



UNIVERSITÀ
DI TORINO



Prospettive di miglioramento genetico di *Castanea sativa* Mill. attraverso l'applicazione di biotecnologie avanzate

Vera Pavese¹, Andrea Moglia¹, Paolo Gonthier¹, Elena Corredoira², M^a Teresa Martínez², Emile Cavalet-Giora¹, Daniela Torello Marinoni¹, Roberto Botta¹

¹ Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari—DISAFA, Università degli Studi di Torino, Largo Paolo Braccini 2, Grugliasco, 10095 Torino, Italia

² Misión Biológica de Galicia, Sede en Santiago, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Avd. Vigo, s/n, 15705 Santiago de Compostela, Spain



- **Patologie**

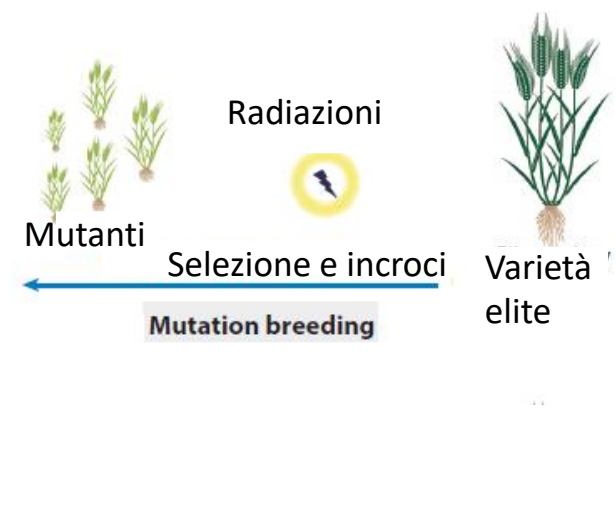
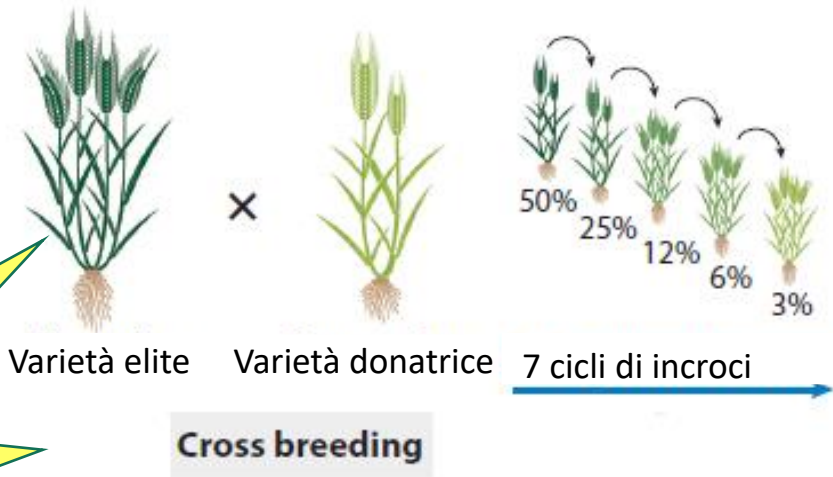
Phytophthora spp.

Cryphonectria parasitica

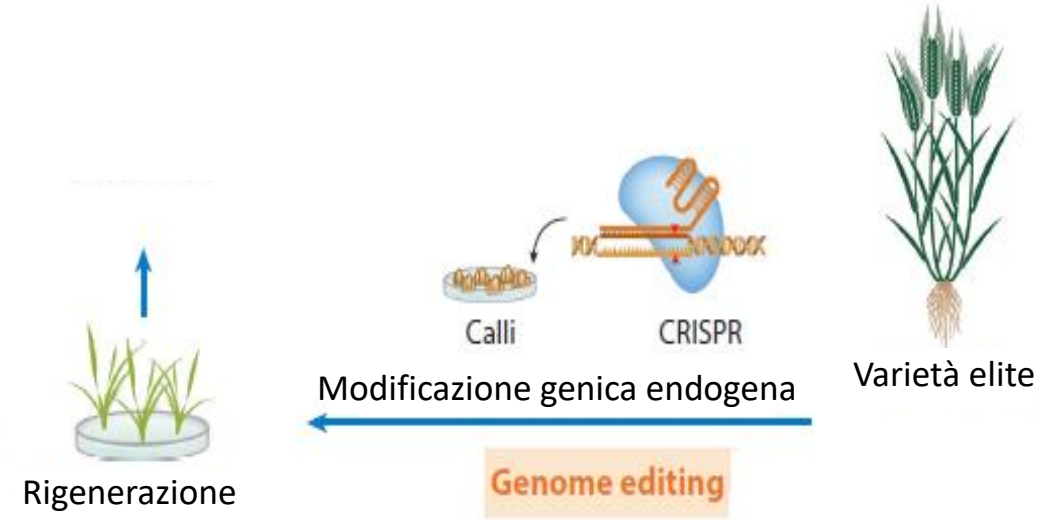


**Miglioramento
genetico**

Miglioramento genetico tradizionale



Nuove tecnologie di breeding





Studio ed identificazione dei geni di suscettibilità in *Castanea sativa* e della loro attivazione a seguito dell'infezione da patogeni



Scopo del lavoro



CRISPR/Cas9 in *Castanea sativa*





Studio ed identificazione dei geni di suscettibilità in *Castanea sativa* e della loro attivazione a seguito dell'infezione da patogeni

- Geni legati alla proliferazione dei patogeni
- Il silenziamento potrebbe interrompere la compatibilità molecolare pianta-patogeno e introdurre una resistenza durevole
- *Mlo1*, *pmr4*, *dmr6*, *dnd1*

Scopo

- Identificazione dei geni S
- Studio dell'espressione dei geni in *C. sativa* e *C. crenata*

Studio dei geni

Identificazione dei geni S sul genoma di *C. mollissima*

Schema sperimentale

Profilo trascrizionale

inoculazione delle piante con i patogeni e campionamento

Estrazione di DNA

Quantificazione del patogeno

Estrazione di RNA

Espressione dei geni S



21 piante inoculate con *Phytophthora cinnamomi*

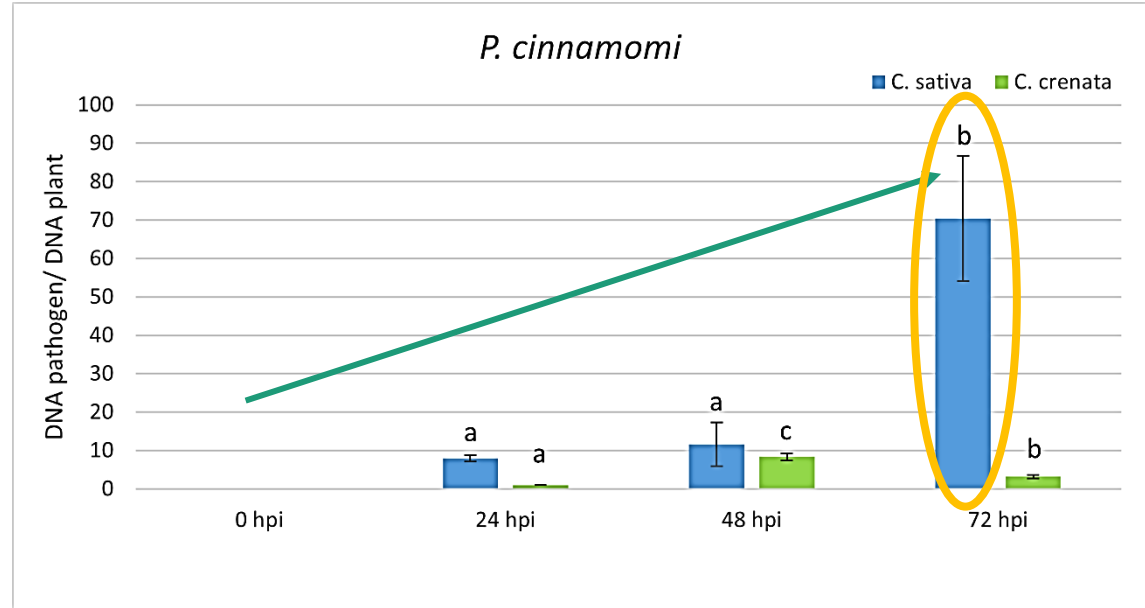
CTRL	3h	6h	12h	24h	48h	72h
------	----	----	-----	-----	-----	-----

21 piante inoculate con *Cryphonectria parasitica*

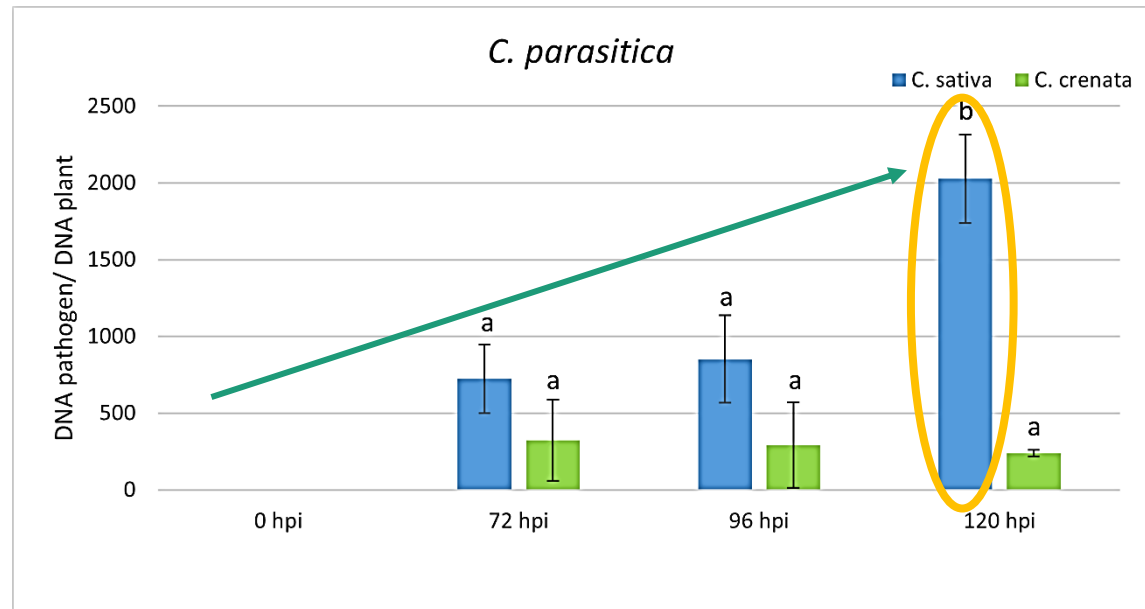
CTRL	12h	24h	48h	72h	96h	120h
------	-----	-----	-----	-----	-----	------



Phytophthora cinnamomi

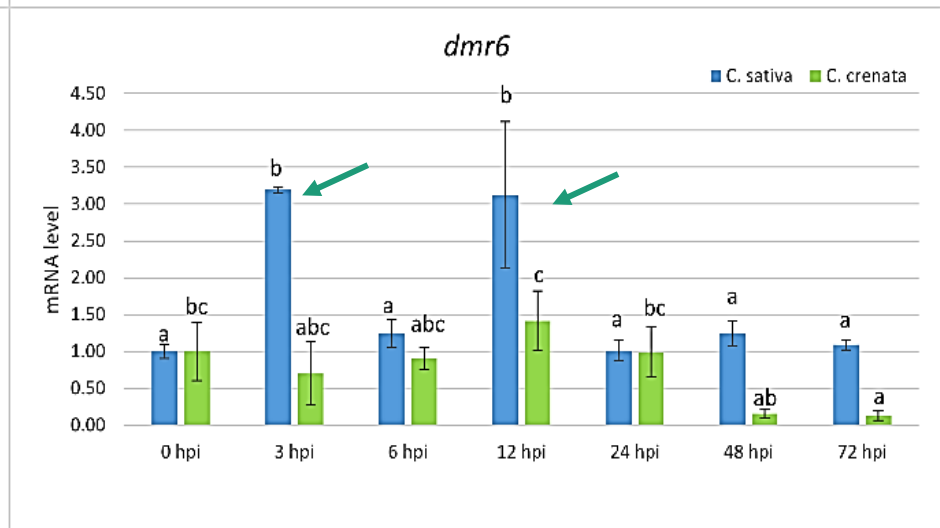
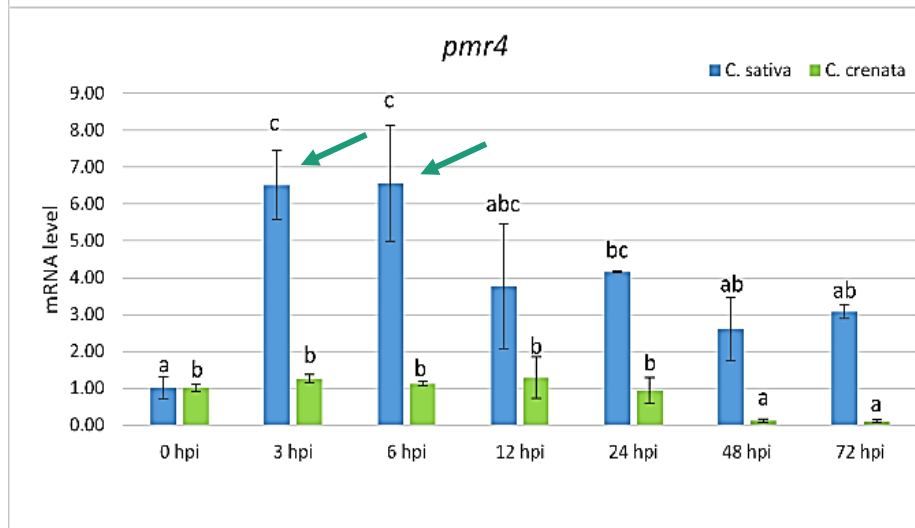
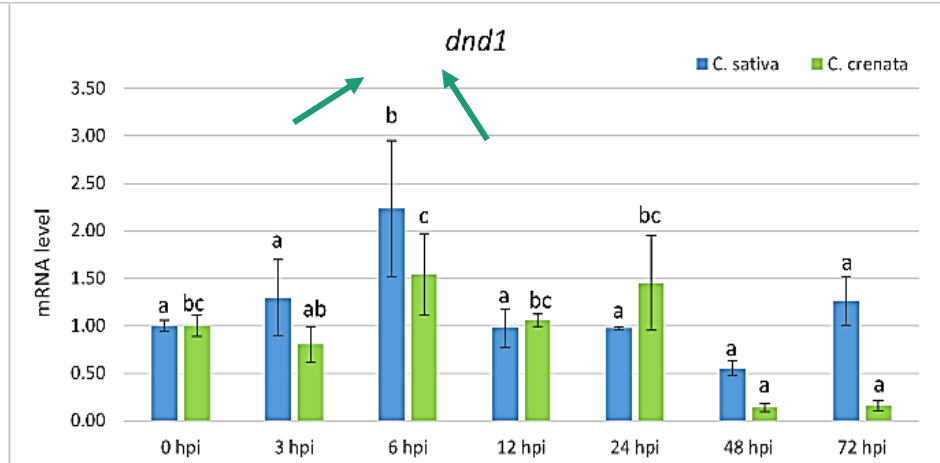
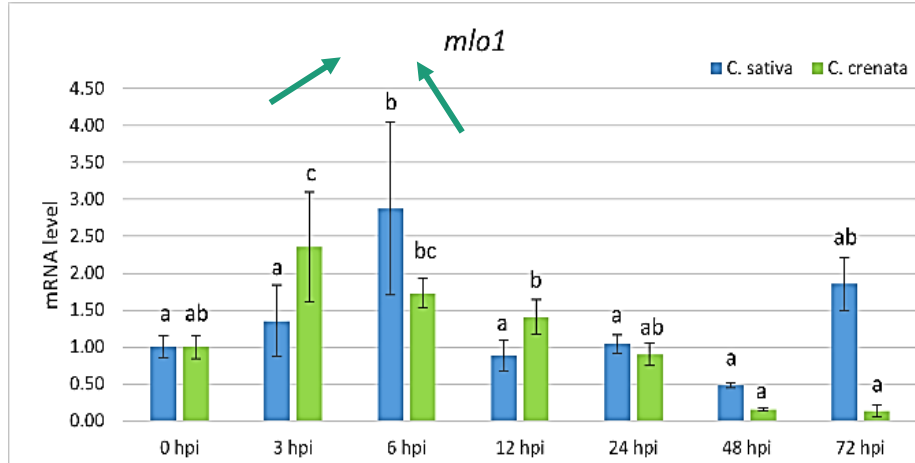


Cryphonectria parasitica



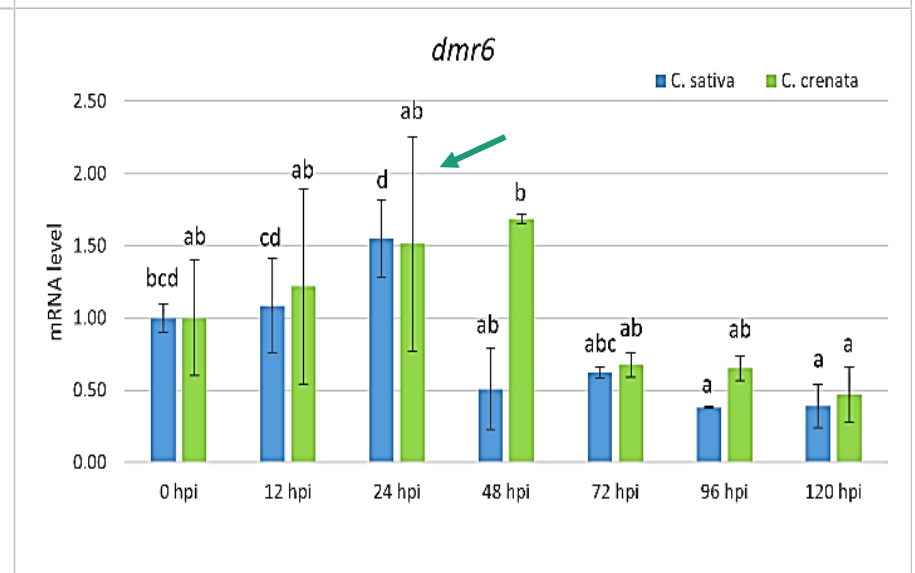
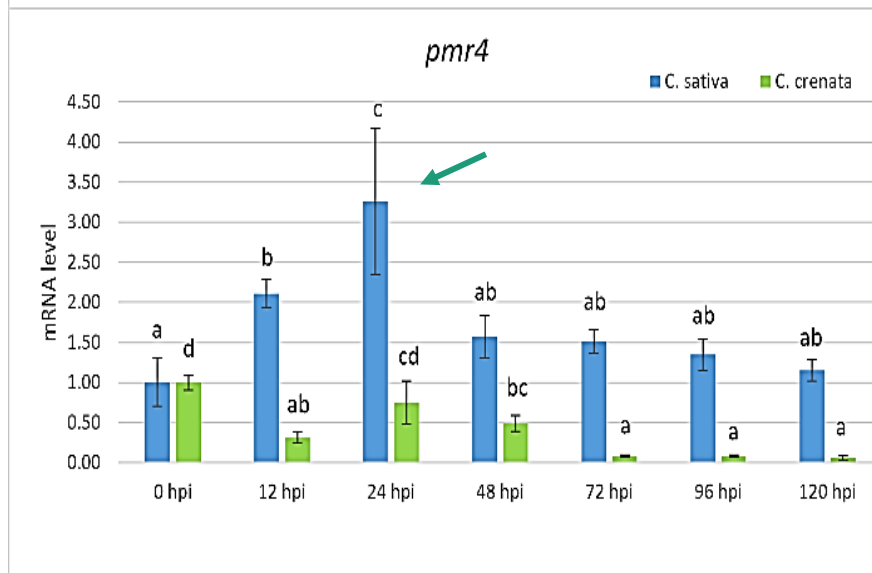
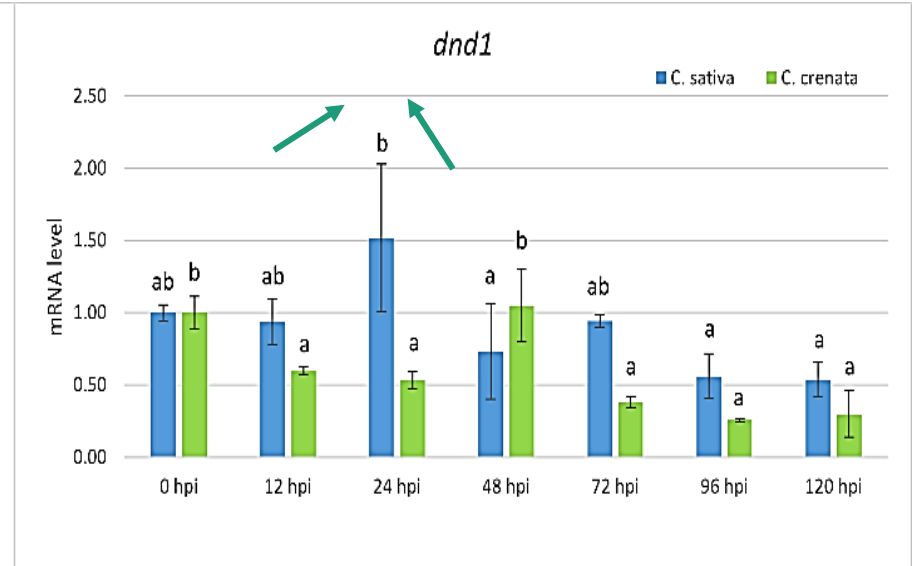
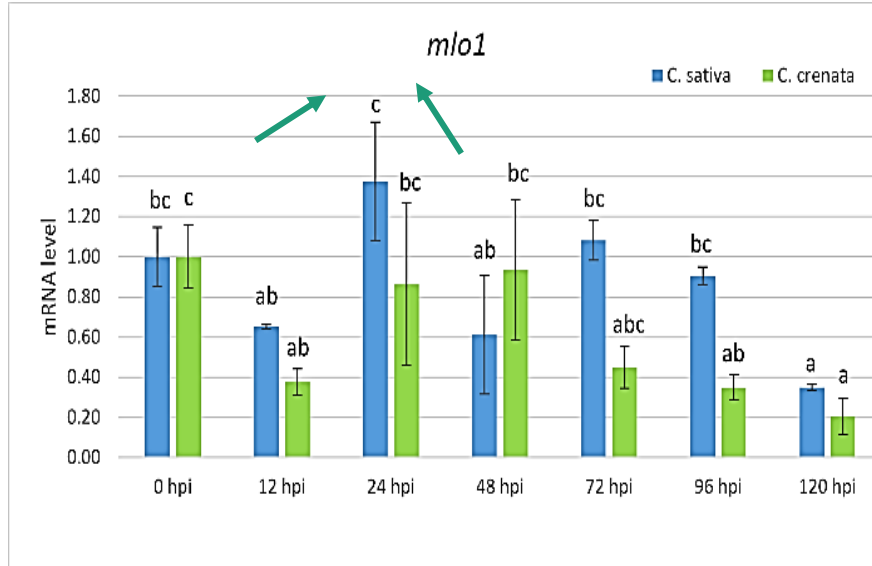
Profilo Trascrizionale

Phytophthora cinnamomi



Profilo Trascrizionale

Cryphonectria parasitica

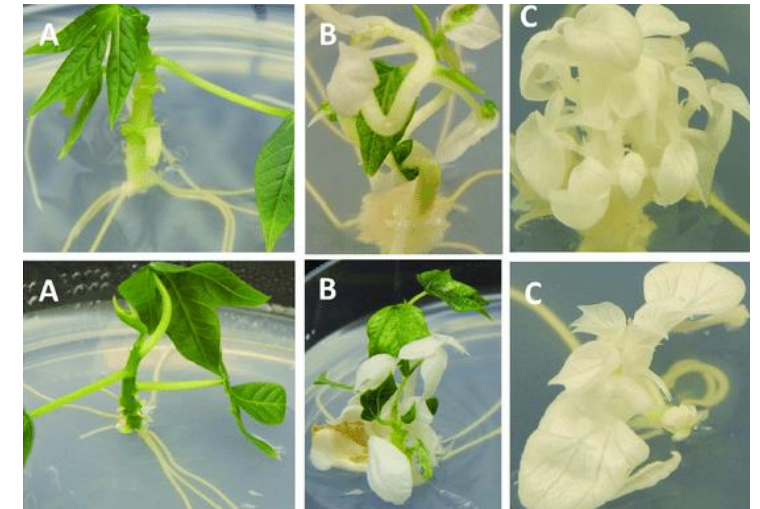
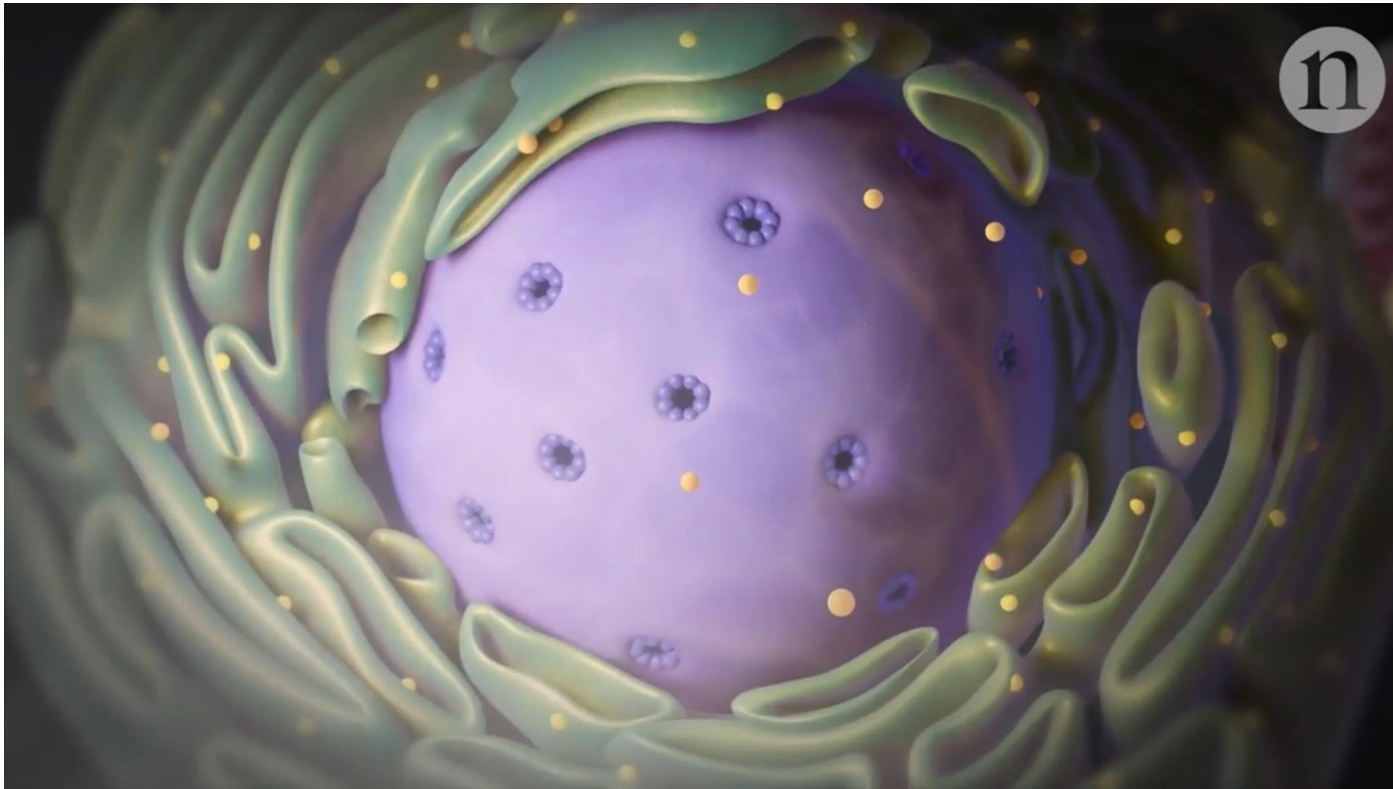


Conclusioni

- **Identificazione dei geni di Suscettibilità in *C. sativa* e *C. crenata***
- **Il gene *Pmr4* è espresso durante l'infezione di entrambi i patogeni in *C. sativa***
- **Il gene *Dmr6* è espresso solo a seguito dell'infezione di *P. cinnamomi* in *C. sativa***
- **Utilizzo dei geni candidati in programmi di genome editing**



CRISPR/Cas9 in *Castanea sativa*



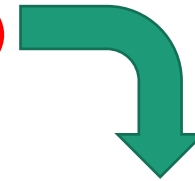
Scopo

- Primo esempio di CRISPR/Cas9 in embrioni somatici di *C. sativa*
- Editing del gene della *fitoene desaturasi (pds)*

**Studio del gene della *pds*,
annotazione dei domini ed analisi
filogenetica**



**Costruzione
del vettore**

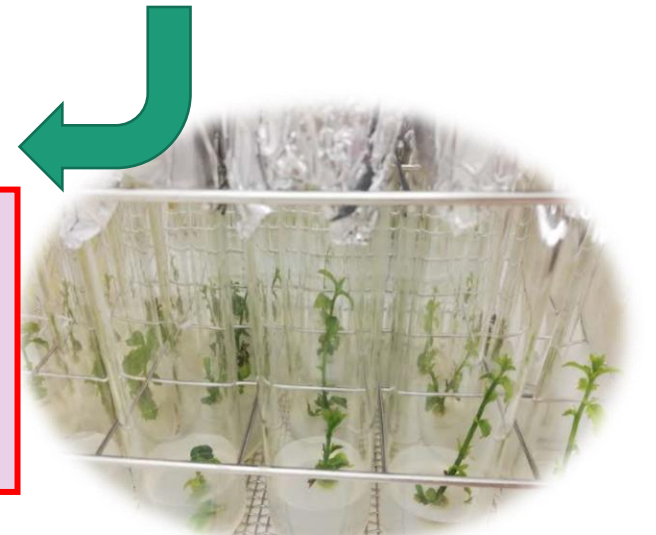


Trasformazione genetica

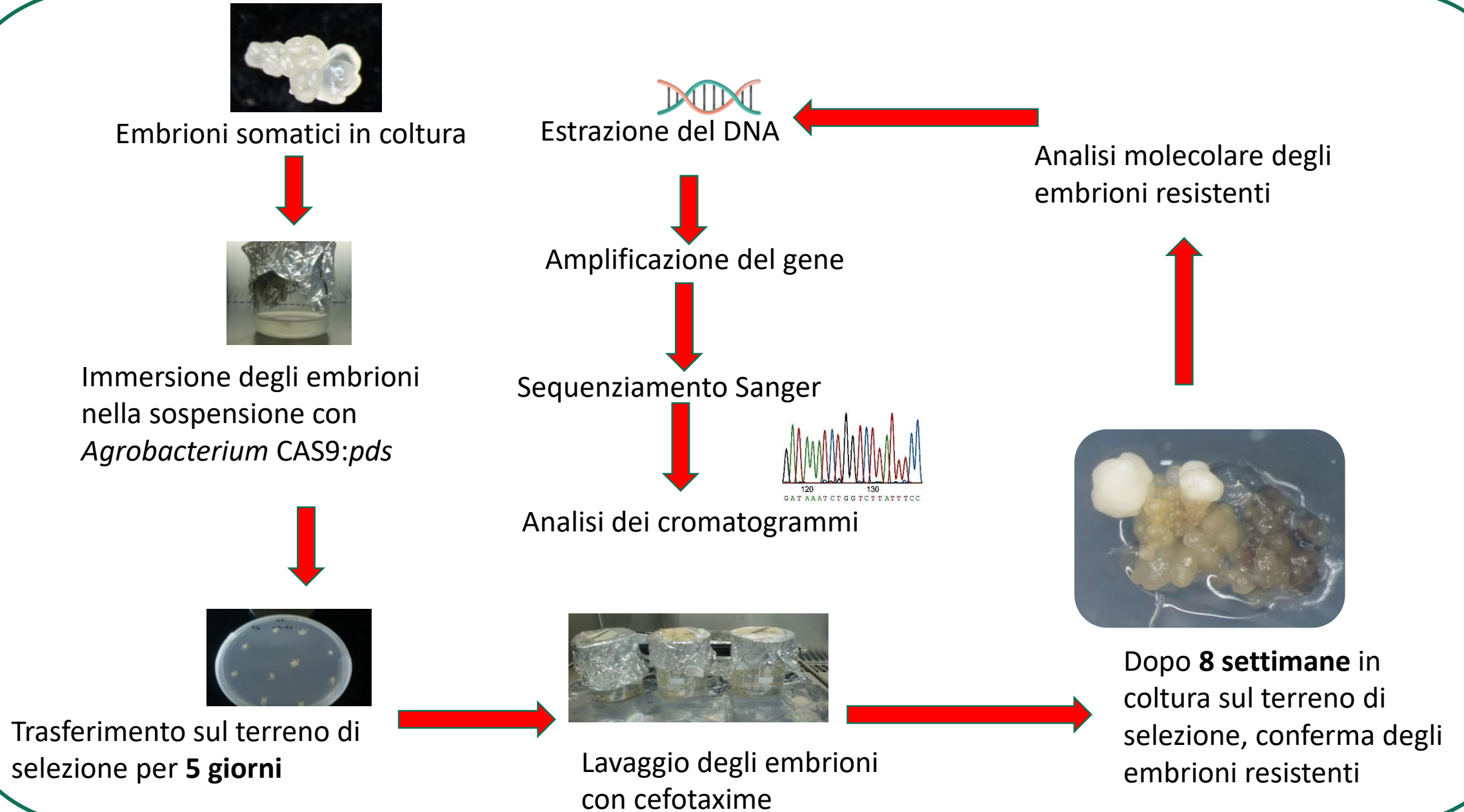
**Valutazione dell'efficienza di
editing**

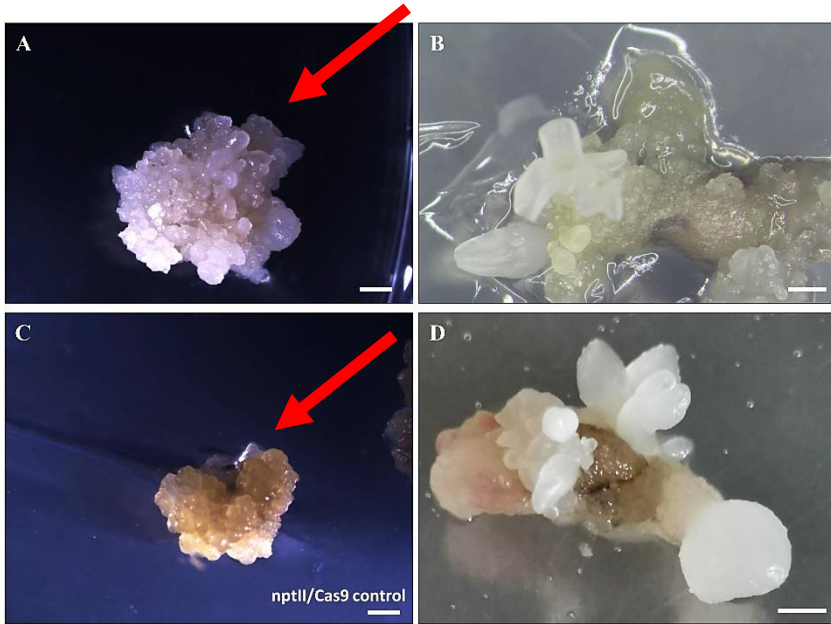


Rigenerazione delle piante

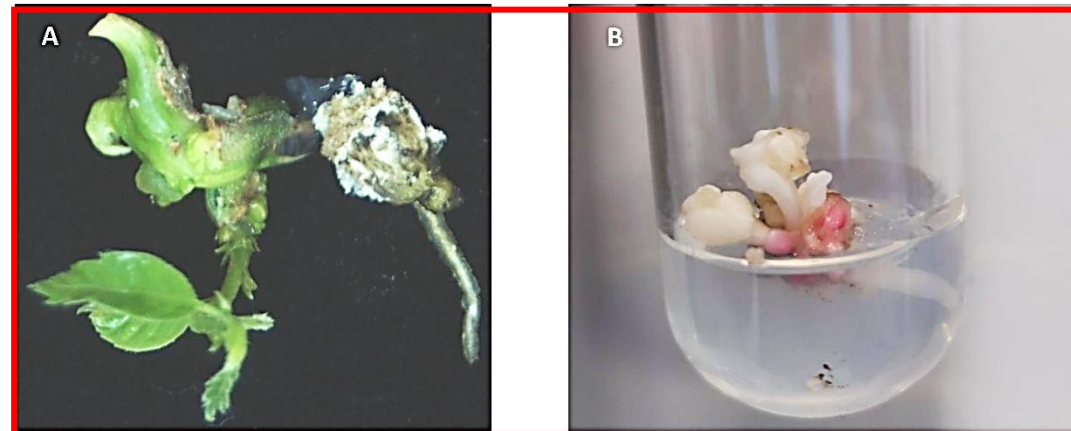


Protocollo di trasformazione





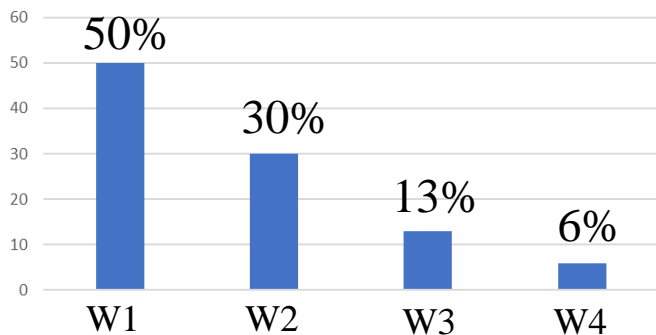
4 Linee embriogeniche W1-W4



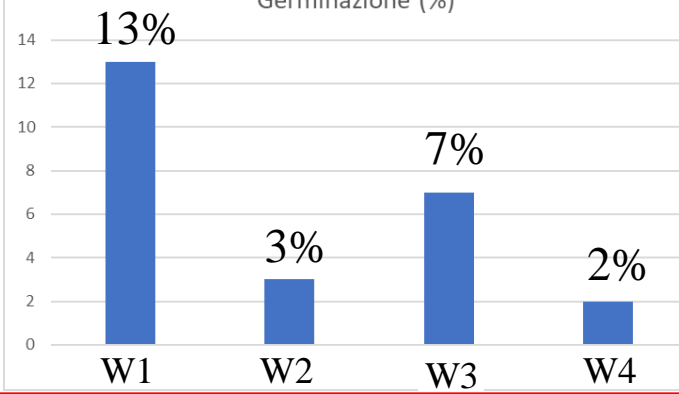
Vernalizzazione

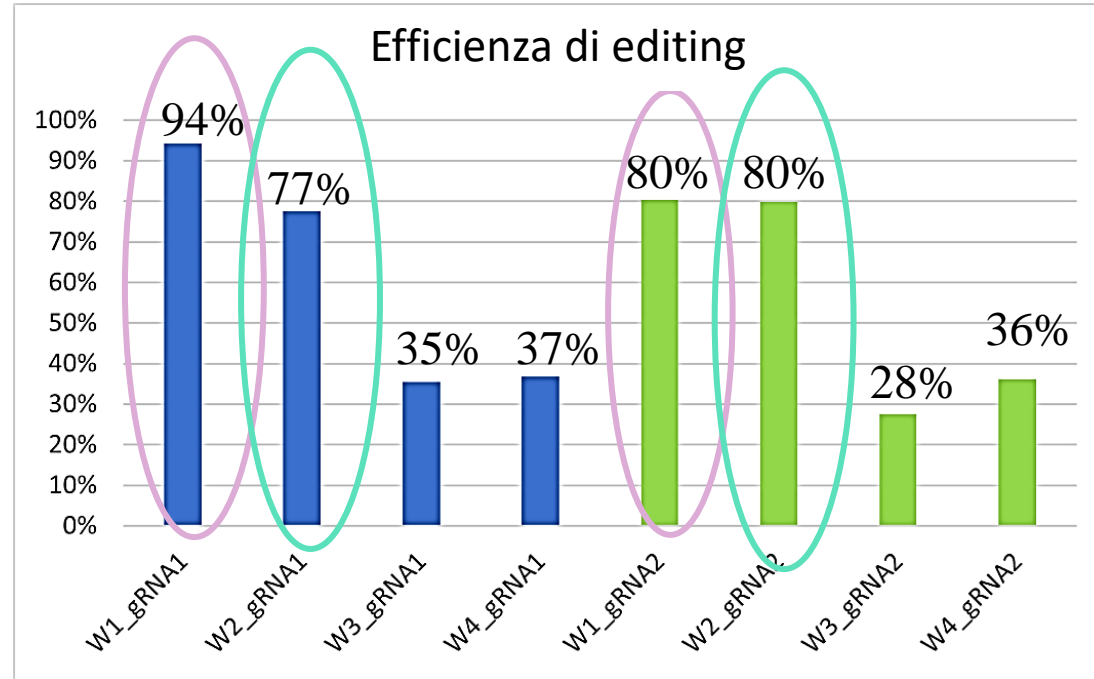
Germinazione

% di embrioni sopravvissuti dopo la vernalizzazione

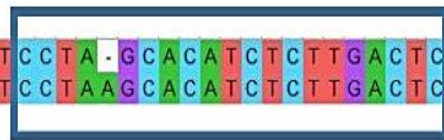


Germinazione (%)



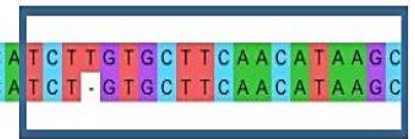


1. NptII/Cas9 control_g1	TGGGACAAAAACAGAGCAGCATGAAAACCTTTCCTCCTA - GCACATCTCTTGACTCCAAATAGTATAGGCTTGTGACCAGCATCTGCCAAATACTTTGC
2. W1_g1	TGGGACAAAAACAGAGCAGCATGAAAACCTTTCCTCCTAAGCACATCTCTTGACTCCAAATAGTATAGGTTTGTGACCAGCATCTGCCAAATACTTTGC



Silenziamento

1. NptII/Cas9 control_g2	GAAAAATGTGGACTACAGTTATTAACCCCAAAACAGTGTAAAGATTTGTATACCTGCTTTCTCATCCACTCTTTAACAGTTAAACCACTTTGTGCTTCAACATAAGC
2. W1_g2	GAAAAATGTGGACTACAGTTATTAACCCCAAAACAGTGTAAAGATTTGTATACCTGCTTTCTCATCCACTCTTTAACAGTTAAACCACTT - GTGCTTCAACATAAGC



Conclusioni

- **Primo esempio di CRISPR/Cas9 in *Castanea sativa***
- **4 linee di embrioni che mostrano il fenotipo albino**
- **La linea W1 ha mostrato la maggiore percentuale di editing (94% per il gRNA1 e 80% per il gRNA2)**
- **Questo lavoro apre la strada a future trasformazioni utilizzando geni interessanti, coinvolti in diversi processi biologici.**





Ricerche in corso e sviluppi futuri

**Isolamento di
protoplasti e
trasfezione con
ribonucleoproteine**



**Messa a punto di un
protocollo di coltura *in vitro*
per le varietà 'Marrone' e
'Garrone rosso'**



**CRISPR/Cas9 con i
geni *pmr4* e *dmr6* e
valutazione dei
trasformanti**





Grazie per l'attenzione!!!

