



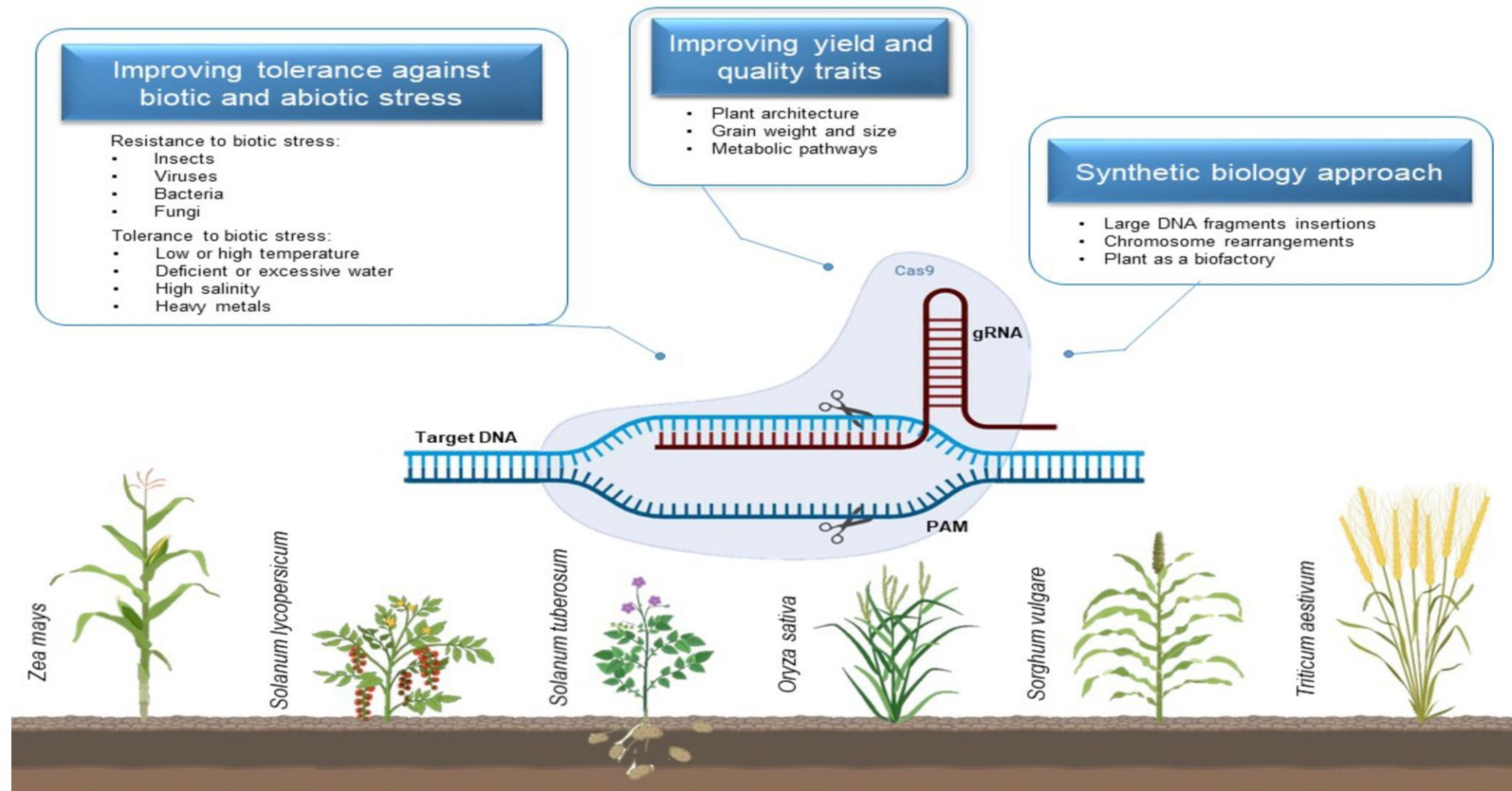
ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

# **DNA editing in frumento e orzo - primi risultati presso il DISTAL**

**Francesco Camerlengo, Ambra Viviani**

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari

# Applicazioni del Genome Editing in campo agrario

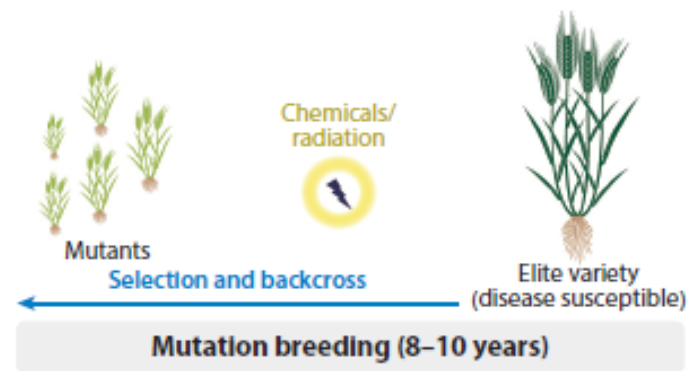
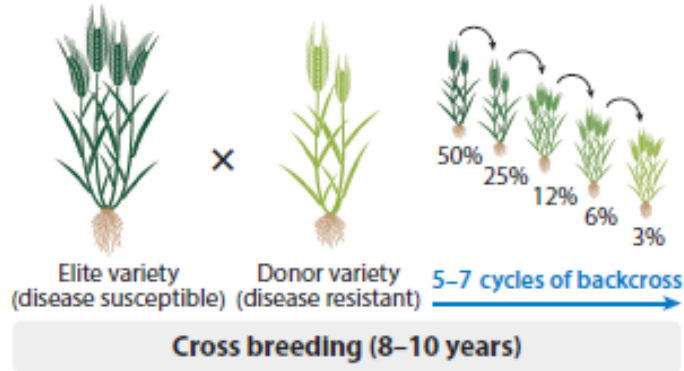


Camerlengo et al. "CRISPR towards a Sustainable Agriculture." Encyclopedia 2.1 (2022): 538-558.

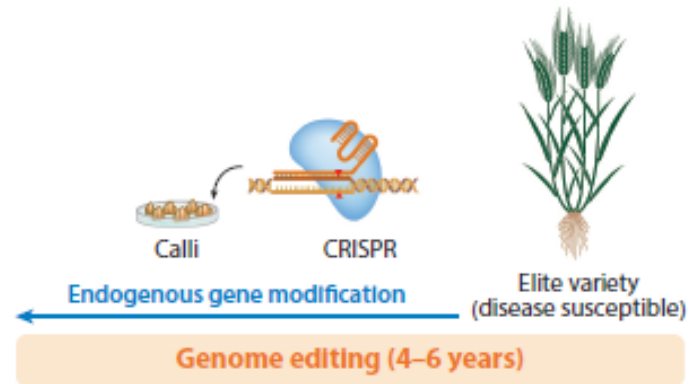
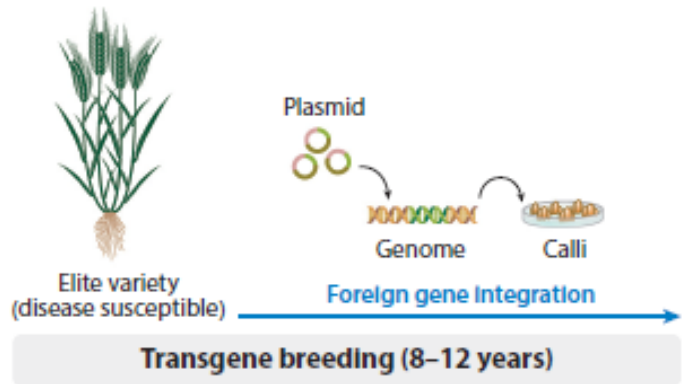


# Punti di forza del Genome Editing

Produce mutazioni specifiche



Diminuzione off-targets

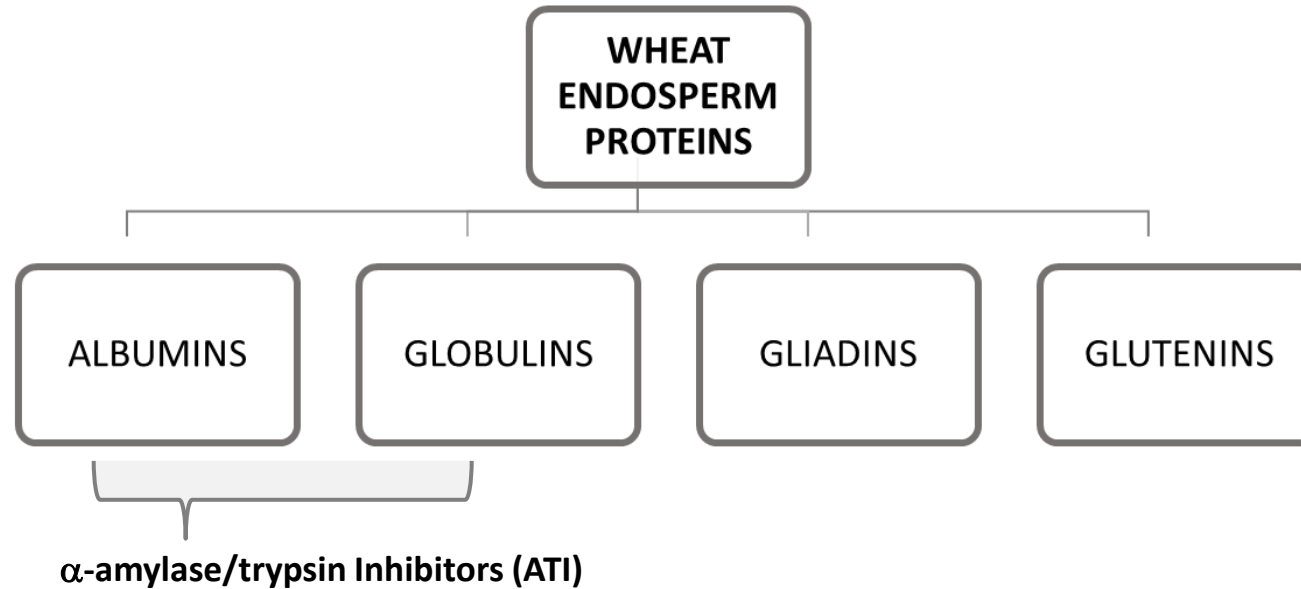


Costi contenuti

Salva-tempo

GM-free?

# Riduzione di allergeni in cariossidi di frumento



Le **reazioni avverse** al frumento sono dovute alle **proteine di riserva** presenti nell'endosperma delle cariossidi

**ATI** sono riconosciuti come potenti **attivatori** della **risposta immunitaria**

	KDa	SUBUNIT	SYN	CHR
<b>MONOMERIC</b>	12	WMAI-1	0.28	6D
		WMAI-2	-	6B
<b>HOMODIMERIC</b>	24	WDAI-1	0.53	3B
		WDAI-2	0.19	3D
		WTAI-CM1	CM1	7D
		WTAI-CM2	CM2	7B
<b>HETEROTETRAMERIC</b>	60	<b>WTAI-CM3B</b>	<b>CM3</b>	<b>4B</b>
		WTAI-CM3D	CM3	4D
		<b>WTAI-CM16</b>	<b>CM16</b>	<b>4B</b>
		WTAI-CM17	CM17	4D

Bakers' asthma

WDEIA

NCWS

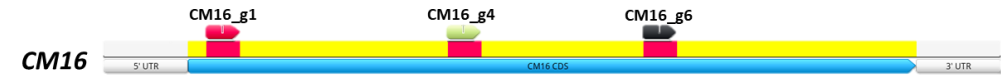
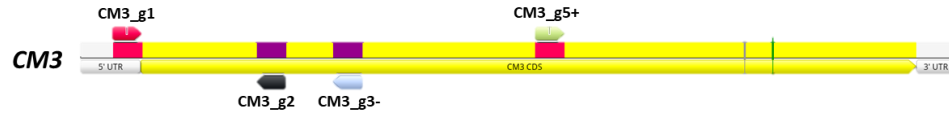
Celiac Disease

IgE reactive proteins

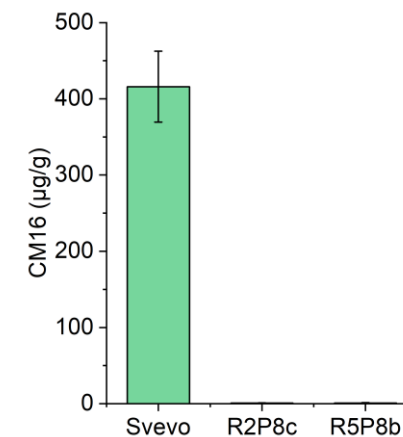
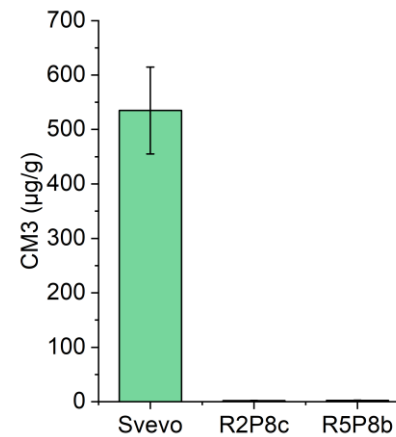
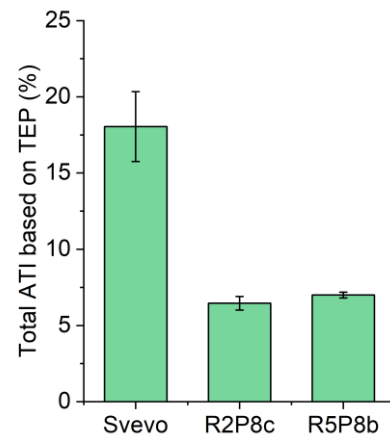


# Riduzione di allergeni in cariossidi di frumento

## Multiplex editing



## Quantificazione delle sub-unità ATI nelle linee editate T<sub>2</sub>



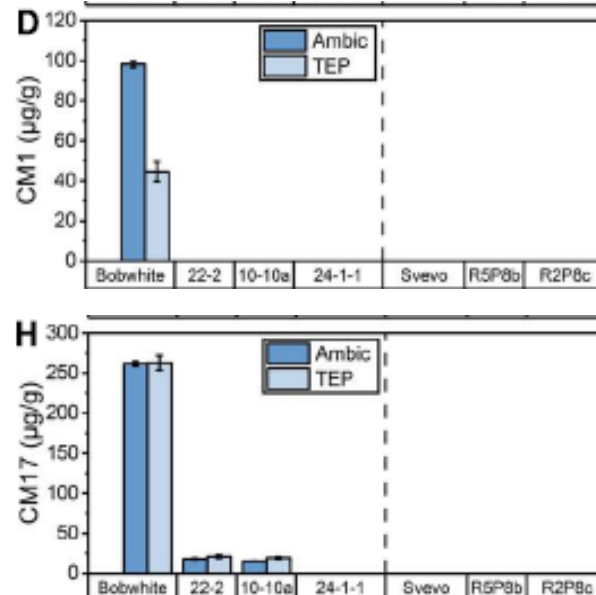
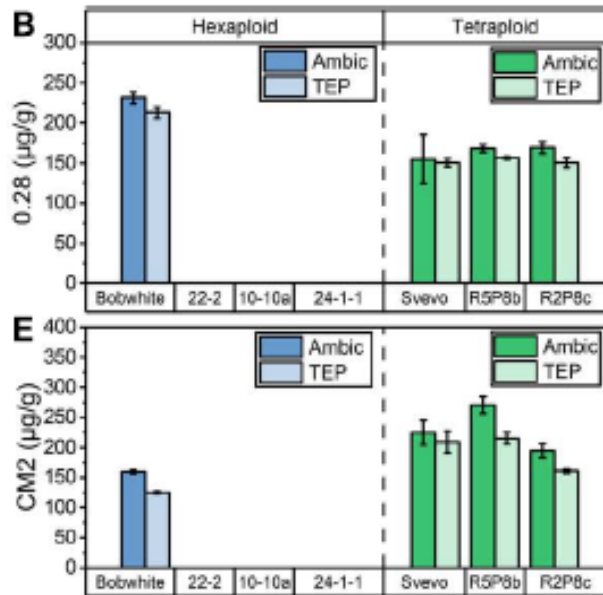
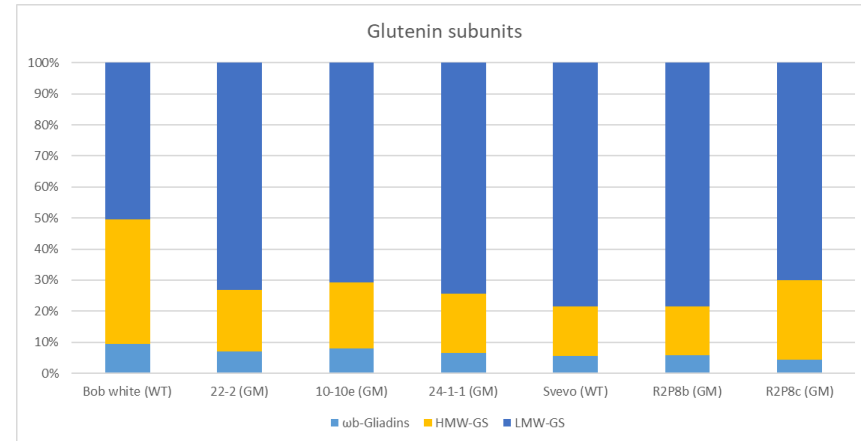
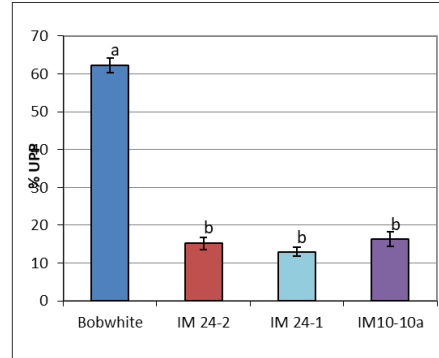
**Riduzione** della quantità totale di **ATI** e delle singole sub-unità, WTAI-CM3 e WTAI-CM16, nelle linee editate rispetto al controllo, quantificate tramite LC-MS/MS

# CRISPR-Cas9 vs RNAi

## Confronto degli off-targets sulle proteine del glutine e le varie sub-unità ATI

Nelle linee RNAi è evidente una **riduzione** della frazione non estraibile di polimeri proteici corrispondente alle **proteine del glutine**

Unextractable Polymeric Proteins (%UPP)



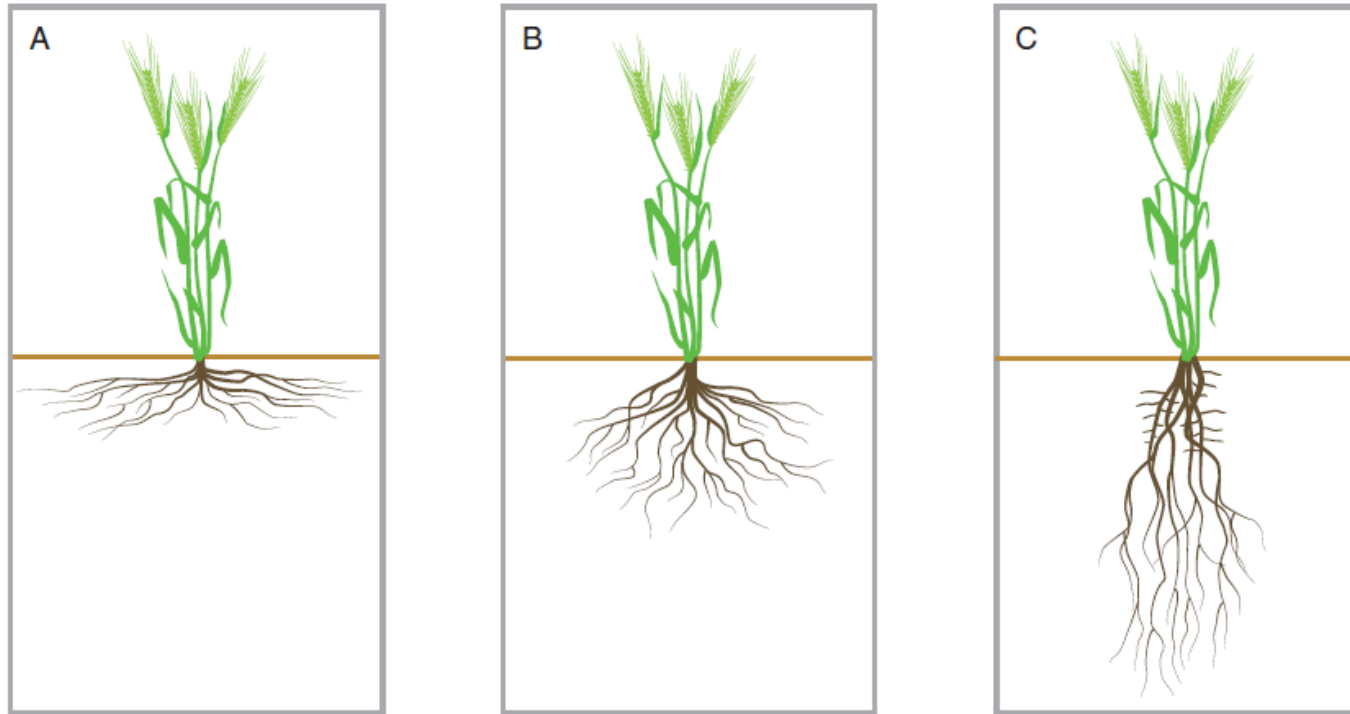
**off-targets** in sub-unità ATI individuati nelle linee RNAi



# Architettura radicale in orzo

Sviluppo di **nuovi ideotipi radicali** che consentono di aumentare **resistenza a stress abiotici e migliorare rese** nei cereali

L'architettura radicale ed in particolare l'**angolo radicale** condizionano l'**adattamento** delle piante a diverse **condizioni ambientali**



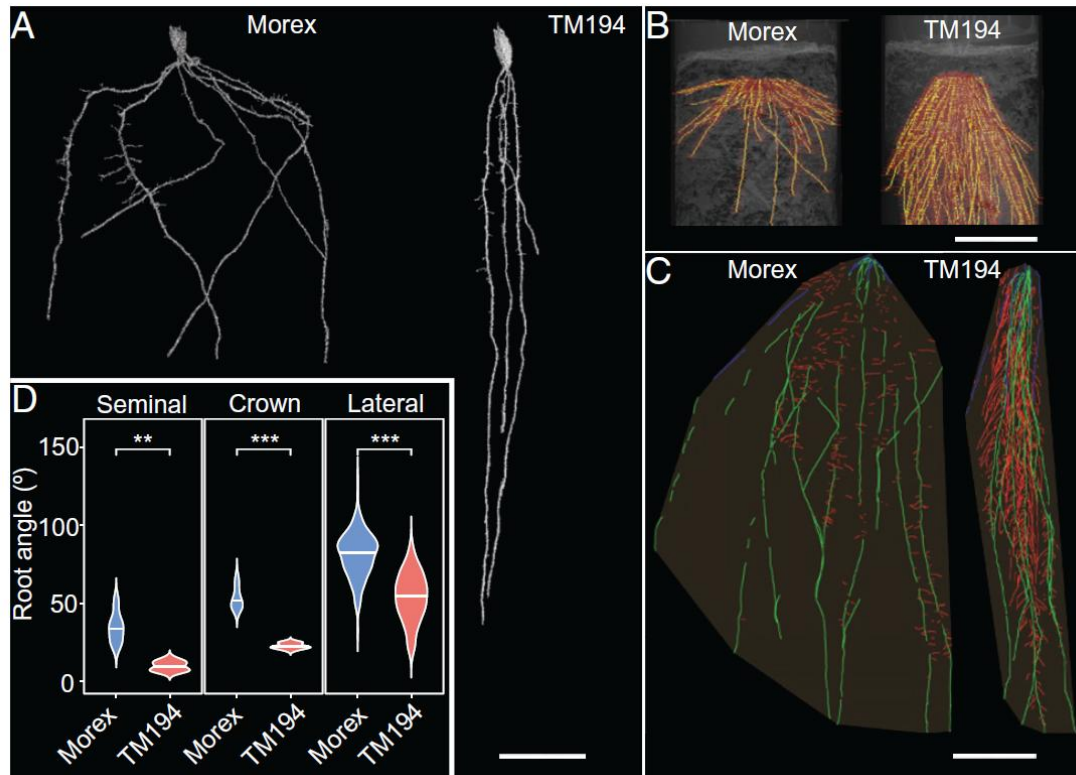
- **Basi genetiche** che influenzano architettura radicale
- **Assorbimento** migliorato di **acqua, NPK** e altri nutrienti dal suolo
- **Adattamento** alle condizioni di **siccità e salinità**

White et al. 2013. Matching roots to their environment. Ann Bot 112: 207–222

# Geni regolatori dell'architettura radicale in orzo

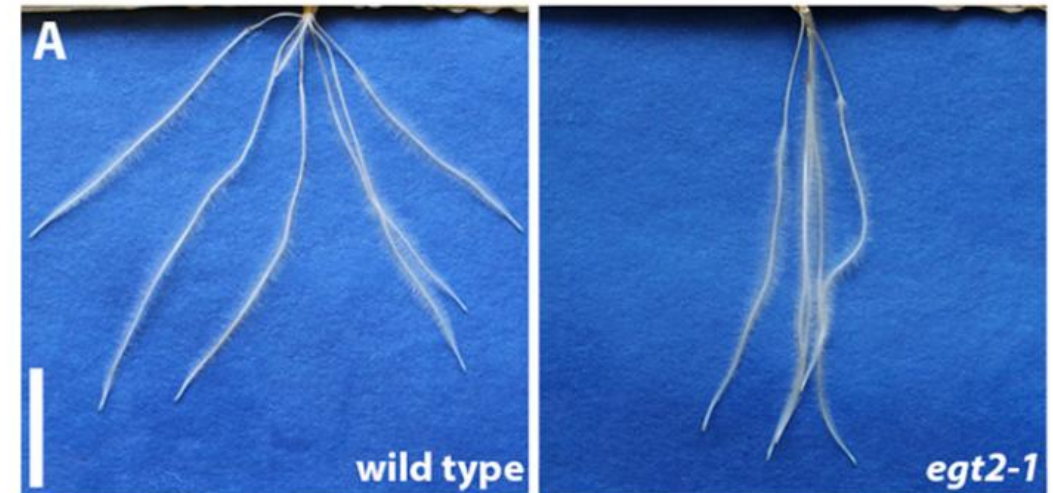
Linee mutanti per **angolo radicale** individuate nella popolazione tilling di orzo *TILLmore*  
**Due geni** clonati tramite Bulk Segregant Analysis and Whole Genome Sequencing.

## ENHANCED GRAVITROPISM 1 (*EGT1*)



## Maggiore risposta gravitropica di radici seminali e laterali

## ENHANCED GRAVITROPISM 2 (*EGT2*)



Kirschner et al. "ENHANCED GRAVITROPISM 2 encodes a STERILE ALPHA MOTIF-containing protein that controls root growth angle in barley and wheat." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118.35 (2021).

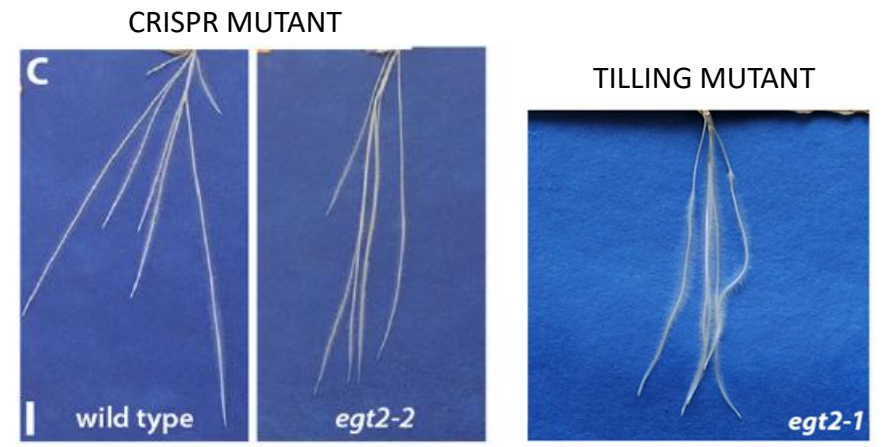
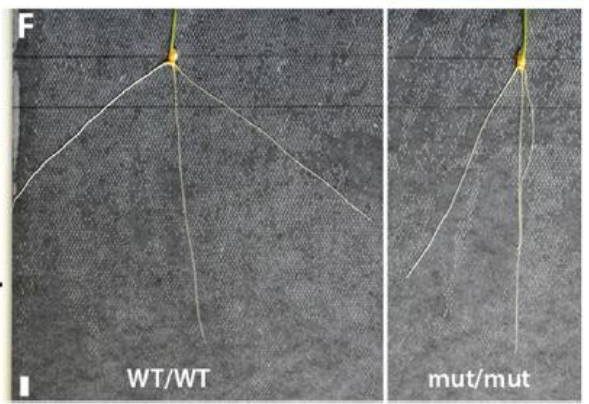
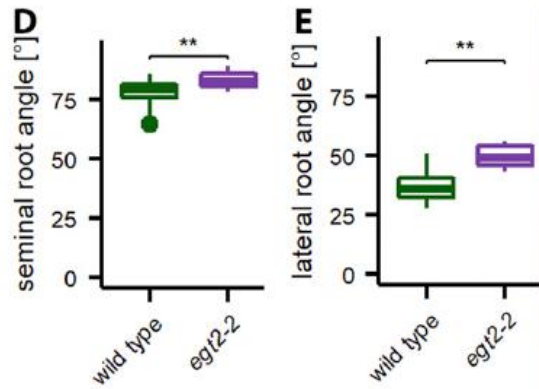
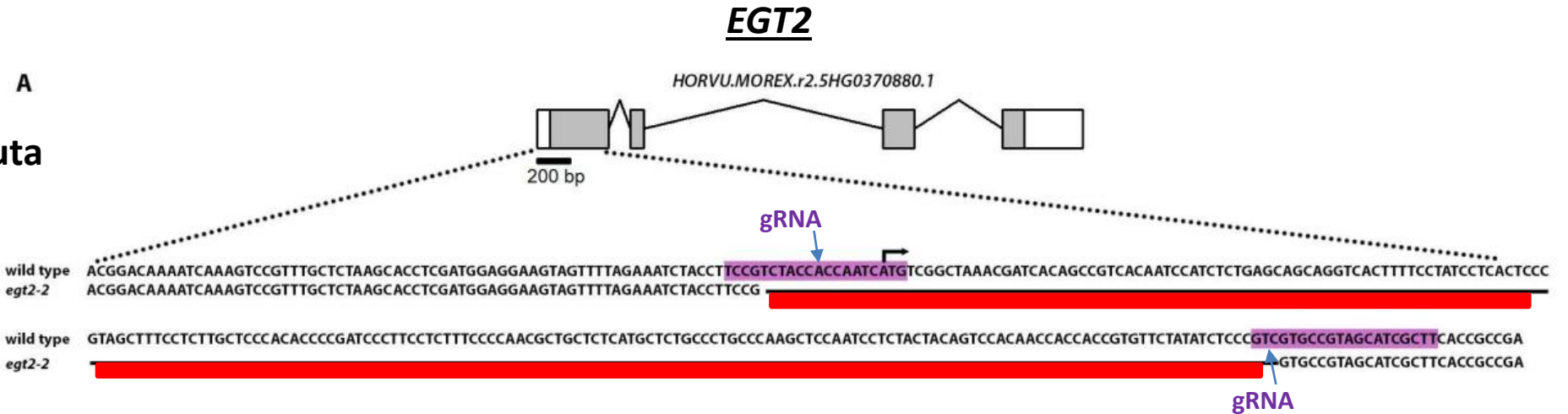
Fusi et al. "Root angle is controlled by *EGT1* in cereal crops employing an antigravitropic mechanism." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 119.31 (2022); e2201350119.





# Validazione di mutanti ipergravitropici di orzo

Delezione di 215 bp ottenuta mediante CRISPR-Cas9



Il fenotipo mostrato dal mutante ottenuto tramite EDITING corrisponde allo stesso fenotipo mostrato dalla linea tilling  
 Un **maggiore angolo radicale** delle radici seminali e laterali nei mutanti rispetto al wt determina una **crescita ipergravitropica**



## Ruggine gialla e bruna in frumento



La **ruggine bruna** (*Puccinia triticina*) è una **malattia fungina** che colpisce steli, foglie e spighe. Le infezioni possono causare una **perdita di resa** fino al **20%**.



La **ruggine gialla** (*Puccinia striiformis f.sp. tritici*) è nota anche come ruggine striata per la disposizione delle pustole sulla foglia. La ruggine gialla è un **problema** grave in **tutto il mondo**, infatti è in grado di causare perdite fino al **40%** della produzione.



**Ruggine bruna**



**Ruggine gialla**

- Uso di **pesticidi** rappresenta una soluzione per la lotta alle ruggini

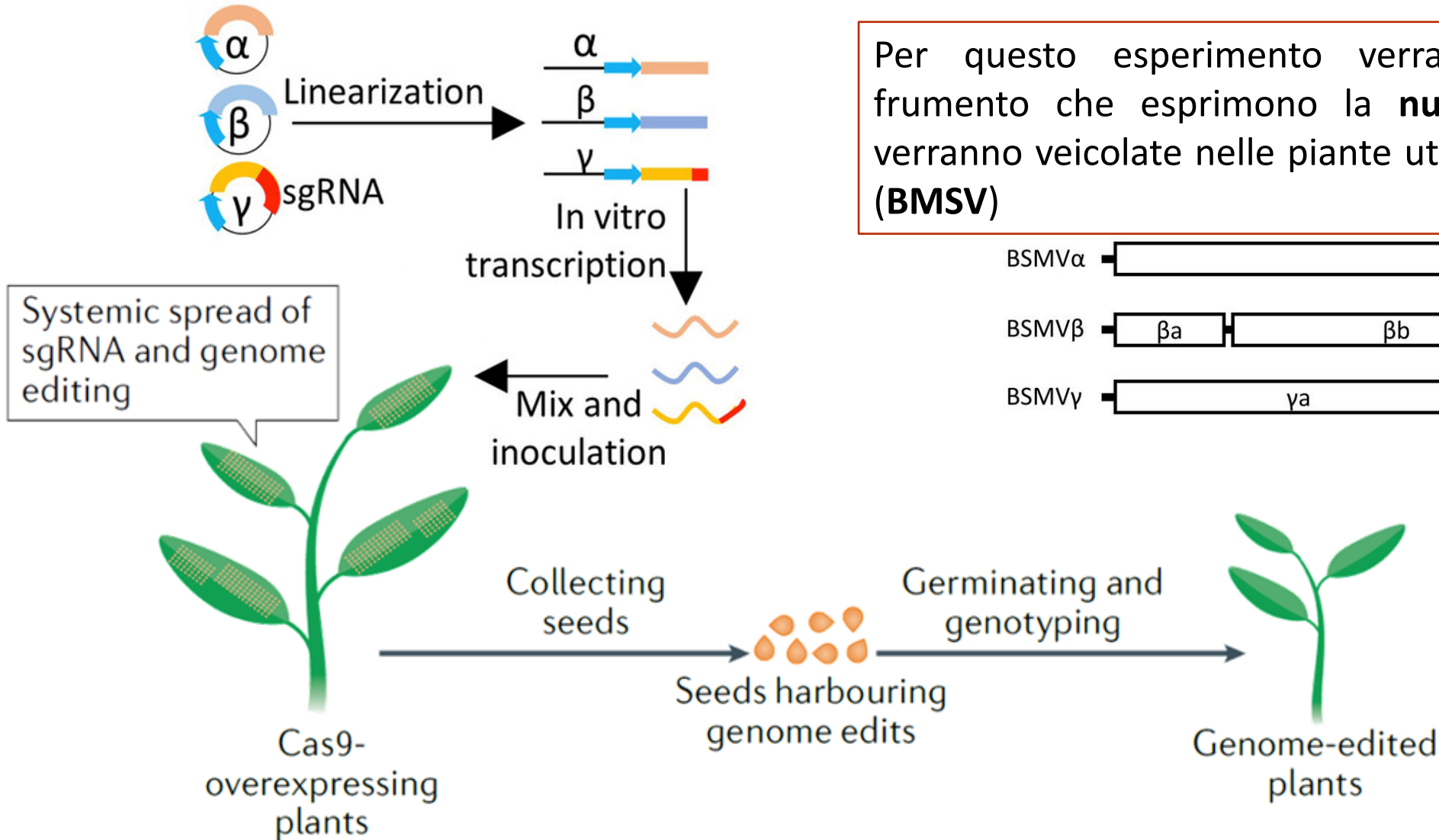


**Danno ambientale**

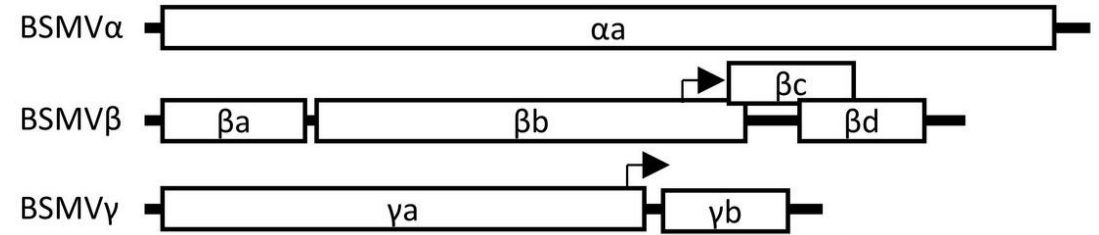
Le **misure agronomiche** applicabili nella lotta alle ruggini sono riassumibili in un'unica voce:  
**l'uso di varietà resistenti.**

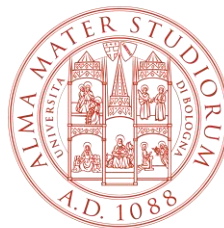
# Aumentare la resistenza alla ruggine gialla e bruna in frumento duro e tenero

## Knockout di geni di suscettibilità in frumento duro e tenero



Per questo esperimento verranno utilizzate piante di frumento che esprimono la **nucleasi Cas9** e le **gRNAs** verranno veicolate nelle piante utilizzando un **vettore virale (BSMV)**





ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

**Francesco Camerlengo, Ambra Viviani**

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari

[f.camerlengo@unibo.it](mailto:f.camerlengo@unibo.it), [ambra.viviani@unibo.it](mailto:ambra.viviani@unibo.it)

[www.unibo.it](http://www.unibo.it)

