

Candidata: Teani Angela

Relatore: Prof. Amedeo Alpi

Correlatore: Prof. Pierdomenico Perata

Corso di Laurea: Biotecnologie Vegetali e Microbiche

Titolo della tesi: Realizzazione di costrutti genici per lo studio dell'effetto di geni alterati da inserzioni di T-DNA in *Arabidopsis thaliana*.

Riassunto: La mutagenesi inserzionale è un metodo molto usato nella genomica funzionale anche nel campo della biologia vegetale.

Nell'ambito della caratterizzazione di mutanti inserzionali di *Arabidopsis thaliana* emergono una serie di problematiche, legate alla natura delle inserzioni dei frammenti di T-DNA, che ostacolano l'individuazione univoca dei geni responsabili della mutazione d'interesse e del relativo fenotipo. A questo proposito, nella presente tesi vengono descritti due casi di studio come esempio delle procedure sperimentali che devono essere messe in atto per sviluppare un efficace metodo di studio dei geni responsabili di fenotipi mutati in *Arabidopsis thaliana*. Due mutanti inserzionali isolati per le loro caratteristiche fenotipiche, il mutante *tin* e il mutante *now*, sono stati analizzati andando prima ad individuare i putativi geni correlabili alle due mutazioni e quindi si è messo in atto un progetto di caratterizzazione genotipica sfruttando le tecniche di trasformazione genetica. I geni in questione sono stati clonati e inseriti in costrutti che permettessero la loro espressione all'interno del genoma di piante di *Arabidopsis* wild type. Con questo sistema si è tentato di complementare la mutazione e di determinare quale fosse la porzione genica responsabile del fenotipo mutato.

Analizzando in maniera più dettagliata le caratteristiche presenti in ciascuno dei due mutanti presi in esame, sono emersi una serie di aspetti che hanno reso problematica la loro caratterizzazione genotipica.

Nel caso del mutante *tin* (turanose in sensitive) mostrante capacità di tolleranza al disaccaride turanosio, è stato possibile individuare i geni responsabili dell'alterazione osservata (At3g11260 e At1g48610). Tali geni, oltre a presentare tre inserzioni di T-DNA, sono fusi a causa di una traslocazione cromosomica, ed il gene At3g11260 risulta troncato all'altezza dell'inserzione di T-DNA. A questo proposito si è ipotizzato che la mutazione potesse essere legata all'intero gene chimerico, ed è quindi stato realizzato un costrutto recante il cDNA dell'intero gene (Trascritto chimerico). Tuttavia col primo sistema non è possibile determinare quale delle due porzioni geniche sia effettivamente responsabile. Per questo motivo sono stati realizzati altri due costrutti: uno recante il gene At3g11260 troncato (Trascritto troncato), uno recante At3g11260 fuso con il gene per la green fluorescent protein. Tale strategia è stata intrapresa per verificare se At3g11260 troncato sia responsabile unico della mutazione o se sia necessaria una fusione con un qualsiasi gene per provocarne l'alterazione. In aggiunta è stata presa in considerazione l'eventualità che il responsabile della mutazione fosse At1g48610, per verificare l'ipotesi è stato realizzato anche un costrutto recante il gene Myb75 fuso con l'At1g48610. In tutti i casi i costrutti sono stati realizzati con metodo tradizionale.

Per quanto riguarda il mutante *now* (nowaving), scelto perché mostrante un fenotipo fortemente dissimile dalla pianta wild type sia in aria che in anossia, il gene coinvolto nell'alterazione è At... mutato a causa di un inserzione di T-DNA nelle vicinanze del codone di stop. La strategia di caratterizzazione adottata in questo caso è stata quella di complementare la mutazione realizzando un costrutto recante il cDNA del gene mutato ed in più di verificare se il fenotipo alterato fosse legato alla troncatura provocata dall'inserzione o all'intero gene mutato, a questo scopo sono state trasformate piante knockout per il gene d'interesse al fine di verificare se la trasformazione potesse ristabilire il fenotipo alterato. In questo secondo caso di studio la realizzazione dei costrutti ha visto l'utilizzo della tecnica Gateway®.