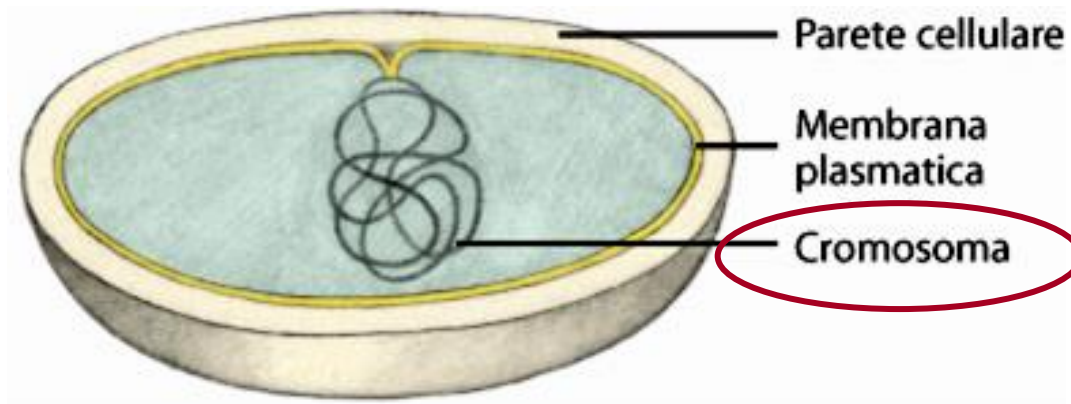


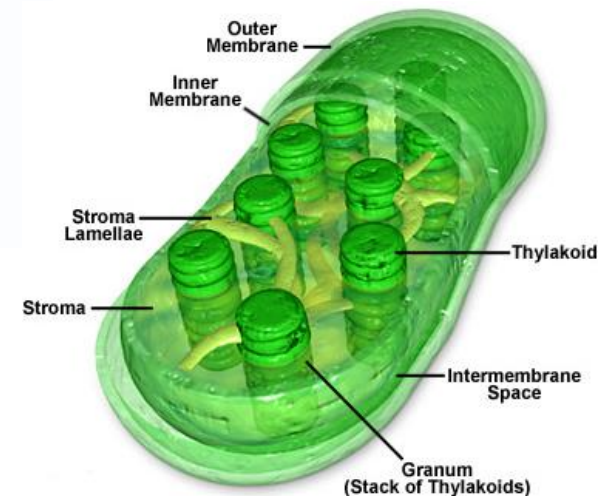
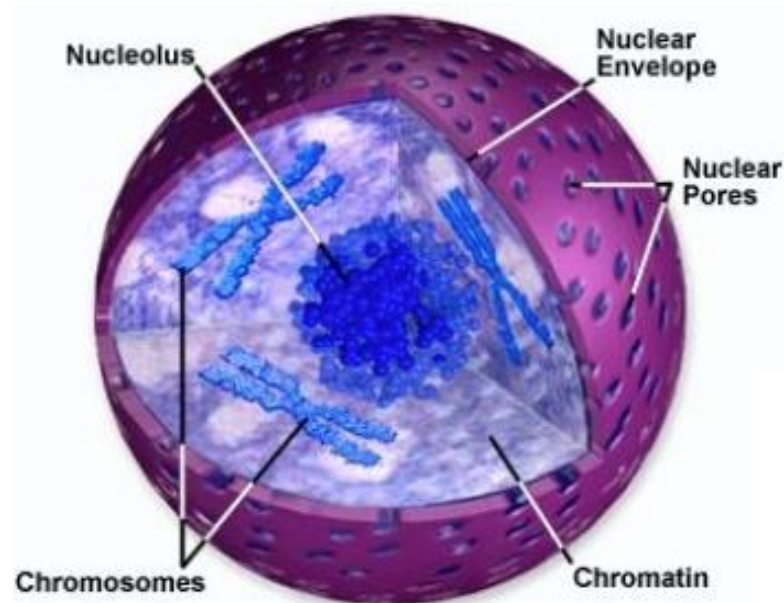
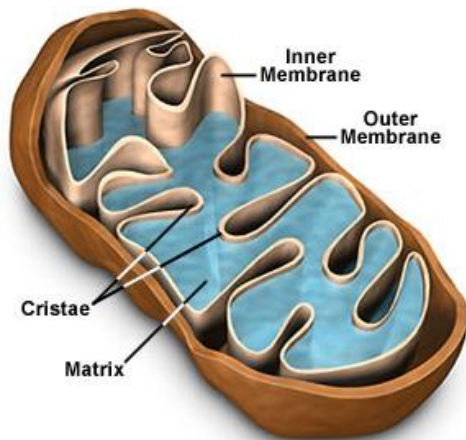
IL NUCLEO È ESCLUSIVO DELLA CELLULA EUCARIOTICA

Nei procarioti il DNA è circolare, nudo, ed occupa una regione del citoplasma (nucleoide) non delimitata da membrana



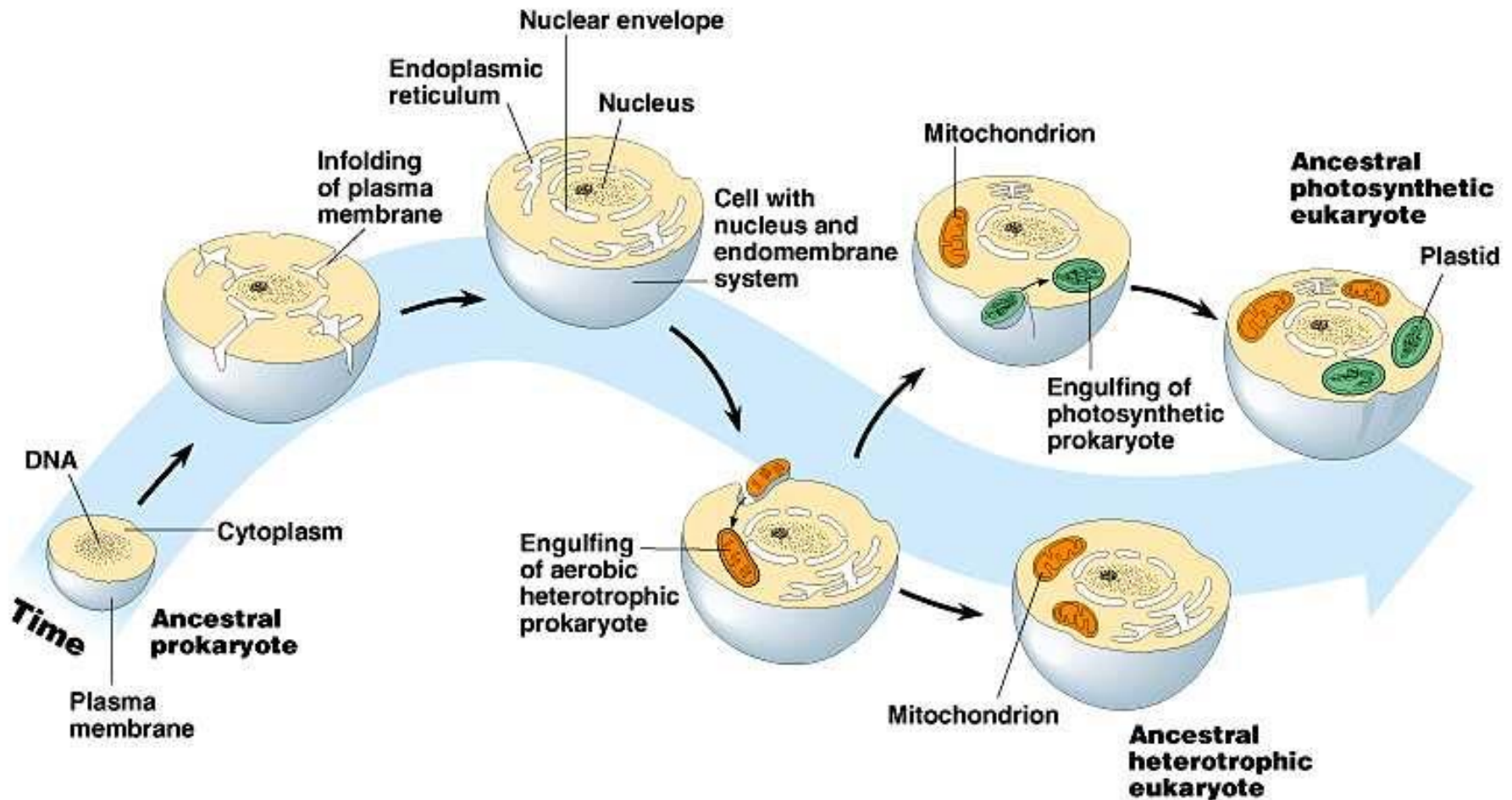
NELLA CELLULA VEGETALE IL DNA È CONTENUTO PRINCIPALMENTE NEL NUCLEO

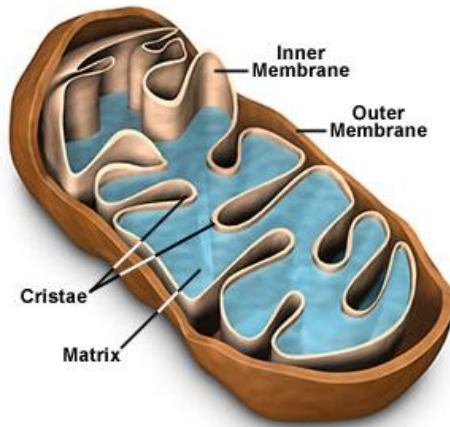
Una piccola parte del DNA è contenuta nei plastidi (DNA plastidiale) e nei mitocondri (DNA mitocondriale)



EVOLUZIONE DEL NUCLEO

Il nucleo e il RE si sono, probabilmente, evoluti per invaginazione del plasmalemma (vescicole endocitotiche)





ORIGINE DEI MITOCONDRI Secondo Martin and Muller (1998) l'ipotesi più probabile è che l'origine dei mitocondri sia avvenuta all'origine della cellula eucariotica. A supporto dell'origine **monofiletica**, l'informazione genetica contenuta nel mtDNA è fondamentalmente la stessa in tutti gli eucarioti. Sono presenti un certo numero di geni che codificano componenti della membrana interna coinvolti nella generazione di ATP attraverso la fosforilazione ossidativa accoppiata al trasporto di elettroni e un numero variabile di geni codificanti componenti del sistema della sintesi proteica (rRNA, tRNA e proteine ribosomali).

Il confronto dell'organizzazione e del contenuto genico di genomi mitocondriali completamente sequenziati, appartenenti ad organismi distanti dal punto di vista filogenetico, suggerisce che in tempi brevi rispetto all'evento di endosimbiosi si sia verificata una massiccia perdita di geni molti dei quali sono stati trasferiti al nucleo. Il genoma di *Rickettsia prowazekii*, proteobatterio vicino dal punto di vista filogenetico all'ipotetico progenitore dei mitocondri, contiene infatti 832 geni codificanti proteine, mentre il corredo genico dei mtDNA moderni è di circa un ordine di grandezza inferiore (il mtDNA umano ne contiene 13 e quello di *Arabidopsis* 32).

MtDNA nelle piante è di dimensione molto variabile e, nelle piante terrestri, risulta molto più grande (200-2500 kb) rispetto a quanto riscontrato nei sistemi animali (16-20 kb).

Caratteristiche di genomi mitocondriali di alcuni organismi vegetali.

Caratteristiche	Taxon							
	<i>Chara</i>	<i>Marchantia</i>	<i>Physcomitrella</i>	<i>Cycas</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>Nicotiana</i>	<i>Oryza</i>	<i>Zea</i>
Dimensione (nt)	67.737	186.609	105.340	414.903	366.924	430.597	490.520	454.528
Numero di geni RNA codificanti proteine	39	41	39	39	32	36	35	32
RNA transfer	26	27	24	22	17	21	18	17
RNA ribosomiali	3	3	3	3	3	3	3	3
Sequenze non codificanti (%)	9,3	79,7	73	89,9	89,4	90,1	88,9	93,8

Il mtDNA delle piante terrestri è caratterizzato da un tipo di organizzazione che può essere definita espansa attestandosi anche a 2500 kb in alcune Cucurbitacee; tuttavia, esso non codifica per una quantità proporzionalmente maggiore di geni rispetto al mtDNA ancestrale tipico delle alghe verdi. La dimensione del mtDNA non è infatti correlata alla quantità di informazione genetica ivi contenuta. La dimensione del mtDNA aumenta considerevolmente nelle angiosperme. In aggiunta, passando da alghe verdi e briofite alle piante a seme, si assiste ad una progressiva perdita di geni per proteine ribosomiali e tRNA ed un parallelo imponente aumento delle sequenze non codificanti.

Sterilità maschile

Circa 150 specie vegetali non sono in grado di formare polline funzionale. Il fenomeno è determinato dal genoma mitocondriale. Lo sviluppo del polline richiede grande input di energia e quindi attività dei mitocondri.

I fenotipi di fiori che presentano sterilità maschile sono vari: stami convertiti in carpelli o in petali, degenerazione degli stami, formazione di polline non funzionale.

E' noto che la corretta identità dei verticilli fiorali è originata da uno specifico pattern di espressione spaziale di fattori di trascrizione codificati dai geni nucleari (MODELLO ABCDE).

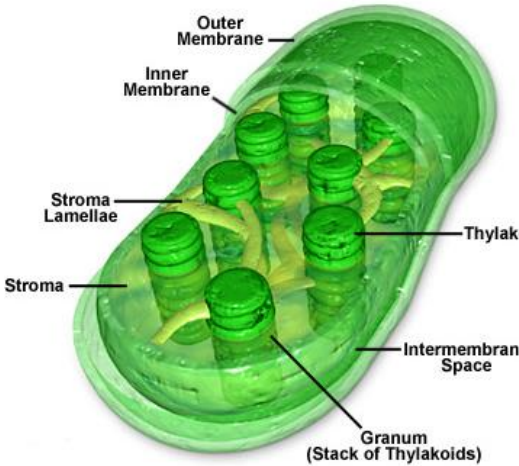
In alcuni casi come il girasole, la sterilità maschile è dovuta a morte cellulare dei tessuti dell'antera associata a morte dei mitocondri.

L'attività di molti geni mt che determinano la sterilità può essere soppressa da proteine codificati da geni nucleari detti Rf (restorer of fertility).

In mais si pensa che la proteina mitocondriale URF13, localizzata nella membrana interna dei mitocondri, porti ad una disfunzione dei mitocondri nelle cellule del tappeto (tessuto fondamentale per il corretto sviluppo del polline), con conseguente necrosi. Rf1 riduce l'accumulo della proteina URF13 ripristinando la fertilità.

Caratteristiche di genomi plastidiali di alcuni organismi vegetali. nt: nucleotidi

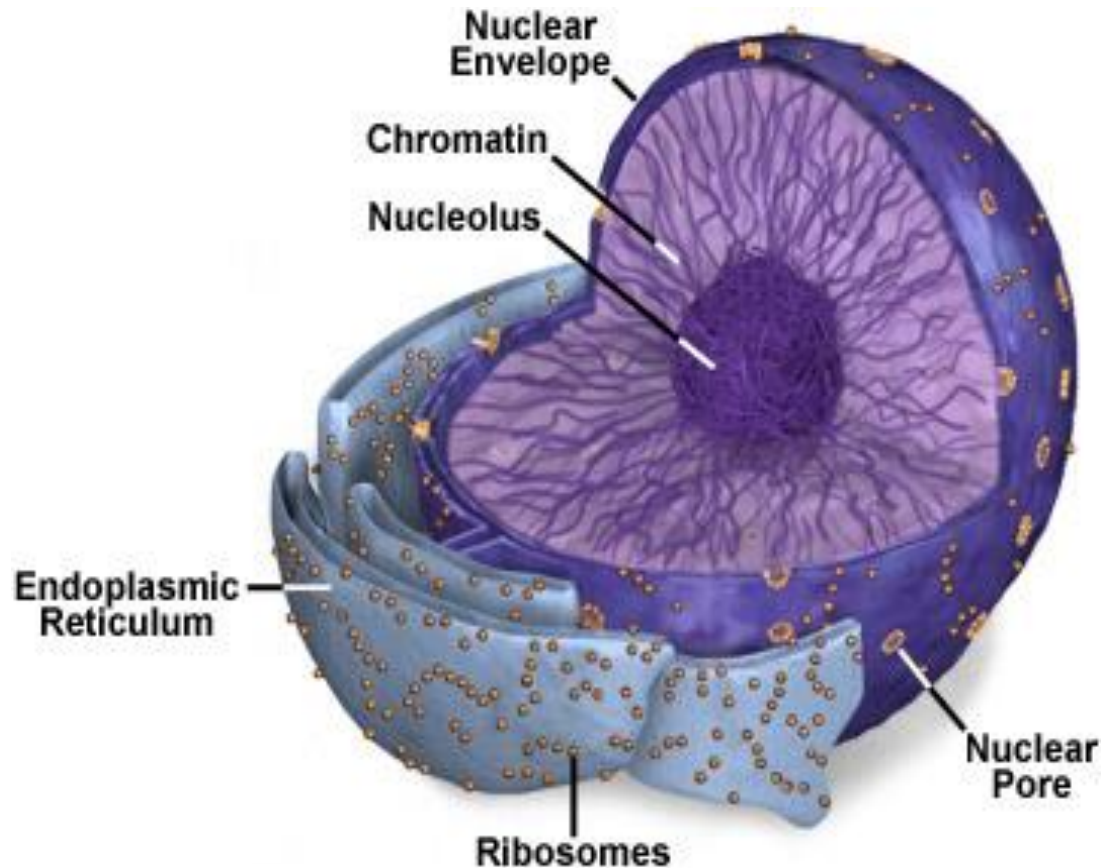
	Dimensione (nt)	N° proteine	N° di RNA strutturali
Glaucofite <i>Cyanophora paradoxa</i>	135.599	149	43
Rodofite <i>Cyanidioschyzon merolae</i> <i>Porphyra purpurea</i>	149.987 191.028	207 209	36 44
Alge verdi e piante <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Brachypodium distachyon</i> <i>Chara vulgaris</i> <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> <i>Epifagus virginiana</i> <i>Glycine max</i> <i>Nicotiana tabacum</i> <i>Physcomitrella patens</i> <i>Pinus thunbergii</i> <i>Populus trichocarpa</i> <i>Solanum lycopersicum</i> <i>Triticum aestivum</i> <i>Vitis vinifera</i> <i>Zea mays</i>	154.478 135.199 184.933 203.828 70.028 152.218 155.943 122.890 119.707 157.033 155.461 134.545 160.928 140.384	85 81 105 69 25 83 98 85 155 98 84 83 84 111	44 46 43 40 31 45 45 44 39 45 46 50 53 46



Sono stati sequenziati 180 genomi plastidiali, 45 geni sono presenti in tutte le piante ed alghe. Essi codificano per i componenti del Fotosistema I e II, il citocromo b6/f, la ATP sintasi e la subunità grande della RUBISCO

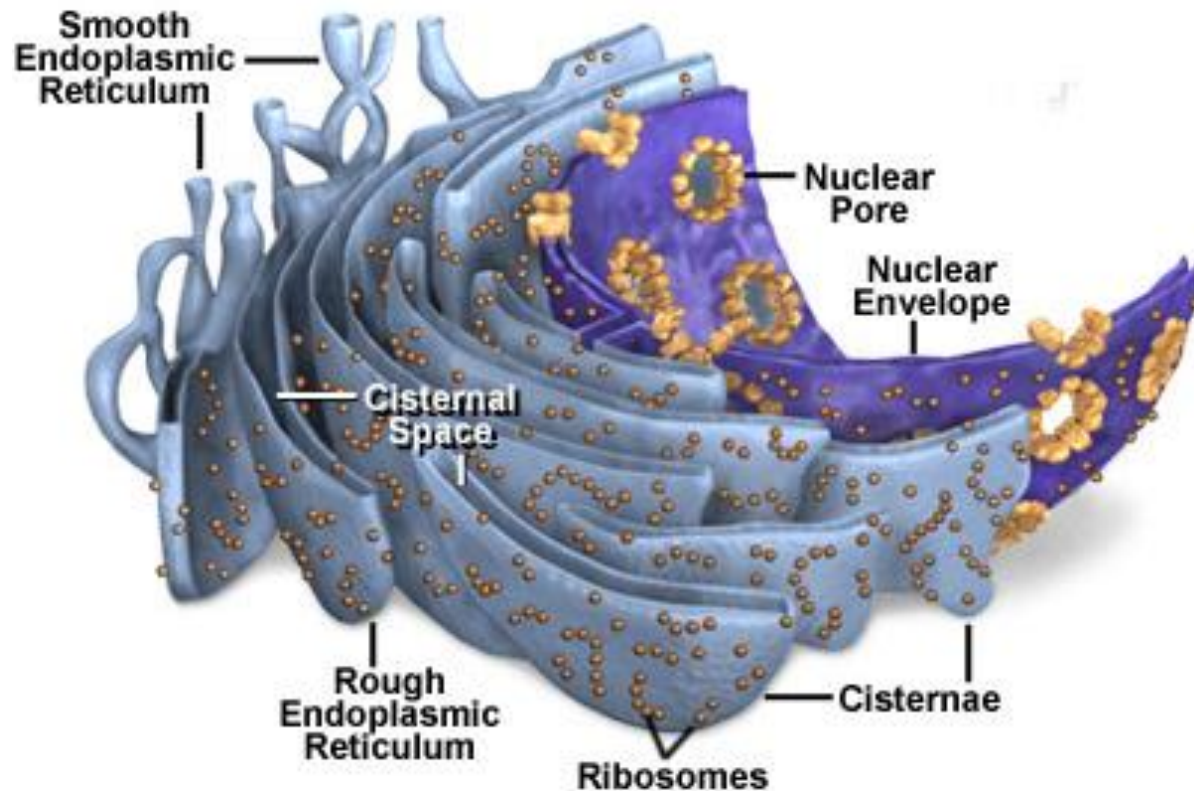
L'INVOLUCRO NUCLEARE

INVOLUCRO NUCLEARE: membrana nucleare esterna + membrana nucleare interna



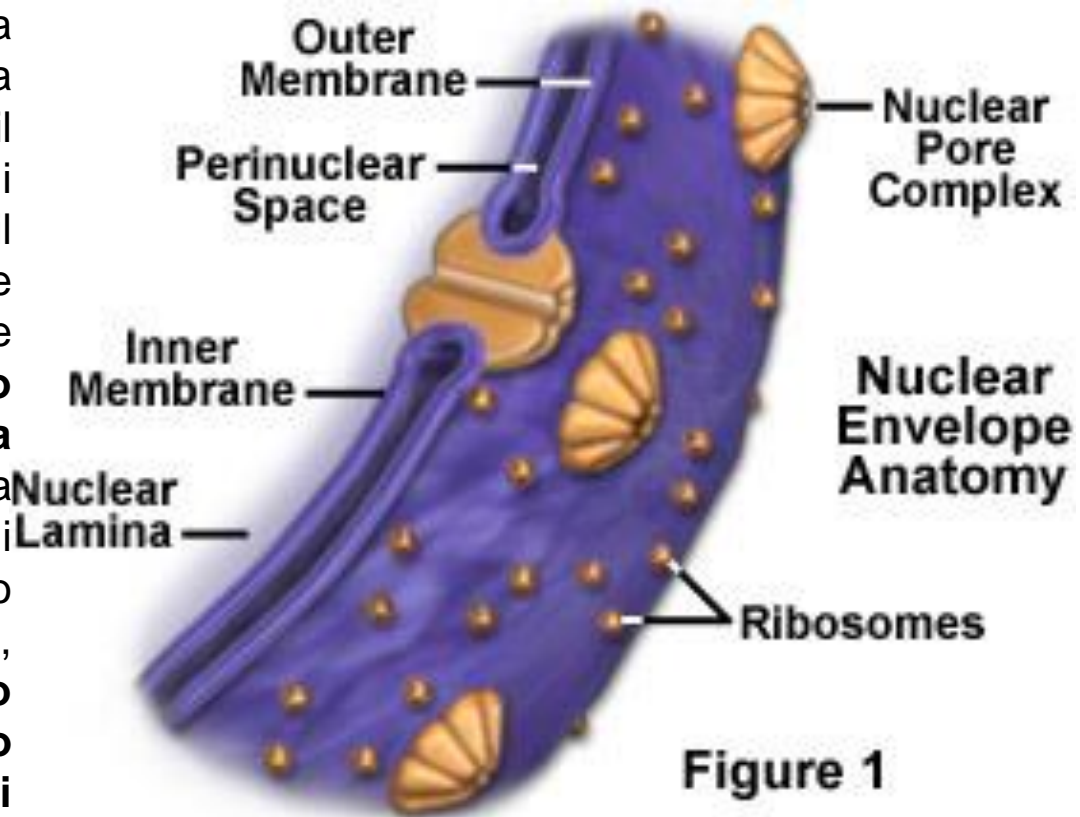
CONTINUITÀ TRA INVOLUCRO NUCLEARE ESTERNO E RE

La presenza di alcune proteine specifiche del nucleo favorisce il legame tra la membrana nucleare interna e la lamina nucleare. Questa è costituita da una o più proteine filamentose che interagiscono formando delle lamine che rivestono la superficie nucleare della membrana nucleare interna, costituendo un reticolo fibroso che fornisce un supporto strutturale al nucleo. Sono state identificate numerose proteine che interagiscono direttamente o indirettamente con la membrana mediante interazioni proteina-proteina. La loro funzione principale è l'ancoraggio della cromatina alla superficie nucleare della membrana nucleare interna.



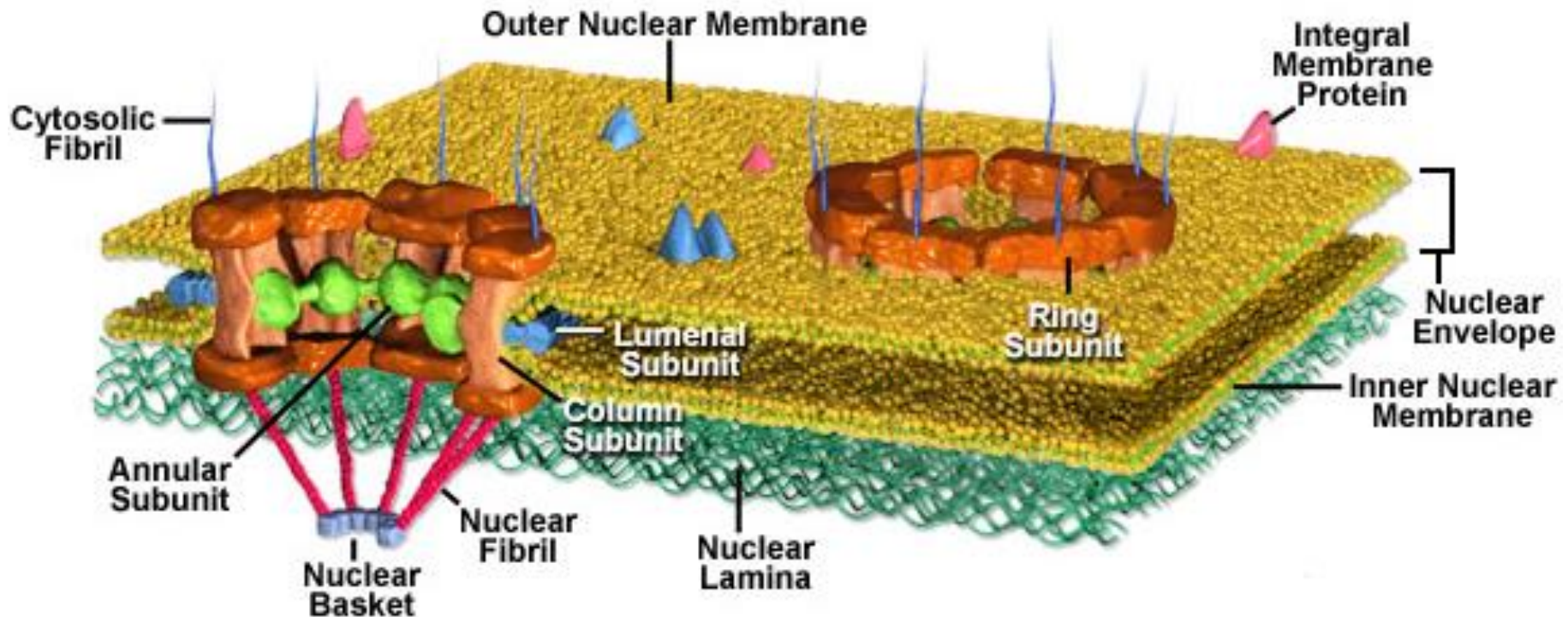
PORI NUCLARI, FUNZIONE: trasporto attivo da e per il citoplasma

Le proteine della membrana nucleare esterna hanno caratteristiche diverse. In particolare, le proteine tipo-spectrina, note come nesprine, appartenenti alla superfamiglia delle **α -actinine**, hanno la funzione di connettere il nucleo con il citoscheletro mediante l'interazione con i filamenti di actina e di posizionare il nucleo rispetto alla cellula. Evidenze sperimentali suggeriscono che analoghe proteine vegetali **svolgono un ruolo nel movimento del nucleo nella cellula vegetale**. A differenza della cellula animale, dove i centri di organizzazione del fuso mitotico sono costituiti dai centrosomi citoplasmatici, **nella cellula vegetale è l'involucro nucleare a rappresentare il sito principale di assemblaggio dei microtubuli mediante la presenza di proteine associate ai microtubuli (MAPs) che regolano la formazione dei microtubuli da parte dell'involucro nucleare**



PORI NUCLEARI

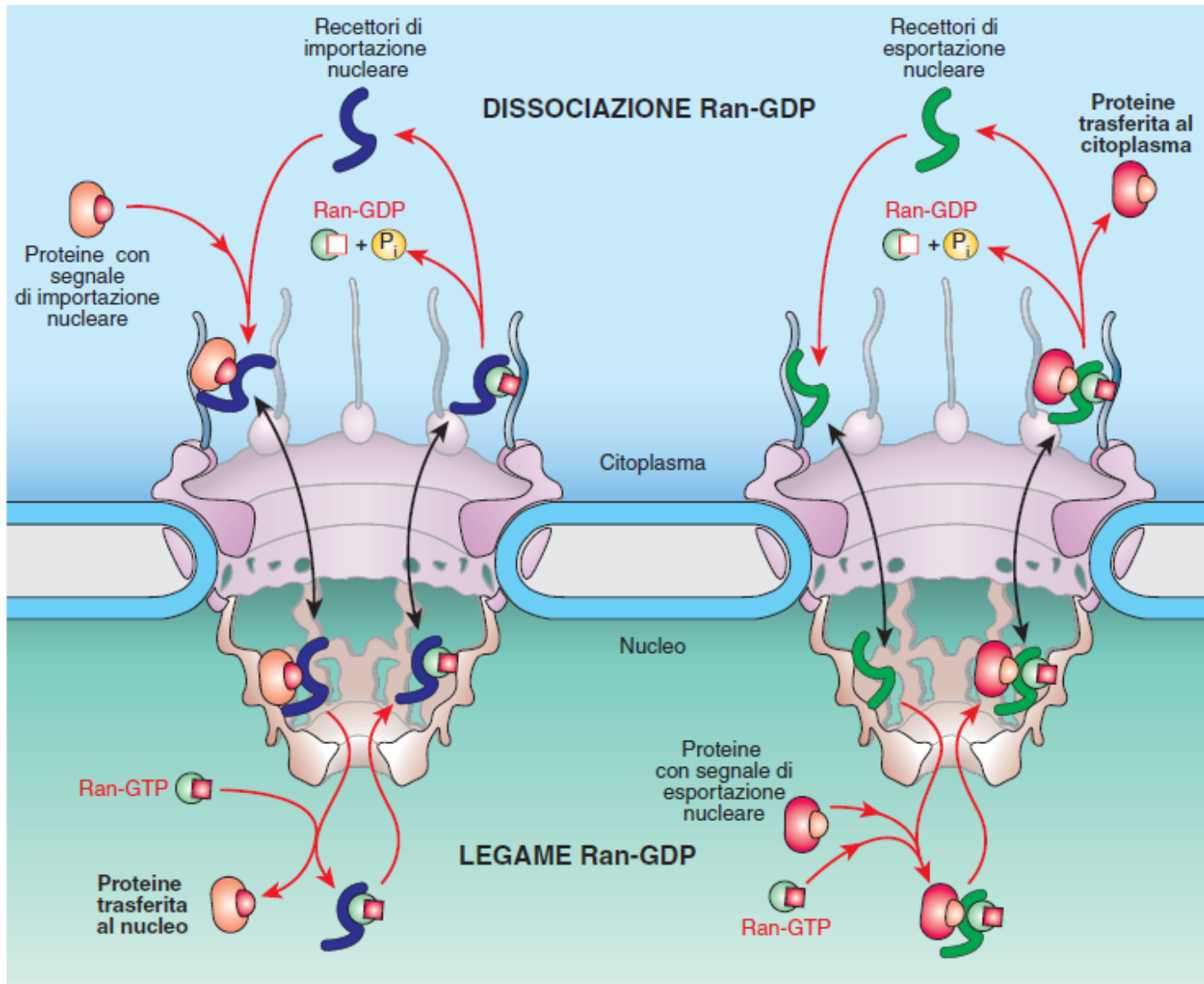
Sono composti da 8 proteine canale disposte ad ottamero e da centinaia di altre proteine che formano le diverse subunità



SCAMBI NUCLEO-CITOPLASMA

Nella cellula eucariotica la sintesi di RNA (trascrizione) avviene nel nucleo e la sintesi proteica (traduzione) nel citoplasma. Questo comporta che l'RNA messaggero dal nucleo deve arrivare nel citoplasma attraverso i pori nucleari ad opera di proteine dette esportine in cooperazione con proteine Ran-GTP. Le proteine Ran esistono in due forme, Ran-GTP e Ran-GDP, che sono trasformate l'una nell'altra mediante l'azione di proteine accessorie con attività GTP-asi. L'idrolisi del GTP della proteina Ran fornisce direzionalità al trasporto dal nucleo al citoplasma. Le proteine Ran-GDP sono poi nuovamente fosforilate a Ran-GTP nel nucleo e riutilizzate (ciclo Ran).

Molti componenti del ciclo Ran sono stati identificati anche nelle piante. In *Arabidopsis* è stata identificata la proteina HASTY (HST), ortologa nelle cellule vegetali delle esportine animali. Essa coopera con AtRAN1 (proteina ortologa di Ran-GTP) nel trasporto nucleocitoplasmatico dei pre-mRNA. HASTY è localizzata nella periferia nucleare e i mutanti del gene *HST-3*, che codifica HST, accumulano pre-mRNA nel nucleo. Recentemente è stato evidenziato che nei vegetali, a differenza di quanto accade negli animali, il ciclo Ran è coinvolto anche nella divisione cellulare.



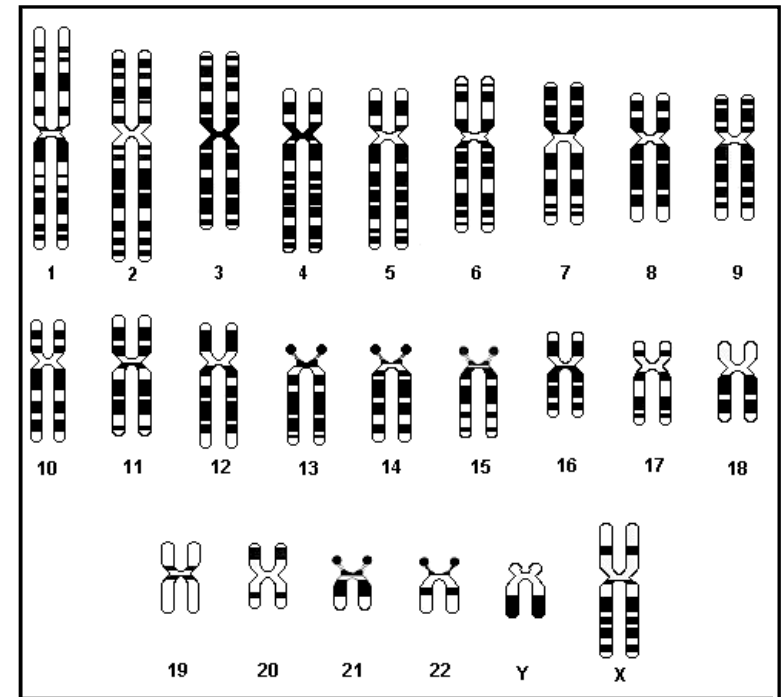
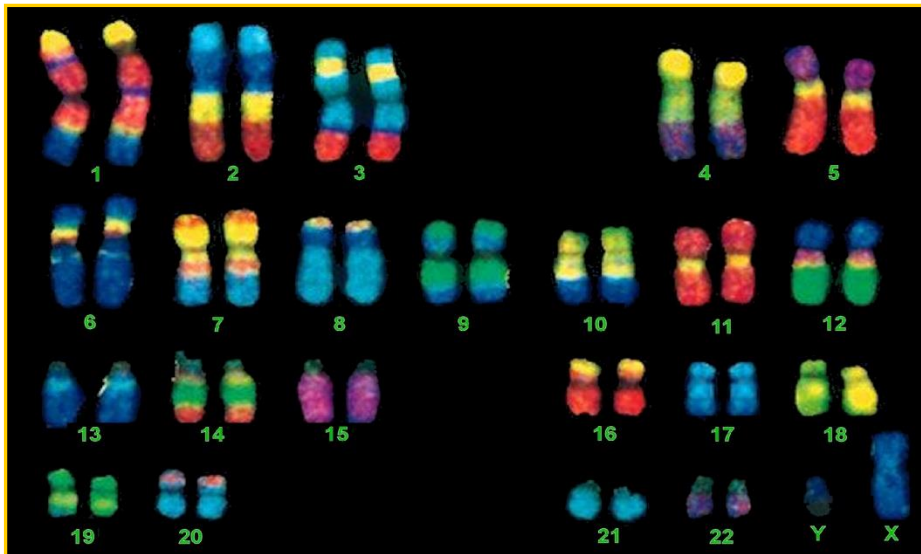
Ciclo associato con la fosforilazione delle proteine Ran e con specifici segnali presenti sulle proteine che devono essere importate-esportate dal nucleo.

Gli scambi tra nucleo e citoplasma non sono unidirezionali. Ad esempio l'mRNA viene esportato dal nucleo al citoplasma, mentre numerose proteine sono sintetizzate nel citoplasma ed importate nel nucleo, es quelle istoniche. L'involucro nucleare è in contatto con il citoplasma mediante i pori nucleari. Le molecole idrosolubili di piccole dimensioni attraversano questi canali e si muovono liberamente tra nucleo e citoplasma, ma le grandi molecole sono solitamente importate nel nucleo mediante trasporto attivo molto selettivo. Solo le proteine che posseggono uno specifico **segnale di accesso nucleare** saranno importate. Di solito tale **segnale è costituito da una breve sequenza peptidica ricca di aminoacidi con carica positiva come lisina e arginina**. Il segnale viene riconosciuto da un complesso di importazione nucleare che permette il trasporto attivo all'interno del nucleo. Il segnale viene riconosciuto dalla α -importina, di cui esistono numerose isoforme, strettamente associate con l'involucro nucleare. Quando la proteina è importata tale segnale non viene rimosso quindi queste proteine possono rientrare nel nucleo dopo la ricostituzione dell'involucro nucleare che si dissolve durante la divisione cellulare.

CROMOSOMI

Le molecole di DNA si organizzano in cromosomi

Il numero e la morfologia dei cromosomi sono caratteristici di ogni specie e costituiscono il cariotipo



Genoma: l'insieme dei cromosomi di un organismo

CROMOSOMI

Né il numero di cromosomi né la quantità totale di DNA sono indicatori affidabili della complessità dell'organismo:

Contenuto in DNA di alcuni genomi batterici ed eucariotici		
Genoma	Numero approssimativo di coppie di basi (kb)*	Numero di cromosomi (aploide)
Batteri (cromosomi circolari)		
<i>Mycoplasma hominis</i>	760	
<i>Bacillus</i>	3 000	
<i>E. coli</i>	4 700	
Eucarioti (cromosomi lineari)		
Funghi		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (lievito)	13 500	16
Animali		
<i>Drosophila melanogaster</i> (moscerino della frutta)	165 000	4
<i>Homo sapiens</i>	3 000 000	23
<i>Amphiuma</i> sp. (salamandra)	76 500 000	14
Piante		
<i>Arabidopsis thaliana</i>	100 000	10
<i>Zea mays</i> (mais)	4 500 000	10
<i>Pisum sativum</i> (pisello)	5 000 000	7
<i>Trillium</i>	100 000 000	5

Tabella 7.1 Dimensioni approssimative del genoma di alcune specie vegetali (in milioni di paia di basi)

Specie	Dimensioni genoma
<i>Arabidopsis</i>	120
Riso	440
Trifoglio	550
Pioppo	550
Melo	770
Pomodoro	950
Sorgo	1.000
Cotone	2.110
Mais	2.500
Orzo	5.000
Grano	16.000
Cipolla	18.000
Felce	160.000

Hewson Swift nel 1950 introdusse il concetto di **valore C** in riferimento alla quantità di DNA presente in un nucleo gametico (aploide) che, in linea generale, può coincidere con la dimensione del genoma.

Ciascun genoma è caratterizzato da una dimensione che può essere definita in base alla massa (picogrammi -pg-) o al numero di basi (b) o nucleotidi (dove 1 pg = 987 Mb, milioni di basi).

Il confronto dei valori C di organismi anche distanti dal punto di vista filogenetico fece emergere una situazione a primo impatto curiosa che fu definita

Il paradosso del valore C

Non esiste una correlazione diretta tra contenuto in DNA e complessità biologica di un organismo (Thomas, 1971).

Tale paradosso è spiegato dalla scoperta che, in un genoma, la maggior parte di DNA risulta essere **DNA non codificante che quindi non contribuisce a fornire informazione**. Fu chiaro pertanto che una **maggior quantità di DNA non** dovesse necessariamente riflettere la presenza di un **maggior numero di geni**. Il genoma umano (3000 Mb) codifica per circa 30.000 geni mentre quello di riso (430 Mb) codifica per circa 40.000-60.000 geni. Queste cifre hanno lasciato aperta la domanda: in che modo un numero così limitato di geni possono generare un organismo strutturalmente più complesso ed evolutivamente più avanzato come l'uomo? L'ipotesi che si avanza oggi è che nell'uomo ci sarebbero un maggior numero di **fenomeni di *splicing* alternativo (eventi per cui da un singolo gene si generano trascritti diversi) e di modificazioni post-traduzionali**.

Le piante con genomi grandi hanno cellule e semi di maggiori dimensioni, spesso però ridotta capacità fotosintetica e crescita rallentata.

SEQUENZIAMENTO DEL GENOMA

Sono stati sequenziati i genomi delle più importanti specie vegetali di interesse agronomico



Arabidopsis thaliana
25.000 geni



Oryza sativa
40.000-60.000 geni



Vitis vinifera
43.000 geni

SEQUENZIAMENTO DEL GENOMA

Non esiste una relazione lineare tra grandezza del genoma e numero di geni

Specie	Dimensioni del genoma (Mpb)	Numero di geni
<i>Arabidopsis thaliana</i>	120	25000
<i>Oryza sativa</i>	440	50000

Più che alla quantità di geni, la dimensione del genoma sembra dipendere dalla quantità di DNA non codificante

La sequenza del genoma di *Arabidopsis* ha evidenziato circa 25.000 geni. Nel genoma di *Oriza sativa* sono state identificate 40.000-60.000 sequenze codificanti, comprendenti la maggior parte dei geni di *Arabidopsis*. Ad oggi circa un terzo dei geni trovati in queste due piante non sono stati riscontrati in nessun genoma di fungo o animale. La maggior parte di questi geni è coinvolto nella fotosintesi e nella fotomorfogenesi. Allo stesso tempo molti geni coinvolti nel metabolismo basale si sono rivelati molto simili. Lunghi tratti del DNA non codificano alcuna proteina. Nel riso il 45% del genoma è costituito da sequenze di DNA non trascritto.

Analisi funzionale: determinare la funzione dei geni

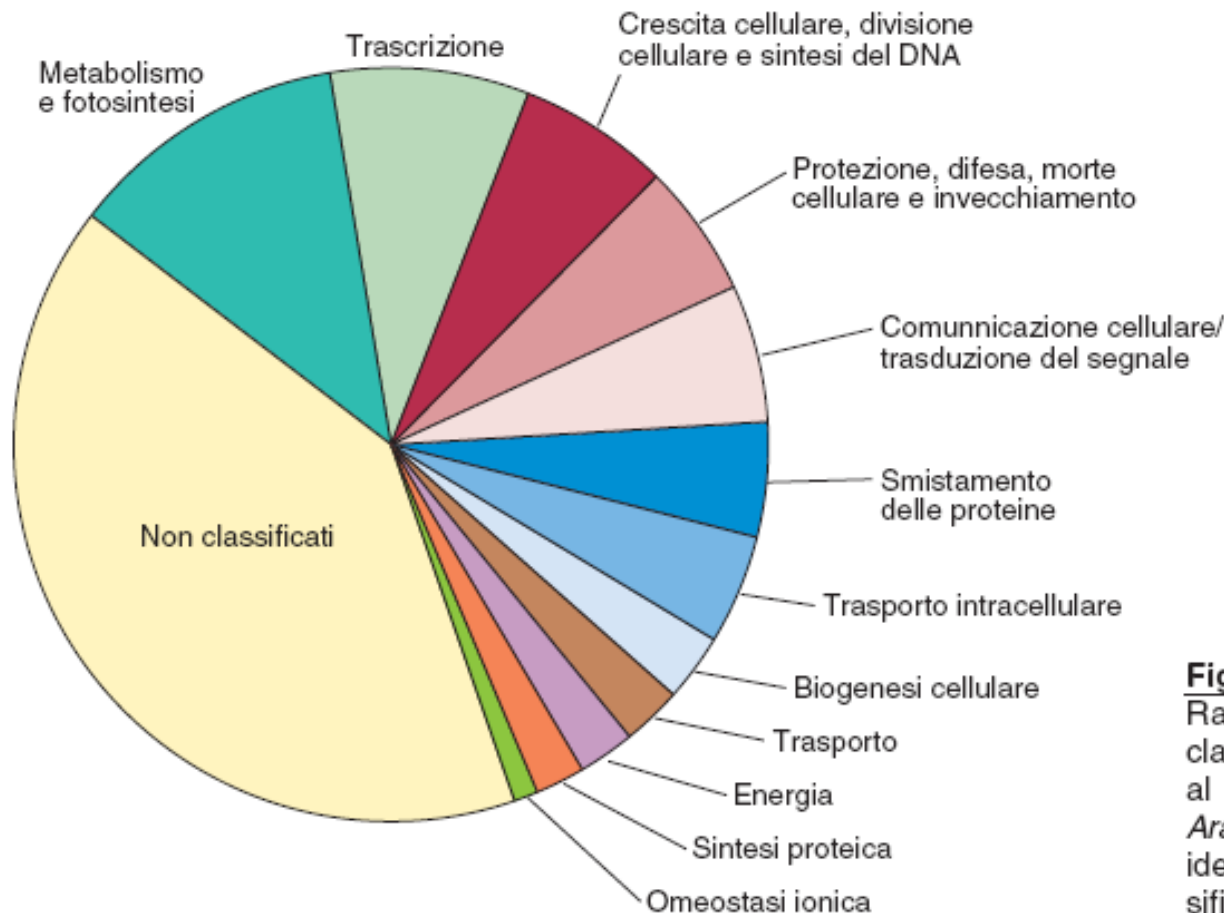


Figura 7.6

Rappresentazione grafica delle classi di geni identificati in seguito al sequenziamento del genoma di *Arabidopsis*. Circa un terzo dei geni identificati non è stato ancora classificato.

DNA NON CODIFICANTE

Ampie aree del cromosoma sono costituite da eterocromatina, regioni di DNA altamente ripetuto

- 1) **DNA satellite.** E' il tipo più diffuso di eterocromatina. Consiste di corte sequenze di DNA ripetute anche milioni di volte localizzate in regioni prossime ai telomeri o vicino al centromero suggerendo un ruolo strutturale nella segregazione e migrazione dei cromosomi durante la mitosi
- 2) **DNA ripetitivo disperso nel genoma** in piccoli raggruppamenti e costituito da trasposoni, sequenze di DNA in grado di muoversi da un punto all'altro del genoma.



Barbara McClintock
Nobel 1984

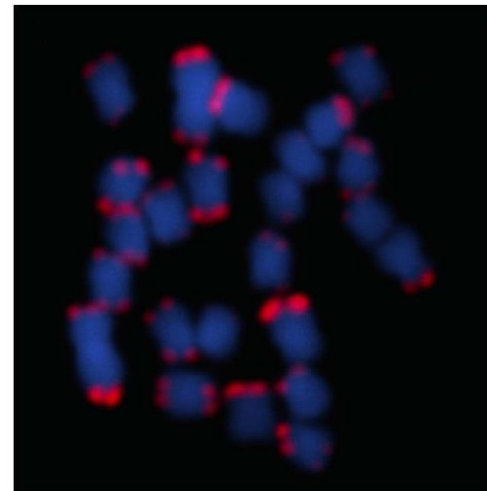


Figura 7.7

DNA ripetitivo a localizzazione telomerica evidenziato mediante ibridazione *in situ* con sonde fluorescenti (da Kazama et al., 2003).

DIMENSIONI DEL GENOMA E DNA RIPETUTO

E' stato dimostrato che le differenze nelle dimensioni del corredo aploide dei genomi delle specie coltivate di cereali sono principalmente dovute al livello di duplicazione di sequenze trasponibili.

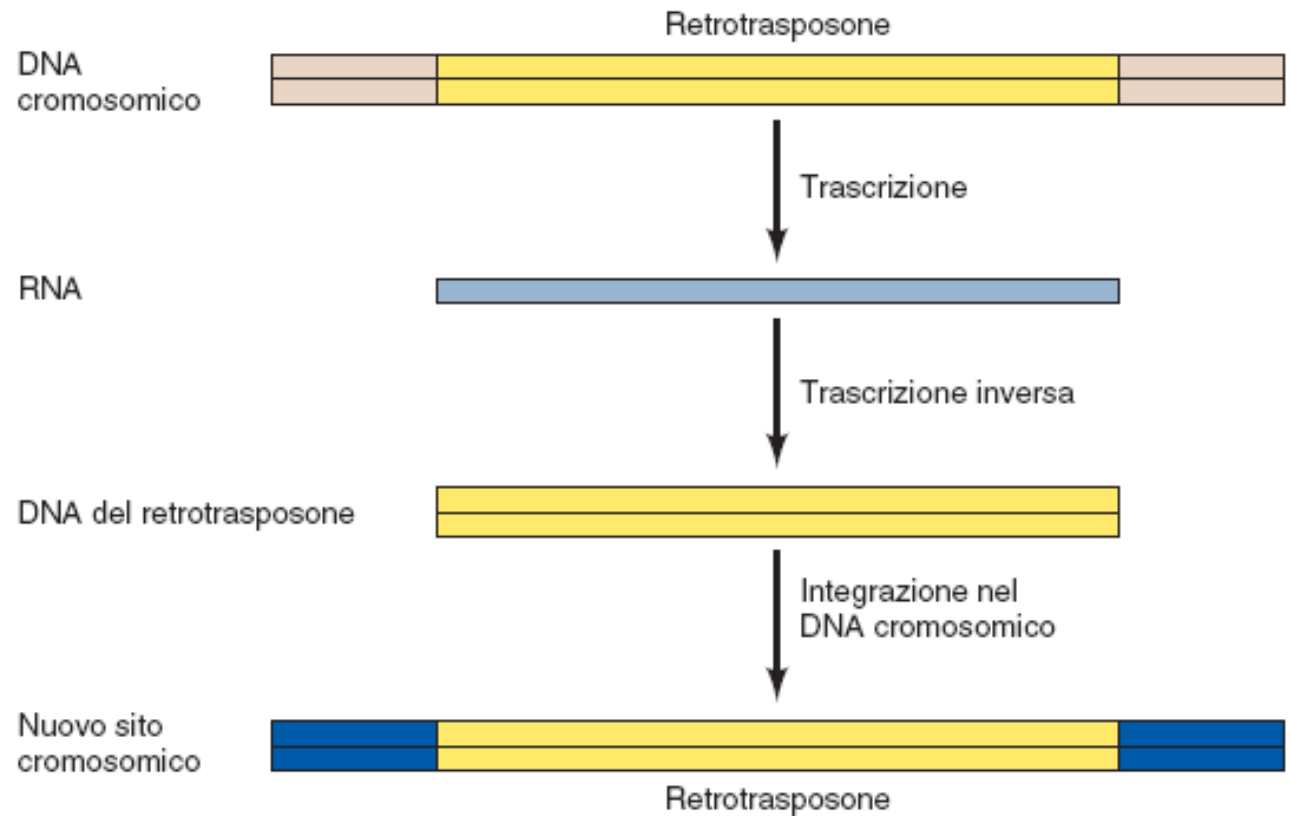
L'80 % del genoma di mais è costituito da elementi trasponibili contro il 25% di riso ed il 10 % di Arabidopsis

Molti trasposoni si concentrano nelle zone centromeriche

Gli elementi retrotrasponibili, piccoli raggruppamenti di DNA ripetitivo disperso, in grado di muoversi all'interno del genoma. I trasposoni sono costituiti da sequenza di DNA che possono spostarsi da una regione all'altra del genoma mediante un tipo particolare di ricombinazione tra il trasposone ed una sequenza bersaglio con cui viene in contatto. Molti trasposoni sono in grado di replicarsi e la loro copia può inserirsi ovunque con un meccanismo simile ai retrovirus. L'elemento trasponibile viene trascritto in RNA e poi riconvertito in DNA.

Figura 7.8

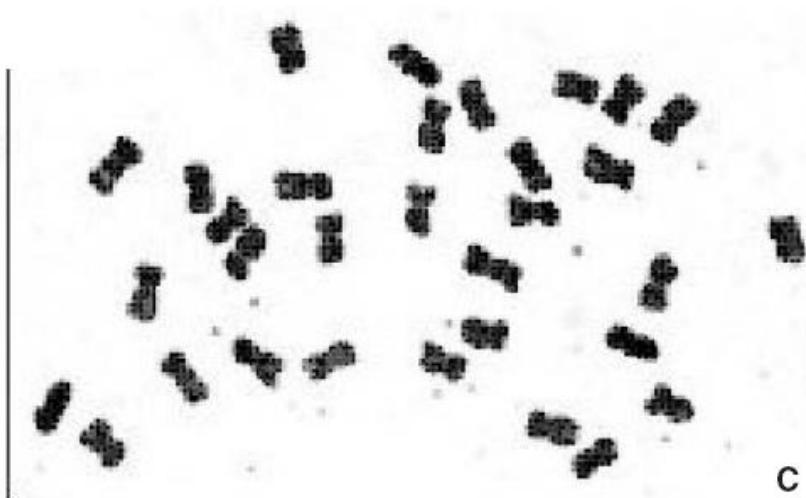
Movimento di un retrotrasposone. L'elemento trasponibile, viene prima trascritto in RNA e poi, grazie alla trascrizione inversa, è riconvertito in DNA che può inserirsi in un altro gene che di solito viene inattivato dalla sua inserzione (da G.M. Cooper, R.E. Hausman).



Le variazioni di dimensioni del genoma possono essere dovute non solo a differenze nel contenuto in DNA ripetitivo, ma anche essere il risultato di duplicazioni genomiche. Tra gli organismi vegetali ci sono numerosi casi di poliploidia

Figura 7.9

In molte specie vegetali come il trifoglio, *Medicago sativa* (A), esistono razze diploidi (B) e tetraploidi (C) (Foto B e C da Bauchan, G. R. and Elgin, J. H. 1984. A new chromosomes number for the genus *Medicago* Crop Sci. 24:193-195).



POLIPLODIA

ASSETTO CROMOSOMICO:

APLOIDE: 1 corredo cromosomico

DIPLOIDE: 2 corredi cromosomici, (materno e paterno)

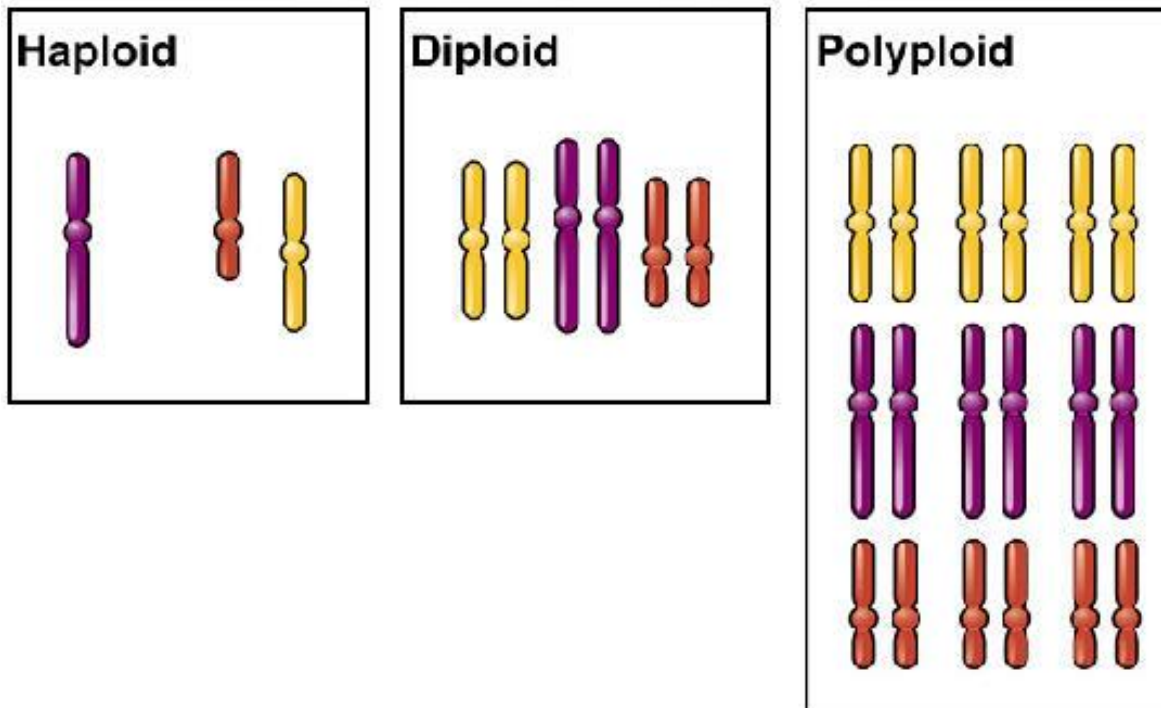
POLIPLOIDE: più di due corredi cromosomici

Negli animali la POLIPLOIDIA è un evento raro (pesci, insetti, anfibi) nei vegetali è molto frequente il loro genoma deriva da più eventi di duplicazione di un genoma ancestrale

POLIPLODIA

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.

Chromosome Numbers Possible in Plant Genomes



GENERAZIONE DELLA POLIPLODIA

ERRORI DELLA MEIOSI:

formazione di gameti $2n$, dopo la fecondazione si formano zigoti tetraploidi stabili

AUTOPOLIPLOIDIA:

fusione di gameti $2n$ provenienti dalla stessa specie (es la patata $2n=4x=48$, la specie selvatica diploide ha $2n=24$)

ALLOPOLIPLOIDIA:

fusione di gameti $2n$ provenienti da specie diverse presentano problemi di sterilità (appaiamento multiplo) (es la colza $2n=4x=38$ generata da *Brassica oleracea* ($2n=18$) e *Brassica campestris* ($2n=20$))

POLIPLODIA

ESEMPI DI POLIPLOIDIA NELLE PIANTE



Poa annua



Nicotiana tabacum



Chrysanthemum spp.

Le angiosperme hanno una grande plasticità nel tollerare l'impatto della poliploidia, con accomodamento di 2 genomi diversi nello stesso nucleo. Un nucleo poliploide è altamente dinamico con modificazioni come delezioni, riarrangiamenti di sequenze, eventi di silenziamento genico, rimodellamenti della cromatina.

Sia *Arabidopsis* che *Zea mais* considerati diploidi sono in realtà dei poliploidi

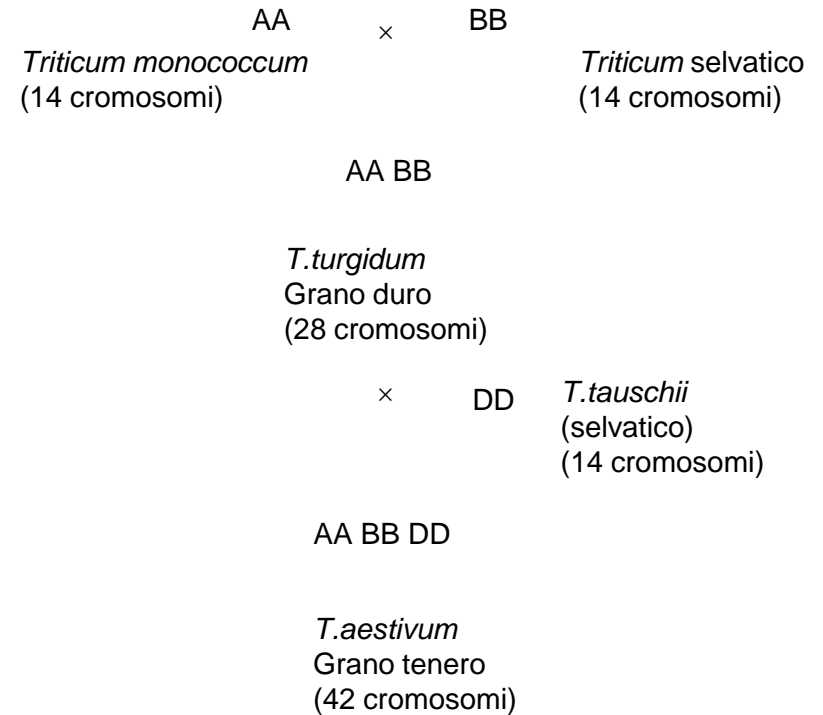
La frequenza della poliploidia nelle angiosperme suggerisce che abbia un significato adattativo. L'individuo poliploide può presentare fenotipi e/o caratteristiche di superiorità rispetto ai genitori diploidi.

Alcuni di questi tratti, quali la tolleranza allo stress idrico, l'apomissia (formazione di semi fertili in assenza di fecondazione), la resistenza a stress biotici, il tempo di fioritura, la biomassa e la dimensione degli organi potrebbero rendere i poliploidi più adatti alla colonizzazione di nuove nicchie o aumentare la possibilità di essere selezionati in agricoltura.

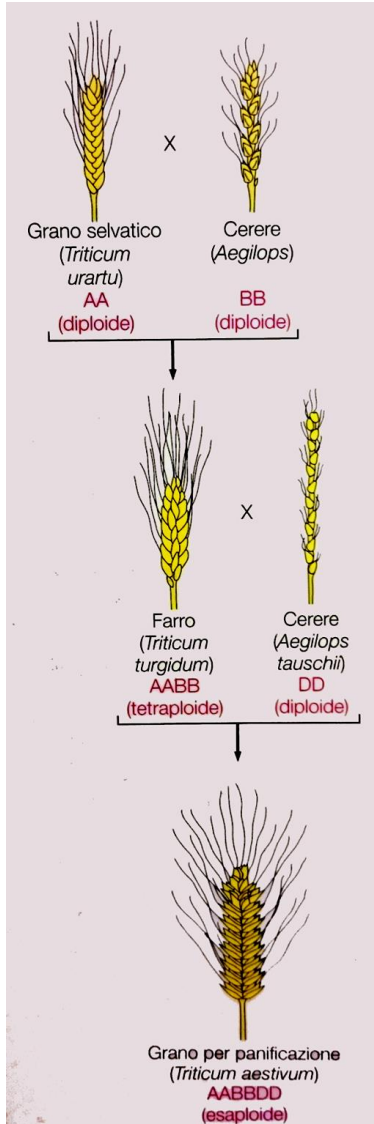
Non stupisce quindi il fatto che la maggior parte delle specie di interesse agro-alimentare portino le tracce di autopoliploidia (erba medica, patata) o di allopoliploidia (grano, cotone, caffè, avena, colza).

POLIPLODIA

- L'ibridazione è la causa principale della allopoliploidia.
- Numerose piante che coltiviamo a scopo alimentare sono poliploidi.



Domesticazione ibridazione



Domesticazione

Modificazione degli organismi da selvatici a domestici

Conseguenze
sull'uomo

Commercio

Struttura sociale

Scrittura

Conseguenze
sulle specie domesticate

Perdita/acquisizione di
caratteri
Simbiosi mutualistica
obbligata

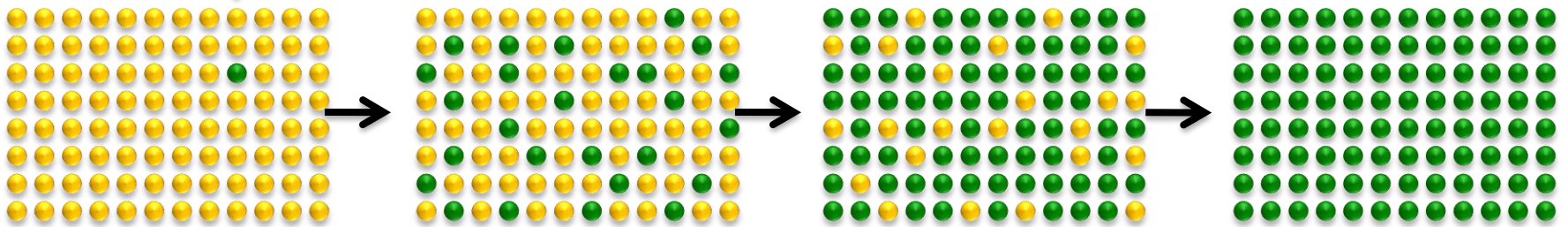


Domesticazione

Selezione artificiale

Selezione degli
individui con caratteri
desiderabili

Moltiplicazione



Fenotipo

Genotipo

Alterazione del pool genico

Paleolitico

miglioramento genetico

oggi

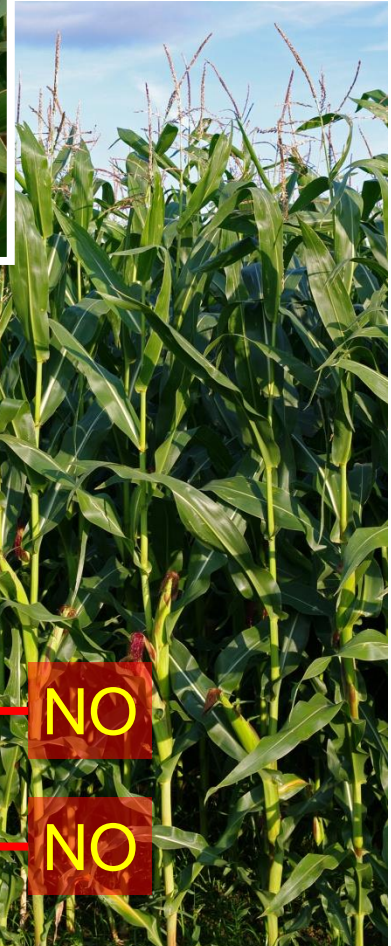
Domesticazione

selezione dei mutanti

Teosinte



Mais



Messico centrale



9000 a.f.

SI

Dispersione semi

NO

SI

Dormienza semi

NO