



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

Applicazioni dell'RNA interferente nella difesa delle colture



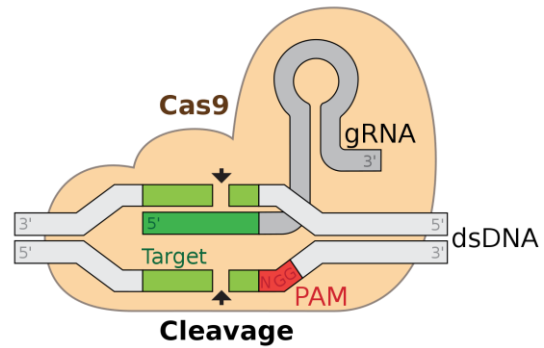
Elena Baraldi

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro Alimentari

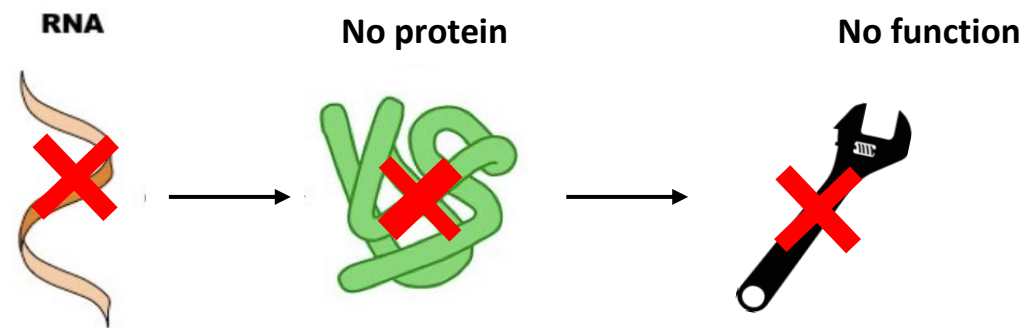


Biotecnologie per la difesa delle colture : approcci endogeni ed esogeni

- NBT (e.g. CRISPR CAS technology)



- RNA interference

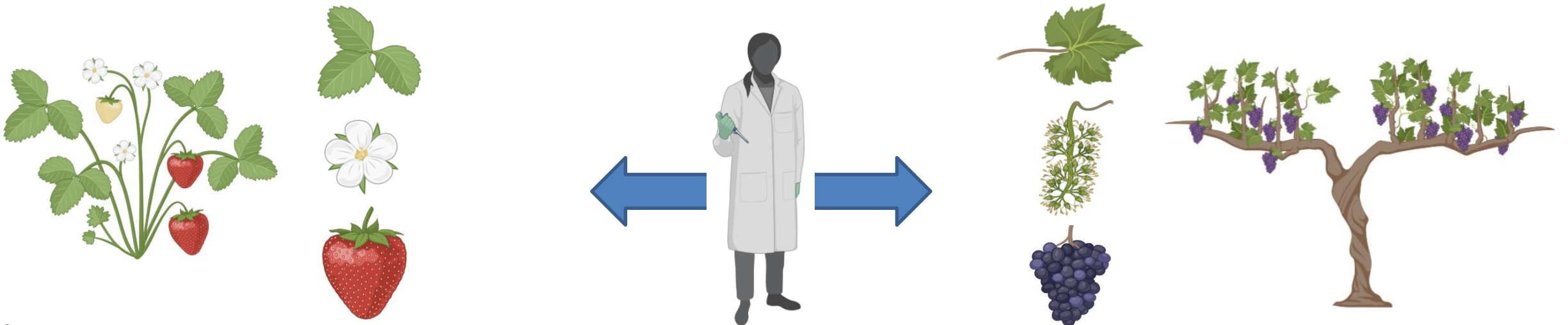
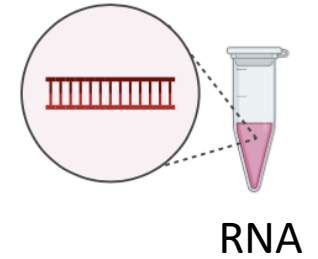


Gene silencing



RNA interferente

1. Come funziona e le prime applicazioni in agricoltura
2. Due possibili approcci per la difesa delle colture
3. Come sviluppare una difesa a base di RNA: dal lab al campo
4. La nostra esperienza in due casi studio

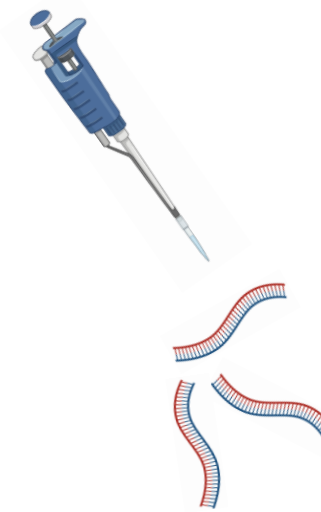


Come funziona l'RNA interferente

Scoperto nel 1998 dai ricercatori Andrew Fire e Craig Mello



Premio Nobel nel 2006



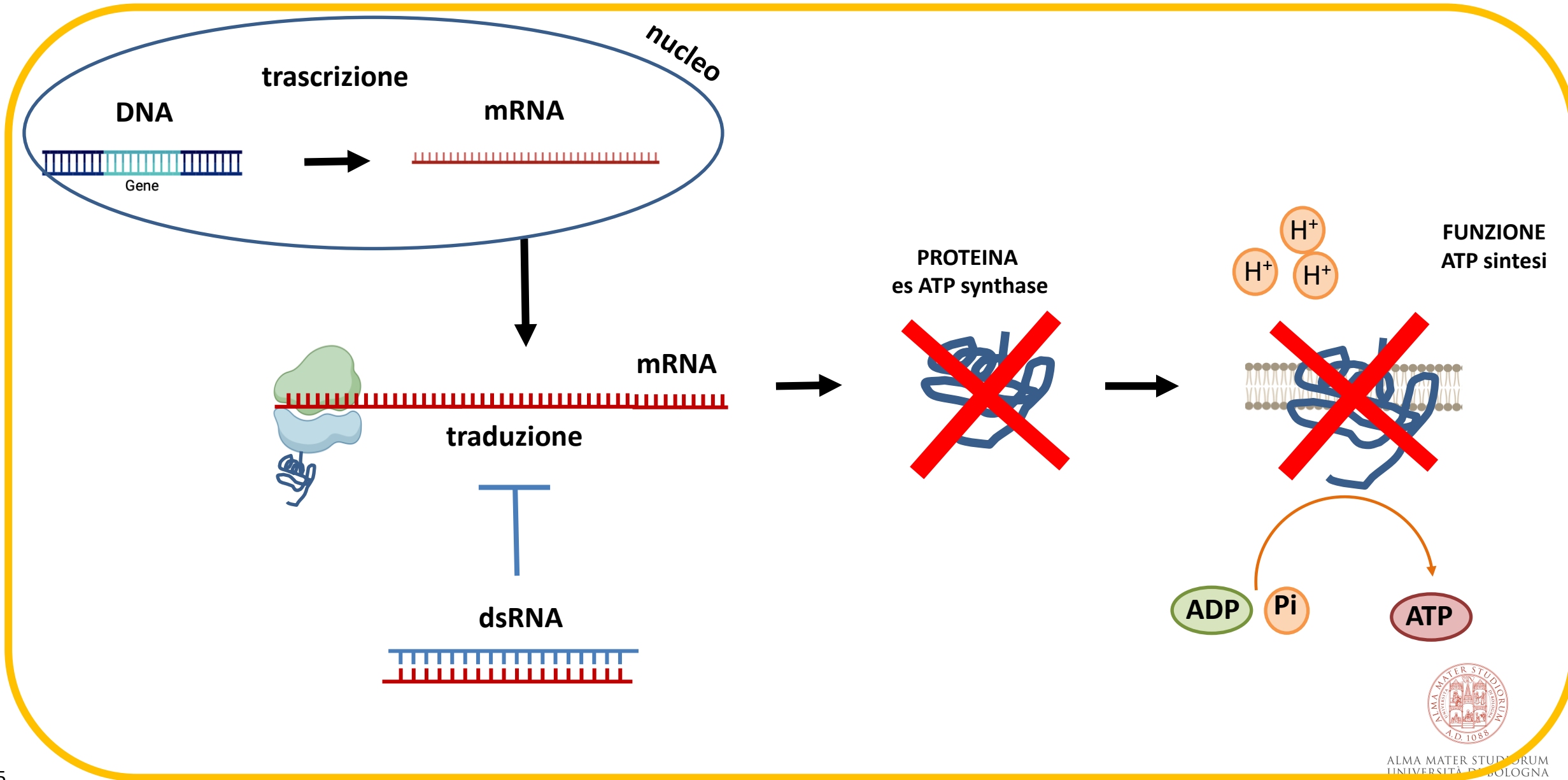
dsRNA
RNA a doppio filamento



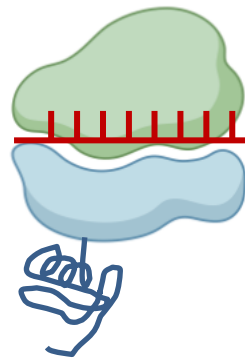
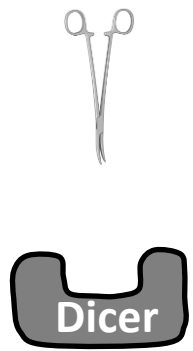
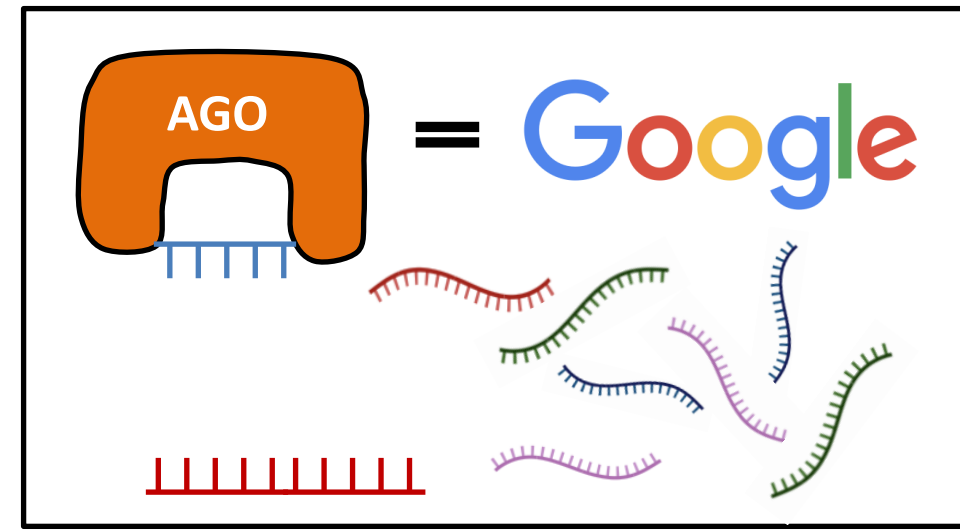
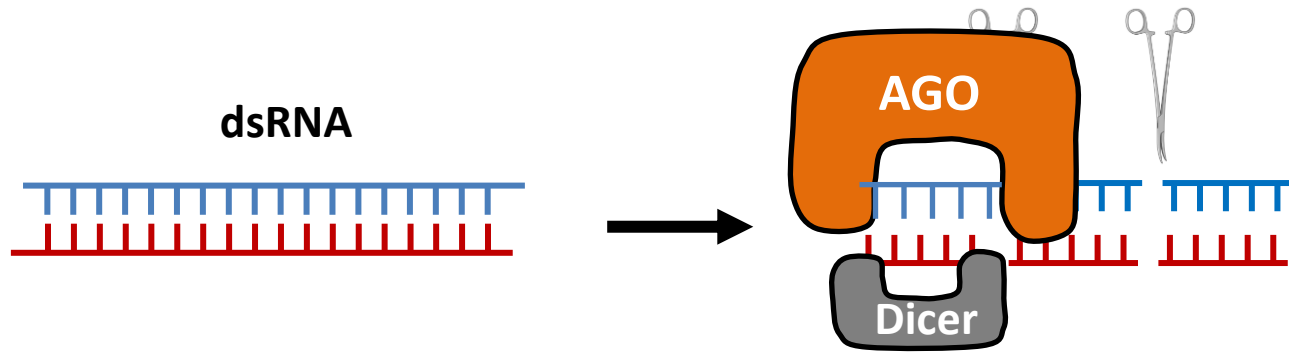
Silenziamento genico



Il dogma della biologia: un gene → un RNA → una proteina → una funzione



Come funziona l'RNA interferente

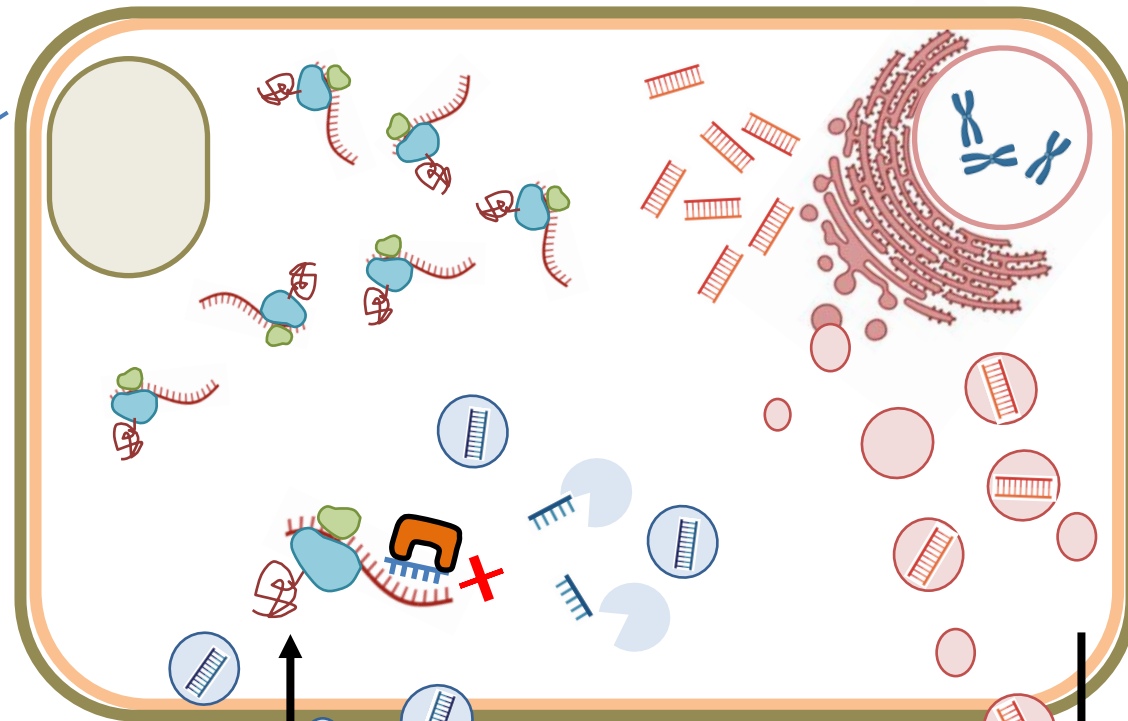


No proteina

No funzione



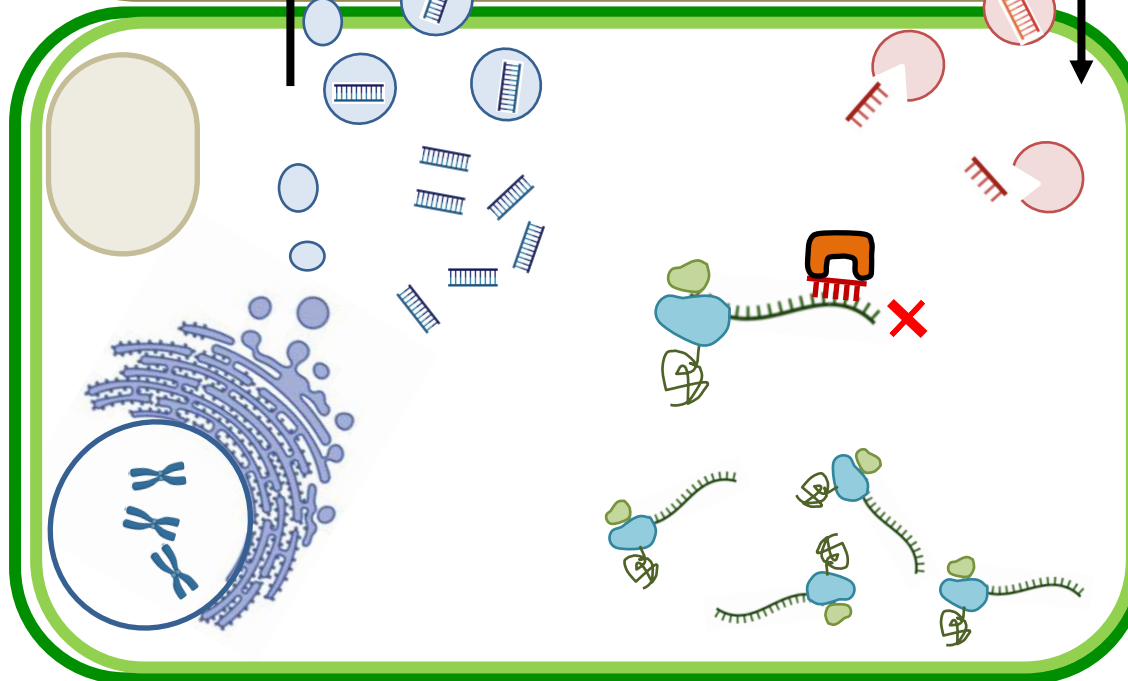
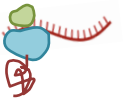
Cellula fungina



dsRNA fungino



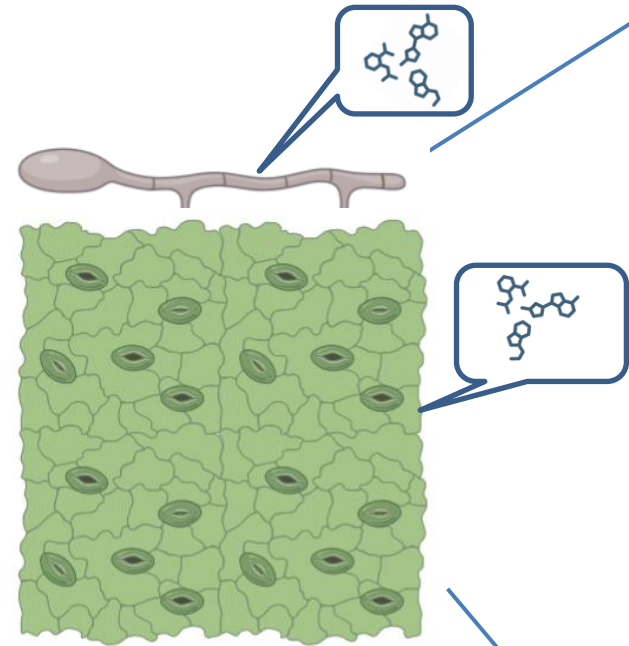
mRNA del fungo



dsRNA della pianta



mRNA della pianta



Dialogo molecolare

RNA interferente tra organismi di due regni diversi : pianta e fungo

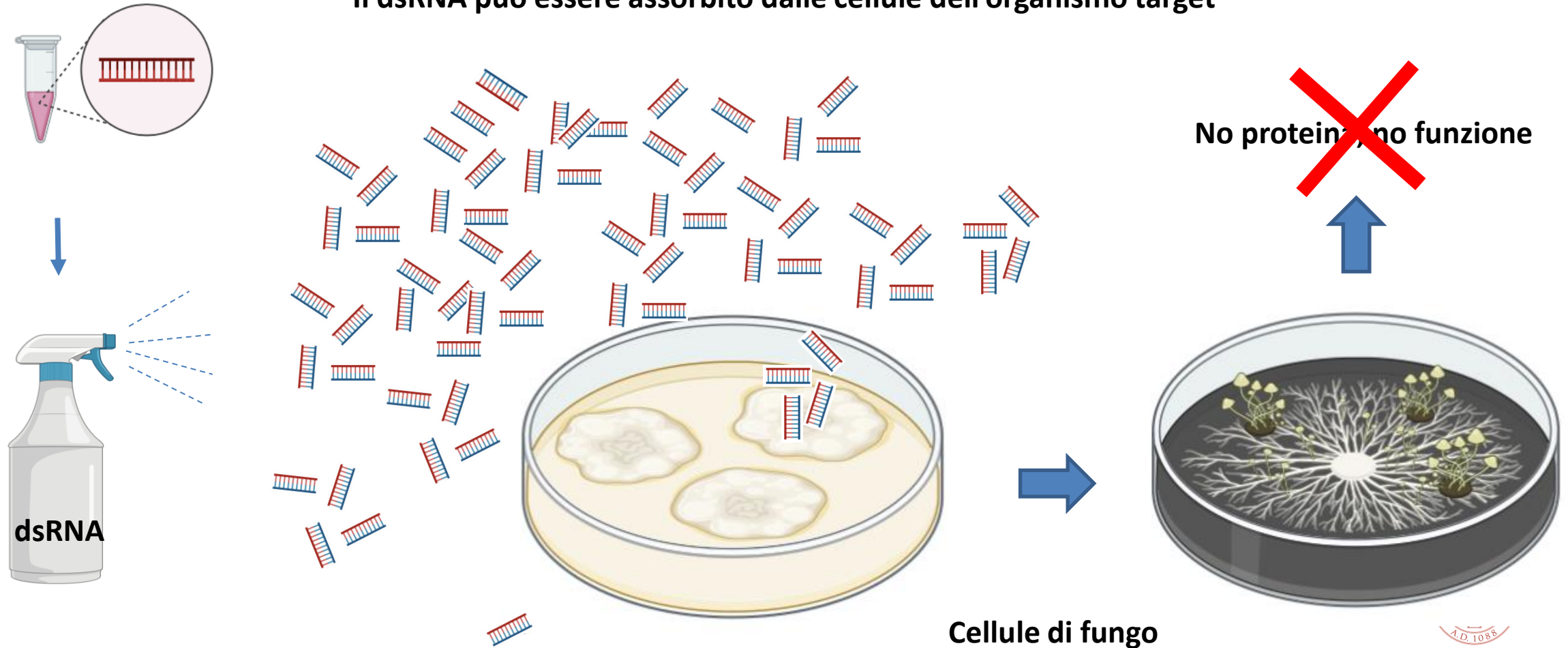


ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

dsRNA come induttore del silenziamento genico per via esogena

E' possibile disegnare dei dsRNA che riconoscono dei geni target di uno specifico organismo

Il dsRNA può essere assorbito dalle cellule dell'organismo target

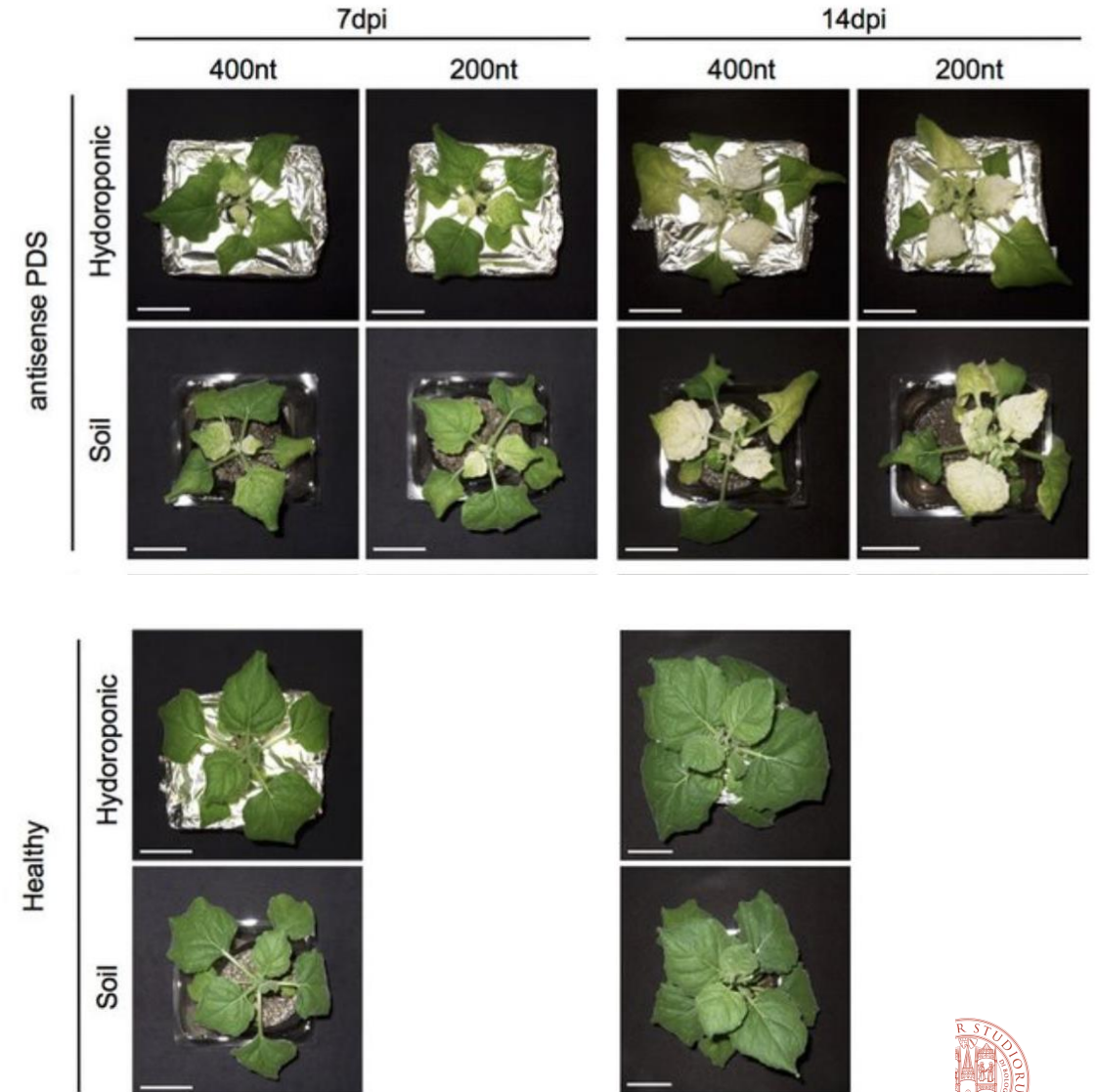
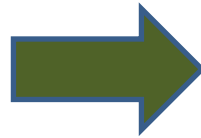


Primo caso di utilizzo di RNA interferente in agricoltura: l'approccio spray SIGS

2011: primo brevetto di applicazione esogena

Si tratta di un brevetto US

L'applicazione esogena di dsRNA specifico per il gene phytoene desaturase, prodotto in vitro o sintetizzato, e spruzzato a 2.5 bar su foglie tabacco stimola l'RNAi di una phytoene desaturase



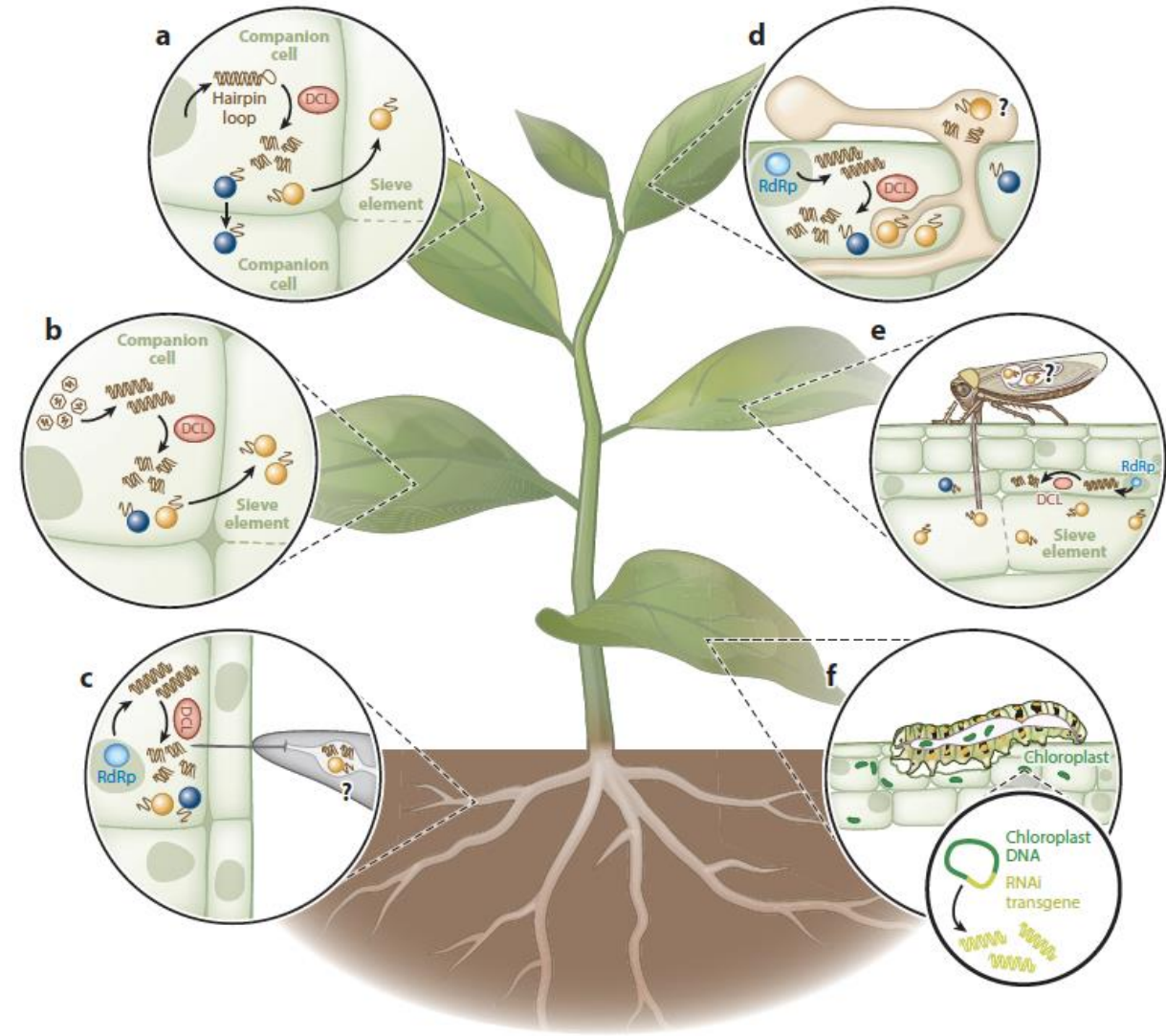
SIGS= Spray induced gene silencing

Possiamo sfruttare l'RNA in agricoltura anche per via endogena nelle piante : l'approccio HIGS

Le piante possono essere ingegnerizzate per produrre dsRNA specifici per geni vitali di diversi tipi di patogeni. Questi inducono l'RNAi in modo sistemico poiché possono muoversi nella pianta per via simplastica, apoplastica e vascolare.

Questi piccoli RNA possono agire contro virus, nematodi, funghi, insetti adulti o larve

HIGS = Host Induced Gene Silencing

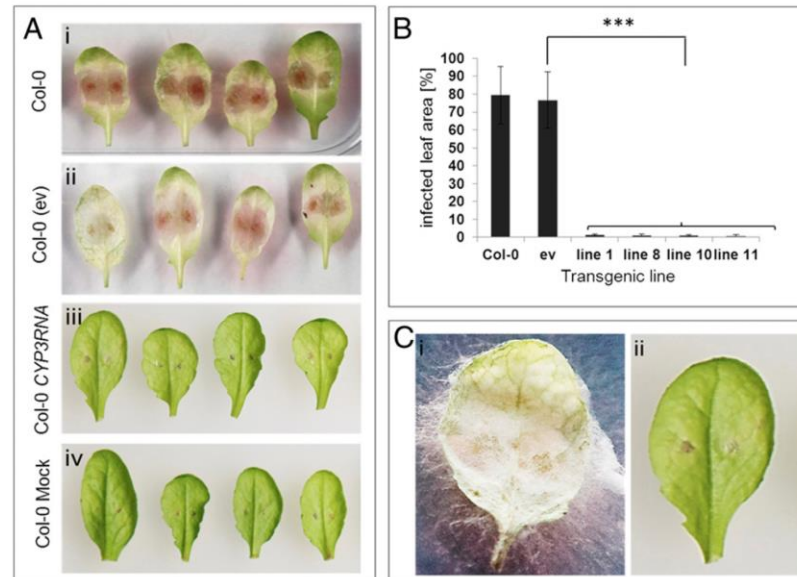


Host-induced gene silencing of cytochrome P450 lanosterol C14 α -demethylase–encoding genes confers strong resistance to *Fusarium* species

Aline Koch^a, Neelendra Kumar^a, Lennart Weber^b, Harald Keller^c, Jafargholi Imani^a, and Karl-Heinz Kogel^{a,1}

^aInstitute for Phytopathology and Applied Zoology and ^bInstitute for Microbiology and Molecular Biology, Centre for Bio Systems, Land Use, and Nutrition, Justus Liebig University, D-35392 Giessen, Germany; and ^cInstitut Sophia Agrobiotech, Unité Mixte de Recherche 1355 Institut National de la Recherche Agronomique Centre National de la Recherche Scientifique, Université Nice-Sophia Antipolis, 06903 Sophia Antipolis, France

Target : gene del CytP450 che media la sintesi dell'ergosterolo ed è un importante target anche di famosi fungicidi come i triazoli.



Arabidopsis + *Fusarium graminearum*

Fig. 1. Infection symptoms on *Arabidopsis* leaves following inoculation with *F. graminearum*. (A) Detached leaves of 5-wk-old plants were treated with 5×10^4 macroconidia mL^{-1} and evaluated for necrotic lesions at 3 dpi. (i) wild-type (Col-0), (ii) Col-0 ev control, (iii) Col-0 expressing *CYP3RNA* (representative line L8), and (iv) wild-type treated with Tween water (mock). (B) Quantification of infected leaf area at 3 dpi; typical infection symptoms are recorded as a percent of the total leaf area. Bars represent mean values \pm SDs of three independent experiments, each using 20 leaves collected from 15 different plants of each transgenic line, as well as wild-type and Col-0 ev plants. The reduction in infection symptoms on *CYP3RNA*-expressing leaves compared with the wild-type and Col-0 ev control was statistically significant ($***P < 0.0001$; Student's *t* test). (C) *Fg*-inoculated *Arabidopsis* leaves at 5 dpi. (i) The Col-0 ev leaf is heavily infected with *Fg*; (ii) Col-0 expressing *CYP3RNA* does not show infection symptoms.

Esempi di applicazioni endogene HIGS contro patogeni fungini



Fungi	Target gene	Plant	Phenotype	References
<i>Puccinia triticina</i>	<i>PtMAPK1</i>	Wheat	Significant reduction of fungal growth and disease suppression	Panwar et al., 2013
<i>Blumeria graminis</i> f.sp. <i>tritici</i>	<i>MLO</i>	Wheat	Inhibition of fungal growth	Riechen, 2007
<i>F. graminearum</i>	IRT containing mycotoxin regulatory sequences	Grain and legume crops	Significant reduction in mycotoxin production	McDonald et al., 2005
<i>Blumeria graminis</i>	<i>Avra10</i>	Barley and wheat	Inhibition of fungal growth	Nowara et al., 2010
<i>Phytophthora parasitica</i>	<i>PnPMA1</i>	Arabidopsis	Elucidation of a compatible interaction between <i>Arabidopsis</i> and <i>P. parasitica</i>	Wang et al., 2011
<i>Fusarium verticillioides</i>	<i>GUS</i>	Tobacco	Reduced expression of <i>GUS</i>	Tinoco et al., 2010
<i>Phytophthora parasitica</i> var. <i>nicotianae</i>	Glutathione S-transferase	Tobacco	Increase resistance of <i>Nicotiana</i> to infection	Hernández et al., 2009
<i>Puccinia striiformis</i> f. sp. <i>tritici</i>	<i>PSTha12J12</i>	Barley and wheat	Significant improvement in rust resistance	Yin et al., 2011
<i>Botrytis cinerea</i>	MAP Kinase <i>Bmp3</i>	Lettuce	Delay in conidial germination, reduction of necrotic lesions	Spada et al., 2021
<i>Botrytis cinerea</i>	<i>DCL1, DCL2</i>	Tomato, Strawberry, Grape, Lettuce, Onion, Rose	Significant inhibition in gray mold disease	Wang M. et al., 2016
<i>Botrytis cinerea</i>	<i>DND1</i>	Tomato and Potato	Reduced susceptibility to <i>Botrytis</i>	Sun et al., 2017
<i>Botrytis cinerea</i>	<i>BcTOR</i>	Arabidopsis, Potato, Tomato	Enhanced resistance against gray mold	Xiong et al., 2019

Ma sono GMO !!

(costo fino a 150 M USD per la commercializzazione + i problemi degli GMO)



Come sviluppare una difesa a base di RNA: dal lab al campo

Muffa grigia



Botrytis cinerea

Antracnosi



Colletotrichum spp.

Mal bianco



Podosphaera aphanis

Peronospora



Phytophthora infestans

Peronospora



Plasmopara viticola

Oidio



Erysiphe necator

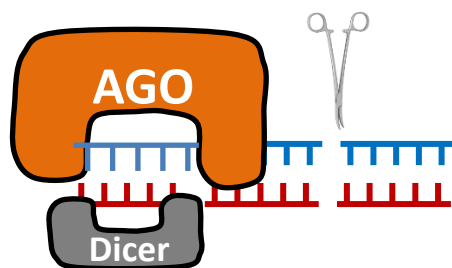
Maculatura bruna



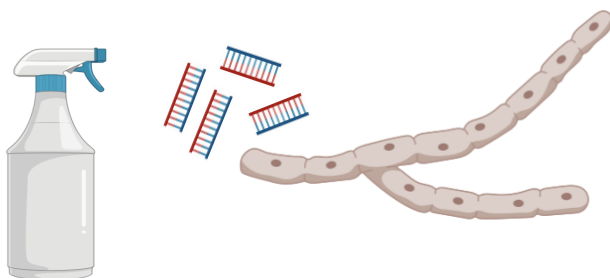
Stemphylium vesicarium

Approccio spray SIGS: requisiti per l'efficacia

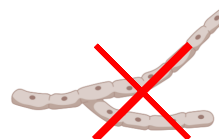
1) L'organismo target possiede il macchinario RNAi



2) L'organismo target assorbe le molecole di RNA



3) Il gene che si va a silenziare blocca effettivamente la crescita del patogeno sulla pianta



1) l'organismo target deve possedere il macchinario RNAi

Analisi dei genomi e ricerca dei geni responsabili del funzionamento del macchinario cellulare RNAi

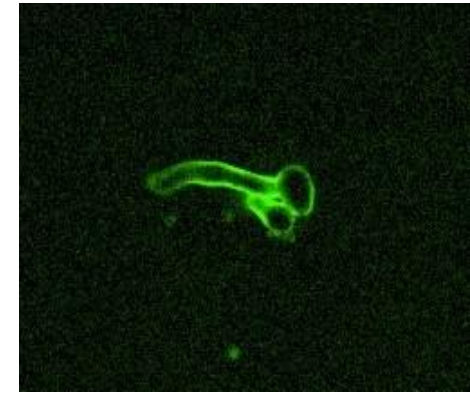
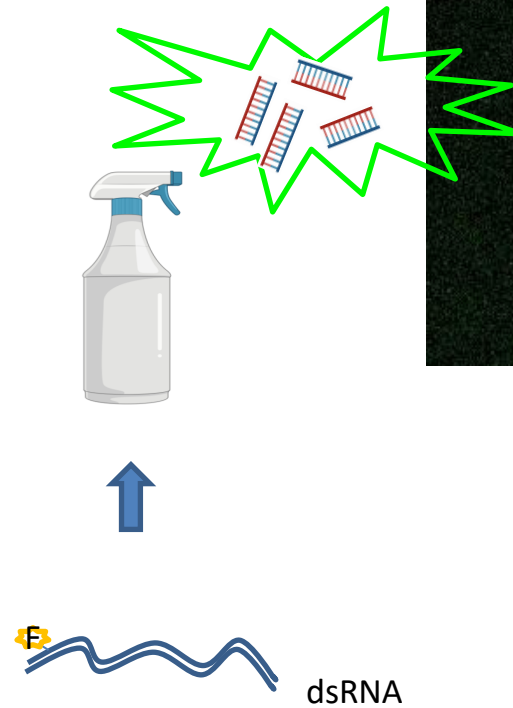
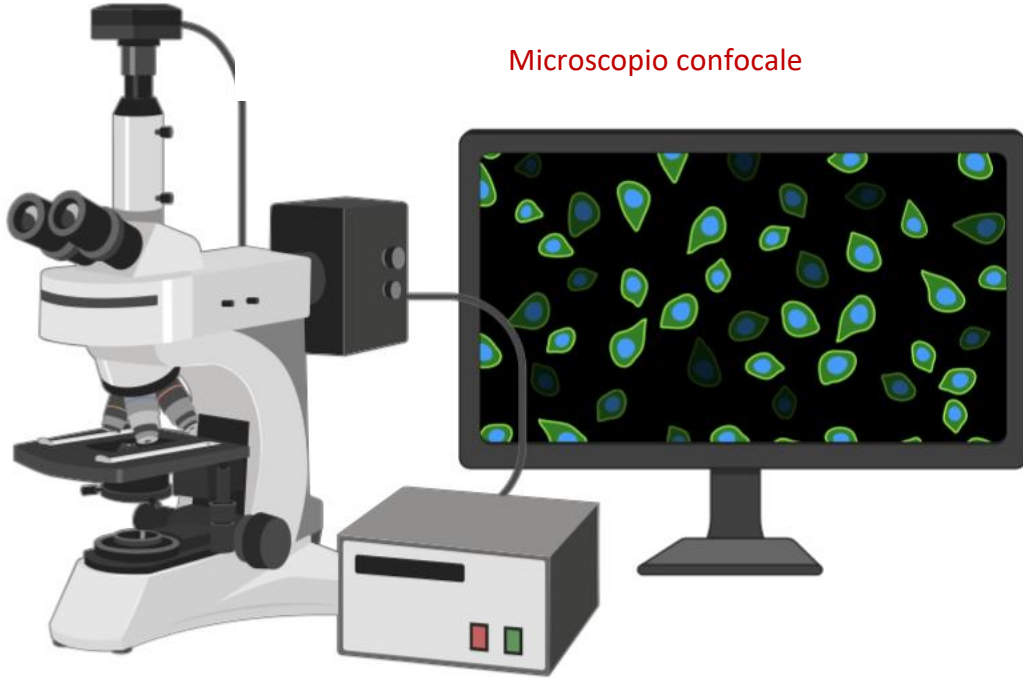
Species name	Phylum	Class	Subclass	Order	Family	No. of AGOs	No. of DCLs	No. of RdRPs
<i>Puccinia graminis</i>	Basidiomycota	Pucciniomycetes		Pucciniales	Pucciniaceae	2	3	4
<i>Ustilago hordei</i>	Basidiomycota	Ustilaginomycetes	Ustilaginomycetidae	Ustilaginales	Ustilaginaceae	1	1	2
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Ascomycota	Schizosaccharomycetes		Schizosaccharomycetales	Schizosaccharomycetaceae	1	1	1
<i>Aspergillus niger</i>	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiomycetidae	Eurotiales	Aspergillaceae	3	2	2
<i>Zymoseptoria tritici</i>	Ascomycota	Dothideomycetes	Dothideomycetidae	Capnodiales	Mycosphaerellaceae	3	1	3
<i>Blumeria graminis</i>	Ascomycota	Leotiomycetes	Leotiomycetidae	Erysiphales	Erysiphaceae	3	2	1
<i>Sclerotinia borealis</i>	Ascomycota	Leotiomycetes	Leotiomycetidae	Helotiales	Sclerotiniaceae	4	2	3
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Ascomycota	Leotiomycetes	Leotiomycetidae	Helotiales	Sclerotiniaceae	2	2	3
<i>Botrytis cinerea</i>	Ascomycota	Leotiomycetes	Leotiomycetidae	Helotiales	Sclerotiniaceae	2	2	3
<i>Colletotrichum graminicola</i>	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreomycetidae	Glomerellales	Glomerellaceae	2	2	3
<i>Magnaporthe oryzae</i>	Ascomycota	Sordariomycetes	Sordariomycetidae	Magnaporthales	Magnaporthaceae	3	2	3
<i>Podospora anserina</i>	Ascomycota	Sordariomycetes	Sordariomycetidae	Sordariales	Lasiosphaeriaceae	2	2	4
<i>Neurospora crassa</i>	Ascomycota	Sordariomycetes	Sordariomycetidae	Sordariales	Sordariaceae	2	2	3
<i>Fusarium graminearum</i>	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreomycetidae	Hypocreales	Nectriaceae	2	2	5
<i>Fusarium oxysporum</i>	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreomycetidae	Hypocreales	Nectriaceae	3	2	4
<i>Nectria haematococca</i>	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreomycetidae	Hypocreales	Nectriaceae	2	2	4
<i>Acremonium chrysogenum</i>	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreomycetidae	Hypocreales	Acremonium	3	2	3
<i>Verticillium dahliae</i>	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreomycetidae	Glomerellales	Plectosphaerellaceae	2	2	3
<i>Verticillium alfalfae</i>	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreomycetidae	Glomerellales	Plectosphaerellaceae	1	2	2
<i>Verticillium nonalfalfae</i>	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreomycetidae	Glomerellales	Plectosphaerellaceae	2	2	2

2) L'organismo target deve assorbire le molecole di RNA



Analisi al microscopio confocale di funghi trattati con dsRNA fluorescente

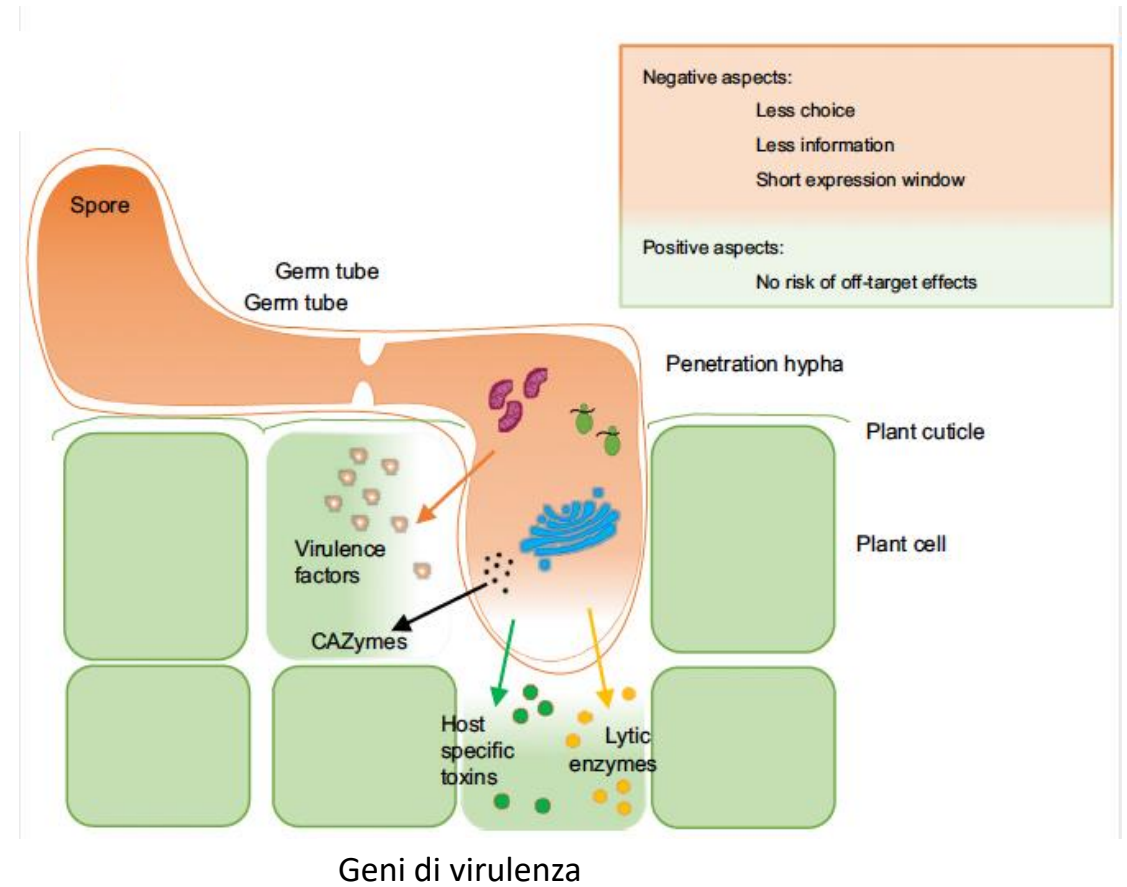
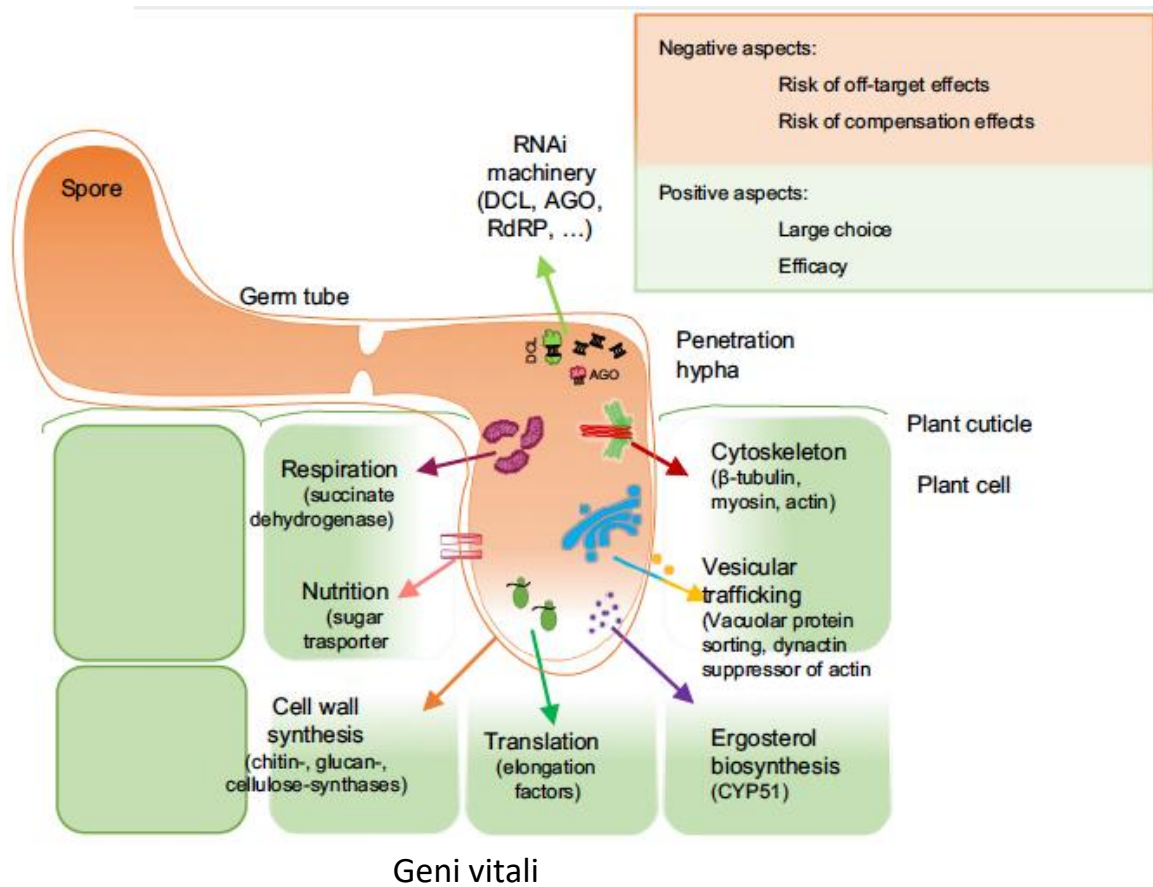
Microscopio confocale



B. cinerea trattata con dsRNA fluorescente dopo 6 ore



3) Il gene che si va a silenziare deve bloccare effettivamente la crescita del patogeno sulla pianta

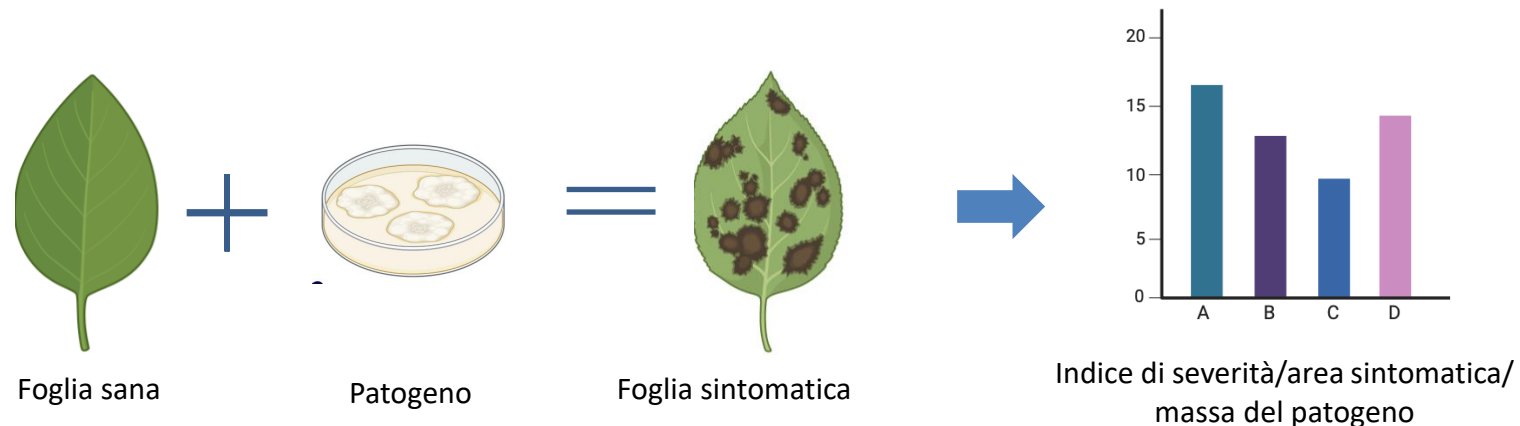


Non è banale trovare il giusto gene

- Conoscere i geni importanti per la crescita, lo stile di vita e la virulenza del patogeno
- Sequenza dei geni disponibile



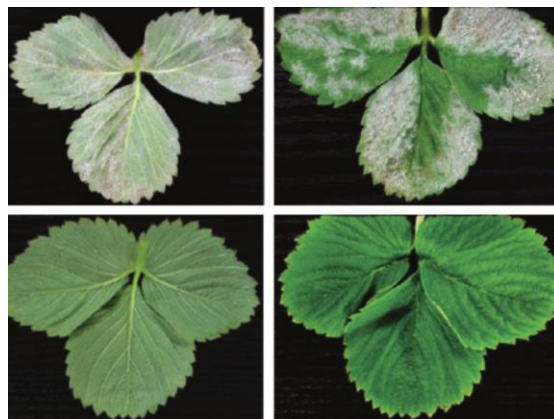
Necessario sviluppare un saggio di infezione affidabile per valutare l'efficacia del gene target prescelto



Muffa grigia (*Botrytis cinerea*)



Oidio (*Podosphaera aphanis*)

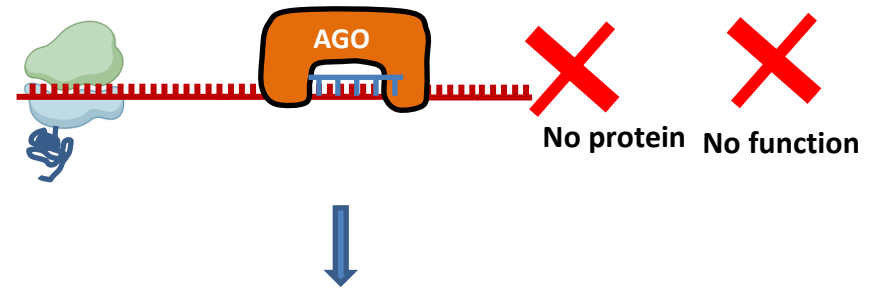
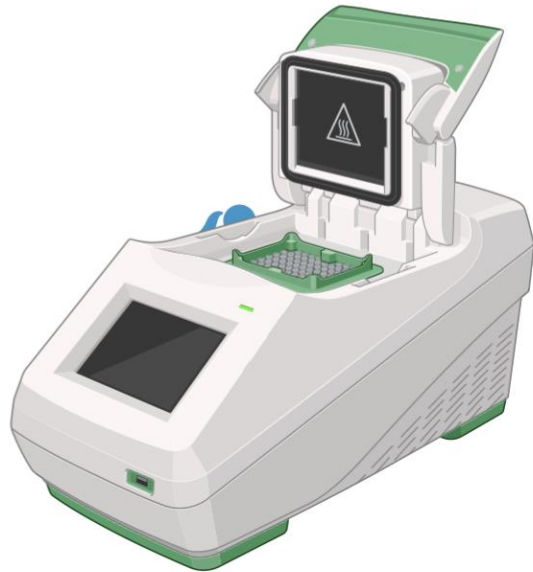


Peronospora (*Plasmopara viticola*)

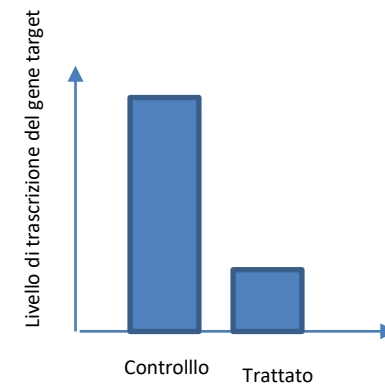
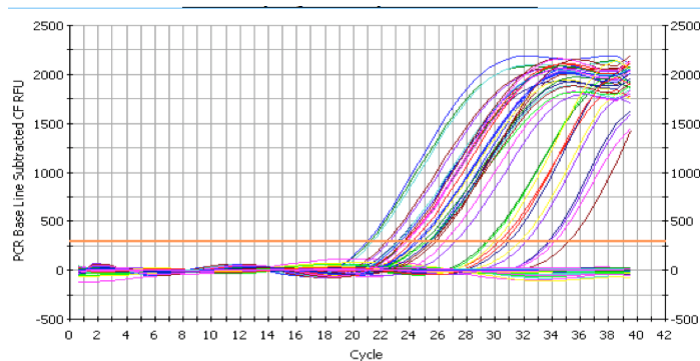


Necessario valutare il silenziamento genico tramite PCR quantitativa

Se l'approccio RNAi ha funzionato il gene target dovrebbe essere silenziato nella sua espressione



Il livello di RNA messaggero dovrebbe diminuire



Necessario testare numerosi geni



Come sviluppare un approccio spray SIGS dal lab al campo

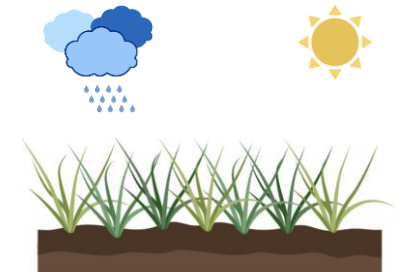
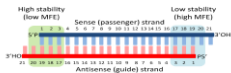
Disegno della
molecola
dsRNA

Produzione
della molecola
dsRNA

Test dell'efficacia
in laboratorio

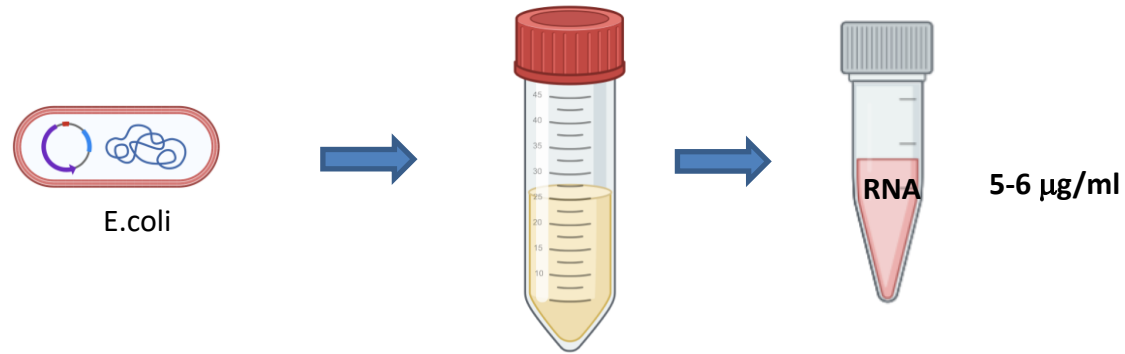
Test
dell'efficacia in
serra

Test
dell'efficacia in
campo

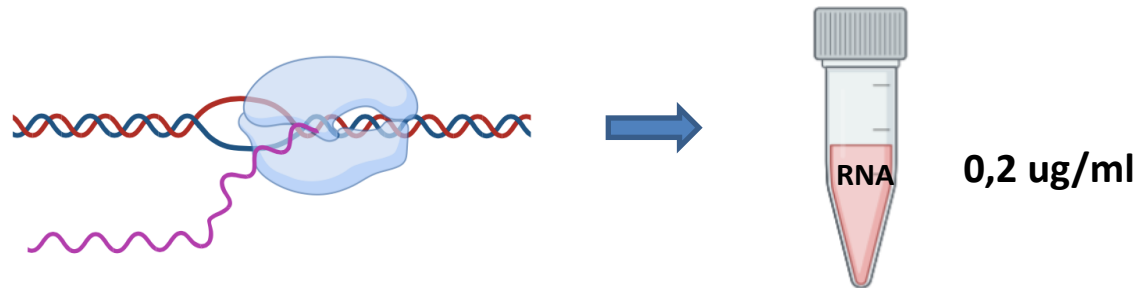


Produzione della molecola

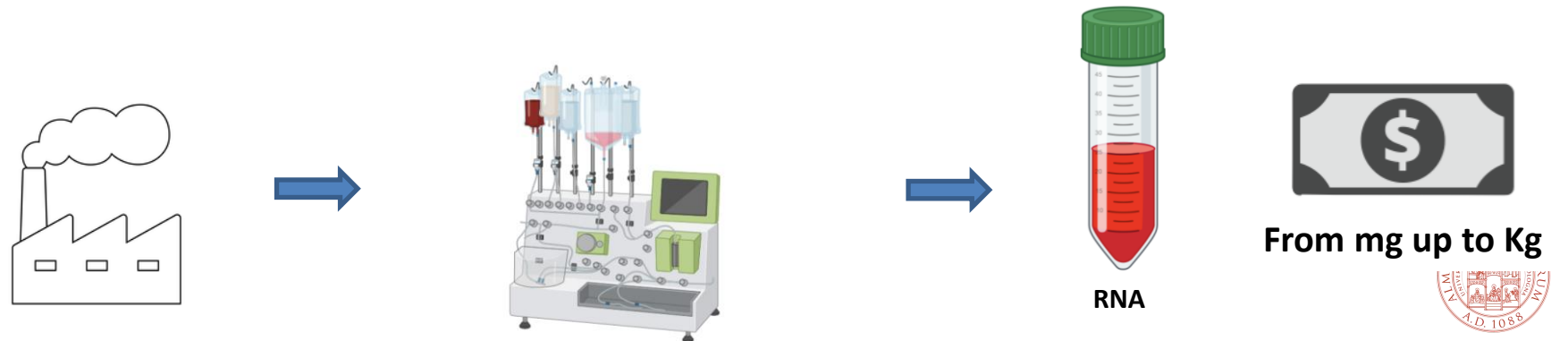
1) In Escherichia coli



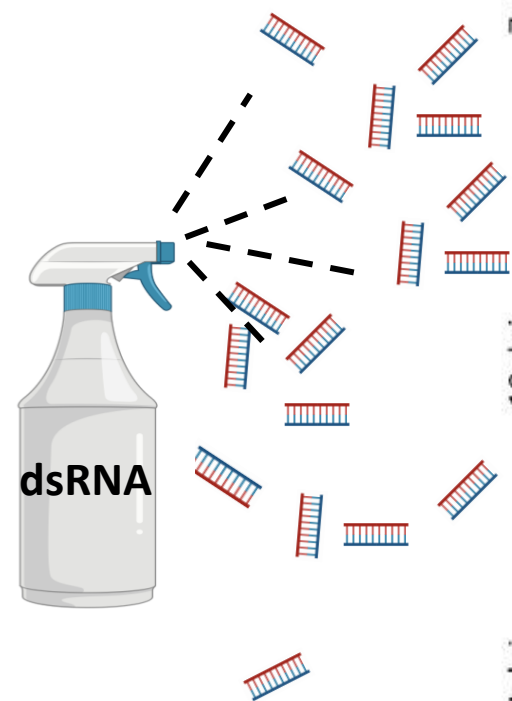
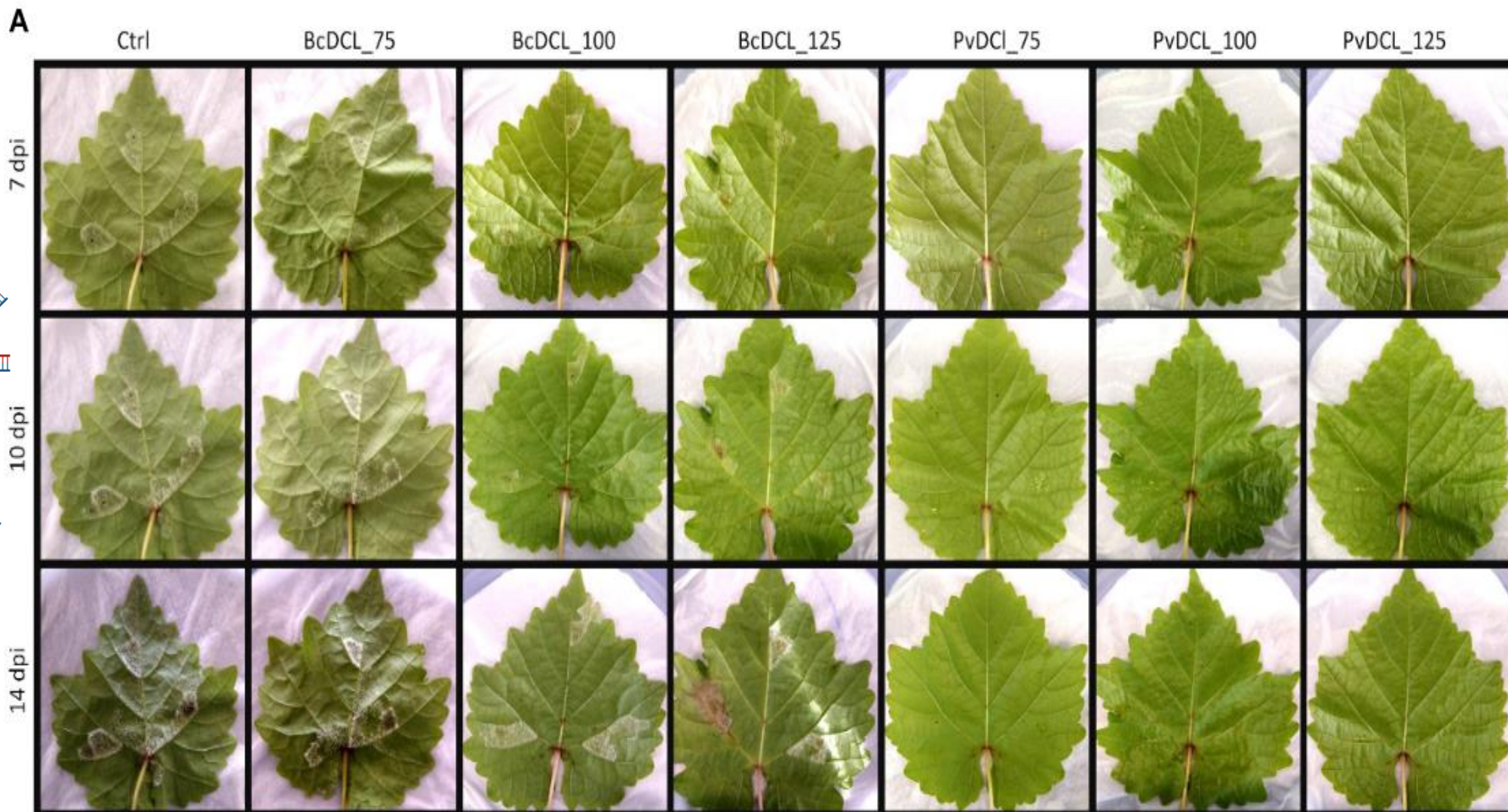
2) Trascrizione in vitro



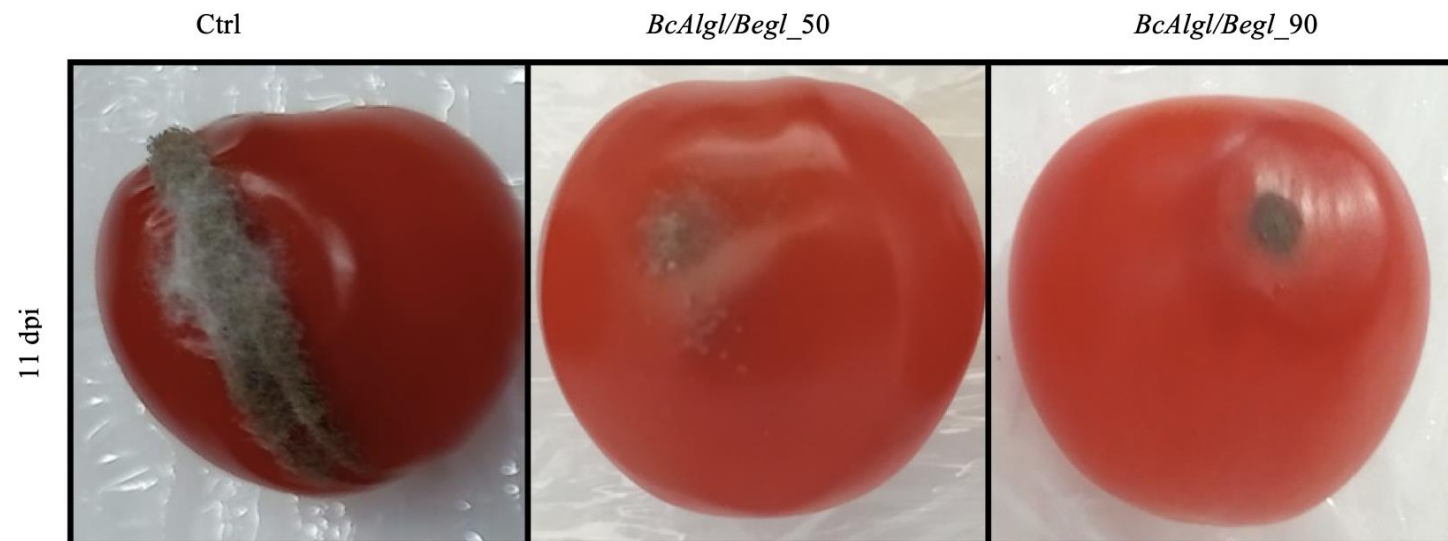
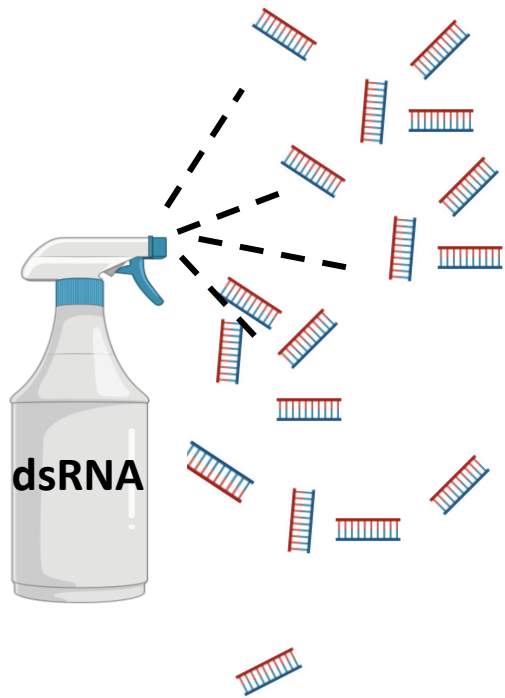
3) Sintesi chimica

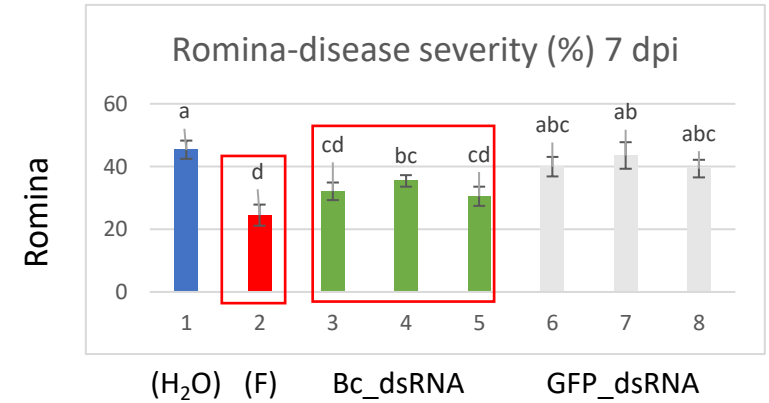
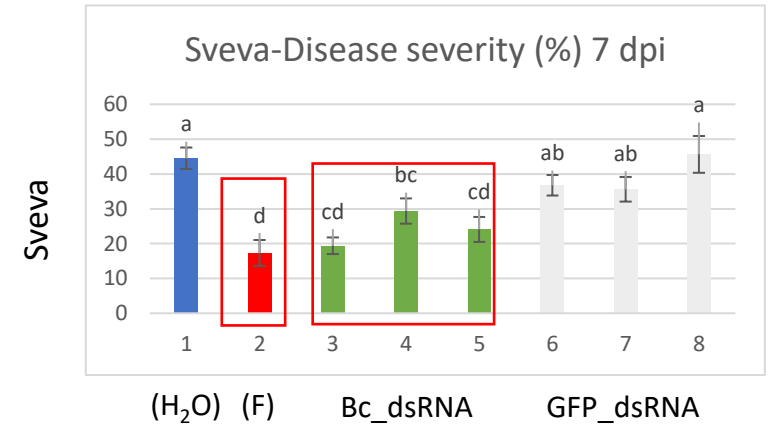
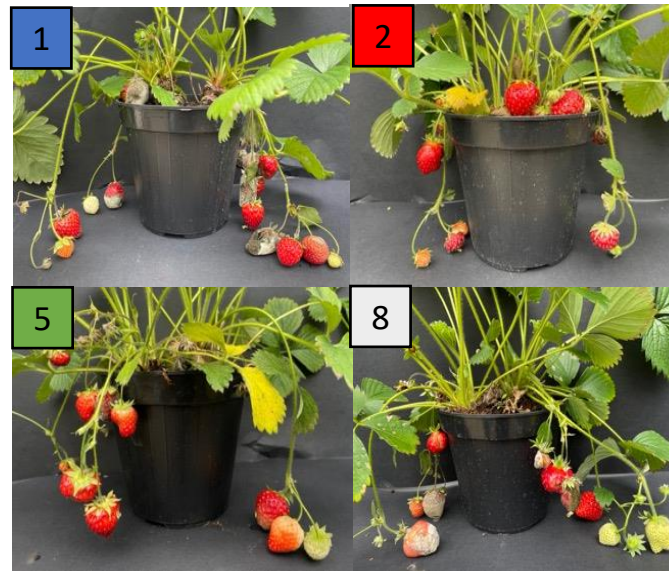
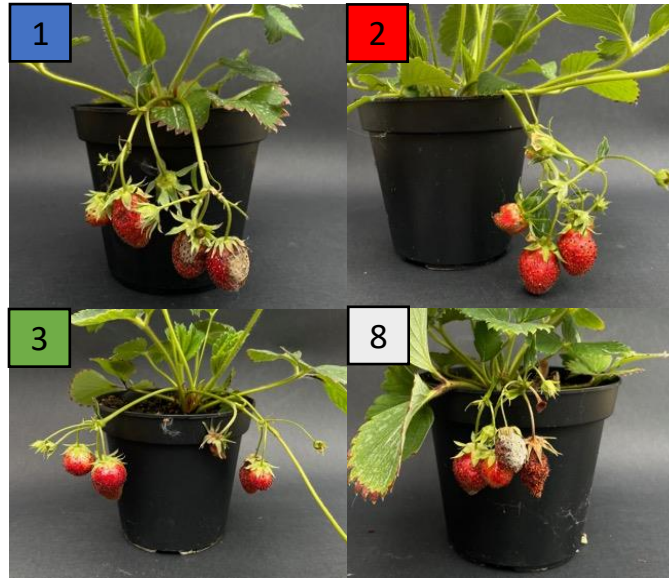
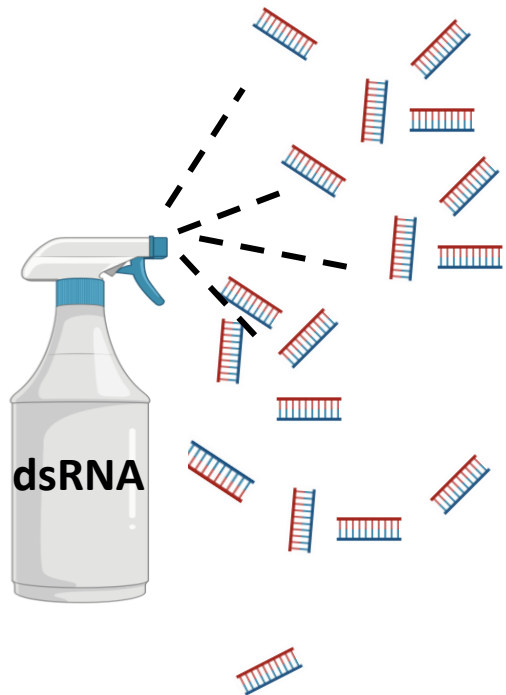


SIGS contro *Plasmopara viticola* : gene target Dicer



Controlli negativi





F= commercial fungicide Switch

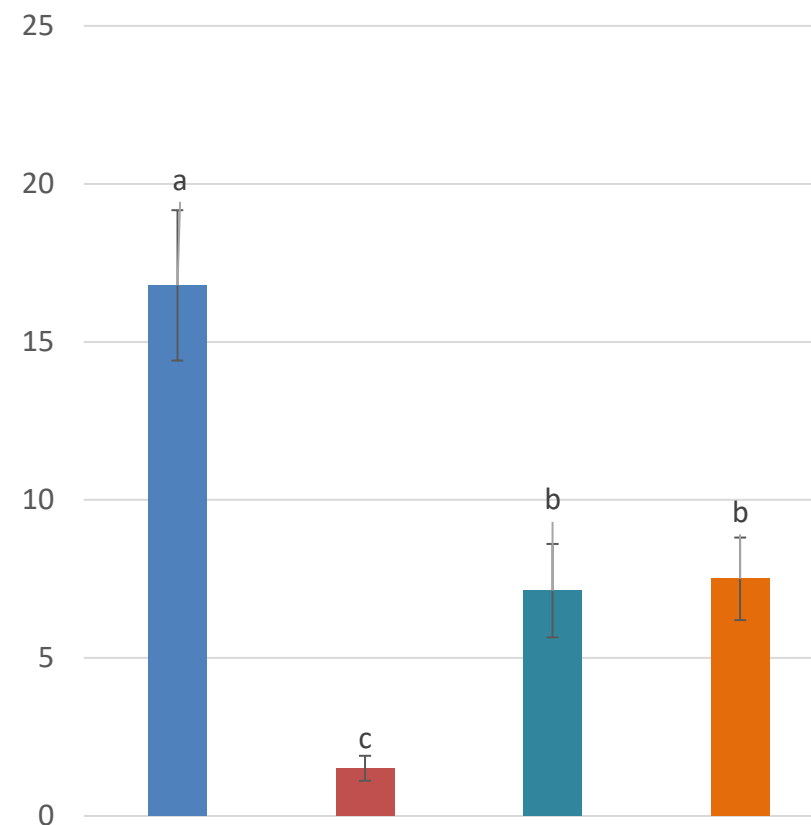


Test dell'efficacia in campo



6 fruit harvests on May 2023

disease severity

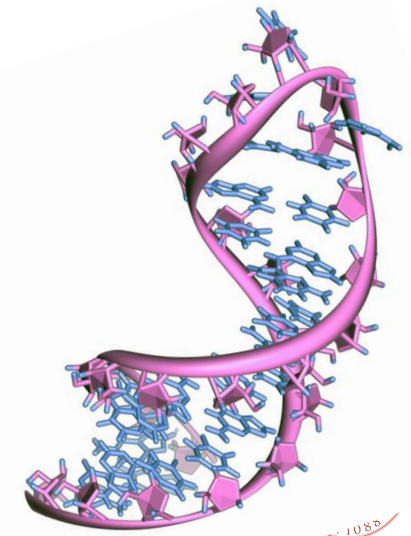


- Negative control (no-treatment)
- Conventional fungicides
- Organic fungicides
- ds-RNA based treatment



In conclusione l'RNA interferente può avere diversi vantaggi rispetto ai fungicidi convenzionali, è una tecnologia promettente con alcuni aspetti ancora da approfondire:

- L'RNA non è tossico e gli approcci spray esogeno e quello endogeno sfruttano un meccanismo naturale
- Gli RNA non sono stabili e si degradano facilmente in ambiente naturale
- Sono molecole molto specifiche e hanno quindi un basso rischio di off-target
- L'approccio endogeno coinvolge manipolazione genetica della pianta, ma senza produzione di proteine e raggiungibile senza coinvolgere la parte riproduttiva della pianta
- Manca una regolamentazione europea ('biopesticides'?)
- C'è necessita di lavorare sul risk assessment
- C'è necessita di sviluppare le formulazioni e stimolare la produzione industriale
- Sono urgenti il coinvolgimento degli investitori e l'informazione ai consumatori





ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA



elena.baraldi@unibo.it



MINISTERO DELL'ISTRUZIONE, DELL'UNIVERSITÀ E DELLA RICERCA

