D3, A4, B4, E4, F4, G4 e A6 e B6. Totali positive CHR120= 17 piante.

Per il gene HDA108 sono state identificate 14 piante mutanti, ottenute da tre diverse piante madri, mentre i 17 mutanti del gene CHR120 sono stati ottenuti da cinque piante madri diverse, tutte però di un'unica linea. Tutte le piante mutanti identificate sono evidenziate anche in tabella 5.4 nelle celle ombreggiate. Lo screening per i mutanti per la seconda linea è ancora in corso.

Le piante risultate mutanti attualmente si trovano in serra e in questi giorni si sta procedendo al terzo reincrocio con B73.

		HDA108		CHR120			
Comb.Primers		F2	F3			F2	F1
Amplificato atteso(bp)		500	300			200	500
Piante mutanti (14)	Pianta madre 1	-----	-----	Piante mutanti (17)	Pianta madre 1	A,C,D,E	A,C,D,E
	Pianta madre 2	A,C,D,G	A,C,D,G		Pianta madre 2	C,D,E	C,D,E
	Pianta madre 3	-----	-----		Pianta madre 3	A,B,D	A,B,D
	Pianta madre 4	A,B,D,E,F, G,H	A,B,D,E,F, G,H		Pianta madre 4	A,B,E,F,G	A,B,E,F,G
	Pianta madre 5	A,D,E	A,D,E		Pianta madre 5	-----	-----
						Pianta madre 6	A,B

Tabella 5.4 : Tabella che riassume la genotipizzazione di piante HDA108 e CHR120. Le celle ombreggiate rappresentano le piante risultate mutanti per le due linee

5.3 CASO DI STUDIO III: LA LINEA OGM Mon810

Il caso di genetica forense che il nostro laboratorio ha avuto in consegna prevede la verifica di piante di mais coltivate in un appezzamento di terreno in località Fanna (PN) per verificarne l'appartenenza alla linea transgenica MON810. Per identificare la presenza di materiale OGM all'interno di derrate alimentari o prodotti finiti normalmente viene utilizzata la Real-Time PCR, una tecnica che permette di quantificare l'eventuale contaminazione da OGM. Infatti la normativa nazionale prevede che possano al massimo esserci contaminazioni da organismi geneticamente modificati del 0,9% e per valutare ciò è appunto necessaria un approccio di tipo quantitativo. Diversamente il nostro caso di studio prevede, di verificare se le piante coltivate in questo appezzamento di terreno siano o meno transgeniche, per cui è sufficiente un metodo qualitativo come una normale PCR end-point.

All'interno dell'appezzamento sono stati individuati cinque punti di prelievo (A-E), sui quattro vertici e uno al centro, da ognuno dei quali sono state campionate quattro piante (1-4). Di queste piante sono state raccolte le brattee che avvolgono l'infiorescenza femminile in quanto erano gli unici tessuti in attiva fase di divisione cellulare al momento del campionamento. Da questo materiale è stato estratto il DNA genomico per le reazioni di PCR.

Precedentemente alle analisi di laboratorio è stato però necessario fare un'attenta analisi bibliografica sui materiali e i metodi utilizzati da altri gruppi di studio accettati a livello internazionale, in particolare per quanto riguarda i primers da utilizzare per l'amplificazione (vedi sezione 4.6 dei Materiali e Metodi e Figura 4.2). Dopo le dovute considerazioni, i protocolli sono stati perfezionati per ottenere un'ottimizzazione dell'amplificazione. La temperatura di annealing utilizzata per l'amplificazione è di 60°C e al fine di aumentare le prestazioni dell'enzima abbiamo utilizzato Biostab PCR Optimizer alla concentrazione finale 1X. Sono state utilizzate quattro diverse combinazioni di primers, tre per amplificare diversi tratti del transgene presente nella linea MON810 e una, il controllo positivo, che amplifica un gene di mais (Figura 5.6). Solo una combinazione di primer è stata usata su tutte le venti piante raccolte, mentre per le altre l'amplificazione è stata fatta solo su una pianta per ogni punto di campionamento. Alcuni dei frammenti amplificati sono inoltre stati purificati da gel e sequenziati per confermare che si tratti della sequenza del costrutto (n° di accessione AY326434.1). Come controllo negativo in tutte le reazioni di PCR è stato utilizzato DNA genomico della linea B73, di sicuro non transgenica.

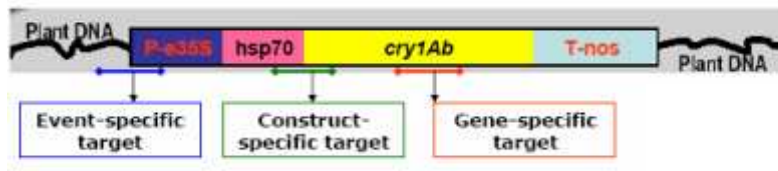


Figura 5.6 : Schema del costrutto utilizzato per l'ottenimento della linea transgenica MON810, e riportante le diverse combinazioni di primers utilizzate per la rilevazione di tale linea e di altri transgeni in mais.

Frammento 1 – “Event Specific Target”

Questo frammento di DNA rappresenta la giunzione tra il genoma di mais e il promotore CaMV35S utilizzato per controllare l'espressione del transgene. Viene amplificato con i primers F1 e R1 e da un prodotto di circa 170bp (Figura5.7).

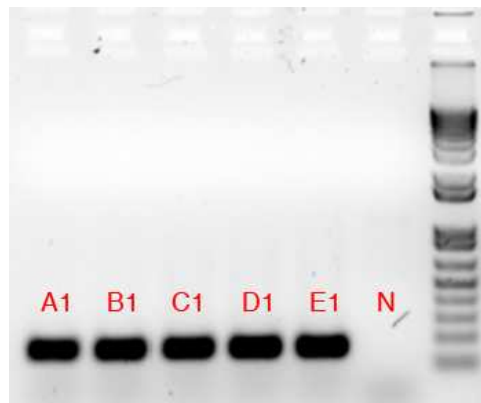


Figura 5.7 : amplificazione del frammento 1. Tutti i campioni presi in esame presentano il frammento.

Questo frammento, specifico dell'evento di trasformazione della linea MON810 è stato amplificato dalle piante raccolte (A1-E1) mentre non è presente nel controllo negativo. Come può dimostrare la figura tutti i campioni sono risultati positivi. Dopo l'amplificazione e la corsa elettroforetica è stato necessario estrarre e purificare dal gel i frammenti delle dimensioni desiderate per verificarne la sequenza. A questo scopo è stato utilizzato il kit QIAquick Gel Extraction. Il sequenziamento degli amplificati dalle piante A1 ed E1, eseguito dalla BMR Genomics di Padova, conferma che la sequenza corrisponde esattamente alla sequenza di inserzione del transgene della linea MON810 (sequenza AY326434 nel database Genbank). Di seguito è mostrato l'appaiamento della sequenza presente nel database e le sequenze da noi amplificate.

```

Frammento1_A1      -NNNNNNNNNNNTTGCNAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTG 59
Frammento1_E1      NNNNNNTNNNNNTNGCNAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTG 60
AY326434.1         -----CCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTG 53
                   * * *****
Frammento1_A1      GCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCG 119
Frammento1_E1      GCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCG 120
AY326434.1         GCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCG 113
                   *****
Frammento1_A1      ACAGTGGTCCCAAAGATGGAA----- 140
Frammento1_E1      ACAGTGGTCCCAAAGATGGAA----- 141
AY326434.1         ACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAGAAGACGTTTC 173

```

Frammento 2 – “Construct Specific Target”

Questo frammento di DNA rappresenta un tratto del costrutto impiegato nella produzione della linea MON810 e comprende l'introne del gene HSP70 e l'inizio del gene CryIAb. Viene amplificato con i primers F2 e R2 e il suo amplificato è lungo 113bp (Figura 5.8).

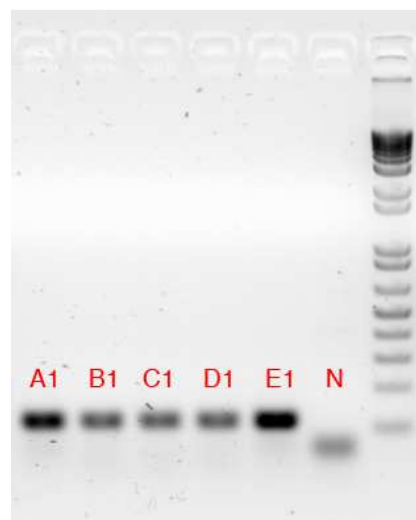


Figura 5.8 : amplificazione del frammento 2. Tutti i campioni presi in esame mostrano la presenza del frammento

Questo frammento, specifico della linea MON810 è stato amplificato dalle piante raccolte (A1-E1) mentre non è presente nel controllo negativo. La figura... dimostra che tutti i campioni risultano positivi eccetto il campione di B73. Il sequenziamento e allineamento degli amplificati, come si può vedere di seguito, dalle piante B1 e D1 conferma che la sequenza corrisponde alla sequenza del transgene della linea MON810 (sequenza AY326434 nel database Genebank).

```

Frammento2_B1      --NNNGNNNNNNNNNCTTTGCTCTTTC--TTGTAATGCAGATACCAAGCGGCCATGGAC 56
Frammento2_D1      ----CNNNNNNNNNANNCTTTGCTCTTTC--TTGTAATGCAGATACCAAGCGGCCATGGAC 54
AY326434.1 |      GTGTTACTCACATAGTCTTTGCTCATTTCATTGTAATGCAGATACCAAGCGGCCATGGAC 1140
                   ***** ** *****
Frammento2_B1      AACAAACCCAAACATCAACGAGTGCATCC----- 84
Frammento2_D1      AACAAACCCAAACATCAACGAGTGCATCC----- 82
AY326434.1 |      AACAAACCCAAACATCAACGAGTGCATCCCGTACAACCTGCCTCAGCAACCCTGAGGTCGAG 1200
                   *****

```

L'amplificazione di questo frammento è stata verificata inoltre su tutti i 20 campioni raccolti, come mostrato nella figura 5.9.

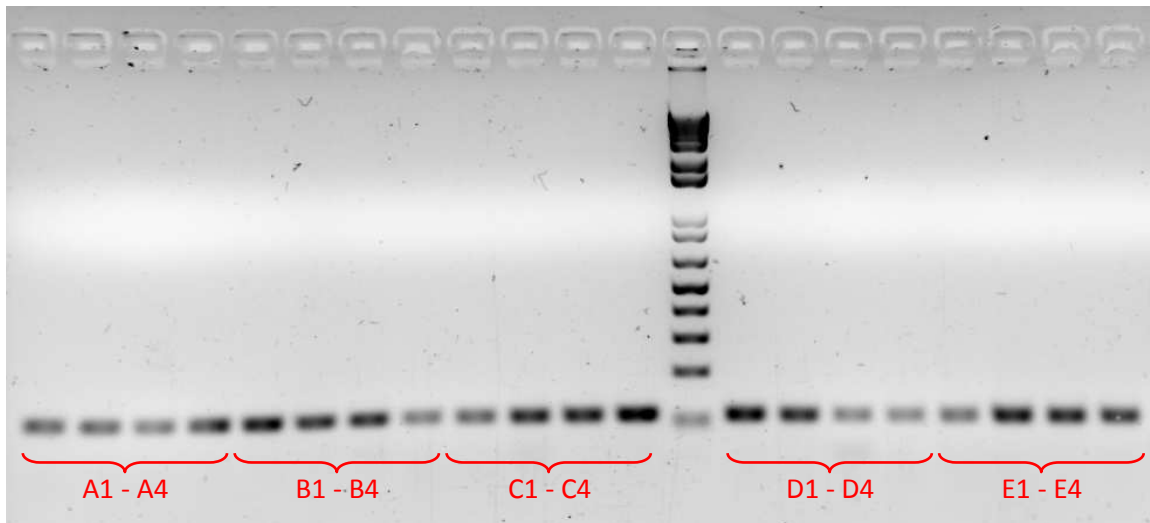


Figura 5.9 : amplificazione del frammento 2 in tutte le piante da cui è stato fatto il prelievo. Tutte le piante presentano il frammento amplificato

Frammento 3 – “Gene Specific Target”

Questo frammento di DNA corrisponde invece ad un tratto del gene CryIAb e quindi è amplificabile da tutte le piante transgeniche che presentino resistenza alla piralide. Il frammento è stato amplificato con i primers F3 e R3 ed è lungo 599bp (Figura 5.10).

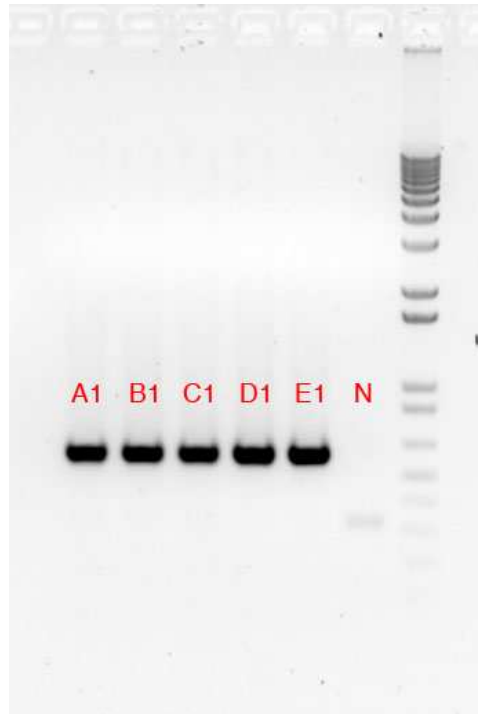


Figura 5.10 : amplificazione del frammento 3. Tutti i campioni analizzati presentano il frammento

Anche questo frammento è stato amplificato dalle piante raccolte (A1-E1) mentre nel controllo negativo è stato amplificato un frammento di dimensioni inferiori che il sequenziamento ha rivelato corrispondere alla sequenza AC165172.2” Zea mays clone CH201-171E16, complete sequence”. Il sequenziamento e allineamento degli amplificati dalle piante A1 e C1 conferma che la sequenza corrisponde esattamente alla sequenza del transgene della linea MON810 (sequenza AY326434 nel database Genebank).

```

Frammento3_A1      -----NNNNNNTTGGCNCANTGGGACGCCTTCCCTGGTGCAAATCGAGCAG  45
Frammento3_C1      -----NNNNNTTGGNCTCAGTGGGACGCCTTCCCTGGTGCAAATCGAGCAG  43
AY326434.1 |       ATCATCTGGGGCATCTTTGGCCCCCTCCAGTGGGACGCCTTCCCTGGTGCAAATCGAGCAG  1380
                   * * * * *
Frammento3_A1      CTCATCAACCAGAGGATCGAGGAGTTCGCCAGGAACCAGGCCATCAGCCGCCTGGAGGGC  105
Frammento3_C1      CTCATCAACCAGAGGATCGAGGAGTTCGCCAGGAACCAGGCCATCAGCCGCCTGGAGGGC  103
AY326434.1 |       CTCATCAACCAGAGGATCGAGGAGTTCGCCAGGAACCAGGCCATCAGCCGCCTGGAGGGC  1440
                   * * * * *
Frammento3_A1      CTCAGCAACCTCTACCAAATCTACGCTGAGAGCTTCCGCGAGTGGGAGGCCGACCCCACT  165
Frammento3_C1      CTCAGCAACCTCTACCAAATCTACGCTGAGAGCTTCCGCGAGTGGGAGGCCGACCCCACT  163
AY326434.1 |       CTCAGCAACCTCTACCAAATCTACGCTGAGAGCTTCCGCGAGTGGGAGGCCGACCCCACT  1500
                   * * * * *
Frammento3_A1      AACCCAGCTCTCCGCGAGGAGATGCGCATCCAGTTCAACGACATGAACAGCGCCCTGACC  225
Frammento3_C1      AACCCAGCTCTCCGCGAGGAGATGCGCATCCAGTTCAACGACATGAACAGCGCCCTGACC  223
AY326434.1 |       AACCCAGCTCTCCGCGAGGAGATGCGCATCCAGTTCAACGACATGAACAGCGCCCTGACC  1560
                   * * * * *
Frammento3_A1      ACCGCCATCCCCTCTTCGCCGTCCAGAACTACCAAGTCCCGCTCCTGTCCGTGTACGTC  285
Frammento3_C1      ACCGCCATCCCCTCTTCGCCGTCCAGAACTACCAAGTCCCGCTCCTGTCCGTGTACGTC  283
AY326434.1 |       ACCGCCATCCCCTCTTCGCCGTCCAGAACTACCAAGTCCCGCTCCTGTCCGTGTACGTC  1620
                   * * * * *

```


Frammento 4 – “Maize Specific Target”

Quest'ultimo frammento è invece il controllo positivo interno delle nostre amplificazioni, corrisponde al gene ZmHMGA, codificante per una proteina ad alta mobilità. Questo gene di mais è stato ovviamente amplificato in tutti i campioni, linea B73 compresa, viene amplificato dai primers F7 e R7 e risulta lungo 175bp (Figura 5.11).

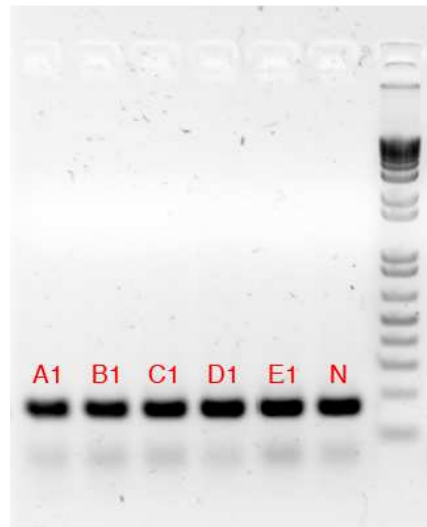


Figura 5.11 : controllo positivo interno presente nei campioni A1-E1 e B73

Le analisi da noi condotte consentono di affermare che le piante di mais analizzate appartengono senza possibilità di dubbio alla varietà MONSANTO 810.

6 CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Cento cinquant'anni fa Charles Darwin, pubblicava il libro "L'Origine della Specie" in cui formulava la sua teoria evoluzionistica basata sulla selezione naturale di mutazioni spontanee. Un secolo e mezzo dopo sappiamo con certezza che cambiamenti nella sequenza di un gene possono indurre nuovi caratteri e fenotipi e abbiamo anche imparato a produrre nuove e specifiche mutazioni per utilizzarle nell'ambito della ricerca. L'ottenimento di mutanti in cui un determinato gene viene "spento" o "acceso" è infatti di fondamentale importanza per studiarne e capirne la funzione. Proprio per queste ragioni sono stati messi a punto tre diversi approcci basati sulla tecnica della Reazione a catena della Polimerasi (PCR) per genotipare, ovvero identificare e caratterizzare, tre tipologie di mutanti di mais.

La prima parte del lavoro è stata incentrata sulla caratterizzazione del mutante spontaneo *semaphore1 (sem1)*. Questo mutante presenta un ridotto trasporto dell'auxina e tutta una serie di difetti (internodi corti, alterazioni dello sviluppo dell'embrione e dell'endosperma, ridotto numero di radici laterali, mancata produzione di polline) che possono essere ricondotti ad anomalie nei livelli di quest'ormone vegetale. Il recente sequenziamento del genoma di mais ha rivelato che questa mutazione si trova in una regione del cromosoma 9, molto vicino alla posizione del gene *ZmPIN1a* che codifica per un trasportatore dell'auxina. Per questo motivo abbiamo quindi verificato l'espressione di questo gene nelle piante mutanti, senza trovare evidenti alterazioni dei livelli di espressione, e ne abbiamo quindi amplificato e sequenziato la regione codificante per valutare la presenza di eventuali mutazioni in grado di rendere il trasportatore non funzionale. L'amplificazione, eseguita con un primer sul codone di inizio della traduzione (ATG) e un primer a valle del codone di stop (TGA) e il successivo sequenziamento hanno mostrato che le otto mutazioni puntiformi identificate non provocano cambiamenti nella sequenza aminoacidica del trasportatore. Questi risultati smentiscono la nostra ipotesi iniziale, ovvero che sia una mutazione di *ZmPIN1a* causare il fenotipo del mutante. Bisogna però dire che l'approccio seguito lascia ancora spazio a qualche speranza; utilizzando per l'amplificazione un primer sull'ATG è stato impossibile avere informazioni sulla regione non tradotta al 5' (5'UTR), in cui l'eventuale presenza di codone di start potrebbe causare un prematuro inizio della traduzione e quindi la produzione di una proteina aberrante. Inoltre le prime 27paia di basi della sequenza amplificata corrispondono al primer utilizzato e non alla sequenza reale del gene e quindi non è da escludere la presenza di una mutazione in questo, seppur breve, tratto. Sarà quindi necessario procedere all'amplificazione e al sequenziamento del 5'UTR e della regione iniziale di *ZmPIN1a* per confermare o escludere queste possibilità e, di conseguenza, la nostra ipotesi iniziale.

Nel secondo caso, invece, i soggetti di studio sono stati due linee di mutanti inserzionali ottenuti attraverso trasposizione del trasposone Mu. Questi due mutanti presentano l'inserzione a carico dei geni HDA108 e CHR120, due regolatori epigenetici che il nostro laboratorio utilizzerà per studiare l'effetto dei fattori ambientali nella creazione di nuova variabilità epigenetica. Prima di procedere con questi studi è però necessario introgredire queste mutazioni nel *background* omozigote della linea B73, attraverso ripetuti reincroci. In questo processo si è reso necessario seguire la segregazione delle mutazioni nella progenie di ciascun re-incrocio e per far questo è stato messo a punto e ottimizzato un protocollo rapido di genotipizzazione attraverso PCR. Primers gene-specifici sono stati infatti utilizzati in combinazione con un primer disegnato sulle regioni terminali ripetute invertite (TIR) del trasposone per verificarne la presenza in ogni singola pianta. In questo modo, nella progenie del terzo re-incrocio con B73 sono state identificate quattordici piante mutanti per il gene HDA108 e diciassette per CHR120. Queste piante selezionate stanno per essere fecondate con polline della linea B73 per procedere al quarto re-incrocio.

Infine, l'ultimo caso preso in esame non riguarda esattamente un mutante di mais ma una linea transgenica, o meglio, OGM. Il nostro laboratorio è stato infatti incaricato di eseguire una perizia su un appezzamento probabilmente coltivato a mais Bt, ovvero resistente alla piralide grazie all'introduzione del gene per la tossina batterica CryIa. In questo caso, quindi, la PCR è stata utilizzata per verificare la presenza della cassetta genica utilizzata per la produzione della linea transgenica nel genoma di 20 piante campionate all'interno dell'appezzamento in esame. Per l'amplificazione sono stati utilizzati dei primer riportati in letteratura, precedentemente utilizzati per gli stessi studi e accettati per la rilevazione degli OGM dagli enti legislatori. Sono state scelte tre diverse combinazioni di primer, una sulla sequenza del gene CryIa (questo per dimostrare che si tratti effettivamente di piante Bt) e altre due combinazioni invece specifiche per la linea transgenica MON810, una delle linee Bt più diffuse. Le nostre analisi di amplificazione, e il sequenziamento dei frammenti ottenuti, hanno mostrato che tutte le piante campionate sono transgeniche e appartenenti proprio alla linea MON810, la cui coltivazione in Italia è vietata a causa di un vuoto legislativo. Spetta ora alle autorità competenti valutare quale danno per la collettività abbia causato questa coltivazione e intraprendere eventuali azioni penali nei confronti del proprietario del terreno.

Sebbene questi lavori siano stati solo preliminari o complementari a più approfonditi studi sul trasporto auxinico o sulla regolazione epigenetica dello sviluppo, hanno dimostrato la potenza e la duttilità della PCR nella ricerca biotecnologica. Inoltre il caso di genetica forense ha consentito di mostrare l'utilità dell'applicazione di alcune tecniche di biologia molecolare anche in ambiti non strettamente correlati all'attività di laboratorio.

7 BIBLIOGRAFIA

Bensen RJ, Johal GS, Crane VC, Tossberg JT, Schnable PS (1995) Cloning and characterization of the maize *An1* gene. *Plant Cell* **7**: 75–84

Bortiri E., Dave Jackson, Sarah Hake (2006) Advances in maize genomics: the emergence of positional cloning. *Plant Biology* **9**: 164-171

Carraro N., Forestan C, Canova S, Traas J, Varotto S (2006) ZmPIN1a and ZmPIN1b encode two novel putative candidates for polar auxin transport and plant architecture determination of maize. *Plant Physiol* **142**: 254-264

Cassani E., Villa D., Forestan C., Cerino Badone F., Casella L., Landoni M., Sirizzotti A., Varotto S., Pilu R. (2009) Brachytic2 and 3 double mutant shown an altered embryo development and plant growth. Proceedings of the 53rd Italian Society of Agricultural Genetics Annual Congress. Torino - Italy, 16/19 September, 2009. Poster Abstract 7.28

China F. Lunde, Darren J. Morrow, Laura M. Roy (2003) Progress in maize gene discovery: a project update *Funct Integr Genomics* **3** : 25–32

Chuck G., Meeley RB, Hake S (1998) The control of maize spikelet meristem fate by the APETALA2-like gene indeterminate spikelet1. *Genes Dev* **12**: 1145–1154

Das L., Martienssen R (1995) Site-selected transposon mutagenesis at the *hcf106* locus in maize. *Plant Cell* **7**:287–294

Forestan C., Meda S, Varotto S (2010) ZmPIN1-Mediated Auxin Transport Is Related to Cellular Differentiation during Maize Embryogenesis and Endosperm Development. *Plant Physiology* **152**:1373-1390

Hanley S., Edwards D, Stevenson D, Haines S, Hegarty M, Schuch W, Edwards KJ (2000) Identification of transposontagged genes by the random sequencing of Mutator-tagged DNA fragments from *Zea mays*. *Plant J* **22** : 557–566

Lisch D, Chomet P, Freeling M (1995) Genetic characterization of the *Mutator* system in maize: behavior and regulation of *Mu* transposons in a minimal line. *Genetics* **139**: 1777–179

McClintock B. (1950) The Origin and Behavior of Mutable Loci in Maize. Proc Natl Acad Sci U S A. **36** : 344 – 355

Multani Dilbag S., Steven P. Briggs, Mark A. Chamberlin, Joshua J. Blakeslee, Angus S. Murphy, Gurmukh S. Johal,(2003) Loss of an MDR transporter in compact stalks of maize *br2* and sorghum *dw3* mutants. Science **302** : 81-84

Neuffer M.G., and Sheridan, F. (1980) Defective kernel mutants of maize. I. Genetic and lethality studies. Genetics **95**: 929-944

Ni W.M., Chen XY, Xu ZH, Xue HW (2002a) Isolation and functional analysis of a Brassica juncea gene encoding a component of auxin efflux carrier. Cell Res **12**: 235- 245

Ni W.M., Chen XY, Xu ZH, Xue HW (2002b) A pin gene families encoding components of auxin efflux carriers in Brassica juncea. Cell Res **12**: 247-255

Schnable Patrick S., et al., (2009) The B73 Maize Genome: Complexity, Diversity, and Dynamics. Science **326**: 1112 – 1115

Snustad D. P., M. J. Simmons (2010) Principi di Genetica. Elementi genetici trasponibili, ed. Edises 535-557

Paponov IA, Teale WD, Trebar M, Blilou I, Palme K (2005) The PIN auxin efflux facilitators: evolutionary and functional perspectives. Trends Plant Sci **10**: 170-177

Pingali PL (2001) (ed) CIMMYT 1999–2000. World maize facts and trends. Meeting world maize needs: technological opportunities and priorities for the public sector. CIMMYT, Mexico

Scanlon M.J., David C. Henderson and Brad Bernstein (2002) *SEMAPHORE1* functions during the regulation of ancestrally duplicated *knox* genes and polar auxin transport in maize. Development **129**: 2663-2673

Wang J., Hu H, Wang G, Li J, Chen J, Wu P (2009) Expression of PIN Genes in Rice (*Oryza sativa* L.): Tissue Specificity and Regulation by Hormones. *Mol Plant*

<http://en.wikipedia.org/>

<http://www.sciencedirect.com>

<http://www.isaaa.org/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

<http://www.maizegdb.org>

<http://www.Promega.com>

<http://www.invitrogen.com>

http://www.izslt.it/izs/modules/sections/sito/IZS/centri_referenza/crogm/centro_ref_OGM/index.html

8 RINGRAZIAMENTI

In questi anni di studio molte persone sono state al mio fianco e molte altre lo sono ancora. L'avventura universitaria non dico sia diventata una passeggiata, ma si è rivelata sicuramente più facile, appassionante, utile, umana, e alcune volte emozionante e divertente con l'aiuto di queste persone. Per questo voglio ringraziare tutte quelle persone che sono riuscite a lasciare il segno, in positivo, in questi quattro anni universitari sapendo che la tesi di laurea è solo la conclusione di uno dei tanti obiettivi che ci si pone durante la vita.

Per prima cosa vorrei ringraziare i miei genitori che tra le mille difficoltà mi hanno dato la possibilità per due anni consecutivi di avere una camera a Legnaro scommettendo sul fatto che sarei riuscito ad autogestirmi in tutto o quasi e soprattutto perché mi hanno sponsorizzato durante questa cavalcata. Grazie alle mie due bellissime sorelle Valentina e Marta, mia zia Tiziana, Mirko, Irene e Riccardo che sempre mi hanno dato quella spinta in più: con loro è stato come possedere le "ridotte" per quando c'era da portare un grosso peso sulle spalle e sette rapporti quando c'è stato da correre contro il tempo.

Un immenso grazie ai miei tre "Angeli Custodi" Cristian, Silvia e Luca i quali mi hanno insegnato più cose in questi quattro mesi che i pesanti libri negli ultimi quattro anni. Grazie non solo per questo, ma anche per essere stati dei punti di riferimento dal punto di vista umano. Grazie della continua disponibilità alla professoressa Varotto che sempre è stata gentile: il tirocinio svolto mi ha dato la possibilità di affacciarmi per la prima volta nel mondo del lavoro e da questa esperienza ho imparato molto.

Grazie a tutte le persone che in questi anni sono passate o sono ancora nell' USD Gambugliano. Grazie a Fabiola, Daniele, Nicola, Alberto i mister Ivan e Venanzio: la possibilità di poter sfogare in maniera positiva le giornate intere passate sulla scrivania e riuscire anche ad imparare a giocare a calcio (una mia grande passione) è un privilegio che pochissime persone hanno.

Grazie a Francesco e Matteo con cui in questi quattro anni ho passato tutte le avventure e mi hanno sicuramente fatto compagnia nello studio. Cortz senza di te non avrei mai passato mate! Grazie Chiara, Alessandra, Sofia, Stefania, Maddalena, Sara ed Elisa che sono le "tose" del sabato sera, le "tose" della "Padova by night". Grazie Giorgio per le belle chiacchierate appassionate del fine settimana.

Grazie ai ragazzi e alle ragazze della 509, delle lezioni al Paolotti del primo e il più difficile anno di università. Grazie mille a Sibilla e Laura con cui ho tanto studiato, Roberto che spesso è stato disponibile nel darmi passaggi nella tratta Legnaro - Padova - Creazzo. Grazie mille a tutti i compagni di corso che con me sono passati in 270: un grazie particolare a Giulia, Marco e Piero con

cui sono riuscito ad instaurare un bel rapporto di amicizia (dobbiamo ancora andare al mare quest'anno!!).

Grazie di cuore a Gabriele, Valentino e Gianluca i coinquilini da cui ho imparato tantissimo, con cui ho legato di più e che mi hanno sopportato di più. Mi mancheranno tutte le avventure di montagna, le partite in palestra il martedì sera, i super canederli, i “giri in carrello” e tutto quello che fa parte della vita universitaria condivisa con voi.

Grazie a tutti.