

BIOTECNOLOGIE

l'uso e la manipolazione di organismi viventi,
o di sostanze ottenute da questi organismi,
per ottenere prodotti utili per l'umanità

➤ **BIOTECNOLOGIE CONVENZIONALI**

(produzione di vino, birra, pane, distillati, formaggio, etc.)

➤ **BIOTECNOLOGIE AVANZATE**

(utilizzano tecniche di ingegneria genetica e biologia molecolare per la selezione di nuovi organismi e l'ottenimento di nuovi prodotti)

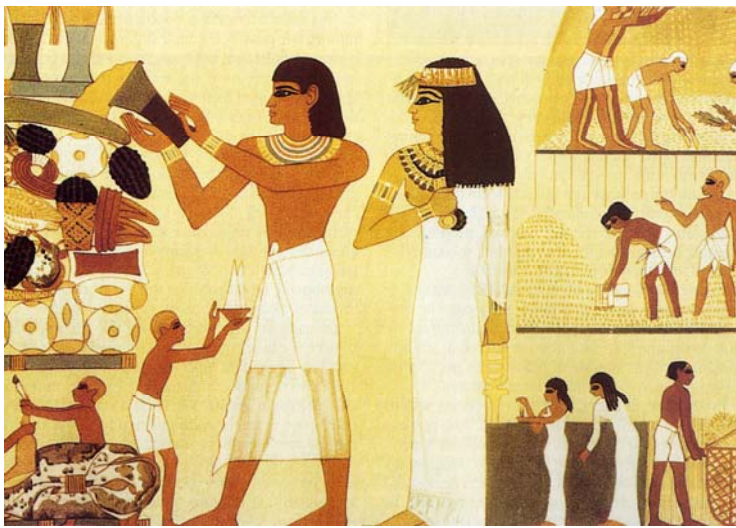
L'uomo utilizza le biotecnologie da migliaia di anni.....

Il termine "biotecnologie" è recente, ma la sua origine risale all'alba della civiltà, quando le donne iniziarono ad addomesticare animali e coltivare piante

per 4 milioni di anni l'uomo si è procurato il cibo attraverso la caccia e la raccolta

CACCIATORE/RACCOGLITORE





circa 10000 anni fa



raccoglitore	➡	agricoltore
cacciatore	➡	allevatore

il cacciatore-raccoglitore
faceva parte della natura
ed era in competizione con
gli altri animali per
approvvigionarsi il cibo,
l'agricoltore cominciò a
modificare l'ecosistema
adattandolo al fabbisogno
degli uomini



DOMESTICAZIONE: processo per cui una specie viene trasferita da una situazione naturale ad una situazione che prevede l'intervento dell'uomo su alcune funzioni fisiologiche (nutrizione, riproduzione). La pianta non è più in grado di crescere spontaneamente ma solo se coltivata. Scopo della domesticazione è far subire ad una specie quelle mutazioni genetiche che la rendano sempre più adatta a soddisfare le esigenze dell'uomo

Coincide con il passaggio dalla
semplice raccolta alla coltivazione

Neolitico VI-IV millennio a.C.



PERCHE' CI FU QUESTO CAMBIAMENTO?

CAMBIAMENTI CLIMATICI

nel vicino oriente dopo l'ultima era glaciale si passò da un clima fresco ed umido ad un clima più caldo e secco. Le popolazione furono forzate a raggrupparsi nei pressi delle fonti idriche.

MESOPOTAMIA

DOVE INIZIO' L'AGRICOLTURA?

Ipotesi del genetista e fitogeografo russo N.I. Vavilov ('20-'30)

- cercare i parenti selvatici delle piante domestiche
- cercare la variabilità in lotti di piante coltivate

Centri di Origine

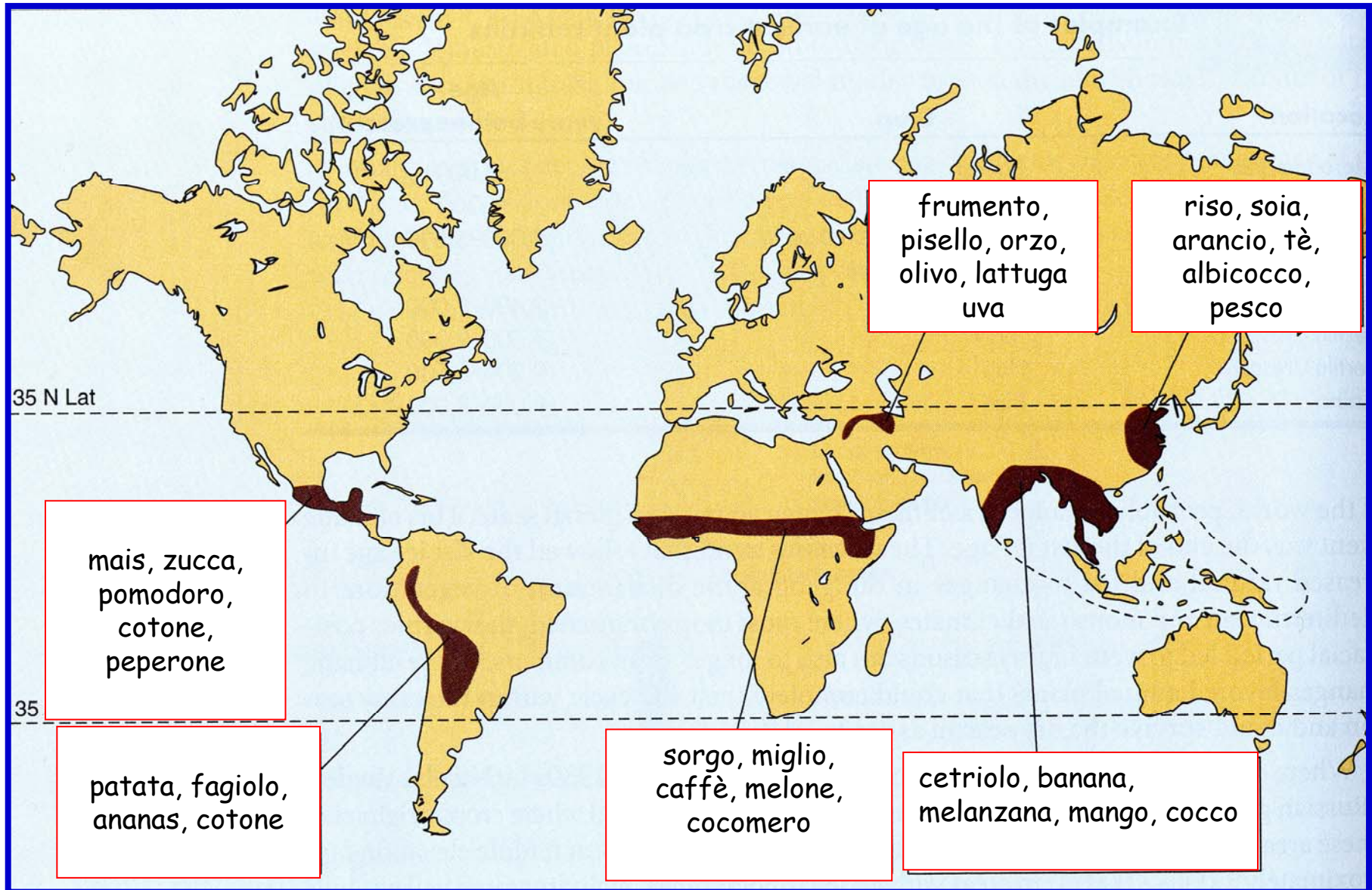


Tabella 13.2 I più importanti centri di origine dell'agricoltura e le principali piante domestiche

I più importanti centri di origine dell'agricoltura						
Coltura	Mesoamerica	America	Cina	Sud-Est Asiatico (India, Cina del Sud, Indocina, Isole del Pacifico)	Vicino Oriente	Africa
Cereali	Mais		Riso asiatico, miglio	Riso asiatico	Fumento, orzo, avena, segale	Riso africano, miglio perlato, sorgo,
Pseudocereali	Amaranto, farinello, salvia	Amaranto, farinello				
Legumi	Fagioli (<i>Phaseolus</i>)	Fagioli (<i>Phaseolus</i>), arachidi, lupino, <i>Inga</i> sp.	Soia, fagioli Adzuki	Cajanus cajan, Canavalia ensiformis, winged bean, Vigna aconitifolia, Phaseolus Angularis	Pisello, cece (garbanza) lenticchia, lupino	Vigna Unguiculata, Arachide Bambara, hyacinth bean, arachide di Kersting
Radici e tuberi	Patata dolce jicama	Patata, arracacha achira, manioca jicama, oca, anu, yacon, ullucu, mashua, unchuc	Rapa, batata	Batata, farinello Taro	Rapa, carota, ravanello	Batata
Colture da olio	Cotone	Arachide, cotone	Colza	Noce di cocco	Colza, girasole, lino, olive	Palma da olio, ricino
Fibre	Cotone, agave (sisal, henequén)	Cotone		Noce di cocco, iuta		Kenaf
Frutta	Papaya, avocado, guava	Ananas, guanabana, cherimoya, noce brasiliana, guava	Pesca, castagna, albicocca, quince, litchi, persimmon	Frutto del pane, arancia, lime, mandarino, uva, mango, banana	Fichi, nocciole, palma da datteri, mandorle, uva, mele, pere, prugne	Baobab, anguria, melone
Verdure e spezie	Peperone, zucca, pomodoro, vaniglia	Peperone zucca,	Cavolo cinese, ginger	Cetriolo, melanzana, piantaggine	Cipolla e simili, lattuga, zafferano, prezzemolo	Okra, Sesamum sp. (leaves), Solanum sp.
Stimolanti	Cacao	Coca, maté	Tè, ginseng, cantora		Papavero, digitale, belladonna, liquirizia	Caffè

cereali

legumi

Sud-ovest asiatico

frumento

lenticchie

Sud-est asiatico

riso

soia

America

mais

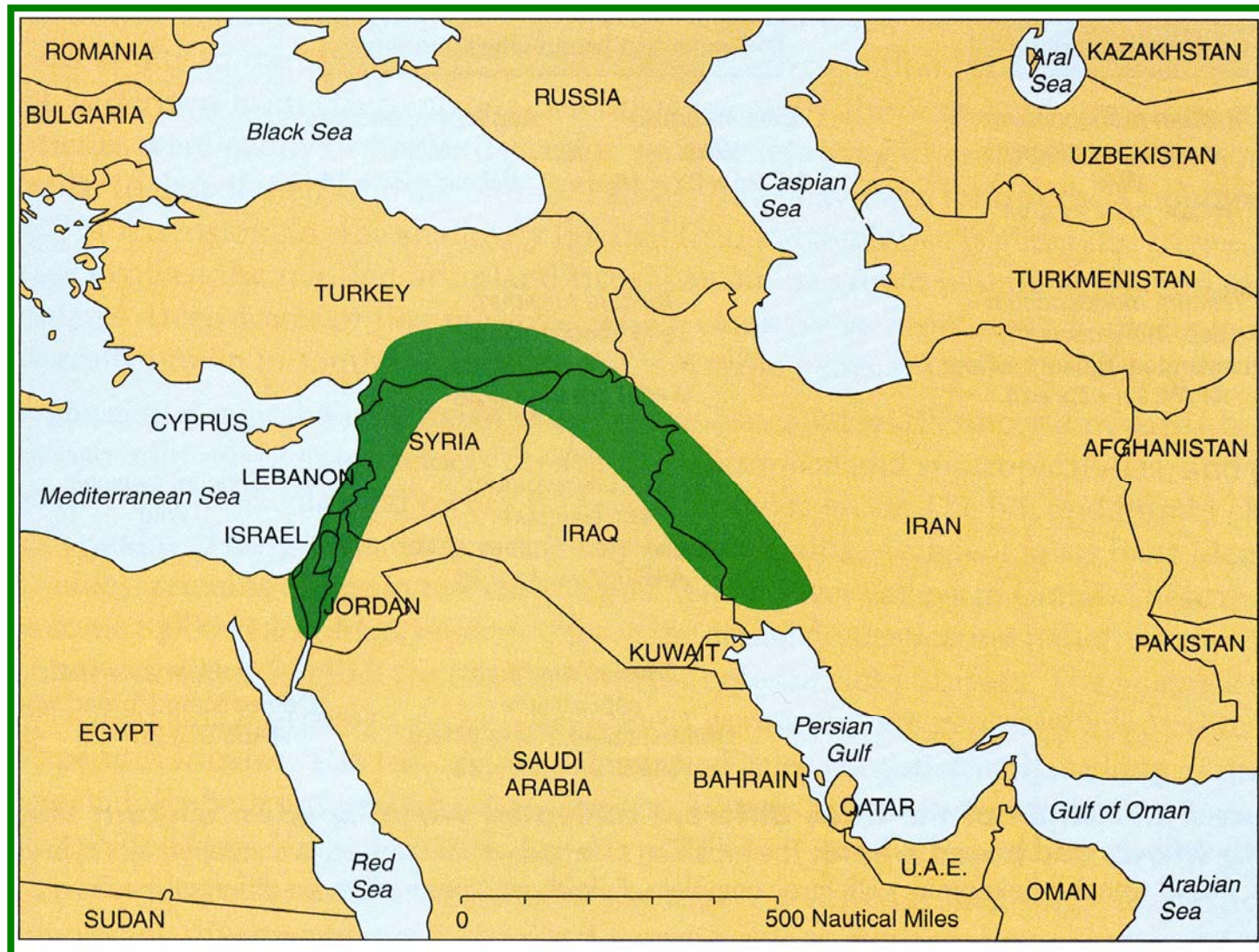
fagioli

Africa

sorgo

fagiolo dall'occhio

domesticazione del frumento



mezzaluna fertile

prove dell'inizio dell'agricoltura

- presenza di falcetti in depositi datati circa 12000 anni fa
- resti dei progenitori delle colture moderne (*Triticum dicoccum* e *Aegilops monococcum*) (impronte su terracotte di cariossidi diverse da quelle coltivate)

Einkorn lineage

Triticum monococcum
ssp. *aegilopoides*:
Wild
 A^MA^M ; $2n = 2x = 14$



Triticum monococcum
ssp. *monococcum*
Domesticated: Einkorn wheat
 A^MA^M ; $2n = 2x = 14$

Pasta and bread wheat lineage

Triticum urartu:
Wild
 AA ; $2n = 2x = 14$

X

Aegilops speltoides:
Wild
 BB ; $2n = 2x = 14$



Triticum turgidum
ssp. *dicoccoides*:
Wild
 $AABB$; $2n = 4x = 28$



Triticum turgidum
ss. *dicoccum*:
Domesticated: Emmer wheat
 $AABB$; $2n = 4x = 28$



Triticum turgidum:
ssp. *durum*:
Domesticated: Pasta wheat
 $AABB$; $2n = 4x = 28$

X

Triticum tauschii:
Wild
 DD ; $2n = 2x = 14$



Triticum aestivum:
Domesticated: bread wheat
 $AABBDD$; $2n = 2x = 42$



Mais domesticato in Mesoamerica



mais

teosinte

il progenitore selvatico e la **TEOSINTE**

sono molto correlati dal
punto di vista genetico

teosinte →

mais →



Riso domestico in India e in Cina

terrazzamenti per la coltivazione datati circa 10000 a.C.

Oryza sativa specie coltivata

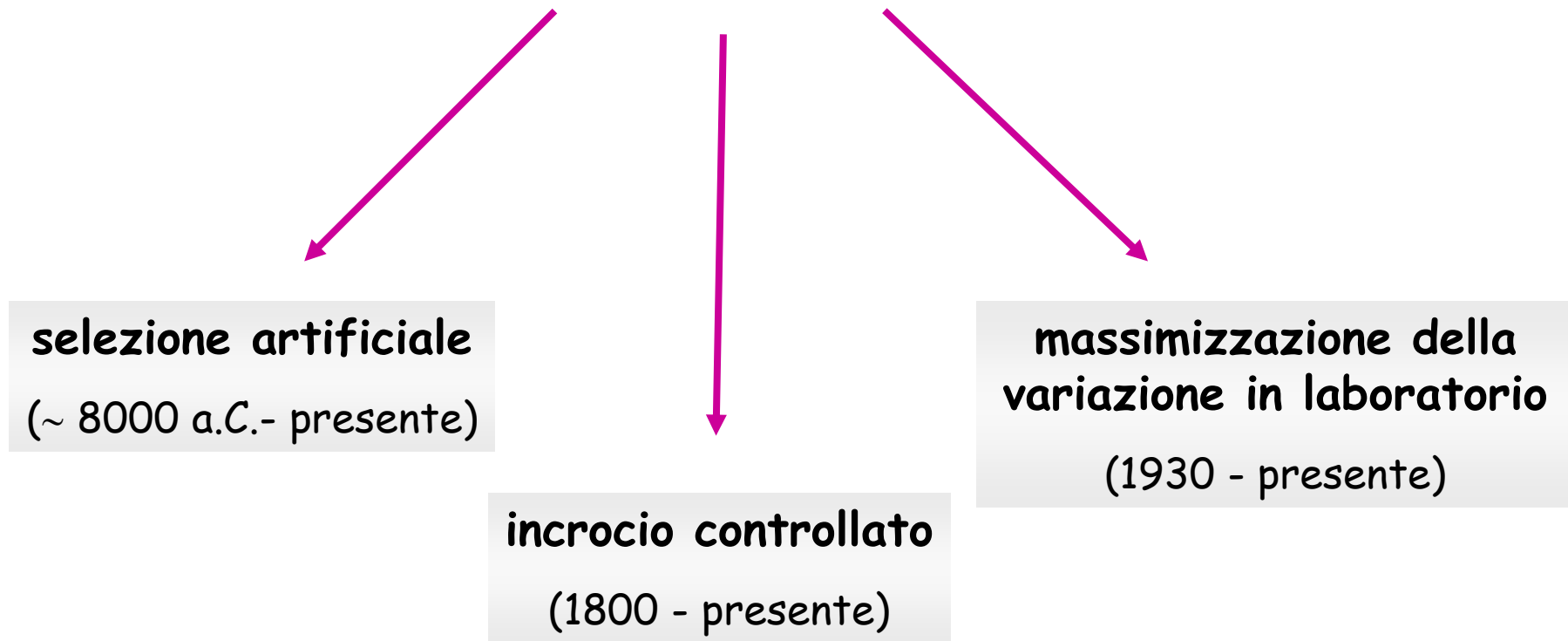
pianta annua
autoimpollinazione

Oryza rufipogon specie selvatiche
Oryza nivara

pianta perenne
impollinazione incrociata

PLANT BREEDING

MIGLIORAMENTO GENETICO TRADIZIONALE



**Tutte le varietà commerciali
sono state ottenute attraverso
la selezione e l'incrocio**



AGRUMI arancio, arancio amaro, chinotto, limone, clementina, bergamotto, mandarancio, mapo, pompelmo, limetta, combava, lice, kumquat, lipo.....

progenitori

pomelo



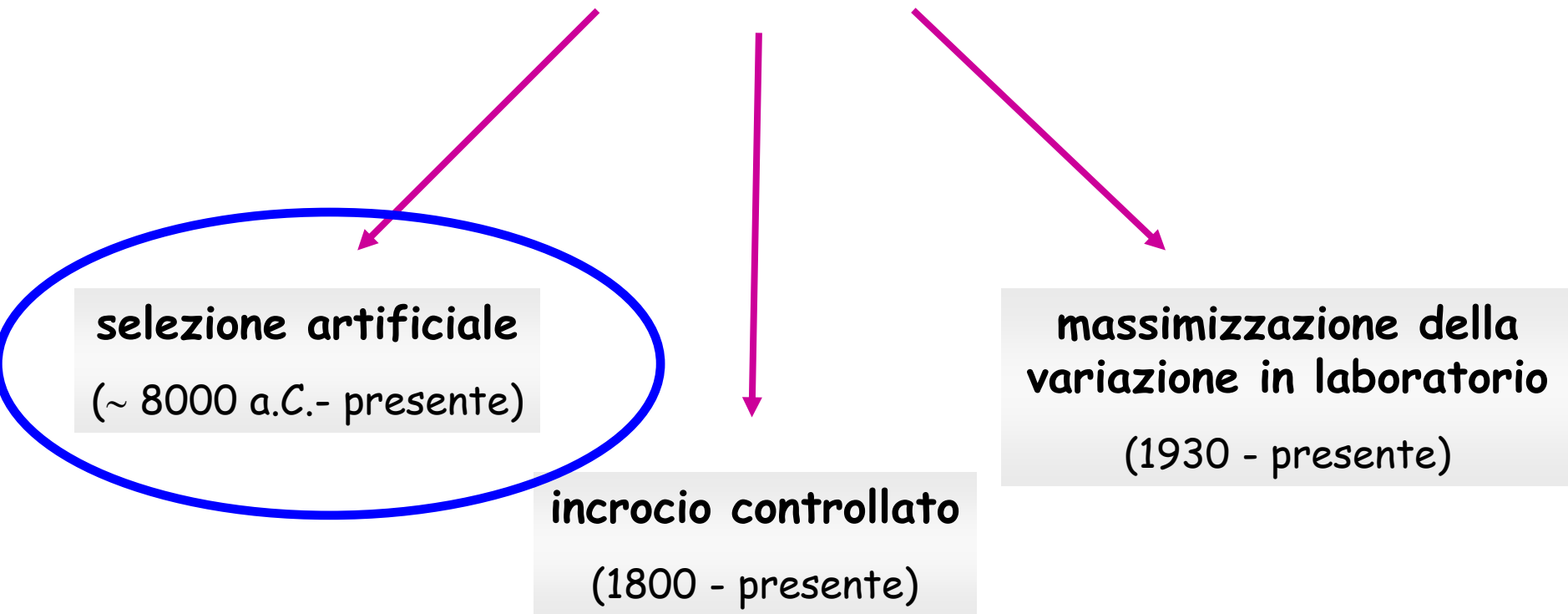
cedro



mandarino

PLANT BREEDING

MIGLIORAMENTO GENETICO TRADIZIONALE



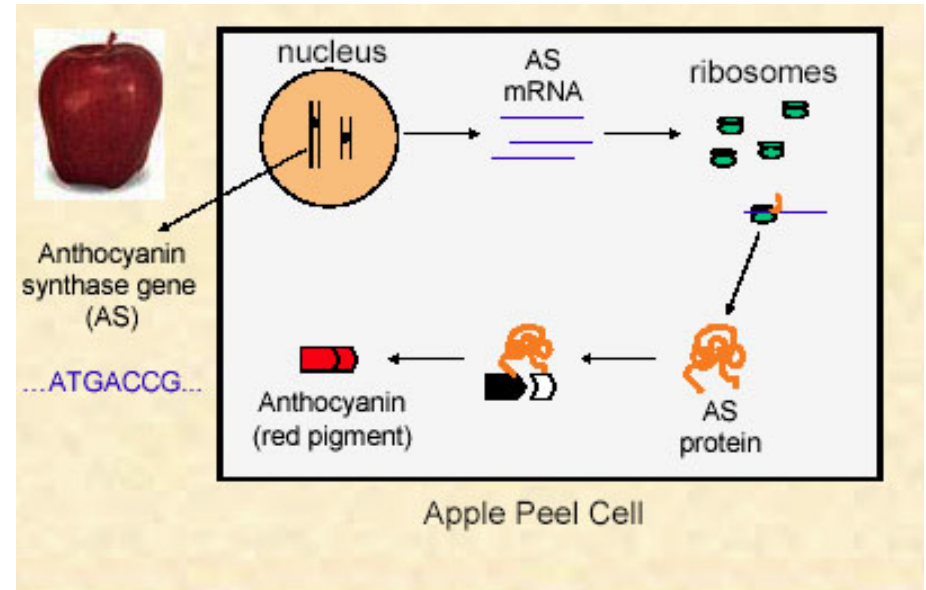
Selezione artificiale

- **domesticazione delle piante**
specie vegetali sono intenzionalmente piantate e coltivate
- **graduale processo di miglioramento delle colture attraverso la selezione umana**
vengono collezionati semi di piante con caratteristiche desiderabili
- **sviluppo di migliaia di RAZZE LOCALI**
(varietà adattate localmente - specie cresciute nell'originale centro di domesticazione, o altrove, che non risultano dai moderni processi di "BREEDING"
sono caratteristiche dell'ambiente che le ha originate e ne mantengono l'eterogeneità)

Qual è la base della diversità?

le **MUTAZIONI** sono alla base della diversità

una mutazione può alterare un tratto e il tratto alterato è trasmesso alla progenie



mutazione nel gene della antocianina sintasi

`...ATGACCGAC...`

`...ATGACCTAC...`

`...AT_C...`



con la selezione artificiale l'uomo ha selezionato e propagato mutanti con caratteristiche di interesse

selezione della "Delicious" in Iowa, 1872

selezione della "Golden Delicious" in West Virginia, 1905

DIFFERENZE TRA PIANTE COLTIVATE E LORO PROGENITORI

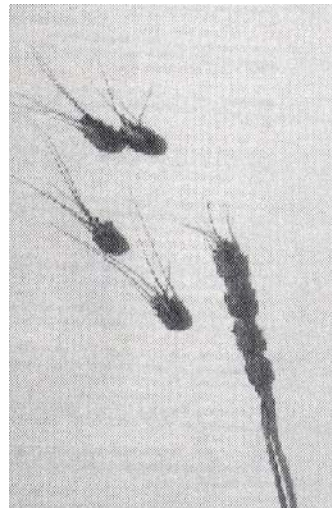
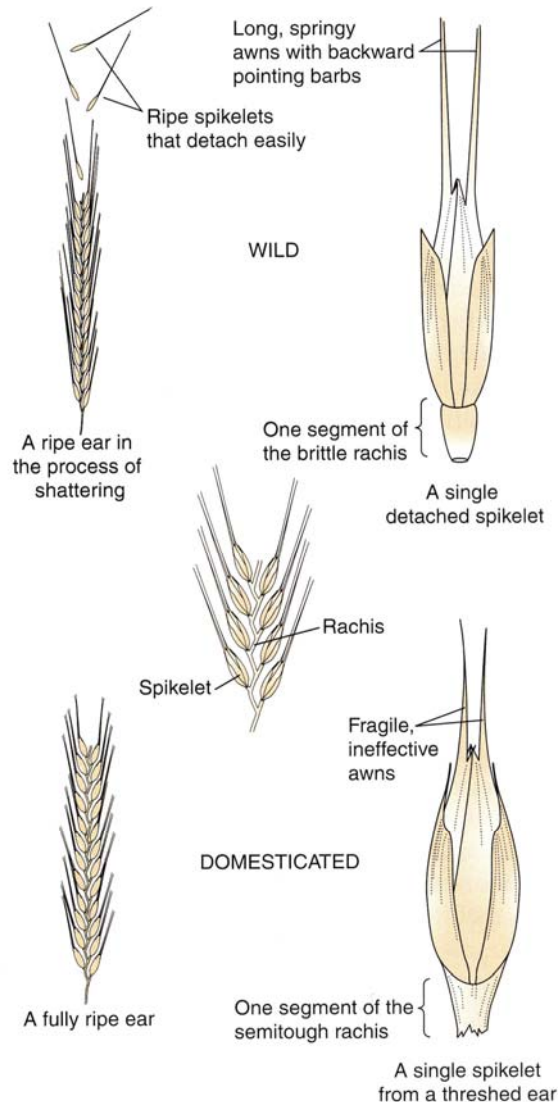
- dispersione dei semi
- dormienza dei semi
- habitus di crescita
- gigantismo degli organi raccolti
- resistenza a malattie

Disseminazione

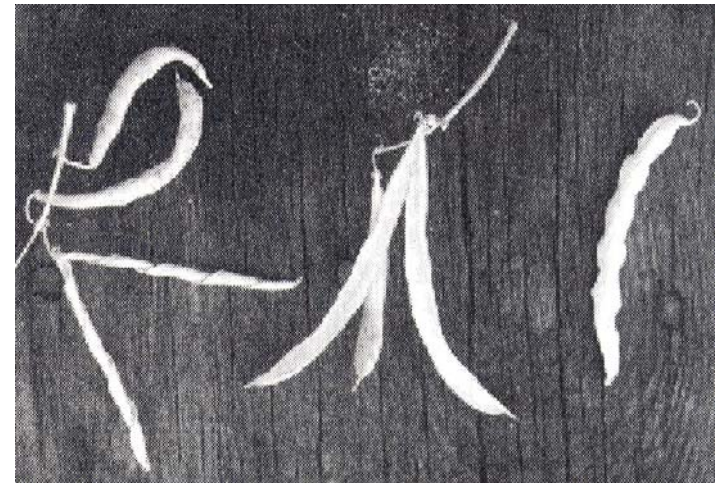
DOMESTICAZIONE

selezione di piante con meccanismi difettosi

- frumento e riso hanno spighe intere
- mais non perde i chicchi dalla pannocchia
- i baccelli dei legumi non si aprono



frumento selvatico



selvatico

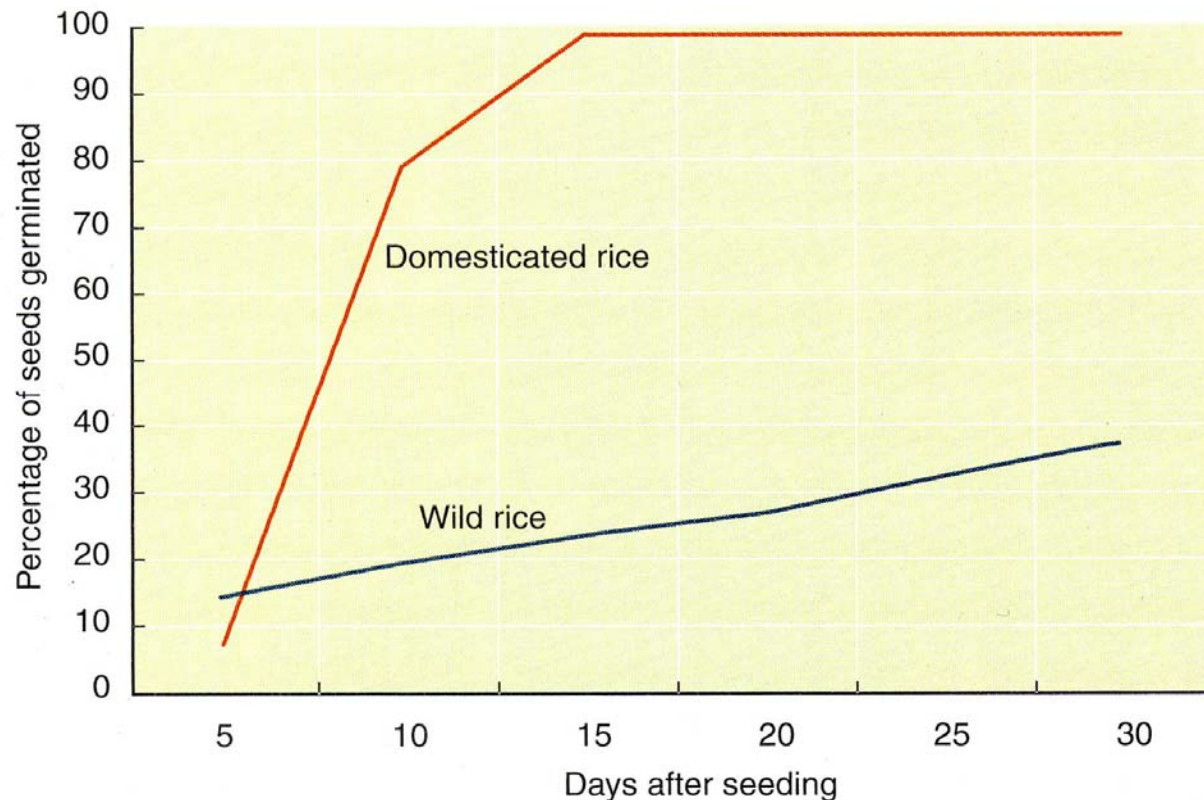
coltivato

Dormienza dei semi

DOMESTICAZIONE

In piante coltivate si osserva la perdita dei meccanismi di dormienza dei semi

la dormienza è un vantaggio per la pianta perché impedisce che tutti i semi germinino contemporaneamente in eventuali condizioni climatiche negative



Modalità di crescita

DOMESTICAZIONE

le piante si sviluppano secondo le condizioni ambientali e la competizione con altre specie

Lo sviluppo vegetativo è un aspetto fondamentale per la sopravvivenza della specie

La coltivazione ha portato a variazioni nell'habitus di crescita

Indice di raccolto: rapporto tra il peso della parte raccolta (normalmente i semi) e la somma della biomassa totale (parte raccolta e non)

le piante selvatiche hanno un basso indice di raccolto 0,2-0,3

le piante coltivate hanno valori più elevati 0,4-0,5

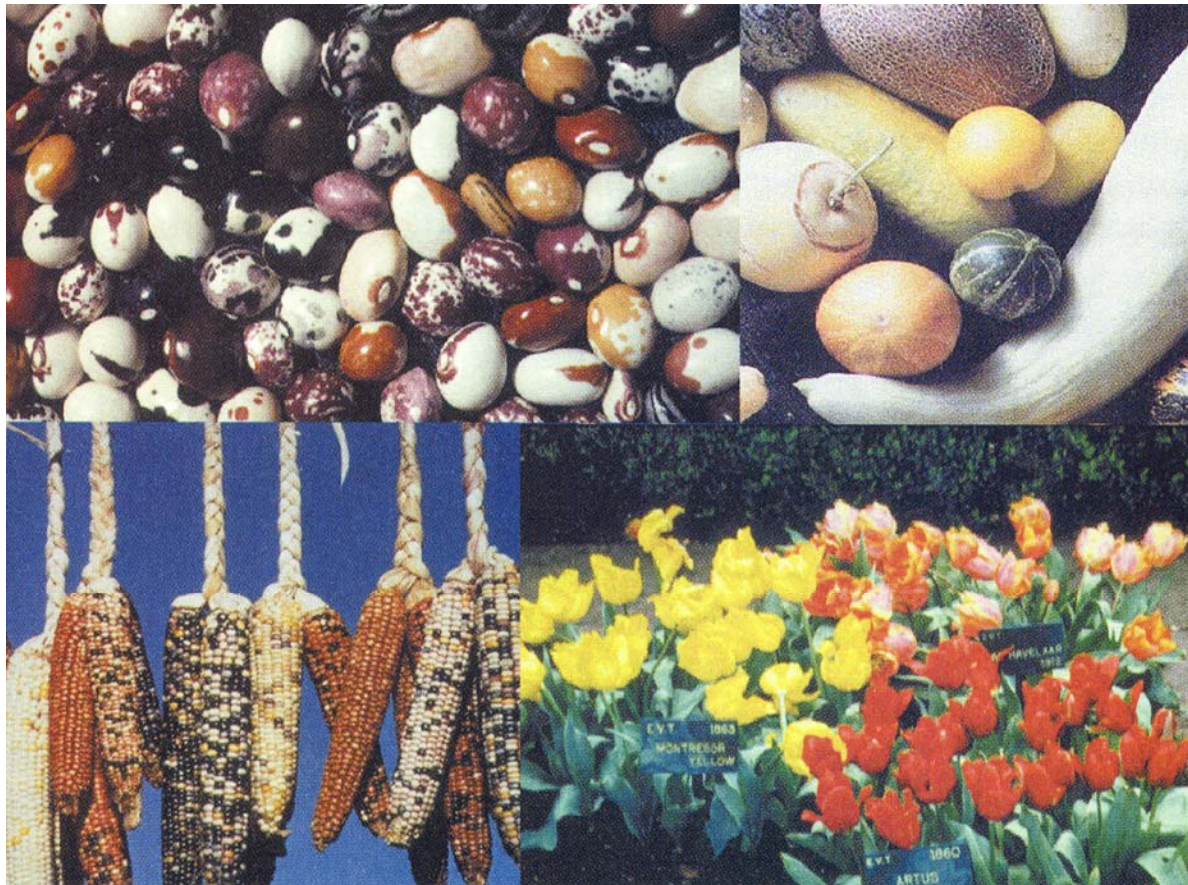


hanno una crescita più compatta
meno ramificata



Gigantismo e diversità degli organi raccolti

Selezione di piante con organi raccolti
(frutti e semi) più grandi e colorati



Perdita della resistenza a malattie

Le piante selvatiche si difendono producendo sostanze tossiche o deterrenti alimentari

alcaloidi
glucosinolati
glucosidi cianogenici
tannini
etc.

Selezione di varietà che non producono composti tossici o ne producono bassi livelli

I tratti che distinguono le piante domestiche in tutte le colture sono simili, prendono il nome di **SINDROME DA DOMESTICAZIONE** e sono il risultato della pressione selettiva esercitata dall'uomo

come cambiano le piante con la domesticazione

carattere	esempi
perdita meccanismi di dispersione dei semi	Mais, frumento, legumi
perdita della dormienza	frumento, riso, avena
passaggio da annua a perenne	riso, segale, manioca
perdita produzione frutti	patata, igname
perdita produzione semi	banana, agrumi
aumento del volume di semi frutti organi di riserva	fagioli zucchine manioca, carota

La domesticazione e la coltivazione di specie vegetali ha portato ad una perdita di **BIODIVERSITA'** che ha avuto inizio con la coltivazione stessa delle specie vegetali

Infatti, la domesticazione, con la selezione artificiale di determinati tratti, ha di per sé ridotto la diversità genetica nelle specie coltivate

La perdita di biodiversità è anche dovuta all'uniformità delle richieste. Poche varietà occupano una porzione significativa delle terre destinate alla coltivazione

Table 13.3 The diversity of our crops is limited because of cultivation of a few varieties over a large area

Crop	Total Number of Varieties	Major Varieties	
		Number	Acreage (%)
Beans, dry	25	2	60
Beans, snap	70	3	76
Cotton	50	3	76
Maize	197	6	71
Peanut	15	9	95
Soybean	62	6	56
Wheat	269	9	50

Esplosione della crescita mondiale ➡ incremento della produzione di cibo ➡ deforestazione per far posto a pascoli e coltivazioni

40000 specie commestibili



circa 200 specie domesticate



circa 15 sostentano l'alimentazione umana

cereali

riso
frumento
mais
orzo
sorgo

legumi

fagioli
soia
arachidi

frutti

banana
cocco

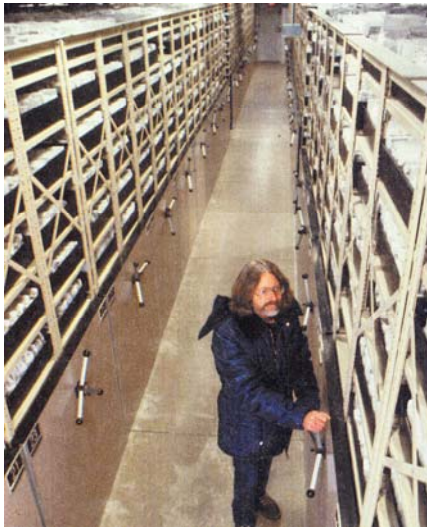
radici e fusti

barbabietola da zucchero
canna da zucchero
patate
manioca
igname

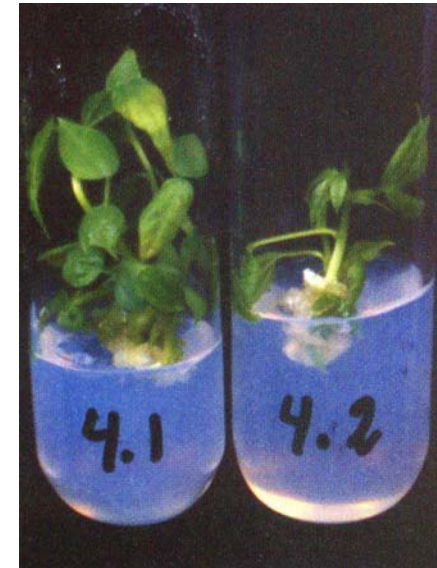
Per contrastare l'erosione genetica, la comunità internazionale ha creato programmi di conservazione "in situ" e "ex situ" delle specie vegetali

Ex situ

National Center for Genetic Research Preservation in Colorado sono mantenute e propagate 38000 specie vegetali



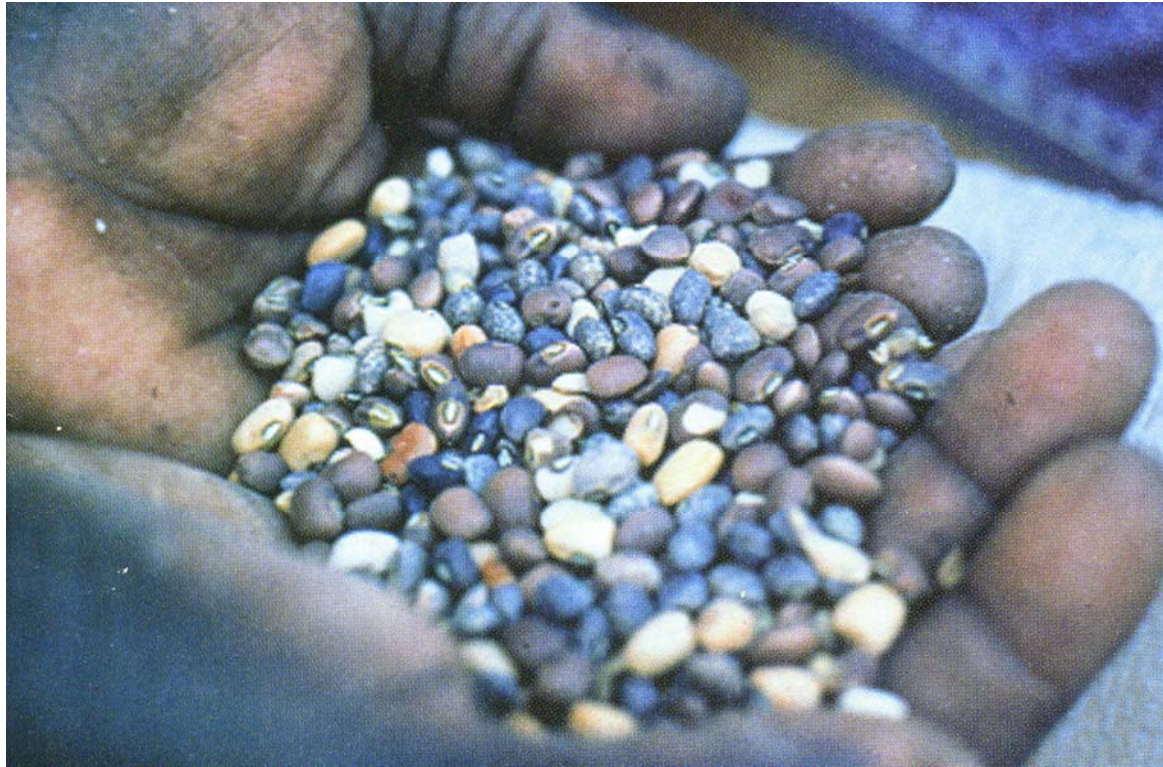
conservazione semi in N₂ liquido
(> 50 anni)



propagazione *in vitro* per
specie che non producono semi

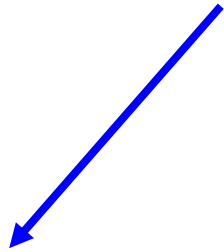
In situ

mantenimento delle **varietà locali** nei luoghi di origine (molto più complicato)

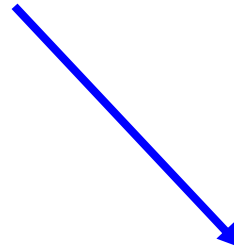


varietà nigeriane di fagioli

Limitazioni della selezione artificiale



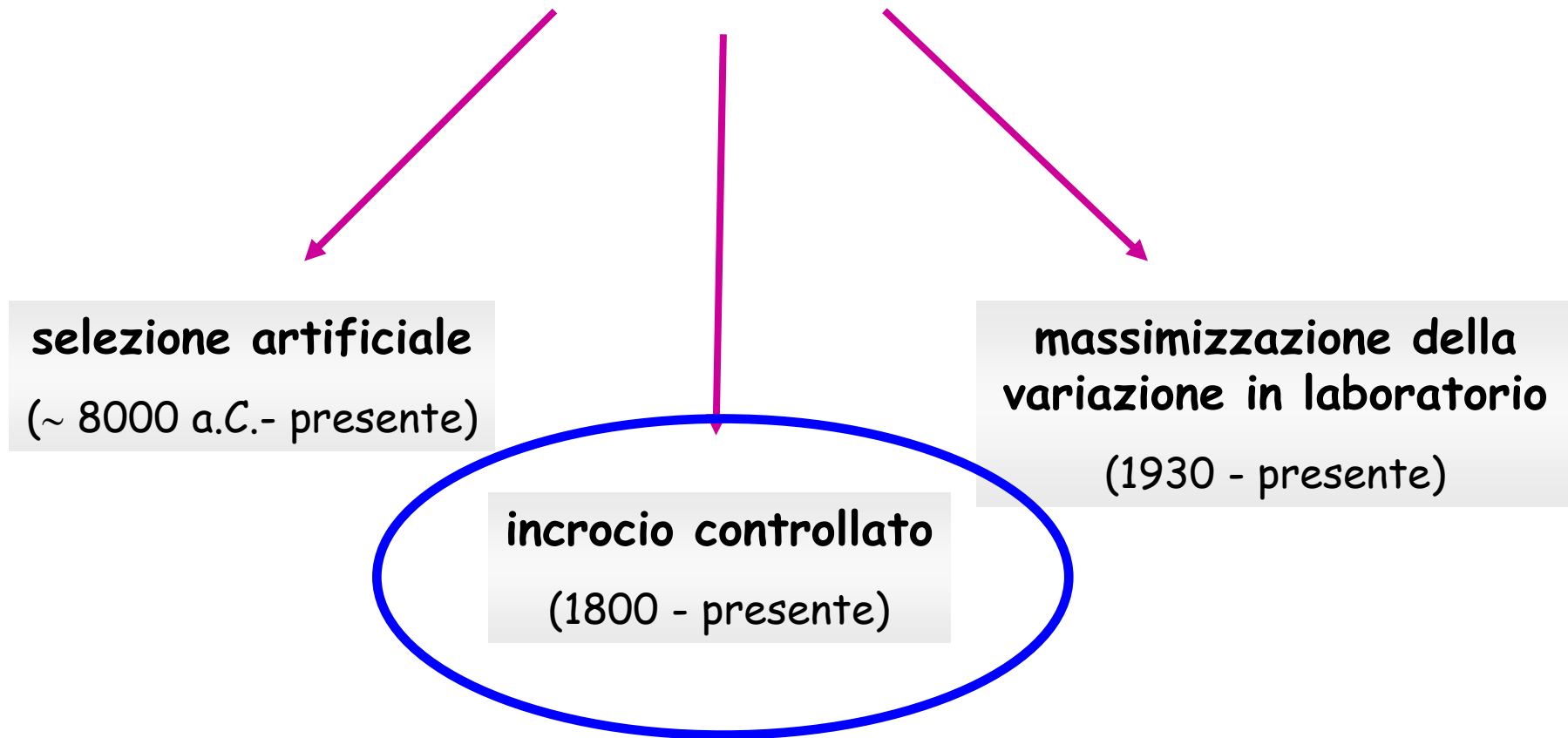
le mutazioni sono rare



una mutazione produce
generalmente un cambiamento
indesiderabile

PLANT BREEDING

MIGLIORAMENTO GENETICO TRADIZIONALE



INCROCIO CONTROLLATO

SCOPO: aggiungere geni da altre varietà attraverso la cross-impollinazione per migliorare la specie

Incrocio o Ibridazione

fra specie può avvenire naturalmente

ruolo fondamentale nello sviluppo di nuove colture

l'incrocio fra specie è favorito dagli insetti impollinatori

fattori genetici: mutazioni che possono causare sterilità del polline aumentano la frequenza degli incroci, perché la progenie si ottiene solo dall'incrocio

l'incrocio può avvenire tra pianta coltivata e progenitore selvatico perché appartengono alla stessa specie

fragaria virginiana
(Nord America orientale)

X

fragaria chiloensis
(Nord America Pacifico)



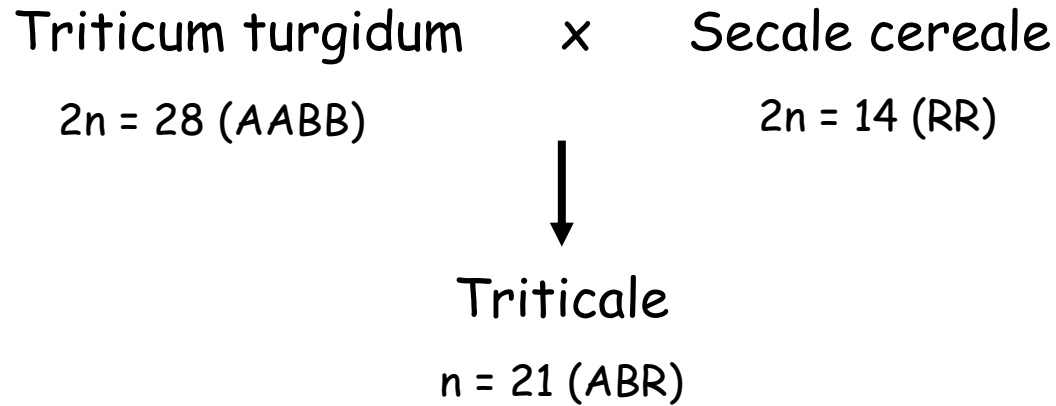
fragaria ananassa



incrocio spontaneo
nel XVIII secolo in
Francia

Triticale

incrocio non
spontaneo



combinare la
qualità del
frumento con
le capacità di
adattamento
all'ambiente
della segale

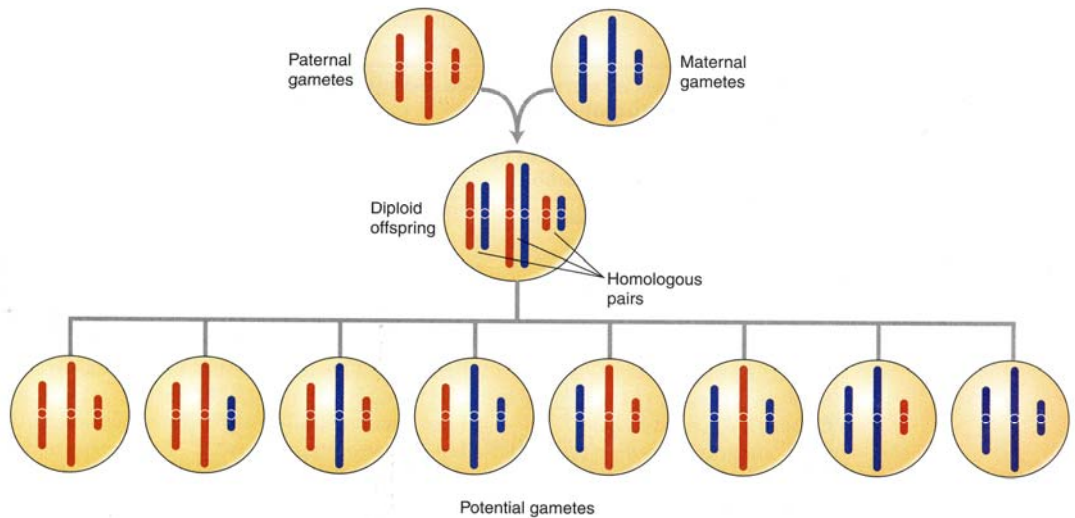


frumento

segale

triticale

L'ibridazione crea variabilità



le possibili combinazioni di n cromosomi

2^n

mais $n = 10 \longrightarrow 1024$

grano $n = 21 \longrightarrow 2097152$

a ciò si deve aggiungere il crossing-over

Autoimpollinazione → LINEE PURE

varietà geneticamente omogenea (piante omozigoti)
riso, grano

Incrocio → IBRIDI - mais

Ibridi F_1 - VIGORE IBRIDO

Rese molto elevate

non si possono usare i semi raccolti dalla pianta a
causa della segregazione
vantaggio per le compagnie sementiere

Ibridazione ➡ Allopoliploidia

allopoliploidia è un vantaggio

- combinazione di differenti genomi che conferiscono adattamenti a condizioni ambientali diverse
- esistenza di copie multiple dello stesso gene
- interazione tra geni di genomi diversi che può portare a nuovi tratti (es. grano tenero)

mais e soia sono antichi allotetraploidi

Le specie poliploidi hanno svolto un ruolo fondamentale nell'evoluzione delle piante coltivate

Molte varietà che gli agricoltori selezionarono per la crescita vigorosa e la resa elevata si rivelarono poliploidi

selezione artificiale di specie poliploidi

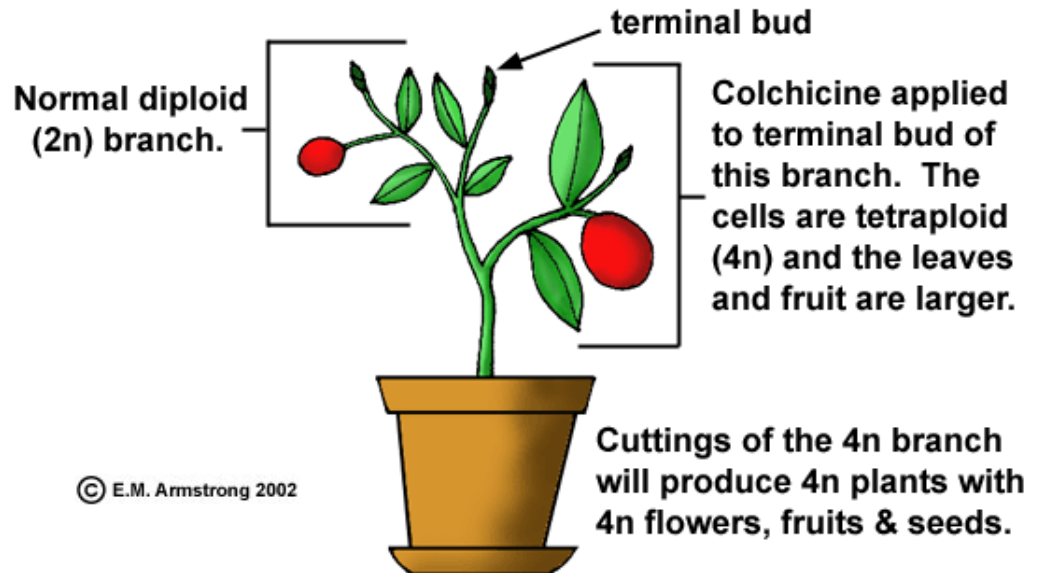
fiori, frutti, semi e foglie di piante poliploidi hanno spesso dimensioni maggiori

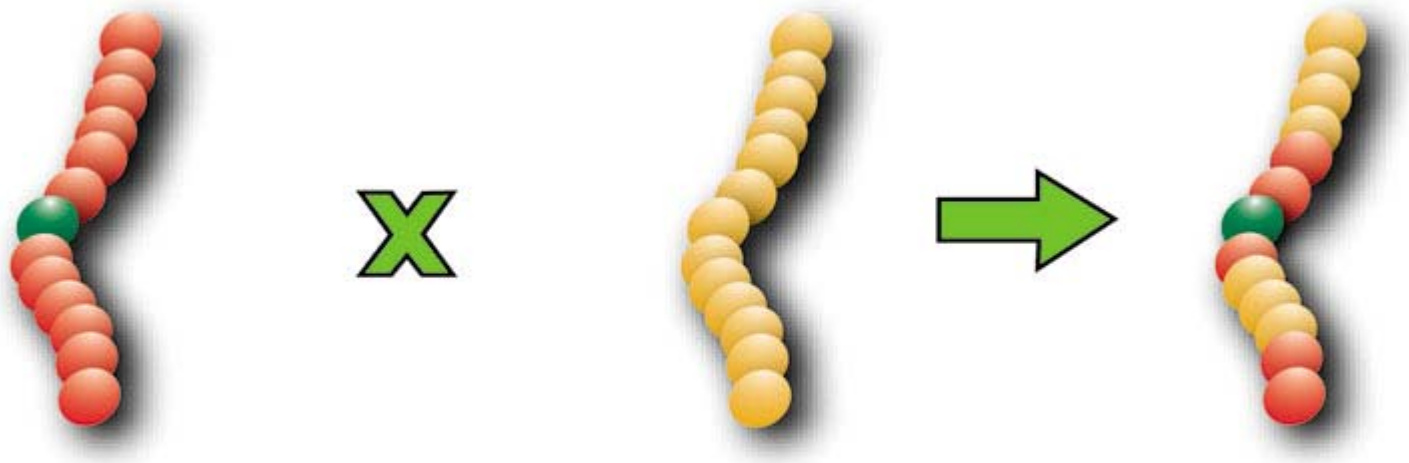
La poliploidia può essere indotta

COLCHICINA

alcaloide che interferisce con la polimerizzazione della tubulina

altera la formazione del fuso mitotico



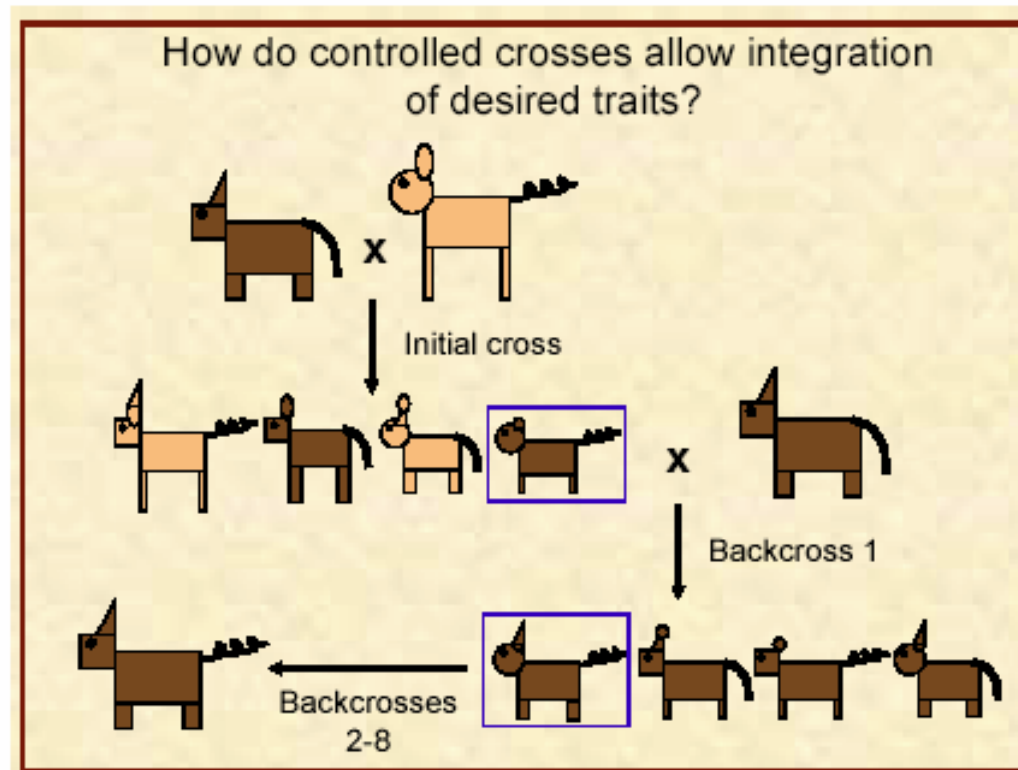


con l'incrocio, oltre al carattere di interesse, possono essere trasferiti anche altri caratteri non desiderabili



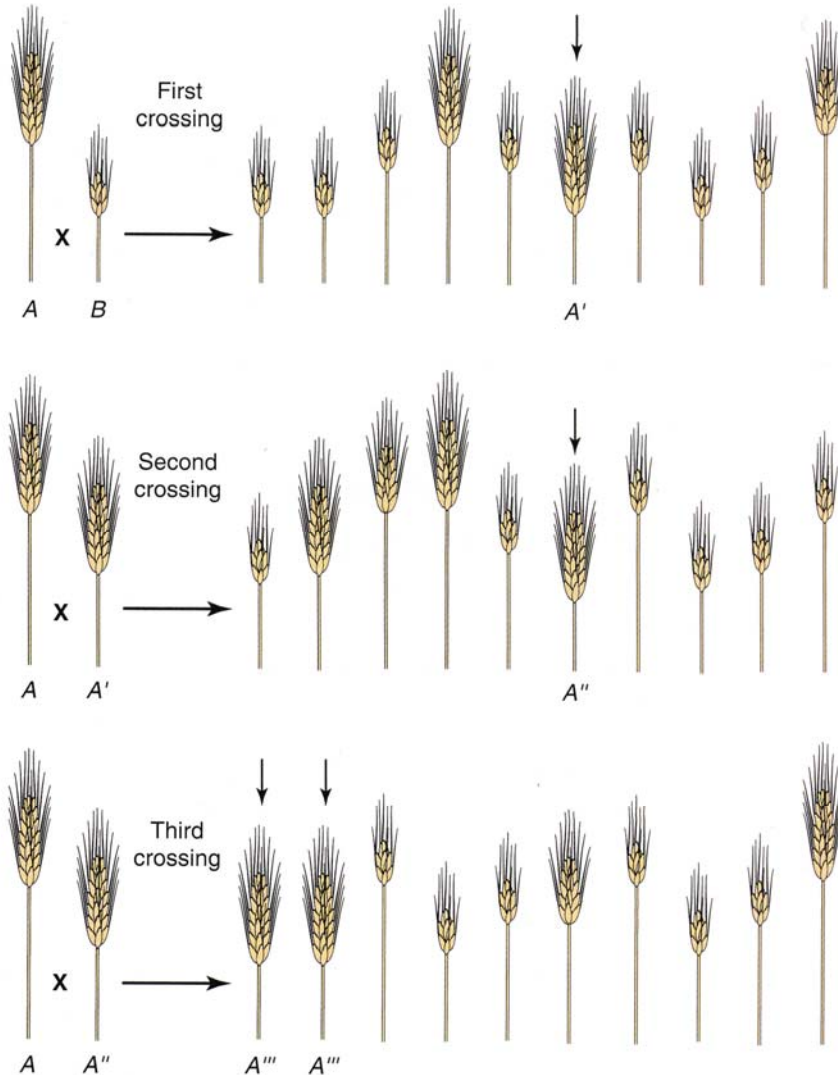
RE-INCROCIO

RE-INCROCIO BACK-CROSSING



Lo scopo del reincrocio è quello di introdurre in una varietà il numero minore di geni possibile oltre quello di interesse

introduzione del tratto "fusto corto" nel frumento



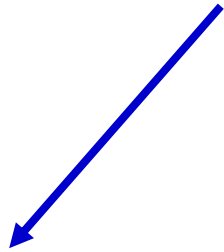
il reincrocio è ripetuto
fino a che non emerge
una varietà che ha tutte
le caratteristiche
dell'originale ad alta
produttività + il gene
della "cortezza"

Table 14.4 Conventional breeding program for a new cereal

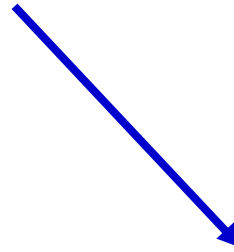
Generations	Evaluation/Selection/Testing		
P	Selected parents		
F ₁	800 crosses		
F ₂	2 million plants	Disease resistance Disease resistance and Field characteristics	
F ₃	400,000 plants		
F ₄	12,000 lines		
F ₅	1,200 lines	Disease resistance Yield Field characteristics Uniformity	
F ₆	300 lines		
F ₇	50 lines		
F ₈	5 lines		
F ₉	3 lines		
F ₁₀	2 lines		
F ₁₁	1 line!		Industrial uses Quality testing

A conventional breeding program for a new cereal starts with selected parents and careful hand pollination to produce 800 crosses. This F₁ progeny is uniform. Then, 2 million plants are grown (2500 from each parent cross) and evaluation begins. After 10 generations the breeder ends up with one line.

Limitazioni dell'incrocio controllato



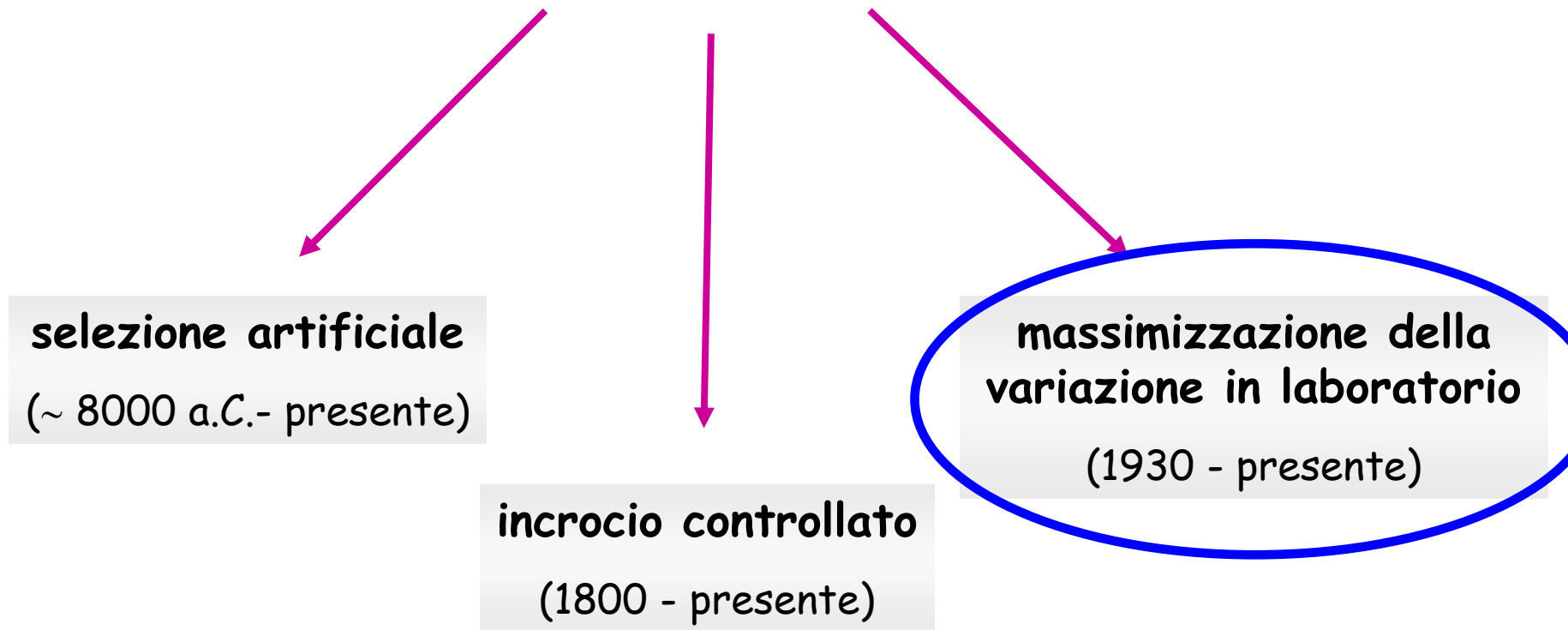
il germoplasma è limitato



tempo: selezione dei genitori,
reincrocio

PLANT BREEDING

MIGLIORAMENTO GENETICO VEGETALE



- **Migliorare la selezione artificiale**



**INDUZIONE DI MUTAZIONI
(MUTATION BREEDING)**

- **Aumentare le possibilità di incrocio controllato**



**RECUPERO EMBRIONALE
IBRIDAZIONE SOMATICA**

Mutation breeding

massimizzazione della
variazione in laboratorio

Mutageni raggi x
 raggi γ

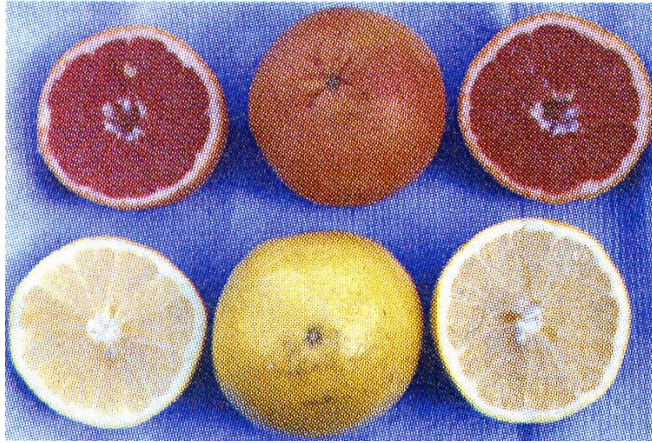
da sorgenti radioattive come il Co

SEMI

svantaggio: i semi sono multicellulari, la pianta formata sarà una chimera



- cellule somatiche in colture
- polline



pompelmo rosa (Texas red)

ottenuto per radiazione

il gene che codifica un enzima che degrada il pigmento rosso in uno incolore è stato reso knock out



grano duro CRESO (90% della produzione nazionale di grano duro)
ottenuto per irraggiamento con neutroni della varietà Cappelli

massimizzazione della
variazione in laboratorio

VARIAZIONE SOMACLONALE

riarrangiamenti ed alterazioni cromosomali

causa: colture *in vitro* di cellule e tessuti e rigenerazione

è una forma di **mutation breeding**

Recupero embrionale

massimizzazione della
variazione in laboratorio

Nell'incrocio "allargato" (interspecie) spesso la fecondazione avviene, ma l'embrione non si sviluppa per incompatibilità con il tessuto materno

recupero dell'embrione



coltura in vitro



Ibridazione somatica

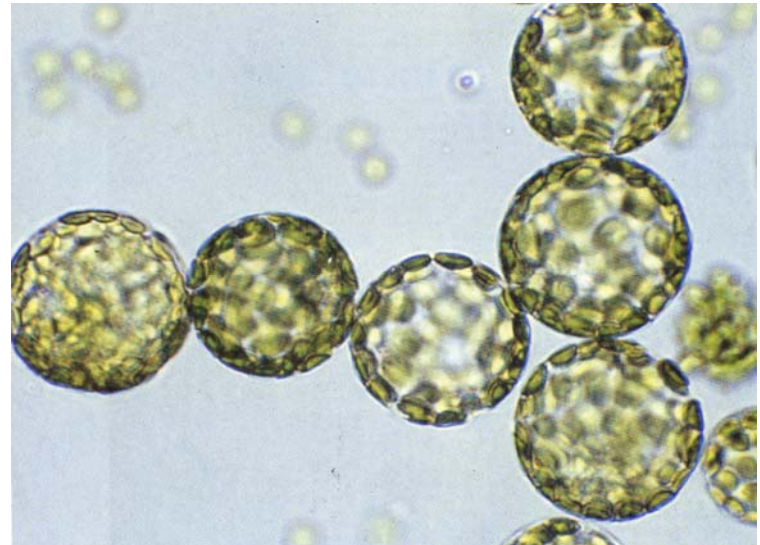
massimizzazione della
variazione in laboratorio

piante sessualmente incompatibili

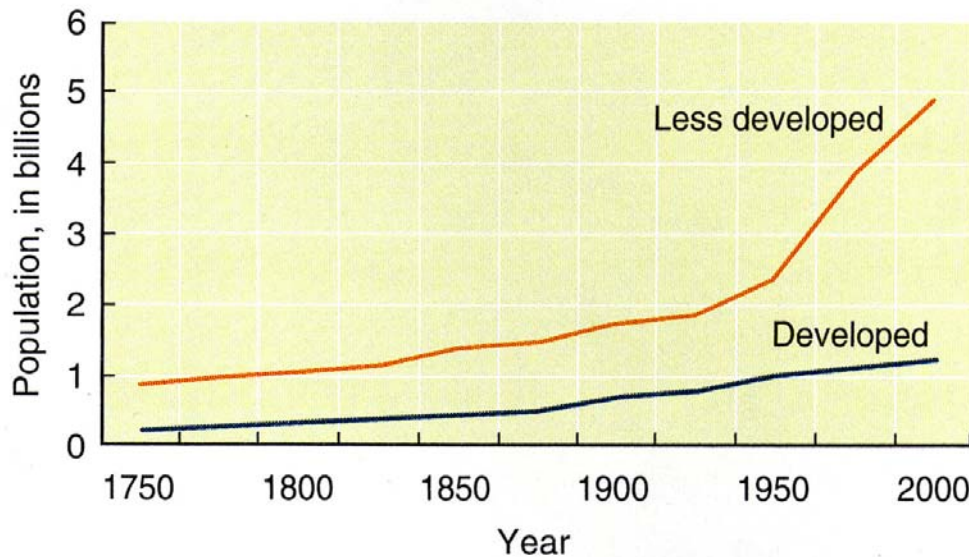
fusione di cellule (protoplasti)



rigenerazione dell'ibrido



GREEN REVOLUTION

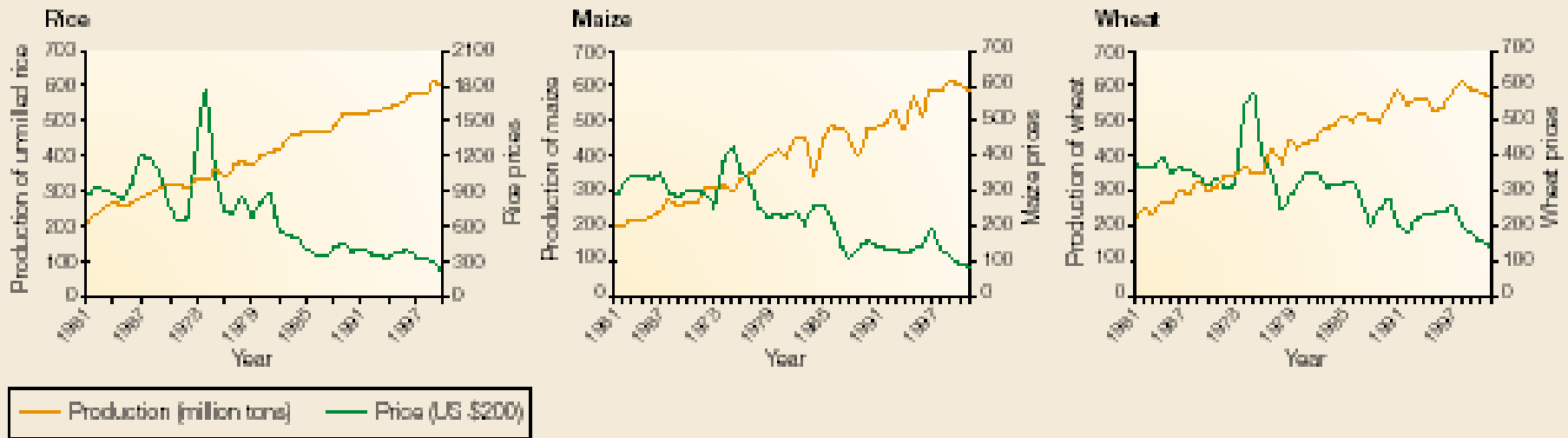


negli ultimi 40 anni
la popolazione mondiale
è raddoppiata

"Famine 1975!" pubblicato nel 1967
si prevedevano catastrofiche carestie
nei successivi 20 anni

In realtà ciò non è accaduto perché la produzione
mondiale di cereali è aumentata del 125%

Box 1 | The impact of the green revolution



1966 - 1999

produzione di riso + 132 %
grano + 91 %

in 10000 anni la produzione di cereali aveva raggiunto 1 miliardo di tonnellate

in 40 anni, dal 1960, ha raggiunto 2 miliardi di tonnellate

Green revolution (1960 - 1980)

incremento della produzione di grano e riso

Norman Borlaug premio Nobel per la pace

sviluppò una varietà di grano ad alta resa in Messico (International Maize and Wheat Improvement Center)

Nelle Filippine
(International Rice Research Institute)
varietà di riso ad alta
resa

Table 14.5

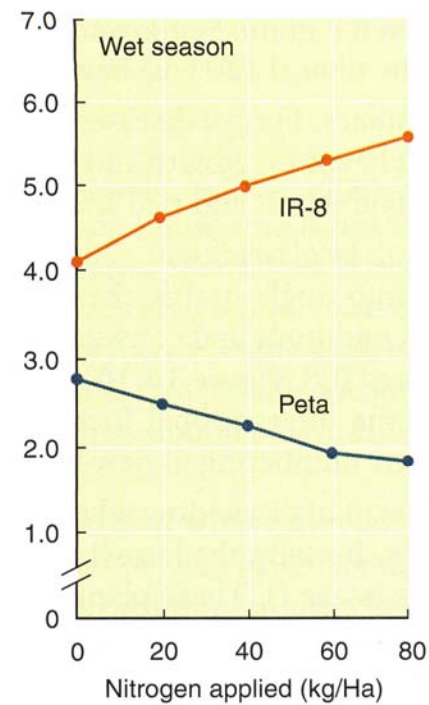
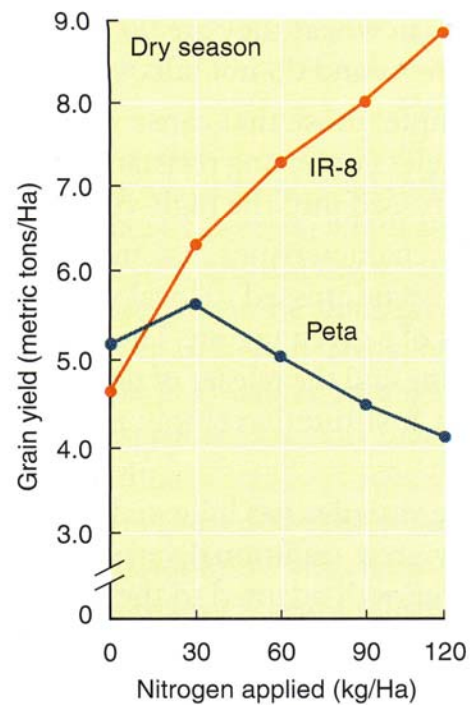
The result of the Green Revolution: yields (metric tons per hectare) of wheat and rice in India and China

Country	Crop	1963	1983
India	Wheat	0.9	1.7
India	Rice	0.9	2.2
China	Wheat	1.0	2.5
China	Rice	2.0	4.7

Source: Data from Food and Agriculture Organization.

CARATTERISTICHE

- Resa elevata
- **Maturazione veloce** (la crescita rapida permette più di un ciclo l'anno = raddoppio della produzione)
- **Varietà semi-nana** (le piante non si piegano) 90 cm invece che 120 cm
- **Resistenza alla ruggine** (attraverso l'incrocio con ceppi che avevano l'allele per la resistenza)
- **Adattabilità alle condizioni ambientali** (inserite le precedenti caratteristiche nella stessa specie, questa è stata incrociata con varietà locali adattate alle condizioni di crescita e ai desideri dei consumatori di quella data regione)



Varietà semi-nane

nel 1999

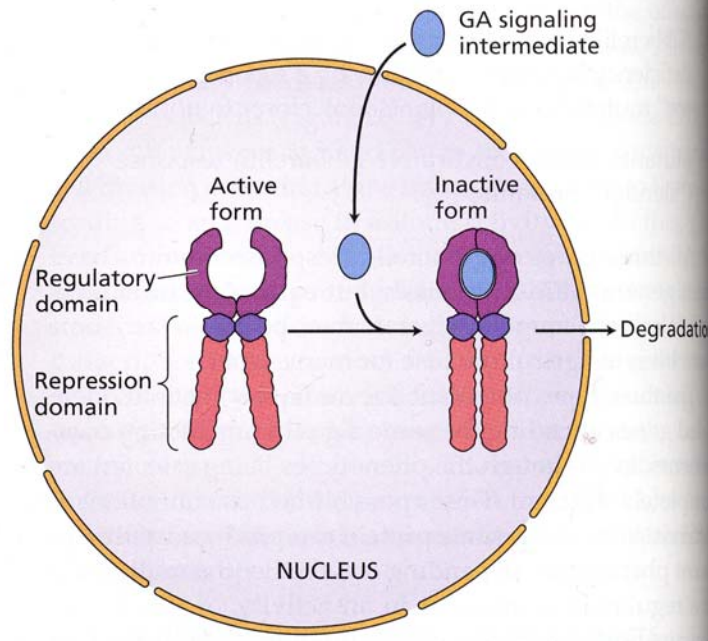
nel grano *Rht-B1* *Rht-D1*
(nel mais *d8*)

ortologi del gene *GAI* in *Arabidopsis*
insensibilità alle gibberelline

GAI è un repressore della risposta

varietà seminane perché
INSENSIBILI ALLE
GIBBERELLINE



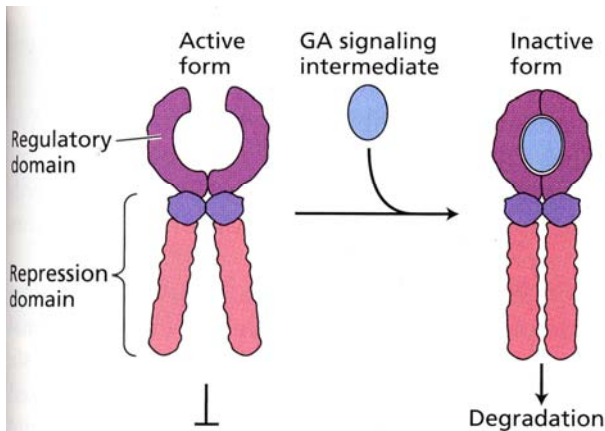


GAI è un repressore della trascrizione

Il legame delle GAs al dominio regolatore inattiva il repressore



LA PIANTA CRESCE

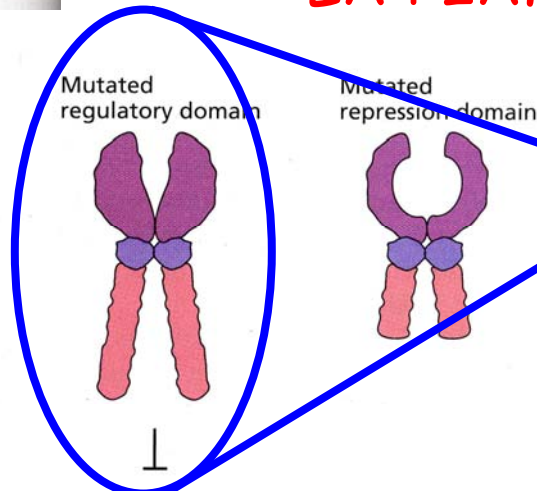


No growth

Wild-type repressor in the absence of GA represses elongation growth.

Growth

In the presence of GA, the repressor is degraded, allowing elongation to occur.



No growth

A mutation in the regulatory domain turns the repressor into a constitutively active repressor, so the plant is dwarf even in the presence of GA.

Growth

A mutation in the repression domain disables the regulatory protein, so the plant grows tall even in the absence of GA.

mutante *gai*

la mutazione nel dominio regolatore determina insensibilità alle GAs

il repressore rimane attivo anche in presenza di GAs

la pianta rimane nana