

MATURAZIONE DEL FRUTTO

Durante il processo di maturazione, i frutti di molte specie subiscono varie modificazioni tra cui:

- alterazione della ultrastruttura della parete cellulare e della consistenza
- conversione di amido in zuccheri semplici
- alterazione della biosintesi e accumulo di pigmenti
- incremento dei livelli di composti volatili che danno sapore e aroma
- incremento della suscettibilità a patogeni dopo la raccolta

EFFETTI DELL'ETILENE

- Maturazione dei frutti
- Abscissione (foglie, fiori, frutti)
- Epinastia
- Allungamento del fusto in suoli allagati (riso)
- Mantenimento della chiusura dell'uncino durante la germinazione
- Senescenza di fiori e foglie

Il pomodoro si ammorbidisce a causa della presenza della Poligalatturonasi (PG), un enzima che degrada la pectina



IDEA: mantenere il pomodoro compatto anche quando è lasciato maturare sulla pianta

Spegnere il gene per la PG

In assenza di PG ----> assenza di degradazione della pectina

FLAVR SAVR tomato

1° alimento geneticamente modificato

Calgene, Inc. (Davis, CA) 1994

Strategia ----> Gene PG antisenso

- Generazione di piante di pomodoro transgenico con un gene PG di pomodoro orientato antisenso
- Brevetto ampio in 1992
- 1994 la FDA approva la vendita di FLAVR SAVR

Non più in commercio per le caratteristiche di bassa resa e di estrema delicatezza del frutto.

Costrutto transgenico non in una buona varietà, a causa di performance su campo scarse.

Inoltre costo superiore alle varietà non GM.

Strategie per alterare la senescenza del frutto: **bloccare l'etilene**

- Due vie per prevenire la produzione di etilene
 - bloccare la produzione usando RNA antisenso di enzimi chiave nel pathway biosintetico
 - Aggiungere un enzima che degrada il precursore dell'etilene

controllo della maturazione del frutto

controllo



transgenico

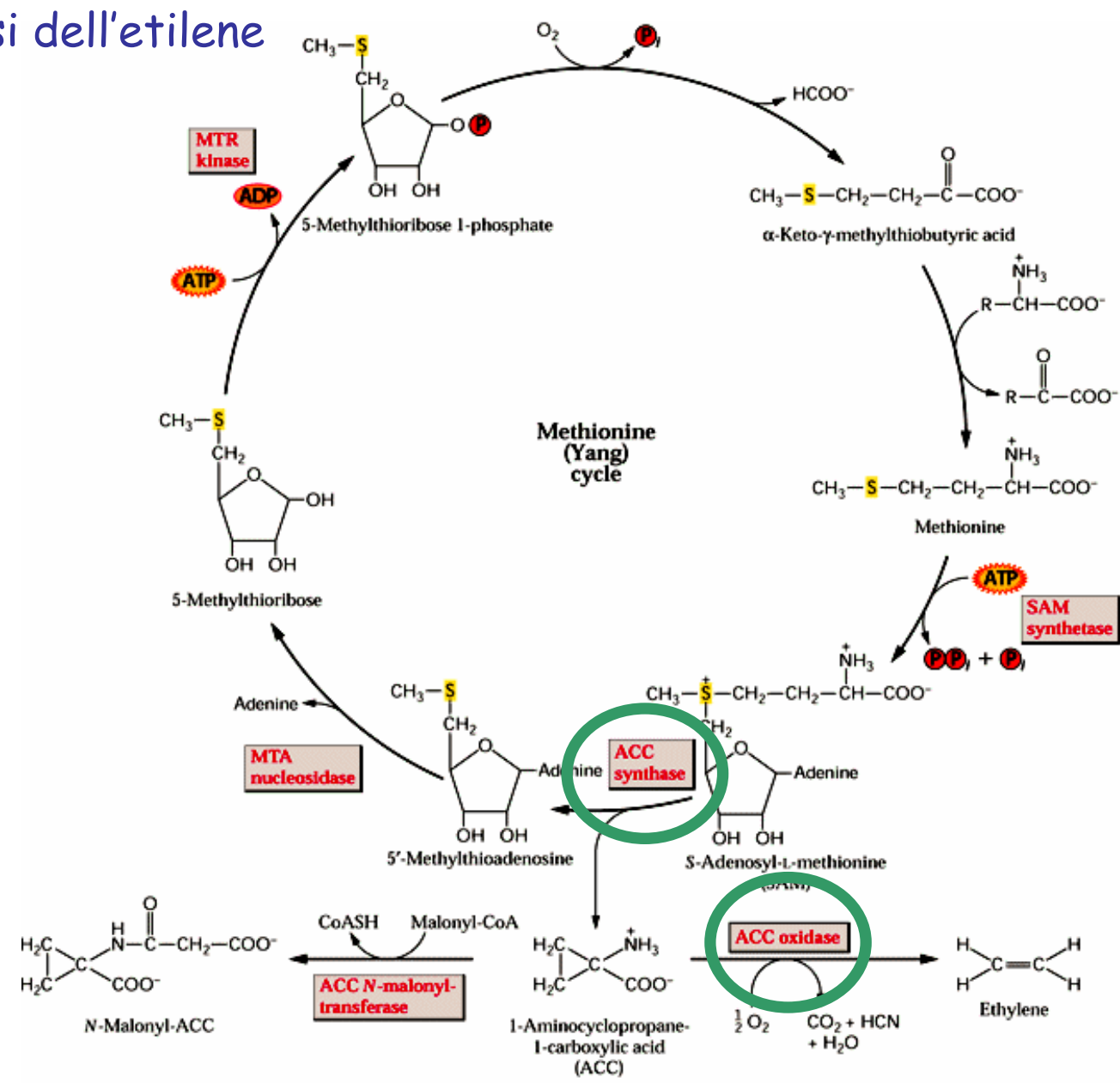


transgenico +
etilene



**bloccare la produzione usando RNA
antisenso di enzimi chiave nel pathway
biosintetico dell'etilene**

biosintesi dell'etilene

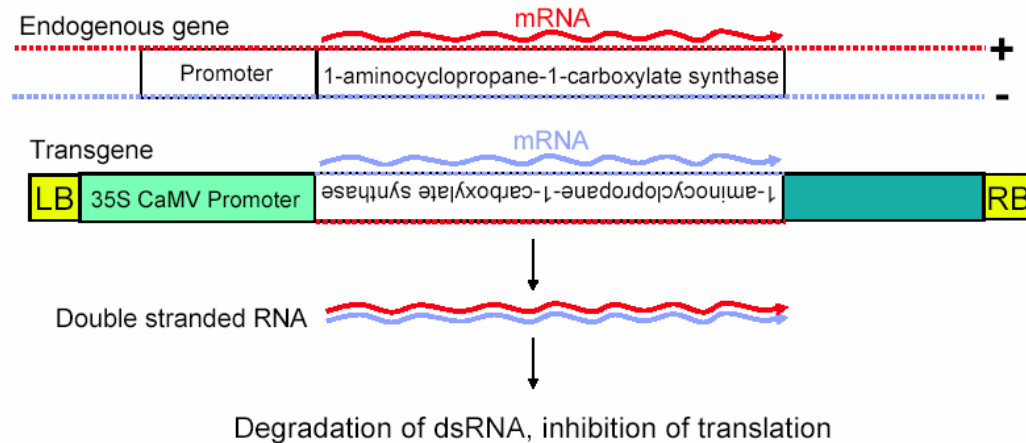


Host Organism / Variety	<i>Lycopersicon esculentum</i> (Tomato)
Trait	Increased shelf-life (delayed ripening) due to reduced ethylene accumulation through introduction of truncated 1-aminocyclopropane carboxylic acid (ACC) synthase gene.
Trait Introduction Method	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> -mediated plant transformation.
Proposed Use	Production of tomatoes for human consumption, either fresh or processed.
Company Information	DNA Plant Technology Corporation

**Silenziamento genico
(Co-soppressione) del gene
endogeno indotto dal
transgene**

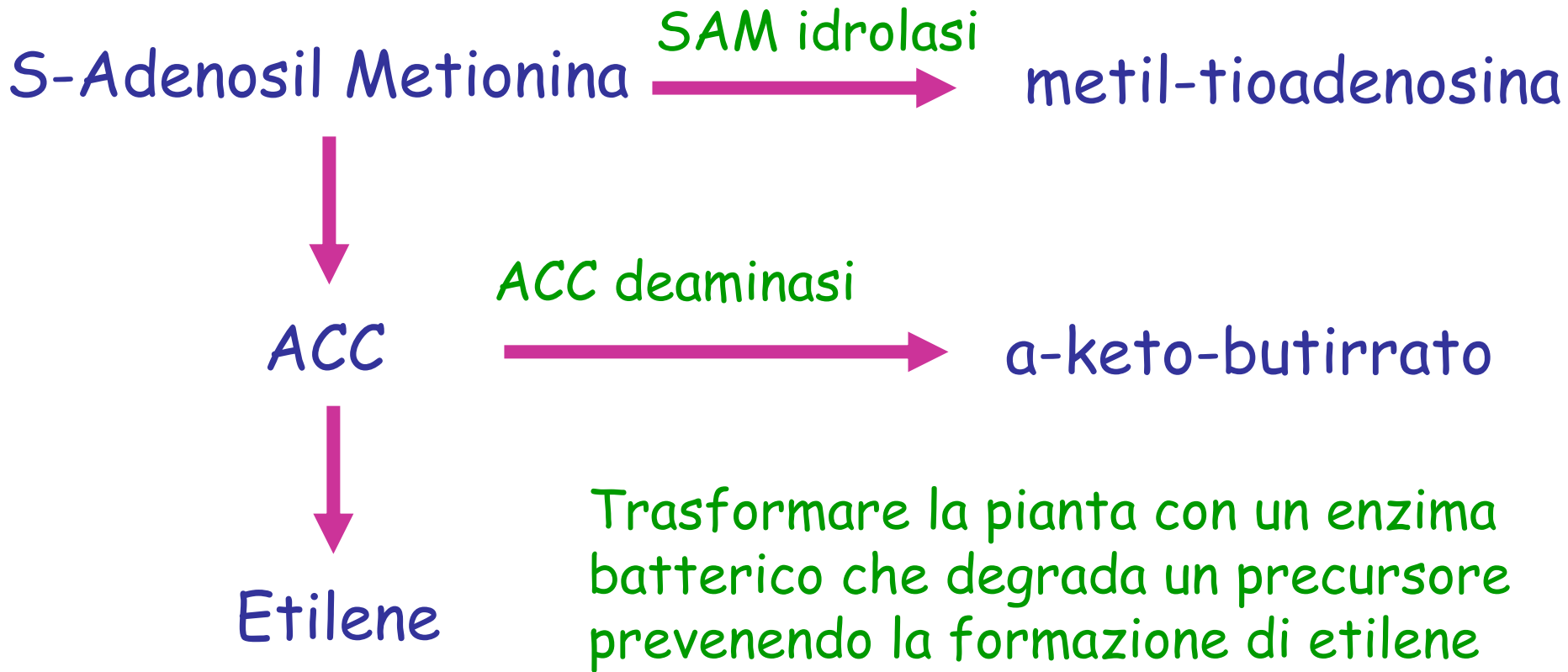
- ACC-sintasi
anti-senso

Antisense Suppression of Genes



- Ethylene biosynthesis blocked
- Tomato fruit ripening inhibited

**Aggiungere un enzima che degrada il
precursore dell'etilene**



- espressione di ACCd (ACC deaminasi) → riduzione dei livelli del precursore ACC (pomodoro)
- espressione di SAM idrolasi → riduzione dei livelli del precursore SAM (pomodoro, melone)

MIGLIORAMENTO DELLE QUALITA' NUTRIZIONALI

- Uso dell'ingegneria genetica per migliorare:
 - livelli di β -carotene
 - contenuto di amminoacidi
 - contenuto di lipidi
 - altri - vit E, Ferro, etc.

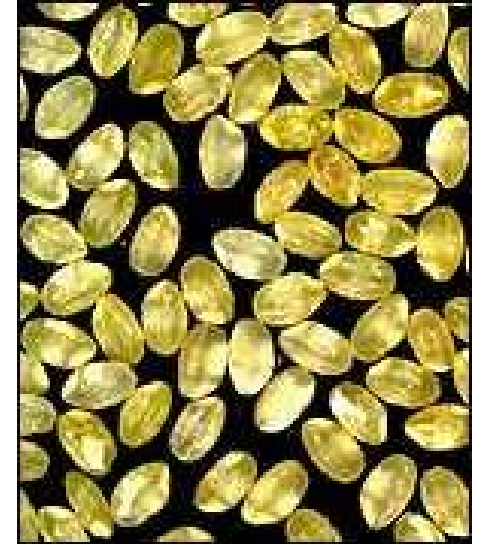
GOLDEN RICE

Il riso brillato non contiene β -carotene

200 milioni di donne e bambini sono affetti da carenza di Vitamina A

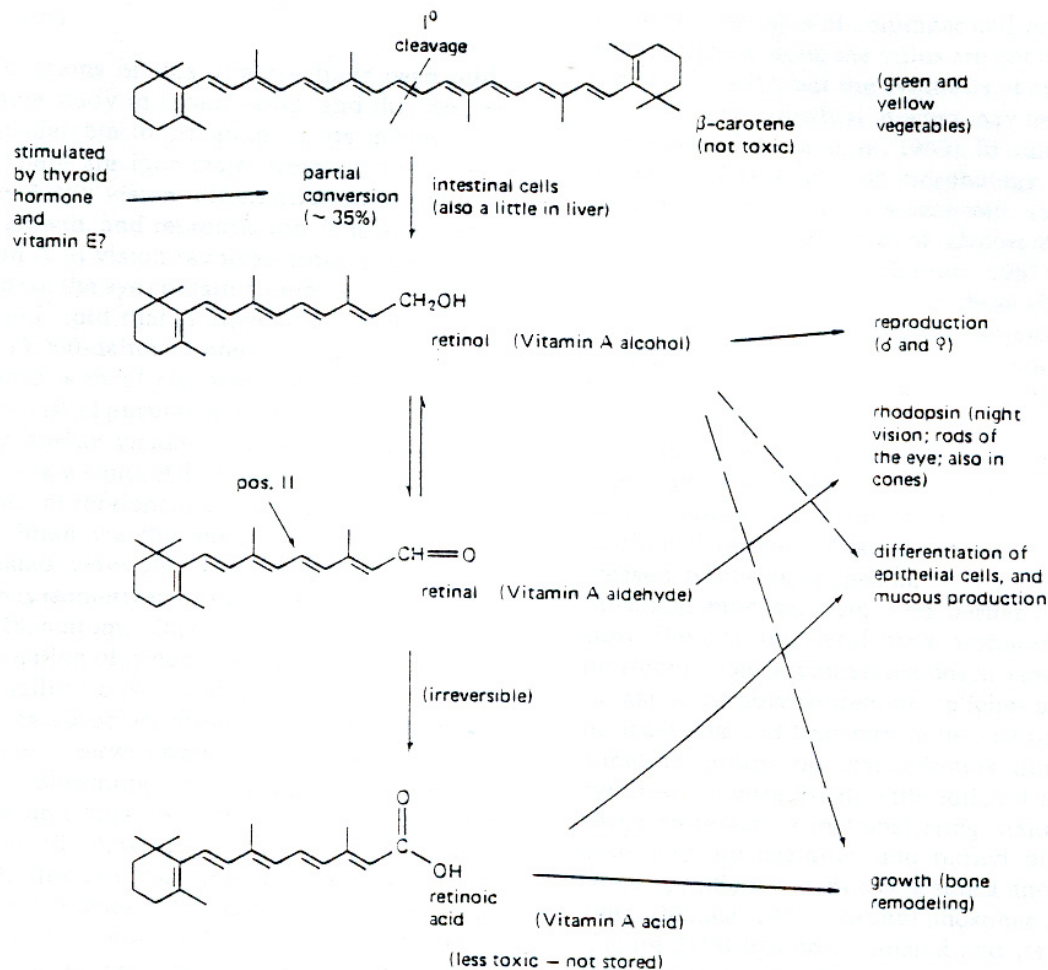
ogni anno circa 500000 bambini diventano ciechi

circa 2 milioni di bambini muoiono ogni anno per malattie da carenza di Vit. A



Ingo Potrykus (Svizzera)
Peter Beyer (Germania)



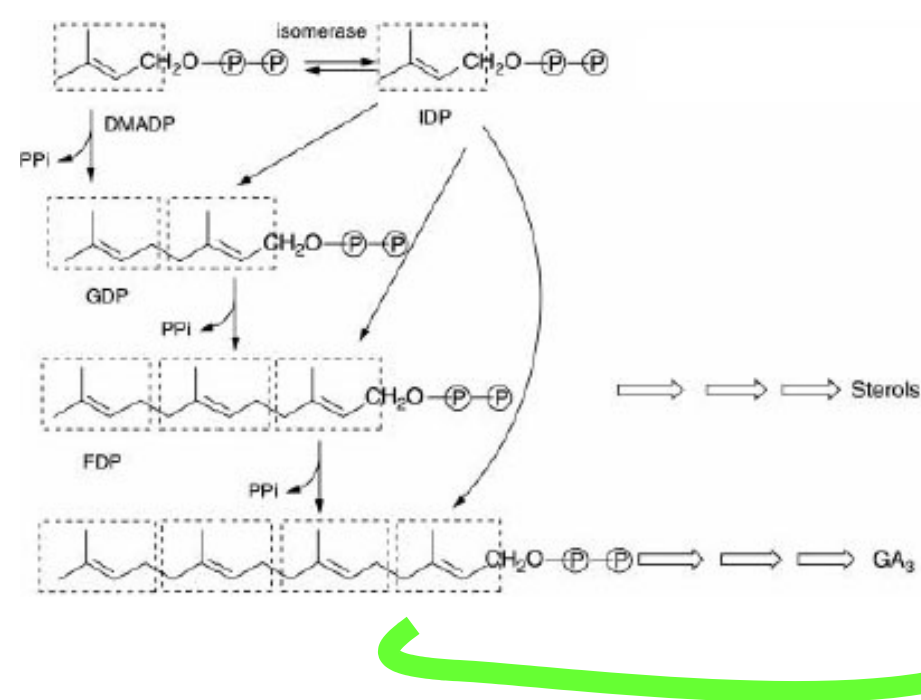


FUNZIONI

- Visione
- Differenziamento cellule epiteliali
- Fertilità
- Cheratinizzazione

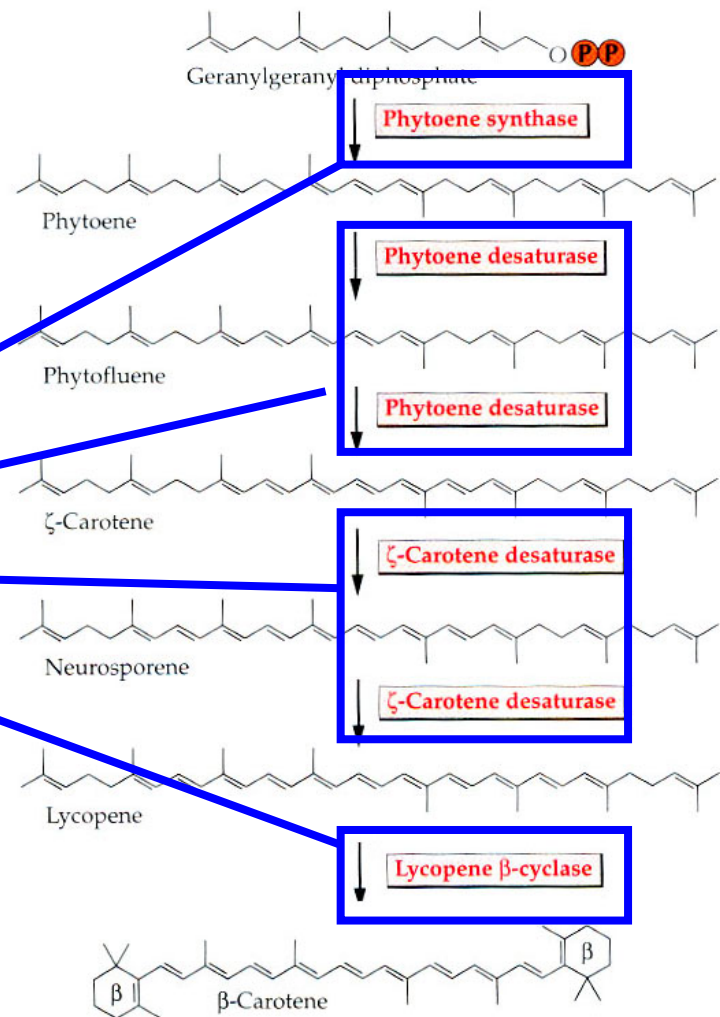
CARENZA VITAMINA A

- Diarrea
- Malattie della pelle
- Cecità
- Fertilità
- Malattie respiratorie



enzimi
mancanti
nel riso

via biosintetica dei
carotenoidi

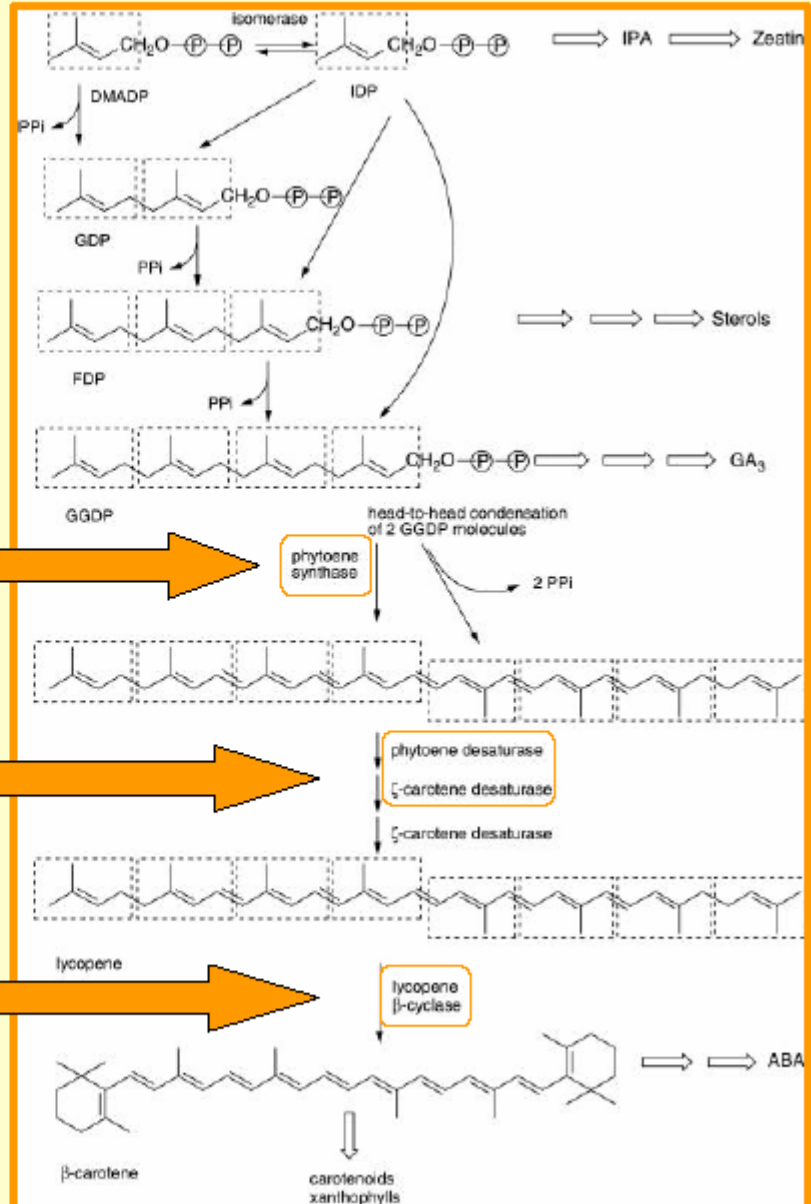


**Geni aggiunti nel
GOLDEN RICE, per
completare la parte
mancante della via
biosintetica dei
carotenoidi**

psy
(fitoene sintasi
di narciso)

ctr 1
(carotene desaturasi
batterica)

lcy
(licopene beta-
ciclasi di narciso)



Engineering the Provitamin A (β -Carotene) Biosynthetic Pathway into (Carotenoid-Free) Rice Endosperm

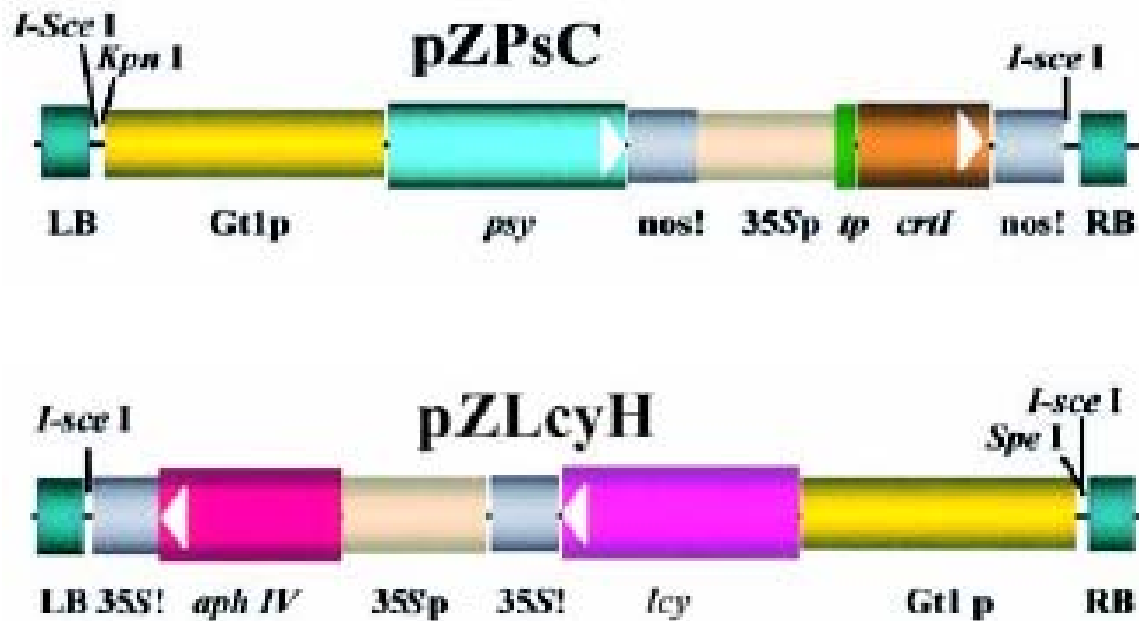
Science vol. 287

14 Jan 2000

Xudong Ye,^{1*†} Salim Al-Babili,^{2*} Andreas Klöti,^{1‡} Jing Zhang,¹
Paola Lucca,¹ Peter Beyer,^{2§} Ingo Potrykus^{1§}

- ① **Clonaggio**
 - fitoene sintasi (*Narcissus pseudonarcissus*)
 - fitoene desaturasi (*Erwinia uredovora*)
 - licopene ciclasi (*Narcissus pseudonarcissus*)
- ② **Agrobacterium tumefaciens**
- ③ **Trasformazione embrioni di riso**
- ④ **Analisi dei trasformanti**

CO-TRASFORMAZIONE

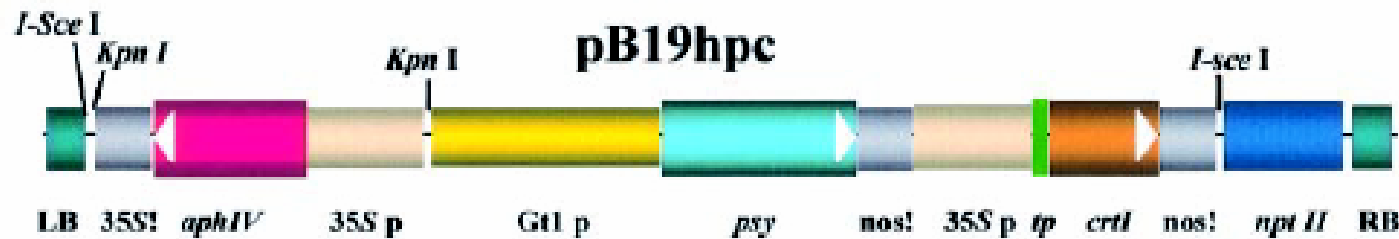


500 embrioni immaturi
sono stati inoculati con
una miscela di
Agrobacterium
LB4404/pZPsC
LB4404/pZLcyH

12, tra i 60
resistenti alla
igromicina, avevano
entrambi i costrutti

- psy* fitoene sintasi di narcisio
- crtI* fitoene desaturasi di *Erwinia uredovora* fusa a *tp* peptide di transito per il plastide
- lcy* licopene β -ciclastasi di narciso
- Gt1p* promotore della glutelina dell'endosperma
- aph IV* resistenza all'igromicina
- 35Sp* promotore CaMV 35S
- 35S!* terminatore CaMV 35S

TRASFORMAZIONE CON UN UNICO VETTORE



- psy* fitoene sintasi di narcisio
- crtI* fitoene desaturasi di *Erwinia uredovora*
- fusa a *tp* peptide di transito per il plastide
- Gt1p promotore della glutelina dell'endosperma
- aph IV* resistenza all'igromicina
- 35Sp promotore CaMV 35S
- 35S! terminatore CaMV 35S
- nos! terminatore nos

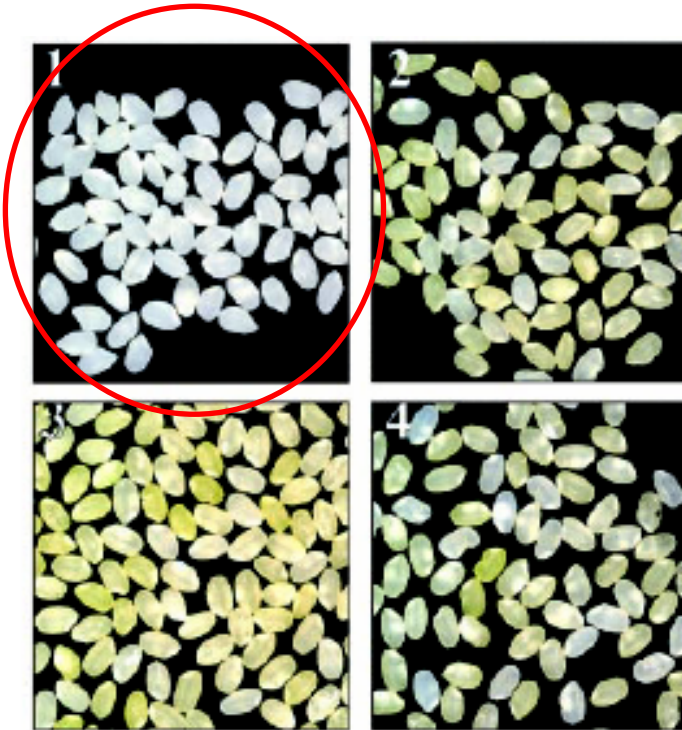
si sarebbe dovuto formare licopene

800 embrioni immaturi
sono stati inoculati con
Agrobacterium
LB4404/pB19hpc

50 sono stati
selezionati per la
resistenza alla
igromicina

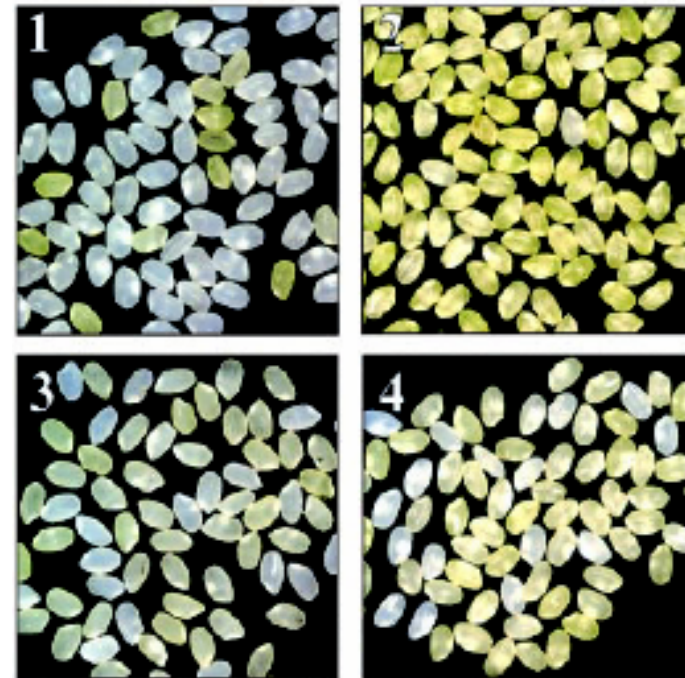
trasformazione con pB19hpc

controllo



non si forma licopene, ma la
sintesi procede a β -carotene;
probabilmente nell'endosperma
è espressa la licopene β -ciclastasi

co-trasformazione con pZPsC e pZLcyH



linee con diversi livelli di
sintesi di beta-carotene
**Le migliori ne contengono 2
 $\mu\text{g/g}$ di riso**

GOLDEN RICE

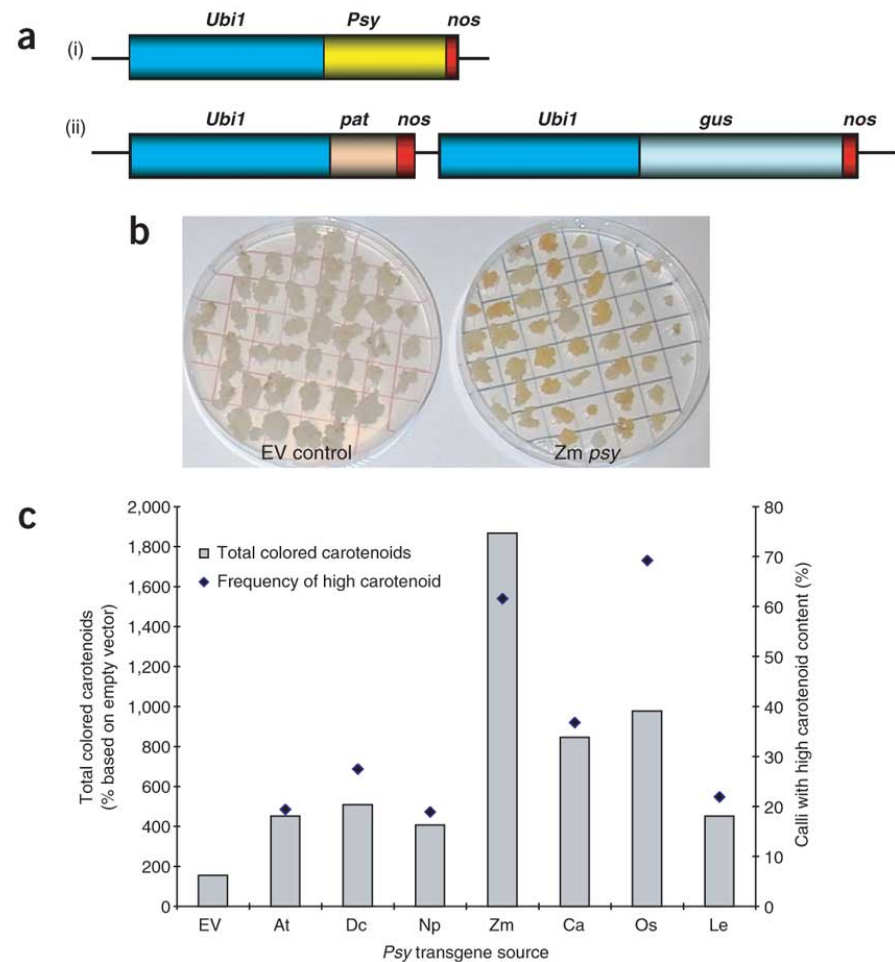
- Sviluppato da istituti di **ricerca pubblica**, non da industrie biotec
- Contiene un numero elevato di brevetti, ma il suo uso sarà consentito a scopo umanitario; gli agricoltori con reddito inferiore a \$ 10000 potranno usarlo e riseminarlo
- E' in corso l'adattamento a varietà locali di riso dei paesi asiatici mediante breeding tradizionale presso i Centri di Ricerca di quei paesi

Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content

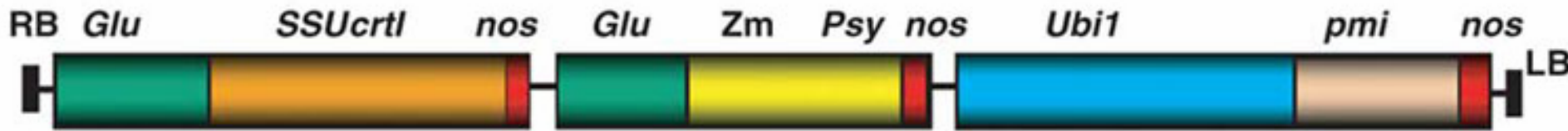
Jacqueline A Paine¹, Catherine A Shipton¹, Sunandha Chaggar¹, Rhian M Howells¹, Mike J Kennedy¹, Gareth Vernon¹, Susan Y Wright¹, Edward Hinchliffe², Jessica L Adams³, Aron L Silverstone³ & Rachel Drake¹

La fitoene sintasi è l'enzima limitante nella via biosintetica del β -carotene

Trasformazione di calli con geni *psy* di varie specie vegetali



GOLDEN RICE II



SSUcrtl: carotene desaturasi batterica fusa al peptide di transito per il cloroplasto della RUBISCO

Glu: promotore della glutelina

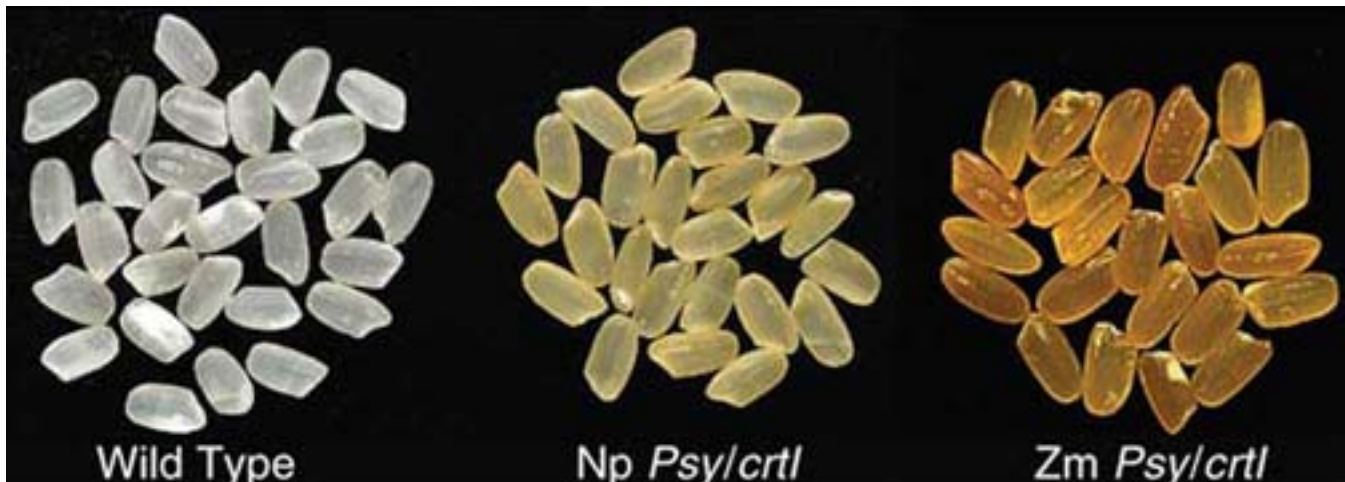
Zm Psy: fitoene sintasi di mais

Ubi1: promotore della ubiquitina

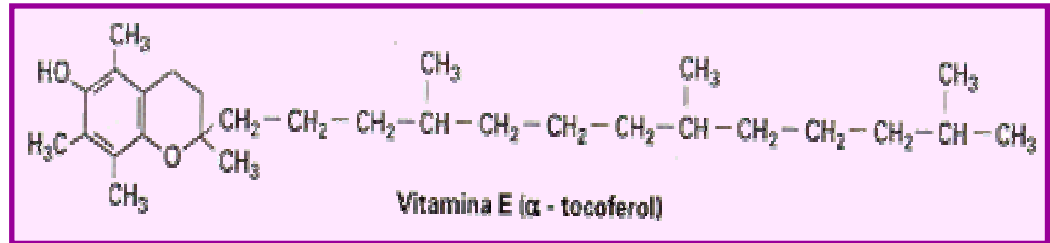
pmi: fosfomannosio isomerasi

Narciso

Mais



VITAMINA E



AZIONE

Antiossidante e anti-radicali liberi
Previene ossidazione acidi grassi
membrana plasmatica → integrità cellule

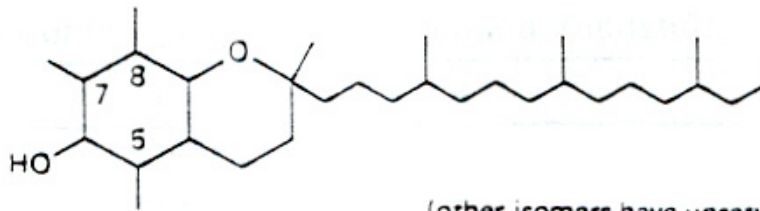
RDA

10-13 UI
(7-9 mg α-tocoferolo)

Dosi superiori (100-1000 UI) →

- riduzione malattie cardiovascolari
- riduzione processi degenerativi

60% → OLI VEGETALI
40% → ALTRI ALIMENTI



(other isomers have unsaturated side chain, or additional CH₃ groups)

α - tocopherol (methyl at positions 5, 7, 8)
 β - tocopherol (methyl at positions 5, 8)
 γ - tocopherol (methyl at positions 7, 8)
 δ - tocopherol (methyl at position 8)

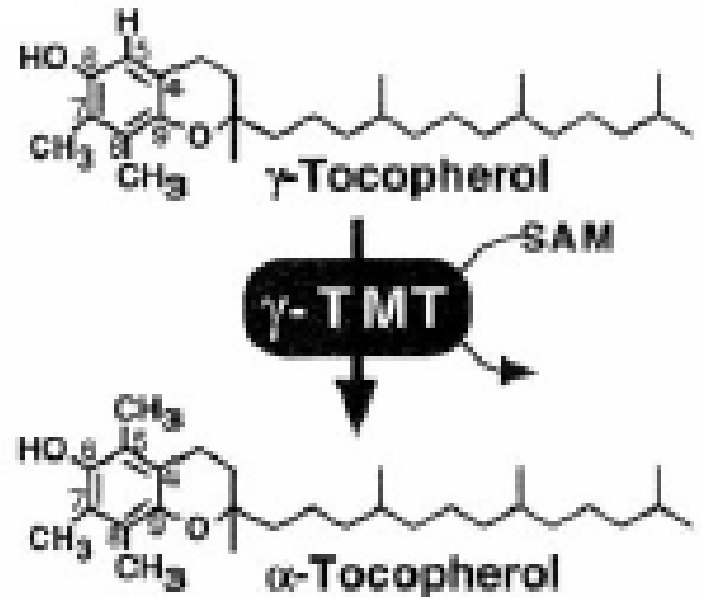
Molti oli vegetali contengono alti livelli di γ -tocoferolo e bassi livelli di α -tocoferolo

NON TUTTI I TOCOFEROLI HANNO LA STESSA EFFICACIA

Uguale assorbimento
Diversa distribuzione nel corpo

ATTIVITA'

α -tocoferolo	100
β -tocoferolo	50
γ -tocoferolo	10
δ -tocoferolo	3



Sovraespressione in piante di Arabidopsis del gene della γ -tocoferolometiltransferasi

AMMINOACIDI

Miglioramento delle qualità nutrizionali

i semi dei cereali contengono il 15-20% di proteine

➡ basso contenuto di lisina



i legumi contengono il 20-30% di proteine

➡ basso contenuto di S-amminoacidi



Strategie per incrementare il contenuto di aminoacidi

- Aumentare la quantità di uno **specifico aminoacido**
- Alterare le **proteine di riserva** del seme
 - mutagenesi sito-specifica per modificare gli aa
- Aggiungere **proteine nuove** con un "corretto" contenuto di aa

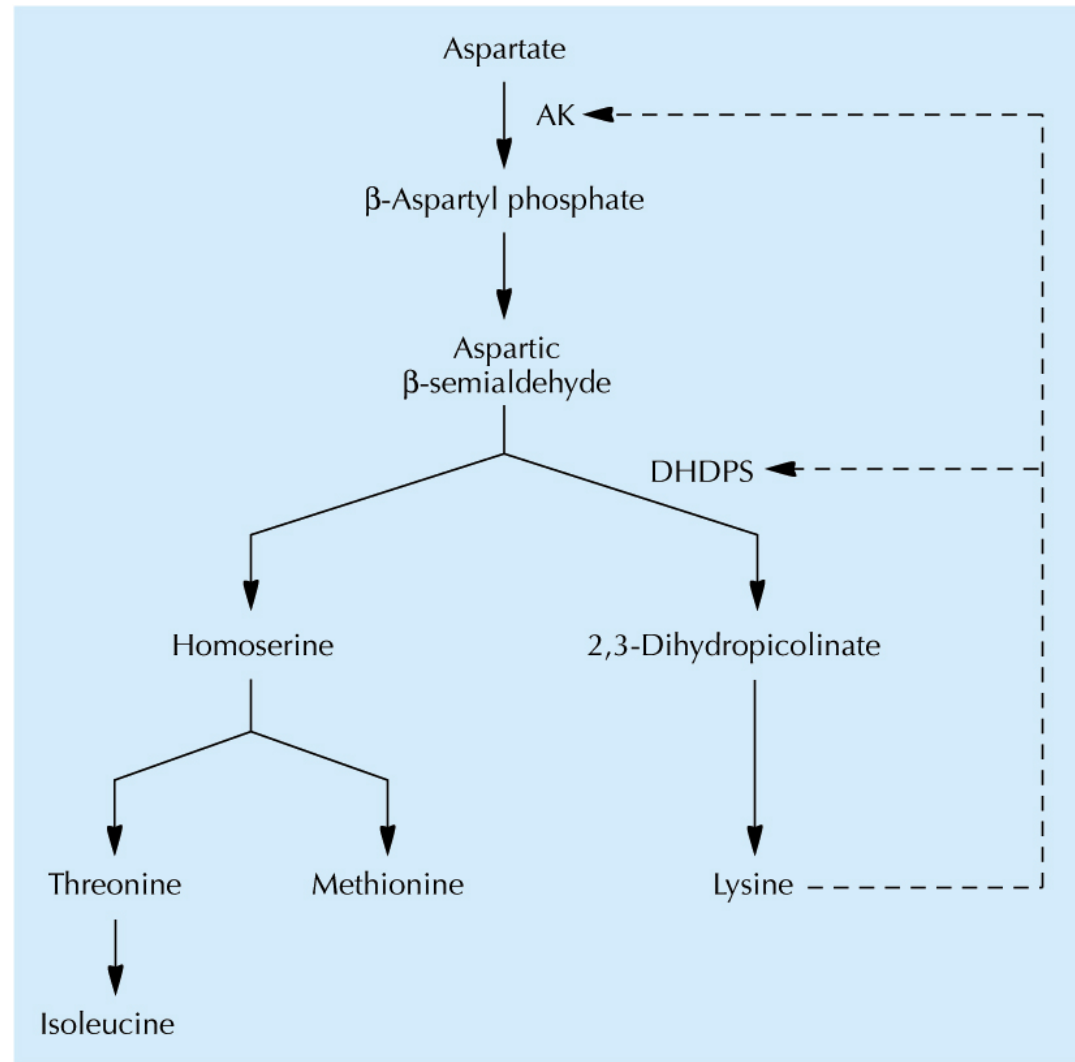
manipolazione delle vie biosintetiche

aspartato chinasi (AK) e diidropicolinato sintasi (DHDPS) sono il punto di controllo della via biosintetica

forme di aspartato chinasi e di DHDPS insensibili al feedback sono state clonate in piante di soia



aumento di circa 100 volte della lisina libera nei semi



LY038

Varietà di mais con aumentati livelli di lisina

per alimentazione del bestiame



Elementi genici introdotti

Code	Name	Type	Promoter, other	Terminator	Copies	Form
<i>cordapA</i>	dihydrodipicolinate synthase (<i>Corynebacterium glutamicum</i>)	AA	promoter from <i>globulin 1</i> (Glb1) gene from <i>Zea mays</i> rice actin gene intron (rAct1) and <i>Z. mays</i> chloroplast transit peptide sequence for DHDPS	Glb1 gene 3' non-translated region from <i>Z. mays</i>	1 functional	

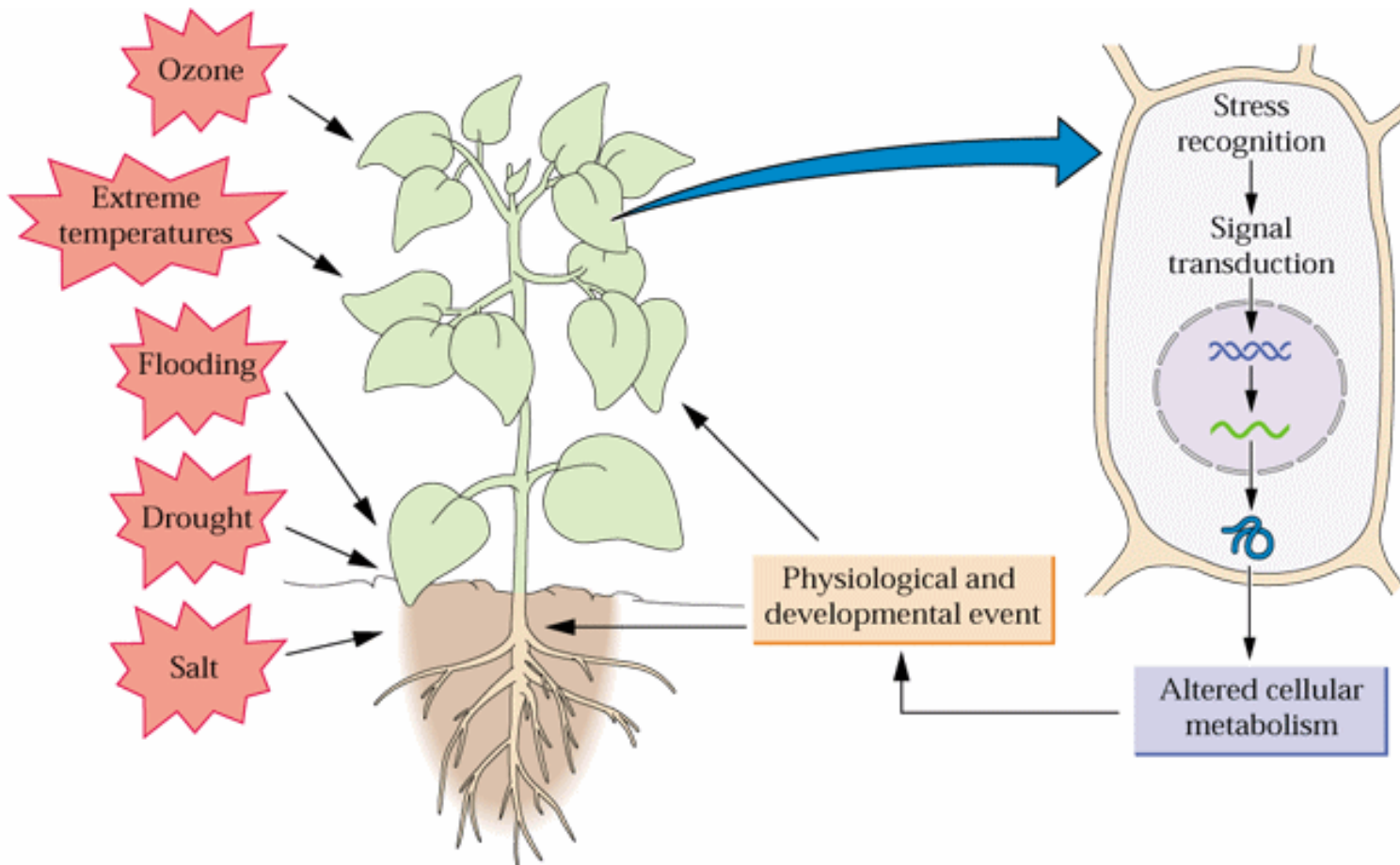
Incrociato con MON810 per inserire anche la resistenza alla piralide

**AUMENTARE LA TOLLERANZA
AGLI STRESS**

Stress biotici

danno da patogeni
danno da animali
danno da ferita

Stress abiotici

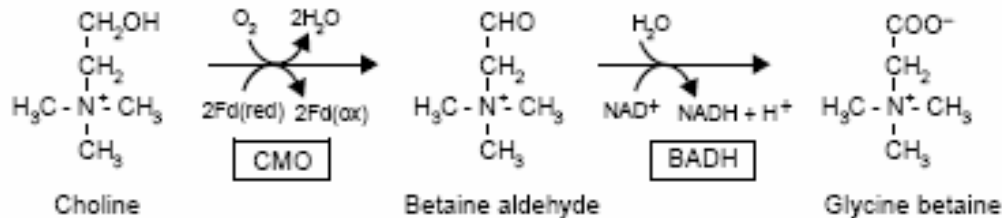


Aumentare la tolleranza allo stress idrico

accumulo di soluti compatibili AGGIUSTAMENTO OSMOTICO

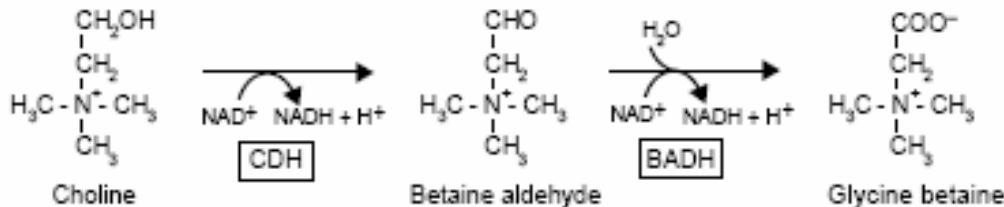
Choline-dehydrogenation/oxidation pathways

(a) Plants



CMO: colina monoossigenasi
BADH: betaina aldeide
deidrogenasi
CDH: colina deidrogenasi
COD: colina ossidasi

(b) *Escherichia coli*



(c) *Arthrobacter globiformis*

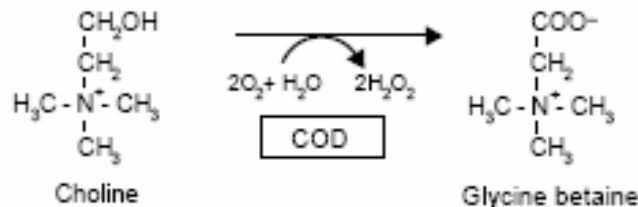


Table 1

Transgenic plants engineered to synthesize glycine betaine and the enhanced tolerance to particular forms of abiotic stress.

Species	Gene	Maximal accumulation	Enhanced tolerance	Reference
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>codA</i>	1.2 $\mu\text{mol g}^{-1}$ fw	Chilling	[4]
	<i>codA</i>	1.2 $\mu\text{mol g}^{-1}$ fw	Chilling, salt	[19]
	<i>codA</i>	1.2 $\mu\text{mol g}^{-1}$ fw	Heat	[45]
	<i>codA</i>	1.2 $\mu\text{mol g}^{-1}$ fw	Strong light	[46]
	<i>codA</i>	1.2 $\mu\text{mol g}^{-1}$ fw	Salt	[3]
	<i>codA</i>	1.2 $\mu\text{mol g}^{-1}$ fw	Freezing	[47*]
	<i>cox</i>	19 $\mu\text{mol g}^{-1}$ dw	Freezing, salt	[18*]
<i>Brassica napus</i>	<i>cox</i>	13 $\mu\text{mol g}^{-1}$ dw	Drought, salt	[18*]
<i>Brassica juncea</i>	<i>codA</i>	0.82 $\mu\text{mol g}^{-1}$ fw	Salt	[48]
<i>Diospyros kaki</i>	<i>codA</i>	0.3 $\mu\text{mol g}^{-1}$ fw	Salt	[49]
<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>cox</i>	13 $\mu\text{mol g}^{-1}$ dw	Salt	[18*]
	<i>betA</i>	?	Salt	[50]
	<i>betA/betB</i>	0.035 $\mu\text{mol g}^{-1}$ fw	Chilling, salt	[51]
	<i>codA</i>	5.3 $\mu\text{mol g}^{-1}$ fw	Chilling, salt	[23]
<i>Oryza sativa</i>	<i>betA</i> (modified)	5.0 $\mu\text{mol g}^{-1}$ fw	Drought, salt	[10]

Piante che accumulano glicina betaina sono tolleranti anche ad altre forme di stress

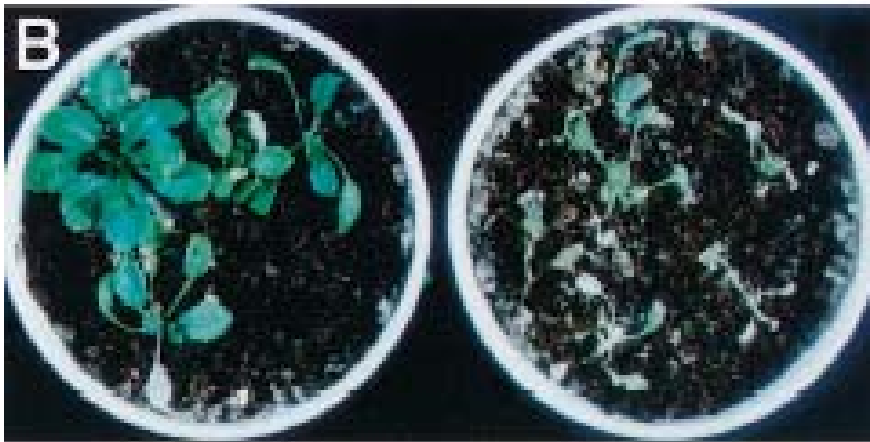
transgeniche

wild type

tolleranza stress idrico



aumentata tolleranza al sale di
piante di *Arabidopsis* che
accumulano glicina betaina in
conseguenza dell'introduzione
del gene *codA* di *A. globiformis*



I semi erano fatti germinare in
un mezzo contenente 100 mM
NaCl

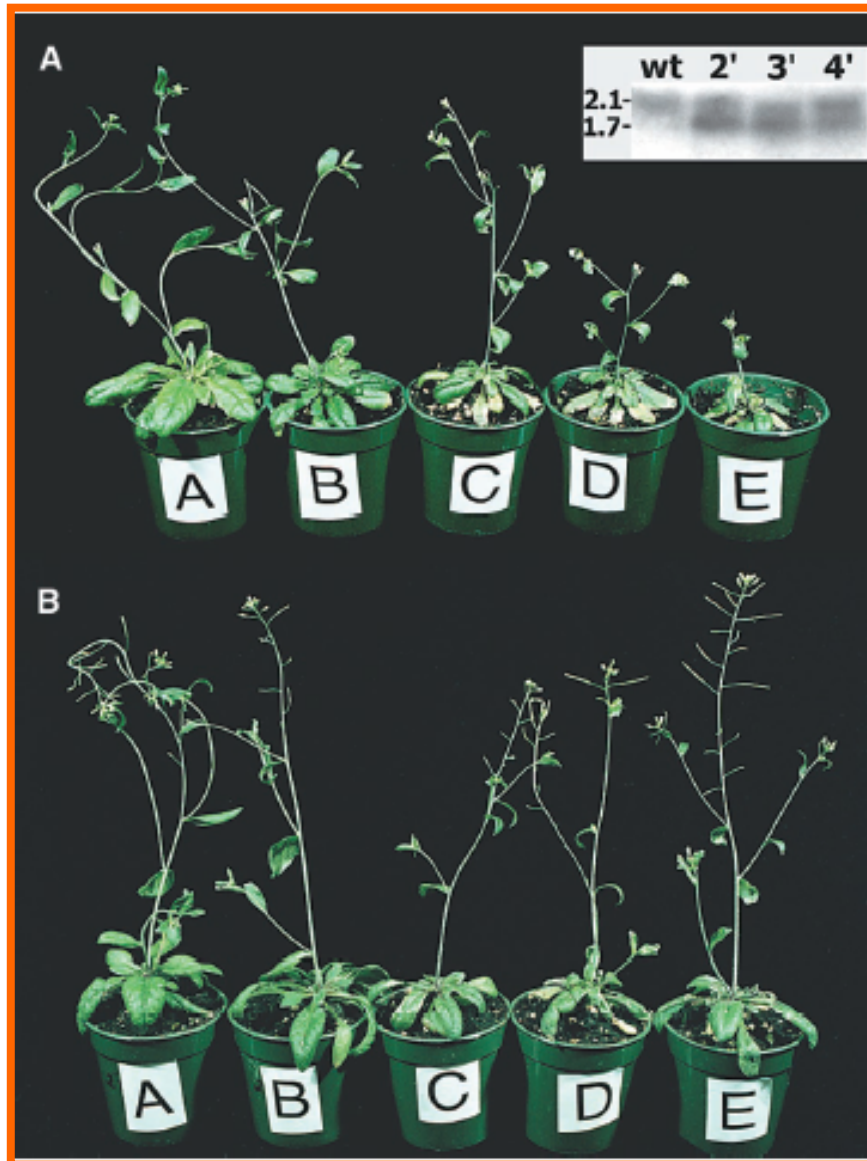
Aumentare la tolleranza allo stress idrico

Salt Tolerance Conferred by Overexpression of a Vacuolar Na^+/H^+ Antiport in *Arabidopsis*

Maris P. Apse,* Gilad S. Aharon,* Wayne A. Snedden,
Eduardo Blumwald†

Le piante accumulano Na^+ nel vacuolo

sovraespressione di AtNHX1 (antiporto Na^+/H^+ di *A. thaliana*)



WT

- A. controllo
- B. 50 mM NaCl
- C. 100 mM NaCl
- D. 150 mM NaCl
- E. 200 mM NaCl

transgeniche

Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit

Hong-Xia Zhang¹ and Eduardo Blumwald^{1,2*}

Il pomodoro è estremamente sensibile alla
concentrazione di sale nel suolo

La sovraespressione di AtNHX1 in piante di pomodoro
aumenta la tolleranza al sale e non altera le qualità del
frutto

WT



transgenici

Resistenza alle malattie

Batteri

Funghi

Virus



Virosi

Non esistono
trattamenti chimici



La varietà San Marzano è particolarmente sensibile
all'infezione virale.

Le perdite nel raccolto possono raggiungere il 100%

normale

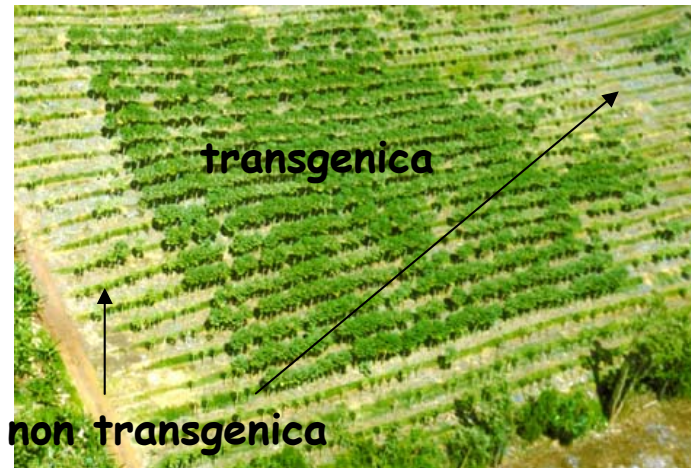
transgenico



PIANTE DI PAPAYA RESISTENTI AL PRSV (papaya ringspot virus)



Esprimono il gene codificante per la "coat protein" virale. La sovraespressione di tale gene silenzia l'espressione del gene virale impedendo la replicazione del virus



PIANTE DI PAPAYA RESISTENTI AL PRSV (papaya ringspot virus)

Code	Name	Type	Promoter, other	Terminator	Copies	Form
<i>nptII</i>	neomycin phosphotransferase II (<i>Escherichia coli</i>)	SM	nopaline synthase (<i>nos</i>) from <i>A. tumefaciens</i>	<i>A. tumefaciens</i> nopaline synthase (<i>nos</i>) 3'-untranslated region		Native
<i>gus</i>	beta-D-glucuronidase (<i>Escherichia coli</i>)	SM	CaMV 35S	<i>A. tumefaciens</i> nopaline synthase (<i>nos</i>) 3'-untranslated region		Native; not present in line 63-1
<i>prsv-cp</i>	viral coat protein (<i>papaya ringspot potyvirus</i> (PRSV))	VR	CaMV 35S	CaMV 35S		Native

MODIFICAZIONE DELLA COLORAZIONE DEL FIORE

- Obiettivi specifici perseguiti per le specie ornamentali sono stati la modifica del **colore dei fiori** (nuovi colori) e dell'**architettura della pianta** (portamento più compatto, maggiore fioritura)
- Il colore dei fiori è essenzialmente dovuto a **flavonoidi**, carotenoidi e betalaine.
I principali flavonoidi sono le **antocianine**, che producono colorazioni dal rosso al blu.
- Nuovi colori di garofani sono stati introdotti sul mercato dalla Florigene (Australia) a partire dal 1996. E' stato il primo caso al mondo.



Florigene Moondust™

COLORAZIONE DEI FIORI

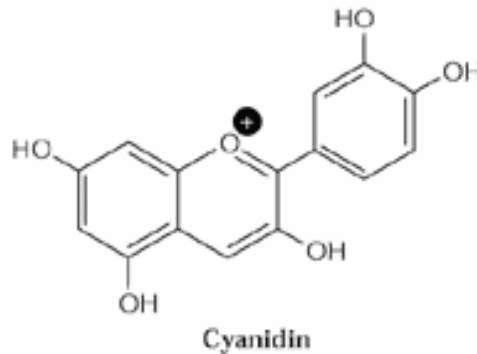
modificazione colore fiore

- carotenoidi dal giallo all'arancio
- flavonoidi dal giallo al rosso al blu

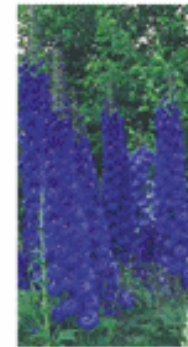
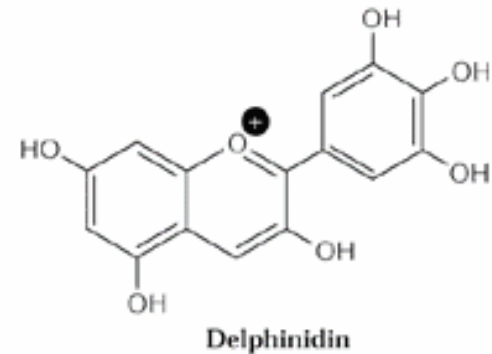
antocianine



Pelargonium
(Geranium)



Rosa
(Rose)



Delphinium
(Larkspur)

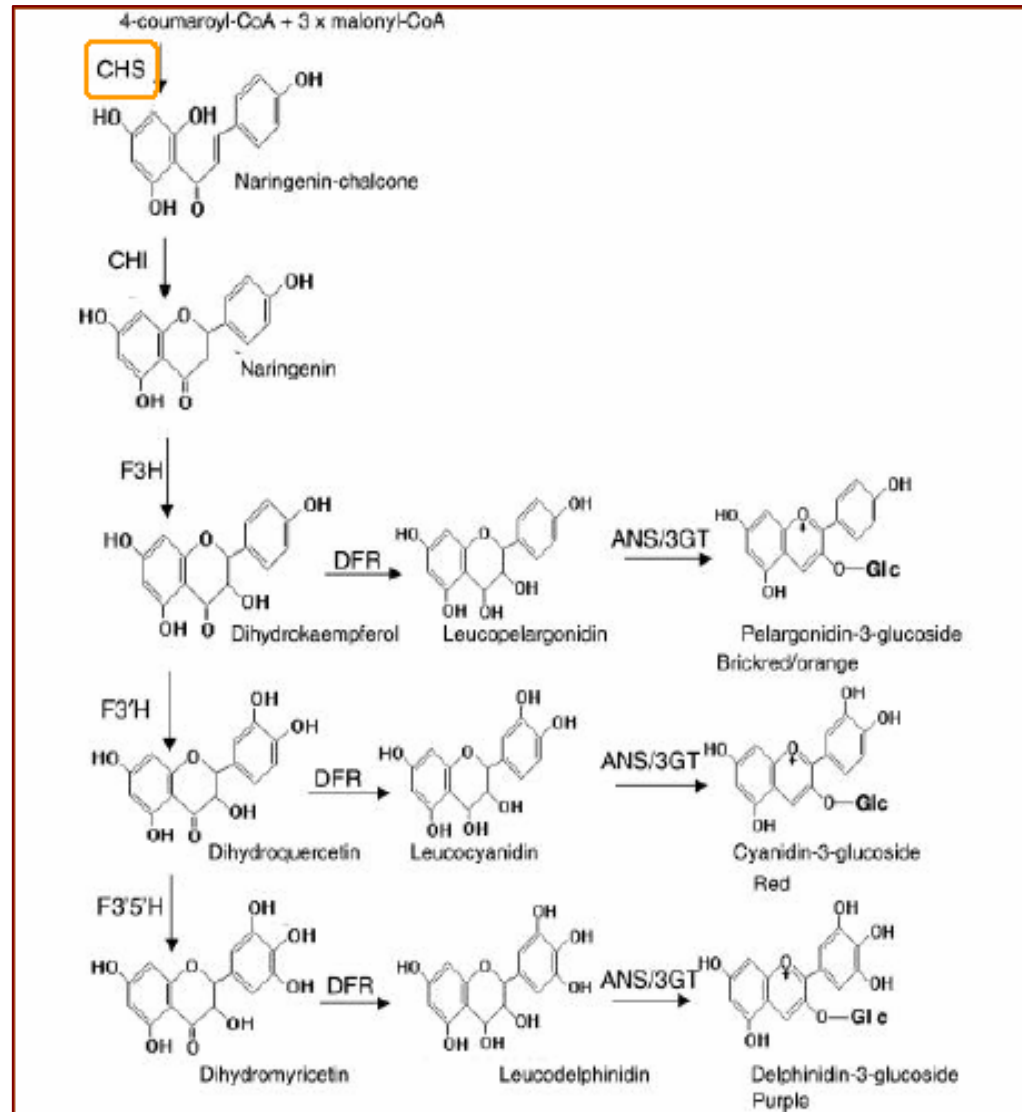
garofani, rose, gerbere, crisantemi e gigli non producono la delfinidina

VIE BIOSINTETICHE DELLE ANTOCIANINE

la Calcone Sintasi (CHS) è
l'enzima chiave

non tutte le piante hanno
tutti gli enzimi

F3H: flavanone-3-idrossilasi
F3'H: flavoide-3'-idrossilasi
F3'5'H: flavonoide-3'5'-idrossilasi
DFR: diidroflavonolo reduttasi
ANS: antocianidina sintasi
3GT: flavonoide 3-
glucosiltransferasi





GAROFANO

Dianthus caryophyllus

Introduzione di due geni di *Petunia hybrida* coinvolti nella sintesi dell'antocianina delfinidina nella cultivar "White Unesco", (mutazione nella DFR endogena → bianco)
colore lilla

Code	Name	Type	Promoter, other	Terminator	Copies	Form
surB	acetolactate synthase (<i>chlorsulfuron tolerant Nicotiana tabacum</i>)	HT	CaMV 35S	<i>surB</i> terminator from <i>N. tabacum</i>		
dfr	dihydroflavonol reductase (<i>Petunia hybrida</i>)	PM	<i>A. tumefaciens</i> constitutive mac-1 promoter	<i>A. tumefaciens mas</i> terminator		
hfl	flavonoid 3p, 5p hydroxylase (<i>Petunia hybrida</i>)	PM	petal specific CHS promoter derived from <i>Anthirrhinum majus</i> .	D8 terminator derived from <i>Petunia hybrida</i>		

Florigene Pty Ltd.
1997