



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO
DIPARTIMENTO DI AGROBIOLOGIA ED AGROCHIMICA

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA
BIOTECNOLOGIE VEGETALI XXIII CICLO

**Analisi citogenetica della potenziale instabilità genetica in linee di frumento
transgenico, comparate alla controparte *wild type*, in seguito ad insulti
genotossici con agenti mutageni chimici e fisici.**

BIO/18

Coordinatore: Prof.ssa Stefania Masci

Tutor: Prof. Pasquale Mosesso

Dottoranda: Raffaella Bellacima

INDICE

RIASSUNTO	5
1 INTRODUZIONE	9
1.1 Le biotecnologie vegetali	9
1.1.1 Trasformazione mediata da <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	10
1.1.2 Trasformazione attraverso il metodo biolistico	12
1.1.3 Selezione e rigenerazione	12
1.2 Applicazione dell'ingegneria genetica al frumento	14
1.3 Il frumento	14
1.3.1 Origine ed evoluzione dei genomi di frumento	17
1.4 Vantaggi legati all'impiego delle piante geneticamente modificate	18
1.5 Problematiche connesse all'impiego delle piante geneticamente modificate	20
1.6 L'inserzione del transgene determina una mutazione a carico della sequenza di DNA	23
1.7 Le mutazioni cromosomiche	23
1.7.1 Mutazioni strutturali	24
1.7.1.1 Delezioni	25
1.7.1.2 Duplicazioni	25
1.7.1.3 Inversioni	26
1.7.1.4 Traslocazione	26
1.7.1.5 Effetto di posizione	27
1.7.2 Mutazioni numeriche	28
1.7.2.1 Aneuploidia	28
1.7.2.2 Cambiamenti relativi ad interi assetti cromosomici	28
1.7.3 Mutazioni geniche	30
1.7.4 Tipi di mutazioni	30
1.8 Cause di mutazione	31
1.8.1 Mutazioni spontanee	32
1.8.2 Mutazioni indotte	32
1.8.3 Mutageni fisici	33
1.8.3.1 Le radiazioni ionizzanti	33
1.8.3.2 La radiazione ultravioletta	34
1.8.4 Mutageni chimici	36
1.9 Sistemi di riparazione del DNA nei sistemi biologici	37
1.9.1 Meccanismi per la riparazione del danno a singolo filamento del DNA	37
1.9.1.1 Riparazione per escissione di base	37
1.9.1.2 Riparazione per escissione di nucleotidi	38
1.9.1.3 Mismatch repair	38

1.9.2 Meccanismi per la riparazione del danno a doppio filamento del DNA	39
1.9.2.1 Ricombinazione omologa	40
1.9.2.2 Ricombinazione non omologa	40
1.9.3 La fotoriattivazione	40
1.10 Le aberrazioni cromosomiche	41
1.11 Scopo del lavoro	43
2 MATERIALI E METODI	48
2.1 Linee utilizzate	48
2.2 Crescita dei semi	50
2.3 Sostanze chimiche	50
2.4 Procedure per il trattamento	51
2.4.1 Trattamento con raggi X	51
2.4.2 Trattamento con raggi UV-C	51
2.4.3 Trattamento con gli agenti mutageni chimici	51
2.5 Analisi delle aberrazioni cromosomiche	52
2.5.1 Protocolli sperimentali	52
2.4.2 Fissazione	53
2.4.3 Digestione della parete cellulare e preparazione dei vetrini	54
2.6 Test del micronucleo	55
2.6.1 Protocolli sperimentali	56
2.6.2 Preparazione dei vetrini	57
2.7 Indice mitotico	58
3 RISULTATI	60
3.1 Induzione di aberrazioni cromosomiche	60
3.1.1 Aberrazioni cromosomiche indotte da camptotecina	60
3.1.2 Aberrazioni cromosomiche indotte da etoposide	64
3.1.3 Aberrazioni cromosomiche indotte da raggi X	69
3.1.4 Aberrazioni cromosomiche indotte da raggi UV-C	72
3.2 Analisi dei micronuclei	74
3.2.1 Micronuclei indotti da camptotecina	75
3.2.2 Micronuclei indotti da etoposide	77
3.2.3 Micronuclei indotti da raggi X	79
3.2.4 Micronuclei indotti da raggi UV-C	81
4 DISCUSSIONE	84
5 CONCLUSIONI	88
6 BIBLIOGRAFIA	91

RIASSUNTO

Le piante geneticamente modificate sono organismi in cui il DNA è stato modificato, mediante tecniche di ingegneria genetica, attraverso l'inserzione di geni esogeni, provenienti anche da organismi evolutivamente molto distanti, allo scopo di migliorare particolari caratteristiche quali, ad esempio, resistenza a patogeni, a stress ambientali, aumento della produttività ecc.

Le piante geneticamente modificate costituiscono una grande risorsa per le prospettive economiche e produttive che possono offrire nel futuro, tuttavia, accanto a queste caratteristiche vantaggiose esistono non pochi aspetti potenzialmente negativi correlati alla loro introduzione in agricoltura, nella nostra alimentazione ed alle imprevedibili interazioni a lungo termine con l'ambiente circostante.

Lo scopo del presente studio è stato quello di valutare la potenziale instabilità genetica intesa come maggiore suscettibilità ad accumulare danno genetico (in relazione ad aumentata inaccuratezza o inefficienza nella riparazione del DNA) in linee transgeniche di frumento, comparate alla loro controparte *wild type* in seguito ad insulti genetici con agenti chimici e fisici.

Le sostanze utilizzate per il trattamento di tali linee producono lesioni al DNA attraverso differenti meccanismi d'azione e simulano il tipo di danno potenziale prodotto in natura da agenti esogeni:

-Camptotecina: inibitore catalitico della DNA topoisomerasi I; induce esclusivamente rotture a singolo filamento del DNA;

-Etoposide: inibitore catalitico della DNA topoisomerasi II; induce esclusivamente rotture a doppio filamento del DNA (DSB's);

-Raggi X: agente mutageno fisico; induce per ogni traccia di ionizzazione, rotture a singolo (SSB's) e doppio filamento (DSB's), eterogeneo danno alle basi, siti abasici, legami crociati DNA-DNA e DNA-proteine.

-Raggi UV-C: agente mutageno fisico; induce specificamente dimeri di pirimidina e 6-4 fotoprodotti.

Tali lesioni attivano differenti sistemi di riparazione del DNA che includono la riparazione da escissione dei nucleotidi, il sistema di riparazione delle rotture a singolo filamento del DNA, sistema di riparazione per ricombinazione omologa (HR) e non

omologa (NHEJ). Gli ultimi due sistemi elencati provvedono alla riparazione delle rotture a doppio filamento del DNA nelle differenti fasi del ciclo cellulare.

Un tale approccio è giustificato dal fatto che l'inserzione casuale nel genoma di numerose copie di transgeni interi o frammenti dello stesso riarrangiati o rotti, determinando la presenza nel DNA di sequenze ad elevata omologia, in alcuni casi in stretta prossimità, può creare dei cosiddetti "hotspot di ricombinazione" con potenziali effetti destabilizzanti della molecola stessa. In diversi lavori condotti in piante di tabacco transgenico è stato osservato che le rotture a doppio filamento del DNA, indotte da agenti mutageni come raggi X, mitomicina-C e specifici enzimi di restrizione, localizzate in prossimità di sequenze omologhe ripetute, sono elettivamente riparate per ricombinazione omologa. Ciò indica che le piante possono rispondere ai suddetti "stress" con livelli marcatamente più elevati di ricombinazione omologa indotta, rispetto alle cellule di mammifero. In questo contesto, la rilevanza della formazione delle aberrazioni cromosomiche è legata al ruolo centrale delle rotture a doppio filamento del DNA sulle quali agiscono i processi di riparazione per ricombinazione non omologa e per ricombinazione omologa.

L'analisi delle aberrazioni cromosomiche è stata condotta in seguito a trattamento con gli agenti mutageni selezionati, nelle cellule proliferanti del germoglio dei seguenti sistemi genetici:

-*Triticum aestivum* (cultivar Bobwhite) dal quale, attraverso il metodo biolistico, sono state ottenute due differenti linee transgeniche: la linea denominata PGIP (che esprime la proteina PGIP della parete cellulare del fagiolo che aumenta la resistenza contro la fusariosi) e la linea denominata LMW-GS (caratterizzata dalla sovraespressione di una subunità gluteninica a basso peso molecolare).

-*Triticum durum* (cultivar Svevo), trasformato con *Agrobacterium tumefaciens* per il silenziamento, attraverso il meccanismo dell'"RNA interference", del gene "Starch branching enzyme IIa" coinvolto nella biosintesi dell'amilopectina, allo scopo di aumentare il contenuto di amilosio nell'endosperma.

In aggiunta all'analisi delle aberrazioni cromosomiche, la potenziale instabilità genomica nelle linee di frumento transgeniche è stata valutata introducendo anche l'analisi dei "micronuclei" che permette di rilevare, insieme al danno cromosomico

strutturale (aberrazioni cromosomiche) anche aberrazioni cromosomiche di tipo numerico (perdita cromosomica, non-disgiunzione).

I risultati ottenuti indicano che le frequenze di aberrazioni cromosomiche, nonché le frequenze di micronuclei nelle linee transgeniche e nelle linee di controllo, non sono significativamente differenti. Ciò dimostra una sostanziale stabilità delle linee transgeniche dovuta ad una corretta riparazione delle rotture a doppio filamento indotte, in modo casuale, attraverso le differenti lesioni inflitte al DNA genomico dai diversi agenti mutageni impiegati.

INTRODUZIONE

1 INTRODUZIONE

1.1 LE BIOTECNOLOGIE VEGETALI

Il termine biotecnologia significa letteralmente “tecnica biologica” e viene impiegato per descrivere ogni tecnologia che utilizza organismi viventi (batteri, lieviti, cellule vegetali, cellule animali) per produrre beni e servizi utili all’umanità.

Le tecniche biologiche sono state utilizzate dall’uomo sin dai tempi preistorici, da quando, con il passaggio dalla vita nomade, basata su caccia e pesca, all’agricoltura e all’allevamento, ha iniziato a controllare e modificare direttamente l’ambiente “addomesticando” piante e animali selvatici.

Osservando il fenotipo ed utilizzando i metodi empirici (nei limiti posti dalle leggi naturali), ha sfruttato la variabilità genetica esistente, per selezionare gli individui più interessanti e per operare incroci finalizzati al miglioramento delle caratteristiche qualitative e produttive di organismi vegetali ed animali.

L’uomo, pur non conoscendo i meccanismi biologici responsabili dei processi osservati, ha utilizzato con successo per secoli queste tecniche, definite oggi di “miglioramento genetico tradizionale”.

Negli ultimi anni le biotecnologie costituiscono senz’altro uno degli strumenti che la tecnologia ha a disposizione per migliorare la ricerca in campo agricolo.

In modo coordinato con le metodologie di miglioramento tradizionali, esse contribuiscono allo sviluppo di nuove tecniche in grado di alterare e controllare la crescita e lo sviluppo delle piante.

Uno dei campi di impiego delle biotecnologie consiste appunto nell’introduzione, integrazione ed espressione di geni esogeni nelle cellule vegetali. Da qui nasce il termine “trasformazione” che va inteso come l’introduzione di DNA nel genoma senza passare attraverso trasmissione sessuale.

Il DNA è prima incorporato in una singola cellula del genoma la quale, in condizioni selettive, viene moltiplicata per formare callo indifferenziato da cui può essere formata una pianta adulta mediante processi rigenerativi.

Quindi le biotecnologie in associazione col “breeding” tradizionale sono in grado di ridurre notevolmente i tempi necessari all’ottenimento di nuove varietà con caratteristiche aggiuntive.

Distinguiamo *biotecnologie convenzionali* e *ingegneria genetica*.

Tra le biotecnologie convenzionali, le tecniche maggiormente utilizzate sono la mutagenesi, la micropropagazione, la variabilità somaclonale, le colture di antere, la fusione di protoplasti così come l’ingegneria cromosomica.

L’ingegneria genetica si basa sulla tecnologia del DNA ricombinante aprendo nuove frontiere nel campo del miglioramento genetico delle piante coltivate.

Essa offre attualmente degli strumenti che permettono di spingersi ancora oltre le biotecnologie convenzionali, modificando direttamente il DNA del prodotto per inserire le caratteristiche volute, servendosi di materiale genetico presente in specie assai diverse e superando quindi ogni barriera genetica.

L’organismo così modificato sarà in grado di produrre nuove sostanze o sviluppare nuove funzioni.

La direttiva 2001/18/CE fornisce una definizione di organismo geneticamente modificato che si concentra sulla caratteristica descritta:

“Un organismo, diverso da un essere umano, il cui materiale genetico è stato modificato in modo diverso da quanto avviene in natura con l'accoppiamento e/o la ricombinazione genetica naturale”.

Le metodologie utilizzate per il trasferimento dei geni utili possono essere raggruppate in metodi che utilizzano trasferimento diretto come la via fisica, o che utilizzano batteri naturali del suolo. I più diffusi sono il bombardamento mediante metodo biolistico, la microiniezione, la trasformazione di protoplasti, l’elettroporazione ma due sono quelli maggiormente utilizzati: il metodo biolistico e l’infezione con *Agrobacterium tumefaciens*.

1.1.1 Trasformazione mediata da *Agrobacterium tumefaciens*

A. tumefaciens è un fitopatogeno che trasforma geneticamente le piante con un processo che rientra normalmente nel suo ciclo vitale. Tale trasformazione si risolve nella formazione di tumori del colletto, che interferiscono con la normale crescita della pianta.

La formazione del tumore è dovuta al trasferimento, all'integrazione e all'espressione dei geni di un segmento del DNA plasmidico del batterio, il T-DNA (DNA trasferito), all'interno del genoma della cellula vegetale.

All'inizio del processo infettivo, *A. tumefaciens* si fissa su una cellula vegetale, in corrispondenza di una ferita aperta, spesso alla base del gambo della pianta, richiamato da composti fenolici escreti dalle piante ferite. Tali molecole inducono l'attività dei geni della virulenza (vir) compresi nel plasmidio, i cui prodotti sono indispensabili per la sintesi di una copia a singola elica del T-DNA.

Il T-DNA viene poi trasferito nel nucleo della cellula vegetale, con un meccanismo simile alla coniugazione batterica e si integra nel genoma per ricombinazione illegittima.

Sfruttando questa naturale caratteristica del plasmidio, si può inserire, mediante le tecniche standard di clonaggio, qualsiasi frammento di DNA, all'interno delle due sequenze terminali del T-DNA e trasferire ed integrare stabilmente quest'ultimo nel genoma di una cellula vegetale (Barton et al., 1983).

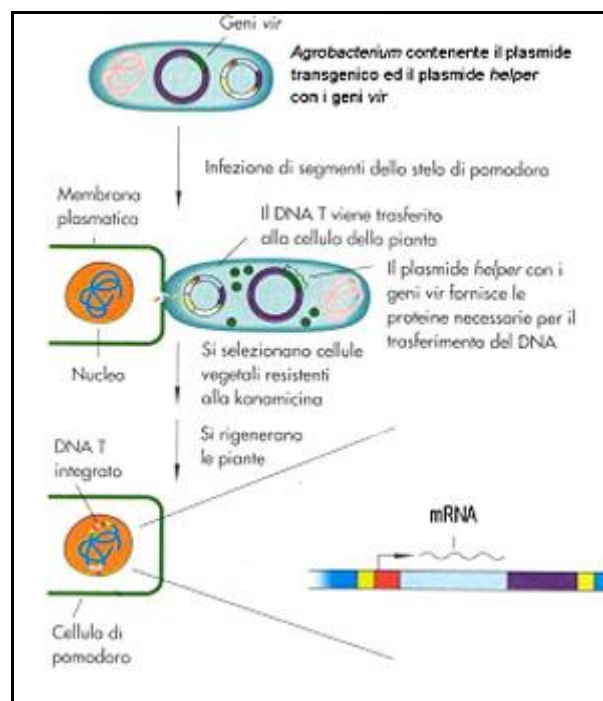


Figura1 Meccanismo d'azione di *Agrobacterium tumefaciens*

1.1.2 Trasformazione attraverso il metodo biolistico

Con il metodo biolistico i tessuti vegetali, vengono bombardati con microproiettili di oro o di tungsteno, ricoperti da molecole di DNA contenenti il gene di interesse.

Queste particelle sono accelerate alla velocità di circa 400,600 m/s con uno speciale dispositivo detto cannone biolistico che impiega la polvere da sparo, l'aria compressa o l'elio per fornire la forza propulsiva. A tale velocità, i proiettili sono in grado di penetrare la parete, la membrana cellulare ed integrare quindi il DNA nel genoma della cellula vegetale (Christou, 1992).

A differenza del metodo che sfrutta *A. tumefaciens*, il metodo biolistico fa uso di un processo fisico per arrivare alla trasformazione, per cui risulta una tecnica molto più versatile ed efficiente, ed inoltre non pone limiti alle dimensioni dei geni inseriti (Alpeter et al., 2005).

Lo svantaggio invece risulta nell'inserimento di blocchi di transgeni contenenti frammenti del transgene riarrangiati o rotti ed in un più probabile silenziamento ed instabilità.

Prove effettuate utilizzando embrioni immaturi in differenti stadi di sviluppo hanno dimostrato che esiste una correlazione tra l'efficienza di trasformazione e l'età della pianta donatrice (Pastori et al., 2001). Utilizzando espianti provenienti da giovani piante, l'efficienza di trasformazione sale dallo 0,7 al 5%.

Studi più recenti sono stati effettuati prendendo in considerazione differenti varietà di frumento ed hanno evidenziato che l'efficienza di trasformazione intra-varietale è del 4% (Rausco-Gaunt, 2001).

1.1.3 Selezione e rigenerazione

Come accennato precedentemente, il processo che porta alla produzione di piante transgeniche si può schematizzare in tre fasi: *trasformazione*, *selezione* e *rigenerazione*.

Il processo di selezione consiste nel monitorare l'avvenuto inserimento del transgene. Questo passaggio è necessario perché l'incorporazione stabile e l'espressione del transgene all'interno di una cellula vegetale, è un evento raro, che interessa solo una piccola frazione delle cellule inizialmente esposte all' *Agrobacterium* o ai microproiettili.

A tal fine si inserisce accanto al transgene, un gene marcatore, come ad esempio un gene che conferisce resistenza ad un agente di selezione. Quando i tessuti vegetali infettati, vengono trasferiti in un terreno che contiene l' agente di selezione (es. erbicida o antibiotico), sopravvivranno solo le cellule vegetali effettivamente trasformate. Questo consente di rilevare l'espressione del DNA estraneo nei tessuti transgenici nei primissimi stadi di sviluppo e rigenerazione delle piante.

Dopo la selezione è sufficiente coltivare i tessuti in presenza di appropriati fattori di crescita e sostanze nutritive per la rigenerazione di un'intera pianta (Barton et al., 1983).

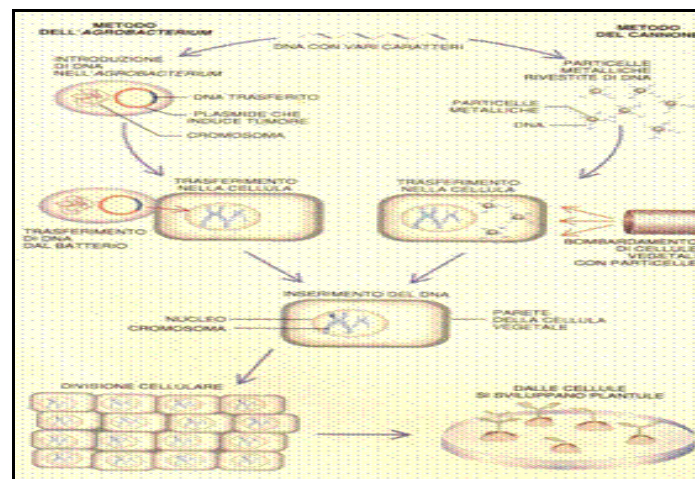


Figura 2 Generazione di piante transgeniche

Una grande attenzione è stata rivolta al miglioramento genetico del frumento in quanto costituisce l'alimento base per la maggior parte della popolazione mondiale.

La necessità di creare varietà più produttive e nutrizionalmente migliori è dettata dall'esigenza di far fronte al sempre maggiore impoverimento del suolo causato dalla crescente desertificazione, dall'utilizzo di coltivazioni intensive senza periodi di riposo e dal crescente aumento della popolazione mondiale.

1.2 APPLICAZIONE DELL' INGEGNERIA GENETICA AL FRUMENTO

Oggi esistono numerosi genotipi di frumento modificati geneticamente, anche se inizialmente la trasformazione di questo cereale aveva presentato numerose difficoltà. Queste erano dovute a diversi fattori quali: bassa efficienza di trasformazione, instabile introgressione del transgene, difficoltà all'infezione da *Agrobacterium* che colpisce preferenzialmente le dicotiledoni, caratteristiche del genoma stesso che essendo poliploide, quindi molto complesso, interferisce con le tecnologie del DNA ricombinante.

Nonostante questo, nell'ultimo ventennio si sono ottenuti diversi esempi di piante di frumento geneticamente modificate.

Le prime piante transgeniche sono state prodotte utilizzando il metodo biolistico (Week et al., 1993) ed oggi sono presenti numerosi genotipi in cui sono stati inseriti geni che conferiscono resistenza a patogeni fungini, virali o batterici, aumento delle risposte di difesa della pianta, maschiosterilità ecc.

Negli ultimi anni anche la trasformazione mediante *Agrobacterium* ha portato a buoni risultati, con produzione di diversi esempi di frumento transgenico. Il primo esperimento è stato condotto da Cheg et al. nel 1997.

Una grossa differenza tra i due metodi di trasformazione è che, nel 60% delle linee prodotte con *Agrobacterium* il transgene si trova in singola copia nel genoma, mentre con il bombardamento biolistico questa percentuale scende sotto il 10% ed aumenta invece la percentuale di transgeni che si trovano inseriti a blocchi (Wu et al., 2003, Shewry et al., 2005).

1.3 IL FRUMENTO

Il frumento (*Triticum spp.*) ha avuto il suo centro di origine e differenziazione nella zona del Medio Oriente, compresa tra la costa del Mediterraneo e la pianura del Tigri e dell'Eufrate ed oggi è la specie più coltivata al mondo.

E' una delle prime specie domesticate, infatti da studi effettuati su cariossidi ritrovate durante scavi archeologici, è stato riscontrato che le prime coltivazioni risalgono a circa 10000 anni fa.

Il frumento, come altri cereali, ha svolto un ruolo fondamentale nello sviluppo delle prime civiltà indoeuropee, già in epoca preistorica, in Italia ne erano coltivati diversi tipi, e poi, dal periodo pre-romano, costituì un importante fattore di sviluppo socio-economico.

E' il prodotto più consumato al mondo, circa il 65% viene utilizzato per l'alimentazione umana, il 21% per quella animale, l'8% come semente ed il restante 6% per altri usi tra cui quello industriale (Orth et al., 1988).

Il motivo dell'ampio utilizzo del frumento consiste nel buon profilo nutrizionale, nella facilità di conservazione e trasporto delle cariossidi e nella grande versatilità degli impasti. La sua importanza alimentare dipende dal fatto che costituisce la principale fonte di carboidrati nell'alimentazione umana, infatti la cariosside è composta per l'80% da amido ed inoltre contiene fibre, proteine, vitamine e minerali e grazie alla sua peculiare componente, il glutine, permette la produzione di pane, pasta, biscotti ecc.

Le condizioni ottimali di crescita del frumento sono quelle presenti a latitudini comprese tra i 30° e 60° N e i 27° e i 40° S, la temperatura ideale è di circa 25°C, con una temperatura minima di 3-4 °C ed una massima di 30-32°C. Si adatta bene anche a differenti gradi di umidità, anche se la maggior parte delle coltivazioni avvengono in zone in cui la media delle precipitazioni annue si aggira intorno ai 375-875 mm di pioggia.

I frumenti attualmente coltivati appartengono in larga parte a specie tetraploidi ed esaploidi rappresentate rispettivamente da frumenti duri (*T. durum*,) e teneri (*T. aestivum*,).

Il frumento duro è coltivato nei paesi mediterranei (Italia, Francia, Grecia, stati iberici), mentre nel resto del mondo viene coltivato quasi esclusivamente negli Stati Uniti, in Australia ed in alcune zone della Russia, in quanto necessita di particolari condizioni di crescita caratterizzate da climi caldi e secchi.

Il frumento duro è utilizzato prevalentemente per la produzione di pasta (di cui l'Italia è il primo produttore mondiale) e di pane, specialmente in alcune regioni dell'Italia meridionale.

Il frumento tenero, invece, presenta una coltivazione più largamente diffusa su scala mondiale, rappresentando il 95% della produzione totale di frumento (Dick e Matsuo, 1988).

La grande adattabilità, del frumento, dovuta soprattutto alla condizione allopoliploide, ne ha consentito la diffusione ad areali molto ampi e diversificati.

Inizialmente, la diffusione in diversi ambienti e condizioni e la selezione da parte dell'uomo contribuirono alla creazione di razze locali di frumento: popolazioni geneticamente eterogenee, ben adattate alle condizioni ambientali nelle quali si sono selezionate.

Grazie alla scoperta delle leggi che regolano l'ereditarietà dei caratteri, la variabilità genetica, presente all'interno delle razze locali, venne sempre più utilizzata in programmi di miglioramento genetico, basati essenzialmente sulla ibridazione intra ed inter-specifica. Questo però ha comportato una prolungata pressione selettiva e la diffusione su scala mondiale di un numero relativamente limitato di varietà, molto simili tra loro, ha fortemente ristretto la base genetica disponibile per ulteriori interventi migliorativi.

Gli effetti dell'erosione genetica che ne è scaturita sono particolarmente evidenti oggi, in coincidenza con un cambiamento dei criteri che guidano le politiche agricole, non più rivolti, almeno nei paesi sviluppati, al solo aumento delle produzioni, ma anche alle elevate qualità nutrizionali e tecnologiche degli alimenti e a metodi di produzione ecocompatibili. Tra gli effetti più evidenti della riduzione della variabilità genetica si assiste ad una maggiore suscettibilità ai patogeni e alle variazioni delle condizioni ambientali delle specie coltivate.

Sebbene esistano nuovi strumenti (l'ingegneria genetica) per aumentare la variabilità genetica delle specie coltivate utilizzando anche geni provenienti da specie filogeneticamente distanti, esistono ancora molti fattori limitanti, tra cui la complessità genetica del frumento e, in generale, la forte opposizione dell'opinione pubblica nei confronti della commercializzazione di sementi transgeniche.

1.3.1 Origine ed evoluzione dei genomi di frumento

Il comune frumento tenero esaploide (*T. aestivum* L.) e il frumento duro tetraploide (*T. durum* L.) appartengono al genere *Triticum*, sottotribù delle *Triticinae*, tribù delle *Triticeae*, famiglia delle *Poaceae* (*Gramineae*).

Kihara (1919) e Sax (1922) dimostrarono l'appartenenza di tutte le *Triticinae* ad un ampio gruppo avente numero cromosomico di base $x=7$.

Sulla base di tale evidenza le *Triticinae* vennero suddivise, in base al diverso livello di ploidia, in diploidi ($2n=2x=14$), tetraploidi ($2n=4x=28$) ed esaploidi ($2n=6x=42$). In seguito ad ibridazione spontanea tra un *Triticum* diploide con genoma A ed una specie donatrice del genoma B, si formarono i progenitori allotetraploidi degli attuali frumenti duri (Kihara, 1924). Successivamente, e con analoghi meccanismi, l'ibridazione del *Triticum* tetraploide con una specie diploide donatrice del genoma D portò alla formazione dei *Triticum* esaploidi, progenitori dell'attuale frumento tenero.

Ciascun cromosoma di un dato genoma (es. A) ha un suo “corrispondente” nell'altro (B) o negli altri (BD) genomi, definito “omeologo” (parzialmente omologo). Dato il numero cromosomico di base 7, comune ai diversi genomi, esistono 7 gruppi di omeologia, ovverosia 7 gruppi di cromosomi omeologhi. Ciò è stato inizialmente dimostrato da evidenze di tipo citogenetico (Sears 1952, 1954, 1966) e, in particolare, dalla possibilità di creare e mantenere stabilmente linee nullitetrasomiche in cui, la mancanza di una coppia cromosomica è funzionalmente “compensata” da una extra dose di un'altra dello stesso gruppo. Inoltre, la creazione di linee di addizione e di sostituzione nel genoma di frumento di singoli cromosomi o bracci cromosomici provenienti da genomi di specie affini, ha permesso di dimostrare che relazioni di omeologia esistono anche tra i cromosomi dei diversi genomi presenti negli allopoliploidi coltivati e quelli delle altre *Triticinae* (Feldman et al., 1981).

Numerosi studi (es. Feldman et al., 1995 e Zhang, 2002) hanno permesso di individuare con sempre maggiore precisione le specie potenzialmente candidate come donatrici dei diversi genomi dei frumenti poliploidi coltivati. In particolare, il *T. urartu* ($2n=2x=14$) e l' *Ae. squarrosa* (= *Ae. tauschii*, $2n=2x=14$) sono largamente accettati come donatori rispettivamente dei genomi A e D. Il donatore del genoma B sembra appartenere alla sezione *Sitopsis* del genere *Aegilops*. A questa sezione afferiscono le quattro specie, *Ae.*

speltoides, *Ae. bicornis*, *Ae. longissima* e *Ae. searsii*, il cui genoma è risultato molto simile all'attuale B dei frumenti poliploidi.

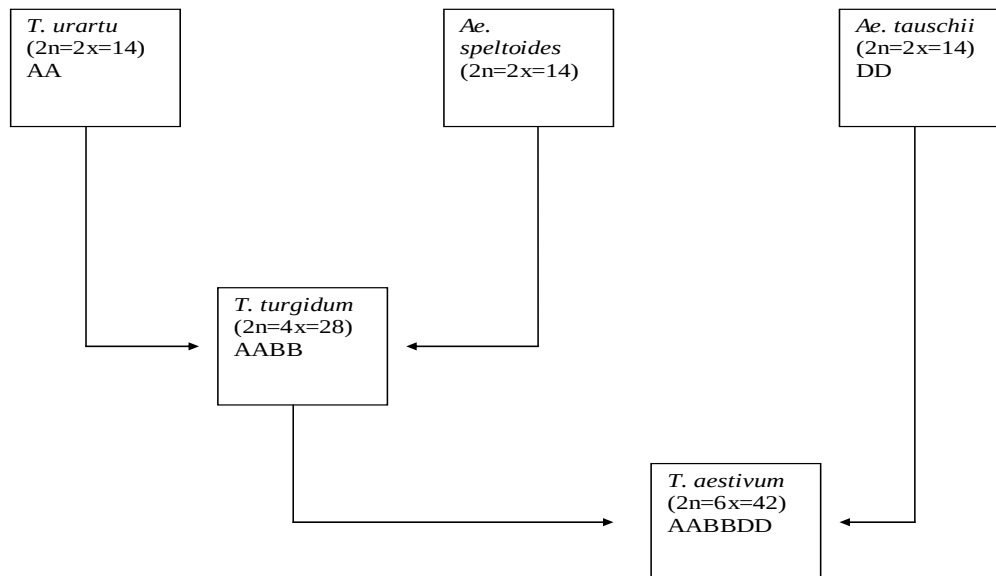


Figura 3 Evoluzione del genoma di frumento.

1.4 VANTAGGI LEGATI ALL’IMPIEGO DELLE PIANTE GENETICAMENTE MODIFICATE

L'utilizzo delle nuove biotecnologie ha coinvolto inizialmente settori come la medicina e la produzione di farmaci (per esempio l’insulina, l’interferone, il vaccino per l’epatite B sono prodotti da microrganismi geneticamente modificati) per poi passare ad altri settori come quello agricolo ed alimentare, in cui ha consentito di introdurre importanti vantaggi.

In **campo agricolo** l’impiego delle piante transgeniche mira all’ottenimento di piante che esprimano “caratteristiche nuove” quali:

- resistenza ai patogeni ed ai parassiti* (virus, batteri, insetti) per diminuire l'uso di pesticidi e combattere malattie difficili da controllare con i mezzi chimici;
- resistenza a stress ambientali* (tolleranza alla siccità, al freddo, alla salinità) per proteggere i raccolti e per estendere la coltivazione a quelle terre, cosiddette "marginali", attualmente non utilizzabili;
- tolleranza agli erbicidi* per consentire l'uso di quelli non selettivi;
- aumento della produttività*, modificando per esempio la naturale regolazione della crescita.

Nel **campo alimentare** le biotecnologie cercano di ottenere:

- miglioramento delle caratteristiche nutrizionali dei cibi* (per esempio elevare il contenuto di aminoacidi essenziali, modificare il contenuto lipidico ecc.);
- aumento della conservabilità dei prodotti*, ottenuta rallentando il processo di maturazione;
- miglioramento delle caratteristiche organolettiche* (per evitare, ad esempio, l'imbrunimento dei chicchi di uva passa ecc.).

Le piante transgeniche, pur costituendo un traguardo molto importante per la scienza e per le prospettive che possono offrire per il futuro, hanno suscitato e continuano a farlo, molte polemiche, soprattutto per quello che riguarda le implicazioni ambientali, economiche, sociali, sanitarie, connesse alla loro introduzione in agricoltura e soprattutto nella nostra alimentazione.

A tale proposito esistono delle normative che impongono uno studio scrupoloso sugli alimenti derivanti da OGM, per tutelarne la sicurezza, basate sul principio della "*Sostanziale Equivalenza*" introdotto dall'OECD. Quest'ultimo cita che, se si può dimostrare che un prodotto alimentare geneticamente modificato è essenzialmente equivalente nella composizione ad un prodotto esistente, allora può essere considerato sicuro quanto il suo equivalente convenzionale (www.oecd.org).

Ad oggi, non esistono prove scientifiche che certifichino rischi per la salute in seguito al consumo di tali alimenti (www.who.org) anche se, non è stato dimostrato scientificamente nemmeno il contrario.

1.5 PROBLEMATICHE CONNESSE ALL'IMPIEGO DELLE PIANTE GENETICAMENTE MODIFICATE

La pianta geneticamente modificata (PGM) si distingue da una pianta tradizionale per la presenza di nuovi tratti genetici provenienti anche da organismi evolutivamente distanti (Wolfenbarger et al., 2000) inseriti nel suo genoma mediante tecniche di ingegneria genetica.

I potenziali impatti e l'entità delle conseguenze di questi ultimi dipenderanno dalla pianta modificata, dai nuovi fenotipi ottenuti, dalla durata, entità e sito di rilascio, dalla possibilità di sopravvivenza nell'ambiente e dalle possibili interazioni tra la PGM e tutti gli elementi della biosfera (Snow et al., 1997).

Tali impatti possono agire su scala microscopica, a livello di interazioni genetiche, e su scala macroscopica, attraverso le interazioni delle piante geneticamente modificate con l'ambiente agricolo e il resto della biosfera.

Non esistono prove in letteratura che tali eventi si siano mai realizzati ed è da sottolineare comunque la scarsità di dati attualmente disponibili su tali argomenti.

Una delle problematiche legate all'utilizzo di piante transgeniche è che, su **scala microscopica**, potrebbe accadere che il transgene si trasferisca ad altre popolazioni attraverso flusso genico o trasferimento genetico orizzontale.

Per **"flusso genico"** si intende l'introggressione di geni all'interno di un pool genico di una popolazione provenienti da una o più popolazioni.

Può avvenire solo tra organismi sessualmente compatibili (Dale. et al., 1996) e si può, quindi, verificare tra una pianta geneticamente modificata e una specie affine, selvatica o coltivata.

Per le piante il flusso genico è legato alla diffusione del polline, la probabilità che questo fenomeno si realizzi, nel caso di coltivazioni in campo aperto, non può mai essere esclusa del tutto. L'incrocio tra specie coltivate e specie sessualmente compatibili selvatiche o coltivate è un fenomeno naturale in agricoltura e molto spesso, infatti, le piante di una coltivazione si incrociano con piante di campi limitrofi creando nuovi ibridi.

La diffusione degli ibridi GM potrebbe avere come conseguenza l'alterazione degli equilibri preesistenti nell'ecosistema in cui avviene il rilascio e dipende dalla natura del gene inserito.

Il **“trasferimento genico orizzontale”** è un fenomeno attraverso il quale il transgene si trasferisce ad altri individui nei quali poi ha l'opportunità di esprimersi.

E' tipico dei batteri e consiste nel trasferimento occasionale di geni anche tra organismi molto diversi (Tepfer, 1993; Droge, 1998) tramite fenomeni di coniugazione, trasformazione e trasduzione.

Il trasferimento genetico orizzontale tra pianta e batterio ha una frequenza bassissima (2×10^{-17}), perché dipende dalla realizzazione simultanea di diversi eventi.

Più probabile è il trasferimento di tratti genetici tra piante geneticamente modificate che contengono geni virali e virus vegetali, in quanto il virus si integra nel genoma ospite e nel momento dell'escissione potrebbe portare con sé una frazione del DNA in cui è stato inserito.

È anche possibile che venga trasferito ad altri organismi il *marker* del transgene e, nel caso in cui sia costituito da un gene che conferisce la resistenza agli antibiotici, potrebbe verificarsi un aumento della diffusione in natura di tale resistenza, fenomeno già diffuso in ambito sanitario e che costituisce uno dei grossi problemi connessi all'utilizzo delle piante geneticamente modificate.

Su **scala macroscopica** le interazioni che possono avvenire tra una pianta e l'ambiente circostante sono numerose, possono dipendere dall'interazione di una qualsiasi componente della pianta (foglie, seme, ecc.) con il resto della biosfera e sono anche strettamente legate al carattere fenotipico determinato dal transgene inserito nella pianta stessa.

- Nella resistenza ad insetti patogeni le principali preoccupazioni legate alle piante transgeniche di questo tipo sono relative sia ai danni potenziali che la proteina può arrecare agli insetti non bersaglio, sia all'insorgenza di resistenza alla tossina nelle popolazioni degli insetti bersaglio.

- Le piante transgeniche tolleranti agli erbicidi determinano dei cambiamenti nei tempi di utilizzo di queste sostanze. Ad esempio, grazie al fatto che le colture sono resistenti, è possibile ritardare l'epoca dei trattamenti in campo con erbicidi. Se da un lato ciò comporta un utilizzo dell'erbicida limitato nel tempo, e soprattutto una diminuzione nella quantità di erbicida, dall'altro potrebbe causare notevoli danni all'ambiente naturale circostante che verrebbe contaminato dai residui degli erbicidi utilizzati in un periodo più tardivo e di massima crescita delle piante (Johnson e Hope 2000). Un utilizzo tardivo dell'erbicida potrebbe anche causare un maggiore accumulo dell'erbicida stesso nel prodotto finale destinato al consumo.

Il cambiamento delle pratiche agricole, in generale, determina inoltre un cambiamento nell'equilibrio dell'agroecosistema le cui conseguenze sono abbastanza imprevedibili, anche se non necessariamente negative.

- Le piante transgeniche resistenti ai virus esprimono geni di origine virale. La strategia prevede sia il trasferimento di geni codificanti per delle proteine (i più utilizzati sono quelli per le proteine capsidiche) sia di geni che comportano l'espressione di RNA virali.

I potenziali impatti ecologici associati alla presenza di RNA virale in una pianta possono verificarsi mediante tre meccanismi:

1. il *sinergismo*, per cui un virus o una proteina virale espressa dalla pianta può complementare gli effetti dannosi di un altro virus, aggravandone i sintomi;
2. l'*incapsidazione eterologa*, che causa l'incapsidazione degli RNA di un virus con la proteina capsidica di un altro virus, presente all'interno della cellula infettata
3. la *ricombinazione*, con la quale può avvenire lo scambio tra materiale genetico virale e il transgene della pianta generando nuovi virus chimerici con nuove potenzialità infettive (Falk et al., 1994);

Mentre i primi due meccanismi possono manifestarsi solo quando la pianta risulta infettata da un virus, il meccanismo della ricombinazione comporta uno scambio genetico tra pianta e virus e può stabilizzarsi nel tempo determinando impatti di maggior portata.

I potenziali impatti derivanti da questi meccanismi e in particolare dalla ricombinazione, includono l'aumento dello spettro d'ospite del virus, modificazioni a livello della virulenza, cambiamenti nella trasmissione e tutti i cambiamenti che potrebbero conferire un vantaggio selettivo per la diffusione del virus ricombinante (Power A., 2000)

- Le piante transgeniche resistenti ai funghi patogeni producono enzimi idrolitici per la degradazione della parete cellulare dei funghi (Snow e Palma, 1997) o di altre tipologie di enzimi in grado di distruggere le cellule del parassita, oppure di un transgene in grado di attivare nella pianta delle “risposte multiple di difesa” al momento dell'infezione. In questi casi possano essere ipotizzati impatti negativi su popolazioni fungine non patogeniche che svolgono ruoli importanti nell'ecosistema.

1.6 L'INSERZIONE DEL TRANSGENE DETERMINA UNA “MUTAZIONE” A CARICO DELLA SEQUENZA DI DNA

L'ingegneria genetica che sta alla base della trasformazione delle piante comporta, come detto, l'inserzione di un tratto di DNA esogeno, proveniente da specie evolutivamente anche molto lontane, all'interno del genoma ospite.

La modificazione della sequenza del DNA rispetto a quella originaria, costituisce, per definizione, una *mutazione* e, in quanto tale, potrebbe indurre modificazioni sia sulla struttura che sulla stabilità del DNA.

Le mutazioni possono essere classificate in cromosomiche e geniche e verranno descritte nei paragrafi successivi.

1.7 LE MUTAZIONI CROMOSOMICHE

Le cellule di ogni organismo possiedono lo stesso numero di cromosomi, caratteristico di ogni specie e la stessa organizzazione e numero di geni sui cromosomi di tutte le cellule.

Cambiamenti nella struttura normale del cromosoma o del numero cromosomico, vengono chiamate mutazioni cromosomiche (Gowen, 1928)

Queste possono verificarsi spontaneamente o essere indotte sperimentalmente mediante agenti mutageni chimici o fisici.

1.7.1 Mutazioni strutturali

Le mutazioni cromosomiche strutturali comportano modificazioni nella sequenza del DNA lungo l'asse del cromosoma in seguito ad eventi di rottura del cromosoma stesso. Quando questi eventi di rottura sono seguiti da riunioni in modo che i cromosomi coinvolti siano strutturalmente riorganizzati, si parla di riarrangiamenti strutturali, altrimenti si originano delezioni..

Esistono quattro tipi di mutazioni strutturali: *delezioni* e *duplicazioni* che comportano un cambiamento nella quantità di DNA di un cromosoma, *inversioni* che comportano cambiamenti nella disposizione di un tratto cromosomico e le *traslocazioni* che implicano un cambiamento nella localizzazione di un frammento cromosomico.

Le duplicazioni, inversioni o traslocazioni possono ritornare alla condizione selvatica (reverttere) attraverso un processo inverso a quello attraverso cui sono state prodotte, mentre le delezioni non possono reverttere perché un intero tratto cromosomico è andato perduto.

Tutti i quattro tipi di mutazioni cromosomiche di struttura hanno origine da una o più rotture nel cromosoma. Se una rottura si verifica all'interno di un gene, si genera una mutazione genica, la cui conseguenza dipende dalla funzione del gene e dal momento della sua espressione.

Qualsiasi sia il punto in cui avviene una rottura, l'evento di rottura genera delle estremità tronche, prive di telomeri la cui funzione è quella di impedire la degradazione da parte delle esonucleasi e la loro potenziale "reattività". Di conseguenza, l'estremità rotta di un cromosoma è "reattiva", il che significa che può attaccarsi ad un'estremità rotta di un altro cromosoma o anche alle estremità normali di altri cromosomi.

Questa caratteristica permette di capire la formazione dei tipi di mutazioni strutturali.

1.7.1.1 Delezioni

Una delezione è una mutazione cromosomica che ha come conseguenza la perdita di un tratto di cromosoma.

Il segmento deleto può essere localizzato in un punto qualsiasi lungo il cromosoma.

La delezione è una rottura che può essere indotta, ad esempio da agenti quali la temperatura, radiazioni, virus, sostanze chimiche, elementi trasponibili o da errori nella ricombinazione.

Le conseguenze di una delezione dipendono dai geni o dalle parti che vengono rimosse. Negli organismi diploidi, o poliploidi, gli effetti possono essere attenuati dalla presenza sul cromosoma omologo di una copia dei geni deleti.

Se la delezione causa la perdita del centromero il risultato sarà un cromosoma acentrico, che viene generalmente perso durante la meiosi con conseguente perdita dal genoma di un intero cromosoma.

A seconda dell'organismo questa perdita cromosomica può avere conseguenze molto gravi o letali.

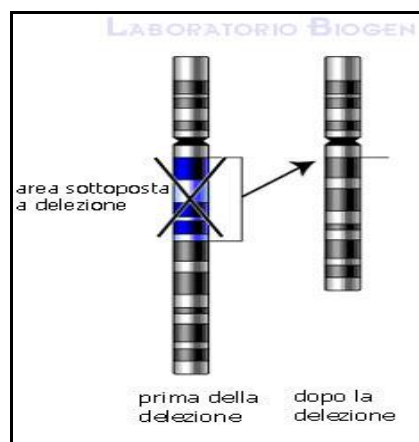


Figura 4 Delezione

1.7.1.2 Duplicazioni

Una duplicazione è una mutazione cromosomica che deriva dal raddoppiamento di un tratto di un cromosoma.

Le duplicazioni hanno avuto un ruolo importante nell'evoluzione delle famiglie geniche.

La dimensione del tratto duplicato può variare in modo considerevole e segmenti duplicati possono trovarsi in punti diversi del genoma oppure in una disposizione tandem, cioè uno vicino all'altro (Kimball, 1962).

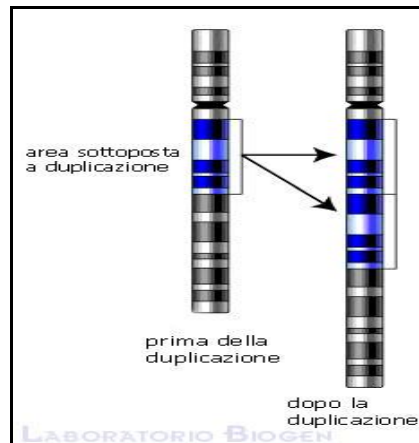


Figura 5 Duplicazione

1.7.1.3 Inversioni

Un'inversione è una mutazione cromosomica che si verifica quando un segmento cromosomico viene escisso e poi reintegrato nel cromosoma dopo rotazione di 180° rispetto all'orientamento originale (Zuffardi, 2009).

Un'inversione ha delle importanti conseguenze sull'aspetto dei cromosomi e sul comportamento durante il crossing-over, interferendo con i prodotti della meiosi.

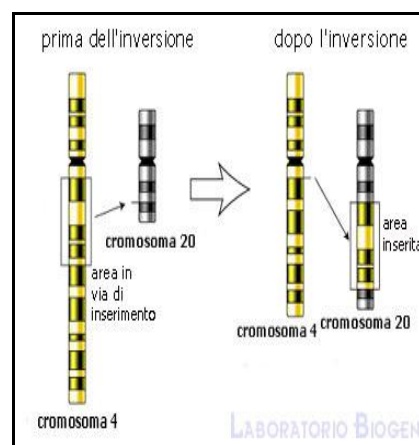


Figura 6 Inversione

1.7.1.4 Traslocazioni

Una traslocazione è una mutazione cromosomica in conseguenza della quale vi è un cambiamento di posizione di segmenti cromosomici e delle sequenze geniche in esse contenute.

In una traslocazione non vi è né aumento né perdita di materiale genetico.

Le traslocazioni influenzano i prodotti della meiosi. In molti casi, alcuni dei gameti prodotti sono sbilanciati, in quanto hanno duplicazioni e/o delezioni e possono essere non vitali.

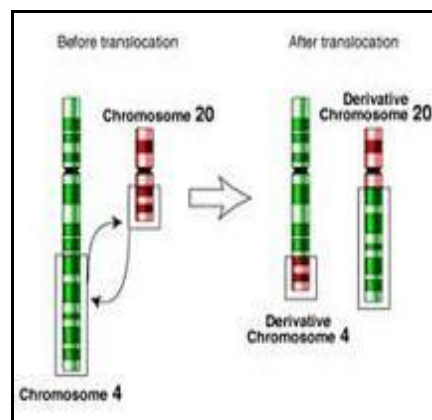


Figura 7 Traslocazione

1.7.1.5 Effetto di posizione

Le inversioni o le traslocazioni, a meno che non implicino rotture all'interno di un gene, non determinano fenotipi mutanti, queste mutazioni hanno piuttosto conseguenze significative alla meiosi quando sono in eterozigosi con le sequenze normali.

In alcuni casi però, si verificano effetti fenotipici determinati da inversioni o traslocazioni a causa di un fenomeno definito: *effetto di posizione*, cioè un cambiamento dell'espressione fenotipica di uno o più geni in conseguenza di un cambiamento di posizione nel genoma. Ad esempio può verificarsi un effetto di posizione se un gene, normalmente localizzato nell'eucromatina, viene portato in seguito a riarrangiamento cromosomico, vicino all'eterocromatina.

1.7.2 Mutazioni numeriche

Organismi con un assetto completo di cromosomi o un multiplo esatto di assetti completi, vengono definiti *euploidi*. In natura avvengono mutazioni cromosomiche che portano a variazioni del numero degli assetti cromosomici e gli organismi risultanti sono ancora euploidi.

Possono anche verificarsi mutazioni cromosomiche che portano a variazioni del numero di singoli cromosomi o variazioni di parti di cromosomi e questi sono esempi di *aneuploidia*.

1.7.2.1 Aneuploidia

Nell'aneuploidia uno o più cromosomi vengono persi o aggiunti rispetto all'assetto cromosomico normale.

Nella maggior parte dei casi, l'aneuploidia è letale negli animali, le piante invece sono più spesso aneuploidi.

Questa anomalia può derivare dalla perdita di singoli cromosomi alla mitosi o alla meiosi e quindi si formano nuclei con un numero di cromosomi inferiore al normale. Un'aneuploidia può anche derivare da una non disgiunzione, cioè una distribuzione irregolare dei cromatidi fratelli alla mitosi o dei cromosomi omologhi alla meiosi. Nella non disgiunzione, vengono prodotti due nuclei figli, uno con un numero di cromosomi superiore al normale e uno con un numero inferiore.

1.7.2.2 Cambiamenti relativi ad interi assetti cromosomici

La monoploidia e la poliploidia implicano variazioni rispetto alla condizione normale del numero di interi assetti cromosomici.

La monoploidia e la poliploidia sono letali per le specie animali e sono molto più tollerate dalle piante, infatti entrambe hanno svolto un ruolo importante nella speciazione delle piante (Merlo et al., 2010).

Cambiamenti relativi ad assetti cromosomici completi, possono derivare, ad esempio, da una non disgiunzione mitotica che coinvolga tutti i cromosomi.

Nella monoploidia un individuo presenta un solo assetto cromosomico, è tipica dei gameti e di alcune specie come parte del loro ciclo vitale.

Monoploidi vengono usati anche in esperimenti di miglioramento genetico, infatti le cellule di un organismo monoploide sono molto utili per l'ottenimento di mutanti, dato che le mutazioni non sono mascherate dall'allele dominante sul cromosoma omologo. La poliploidia è la condizione per la quale una cellula o un organismo possiede un numero di assetti cromosomici superiore al normale.

I poliploidi possono insorgere spontaneamente o essere indotti sperimentalmente. Spesso derivano da un'alterazione dell'apparato del fuso in divisioni mitotiche o meiotiche. Un esempio di inibitore del fuso mitotico è la colchicina, in presenza della quale i cromosomi duplicano, ma in seguito a non disgiunzione mitotica non possono essere ripartiti nei nuclei figli, con la conseguenza di una cellula con un assetto cromosomico doppio (Chow et al, 2010).

Esistono due classi di poliploidi: quelli con un numero pari di assetti cromosomici, che hanno una maggiore probabilità di essere fertili dato che possono appaiarsi alla meiosi e quelli dispari che invece hanno sempre un cromosoma spaio di ogni paio, per cui è molto bassa la probabilità di un gamete bilanciato.

Le piante riescono a tollerare la poliploidia, sia perché la determinazione del sesso è meno sensibile alla poliploidia, sia perché molte piante vanno incontro ad autofecondazione, per cui se viene prodotta una pianta con un numero di assetti cromosomici poliploide pari (es $4N$), può ancora produrre gameti funzionali e riprodursi.

A seconda dell'origine dei genomi, nelle piante si riscontrano altri due tipi di poliploidia; l' **autopoliploidia** e l' **alloploidia**.

Nell'autopoliploidia tutti gli assetti cromosomici appartengono alla stessa specie. Questa condizione probabilmente deriva da un difetto della meiosi che porta a gameti diploidi o triploidi. Se un gamete si fonde con un gamete normale aploide, lo zigote che ne deriva avrà tre assetti cromosomici, sarà triploide (la banana è un esempio di pianta autotriploide). Dato che hanno un numero dispari di assetti cromosomici, i gameti hanno un numero variabile di cromosomi e quindi vengono prodotti pochi semi fertili. E' stata osservata la triploidia anche in piante erbacee, ornamentali, in cereali e in piante forestali.

Nell'alloploidia, gli assetti cromosomici derivano da specie diverse, anche se generalmente correlate. Questa situazione può originarsi se due specie diverse si

incrociano, producendo un organismo con due assetti cromosomici aploidi, provenienti da ciascun genitore e poi entrambi gli assetti cromosomici vengono raddoppiati.

I cereali, la maggior parte delle piante coltivate e molti fiori commerciali sono poliploidi. Ad esempio il frumento *Triticum aestivum* è un alloesaploide con 42 cromosomi, derivati da tre specie diploidi diverse e il contributo di ciascuna di queste è un assetto diploide di 14 cromosomi. La meiosi è normale in quanto si appaiano solo cromosomi omologhi, per cui la pianta è fertile.

1.7.3 Mutazioni geniche

Le mutazioni geniche sono cambiamenti della sequenza del DNA, a carico di uno o pochi nucleotidi, cui può far seguito un'alterazione dell'informazione genetica con comparsa di un fenotipo mutante.

Tali mutazioni sono anche dette *mutazioni puntiformi*.

1.7.4 Tipi di mutazioni

A) *Mutazione per sostituzione*: mutazione puntiforme in cui una coppia di basi viene "sostituita" da un'altra coppia che può portare a:

transizione quando la sostituzione avviene tra una coppia di basi purina-pirimidina con un'altra coppia purina-pirimidina.

transversione quando ad una coppia di basi purina-pirimidina viene sostituita una coppia pirimidina-purina.

B) *Mutazione frameshift* è il risultato di un'inserzione o di una delezione di una o più coppie di basi in un gene che causano uno scorrimento del modulo o cornice di lettura (frame) dal sito mutato in poi.

Le mutazioni sono anche classificate in base agli effetti fenotipici:

Mutazione missenso in cui la sostituzione di una coppia di basi nel DNA causa un cambiamento nel codone dell'mRNA, con il risultato che nel polipeptide viene inserito un amminoacido differente al posto di quello specifico del codone selvatico ed il fenotipo risulta mutato.

Mutazione nonsense è una sostituzione di una coppia di basi nel DNA che determina nell'mRNA un cambiamento da un codone che specifica per un amminoacido ad un

codone di terminazione. Poiché una mutazione nonsense da origine alla terminazione della catena polipeptidica in un punto non corretto, essa determina la fine prematura della proteina.

Mutazione neutra è una sostituzione di una coppia di basi in un gene che cambia un codone nell'mRNA, ma l'amminoacido risultante non determina alcuna alterazione nella funzionalità della proteina prodotta.

Mutazione silente è uno specifico caso di mutazione “missenso” che avviene quando un codone dell'mRNA viene cambiato in modo tale da codificare ancora per lo stesso amminoacido. La proteina in questo caso è identica a quella selvatica.

1.8 CAUSE DI MUTAZIONE

L'ambiente in cui viviamo rappresenta una minaccia continua per il materiale genetico. Radiazioni ionizzanti, luce ultravioletta ed una moltitudine di composti chimici possono operare come agenti genotossici.

Accanto a tali fonti esogene, il DNA è soggetto al danneggiamento endogeno legato al metabolismo cellulare che può determinare eventi quali la perdita di basi, alterazioni della sequenza nucleotidica dovuta alla infedeltà dei processi di replicazione del DNA e produzione di metaboliti che possono interagire in vario modo con il materiale genetico. Queste modificazioni vanno dall'alterazione di una singola base fino alla rottura del doppio filamento, cambiando la conformazione della doppia elica.

Gli organismi viventi nel corso della loro storia evolutiva hanno selezionato una complessa rete di eventi atti a proteggere il DNA dagli agenti genotossici (*scavengers*) o a ristrutturare la sequenza nucleotidica dopo che il danno è stato inflitto (riparazione).

I sistemi enzimatici preposti alla riparazione del DNA sono di primaria importanza nel mantenimento dell'integrità del genoma poiché è noto che l'accumulo di danno non riparato o riparato in modo non corretto può rappresentare un evento iniziale nell'origine di mutazioni trasmissibili o indurre alterazioni funzionali a carico delle cellule somatiche.

Le mutazioni, come già accennato, possono avvenire spontaneamente *mutazioni spontanee* o possono essere indotte da un agente mutageno chimico o fisico, *mutazioni indotte*.

1.8.1 Mutazioni spontanee

Le mutazioni spontanee sono dovute ad errori nella replicazione del DNA, durante la quale possono generarsi sia mutazioni puntiformi, che corte inserzioni o delezioni causate rispettivamente da *sostituzione di coppie di basi* se si verifica un appaiamento errato durante la replicazione del DNA, o da *inserzioni e delezioni* che possono avvenire spontaneamente attraverso un non corretto appaiamento del filamento neosintetizzato o del filamento stampo.

1.8.2 Mutazioni indotte

Le mutazioni indotte vengono prodotte da *agenti fisici* (radiazioni ionizzanti, UV), *agenti chimici* (agenti alchilanti, analoghi di base, intercalanti), *biologici* (batteri, virus) indicati come agenti genotossici.

Gli agenti mutageni (genotossici), aumentano il tasso di mutazione spontanea: ed agiscono sia direttamente sul DNA che indirettamente come nel caso degli inibitori delle DNA topo isomerasi. Tali agenti possono essere esogeni ed endogeni.

Esempi di lesioni al DNA indotte da tali agenti sono mostrati nella figura 8.

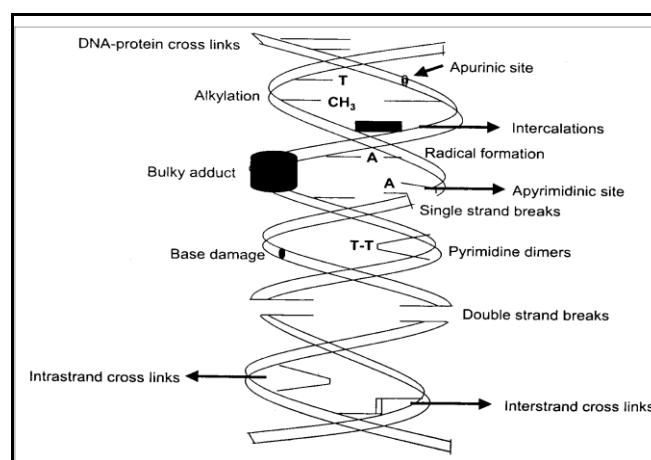


Figura 8 Lesioni primarie indotte al DNA da agenti mutageni chimici e fisici

1.8.3 Mutageni fisici

Gli agenti fisici comprendono le radiazioni elettromagnetiche a corta lunghezza d'onda quali i raggi x, i raggi γ , i raggi ultravioletti (B, C) e le radiazioni corpuscolate come le particelle α , β , neutroni.

Le radiazioni elettromagnetiche si dividono a loro volta in ionizzanti e non.

1.8.3.1 Le radiazioni ionizzanti

Le radiazioni ionizzanti (IR) hanno rappresentato una sorgente di danno fisico di tipo naturale al DNA degli organismi su questo pianeta fin dall'inizio dell'evoluzione biologica.

Allo stato attuale, le sorgenti di radiazioni ionizzanti di importanza rilevante sono quelle create dall'uomo per scopi terapeutici, diagnostici, nucleare, civile e militare.

Le radiazioni ionizzanti sono caratterizzate dal produrre, in modo assolutamente casuale "random", danno a tutti i componenti cellulari incluso il DNA.

Uno dei parametri maggiormente utilizzati per indicare il tasso di energia rilasciata dalle radiazioni ionizzanti è il "*Linear Energy Transfer*" (LET) definito come l'energia media perduta nella collisione in funzione della distanza coperta dai fotoni o dalle particelle.

Il danno con cui le radiazioni incidenti interagiscono con qualsiasi mezzo e nel nostro caso, con il materiale biologico, per determinare ionizzazioni, può essere diretto o indiretto.

L'azione diretta consiste nell'eccitazione o ionizzazione da parte della radiazione, degli atomi che costituiscono la molecola di DNA.

L'azione indiretta consiste nell'interazione della radiazione con il materiale biologico diverso dal DNA, cioè altri atomi e/o molecole che emettendo elettroni secondari, come in una reazione a catena, potrebbero determinare ionizzazioni nel materiale ereditario, modificandone le caratteristiche.

Nel materiale biologico la radiolisi dell'acqua rappresenta uno degli elementi più importanti di azione indiretta delle radiazioni ionizzanti. Il prodotto primario della radiolisi della molecola dell'acqua è rappresentato dai radicali liberi idrossilici ($\bullet$ OH) e di idrogeno ($\bullet$ H). Questi radicali primari possono generare a loro volta radicali

secondari che attaccano importanti macromolecole cellulari come DNA, proteine e lipidi. Un'altra importante considerazione è che i suddetti radicali possono reagire con l'ossigeno per formare radicali idroperossilici ($\text{HO}_2 \bullet$) e radicali superossido ($\text{O}_2 \bullet^-$). I radicali possono reagire con il DNA sia a livello delle basi sia dello zucchero deossiribosio producendo alterazioni e rotture a singolo (SSB) e doppio filamento (DSB) (Bopp e Hagen, 1970; Coquerelle et al., 1973).

Esempi di radiazioni indirettamente ionizzanti sono raggi X , le radiazioni γ .

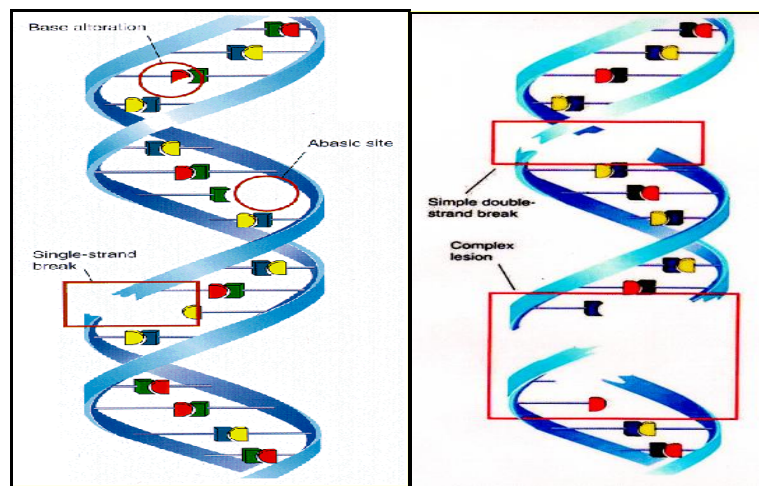


Figura 9 Principali lesioni al DNA indotte dalle radiazioni ionizzanti.

1.8.3.2 La radiazione ultravioletta

Le radiazioni ultraviolette sono radiazioni elettromagnetiche non ionizzanti, allocate nell'intervallo di frequenza che inizia dalla luce violetta nel visibile e arriva fino alle frequenze dei raggi X.

In biologia, questo intervallo viene diviso in intervallo vicino (per lunghezze d'onda comprese tra 300 nm e 380 nm) ed intervallo lontano (al di sotto dei 300 nm). Gli effetti biologici delle radiazioni non ionizzanti prese in esame, si riferiscono alle radiazioni aventi lunghezze d'onda comprese tra 190 nm e 380 nm, poiché in tale intervallo esse

hanno un'energia inferiore a 12eV, l'energia minima necessaria per risolvere un legame covalente.

In campo medico, le radiazioni ultraviolette, sulla base della loro efficienza nell'induzione di differenti effetti biologici, sono distinte come di seguito:

-**UV-A** (>di 315 nm)

-**UV-B** (280-320 nm)

-**UV-C** (< 280 nm)

Le molecole biologiche assorbono i fotoni della radiazione ultravioletta a differenti lunghezze d'onda.

Gli **acidi nucleici** hanno un massimo di assorbimento per radiazioni aventi lunghezza d'onda compresa tra 260 e 265nm, mentre per le **proteine** è intorno a 280nm.

La luce ultravioletta induce danno alle membrane cellulari, alle strutture proteiche, all'RNA, ma danneggia preferenzialmente la doppia elica del DNA.

Il danno predominante indotto dagli UV al DNA è il *dimero di ciclobutano*. La sua struttura è costituita da due residui di pirimidina situati nella medesima elica, legati covalentemente a livello degli atomi di carbonio 5 e 6. La distribuzione dei dimeri nel DNA è casuale, però nel core del nucleosoma non è uniforme (Gale et al 1987), ciò perché esiste una periodicità di 10.3 basi che può essere ricollegata alla struttura del nucleosoma.

Beukers e Berends nel 1960, per primi isolarono ed identificarono gli anelli di ciclobutano da una soluzione di timina irradiata con UV-C. Successivamente Setlow e Carrier (1966) hanno dimostrato che la dimerizzazione a ciclobutano non riguarda esclusivamente le timine, ma può essere estesa alle pirimidine in generale e conseguentemente, questi fotoprodotto furono denominati *dimeri di pirimidina*. Possono formarsi, dopo irradiazione, tre tipi di dimeri di pirimidina: dimeri di timina (50%), dimeri di timina-citosina (40%), dimeri di citosina (10%).

Un'altra importante lesione indotta dagli UV è il *pirimidina-pirimidone-(6-4)fotoprodotto* detto più semplicemente 6-4 fotoprodotto (Lippke et al, 1981). Questo è formato preferenzialmente nel DNA linker dove si trovano sei volte in più rispetto al DNA del core del nucleosoma. Questa lesione si verifica frequentemente nelle sequenze T-C, spesso nelle C-C, raramente nelle T-T e mai nei siti C-T. Altre lesioni prodotte dagli UV al DNA sono la formazione di legami crociati (cross-links) DNA-proteine,

rottture a singolo filamento e a bassa frequenza, glicoli di timina e idrati di pirimidina (Peak et al, 1985, Hirschi et al, 1981, Tyrrel et al, 1982).

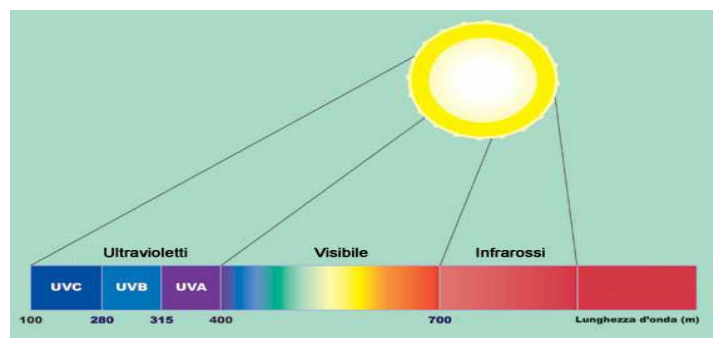


Figura 10 Raggi Ultravioletti

1.8.4 Mutageni chimici

Molte sostanze chimiche possono indurre mutazioni e possono essere raggruppate in diverse classi a seconda del loro meccanismo d'azione.

Analoghi delle basi: sono sostanze chimiche che hanno una struttura molecolare simile a quella delle normali basi del DNA. Un analogo delle basi causa mutazioni perché esiste in stati alternativi (tautomeri), uno normale ed uno raro. In ciascuno di questi stati l'analogo delle basi si appaia con una diversa base del DNA e ciò può causare mutazioni per sostituzioni di coppia di base.

Agenti intercalanti agiscono inserendosi tra basi adiacenti in una o entrambe le eliche di DNA. Se l'agente intercalante si inserisce tra due coppie di basi adiacenti, in seguito a replicazione, dopo che l'agente è stato perso, il risultato sarà una mutazione *frameshift*, se l'agente si inserisce al posto di una base nella nuova elica del DNA, quando la doppia elica si replica, dopo che l'agente è stato perso, si avrà una mutazione *frameshift* per delezione di una coppia di basi.

1.9 SISTEMI DI RIPARAZIONE DEL DNA NEI SISTEMI BIOLOGICI

La stabilità genomica è essenziale per una corretta proliferazione cellulare e per la vitalità degli organismi pluricellulari

Tuttavia il patrimonio genetico è continuamente soggetto ad alterazioni strutturali indotte sia da agenti endogeni sia ambientali.

La sopravvivenza a breve termine, quindi, oltre a richiedere un accurato processo replicativo dello stesso genoma, necessita di un altrettanto valido sistema di riparazione che minimizzi o annulli le numerose lesioni che vengono continuamente indotte nel DNA.

Esistono molteplici meccanismi di riparazione del DNA evoluti per rispondere ad una varietà di lesioni. Si conoscono molto approfonditamente i vari meccanismi di riparazione del DNA nei batteri, nel lievito, nei mammiferi, mentre è meno ricca la letteratura per quello che riguarda la riparazione del DNA nelle piante.

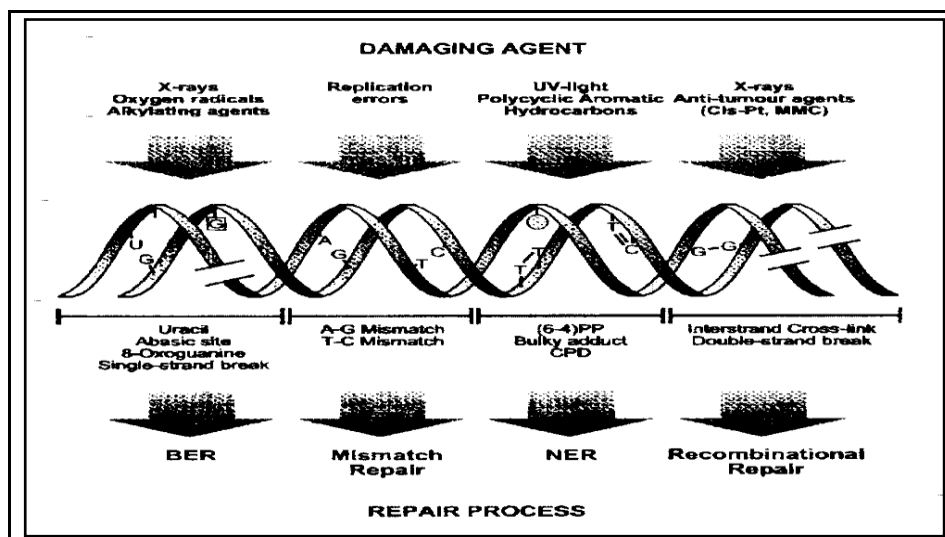


Figura 11 Meccanismi di riparazione del danno al DNA

1.9.1 Meccanismi per la riparazione del danno a singolo filamento del DNA

Il danno a singolo filamento del DNA viene riparato utilizzando l'altro filamento come stampo per la correzione del filamento danneggiato. Questo può avvenire attraverso differenti meccanismi che dipendono dall'entità del danno stesso e sono:

1.9.1.1 Riparazione per escissione di base (BER, *Base Excision Repair*)

E' responsabile della maggior parte dei processi di riparazione del DNA nella cellula dovuti ad ossidazione, alchilazione, idrolisi e deaminazione, attraverso il quale le

basi danneggiate sono semplicemente rimosse. Gli agenti chiave in questo processo di riparazione sono le *glicosilasi*.

Per ogni specifico danno alle basi esiste una specifica glicosidasi la quale, riconosce la base alterata, taglia il legame tra le basi ed il residuo del deossiribosio (legame N-glicosidico) rilasciando la base danneggiata, generando così un sito apurinico o apirimidinico generalmente indicato come “AP-sites”.

Un altro gruppo di enzimi, le *glicosilasi-AP-liasi* tagliano il legame glicosidico, nonché l’ossatura zucchero-fosfato lasciando un’ incisione con uno zucchero insaturo in posizione 3’-terminale ed un gruppo 5’-fosfato. I siti AP che derivano dall’azione delle glicosilasi sono attaccati dalle *endonucleasi AP*. Queste endonucleasi provocano un taglio nel legame fosfo-diesterico all’altezza del sito AP e la rimozione dello zucchero.

Il deossiribosio in posizione 5’-terminale che né deriva, diventa substrato per l’attività di una fosfodiesterasi che sembra essere associata con le glicosilasi. Una volta che il deossiribosio senza base è rimosso, la piccola “gap” che ne risulta è riempita dalla *DNA-polimerasi* e quindi richiusa da una *DNA-ligasi*. (Dianov e Lindahl, 1994; Friedberg et al., 1995; Lindahl e Wood 1999).

1.9.1.2 Riparazione per escissione di nucleotidi (NER *Nucleotide Excision repair*)

E’ uno dei maggiori sistemi di riparazione per la rimozione di addotti voluminosi al DNA lunghi da 2 a 30 nucleotidi.

Specifiche endonucleasi riconoscono le distorsioni dell’elica ed effettuano un taglio nell’elica del DNA danneggiato, rilasciando il singolo filamento che contiene le basi danneggiate. La regione mancante viene poi riempita dalla DNA Polimerasi ed il filamento saldato dalla DNA ligasi.

1.9.1.3 Mismatch repair

Questo sistema di riparazione elimina le basi non correttamente appaiate che si formano durante la replicazione, ricombinazione genetica o come risultato di un danno al DNA.

In *E. Coli* il *mismatch repair* è reso possibile dalla metilazione dei residui adenina nella sequenza GATC del filamento parentale ed è attuato dal sistema *Mut-HLS*. Questa metilazione avviene per via enzimatica in posizione N-6 attraverso l'azione di una *adenina-metilasi*. Comunque, immediatamente dopo la replicazione, la sequenza GATC neosintetizzata nel filamento figlio è temporaneamente in una condizione di semi-metilazione. Questa condizione serve da segnale specifico per distinguere il filamento neosintetizzato da quello parentale. Essenzialmente, l'attività di riparo coinvolge l'incisione del filamento non metilato nella molecola "duplex" semimetilata all'altezza del sito danneggiato. Segue, poi, l'eliminazione della base sbagliata e successiva risintesi. La proteina *Mut-S* si lega al DNA al sito della base non correttamente appaiata. La proteina *Mut-L*, quindi, interagisce con *Mut-S* per attivare una terza proteina *Mut-H*, questa è una endonucleasi specifica per DNA semi-metilato che però incide nel filamento non metilato. La successiva reazione di escissione richiede la partecipazione di una esonucleasi e di una elicasi. Una volta che l'escissione è completa, la risintesi del DNA mancante è eseguita dalla *DNA-polimerasi III*, seguita dall'attività della *DNA-ligasi* (Loeb, 1994; Modrich, 1994). Un sistema di riparazione molto simile a *E. Coli* è stato osservato nelle cellule vegetali da Kevin et al nel 2000 dove in *Arabidopsis* sono state riscontrate proteine analoghe a quelle che intervengono in *E. coli* nel *mismatch repair*.

1.9.2 Meccanismi per la riparazione del danno a doppio filamento del DNA

Le rotture a doppio filamento del DNA (DSB) costituiscono lesioni molto gravi per la cellula e ne compromettono la vitalità, quindi la loro riparazione è un evento critico per la sopravvivenza.

Una sola DSB può causare morte cellulare per apoptosi, inattivare geni chiave o produrre aberrazioni cromosomiche.

Le rotture a doppio filamento sono riparate, in tutti gli eucarioti, attraverso l'azione di due meccanismi, uno basato sulla ricombinazione omologa (HR) che ripristina la normale struttura e funzione del DNA, e l'altro basato sulla ricombinazione non omologa (NHEJ) che ha come conseguenza la produzione di errori nel DNA.

1.9.2.1 Ricombinazione omologa (HR, *Homologous Recombination*)

La ricombinazione omologa necessita di una sequenza identica da utilizzare come stampo per la riparazione della rottura. Gli enzimi responsabili di questo processo agiscono praticamente in modo analogo a quelli responsabili del crossingover meiotico.

Nelle cellule somatiche delle piante, l'HR è la via meno utilizzata per la riparazione delle rotture a doppio filamento e la sua efficienza è molto influenzata dalla disponibilità di una sequenza da utilizzare come stampo.

L'informazione omologa per la riparazione può essere copiata da qualche sito nel genoma (ectopica), dal cromosoma omologo (allelica), da qualche altro cromosoma (intracromosomiale) o dopo la replicazione dal cromatidio fratello. In base al sito di omologia che viene utilizzato, verranno attivate differenti pathways di ricombinazione omologa (Putcha H. et al, 2004)

1.9.2.2 Ricombinazione non omologa (NHEJ, *Non Homologous End Joining*)

In questa via la riparazione avviene rapidamente attraverso la ricongiunzione diretta e ricucitura del filamento danneggiato, quindi le estremità danneggiate vengono legate senza l'utilizzo di un filamento da utilizzare da stampo.

Le DSB nelle piante sono riparate principalmente attraverso il NHEJ.

Uno studio di Putcha del 2005 ha dimostrato come la riparazione delle rotture a doppio filamento del DNA nelle piante abbia contribuito all'evoluzione delle stesse, infatti sia il NHEJ che l'HR è coinvolto in cambiamenti del genoma delle piante in quanto porta a traslocazioni cromosomiche e ad altri tipi di riarrangiamento inserzioni e delezioni.

1.9.3 La fotoriattivazione

Le principali lesioni indotte dai raggi UV al DNA sono i cis-sin-dimeri di ciclobutano (CPD) e i pirimidina-pirimidone(6-4)fotoprodotto (6-4PP) formati tra pirimidine adiacenti che si legano in modo covalente.

La fotoriattivazione è catalizzata da un'enzima chiamato *fotoliasi* che, riconoscendo le distorsioni dell'elica causate dai dimeri, vi si lega in modo reversibile e le ripara.

La correzione avviene in modo diretto, in seguito ad esposizione alla luce visibile e consiste nella rottura del dimero e ricostituzione della struttura corretta.

Per quanto riguarda le piante la fotoriattivazione è la principale via di riparazione del DNA in seguito a danno indotto da raggi UV nelle cellule non proliferanti, mentre nelle cellule in attiva proliferazione intervengono anche BER e NER (Seisuke et al, 2004).

1.10 LE ABERRAZIONI CROMOSOMICHE

La visione corrente sulla formazione delle aberrazioni cromosomiche attribuisce un ruolo centrale alle rotture a doppio filamento del DNA (*double strand breaks*, DSB) sulle quali agiscono due processi di riparazione: la ricombinazione non omologa (*non homologous end joining*, NHEJ) e la ricombinazione omologa (*homologous recombination*, HR).

La formazione di un'aberrazione cromosomica deriva da una riparazione “sbagliata” (*misrepair*) di due DSB contigue e le aberrazioni indotte da raggi X possono essere generate, verosimilmente, da un *misrepair* sia di basi danneggiate sia di DSB direttamente formate.

Il risultato sarà un cambiamento nella struttura dei cromosomi che comprende rotture, vari riarrangiamenti e la formazione di **Aberrazioni cromosomiche** (Hanna et al, 2005). Le aberrazioni che coinvolgono un solo cromatidio sono dette aberrazioni cromatidiche, quelle che li coinvolgono entrambi sono dette aberrazioni cromosomiche.

I principali tipi di aberrazioni cromosomiche e cromatidiche sono: dicentrici, anelli, traslocazioni e delezioni.

Alcune aberrazioni sono stabili, possono essere trasmesse attraverso ripetute divisioni cellulari e persistere nella popolazione cellulare.

Delezioni, duplicazioni, inversioni e traslocazioni bilanciate sono riarrangiamenti cromosomici che possono essere trasmessi.

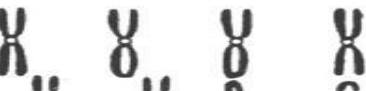
Oltre ad aberrazioni stabili, le rotture cromosomiche danno origine a frammenti acentrici (pezzi rotti senza centromero), cromosomi dicentrici, cromosomi ad anello e altri riarrangiamenti asimmetrici che sono instabili e spesso causano la morte cellulare.

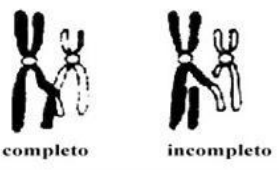
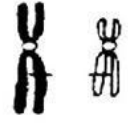
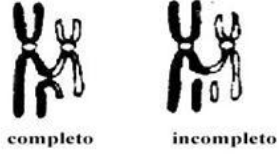
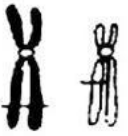
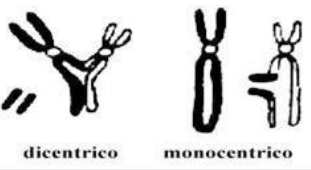
Il tipo di aberrazione cromosomica che si osserva dipende dalla fase del ciclo cellulare in cui la cellula è stata danneggiata.

Il ciclo cellulare può essere suddiviso in due fasi: la fase di mitosi M, cioè di divisione ed un'interfase tra una divisione e l'altra. L'interfase è caratterizzata da tre tappe successive: G_1 , S e G_2 . Durante la G_1 , fase di pre-sintesi, la cellula si prepara alla replicazione del DNA che avviene nella successiva fase S. In G_2 la cellula si prepara alla divisione cellulare o fase M.

Se il danno al DNA avviene prima della fase di sintesi, cioè in fase G_1 , si ottengono aberrazioni di tipo cromosomico, se invece avviene dopo la fase S l'aberrazione è di tipo cromatidico.

Nelle tabelle che seguono sono mostrati alcuni esempi di aberrazioni in relazione alla fase del ciclo cellulare in cui il DNA è stato danneggiato.

TIPO	S. G_2	METAFASE
DELEZIONE TERMINALE		
DELEZIONE INTERSTIZIALE		
ANELLO ACENTRICO		
ANELLO CENTRICO		
ISOCROMATIDI		

TIPO	S. G ₂	METAFASE
SCAMBI SIMMETRICI		
SCAMBI ASIMMETRICI		
TRIRADIALI		

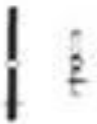
TIPO	G ₁	METAFASE
TRASLOCAZIONI RECIPROCHE		
DICENTRICI		

Figura 12 Esempi di aberrazioni cromosomiche

1.11 SCOPO DEL LAVORO

L'ingegneria genetica, che sta alla base della trasformazione delle piante, può comportare l'inserzione casuale nel genoma di numerose copie di transgeni interi o frammenti dello stesso riarrangiati, determinando la presenza nel DNA di sequenze ad elevata omologia, in alcuni casi in stretta prossimità.

Questa condizione potrebbe generare dei cosiddetti "hotspot di ricombinazione" con potenziali effetti destabilizzanti della molecola stessa.

La stabilità del genoma è normalmente mantenuta attraverso un processo replicativo molto accurato e da un efficiente sistema di riparazione del danno al DNA sia spontaneo che indotto.

Tuttavia, quando il volume del danno genetico indotto eccede la capacità di riparazione di tipo "escissivo" (excision repair) potenzialmente espresso, la cellula può ricorrere all'attivazione della "riparazione di tipo ricombinazionale" (Kunz and Haynes, 1981; Oishi, 1988; Petes, 1988; Tsujimura et al., 1990; Bhattacharyya et al., 1990). Poiché, la riparazione di tipo ricombinazionale può, di per se, influenzare la stabilità genomica, è estremamente importante determinare i livelli di ricombinazione indotti nelle piante e compararli ad altri organismi eucarioti superiori.

Alcuni studi nelle cellule somatiche di piante (Gallego et al. 1999; Puchta, 1998) (Rei set al., 2000) hanno mostrato che la ricombinazione omologa, oltre che ad essere molto meno efficiente della ricombinazione non-omologa è anche poco utilizzata per la riparazione delle rotture a doppio filamento del DNA genomico. Tuttavia, in piante di tabacco transgenico è stato osservato che se le rotture a doppio filamento del DNA, indotte da raggi X, mitomicina-C (Lebel et al., 1993), più recentemente da specifici enzimi di restrizione o da elementi trasponibili (Siebert and Puchta, 2002), sono in prossimità di sequenze omologhe ripetute, possono essere riparate fino ad 1/3 dei casi per ricombinazione omologa, indicando che le piante possono rispondere ai suddetti "stress" con livelli marcatamente più elevati di ricombinazione omologa indotta, rispetto alle cellule di mammifero. Induzione di elevata ricombinazione omologa nella pianta di tabacco è stata anche riscontrata in seguito a trattamento con due differenti ceppi virali (Kovalchuk et al.2003), radiazione ultravioletta C (UVC) e rosso Bengala (Filkowsky et al. 2004).

In tale scenario, lo scopo del presente lavoro è stato quello di valutare la potenziale instabilità genetica, intesa come maggiore suscettibilità ad accumulare danno cromosomico nelle linee di frumento transgenico, comparate alla loro controparte *wild type* in seguito ad insulti genotossici con agenti mutageni chimici e fisici. Tale ipotesi è riconducibile, come accennato precedentemente, al fatto che l'inserzione casuale nel genoma di transgeni, può creare degli "hotspot di ricombinazione" con potenziali effetti destabilizzanti della molecola di DNA.

Poiché la visione corrente sulla formazione delle aberrazioni cromosomiche attribuisce un ruolo centrale alle rotture a doppio filamento del DNA (sulle quali agiscono i processi di riparazione per ricombinazione non omologa e omologa) e poiché la formazione di un'aberrazione cromosomica deriva da una riparazione "sbagliata" (*misrepair*) di due DSB contigue, la potenziale instabilità genomica delle linee transgeniche selezionate rispetto alle loro controparti *wild type* è stata valutata attraverso l'analisi delle aberrazioni cromosomiche indotte dai seguenti mutageni chimici e fisici con differenti meccanismi di induzione di danno al DNA:

-Camptotecina: inibitore catalitico della DNA topoisomerasi I; induce esclusivamente rotture a singolo filamento nel DNA.

-Etoposide: inibitore catalitico della DNA topoisomerasi II; induce esclusivamente rotture a doppio filamento nel DNA (DSB);

-Raggi X: agente mutageno fisico; che induce danno di vario tipo al DNA tra cui: rotture a singolo (SSB) e doppio filamento (DSB), complesso ed eterogeneo danno chimico alle basi, siti abasici e legami "crociati" DNA-DNA e DNA-proteine.

-Raggi UV-C: agente mutageno fisico; induce specificamente dimeri di pirimidina e "6-4 fotoprodotti".

Tali lesioni inducono l'attivazione di differenti sistemi di riparazione del DNA che includono la riparazione per escissione dei nucleotidi, la riparazione per escissione di basi, il sistema di riparazione delle rotture a singolo filamento del DNA.

Tale attività riparativa può portare al ripristino della condizione "selvatica" oppure generare rotture a doppio filamento nel DNA e produzione di aberrazioni cromosomiche.

In aggiunta all'analisi delle aberrazioni cromosomiche, la potenziale instabilità genomica nelle linee di frumento transgeniche è stata valutata introducendo anche l'analisi dei "micronuclei" che permette di rilevare, insieme al danno cromosomico strutturale (aberrazioni cromosomiche) anche aberrazioni cromosomiche di tipo numerico (perdita cromosomica, non-disgiunzione).

Inoltre, il confronto effettuato su specie trasformate con i due differenti metodi (*Agrobacterium tumefaciens* e biolistico) ha lo scopo di valutare se, oltre ad esserci differenze in termini di stabilità genetica tra *wild type* e corrispondente transgenico, esistano differenze legate anche al metodo di trasformazione impiegato, visto che con il primo metodo si introduce un gene esogeno in singola copia, mentre, con il secondo, numerose copie di transgeni.

MATERIALI E METODI

2 MATERIALI E METODI

2.1 LINEE UTILIZZATE

Sono state utilizzate due linee transgeniche di frumento tenero (*Triticum aestivum* cultivar Bobwhite) e la controparte “*wild type*” ed una linea transgenica di frumento duro (*Triticum durum* cultivar Svevo), con il corrispondente *wild type*.

Le tre linee transgeniche sono state modificate al fine di ottenere piante che presentano interessanti caratteristiche dal punto di vista qualitativo e della resistenza alla fusariosi.

I genotipi transgenici di **frumento tenero** forniti dal prof. D'Ovidio R. e dalla prof.ssa Masci S. dell'Università degli Studi della Tuscia, sono stati ottenuti entrambi attraverso il metodo biolistico per l'inserzione dei seguenti geni:

- Un gene codificante per una subunità gluteninica a basso peso molecolare (**LMW-GS**) che sovraesprime la subunità gluteninica a basso peso molecolare la quale, formando dei legami disolfuro, inter/intra molecolari con altre LMW-GS o con subunità gluteniniche ad alto peso molecolare (HMW-GS), forma i polimeri gluteninici che sono componenti, insieme alle gliadine, del glutine che costituisce più dell'80% delle proteine totali della cariosside (Shewry P. R., 2003) (Wrigley C.W. et al., 1996) (D'Ovidio R., Masci S., 2003).

Le dimensioni e la composizione dei polimeri gluteninici è correlata alla caratteristica qualitativa degli impasti (Gupta R. B. et al., 1994).

- Un gene codificante per una proteina inibente la poligalatturonasi (**PGIP**), presente nella parete cellulare del fagiolo (Janni M. et al., 2007).

In numerose interazioni pianta-patogeno, la parete cellulare rappresenta la principale barriera contro la colonizzazione dei patogeni. Uno dei primi enzimi secreti da molti patogeni fungini è una endopoligalatturonasi (endo-PG) che ha lo scopo di degradare la parete cellulare della cellula ospite (ten Have et al., 1998). Quindi l'espressione di PGIP, consente di inibire l'azione delle endo-PG fungine mostrando un aumento della resistenza contro alcuni patogeni ed una significativa riduzione della progressione dei sintomi (dal 46 al 50%) nelle foglie in seguito ad infezione (Cervone et al., 1997; Ridley et al., 2001).

Il genotipo transgenico di **frumento duro** che mi è stato fornito dal prof. Lafiandra D. è ottenuto mediante la tecnica che utilizza *Agrobacterium tumefaciens* per l'inserzione di:

- RNA interference (iRNA) per silenziare il gene Starch Branching IIa Enzymes (**SBEIIa**) che porta alla formazione di un alto contenuto di amilopectina.

Gli amiloplasti sono degli organelli che contengono le riserve di amido sottoforma di due differenti polimeri: amilosio ed amilopectina. La principale differenza tra i due è il grado di polimerizzazione ed i “side branches “(siti di ramificazione). L'amilosio è una catena lineare di molecole di D glucosio, con un basso grado di polimerizzazione, mentre l'amilopectina mostra un alta polimerizzazione che ha forti implicazioni anche per la struttura. L'amilopectina è il maggior costituente dell' amido nell'endosperma del grano e ne compone circa il 70/80%, mentre l'amilosio costituisce il rimanente 20/30%. Amilosio ed amilopectina sono sintetizzati da due differenti pathways che hanno un substrato comune che è l'ADP glucosio. L'amilosio viene sintetizzato da GBSSI granule bound starch synthase, mentre l'amilopectina è prodotta dall'azione degli SS,SSII, SSII starch synthases e SBEI, SBEIIa, SBEIIb starch branching enzyme che si trovano, nel braccio lungo del cromosoma 2 .

Con l'inserzione dell'RNA interference che silenzia i geni SBEIIa si verifica una diminuzione dell'amilopectina e di conseguenza un forte aumento del contenuto di amilosio ed una deformazione della struttura dei granuli.

Il risultato è una farina ricca di amido resistente che avrà effetti benefici sulla salute umana, proteggendo da alcune malattie come il cancro al colon il diabete di tipoII, l'obesità e l'osteoporosi. Inoltre la pasta prodotta con semolina contenente un alto contenuto di amilosio mostra buona resistenza alla cottura ed è preferita dai consumatori (Sestili et al., 2010).

2.2 CRESCITA DEI SEMI

I semi vengono lavati per 15 minuti circa in una soluzione di acqua ed ipoclorito di sodio (5%) e poi sciacquati in abbondante acqua di fonte.

Successivamente vengono posti in una piastra Petri su di uno strato di carta idrofila in presenza di acqua di fonte e mantenuti in un ambiente controllato, alla temperatura costante di 25°C ed al buio per tre giorni, tempo necessario per la crescita del germoglio.

Al termine di questo periodo soltanto i semi che hanno un germoglio che ha raggiunto un'altezza di circa 2 cm vengono selezionati per i trattamenti.

2.3 SOSTANZE CHIMICHE

-Camptotecina (Sigma), dissolta in dimetilsolfossido (DMSO) alla concentrazione iniziale di 1mM, è stata successivamente diluita in acqua per ottenere le concentrazioni finali di trattamento di 0.05 e 0.1 μ M.

-Etoposide (Sigma), dissolto in DMSO alla concentrazione iniziale di 10 mM è stato successivamente diluito in acqua per ottenere le concentrazioni finali di trattamento di 1 e 2mM.

-Colchicina (Sigma), dissolta in PBS alla concentrazione dello 0.1% è stata utilizzata alla concentrazione finale dello 0.05%.

-Tampone acido citrico-sodio citrato, pH 4.8 costituito da una soluzione composta da 40 ml di acido citrico monoidrato 0.01M (PM 210.14) e 60 ml di tri-sodio citrato diidrato 0.01M (PM 294.10).

-Enzimi digestivi della parete cellulare: Cellulasi da *Trichoderma viride* e Pectinasi da *Aspergillus niger*, ottenuti dalla ditta Sigma Italia, sono stati utilizzati alla concentrazione del 2 e 15 % rispettivamente in tampone acido citrico-sodio citrato (pH 4.8).

2.4 PROCEDURE PER IL TRATTAMENTO

Piantine di frumento con un germoglio di altezza pari a 2 cm circa, come precedentemente descritto, sono state impiegate per tutti i trattamenti previsti con i differenti agenti chimici e fisici.

Per ogni prova sperimentale sono state impiegate un numero minimo di 5 piantine.

2.4.1 *Trattamento con raggi X*

L'esposizione ai raggi X, condotta con un generatore Gilardoni MGL 200/8d (Como, Italia) operante a 250 KV e 6 mA ad un flusso di 0.75 Gy/min, è stata eseguita somministrando dosi di 0.75, 1.5 e 3 Gy.

2.4.2 *Trattamento con raggi UVC*

L'esposizione ai raggi UVC, è stata eseguita a temperatura ambiente con una lampada Spectroline (Spectronics Corporation U.S.A), con un'emissione predominante a 254 nm, ed intensità di 0.2 W/m², somministrando dosi di 3600 e 7200 J/m².

2.4.3 *Trattamento con gli agenti mutageni chimici*

I trattamenti con camptotecina ed etoposide sono stati condotti immergendo i germogli in piastre Petri contenenti soluzioni acquose di 0.05 e 0.1 μ M per la camptotecina e 1 e 2 mM per l'etoposide. I tempi di trattamento sono stati condotti rispettivamente per 24 e 6 ore.

Alla fine del trattamento le piantine sono state lavate accuratamente con acqua di fonte ed adagiate in una nuova piastra Petri, su uno strato umido di carta idrofila per un tempo di recupero di 24 ore, periodo necessario per eseguire una completa riparazione degli specifici danni al DNA indotti. Nelle ultime sei ore del periodo di recupero, è stata aggiunta colchicina, (veleno del fuso mitotico capace di bloccare le cellule in metafase) direttamente nella piastra alla concentrazione dello 0.5% .

2.5 ANALISI DELLE ABERRAZIONI CROMOSOMICHE

L'analisi delle aberrazioni cromosomiche è un metodo molto accurato ed affidabile attraverso il quale è possibile identificare e misurare danni genetici indotti da agenti chimici e fisici.

L'analisi viene condotta mediante microscopio ottico in cellule accumulate in metafase mediante trattamento con colchicina, un agente alcaloide che inibisce l'assemblaggio del fuso mitotico.

2.5.1 Protocolli sperimentali

Negli schemi riportati di seguito sono illustrati i protocolli sperimentali per l'induzione e l'analisi delle aberrazioni cromosomiche.

Ogni esperimento è stato condotto simultaneamente su ciascuna delle tre linee di frumento geneticamente modificate e sui loro corrispondenti *wild types*.

Ciascun esperimento è stato condotto per almeno due volte.

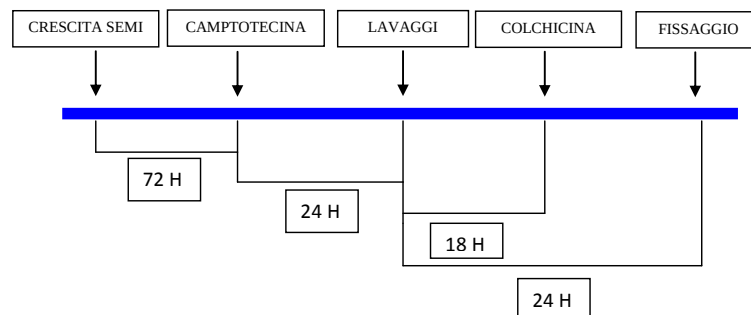


Figura 13 Protocollo sperimentale per l'induzione di Aberrazioni Cromosomiche in seguito a trattamento con camptotecina.

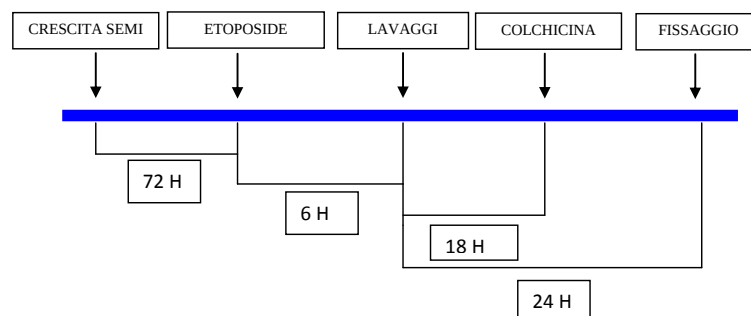


Figura 14 Protocollo sperimentale per l'induzione di Aberrazioni Cromosomiche in seguito a trattamento con etoposide.

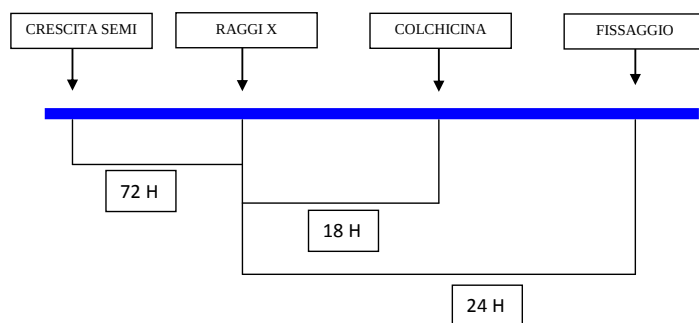


Figura 15 Protocollo sperimentale per l'induzione di Aberrazioni Cromosomiche in seguito a trattamento con raggi X.

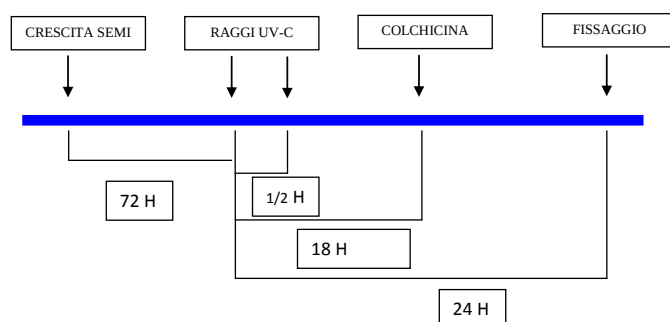


Figura 16 Protocollo sperimentale per l'induzione di Aberrazioni Cromosomiche in seguito a trattamento con raggi UVC.

2.5.2 Fissazione

Al termine del periodo di recupero i germogli sono stati abbondantemente lavati con acqua di fonte e tagliati per la fissazione nel punto di congiunzione con il seme.

La fissazione è stata eseguita immergendo il germoglio in una soluzione di Carnoy (alcool etilico e acido acetico, 3:1 v/v) a +4°C per almeno 24 ore.

Al fine di migliorare la qualità dei preparati metafisici, il materiale può essere mantenuto per alcuni mesi a +4°C o per tempi più lunghi a – 20°C. In ambedue i casi è prevista una sostituzione periodica della soluzione di fissazione.

2.5.3 Digestione della parete cellulare e preparazione dei vetrini

Al termine del periodo di fissazione i germogli sono stati lavati in tampone acido citrico-sodio citrato (pH 4.8) e sottoposti ad un trattamento enzimatico al fine di rimuovere la parete cellulare del tessuto per poter analizzare i cromosomi in metafase.

La digestione della parete cellulare non è stata effettuata sull'intero germoglio ma limitata alla parte mitoticamente attiva dello stesso, localizzata alla sua base, con uno spessore di circa 2 mm.

Questa regione, privata del coleoptile di rivestimento è stata immersa in una soluzione enzimatica di cellulasi (2%) pectinasi (1.5%) e tampone acido citrico-sodio citrato (96.5%) alla temperatura di 40 °C per 50 minuti.

Attraverso questo procedimento è stato possibile rimuovere la parete cellulare presente nel tessuto e permettere una sua dispersione monocellulare.

Le sospensioni monocellulari ottenute, sono state centrifugate a 1500 g per 5 minuti ed il sovrantante eliminato.

Un numero minimo di cinque lavaggi con soluzioni fresche di Carnoy, sono stati eseguiti per eliminare i residui di citoplasma all'interno della cellula, permettere una adeguata dispersione dei cromosomi ed ottenere metafasi qualitativamente adeguate per l'analisi delle aberrazioni cromosomiche.

Al termine dei lavaggi, un adeguato volume della sospensione cellulare così ottenuta, è stata dispersa per gocciolamento su vetrini per microscopia, preventivamente puliti in etanolo. I preparati, sono stati asciugati all'aria e colorati in una soluzione acquosa di Giemsa al 3% per 6 minuti.

Per ciascun punto sperimentale sono state analizzate un minimo di 100 metafasi per l'analisi delle aberrazioni cromosomiche.

Le aberrazioni cromosomiche sono state classificate in accordo con le linee guida pubblicate dall'Agenzia Internazionale per l'Energia Atomica di Vienna (IAEA).

2.6 TEST DEL MICRONUCLEO

Il test del micronucleo (MN) è stato proposto nel 1976 da Countryman e Heddle per la valutazione del danno cromosomico indotto o spontaneo, è un metodo più rapido e meno soggetto ad artefatti tecnici rispetto all'analisi metafasica.

Il test utilizza cellule in interfase che sono facilmente analizzabili in elevato numero, permettendo un rapido *screening* di un'ampia popolazione cellulare. Queste caratteristiche hanno reso il test del micronucleo una metodica complementare alla convenzionale analisi metafasica

I micronuclei appaiono nel citoplasma come piccoli nuclei accessori, morfologicamente identici al nucleo principale ma di dimensioni ridotte.

Possono essere formati da frammenti che, privi di centromero, non segregano correttamente alla divisione cellulare, o da interi cromosomi i quali, ritardando la migrazione anafasica, restano esclusi dai nuclei principali. Durante la telofase si ricostituisce l'involucro nucleare anche attorno ai frammenti e ai cromosomi non migrati che gradualmente si decondenseranno in interfase assumendo la tipica morfologia dei MN.

Quindi i micronuclei rappresentano un indicatore diretto sia di rotture a livello cromosomico, sia di alterazioni dell'apparato del fuso mitotico e determinarne la frequenza significa valutare il danno cromosomico esistente. Figura 17

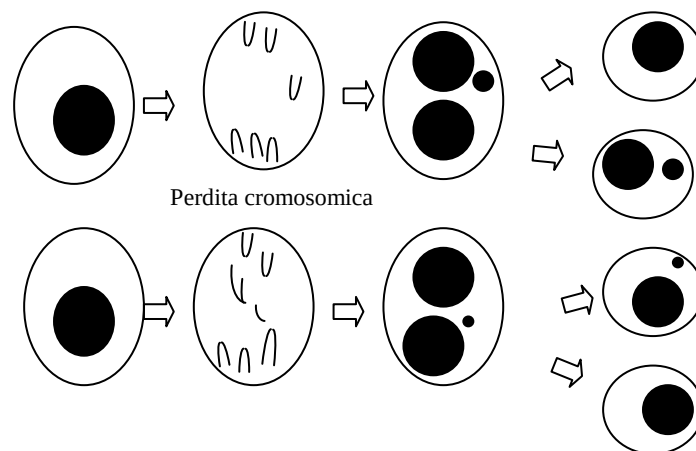


Figura 17 Meccanismo di formazione dei micronuclei.

2.6.1 Protocolli sperimentali

Negli schemi riportati di seguito sono illustrati i protocolli sperimentali per l'induzione e l'analisi dei micronuclei.

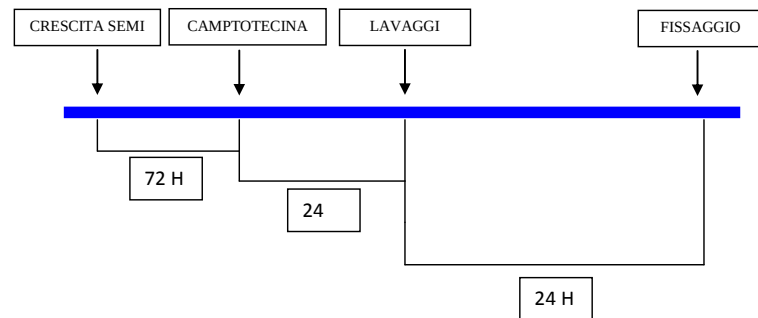


Figura 18 Protocollo sperimentale per l'induzione di Micronuclei in seguito a trattamento con Camptotecina

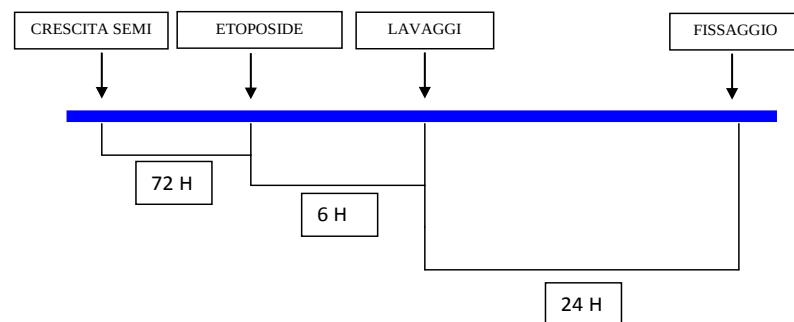


Figura 19 Protocollo sperimentale per l'induzione di micronuclei in seguito a trattamento con etoposide.

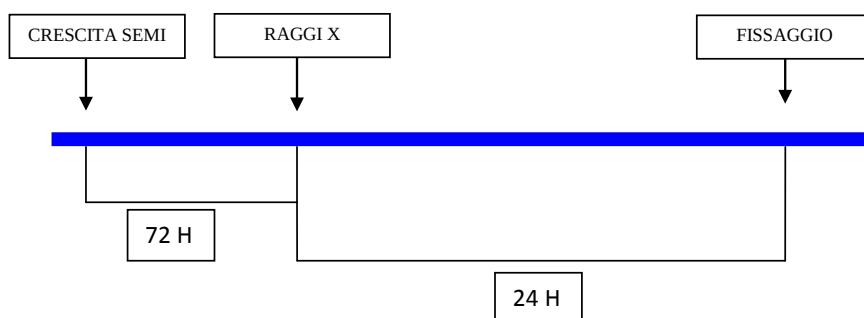


Figura 20 Protocollo sperimentale per l'induzione di Micronuclei in seguito a trattamento con raggi X

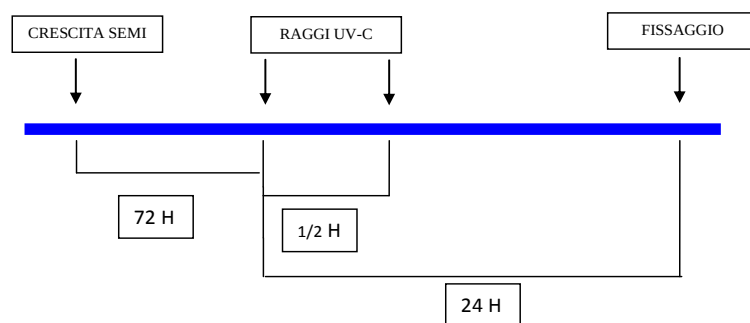


Figura 21 Protocollo sperimentale per l'induzione di micronuclei in seguito a trattamento raggi UV-C

Lo schema sperimentale risulta identico, sia per i tempi di azione che per le concentrazioni utilizzate, a quello adottato per le aberrazioni cromosomiche, con la differenza che per il test del micronucleo non viene aggiunta colchicina poiché l'analisi citogenetica è eseguita in interfase.

2.6.2 Preparazione dei vetrini

I germogli, opportunamente fissati in Carnoy, (come descritto precedentemente per le aberrazioni cromosomiche), sono successivamente lavati in acqua distillata per almeno 5 minuti e sottoposti a trattamento con HCl 1N a 60°C per 10 minuti. Al termine dell'idrolisi con HCl si procede alla colorazione del preparato utilizzando il reagente di Schiff per 1-3 ore. Al termine della colorazione il preparato viene lavato in acqua distillata e conservato a +4°C per alcune ore.

La parte mitoticamente attiva del germoglio che si presenta con un colore viola molto acceso, viene posta su un vetrino portaoggetti per microscopia e sminuzzata con bisturi in una goccia di acido acetico al 45%.

Il preparato viene quindi coperto con coprioggetto e sottoposto a schiacciamento meccanico al fine di ottenere una adeguata dispersione delle cellule.

I preparati così ottenuti sono posti su un blocco di ghiaccio secco, per almeno 5 minuti, per consentire rimozione del copri oggetto e poi disidratati in una serie di immersioni in soluzioni di etanolo al 70, 90 e 100% per 5 minuti.

Il vetrino viene infine chiuso permanentemente con coprioggetto.

L'analisi procede con la conta del numero totale di micronuclei calcolati su 1000 cellule in interfase e l'analisi della distribuzione di micronuclei per ogni cellula.

2.7 INDICE MITOTICO

L'indice mitotico rappresenta la frazione di cellule in metafase su una popolazione cellulare.

Esso costituisce quindi un indice di "vitalità" delle cellule in quanto indica quanto la loro proliferazione sia stata rallentata dal trattamento sperimentale effettuato.

Infatti dopo il trattamento con agente chimico o fisico, alcune cellule risulteranno troppo danneggiate ed andranno incontro ad apoptosi (morte cellulare), altre ripareranno il danno al DNA provocando un arresto o un rallentamento del ciclo cellulare; eventi riscontrabili con un abbassamento dell'indice mitotico. L'indice mitotico è stato inoltre utilizzato, in esperimenti preliminari, come strumento per individuare dosi e tempi d'azione degli agenti chimici e fisici, valutando la curva dose-effetto.

Gli schemi sperimentali utilizzati per la valutazione dell'indice mitotico, sono i medesimi adottati per l'induzione delle aberrazioni cromosomiche.

Per la preparazione dei vetrini dell'indice mitotico si procede in maniera del tutto analoga al test del micronucleo.

Allestito il preparato citogenetico, si procede alla conta delle cellule in metafase calcolate su un totale di 1000 cellule in interfase.

RISULTATI

3 RISULTATI

3.1 INDUZIONE DI ABERRAZIONI CROMOSOMICHE

Il test delle aberrazioni cromosomiche è un test molto potente che consente di individuare le aberrazioni di tipo numerico e strutturale. Le prime comportano cambiamenti nel numero di interi assetti cromosomici (poliploidia), o modificazioni nel numero di singoli, specifici cromosomi (aneuploidia), le seconde invece derivano da una modificazione nella sequenza del DNA lungo l'asse del cromosoma, in seguito ad eventi di rottura del cromosoma stesso (aberrazioni cromosomiche).

3.1.1 Aberrazioni cromosomiche indotte da camptotecina

La Camptotecina (CPT) è un alcaloide naturale isolato circa 50 anni fa da Wall e collaboratori, da una pianta tipica della Cina meridionale *Camptotheca acuminata*.



Figura 22 *Camptotheca acuminata* dalla quale viene estratta la camptotecina.

Questa molecola interagisce con l'enzima DNA topoisomerasi I, generando rotture a singolo filamento nel DNA.

La camptotecina ed i suoi analoghi sono citotossici, anche per le cellule tumorali di origine epiteliale ed endoteliale ed è infatti attualmente è utilizzata come farmaco antitumorale.

Il bersaglio cellulare della camptotecina è la DNA topoisomerasi I, un enzima che taglia in modo specifico e reversibile determinate sequenze lungo il singolo filamento di DNA. Tale attività è finalizzata alla risoluzione dei superavvolgimenti negativi del DNA generati durante i processi di trascrizione e replicazione. Terminato il processo, l'enzima viene allontanato ripristinando l'integrità della molecola di DNA.

In presenza di camptotecina, la DNA topoisomerasi I forma un legame irreversibile con il DNA detto "cleavable complex". Quando questo viene raggiunto dalla forza replicativa, durante i processi di trascrizione e di replicazione del DNA, genera rotture a singolo filamento che possono evolvere in rotture a doppio filamento con conseguente produzione di aberrazioni cromosomiche (figura 23) (Mosesso et al 1999).

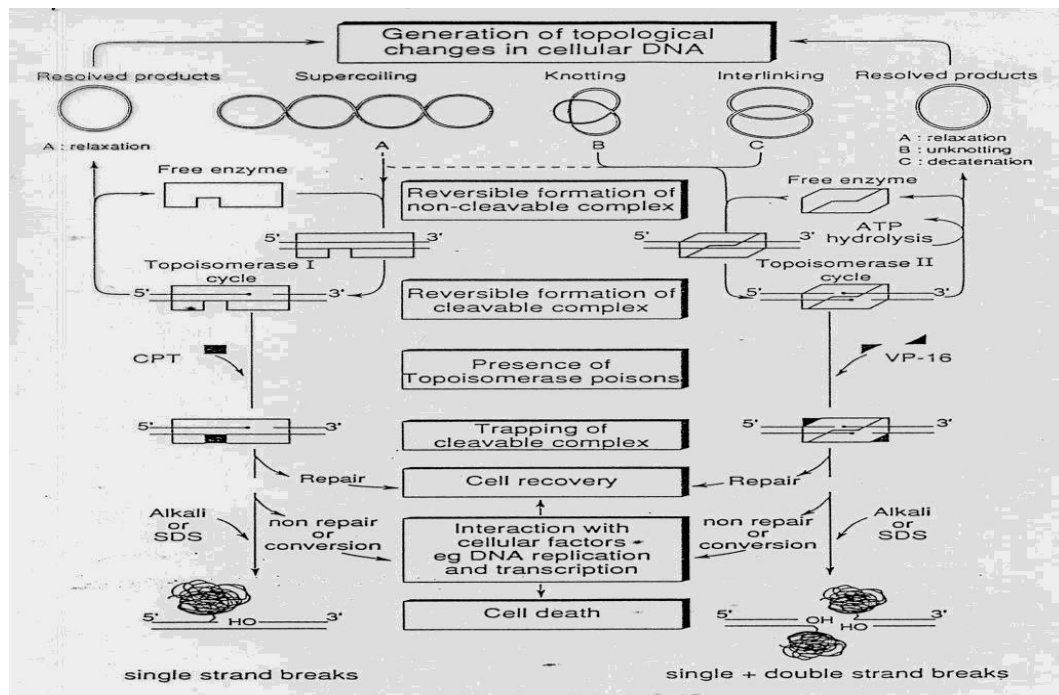


Figura 23 Meccanismo d'azione della camptotecina e dell'etoposide.

La percentuale di cellule contenenti aberrazioni cromosomiche, ottenute in seguito a trattamento con Camptotecina alle dosi 0.05 e 0.1μM, secondo i protocolli sperimentali mostrati in figura 13, sono presentati nelle figure 24 e 25

Nella figura 24 sono riportati i risultati ottenuti per il frumento tenero (cultivar Bobwhite) nel *wild type* e nelle corrispondenti linee transgeniche trasformate col metodo biolistico: IPGP e LMW-GS.

Nella figura 25 sono riportati i risultati ottenuti, in seguito al medesimo trattamento, nel frumento duro (cultivar Svevo) trasformato con *Agrobacterium tumefaciens*, per il silenziamento del gene SBEIIa e nella sua controparte *wild type*.

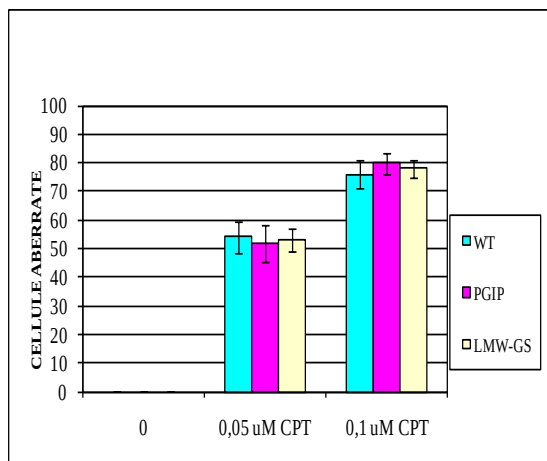


Figura24 Cellule aberrante indotte da camptotecina

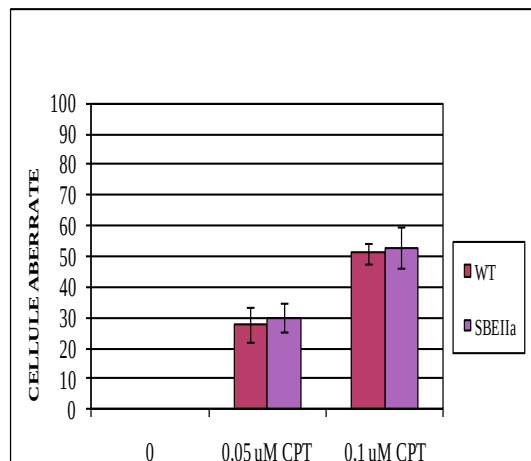


Figura 25 Cellule aberrante indotte da camptotecina

I risultati ottenuti indicano incrementi dose-dipendenti e statisticamente significativi dell'induzione di aberrazioni cromosomiche (cellule con aberrazioni cromosomiche) in seguito a trattamento con camptotecina, rispetto alle linee non trattate.

Le frequenze di cellule con aberrazioni nelle linee di controllo e nelle linee trasformate, non mostrano differenze statisticamente significative (Fisher's exact test).

I profili delle specifiche aberrazioni cromosomiche indotte nelle linee transgeniche e nelle corrispondenti linee *wild type*, sono riportati nelle tabelle 1 e 2.

CAMPTOTECINA	Cromatidiche	Cromosomiche			Isol.	Ab totali/100 cellule	Cellule Ab/100
	Del	Exch	Ring	Dic	B''		
WT K	0	0	0	0	0	0	0
WT 0,05uM	16	17Tr+10Qr	8	10	3	64	54
WT 0,1 uM	21	20Tr+10Qr	15	19	9	103	76
PGIP K	0	0	0	0	0	0	0
PGIP 0,05uM	18	10Tr+15Qr	6	13	4	66	52
PGIP 0,1uM	23	17Tr+19Qr	17	17	7	100	80
LMW-GS K	0	0	0	0	0	0	0
LMW-GS 0,05uM	15	13Tr+11Qr	7	14	8	68	53
LMW-GS 0,1uM	24	17Tr+15Qr	13	19	10	98	78

Tabella 1 Analisi qualitativa del danno al DNA indotto da camptotecina nelle due linee frumento tenero trasformate con metodo biolistico e nel corrispondente *wild type*

(**Del:** delezione, **Exch:** scambio cromatidico, **Tr:** triradiale, **Qr:** quadriradiale, **Ring:** cromosoma ad anello, **Dic:** cromosoma di centrico, **B'':** frammento cromosomico)

CAMPTOTECINA	Cromatidiche	Cromosomiche			Isol.	Ab totali/100 cellule	Cellule Ab/100
	Del	Exch	Ring	Dic	B''		
WT K	0	0	0	0	0	0	0
WT 0,05 uM	2	4Tr+2Qr	6	12	2	28	28
WT 0,1 uM	6	13Tr+9Qr	8	19	4	59	51
SBEIIa K	0	0	0	0	0	0	0
SBEIIa 0,05 uM	3	6Tr+1Qr	5	13	2	30	30
SBEIIa 0,1 uM	8	15Tr+7Qr	9	13	6	58	53

Tabella 2 Analisi qualitativa del danno al DNA indotto da camptotecina nella linea di frumento duro trasformata con *Agrobacterium* e nel corrispondente wild type
(**Del**: delezione, **Exch**: scambio cromatidico, **Tr**: triradiale, **Qr**: quadriradiale, **Ring**: cromosoma ad anello, **Dic**: cromosoma di centrico, **B''**: frammento cromosomico)

I risultati ottenuti mostrano, come atteso sulla base del meccanismo d'azione della camptotecina, una predominanza di aberrazioni di tipo cromatidico come delezioni e scambi, rispetto a quelle cromosomiche (figura 26) con un profilo simile nelle linee transgeniche e nelle corrispondenti controparti *wild type*.

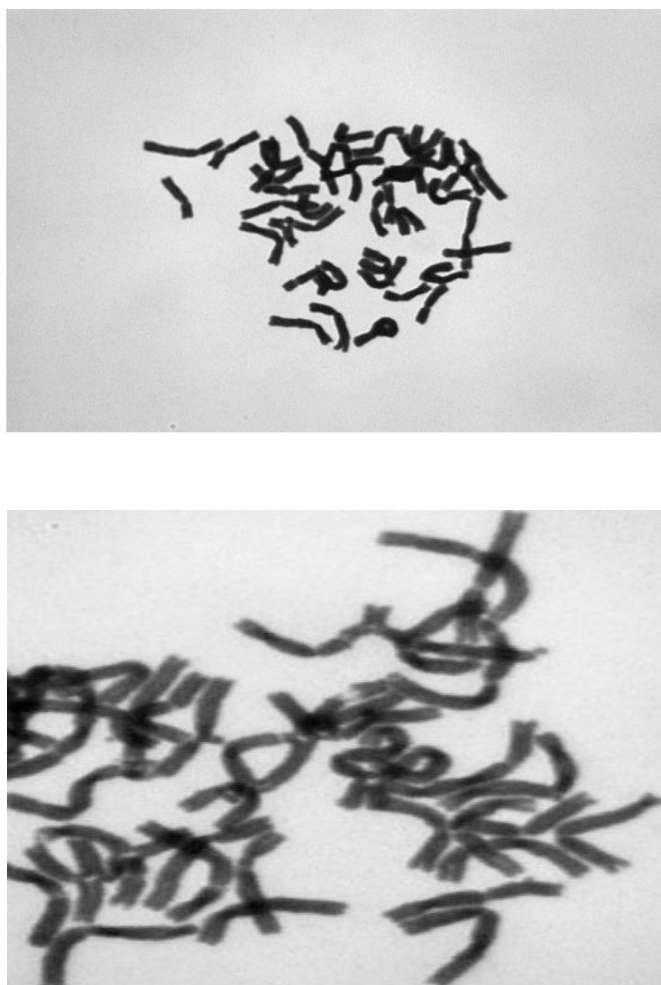


Figura 26 Metafasi aberrante in seguito a trattamento con camptotecina

Parallelamente all'analisi delle aberrazioni cromosomiche sono stati calcolati i valori degli **indici mitotici** (MI) riportati come percentuali nelle figura 27 per i genotipi di frumento tenero e nella figura 28 per i genotipi di frumento duro.

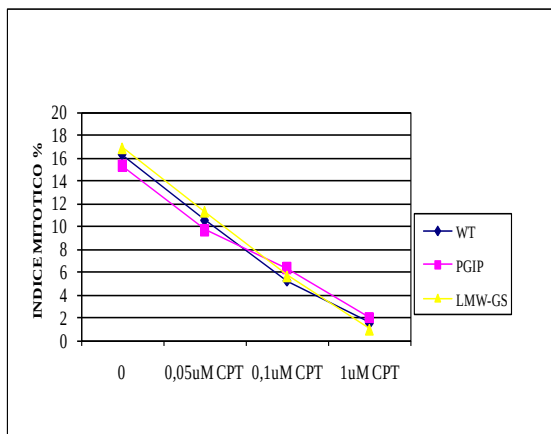


Figura 27 Valori del MI indotti da CPT

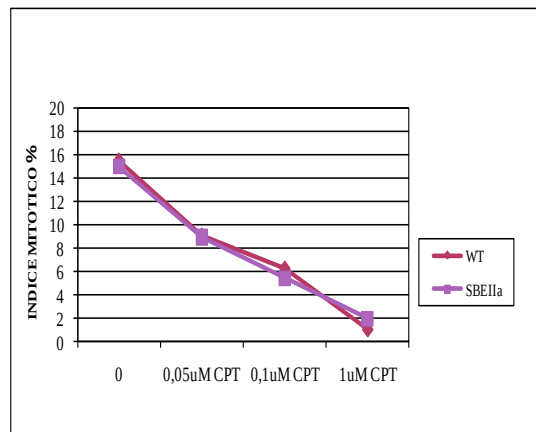


Figura 28 Valori del MI indotti da CPT

L'analisi dell'indice mitotico è di fondamentale importanza per valutare l'attività proliferativa delle differenti linee.

Questo parametro è particolarmente rilevante per valutare l'effetto citotossico del trattamento ed è discriminante per la scelta delle dosi appropriate da usare per i trattamenti con l'agente genotossico selezionato.

I risultati ottenuti indicano una marcata riduzione dose-dipendente dell'indice mitotico nelle differenti linee trattate rispetto alle corrispondenti linee non trattate. La dose più alta (1 µM) abolisce completamente l'attività mitotica e pertanto viene esclusa dal successivo impiego nell'analisi delle aberrazioni cromosomiche e dei micronuclei.

3.1.2 Aberrazioni cromosomiche indotte da etoposide

L'Etoposide è ricavato dalla pianta erbacea *Podophyllum peltatum*.

Tutte le parti della pianta, eccetto il frutto sono velenose. In medicina viene usata per estrarre il principio attivo *podofillotossina* e produrre altri derivati come etoposide, teniposide. Queste sostanze sono usate come agenti chemioterapici per la cura delle neoplasie.

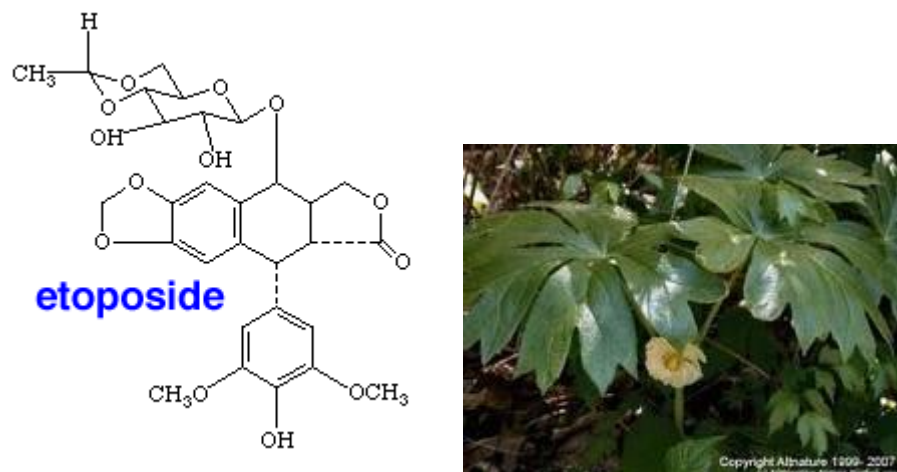


Figura 29 *Podophyllum peltatum* dalla quale si estrae etoposide e struttura chimica della molecola.

Il meccanismo d'azione dell'etoposide, mostrato in figura 23 è analogo a quello della camptotecina.

Il bersaglio cellulare dell'etoposide è la DNA topoisomerasi II, un enzima che taglia in modo specifico e reversibile lungo determinate sequenze del doppio filamento di DNA, attraverso la produzione di un complesso intermedio denominato “cleavable complex”. Tale attività è finalizzata alla decatenazione di molecole di DNA reciprocamente legate generate durante i processi di trascrizione e replicazione. Terminato il processo, l'enzima viene allontanato ripristinando l'integrità della molecola di DNA. In presenza di etoposide, la DNA topoisomerasi II forma un legame irreversibile con il DNA generando di conseguenza rotture a doppio filamento che, in assenza di riparazione, possono generare aberrazioni cromosomiche (Mosesso et al., 1998).

La percentuale di cellule contenenti aberrazioni cromosomiche, ottenute in seguito a trattamento con etoposide alle dosi 1 e 2 mM, secondo i protocolli sperimentali mostrati in figura 14, sono presentati nelle figure 30 e 31.

Nella figura 30 sono riportati i risultati ottenuti per il frumento tenero nel *wild type* e nelle corrispondenti linee transgeniche trasformate col metodo biolistico: IPGP e LMW-GS.

Nella figura 31 sono riportati i risultati, ottenuti in seguito al medesimo trattamento, nel frumento duro trasformato con *Agrobacterium tumefaciens*, e nella controparte *wild type*.

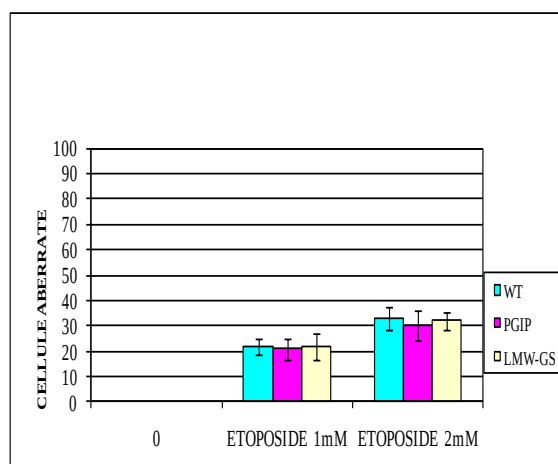


Figura 30 Cellule aberrante indotte da etoposide

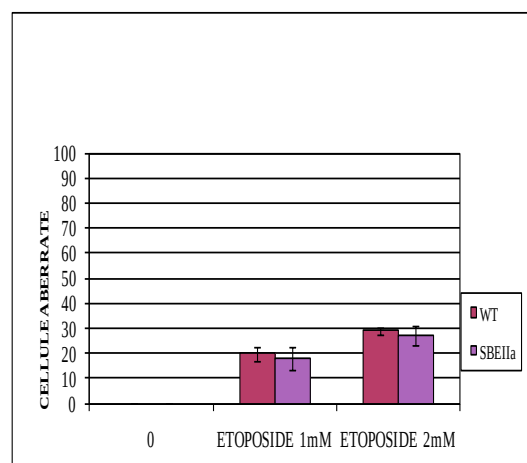


Figura 31 Cellule aberrante indotte da etoposide

I risultati indicano incrementi dose-dipendenti e statisticamente significativi dell'induzione di aberrazioni cromosomiche nelle linee *wild type* e nelle corrispondenti linee transgeniche, rispetto alle linee non trattate con etoposide.

Le frequenze di cellule aberrante nelle linee di controllo e nelle linee transgeniche non mostrano differenze statisticamente significative (Fisher's exact test).

I profili delle specifiche aberrazioni cromosomiche indotte nelle linee transgeniche e nelle corrispondenti linee *wild type*, sono riportati nelle tabelle 3 e 4.

ETOPOSIDE	Cromatidiche		Cromosomiche		Isol.	Ab. totali/100 cellule	Cellule Ab/100
	Del	Exch	Ring	Dic	B''		
WTK	0	0	0	0	0	0	0
WT 1mM	3	1Tr+0Qr	5	13	2	24	22
WT 2mM	3	2Tr+0Qr	9	17	5	36	33
PGIP K	0	0	0	0	0	0	0
PGIP 1mM	3	0Tr+0Qr	4	9	5	21	21
PGIP 2mM	3	0Tr+1Qr	13	13	7	37	30
LMW-GS K	0	0	0	0	0	0	0
LMW-GS 1mM	1	0Tr+0Qr	8	8	5	22	22
LMW-GS 2mM	2	0Tr+1Qr	9	20	8	40	32

Tabella 3 Analisi qualitativa del danno al DNA indotto da etoposide nelle due linee frumento tenero trasformate con metodo bi olistico e nel corrispondente wild type
(**Del**: delezione, **Exch**: scambio cromatidico, **Tr**: triradiale, **Qr**: quadriradiale, **Ring**: cromosoma ad anello, **Dic**: cromosoma di centrico, **B''**: frammento cromosomico)

ETOPOSIDE	Cromatidiche		Cromosomiche		Isol.	Ab. totali/100 cellule	Cellule Ab/100
	Del	Exch	Ring	Dic	B''		
WTK	0	0	0	0	0	0	0
WT 1mM	3	0Tr+1Qr	5	7	5	21	20
WT 2mM	3	1Tr+0Qr	6	15	7	32	29
SBElLa K	0	0	0	0	0	0	0
SBElLa 1mM	1	0Tr+0Qr	6	8	6	21	18
SBElLa 2mM	2	1Tr+0Qr	7	10	10	30	27

Tabella 4 Analisi qualitativa del danno al DNA indotto da etoposide nella linea di frumento duro trasformata con *Agrobacterium* e nel corrispondente wild type
(**Del**: delezione, **Exch**: scambio cromatidico, **Tr**: triradiale, **Qr**: quadriradiale, **Ring**: cromosoma ad anello, **Dic**: cromosoma di centrico, **B''**: frammento cromosomico)

I risultati mostrano, come atteso sulla base del meccanismo d'azione dell'etoposide, una predominanza di aberrazioni di tipo cromosomico come dicentrici e “ring” rispetto a quelle cromatidiche (figura 32) con un profilo simile nelle linee transgeniche e nei corrispondenti *wild type*.

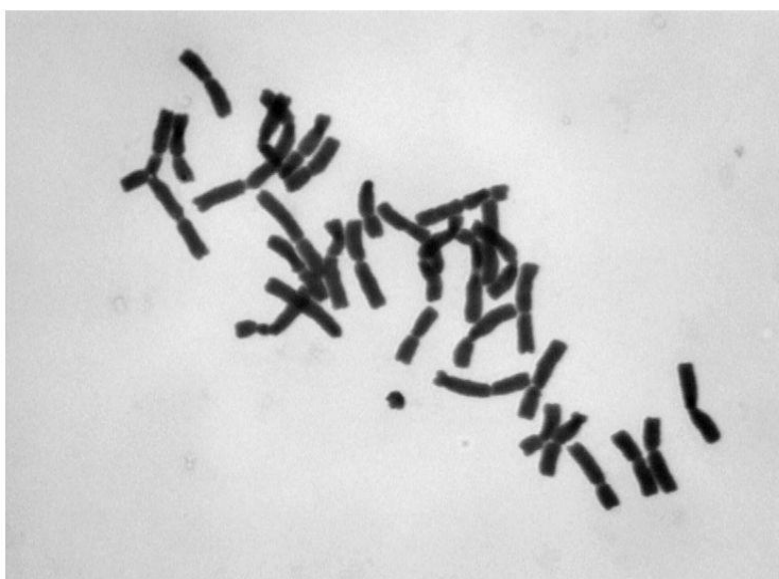


Figura 32a Metafase aberrata in seguito a trattamento con etoposide

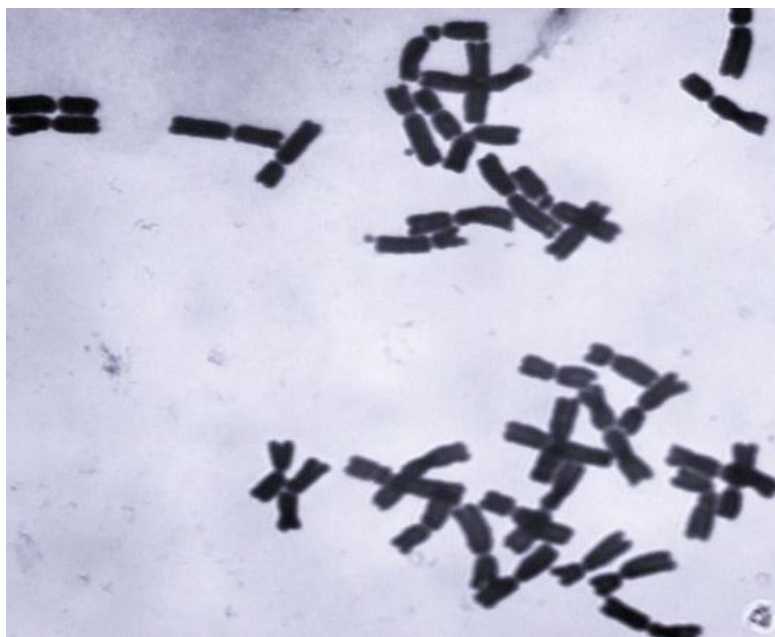


Figura 32b Metafase aberrata in seguito a trattamento con etoposide

Parallelamente all'analisi delle aberrazioni cromosomiche sono stati calcolati i valori degli indici mitotici riportati come percentuali nelle figure 33 per i genotipi di frumento tenero e 34 per i genotipi di frumento duro.

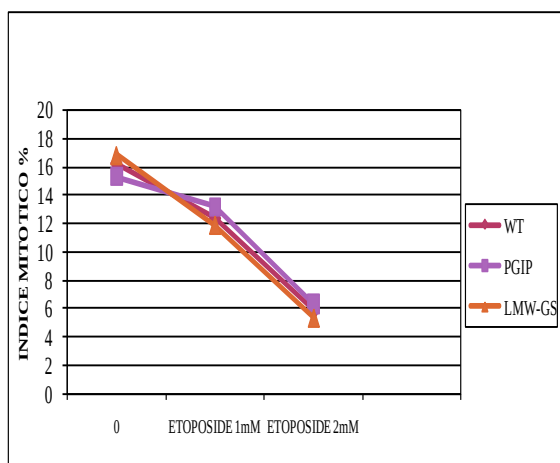


Figura 33 Valori del MI indotti da etoposide

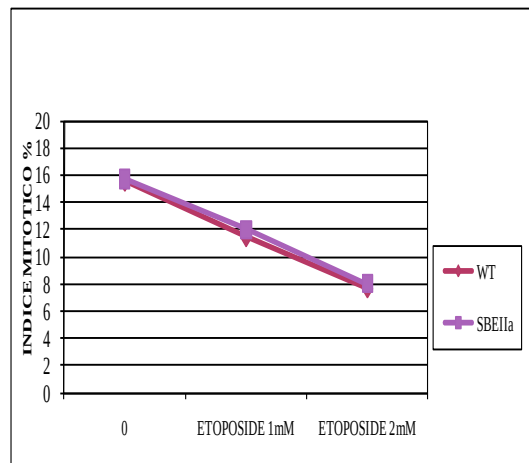


Figura 34 Valori del MI indotti da etoposide

I risultati ottenuti indicano una marcata riduzione dose-dipendente dell'indice mitotico nelle differenti linee trattate rispetto alle corrispondenti linee non trattate.

Non sono state osservate differenze significative, per quanto riguarda la riduzione dell'attività mitotica, tra le linee transgeniche e le corrispondenti controparti *wild type*.

3.1.3 Aberrazioni cromosomiche indotte da raggi X

La radiazione elettromagnetica ionizzante (raggi X) è un tipo di radiazione a basso LET, capace di indurre una grande varietà di danno alle differenti strutture cellulari ed al DNA. Per ogni traccia di ionizzazione, i raggi X, generano rotture a singolo e doppio filamento, complesso ed eterogeneo danno chimico alle basi, siti abasici e legami “crociati” DNA-DNA e DNA-proteine.

In figura 35 è mostrata la modalità di induzione di danno al DNA mediante azione diretta e indiretta dei raggi X.

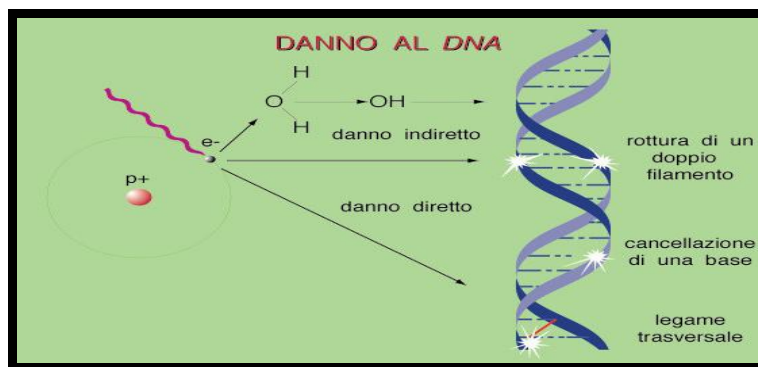


Figura 35 Danno al DNA diretto ed indiretto, indotto dai raggi X.

Per il trattamento le piantine di frumento sono state esposte a tre diverse dosi di raggi X: 0.75, 1.5 e 3 Gy .

Le percentuali di cellule contenenti aberrazioni cromosomiche ottenute in seguito al suddetto trattamento, come mostrato nel protocollo sperimentale in figura 15, sono presentati nelle figure 36 e 37.

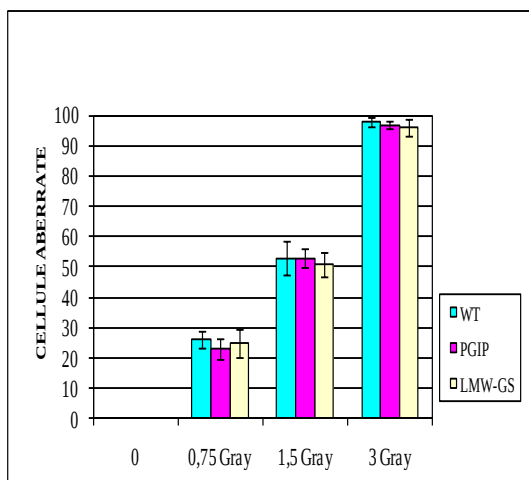


Figura 36 Cellule aberrante indotte da raggi X

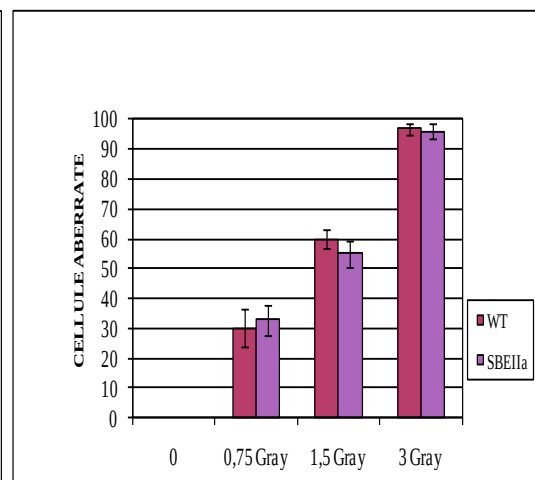


Figura 37 Cellule aberrante indotte da raggi X

I risultati ottenuti indicano incrementi dose-dipendenti e statisticamente significativi dell'induzione di aberrazioni cromosomiche nelle linee trattate con raggi X, rispetto alle linee non trattate. E' interessante notare che alla dose massima impiegata di 3 Gy, la frequenza di cellule aberrate è prossima al 100%. Tuttavia, le frequenze di cellule con aberrazioni nelle linee *wild type* e nelle linee transgeniche non mostrano differenze statisticamente significative (Fisher's exact test).

I profili delle specifiche aberrazioni cromosomiche indotte nelle linee transgeniche e nelle corrispondenti linee *wild type*, sono riportati nelle tabelle 5 e 6.

RAGGI X	Cromatidiche	Cromosomiche			Isol.	Ab>Totali /100 cellule	Cellule Ab/100
	Del	Exch	Ring	Dic	B''		
WTK	0	0	0	0	0	0	0
WT 0,75 GY	9	2 Tr	3	14	3	31	26
WT 1,5 GY	8	1Tr+4Qr	5	31	6	55	53
WT 3 GY	50	11Tr+9Qr	35	65	51	221	98
PGIP K	0	0	0	0	0	0	0
PGIP 0,75 GY	8	0	2	13	8	27	23
PGIP 1,5 GY	13	2Tr+3Qr	4	30	5	57	53
PGIP 3 GY	55	12Tr+12Qr	50	56	40	225	97
LMW-GS K	0	0	0	0	0	0	0
LMW-GS 0,75 GY	7	2 Tr	5	10	5	29	25
LMW-GS 1,5 GY	11	6Tr+1Qr	4	28	3	53	51
LMW-GS 3 GY	45	12Tr+19Qr	47	63	43	229	96

Tabella 5 Analisi qualitativa del danno al DNA indotto da raggi X nelle due linee frumento tenero trasformate con metodo biolistico e nel corrispondente wild type

(**Del**: delezione, **Exch**: scambio cromatidico, **Tr**: triradiale, **Qr**: quadriradiale, **Ring**: cromosoma ad anello, **Dic**: cromosoma di centrico, **B''**: frammento cromosomico)

RAGGI X	Cromatidiche	Cromosomiche			Isol.	Ab>Totali /100 cellule	Cellule Ab/100
	Del	Exch	Ring	Dic	B''		
WTK	0	0	0	0	0	0	0
WT 0,75 GRAY	8	2 Tr	2	14	5	31	30
WT 1,5 GRAY	11	3Tr+2Qr	12	20	11	60	60
WT 3 GRAY	21	4Tr+8Qr	29	38	16	116	100
SBEIIa K	0	0	0	0	0	0	0
SBEIIa 0,75 GRAY	8	4	3	11	7	33	33
SBEIIa 1,5 GRAY	13	2Tr+1Qr	9	22	12	59	55
SBEIIa 3 GRAY	25	5Tr+7Qr	21	41	10	109	96

Tabella 6 Analisi qualitativa del danno al DNA indotto da Raggi X nella linea di frumento duro trasformata con *Agrobacterium* e nel corrispondente wild type

(**Del**: delezione, **Exch**: scambio cromatidico, **Tr**: triradiale, **Qr**: quadriradiale, **Ring**: cromosoma ad anello, **Dic**: cromosoma di centrico, **B''**: frammento cromosomico)

I risultati ottenuti mostrano una distribuzione uniforme di aberrazioni cromosomiche e cromatidiche (figura 38), come atteso sulla base del meccanismo d'azione dei raggi X, con un profilo simile nelle linee transgeniche e nelle corrispondenti controparti *wild type*. Il trattamento con raggi X causa aberrazioni cromosomiche nella fase G₁ del ciclo cellulare e aberrazioni cromatidiche nelle fasi S e G₂. Nelle condizioni sperimentali riportate la popolazione cellulare è asincrona e pertanto si trova in tutte le fasi del ciclo cellulare giustificando la presenza simultanea di aberrazioni cromatidiche e cromosomiche.

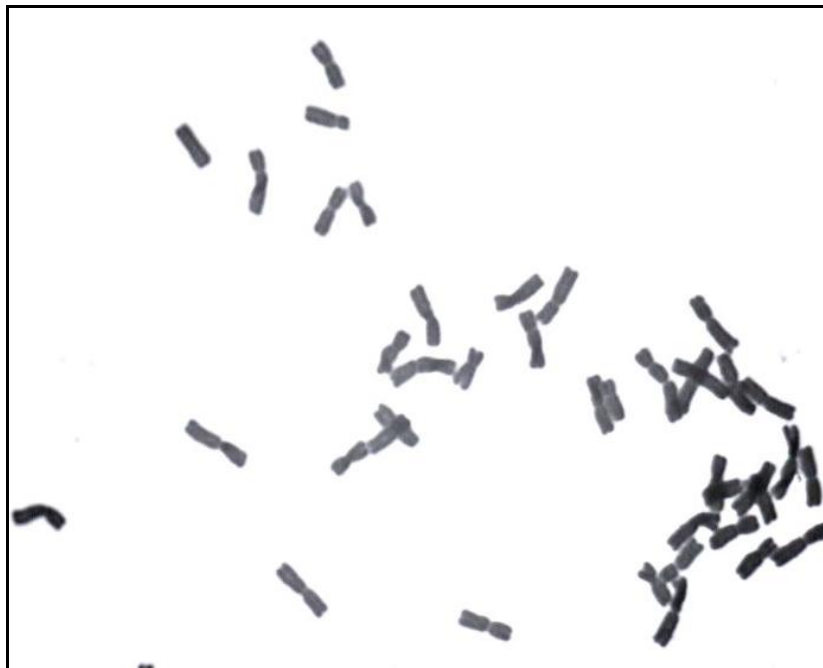


Figura 38 Metafase aberrata, in seguito a trattamento con raggi X

Le variazioni che subisce l'indice mitotico in seguito a trattamento con raggi X sono riportate nelle figure 39 e 40

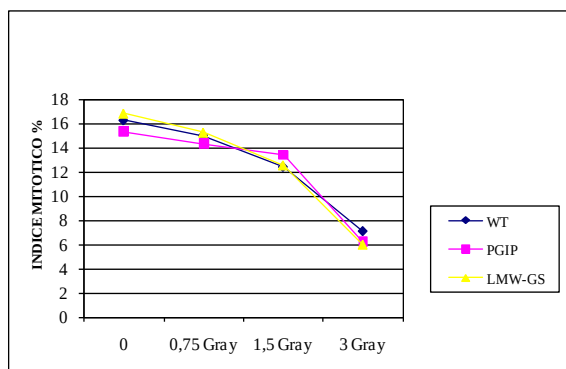


Figura 39 Valori del MI indotti da raggi X

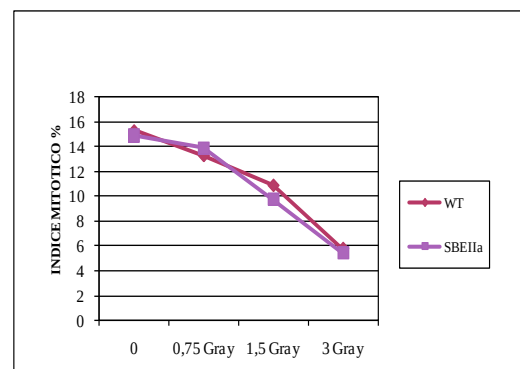


Figura 40 Valori del MI indotti da raggi X

L'indice mitotico subisce un declino dose-dipendente nelle varie linee, senza mostrare differenze statisticamente significative tra linee transgeniche e rispettivi *wild type*.

3.1.4 Aberrazioni cromosomiche indotte da raggi UV-C

Le radiazioni ultraviolette sono radiazioni elettromagnetiche non ionizzanti, allocate nell'intervallo di frequenza che inizia dalla luce violetta nel visibile e arriva fino alle frequenze dei raggi X. La luce ultravioletta, oltre ad indurre danno alle principali strutture cellulari, danneggia preferenzialmente la doppia elica del DNA producendo essenzialmente dimeri di ciclo butano e 6-4 fotoprodotto.

Il trattamento con raggi UV-C è stato condotto per 1 o 2 ore, al fine di somministrare dosi di 3600 e 7200 Joule/m², come mostrato nel protocollo riportato in figura 16.

Le percentuali di cellule che presentano aberrazioni cromosomiche sono presentate nella figura 41 per il frumento tenero e nella figura 42 per il frumento duro.

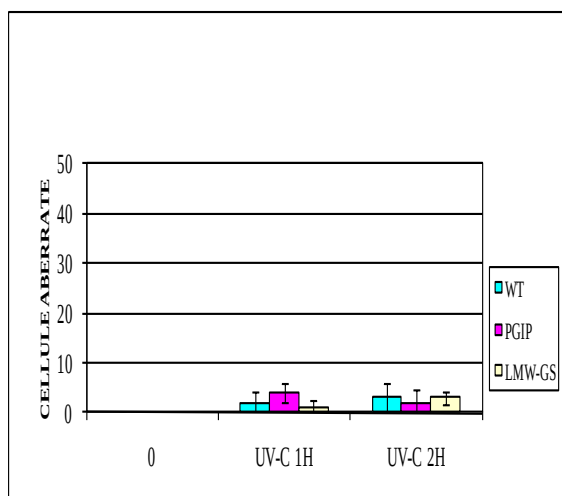


Figura 41 Cellule aberranti indotte da raggi UV-C

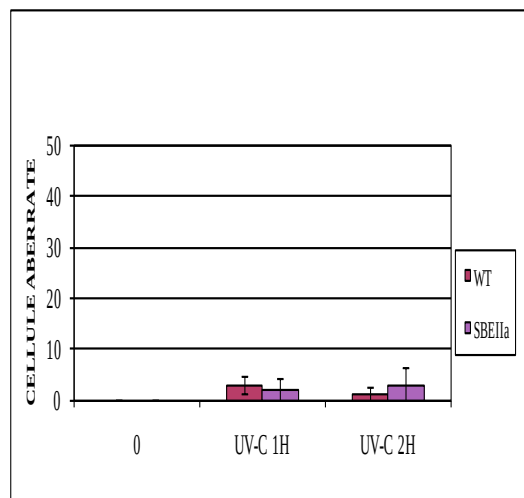


Figura 42 Cellule aberranti indotte da raggi UV-C

I risultati ottenuti indicano che, nonostante la somministrazione di dosi elevate, non è stato riscontrato un incremento significativo di cellule aberranti nelle linee trattate, rispetto ai controlli non trattati (sia nei genotipi transgenici che *wild type*). Ciò indica una forte tolleranza a questo tipo di stress esogeno legata, verosimilmente, ad efficientissimi sistemi di riparazione.

Risultati analoghi si riscontrano per quanto riguarda l'andamento dei valori dell'indice mitotico, che non subiscono variazioni apprezzabili dopo esposizione ai raggi UV-C come mostrato nelle figure 43 e 44.

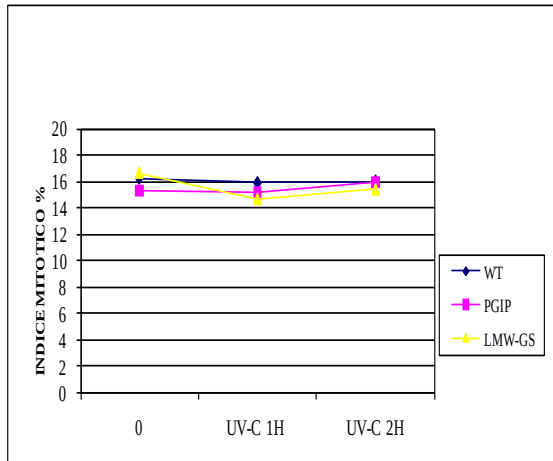


Figura 43 Valori del MI indotti da raggi uv-c

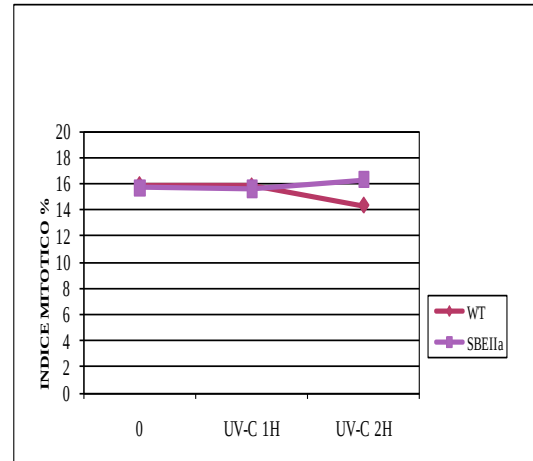


Figura 44 Valori del MI indotti da raggi uv-c

I profili delle specifiche aberrazioni cromosomiche indotte nelle linee transgeniche e nelle corrispondenti linee *wild type*, sono riportati nelle tabelle 7 e 8.

RAGGI UV-C	Cromosomiche				Isol. B''	Ab. totali/100 cellule	Cellule Ab/100
	Cromatidiche Del	Exch	Ring	Dic			
WTK	0	0	0	0	0	0	0
WT 1H UV-C	2	0	0	0	0	2	2
WT 2H UV-C	3	0	0	0	0	3	3
PGIP K	0	0	0	0	0	0	0
PGIP 1H UV-C	3	0	0	0	1	4	4
PGIP 2H UV-C	2	0	0	0	0	2	2
LMW-GS K	0	0	0	0	0	0	0
LMW-GS 1H UV-C	1	0	0	0	0	1	1
LMW-GS 2H UV-C	3	0	0	0	0	3	3

Tabella 7 Analisi qualitativa del danno al DNA indotto da raggi UV-C nelle due linee frumento tenero trasformate con metodo biolistico e nel corrispondente wild type
(**Del**: delezione, **Exch**: scambio cromatidico, **Tr**: triradiale, **Qr**: quadriradiale, **Ring**: cromosoma ad anello, **Dic**: cromosoma di centrico, **B''**: frammento cromosomico)

RAGGI UV-C	Cromatidiche	Cromosomiche				Isol.	Ab. totali/100 cellule	Cellule Ab/100
	Del	Exch	Ring	Dic	B''			
WTK	0	0	0	0	0	0	0	0
WT 1HUV-C	3	0	0	0	0	3	3	3
WT 2HUC-C	0	0	0	0	1	1	1	1
SBElla K	0	0	0	0	0	0	0	0
SBElla 1HUV-C	1	0	0	0	1	2	2	2
SBElla 2HUV-C	2	0	0	0	1	3	3	3

Tabella 8 Analisi qualitativa del danno al DNA indotto da raggi UV-C nella linea di frumento duro trasformata con *Agrobacterim* e nel corrispondente wild type

(**Del**: delezione, **Exch**: scambio cromatidico, **Tr**: triradiale, **Qr**: quadriradiale, **Ring**: cromosoma ad anello, **Dic**: cromosoma di centrico, **B''**: frammento cromosomico)

L'analisi qualitativa del danno al DNA dopo prolungata esposizione a raggi UV-C (1-2 ore) mostra un esiguo numero di delezioni e di frammenti in tutte le linee.

3.2 ANALISI DEI MICRONUCLEI

I micronuclei sono dei piccoli nuclei aggiuntivi che si trovano nel citoplasma delle cellule in interfase che hanno effettuato un ciclo di divisione cellulare. Derivano da un danno che ha subito la cellula e possono essere costituiti da frammenti cromosomici oppure da interi cromosomi che per ragioni meccaniche non sono trasferiti nei nuclei in formazione, rimanendo pertanto nel citoplasma di una delle due cellule figlie (Figura45).

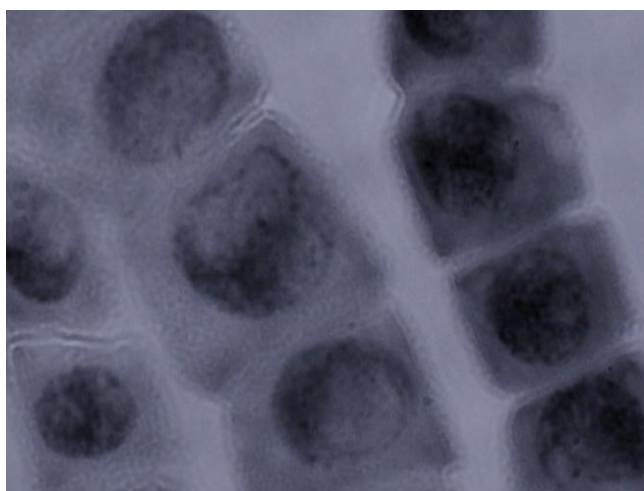


Figura 45a Immagine di cellule normali.

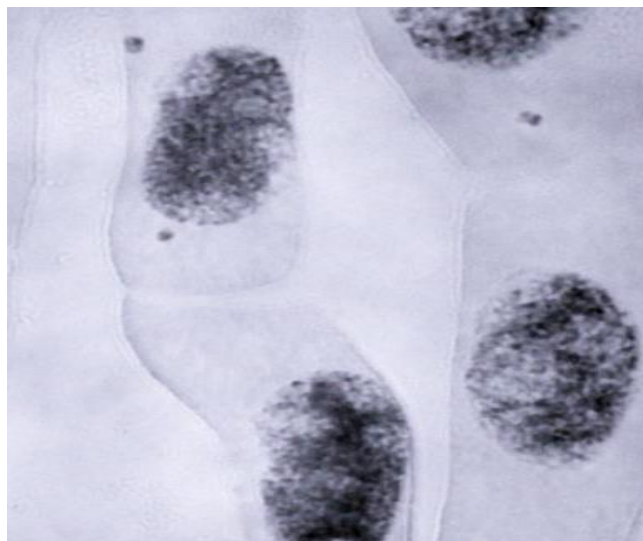


Figura 45b Immagine di cellule con micronuclei

3.2.1 Analisi dei micronuclei indotti da camptotecina.

L'incidenza dei micronuclei per 1000 cellule ottenute in seguito a trattamento con camptotecina alle dosi 0.05 e 0.1 μ M, secondo i protocolli sperimentali mostrati in figura 18, sono presentati nelle figure 46 e 47.

Nella figura 46 sono riportati i risultati ottenuti per il frumento tenero (cultivar Bobwhite) nel *wild type* e nelle corrispondenti linee transgeniche trasformate col metodo biolistico: IPGP e LMW-GS.

Nella figura 47 sono riportati i risultati ottenuti, in seguito al medesimo trattamento, nel frumento duro (cultivar Svevo), trasformato con *Agrobacterium tumefaciens*, per il silenziamento del gene SBEIIa e nella sua controparte *wild type*.

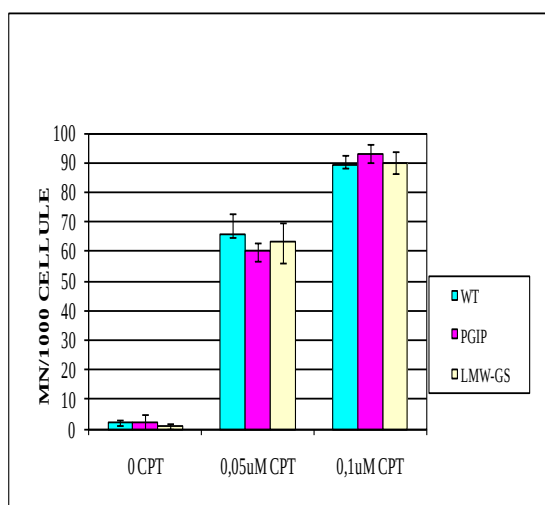


Figura 46 Micronuclei indotti da camptotecina

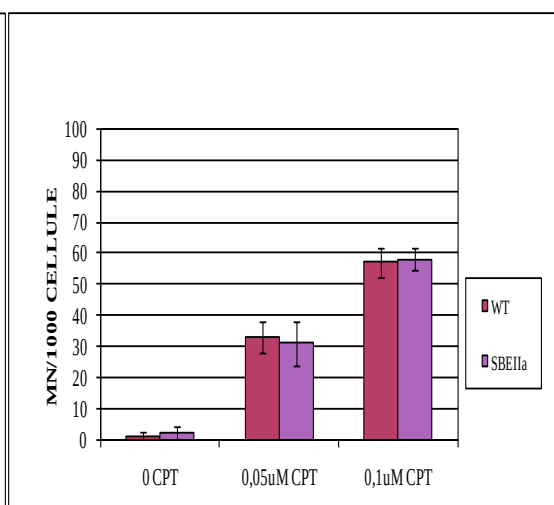


Figura 47 Micronuclei indotti da camptotecina

I risultati ottenuti indicano incrementi dose-dipendenti e statisticamente significativi dell'incidenza dei micronuclei nelle linee trattate con camptotecina, rispetto alle linee non trattate. L'incidenza dei micronuclei nelle linee di controllo e nelle controparti transgeniche non mostra differenze statisticamente significative (Fisher's exact test).

E' interessante notare che l'incidenza dei MN per 1000 nelle linee di frumento tenero (transgeniche e di controllo) è significativamente maggiore rispetto alle linee di frumento duro (transgeniche e di controllo) alle stesse dosi. Questa particolarità può essere spiegata con il fatto che la quantità di DNA presente nel frumento tenero è maggiore rispetto al frumento duro.

I profili della distribuzione del numero dei micronuclei per singola cellula, indotti nelle linee transgeniche e nelle corrispondenti linee *wild type*, sono riportati nelle tabelle 9 e 10.

CAMPTOTECINA					
	0 MN	1MN	2MN	3MN	4/+ MN
WT K	999	1	0	0	0
WT 0,05uM	934	39	14	12	1
WT 0,1 uM	911	55	19	11	4
PGIP K	998	2	0	0	0
PGIP 0,05uM	940	36	12	11	1
PGIP 0,1uM	907	54	23	10	6
LMW-GS K	1000	0	0	0	0
LMW-GS 0,05uM	937	32	17	13	1
LMW-GS 0,1uM	910	53	24	12	1

Tabella 9 Distribuzione dei micronuclei per cellula indotti da camptotecina nelle due linee frumento tenero trasformate con metodo biolistico e nel corrispondente wild type.

CAMPTOTECINA					
	0 MN	1MN	2MN	3MN	4/+ MN
WT K	999	1	0	0	0
WT 0,05uM	967	25	8	0	0
WT 0,1 uM	943	43	12	2	0
SBEIIa K	998	2	0	0	0
SBEIIa 0,05 uM	969	22	8	1	0
SBEIIa 0,1 uM	942	40	15	3	0

Tabella 10 Distribuzione dei micronuclei per cellula indotti da camptotecina nella linea di frumento duro trasformata con *Agrobacterim* e nel corrispondente wild type.

I risultati ottenuti mostrano un profilo di distribuzione di micronuclei per cellula simile nelle linee transgeniche e nelle corrispondenti controparti *wild type*.

3.2.2 Micronuclei indotti da etoposide

L'incidenza dei micronuclei per 1000 cellule ottenute in seguito a trattamento con etoposide alle dosi 1 e 2 mM sono presentati nelle figure 48 e 49.

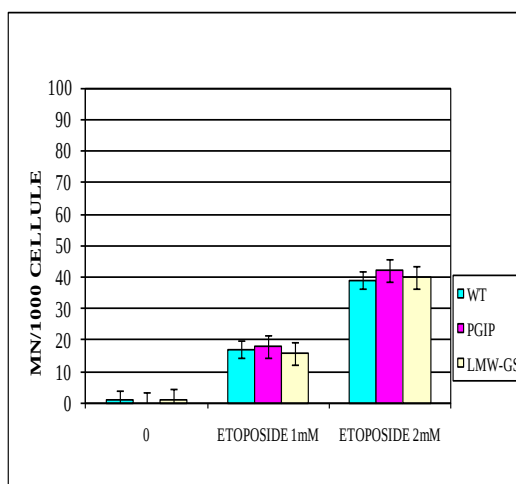


Figura 48 Micronuclei indotti da etoposide

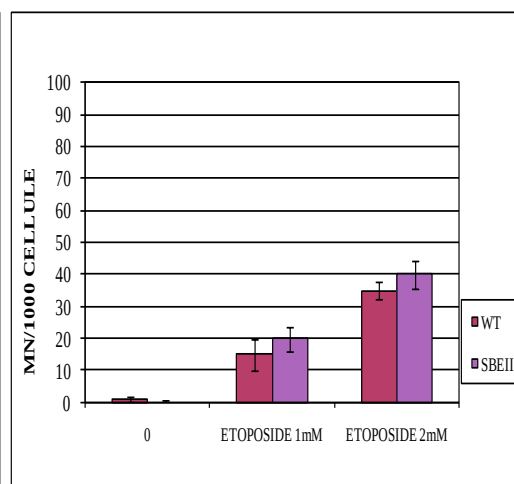


Figura 49 Micronuclei indotti da etoposide

I risultati ottenuti indicano incrementi dose-dipendenti e statisticamente significativi dell'incidenza di micronuclei per 1000 cellule in tutte le linee.

Le frequenze di cellule con micronuclei nelle linee *wild type* e nelle linee transgeniche non mostrano differenze statisticamente significative (Fisher's exact test).

I profili della distribuzione del numero dei micronuclei per singola cellula, indotti nelle linee transgeniche e nelle corrispondenti linee *wild type*, sono riportati nelle tabelle 11 e 12.

ETOPOSIDE					
	0 MN	1MN	2MN	3MN	4/+ MN
WT K	999	1	0	0	0
WTE 1mM	983	10	4	2	1
WT 2mM	961	19	11	7	2
PGIP K	1000	0	0	0	0
PGIP 1mM	982	9	5	3	1
PGIP 2mM	958	22	10	6	4
LMW-GS K	999	1	0	0	0
LMW-GS 1mM	984	8	5	3	0
LMW-GS 2mM	960	23	12	3	2

Tabella 11 Distribuzione dei micronuclei per cellula indotti da etoposide nelle due linee frumento tenero trasformate con metodo biolistico e nel corrispondente *wild type*.

ETOPOSIDE					
	0 MN	1MN	2MN	3MN	4/+ MN
WT K	999	1	0	0	0
WT 1mM	985	13	2	0	0
WT 2mM	965	20	15	5	0
SBEIIa K	1000	0	0	0	0
SBEIIa 1mM	980	15	4	1	0
SBEIIa 2mM	960	21	15	4	0

Tabella 12 Distribuzione dei micronuclei indotti da etoposide nella linea di frumento duro trasformata con *Agrobacterim* e nel corrispondente *wild type*.

Le linee transgeniche e le corrispondenti linee di controllo mostrano un profilo simile di distribuzione di micronuclei per cellula.

3.2.3 Micronuclei indotti da raggi X

L'incidenza dei micronuclei per 1000 cellule ottenuta in seguito a trattamento con raggi X alle dosi di 0.75, 1.5 e 3 Gy secondo i protocolli sperimentali mostrati in figura 20 è presentata nella figura 50 per il frumento tenero e 51 per il frumento duro.

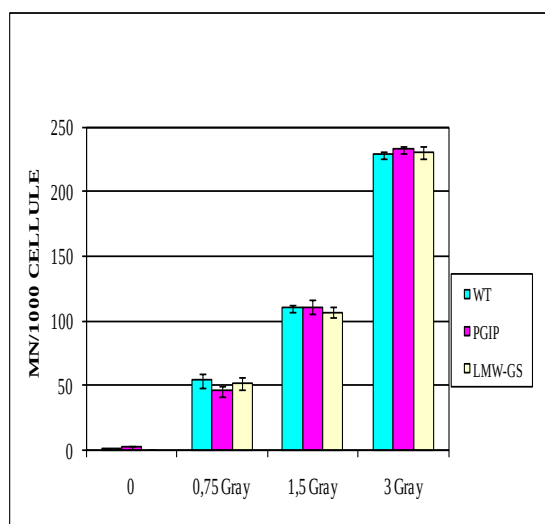


Figura 50 Micronuclei indotti da raggi X

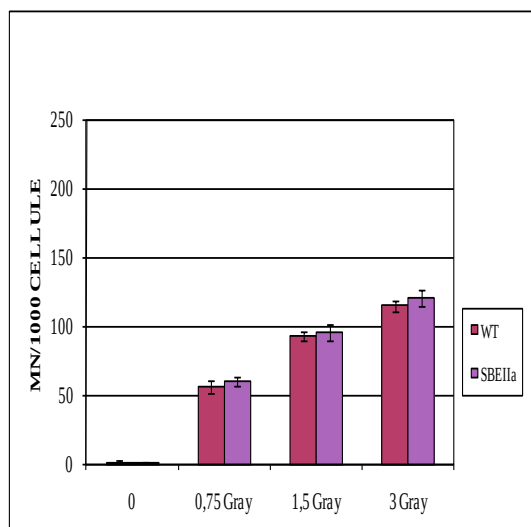


Figura 51 Micronuclei indotti da raggi X

I risultati ottenuti indicano marcati incrementi dose-dipendenti e statisticamente significativi dell'incidenza di micronuclei per 1000 cellule nelle linee trattate rispetto alle linee non trattate con raggi X. Tuttavia, le frequenze di cellule con micronuclei nelle linee *wild type* e nelle linee transgeniche non mostrano differenze statisticamente significative (Fisher's exact test).

In accordo con quanto ottenuto in seguito all'analisi delle aberrazioni cromosomiche, l'incidenza dei MN per 1000 nelle linee di frumento tenero (transgeniche e di controllo) è significativamente maggiore rispetto alle linee di frumento duro (transgeniche e di controllo) alle stesse dosi. Analogamente questa particolarità può essere spiegata con il fatto che la quantità di DNA presente nel frumento tenero è maggiore rispetto al frumento duro.

I profili della distribuzione del numero dei micronuclei per singola cellula, indotti nelle linee transgeniche e nelle corrispondenti linee *wild type*, sono riportati nelle tabelle 13 e 14.

RAGGI X					
	0 MN	1MN	2MN	3MN	4/+ MN
WT K	999	1	0	0	0
WT 0,75 GY	946	35	12	6	1
WT 1,5 GY	890	74	23	11	2
WT 3 GY	771	123	67	26	13
PGIP K	998	2	0	0	0
PGIP 0,75 GY	954	31	10	4	1
PGIP 1,5 GY	889	73	25	10	3
PGIP 3 GY	767	125	70	28	10
LMW-GS K	1000	0	0	0	0
LMW-GS 0,75 GY	948	32	12	7	1
LMW-GS 1,5 GY	893	70	24	12	1
LMW-GS 3 GY	769	120	68	29	14

Tabella 13 Distribuzione dei micronuclei per cellula indotti da raggi X nelle due linee frumento tenero trasformate con metodo biolistico e nel corrispondente *wild type*.

RAGGI X					
	0 MN	1MN	2MN	3MN	4/+ MN
WT K	999	1	0	0	0
WT 0,75 GY	944	49	6	1	0
WT 1,5 GY	907	82	10	1	0
WT 3 GY	885	97	14	3	1
SBElla K	999	1	0	0	0
SBElla 0,75 GY	940	55	5	0	0
SBElla 1,5 GY	905	81	13	1	0
SBElla 3 GY	880	100	17	1	2

Tabella 14 Distribuzione dei micronuclei indotti da raggi x nella linea di frumento duro trasformata con *Agrobacterim* e nel corrispondente *wild type*

I risultati ottenuti mostrano un profilo di distribuzione simile del numero di micronuclei per cellula nelle linee transgeniche e nelle corrispondenti controparti *wild type*.

3.2.3 Micronuclei indotti da raggi UV-C

Il numero di micronuclei per 1000 cellule ottenuti in seguito a trattamento con raggi UV-C alle dosi di 3600 e 7200 Joule/m², secondo i protocolli sperimentali di figura 21, sono presentati nelle figure 52 e 53.

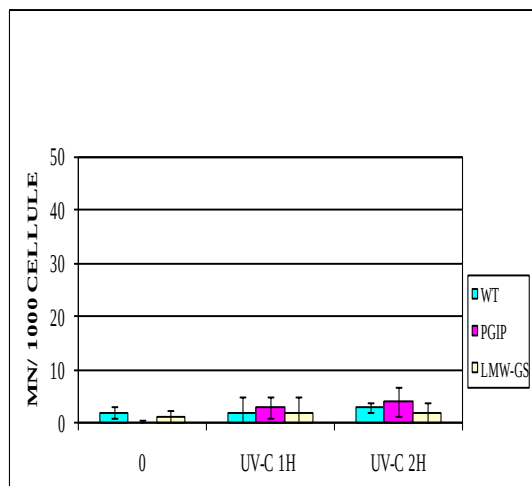


Figura 52 Micronuclei indotti da raggi UV-C

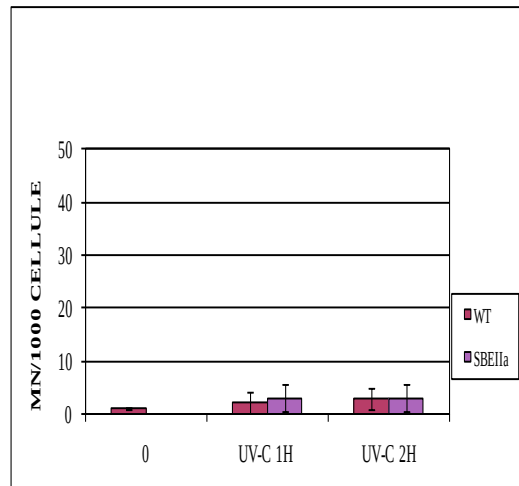


Figura 53 Micronuclei indotti da raggi UV-C

I risultati ottenuti mostrano che, nonostante la somministrazione di dosi elevate, non è stato riscontrato un incremento significativo della frequenza di micronuclei nelle linee trattate, rispetto ai corrispondenti controlli non trattati, indicando una forte tolleranza a questo tipo di stress esogeno e la presenza di efficienti sistemi di riparazione.

La distribuzione del numero dei micronuclei per singola cellula, indotti nelle linee transgeniche e nelle corrispondenti linee *wild type*, sono riportati nelle tabelle 15 e 16.

RAGGI UV-C					
	0 MN	1MN	2MN	3MN	4/+ MN
WT K	998	2	0	0	0
WT 1H	998	2	0	0	0
WT 2H	997	3	0	0	0
PGIP K	1000	0	0	0	0
PGIP 1H	997	3	0	0	0
PGIP 2H	996	4	0	0	0
LMW-GS K	999	1	0	0	0
LMW-GS 1H	998	2	0	0	0
LMW-GS 2H	998	2	0	0	0

Tabella 15 Distribuzione dei micronuclei per cellula indotti da raggi UV-C nelle due linee frumento tenero trasformate con metodo biolistico e nel corrispondente *wild type*.

RAGGI UV-C					
	0 MN	1MN	2MN	3MN	4/+ MN
WT K	999	1	0	0	0
WT 1H	998	2	0	0	0
WT 2H	997	3	0	0	0
SBEIIa K	998	2	0	0	0
SBEIIa 1H	997	3	0	0	0
SBEIIa 2H	997	3	0	0	0

Tabella 16 Distribuzione dei micronuclei indotti da raggi UV-C nella linea di frumento duro trasformata con *Agrobacterim* e nel corrispondente wild type

I risultati ottenuti mostrano un profilo di distribuzione simile del numero di micronuclei per cellula nelle linee transgeniche e nelle corrispondenti controparti *wild type*.

DISCUSSIONE

4 DISCUSSIONE

È noto da tempo che le rotture a doppio filamento del DNA, sulle quali agiscono i processi di riparazione per ricombinazione omologa e non omologa, sono alla base della formazione delle aberrazioni cromosomiche.

Recenti studi hanno dimostrato che le piante possono rispondere alle rotture a doppio filamento del DNA con livelli marcatamente più elevati di ricombinazione omologa, rispetto alle cellule di mammifero (Lebel et al., 1993, Siebert and Puchta, 2002).

Negli organismi transgenici vegetali, la trasformazione può comportare l'inserzione casuale nel genoma di numerose copie di transgeni interi o frammentati, determinando la presenza nel DNA di sequenze ad elevata omologia in alcuni casi in stretta prossimità.

Poiché questa condizione potrebbe generare “hotspot di ricombinazione” con potenziali effetti destabilizzanti sul DNA, in questo lavoro è stata valutata la potenziale instabilità genetica, intesa come maggiore suscettibilità ad accumulare danno cromosomico nelle linee di frumento transgenico, comparate alla loro controparte *wild type*. Ciò è stato effettuato analizzando le aberrazioni cromosomiche indotte da mutageni chimici e fisici che inducono danno al DNA attraverso differenti meccanismi d'azione.

In aggiunta all'analisi delle aberrazioni cromosomiche, la potenziale instabilità genomica nelle linee di frumento transgeniche è stata valutata introducendo anche l'analisi dei “micronuclei” che permettono di rilevare, insieme al danno cromosomico strutturale (aberrazioni cromosomiche) anche aberrazioni cromosomiche di tipo numerico (perdita cromosomica, non-disgiunzione).

La **Camptotecina** (CPT) è un agente che induce rotture a singolo filamento nel DNA.

Le aberrazioni cromosomiche indotte dopo 24 ore di trattamento con CPT aumentano all'aumentare della dose, senza mostrare differenze statisticamente significative tra *wild type* e corrispondenti linee transgeniche.

Dopo aver osservato che la quantità di danno risulta uguale tra controlli e piante transgeniche, si è proceduto ad un'analisi di tipo qualitativo delle aberrazioni cromosomiche.

Questa indagine risulta necessaria perché, nonostante il numero di cellule aberrate sia lo stesso, potrebbe variare la tipologia di danno.

Se una delle vie di riparazione del DNA fosse stata alterata dall'inserzione del transgene, la pianta potrebbe aver perso la capacità di processare una determinata lesione inattivando o rendendo meno efficienti le rilevanti “pathways” di riparazione del DNA. In questo caso alcuni tipi di aberrazioni cromosomiche tenderebbero ad accumularsi rispetto ad altre.

L'analisi qualitativa delle aberrazioni cromosomiche, presenta invece un andamento omogeneo tra le varie linee (GM e non) e come atteso, numerose aberrazioni come scambi e delezioni. E' noto infatti che la CPT è un agente “S dipendente”, ossia esplica la sua azione durante il processo di replicazione del DNA, determinando rotture a singola elica. Ciò si risolve o con la morte della cellula o con una riparazione errata che porta ad aberrazioni di tipo cromatidico.

Il fatto che alcune lesioni non riescono ad essere efficacemente riparate inducendo il processo apoptotico è riscontrato con un abbassamento dell'indice mitotico in tutte le linee.

L'indice mitotico è stato utilizzato, non solo come test per confrontare la risposta cellulare ai vari agenti (cellule transgeniche rispetto al *wild type*), ma anche come mezzo per valutare, tramite esperimenti preliminari, la scelta delle dosi.

Come le aberrazioni cromosomiche, anche i micronuclei, essendo espressione di un danno che la cellula ha subito, aumentano con l'aumentare della concentrazione di CPT con un andamento omogeneo tra le diverse linee.

La loro distribuzione per cellula mostra che, all'aumentare della dose cresce anche il numero di cellule con due o tre micronuclei. Nel frumento tenero, così come nei corrispondenti transgenici PGIP e LMW-GS aumenta anche il numero di cellule con quattro micronuclei che invece non si osservano, alle stesse dosi, nel frumento duro e controparte transgenica.

L'**Etoposide** è un agente chimico che induce rotture a doppio filamento nel DNA.

Le rotture della doppia elica del DNA costituiscono lesioni molto gravi per la cellula e ne compromettono la vitalità, quindi la loro riparazione è un evento critico per la sopravvivenza.

Una sola DSB può causare morte cellulare per apoptosi, o produrre aberrazioni cromosomiche.

L'induzione di aberrazioni cromosomiche dovuta al trattamento con etoposide mostra un aumento alla dose 1mM, ed un successivo, lieve incremento quando la dose viene raddoppiata, in tutti i sistemi sperimentali analizzati.

Va precisato che le dosi 1mM e 2mM sono particolarmente alte.

In letteratura, su esperimenti condotti con linfociti umani, le dosi indicate sono nell'ordine di 10μM. Esperimenti preliminari condotti a queste concentrazioni, non hanno indotto alcun tipo di danno nel frumento, per cui si può dedurre che questo è molto resistente alle lesioni prodotte da etoposide.

L'analisi delle aberrazioni cromosomiche, come atteso, mostra un aumento delle aberrazioni di tipo cromosomico quali ring, dicentrici, frammenti, visto che l'etoposide genera rotture a doppia elica nel DNA.

L'indice mitotico si abbassa con l'incremento della concentrazione di etoposide, indicando che la sopravvivenza cellulare diminuisce.

Il danno cellulare si riflette anche su un aumento del numero di micronuclei.

Con la dose cresce il numero di MN per cellula, specialmente nel frumento tenero.

Si può concludere quindi che, dopo trattamento con etoposide, non esistono differenze, in termini di stabilità genetica, tra linee transgeniche e linee di controllo.

I **Raggi X** inducono danno di vario tipo al DNA tra cui: rotture a singolo e doppio filamento, complesso ed eterogeneo danno chimico alle basi, siti abasici e legami "crociati" DNA-DNA e DNA-proteine.

Il trattamento con Raggi X induce marcati aumenti, dose-dipendenti, della frequenza di aberrazioni cromosomiche.

L'analisi qualitativa indica una distribuzione uniforme, in tutte le linee, di aberrazioni cromosomiche e cromatidiche. Questo si può spiegare con il fatto che, un agente diretto come i raggi X, danneggia in modo casuale ed uniforme l'intero genoma. Il trattamento con raggi X causa aberrazioni cromosomiche nella fase G₁ del ciclo cellulare e aberrazioni cromatidiche nelle fasi S e G₂. Nelle condizioni sperimentali riportate la popolazione cellulare è asincrona e pertanto si trova in tutte le fasi del ciclo cellulare, giustificando la presenza simultanea di aberrazioni cromatidiche e cromosomiche.

L'indice mitotico si abbassa sensibilmente con l'aumentare della dose confermando un danno importante al DNA.

I micronuclei aumentano con l'incremento della dose di raggi X, soprattutto nel frumento tenero, senza variazioni statisticamente significative tra *wild type* e linee transgeniche.

L'analisi della distribuzione per cellula mostra un forte incremento di cellule, con due e tre micronuclei alle alte dosi nel frumento tenero, mentre queste sono quasi assenti nel frumento duro.

Il trattamento con **Raggi UV-C** ha prodotto risultati sorprendenti. Per questo agente fisico sono state utilizzate dosi che sarebbero state in grado di uccidere una cellula animale, (dosi assimilabili a 20 J/m^2 , nelle cellule animali, inducono un esteso danno cromosomico) Nel frumento invece sono stati osservati solo lievi incrementi, non statisticamente significativi delle aberrazioni cromosomiche, in ogni linea analizzata.

L'analisi qualitativa del danno mostra un esiguo numero di delezioni e frammenti.

L'indice mitotico, non varia in nessuna condizione sperimentale impiegata.

La frequenza di micronuclei calcolata su 1000 cellule, è molto simile a quella dei controlli, non identificando cellule con più di un micronucleo.

Questi dati mostrano una forte resistenza ai raggi ultravioletti, probabilmente in relazione al fatto che le cellule vegetali, risultando continuamente esposte a questo agente, abbiano dovuto evolvere sistemi di riparazione in grado di minimizzarne gli effetti.

Il fatto che le specie studiate siano esaploidi e tetraploidi, costituisce un'ulteriore spiegazione alla grande tolleranza verso questo agente fisico, in quanto il danneggiamento di un gene può essere compensato dalle altre copie presenti nel genoma.

La risposta ai raggi UV è sicuramente la più evidente in termini di tolleranza al danno genetico, tuttavia, anche per l'etoposide, sono state utilizzate dosi superiori (1000/2000 volte) e per tempi doppi a quelli presenti in letterature su linfociti umani. Dosi inferiori a quelle utilizzate non inducevano alcun tipo di danno e neppure un abbassamento dell'indice mitotico. Anche il trattamento con camptotecina (per 24 ore), è stato prolungato per un tempo tale da infliggere un danno critico a qualunque cellula animale.

Questa particolare plasticità delle piante potrebbe essere una risposta alla loro maggiore esposizioni ad agenti mutageni. Le piante infatti sono immobili su un territorio, continuamente esposte ad agenti chimici e fisici, e questo, nel corso dell'evoluzione, gli ha conferito una grande capacità di tolleranza al danno al DNA.

Infine è da notare una maggiore quantità di danno genetico nel frumento tenero rispetto a quello duro, particolarmente evidente nell'analisi dei micronuclei. Questo può essere messo in relazione alla quantità di DNA. Il frumento tenero esaploide, avendo più DNA del frumento duro tetraploide, risulta più danneggiato in quanto esiste una proporzionalità tra danno genetico indotto e contenuto di DNA.

CONCLUSIONI

5 CONCLUSIONI

I risultati ottenuti indicano che le frequenze di aberrazioni cromosomiche, nonché le frequenze di micronuclei nelle linee transgeniche e nelle linee di controllo, non sono significativamente differenti.

I trattamenti effettuati hanno mimato tutti i possibili tipi di danno al quale, in natura, può essere esposta una cellula e di conseguenza hanno attivato i differenti sistemi di riparazione dei quali: riparazione per escissione di base, riparazione per escissione di nucleotidi, riparazione delle rotture a singolo filamento e riparazione omologa e non omologa delle rotture a doppio filamento.

Se l'introduzione del transgene fosse avvenuta all'interno di uno dei geni coinvolti nelle *pathways* riparative stimulate dai trattamenti mutageni o avesse interferito per effetto di posizione o per l'innescio di eventi di ricombinazione, con la loro normale espressione, sarebbe stata alterata la capacità ripartiva del DNA, visibile con un aumento del numero di aberrazioni cromosomiche e micronuclei.

I dati ottenuti invece mostrano che l'inserzione del gene esogeno non ha assolutamente influito sulla stabilità genetica del grano GM rispetto al controllo.

Questo dato è ulteriormente confermato dall'analisi qualitativa del danno presente nei cromosomi delle cellule trasformate rispetto ai *wild types*.

Inoltre, l'analisi effettuata su linee di frumento ingegnerizzate mediante i due differenti metodi: *biolistico* ed attraverso *A. Tumefaciens*, indica che non esistono differenze legate al metodo di trasformazione che è stato utilizzato.

BIBLIOGRAFIA

6. BIBLIOGRAFIA

Altpeter F., Baisakh N., Beachy R., Bock R., Capell T., Christou P., Daniell H., Datta K., Datta S., Dix P.J., Fauquet C., Kohli A., Mooibroek H., Nicholson L., Nguyen TT., Nugent G., Raemakers K., Romano A., Somers D A., Stoger E., Taylor N. and Visser R. (2005).

Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: myths and realities. *Molecular Breeding*. 15: 305–327.

Ann E. Stapleton. (1992)

Ultraviolet Radiation and Plants: Burning Questions .*The Plant Cell*, Vol. 4, 1353-1358,.

Barton K.A. and Chilton M.D. (1983)

Agrobacterium Ti plasmids as vector for plant genetic engineering. *Methods Enzymol* 101 527-539.

Beukers I. and Berends W (1960)

Isolation and identification of the irradiation product of thymine. *Biochim. Biophys. Acta*, 41, 550-551.

Bhattacharyya N. P., Maher V. M. and McCormick J. J. (1990)

Effect of nucleotide excision repair in human cells on intrachromosomal homologous recombination induced by UV and 1-nitrosopyrene. *Mol. Cell. Biol.* 10, 3945-3951

Bopp A. and Hagen V.(1970)

End group determination in (-irradiated) DNA. *Biochem. Biophys. Acta*, 209,320-326.

Cervone F., Castoria R., Leckie F. and De Lorenzo, G. (1997)

Perception of fungal elicitors and signal transduction. in plants. In: *Signal Transduction in plants*. P. Aducci, ed. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland

Cheng, M., Fry, J.E., Pang, S.Z., Zhou, H.P., Hironaka, C.M.,Duncan, D.R., Conner, T.W., Wan, Y.C., (1997).

Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiology* 115: 971–980.

Chow J., Poon R.Y. (2010)

Dna damage and polyploidization. *Adv. Exp. Med. Biol.* 676: 57-71.

- Christou P. (1992)
Genetic transformation of crop plants using microprojectile bombardment. *Plant J.* 2:275-281.
- Coquerelle T., Bopp A., Kessler B. and Hagen U. (1973)
Strand breaks and 5' end-group in DNA of irradiated thymocytes. *Int J. Radiat. Biol.*, 24, 397-404.
- Dale P.J., Sheffer J.A., (1996)
Gene dispersal from transgenic crops, in Schmidt E.R., Hankeln (eds.) "Transgenic organisms and biosafety", Berlin
- Darlington H., Fido R., Tatham A. S., Jones H. (2003)
Milling and baking properties of field grown wheat expressing HMW subunit transgenes. *J. Cereal Sci.* 38, 301–306.
- Dianov G. and Lindahl T. (1994)
Recostitution of base-excision repair pathway for DNA containing puracil residues. *Current Biol.* 4, 1069-1107.
- Dick, J.W., Matsuo, R.R., (1988).
Durum wheat and pasta products. In: Pomeranz, Y., (ed.): *Wheat: Chemistry and Technology*, vol. II. Am. Ass. Cereal Chem., St. Paul, pp. 507-547.
- D'Ovidio R., Masci S. (2004).
The low-molecular-weight glutenin subunits of wheat gluten. *J. Cereal Sci.* 39, 321–339
- Droge M., Selbitschka W., (1998),
Horizontal gene transfer as a biosafety issue: a natural phenomenon of public concern. *J. Biotechnology* 64 (1), pp. 75-90.
- Falk B.W., Bruening G., (1994),
Will Transgenic Crops Generate New Viruses and New Diseases?, *Science* Vol. 263, pp. 1395-1396.
- Feldman M. and Sears E.R., (1981)
The wild gene resources of wheat. *Sci. Am.* 244: 98-109

Feldman M., Lupton F.G.H. and Miller T.E. (1995).
Wheats. In Evolution of crop plants, ed. J. Smartt and N.W. Simmonds: Longman Group, London, pp.184-192.

Filkowski J, Kovalchuk O, Kovalchuk (2004)
Genome stability of vtc1, tt4, and tt5 *Arabidopsis thaliana* mutants impaired in protection against oxidative stress. *Plant J.*;38(1):60-9

Friedberg E., Walker G. and Siede W. (1995)
Dna repair and mutagenesis. ASM Press: Washington D. C.

Gale J. M., Nissen K. A. and Smerdon M. J. (1987).
UV-induced formation of pyrimidine dimers in nucleosome core DNA is strongly modulated with a period of 10.3 base. *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)* 84, 6644-6648.

Gallego M.E., Sirand-Pugnet P., and White C.I.(1999).
Positivenegative selection and T-DNA stability in *Arabidopsis* transformation. *Plant Mol. Biol.*39,83–93

Gill B. S., Friebe B. and Endo T.R. (1991)
Standard karyotype and nomenclature system for description of chromosome bands and structural aberration in wheat *Triticum aestivum*. *Genome* 34:830-839.

Gowen J.W. (1928).
Mutation, chromosome non disjunction and the gene. *Science*. Aug 31;68(1757):211-2

Guangke Li, Yang Y., Hongyan L. and Nan S. (2007)
Effect of landfill leachate on cell cycle, micronucleus, and sister chromatid exchange in *Triticum aestivum*. *Journal of Hazardous Materials*. 155:10-16 2007.

Gupta R. B., and MacRitchie F. (1994)
Allelic variation at glutenin subunit and gliadin loci, Glu-1, Glu-3, and Gli-1 of common wheats. Biochemical basis of the allelic effects on dough properties. *J. Cereal Sci* 19 19-29.

Hanna N., Parfait B., Vidaud D. and Vidaud M. (2005)
Mutation mechanisms and their consequences. *Med Sci* 11, 969-80.

Higuchi Y, Mizukami Y, Yoshimoto T. (2003)
Ultraviolet ray induces chromosomal giant DNA fragmentation followed by internucleosomal DNA fragmentation associated with apoptosis in rat glioma cells. *Ann N Y Acad Sci.*1010:326-30

Hirschi M., Netrawali M. S., Remens J. F. and Cerrutti P. A. (1981)
Formation of DNA single strand break by near ultraviolet and gamma rays in normal and Boom's syndrome skin fibroblasts. *Cancer Res.* 41, 2003-2007.

Lebel E.G., Masson J., Bogucki A., and Paszkowski J. (1993).
Stress-induced intrachromosomal recombination in plant somatic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 422–426.

Lindahl and Wood R. D. (1999)
Quality control by DNA repair. *Science* 286 (5446) 1897-1905.

Janni M., Sella L., Favaron F., Blech A.E., De Lorenzo G., D'Ovidio R. (2008)
The expression of bean PGIP in transgenic wheat confers increased resistance to the fungal pathogen *Bipolaris sorokiniana*. *The American Phytopathological Society* vol.21.n.2 pp171-177.

Johnson B., Hope A., (2000)
GM Crops and Equivocal Environmental Benefits, *Nature Biotechnology* Vol. 18, pp. 242.

Kihara H., (1919)
Studien bei einige Getreidearten. I. Spezies-Bastardses Über cytologische

Kimball RF.(1962)
Chromosome duplication and mutation *Strahlentherapie.* 51:116-25.

Kovalchuk I., Filkowski J., Smith K. and Kovalchuk O.(2003)
Reactive oxygen species stimulate homologous recombination in plants. *Embo J.*5562-5566

Kunz B. A., Haynes R. H. (1981)
UV-induced DNA damage promotes resistance to the biotrophic pathogen *Hyaloperonospora parasitica* in *Arabidopsis*. *Annu. Rev. Genet.* 15,57-89

Lippke J. A., Gordon L. K., Brash D. E. and Haseltine W. A. (1981)
Distribution of UV light-induced damage in a defined sequence of human DNA: detection of alkaline-sensitive lesions at pyrimidine nucleoside-cytidine sequences. *Proc Natl. Acad. Sci. (USA)* 78, 3388-3392.

Loeb L. A. (1994)
Microsatellite instability: marker of a mutator phenotype in cancer. *Cancer Res.* 54, 5059-5063.

Merlo LM, Wang LS, Pepper JW, Rabinovitch PS, Maley CC. (2010)
Polyploidy, aneuploidy and the evolution of cancer *Adv Exp Med Biol.* 2010;676:1-13.

Modrich P. (1994)
Mismatch repair, genetic stability, and cancer. *Science* 266 1959-1960.

Mosesso P., Fonti E., Bassi L., Lorenti Garcia C. and Palitti F. (1999).
The involvement of chromatin condensation in camptothecin induced chromosome breaks in G0 human lymphocytes. *Mutagenesis* vol.14 no.1 pp.103–105

Mosesso P., Darroudi F., van den Berg M., Vermeulen S. , Palitti F. and Natarajan A. T. (1998)
Induction of chromosomal aberrations (unstable and stable) by inhibitors of topoisomerase II m-AMSA, and VP16, using conventional Giemsa staining and chromosome painting techniques. *Mutagenesis* vol.13 no.1 pp.39-43.

Oishi M. (1988)
Analysis of the secondary structure of intermediates of dna replication in *The Recombination of Genetic Material*. Ed. Brooks Low, K. (Academic, New York), pp. 445-491.

Orth, R.A., Shellenberger, J.A., (1988)
Origin, production and utilization of wheat. *Wheat Chemistry and Technology*. Ed. Y. Pomeranz, American Association of Cereal Chemists, St Paul, Minnesota, 1-14.

Pastori, G.M., Wilkinson, M.D., Steele, S.H., Sparks, C.A., Jones, H.D., Parry, M.A.J. (2001).
Age-dependent transformation frequency in elite wheat varieties. *Journal of Experimental Botany* 52, 857–863.

Peak J. G., Peak M., J., Sikorski R. S. and Jones C. A. (1985)
Induction of DNA-protein crosslinks in human cells by ultraviolet and visible radiations: action spectrum. *Photochem. Photobiol.*, 41, 295-302.

Petes T. D., Hill C. W. (1988)
Recombination between repeated genes in microorganisms. *Annu. Rev. Genet.* 22,147-168.

Power A., (2000)
Environmental risks of Crops with Transgenic Virus-Resistance, World Health Organisation, Regional Office for Europe, Roma. p 12

Psonka-Antonczyk K., Elsässer T., Gudowska-Nowak E., Taucher-Scholz G. (2009)
Distribution of double-strand breaks induced by ionizing radiation at the level of single DNA molecules examined by atomic force microscopy. GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung GmbH, Biophysics Group, Darmstadt, Germany.

Puchta H. (1998).
Repair of genomic double-strand breaks in somatic plant cells by one-sided invasion of homologous sequences. *Plant J.* 13, 331–339

Puchta H. (2005)
The repair of double strand breaks in plants: mechanisms and consequences for genome evolution. *Journal of Experimental Botany*, Vol 56 n°409 pp1-14

Rasco-Gaunt S., Riley A., Cannell M., Barcelo P., Lazzeri P.A., (2001)
Procedures allowing the transformation of a range of European elite wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties via particle bombardment, *J. Exp. Bot.* 52: 865/874.

Ridley B. L., O'Neill M. A., and Mohnen D. (2001)
Pectins: Structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* 57:929-967 2001.

Ries G., Heller W., Puchta H., Sandermann H.J., Seidlitz H.K., and Hohn B. (2000).
Elevated UV-B radiation reduces genome stability in plants. *Nature* 406, 98–101

Sax K., (1922)
Sterility in wheat hybrids. II. Chromosome behaviour in partially sterile hybrids. *Genetics.* 7: 513-522.

- Sears E.R., (1952)
Homoeologous chromosome in *Triticum aestivum*. Genetics 37: 624
- Sears E.R., (1954). The aneuploids of common wheat. Univ. Mo. Agric. Exp. Stn. Res. Bull.572: 1-59.
- Sears E.R., (1956)
The transfer of leaf rust resistance from *Aegilops umbellulata* to wheat.
Brookhaven Symposia in Biology 9, 1–22.
- Sears E.R., (1981)
Transfer of alien genetic material to wheat. In ‘Wheat science—today and tomorrow’. (Eds LT Evans, WJ Peacock). (Cambridge University Press: Cambridge, UK) pp. 75–89.
- Seisuke K., Yasue T., Toyotaka I., Yoko M., Toscio M., Junji H and Kengo S.(2004)
DNA repair in higher plants; photoreactivation is the major DNA repair pathway in non-proliferating cells while excision repair (nucleotide excision repair and base excision repair) is active in proliferating cells. Nucleic acids Research Vol 32 n°9
- Sestili F., Botticella E., Bedo E., Phillips A., Lafiandra D. (2009)
Production of novel allelic variation for genes involved in starch biosynthesis through mutagenesis. Mol Breeding DOI 10.1007/s11032-009-9314-7 2009.
- Sestili F., janni M., Doherty A., Botticella E., d’Ovidio R. and Lafiandra D.(2010)
Increasing the amylose content of durum wheat through silencing of the SBEIIa genes. BMC Plant Biol. 10:144
- Setlow R. B. and Carrier W. L. (1966).
Pyrimidine dimers in ultraviolet irradiated DNA’s. J. Mol. Biol.
- Shewry P. R., Halford N. G., Lafiandra D.(2003)
Genetics of wheat gluten proteins. Adv. Genet. 49, 111–184.
- Shewry P.R. and Jones H.D. (2005)
Transgenic wheat: where do we stand after 12 years?.Annals of Applied Biology 147:1-14.

Siebert R., Puchta H. (2002)
Efficient Repair of Genomic Double-Strand Breaks by Homologous Recombination between Directly Repeated Sequences in the Plant Genome *The Plant Cell*, Vol. 14, 1121–1131

Snow A.A., Palma P.M., (1997),
Commercialisation of Transgenic Plants: Potential Ecological Risks”, *BioScience* Vol. 47 pp. 86-96.

ten Have A., Mulder W., Visser J., van Kaan J. A. L. (1998)
The endopolygalacturonase gene Bcp1 is required for full virulence of *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11:1009-1016.

Tepfer M., (1993)
Viral genes and transgenic plants: what are the potential environmental risks?, *Biotechnology* 11, pp. 1125-1132.

Tsujimura T., Maher V. M., Godwin A. R., Liskay R. M. and McCormick J. J. (1990)
Frequency of intrachromosomal homologous recombination induced by UV radiation in normally repairing and excision repair-deficient human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87,1566-1570

Tyrrel R. M. (1982)
In: trends in Photobiology, Eds. Helene pp. 155-172, plenum press New York.

Weeks J.T., Anderson O.D., Blechl A.E. (1993)
Rapid production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat (*Triticum aestivum*). *Plan Physiol.* 102: 1077-1084

Wolfenbarger L.L., Phifer P.R., (2000)
The Ecological Risks and Benefits of Genetically Engineered Plants, *Science* Vol. 290, pp. 2088-2093.

Wrigley C.W. (1996)
Giant proteins with flour power. *Nature* 381, 738–739.

Wu H., Sparks C., Amoah B., Jones H.D. (2003)
Factors influencing successful *Agrobacterium* mediated genetic transformation of wheat. Plant Cell Reports, 21, 659–668.

Zhang W., Qu L.J., Gu H., Gao W., Liu M., Chen J. and Chen Z., (2002)
Studies on the origin and evolution of tetraploid wheat based on the internal transcribed spacer (ITS) sequences of nuclear ribosomal DNA. Theor. Appl. Genet. 104: 1099-1106

Zuffardi O, Bonaglia M, Ciccone R, Giorda R (2009)
Inverted duplications deletions: underdiagnosed rearrangements? Clin Genet. Jun;75(6):505-13. Review.

SITI INTERNET

www.oecd.org

www.who.org