



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

VI Edizione

SUMMER SCHOOL SANGUIS JOVIS

SANGIOVESE

PHYGITAL:

**L'impatto della tecnologia
dalla vigna al Metaverso**

Il futuro è del RNA. Epigenetica, tolleranza alle malattie, nuova variabilità

Prof.ssa Gabriella De Lorenzis



Dipartimento di Scienze Agrarie ed Ambientali

Università degli Studi di Milano

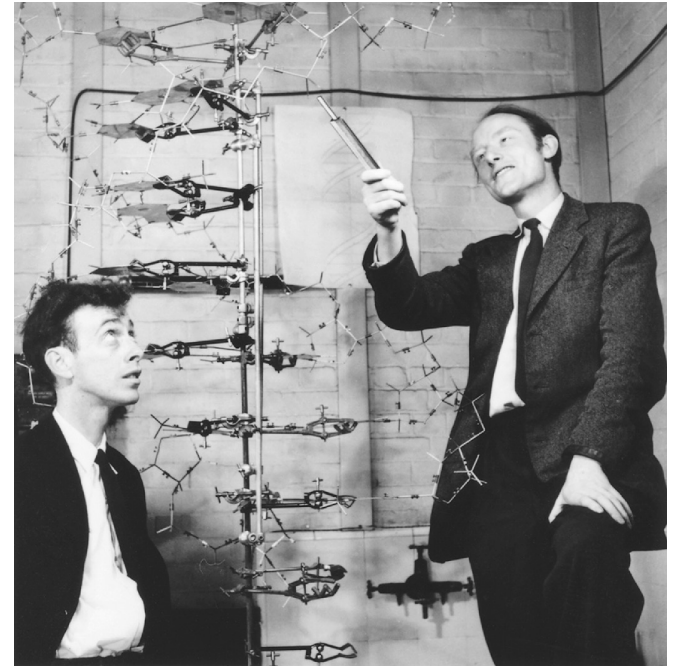


fondazione banfi

SANGUIS JOVIS
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

Il codice genetico: DNA

- 1954. Watson e Crick (Premio Nobel per la Medicina nel 1962) propongono il modello a doppia elica del DNA
- Il materiale genetico contiene, in forma stabile, tutte le **informazioni necessarie** per determinare la struttura dell'organismo, le sue funzioni, lo sviluppo e la riproduzione; si **replica** in modo accurato, affinché le Cellule figlie possano avere la stessa informazione genetica della cellula madre; è capace di **variare**.

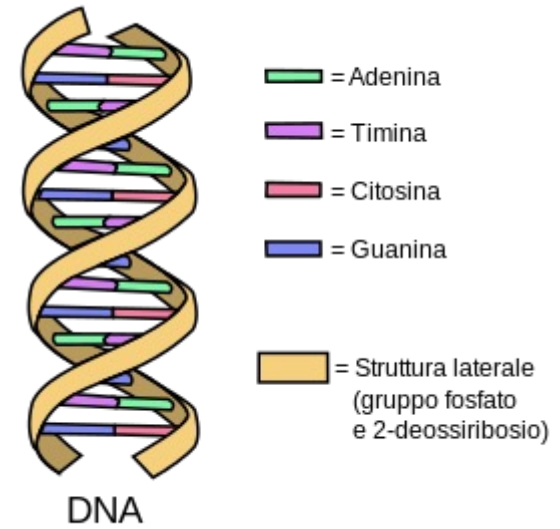


fondazione banfi

SANGUIS JOVIS
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

Il codice genetico: DNA

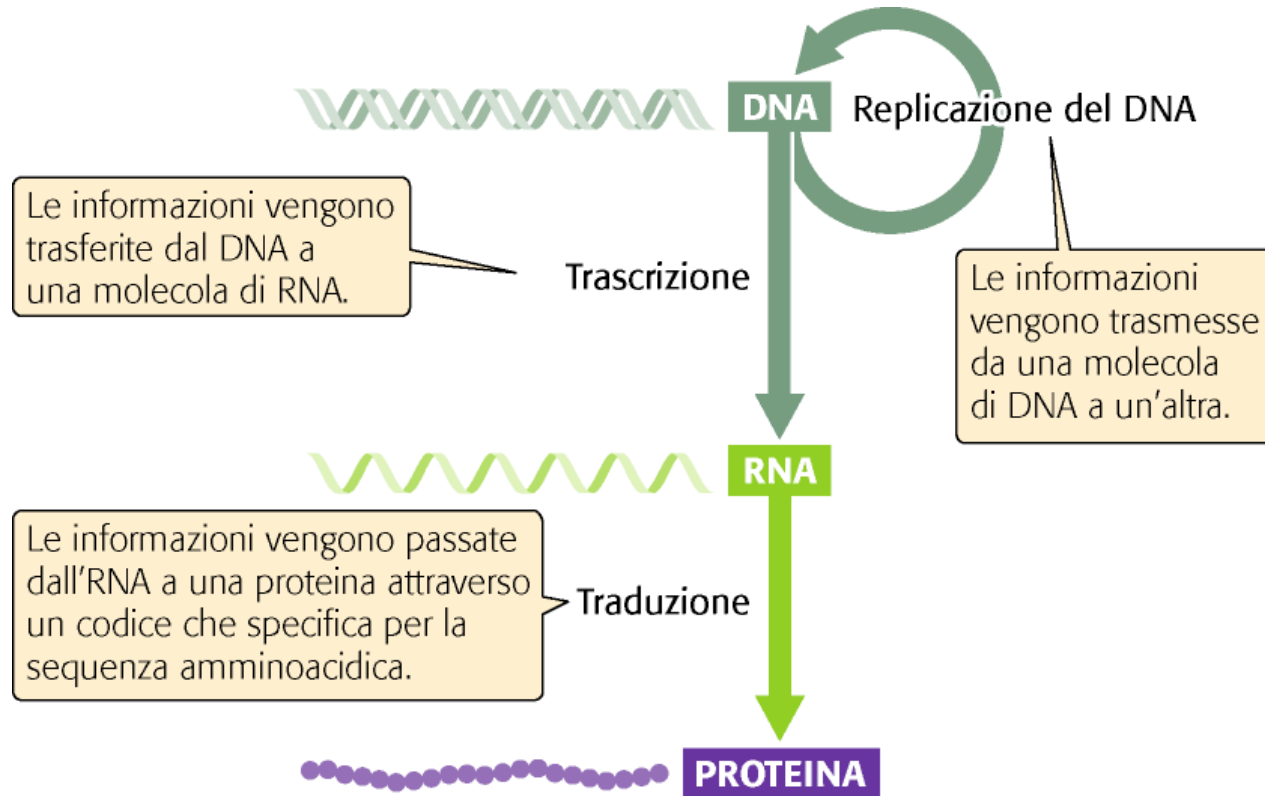
- Il DNA è un polimero costituito da 4 tipi di nucleotidi: adenina (A), guanina (G), timina (T) e citosina (C).
- Ogni nucleotide è composto da: un pentoso (zucchero a 5 atomi di carbonio, il desossiribosio), una base azotata ed un gruppo fosfato.
- Le basi azotate si suddividono in due classi: purine (A e G) e pirimidine (T e C) e sono complementari.



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

Il flusso dell'informazione genetica

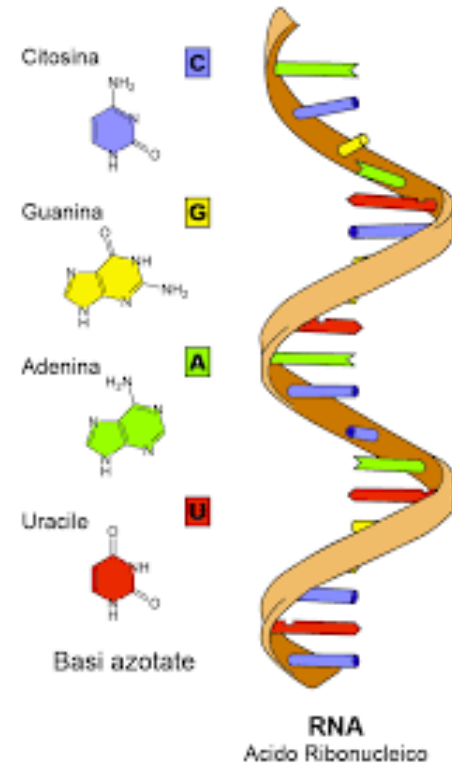


fondazione banfi

SANGUIS JOVIS
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

Il codice genetico: RNA

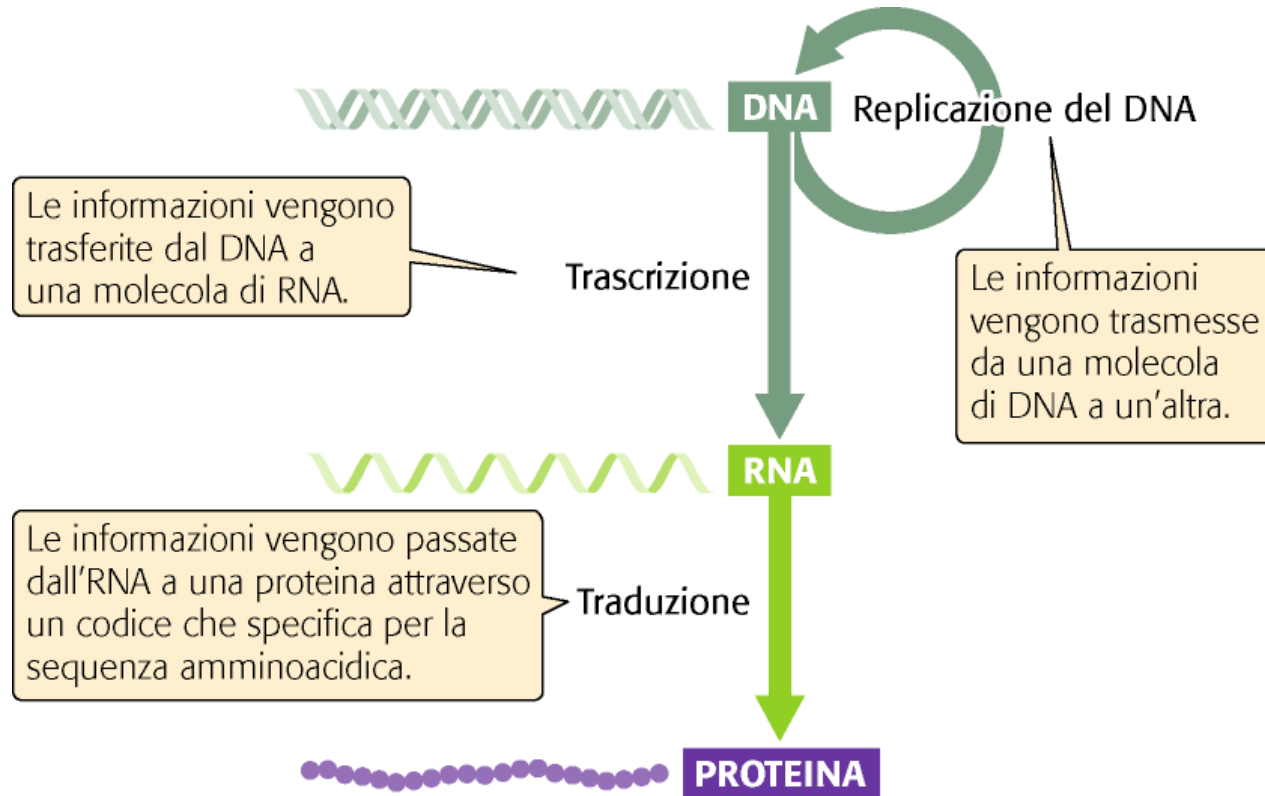
- L'RNA è di solito a **singola elica**.
- L'RNA contiene **ribosio** come zucchero.
- L'RNA contiene **uracile** al posto della timina.



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

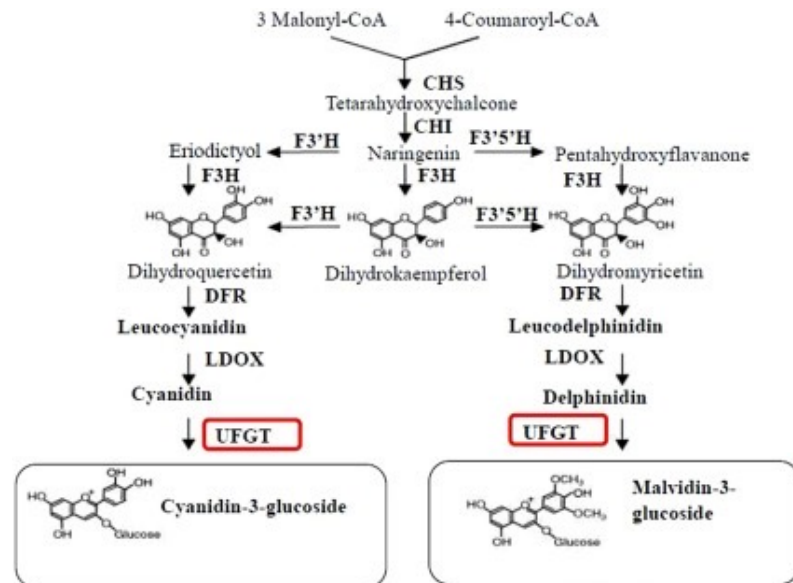
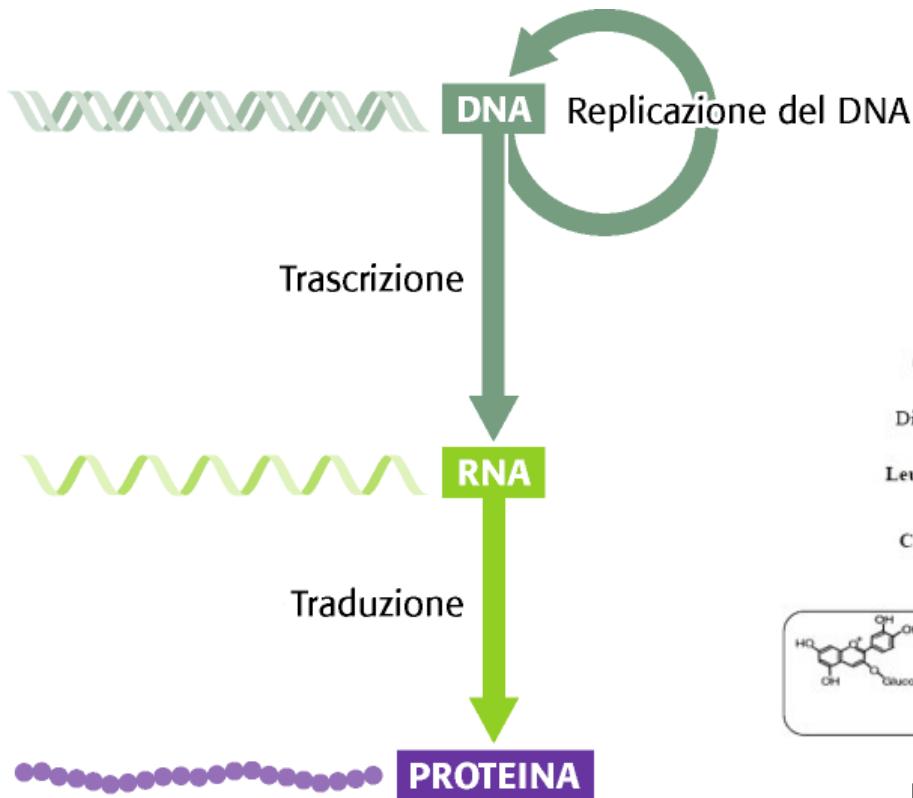
Il flusso dell'informazione genetica



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

Il flusso dell'informazione genetica



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

Come possiamo modificare il flusso dell'informazione genetica?

- Agendo sulle molecole di RNA attraverso l'RNA interference (RNAi).
- E' un meccanismo mediante il quale alcuni frammenti di RNA sono in grado di interferire (spegnere) l'espressione genica.
- Questi frammenti di RNA sono **complementari** all'RNA espresso dalla cellula (**gene target**).

Organismo
geneticamente
modificato

RNA
endogeno

RNA
esogeno

Applicazione
esogena di dsRNA

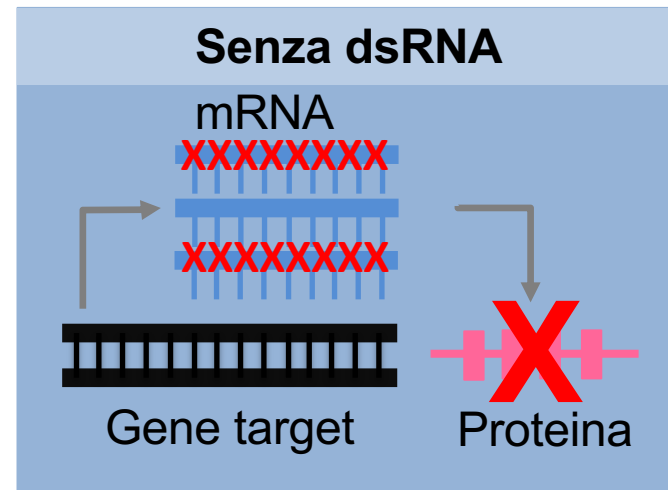
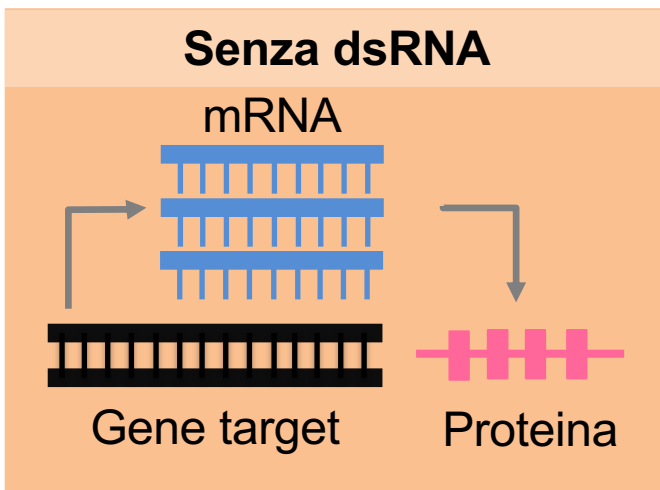


fondazione banfi

SANGUIS JOVIS
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

Il silenziamento genico tramite dsRNA

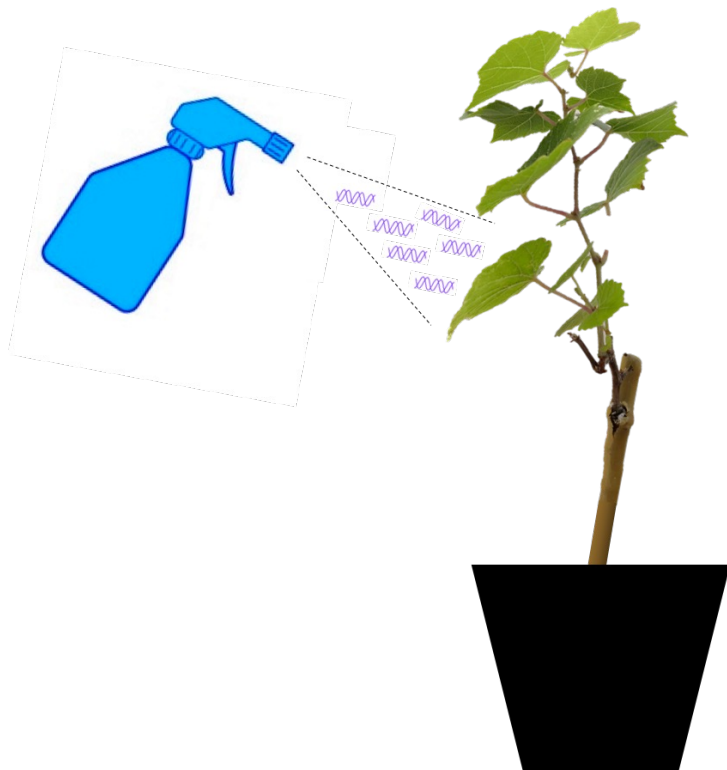
- dsRNA: double-stranded RNA



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

L'applicazione del dsRNA esogeno



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

Quali applicazioni agronomiche per il dsRNA esogeno?

- Il silenziamento dei geni di suscettibilità a stress biotici ed abiotici.

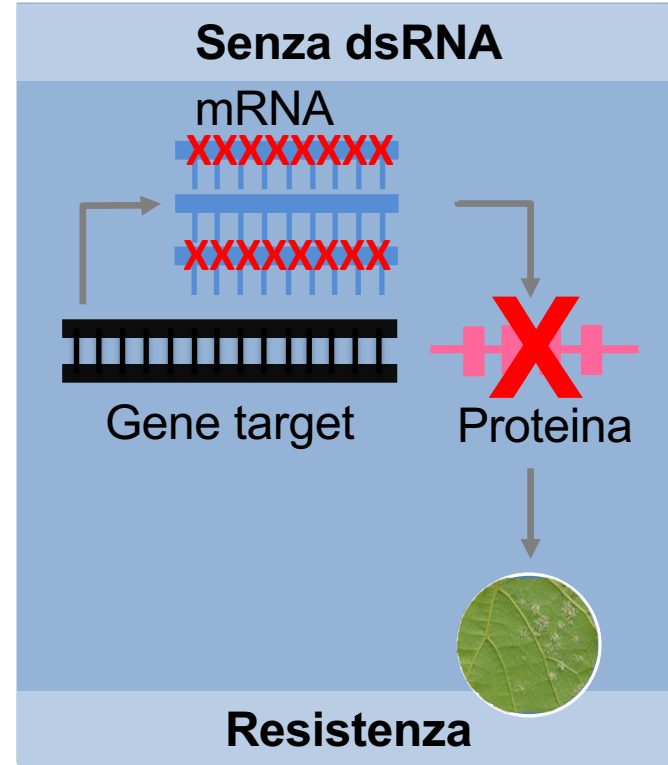
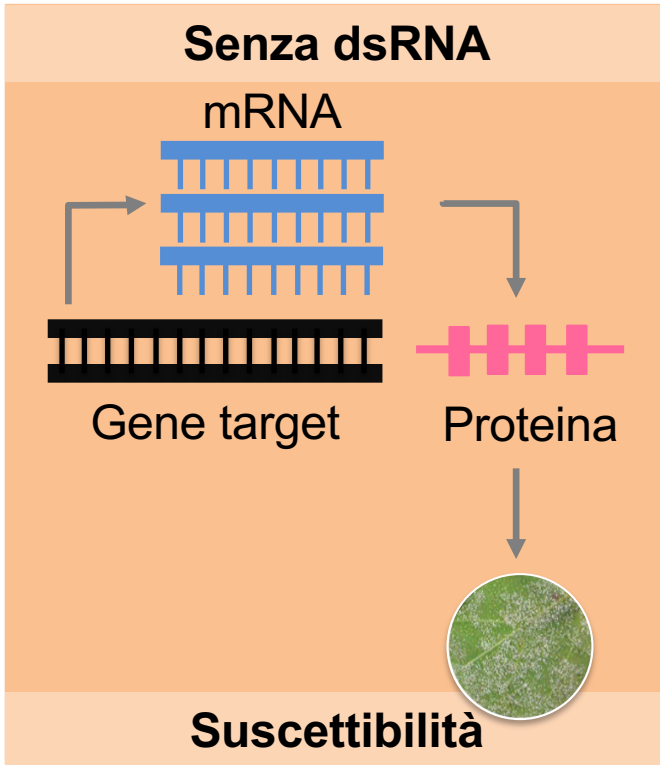
	Varietà resistenti	Varietà suscettibili
Gene di resistenza		
Gene di suscettibilità		



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

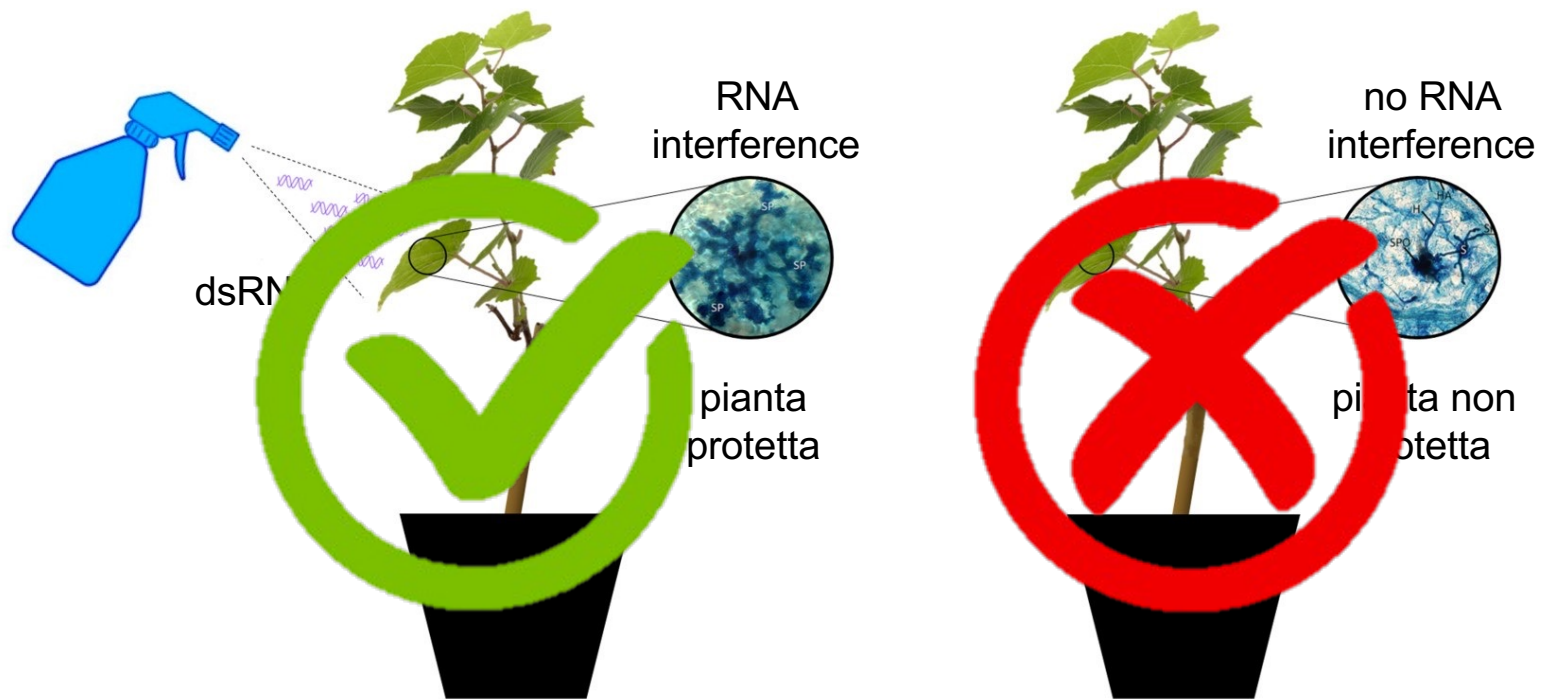
dsRNA: una strategia innovativa per combattere le fitopatie



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

dsRNA: una strategia innovativa per combattere le fitopatie



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

Quali geni di suscettibilità in vite?

- MLO per la resistenza ad iodio (Pessina et al. 2016)
- DMR6 per la resistenza a peronospora (Giacomelli et al. 2022)
- **LBDIf7 per la resistenza peronospora (Marcianò et al. 2021)**



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

Esistono varietà di vite (*V. vinifera*) resistenti alle crittogame



fonda

SANGIOVESI JOVINS
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

Varietà georgiane resistenti a *P. viticola*

Vitis 55, 121–128 (2016)

DOI: 10.5073/vitis.2016.55.121-128

Evidence of resistance to the downy mildew agent *Plasmopara viticola* in the Georgian *Vitis vinifera* germplasm

S. L. TOFFOLATTI¹, G. MADDALENA¹, D. SALOMONI¹, D. MAGHRADZE², P. A. BIANCO¹ and O. FAILLA¹

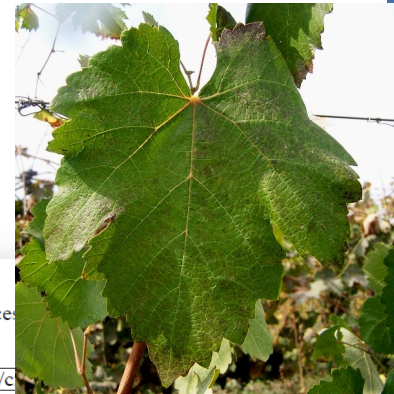
¹Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali, Università degli
²Scientific – Research Center of Agriculture, IT

Vitis 54 (Special Issue), 193–196 (2015)

Screening of Georgian grapevine germplasm for susceptibility to downy mildew (*Plasmopara viticola*)

N. BITSADZE¹, M. AZNARASHVILI¹, A. VERCESI², R. CHIPASHVILI¹, O. FAILLA² and D. MAGHRADZE¹

¹ Institute of Horticulture, Viticulture and Oenology, Agricultural University of Georgia, Tbilisi, Georgia
² Dipartimento di Scienze Agrarie ed Ambientali, University of Milan, Milano, Italy



Mgaloblishvili

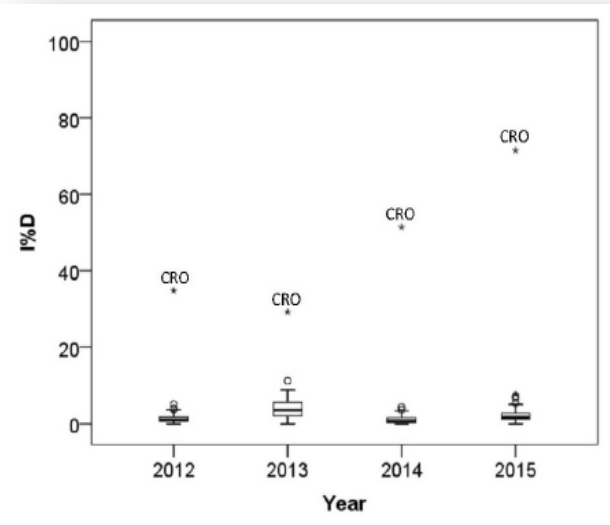


Table 3
Average values of sporangia $\times 10^3/\text{cm}^2$ of the accessions and results of statistical analysis*

Accession	Sporangia/cm ²
N21F - Buza	1.2 a
L22A - Mgaloblishvili	1.5 ab
M22F - Jami Bakhvis	2.2 abc
L23A - Khushia Shavi	2.3 abc
M22E - Kamuri Shavi	2.4 abcd
N23E - Imeruli Shavi	2.6 abcd
M24C - Argvetula	3.2 abcd
O22B - Ubakluri	3.3 abcd
L23F - Vertkvitchalis Shavi	3.9 abcd
N24F - Acharuli Tetri	7.3 bcd
O23D - Didshavi	18.7 cd
L22B - Marguli Sapere	25.9 d

*Mean values within the column followed by the same letter are not significant

Riduzione incidenza della malattia e sporulazione



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

Mgaloblishvili versus *P. viticola*

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Unique resistance traits against downy mildew from the center of origin of grapevine (*Vitis vinifera*)

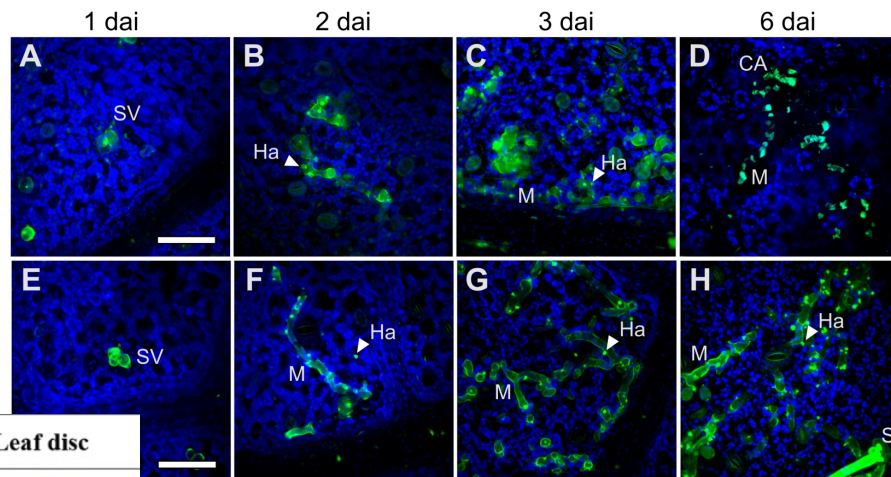
Received: 10 April 2018
Accepted: 30 July 2018
Published online: 21 August 2018



Silvia Laura Toffolatti¹, Gabriella De Lorenzis¹, Alex Costa¹, Giuliana Maddalena¹, Alessandro Passera², Maria Cristina Bonza², Massimo Pindo², Erika Stefani³, Alessandro Cestaro⁴, Paola Casati⁵, Osvaldo Failla⁶, Piero Attilio Bianco⁵, David Maghradze^{4,5} & Fabio Quaglino²

Minore colonizzazione della foglia

Mgaloblishvili

Pinot noir



Genotype	I%I (%)	Sporangia/cm ²	Leaf disc
Mgaloblishvili	25	1.4x10 ⁴	
Pinot noir	84	13.5x10 ⁴	

Minore sporulazione



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

Il gene VvLBDIf7



Article
Novel Aspects on The Interaction Between Grapevine and *Plasmopara viticola*: Dual-RNA-Seq Analysis Highlights Gene Expression Dynamics in The Pathogen and The Plant During The Battle For Infection

Silvia Laura Toffolatti ^{1,*,} Gabriella De Lorenzis ^{1,*,} Matteo Brilli ^{2,} Mirko Moser ^{3,} Vahid Shariati ^{4,} Elahe Tavakol ^{5,} Giuliana Maddalena ^{1,} Alessandro Passera ^{1,} Paola Casati ^{1,} Massimo Pindo ^{3,} Alessandro Cestaro ^{3,} David Maghradze ^{6,7,} Osvaldo Failla ^{1,} Piero Attilio Bianco ¹ and Fabio Quaglino ¹

Gene di resistenza



Gene di suscettibilità



LOB domain-containing Protein (LBD)



Varietà resistenti

Varietà suscettibili

Mgaloblishvili

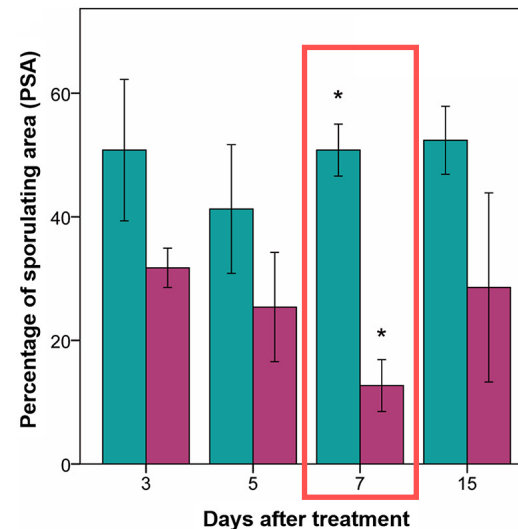
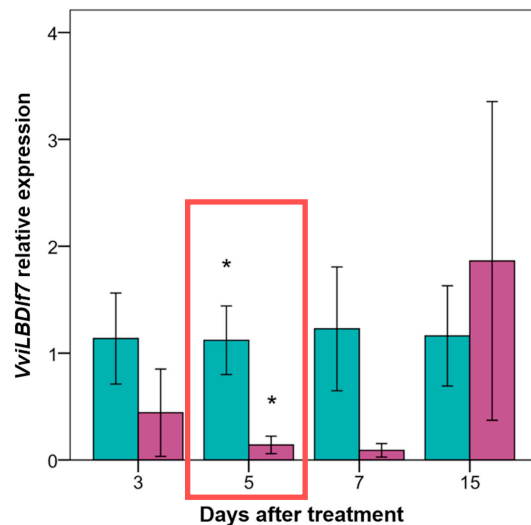
Pinot noir



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

La disattivazione di VvLBDIf7 con dsRNA riduce la suscettibilità a *P. viticola* in Pinot noir



**VvLBDIf7 è sottoespresso a cinque giorni dal trattamento con dsRNA (↑).
Riduzione della sporulazione di *P. viticola* a sette giorni dopo il trattamento
con dsRNA (↓).**



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

Quali altre strategie a base di dsRNA?

- dsRNA che abbia come target un gene del patogeno
- dsRNA che abbia come target un gene di resistenza al stress biotici



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

dsRNA *versus Botrytis cinerea*



Article

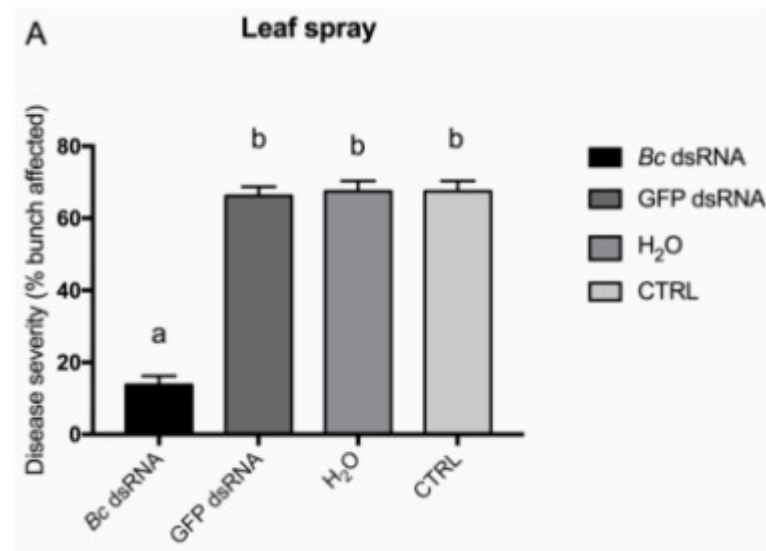
Double-Stranded RNAs (dsRNAs) as a Sustainable Tool against Gray Mold (*Botrytis cinerea*) in Grapevine: Effectiveness of Different Application Methods in an Open-Air Environment

Luca Nerva ^{1,2,*}, Marco Sandrini ^{1,3}, Giorgio Gambino ² and Walter Chitarra ^{1,2,*}

Geni: BcCYP51, Bcchs1, and BcEF2, siti d'azione dei fungicidi

Varietà: Moscato

Riduzione dell'incidenza della malattia in campioni trattati con Bc dsRNA



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

dsRNA *versus* stress idrico

Received: 15 October 2021 | Revised: 10 November 2021 | Accepted: 12 November 2021
DOI: 10.1111/pce.14228

ORIGINAL ARTICLE

Plant, Cell & Environment WILEY

Spray-induced gene silencing targeting a glutathione S-transferase gene improves resilience to drought in grapevine

Luca Nerva^{1,2} | Micol Guaschino^{1,3} | Chiara Pagliarani² | Mirko De Rosso¹ | Claudio Lovisolo³ | Walter Chitarra^{1,2}

Gene: VvGST40, glutatione S-transferase (responsabile dell'aumento dell'ABA)

Varietà: Chardonnay

Una volta reidratate, le piante trattate con dsRNA VvGST40 si sono riprese completamente, mostrando un fenotipo simile alle piante non stressate, senza alcun danno evidente dovuto alle condizioni di siccità applicate

(c) CTRL WS Recovery VvGST40 WS Recovery



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

Articolazione del progetto

1. Selezione dei geni bersaglio e disegno dei dsRNA
2. Trasformazione degli scarti (vinacce e sarmenti) in substrati di crescita per funghi (filamentosi e lieviti) o piante (*Nicotiana benthamiana*) in grado di sintetizzare i dsRNA
3. Sintesi di elevate quantità di dsRNA
4. Valutazione dell'efficacia dei dsRNA nel contenimento di peronospora e muffa grigia
5. Selezione del metodo più efficace e meno impattante per la sintesi dei dsRNA in funzione dell'impatto economico, sociale e ambientale del processo

Scopri di più



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

@Grape4vine project

www.grape4vine.unimi.it



Un'altra frontiera: IL GENOME EDITING

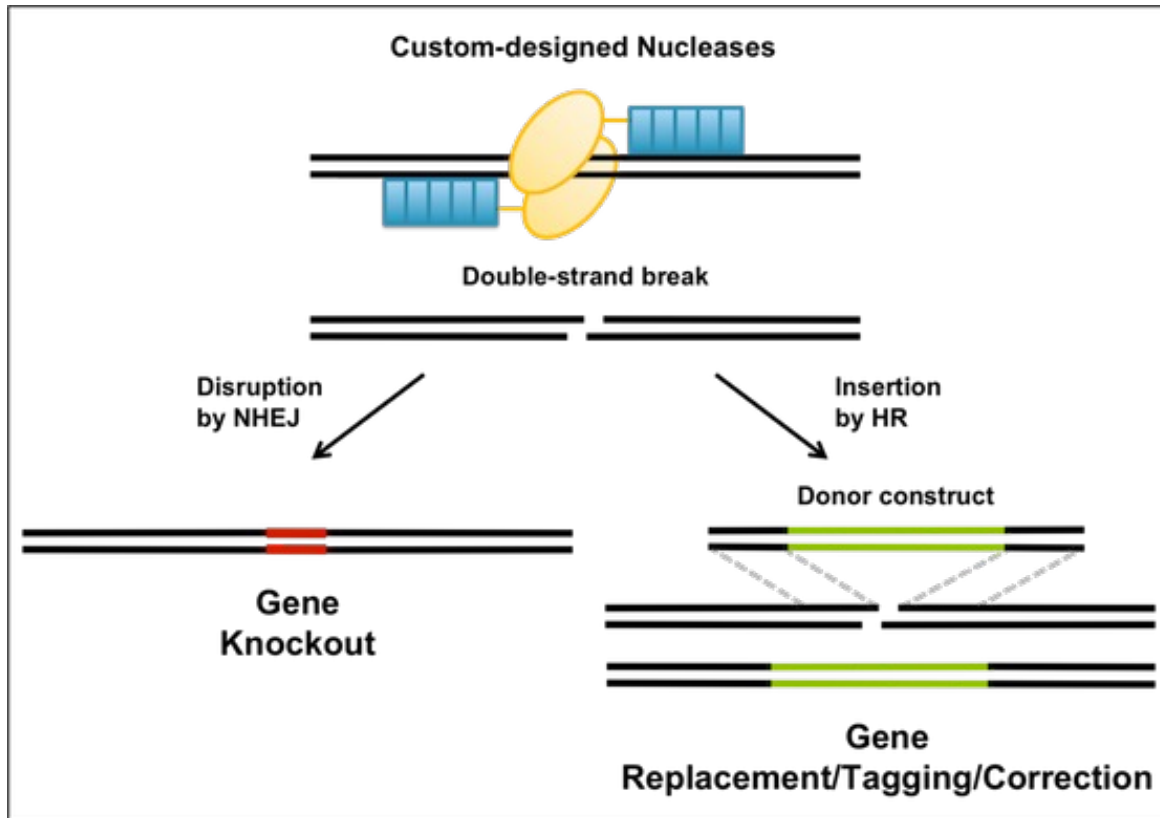
- Il genome editing è una tecnica che consente di **introdurre, eliminare o alterare** sequenze di DNA all'interno del genoma in una posizione specifica.
- Il genome editing rientra nella categoria delle new breeding technologies (NBT), in italiano TEA (tecniche di evoluzione assistita).
- Questa tecnica si basa sull'utilizzo di particolari **endonucleasi** ingegnerizzate in grado di **tagliare le sequenze di DNA** stabilite dallo sperimentatore.



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

Il genome editing: knock-out e knock-in



Knock-out:
inattivare un gene specifico (perdita di funzione);

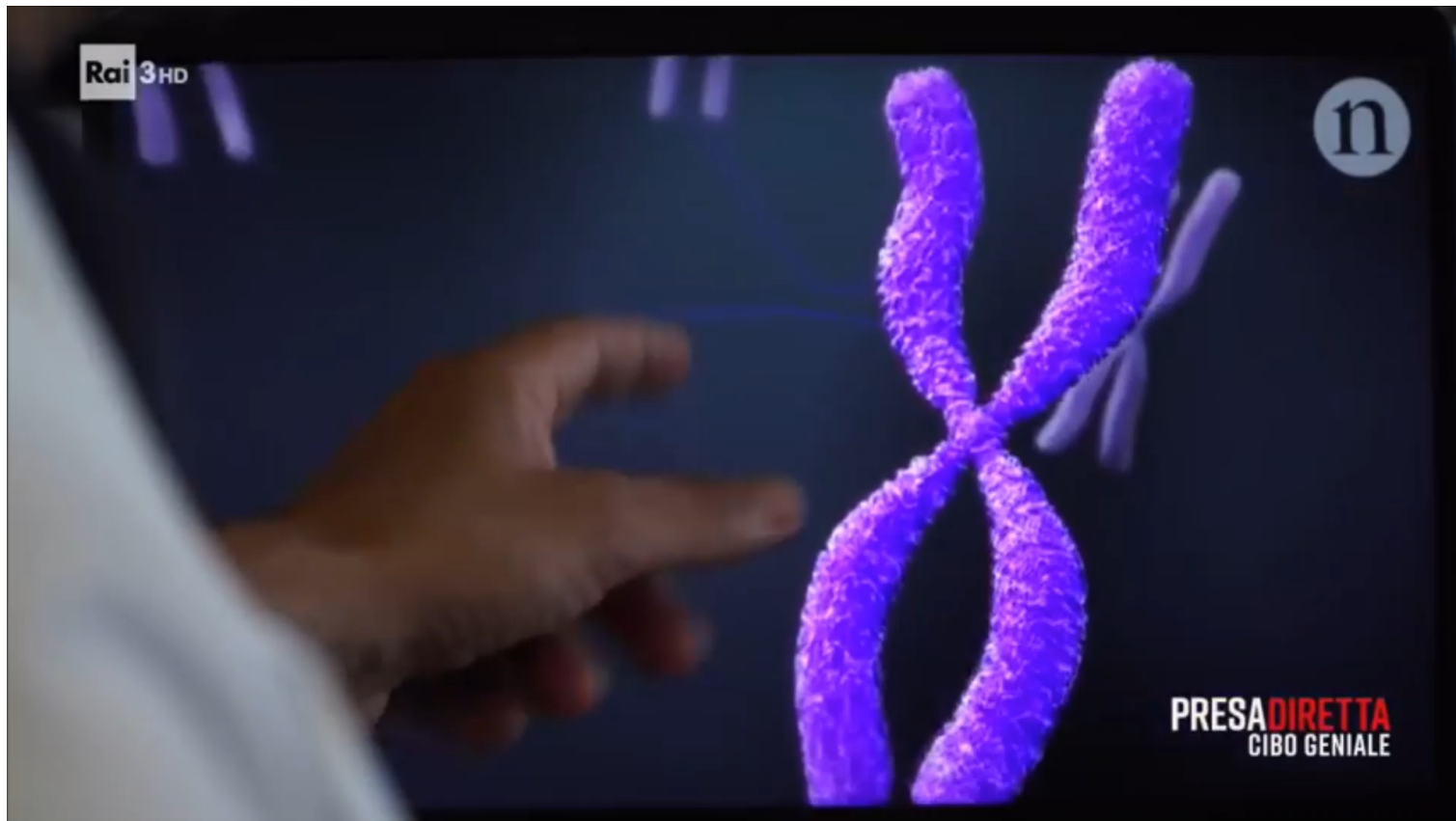
Knock-in
introdurre un gene esogeno (acquisizione di una funzione).



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

Il sistema CRISPR in azione



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

<https://www.youtube.com/watch?v=zACM5jgNlfQ>

Un altro premio Nobel



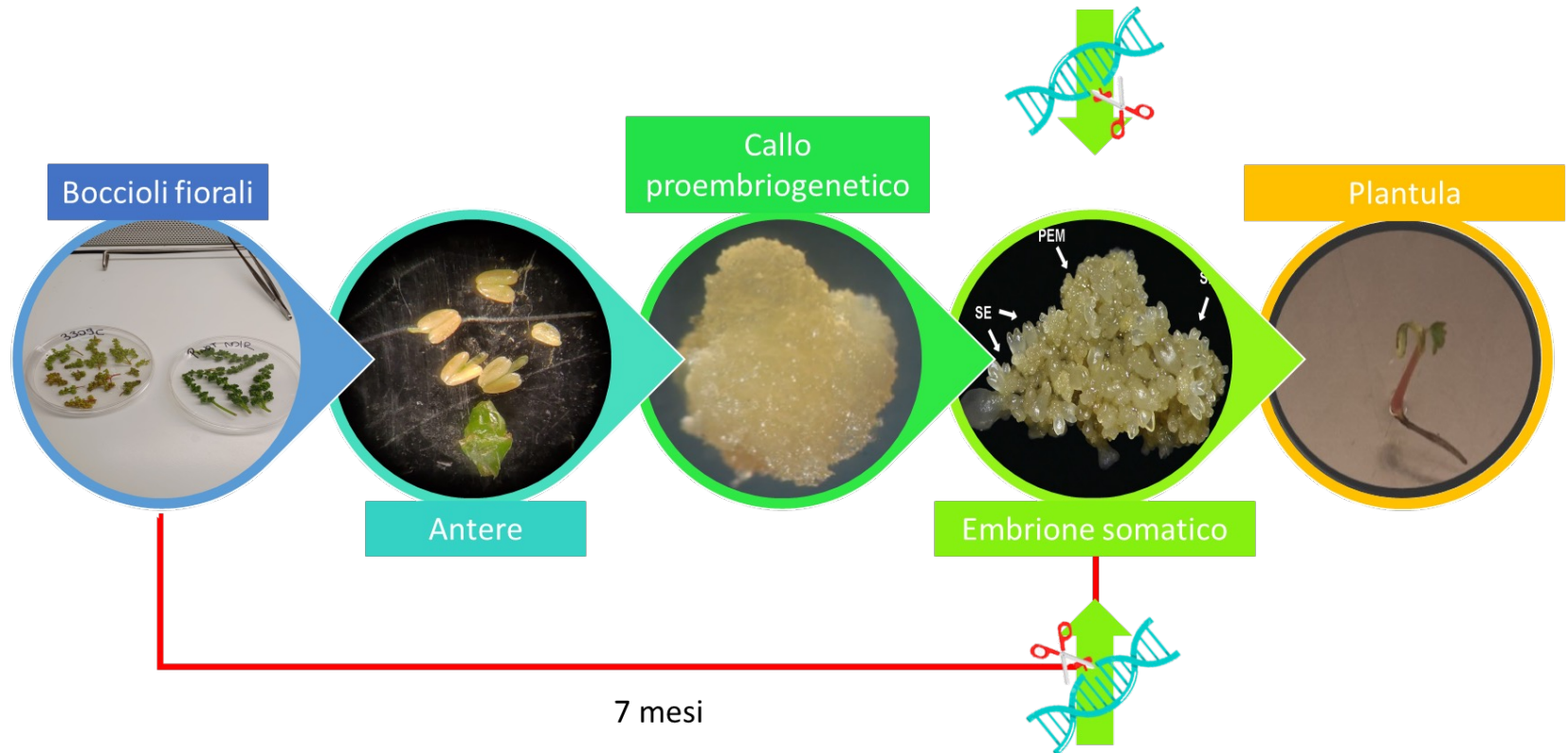
Emmanuelle Charpentier e Jennifer A. Doudna sono state premiate con il Nobel per la Chimica nel 2020.



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

Come si ottiene una pianta di vite editata?



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

Perchè investire nel dsRNA quando abbiamo a disposizione altre strategie?



1

Go to [wooclap.com](https://www.wooclap.com)

2

Enter the event code in the top banner

Event code
BANFI



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

L'epigenetica

- Parte della genetica che si occupa dei cambiamenti fenotipici ereditabili da una cellula o un organismo, in cui non si osserva una variazione del genotipo (sequenza nucleotidica).
- I fenomeni epigenetici concorrono a una certa plasticità fenotipica ereditabile (soprattutto per via vegetativa) perché indotti in modo differente al variare delle condizioni ambientali (stress abiotici).



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

Le modificazioni epigenetiche si possono ereditare?

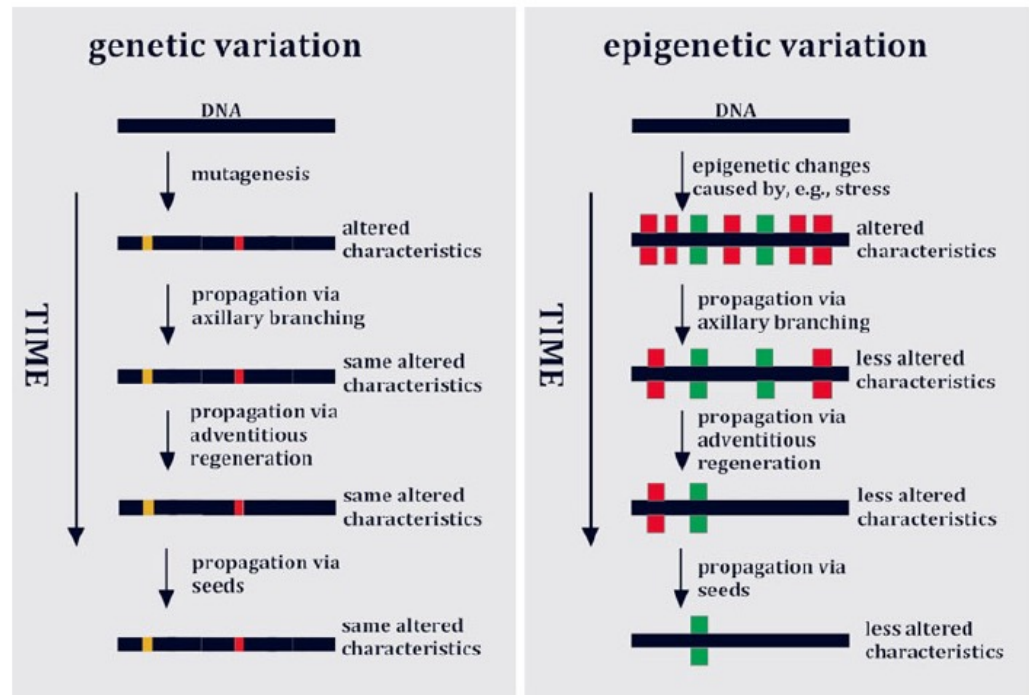
Plant Growth Regul (2011) 63:137–146
DOI 10.1007/s10725-010-9531-4

SI : TISSUE CULTURE

Epigenetics in plant tissue culture

M. J. M. Smulders · G. J. de Klerk

Fig. 1 Schematic representation of the differences between genetic and epigenetic variation. Note that during the various indicated tissue culture processes, the extent of genetic variation remains the same, but the extent of epigenetic variation is sharply reduced. In plants some epigenetic changes may survive sexual propagation



fondazi

SANGUIS JOVIS
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

Modificazioni epigenetiche del DNA

- Metilazione della citosina da parte delle metiltrasferasi
- Modificazioni post-traduzionali degli istoni: acetilazione, metilazione e altre.
- RNA interference – RNAi (piccoli RNA prendono di mira sequenze di DNA che modificano la cromatina, con conseguente formazione di eterocromatina e silenziamento dei geni target).

Questi processi alterano l'accessibilità alle regioni del genoma, sulle quali si legano proteine e enzimi deputati all'espressione genica e quindi alterano l'espressione del gene.

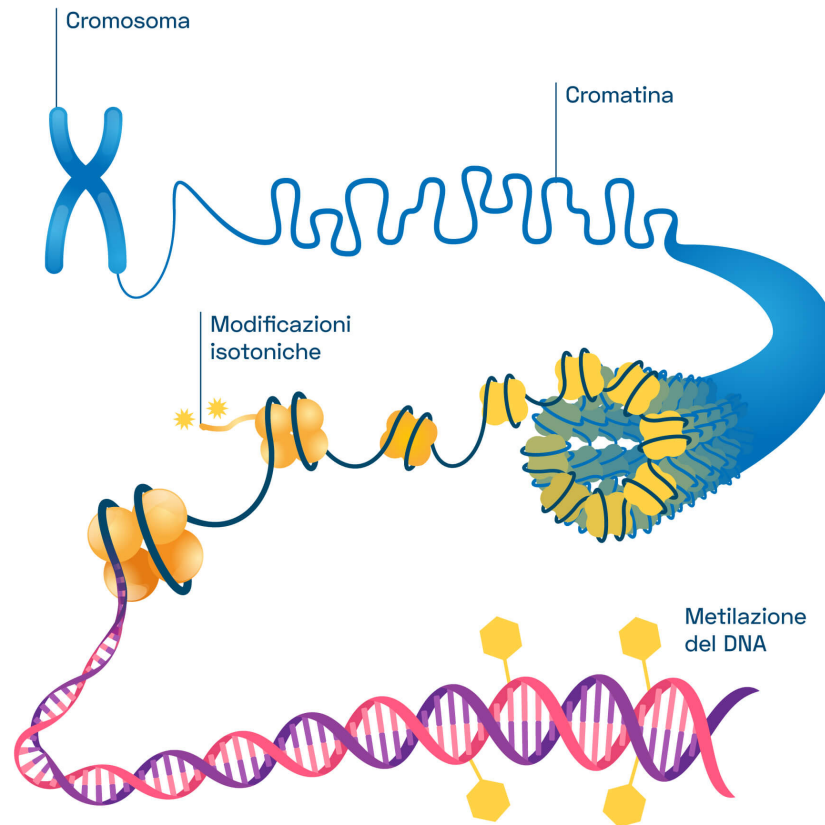


fondazione banfi

SANGUIS JOVIS
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

Modificazioni epigenetiche del DNA

Le **modificazioni istoniche** sono modificazioni epigenetiche che interessano gli *istoni*, le proteine che si associano al DNA e ne permettono il compattamento in cromatina. Il DNA compattato non è trascritto.



Una delle modificazioni epigenetiche più comuni è la **metilazione del DNA**. Alcuni enzimi, chiamati DNA metiltransferasi, aggiungono un gruppo metile a una citosina. Geni metilati non vengono trascritti.



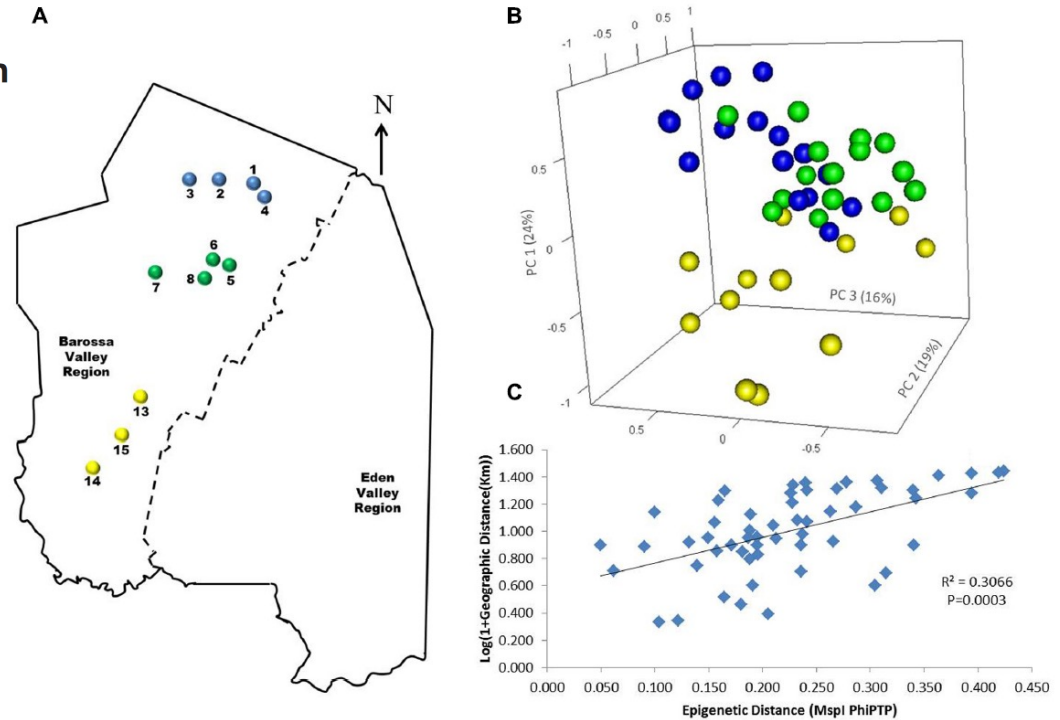
fondazione banfi

SANGUIS JOVIS
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

Modificazioni epigenetiche del DNA

Global DNA Methylation Patterns Can Play a Role in Defining Terroir in Grapevine (*Vitis vinifera* cv. Shiraz)

Huahan Xie^{1,2†}, Moumouni Konate^{1,2†}, Na Saj^{1,2,3}, Kiflu G. Tesfamicael^{1,2}, Timothy Cavagnaro², Matthew Gillilham^{2,3}, James Breen^{4,5}, Andrew Metcalfe⁶, John R. Stephen⁷, Roberta De Bei², Cassandra Collins² and Carlos M. R. Lopez^{1,2*}



I campioni provenienti da diverse zone sono facilmente distinguibili



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

Fondazione Banfi finanzia la ricerca

Studio della **variabilità intravarietale** della cultivar Sangiovese attraverso i cambiamenti epigenetici



Studio delle
caratteristiche
fenotipiche
della bacca

Clone di Sangiovese	Provenienza
VCR 6	Montalcino (Siena, Toscana)
TIN 10	Montalcino (Siena, Toscana)
VCR 5	Montalcino (Siena, Toscana)
T 14	Romagna
FEDIT 30	Romagna
VCR 23	Romagna

Studio delle
modificazioni
epigenetiche
nella bacca



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

Take home messages

- RNAi e CRISPR sono meccanismi naturali.
- dsRNA esogeno e TEA sono opportunità per una viticoltura più sostenibile e competitiva.
- Abbiamo l'esigenza di trovare nuovi target per il dsRNA e le TEA.
- I cambiamenti epigenetici sono indotti dall'ambiente.
- I cambiamenti epigenetici sono ereditabili.
- I cambiamenti epigenetici sono in parte responsabili della variabilità intravarietale.



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

Vi ringrazio per la cortese
attenzione

gabriella.delorenzis@unimi.it

Follow me on



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

fondazionebanfi.it