

PRINCIPALI CRITICHE MOSSE AGLI OGM

- presenza del gene marcatore per la resistenza a un antibiotico



possibilità di sviluppo di microrganismi resistenti (flora intestinale)

- flusso genico - dispersione del transgene attraverso l'ibridazione

**GENERAZIONE DI PIANTE
TRANSGENICHE SENZA MARKER
DI RESISTENZA AD ANTIBIOTICI**

PERCHÉ?

- Opinione pubblica
- Antibiotici ed erbicidi rallentano la crescita e la rigenerazione della pianta
- Possibilità di inserire più geni in fasi successive senza dover usare marker diversi

- 1) Evitare completamente l'uso del gene marcatore
PCR per lo screening
- 2) Uso di geni marcatori che non hanno attività
biologiche potenzialmente "dannose"
- 3) Co-trasformazione di 2 costrutti: uno con il tratto
desiderato e l'altro con il marker seguita dalla
segregazione dei due
- 4) Rimozione del gene marcatore dopo selezione delle
piante trasformate

Uso di geni marcatori che non hanno attività biologiche potenzialmente "dannose"

SELEZIONE POSITIVA

"screenable markers"

Composti di selezione non tossici (aumento dell'efficienza di rigenerazione)

Le cellule trasformate acquisiscono un vantaggio metabolico o nello sviluppo

"screenable markers"

ESEMPI

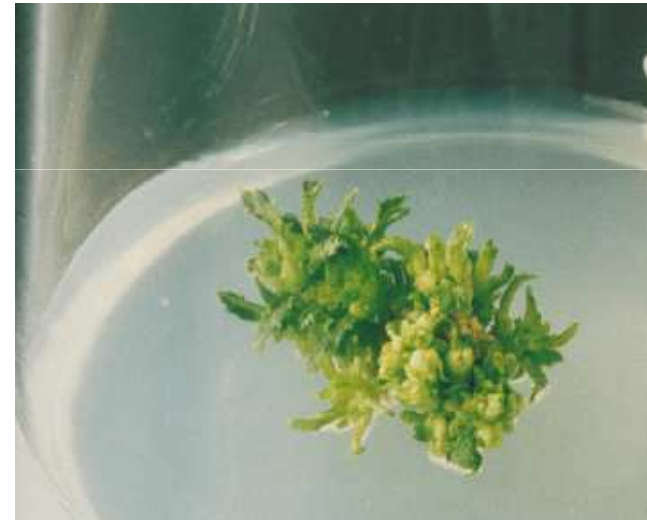
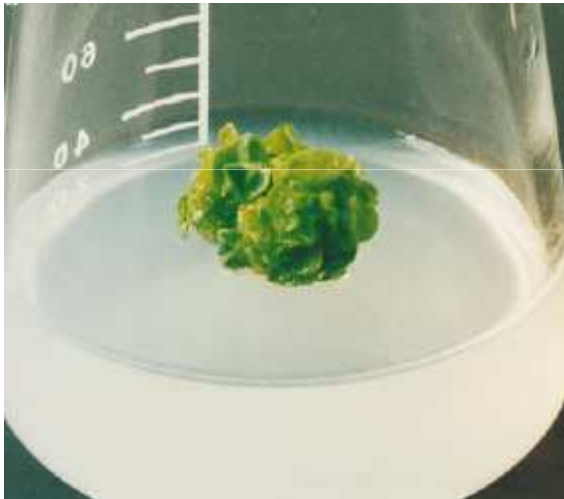
- **fosfomannosio isomerasi** (*pmi*) di E. coli:
capacità di crescere in terreno con mannosio come fonte di C

(Golden rice II)

- **xilosio isomerasi**: capacità di crescere in terreno con xilosio come fonte di C

ISOPENTENIL TRANSFERASI (*ipt*): i tessuti proliferano anche in assenza di citochinina

"Extreme shooty phenotype" perdita della dominanza apicale e assenza di radici



- non può essere usato con un promotore costitutivo
- promotore inducibile
 - rimozione del marker

COTRASFORMAZIONE

transgene e gene marcatore
separati



2 vettori binari
nello stesso ceppo
di *Agrobacterium*

2 ceppi di
Agrobacterium ognuno
con il proprio
costrutto
(Golden rice)

I trasformanti avranno il transgene di interesse e il gene
marcatore non associati

→ separazione mediante incrocio e segregazione

Svantaggi

- Non utilizzabile per piante propagate vegetativamente, né per specie con lunghi tempi di generazione (alberi)
- Bassa efficienza, solo una parte delle piante selezionate avrà acquisito anche il transgene per il tratto di interesse

RIMOZIONE DEL GENE MARCATORE

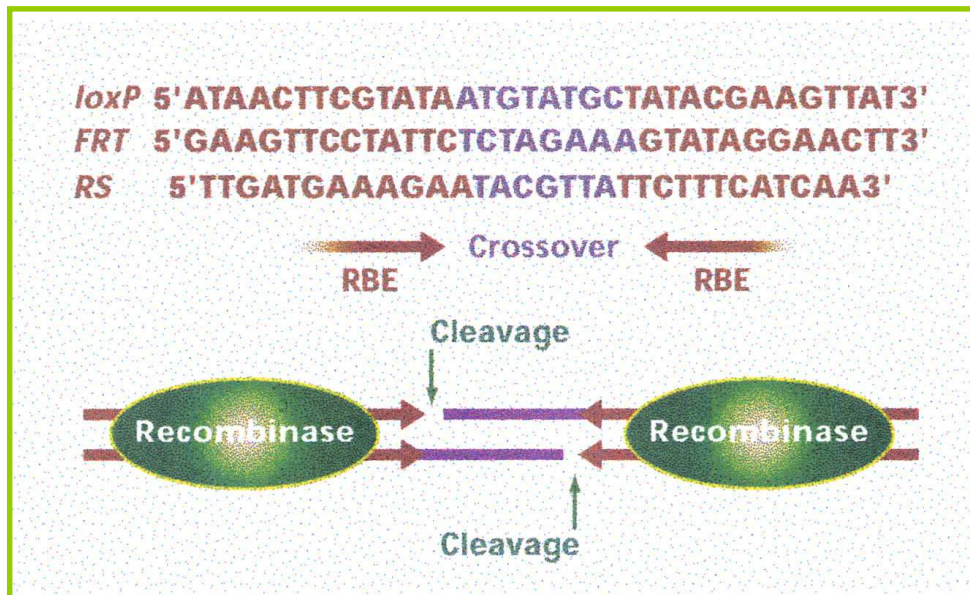
Il gene marcatore viene rimosso dopo aver effettuato la selezione delle piante trasformate

- ricombinazione sito-specifica
- trasposizione
- ricombinazione omologa

Ricombinazione sito-specifica

sistemi basati su ricombinasi microbiche

→ fiancheggiare il marker con sequenze riconosciute da ricombinasi



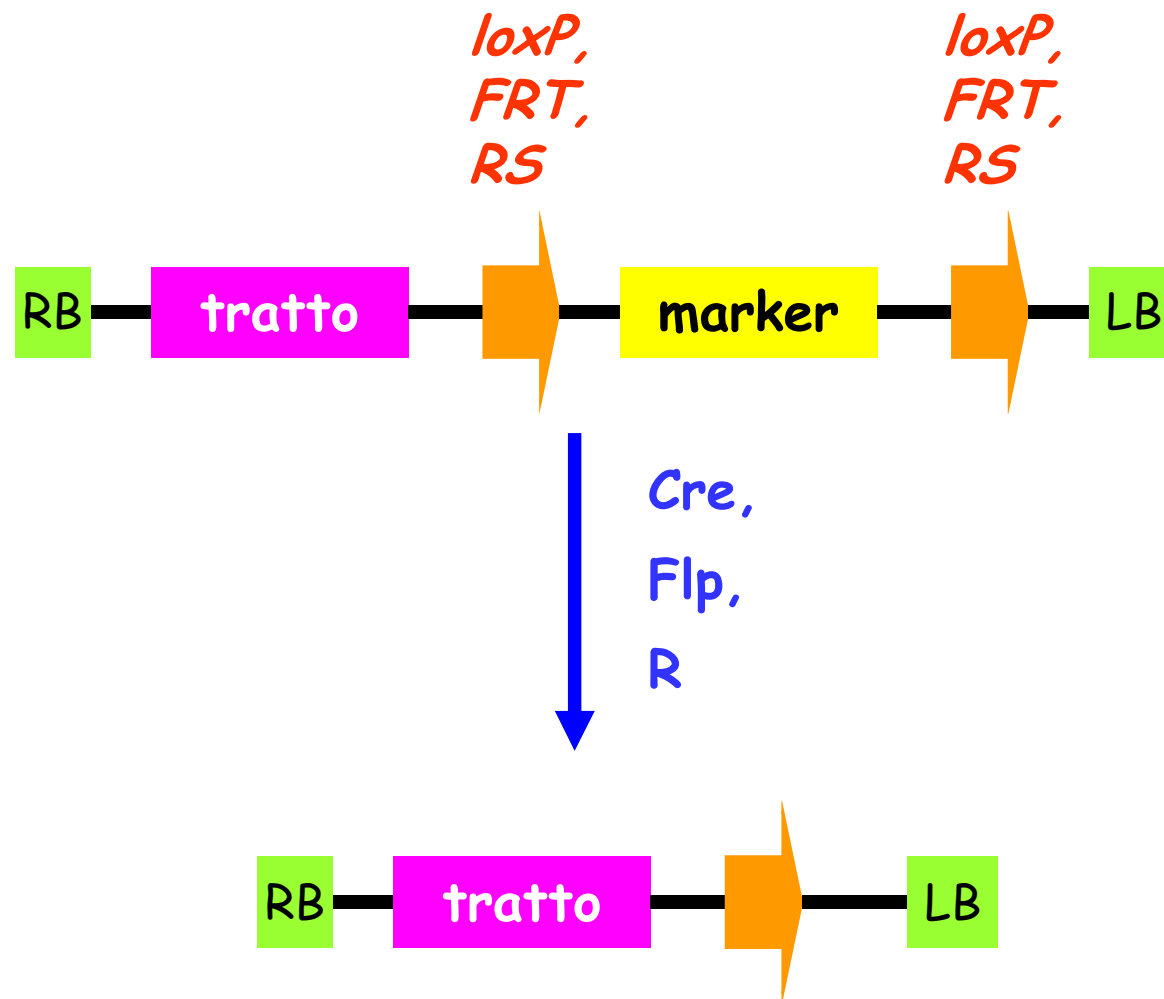
loxP - *Cre* batteriofago P1

FRT - *Flp* 2 μ *S. cerevisiae*

RS - *R* *Zygosaccharomyces rauxii*

le ricombinasi Cre, Flp e R non richiedono specifici fattori né modificazioni per funzionare in pianta

Ricombinazione sito-specifica



Come viene inserito il gene per la ricombinasi?

- **Trasformazione** della linea transgenica con il costrutto che esprime la ricombinasi
(svantaggio: necessità di introdurre un altro marker)
- **Incrocio** con una linea trasformata con il gene della ricombinasi

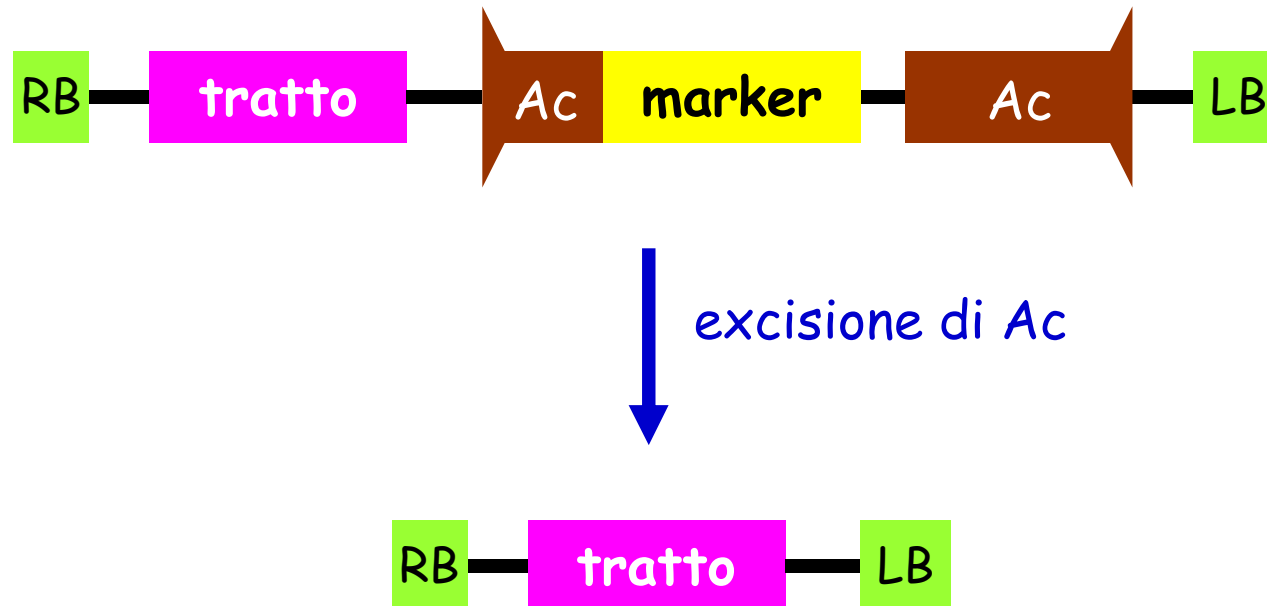
In entrambi i casi il gene del tratto desiderato e il gene della ricombinasi devono essere separati per segregazione

Svantaggi

- E' richiesto l'incrocio sessuale per la rimozione della ricombinasi → non si può usare con piante propagate vegetativamente
- L'esposizione prolungata alla ricombinasi microbica può portare a cambiamenti nel genoma

Trasposizione

Il gene marker è inserito su un elemento trasponibile



ESEMPIO

marker ipt su elemento
trasponibile

"extreme shooty phenotype"



Trasposizione

trasposizione



comparsa di germogli
"normali" da ESP



Svantaggi

- Efficienza molto bassa (il trasposone tende a re-integrarsi)
- Cicli successivi di excisioni e integrazioni possono indurre mutazioni in loci diversi
- Se il marker è associato all'elemento trasponibile non autonomo il gene per la trasposasi deve essere inserito (incrocio) e poi separato per segregazione

Ricombinasi e trasposasi

- **espressione transiente**: iniezione "in vitro" in protoplasti dell'mRNA
- **esposizione transiente della pianta ad Agrobacterium che esprime la ricombinasi**. La trascrizione di T-DNA non integrato sembra sufficiente per l'eliminazione del marker
- **fusione VirE2::Cre** - la ricombinasi viene trasportata da Agrobacterium nella cellula vegetale indipendentemente dal T-DNA

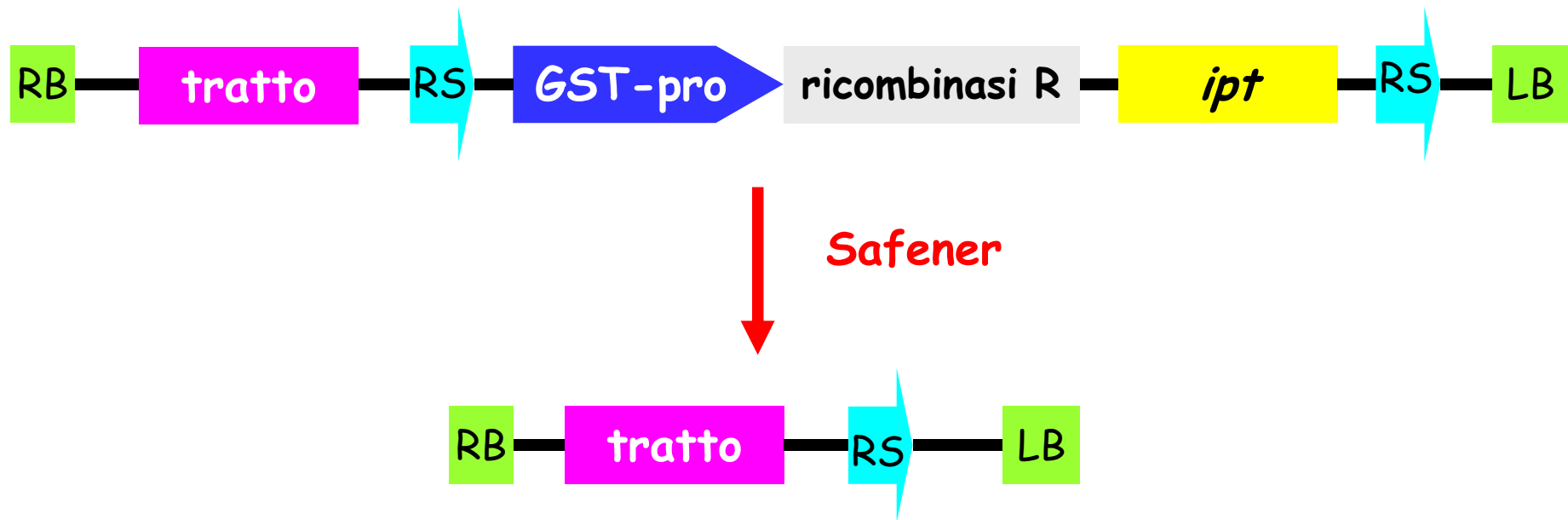
la ricombinasi non può essere
costitutivamente espressa

utilizzo di promotori inducibili chimicamente

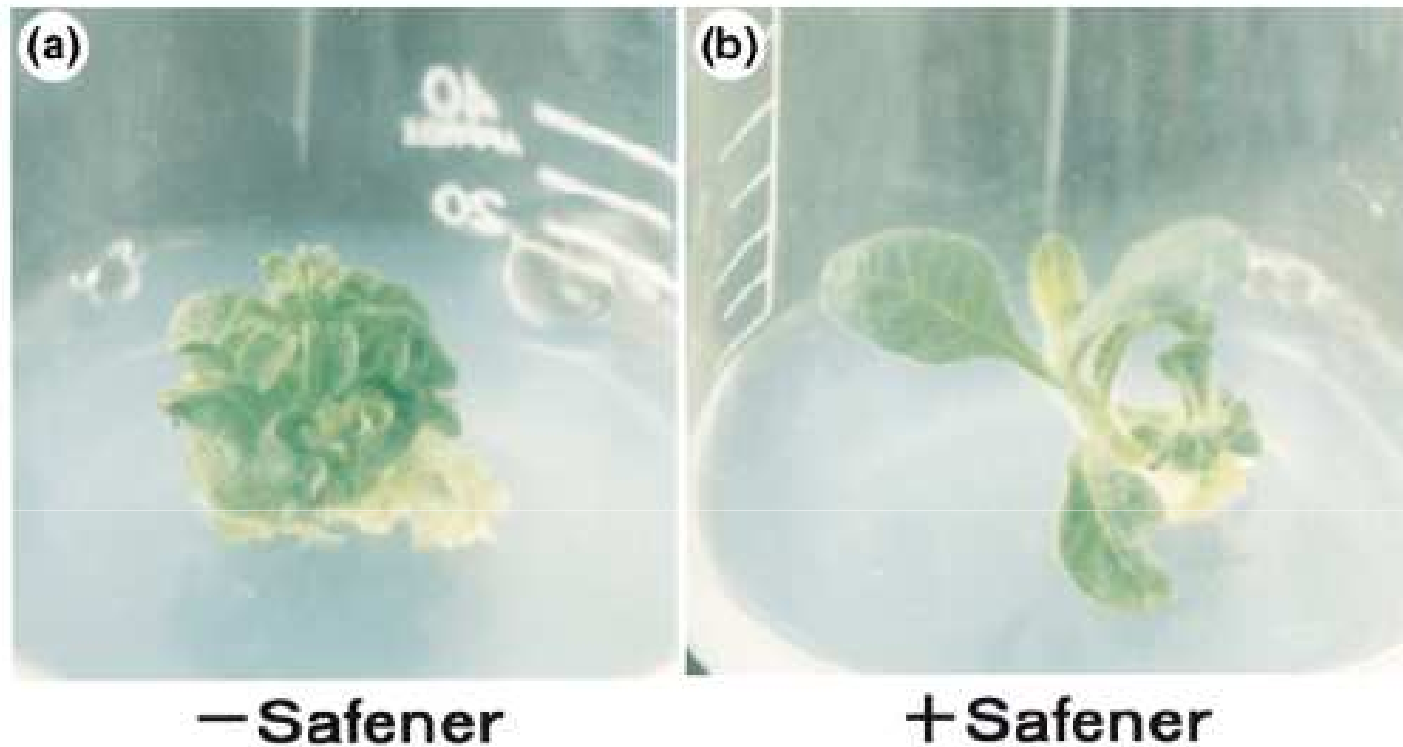
sistema del vettore *MAT*

(multiautotransformation)

ESEMPIO

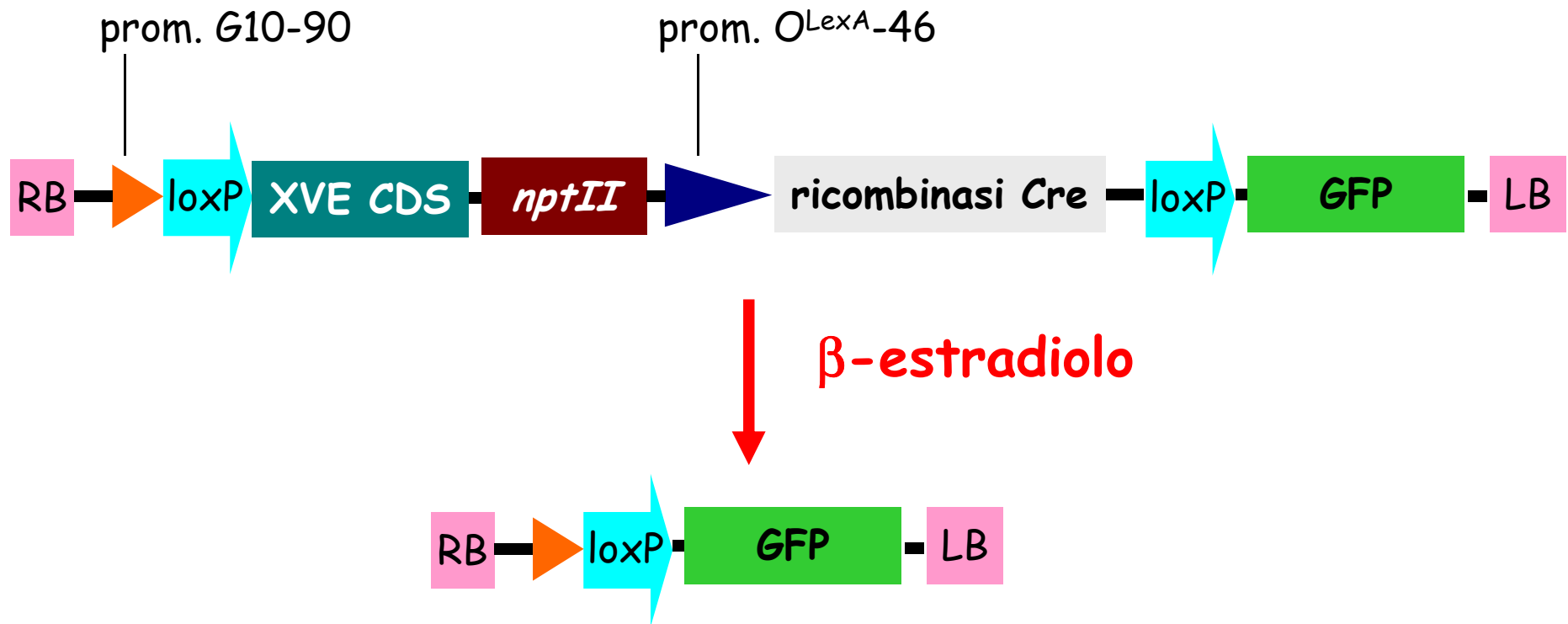


il promotore *GST* è inducibile da erbicidi Safener



in assenza di induttore, l'espressione del gene IPT determina un fenotipo extreme shooty; in presenza di induttore, l'espressione della ricombinasi determina la rimozione del marker IPT e quindi un fenotipo normale

ESEMPIO



il promotore costitutivo G10-90 determina l'espressione della GFP

sistema del vettore *MAT*

Vantaggi

- la rimozione del marker e della ricombinasi non richiede incrocio e segregazione
- l'esposizione all'azione della ricombinasi è breve

PRINCIPALI CRITICHE MOSSE AGLI OGM

- presenza del gene marcatore per la resistenza a un antibiotico



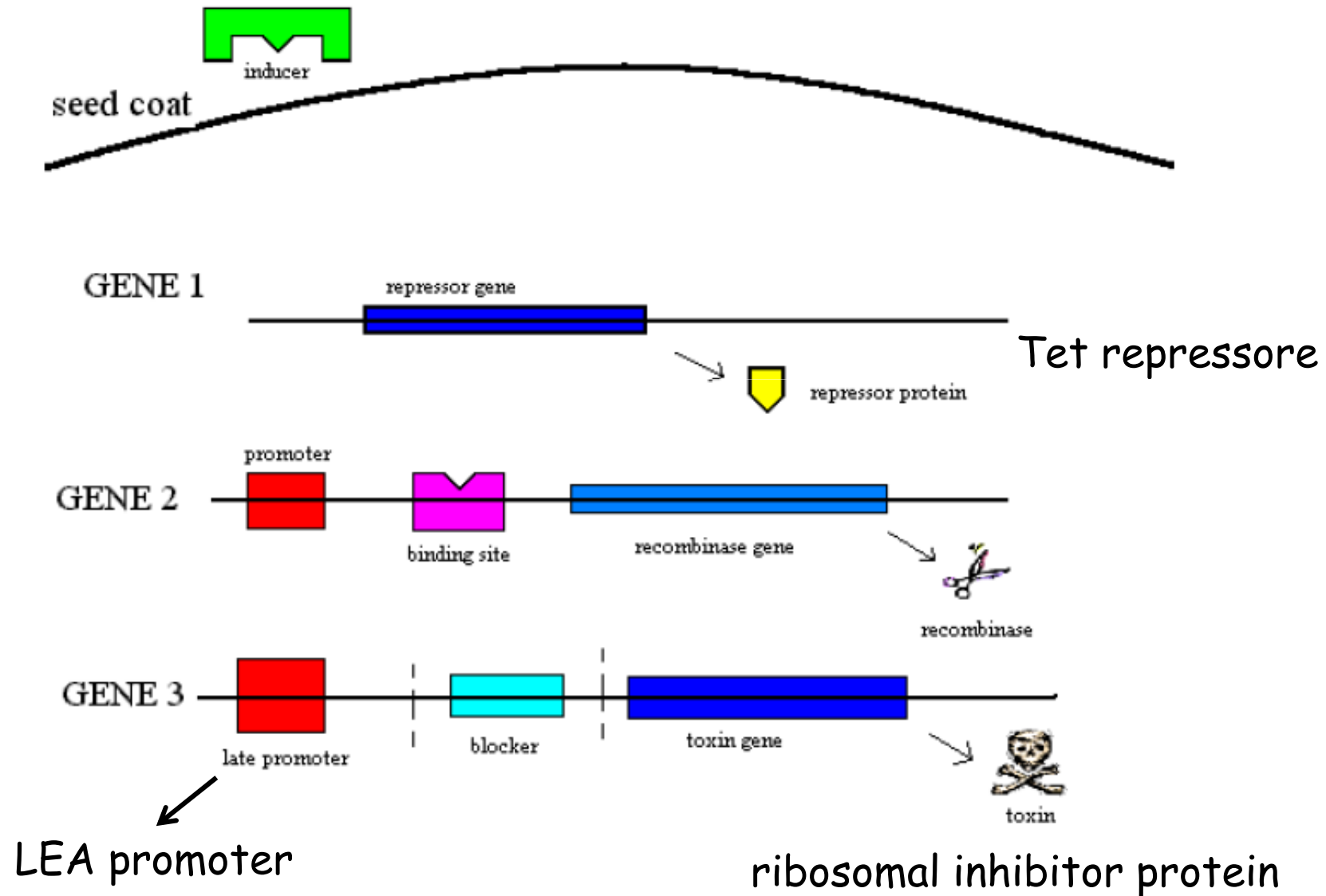
possibilità di sviluppo di
microrganismi resistenti
(flora intestinale)

- flusso genico - dispersione del transgene attraverso l'ibridazione

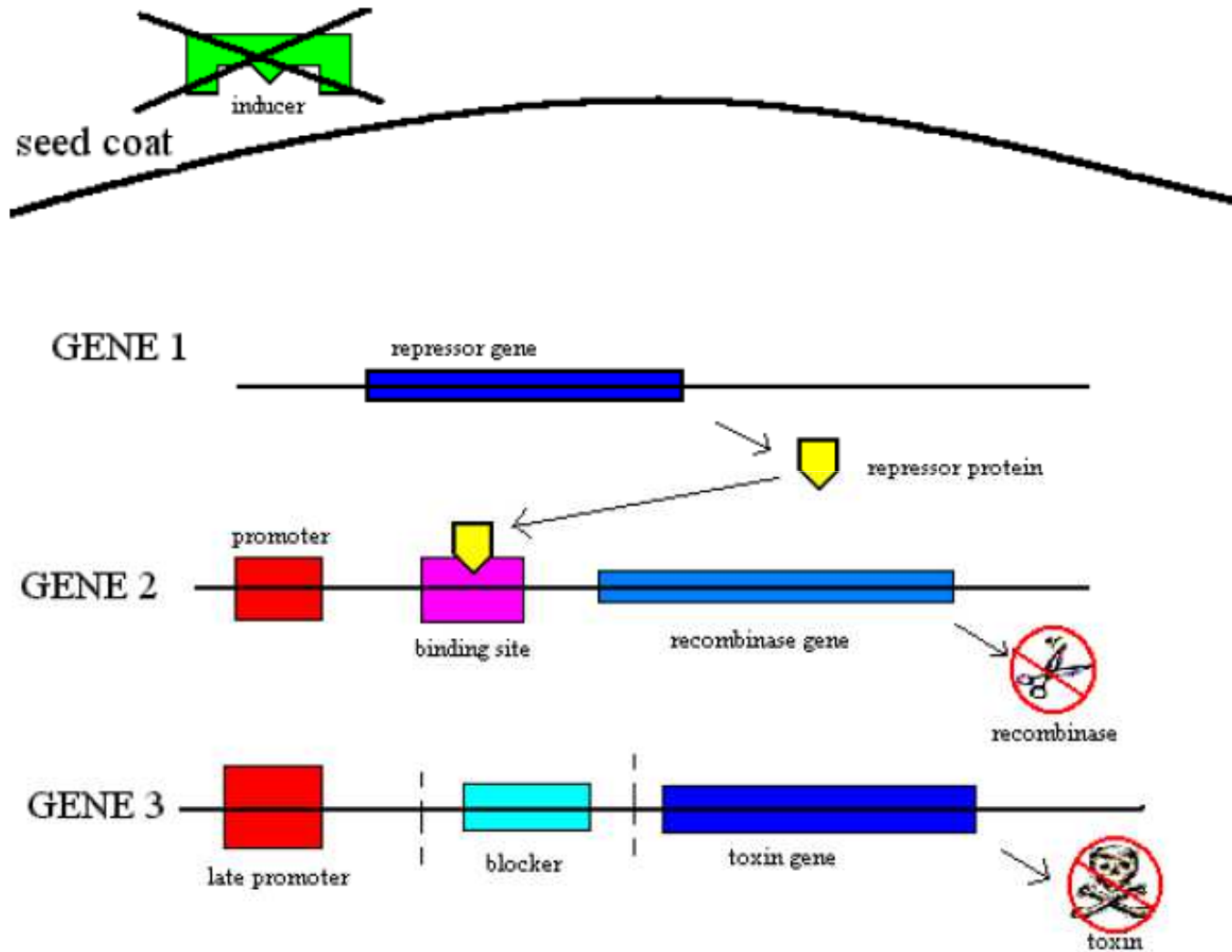
TECNICHE PER IL CONTENIMENTO GENICO

- Sterilità maschile non si sviluppa il polline
- Terminator semi sterili (inducibile)
- Apomissia produzione di semi senza fecondazione
- Trasformazione cloroplasti

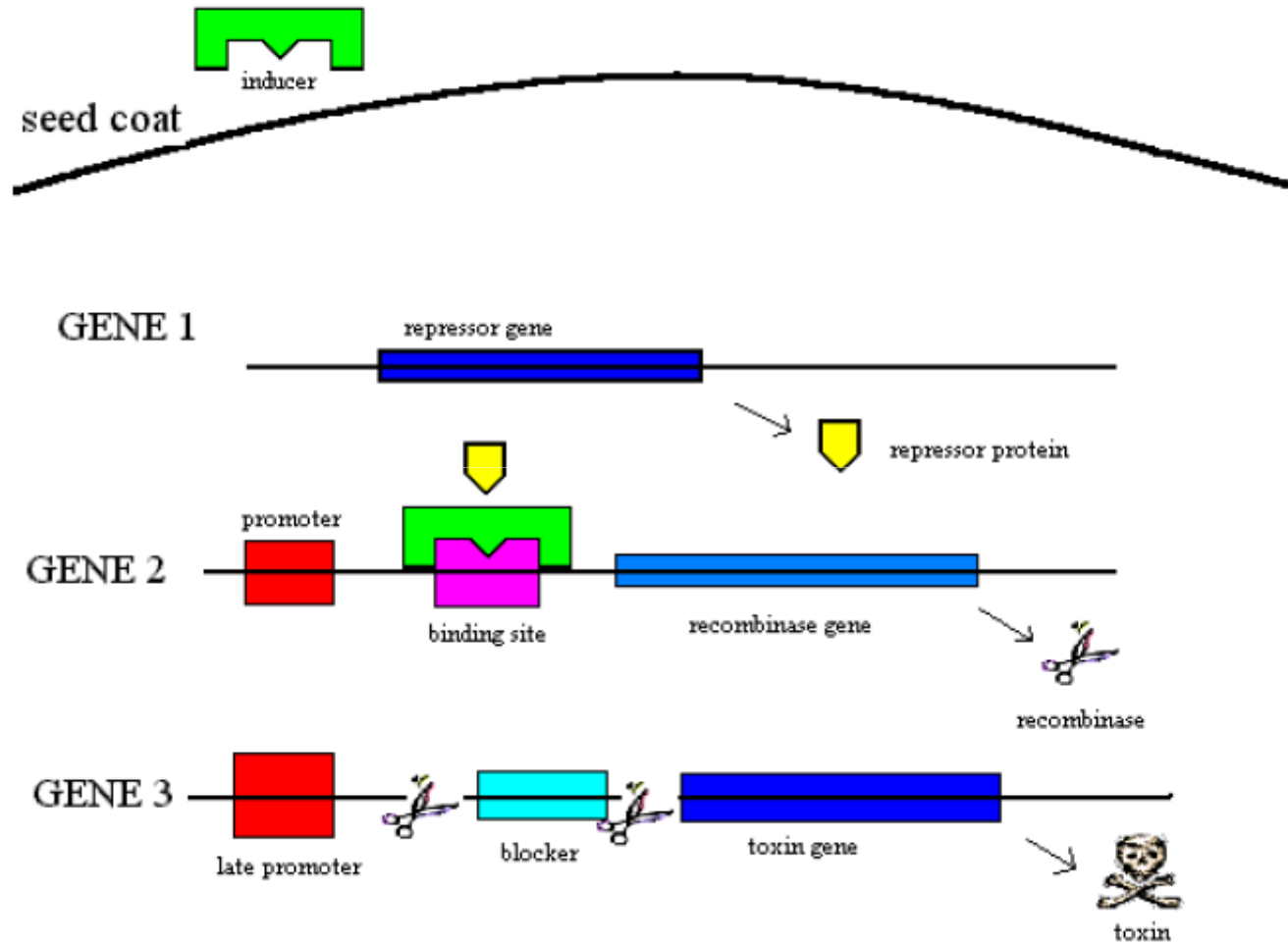
TERMINATOR TECHNOLOGY



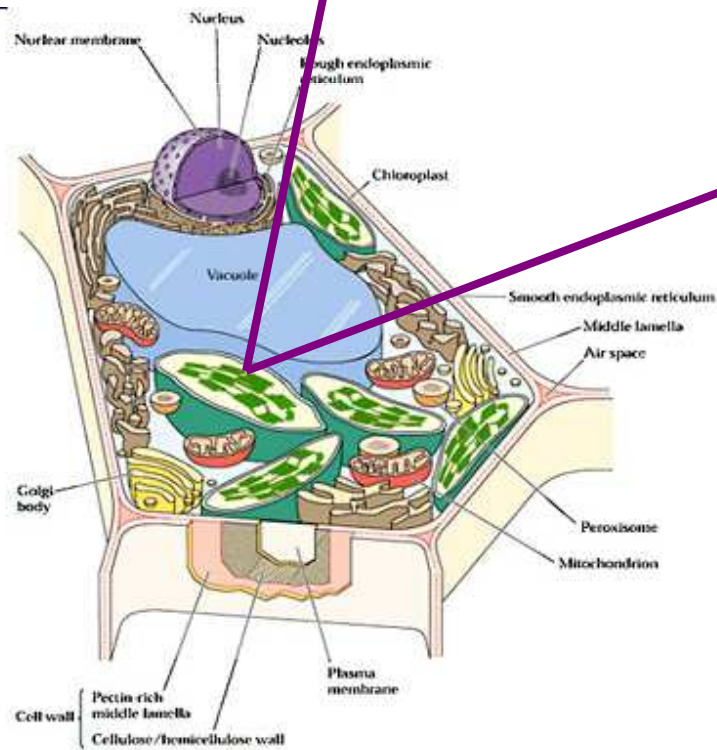
TERMINATOR TECHNOLOGY



TERMINATOR TECHNOLOGY



TRASFORMAZIONE DEI CLOROPLASTI



I cloroplasti si trasmettono per eredità materna



NON SONO PRESENTI NEL POLLINE

ALTRI VANTAGGI

Elevati livelli di espressione

plastoma: 120-180 kb altamente poliploide



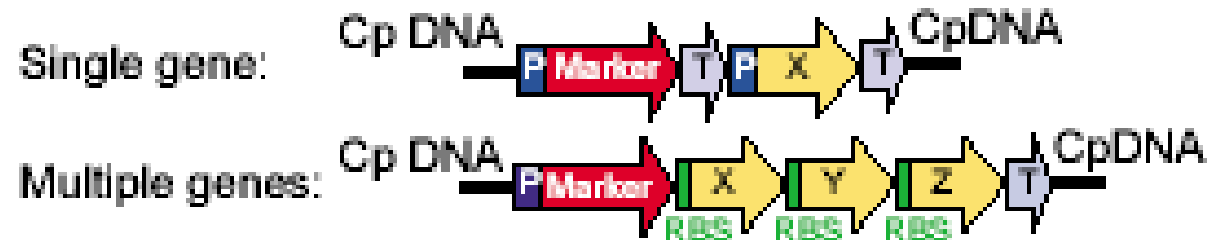
1000 - 10000 copie
genomiche per cellula

Nei cloroplasti si formano i ponti disolfuro



produzione di proteine di interesse farmaceutico

Chloroplast
transformation
vectors

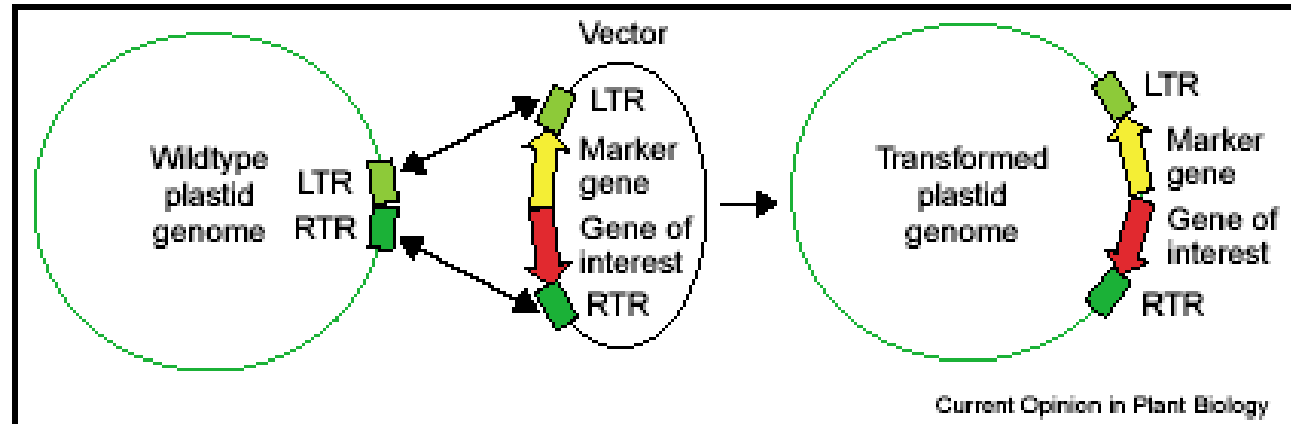


E' possibile inserire più geni in un unico operone sotto il controllo dello stesso promotore

Ricombinazione
omologa



Non si ha "effetto
di posizione"



Si utilizzano vettori che permettono l'inserimento del costrutto in regioni intergeniche in modo da non alterare l'espressione dei geni endogeni

Si possono usare anche vettori shuttle per il mantenimento episomiale

Poco usati: la pianta deve essere sempre mantenuta in condizioni selettive per evitare la perdita del plasmide

Tecniche di trasformazione

- sistema biolistico
- trattamento con PEG

Marker di selezione

aadA - amminoglicoside 3-adeniltransferasi

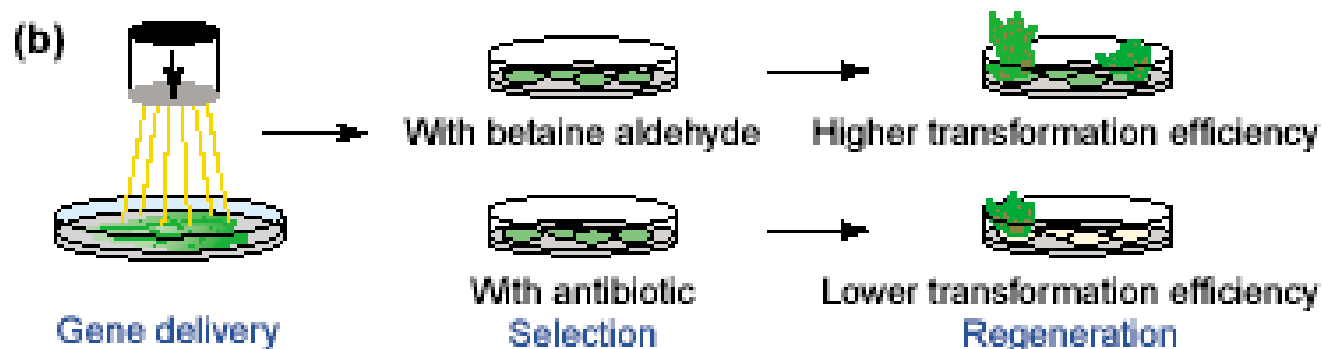
conferisce resistenza alla Streptomicina/Spectomicina

Selezione positiva

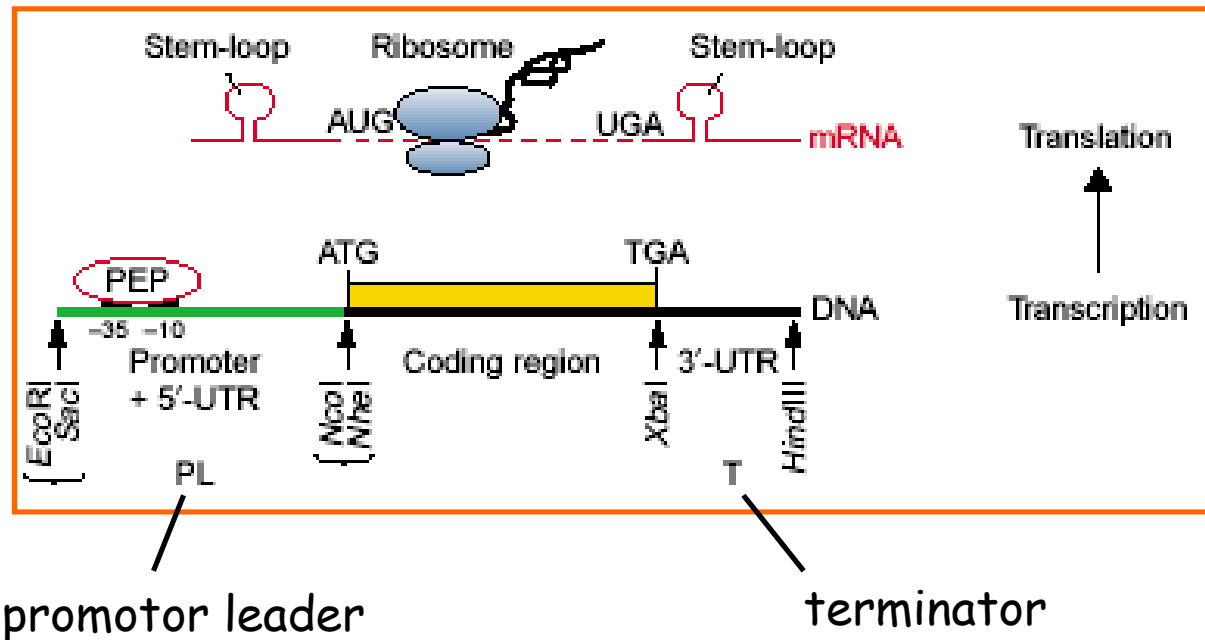
BADH betaina aldeide deidrogenasi

espressa nelle piante adattate a crescere in condizioni di stress idrico-salino

conferisce resistenza alla betaina-aldeide



Cassetta di espressione



PEP: Plastid-encoded plastid RNA polymerase

Il promotore generalmente usato è
prrrn = promotore dell'operone rRNA plastidico

5'-UTR contiene una struttura stem-loop e sequenze che facilitano il caricamento dell'mRNA sui ribosomi
I livelli di espressioni sono influenzati dalla 5'-UTR

trasformazione cloroplasti

Table 2. Accumulation of recombinant proteins in chloroplasts

Protein	TSP concentration	Plasmid	Promoter ^a	5'-UTR ^b	N-terminal fusion	Coding region	3'-UTR ^b	Ref.
GUS	2.5%	pJS80	<i>PpsbA</i>	<i>psbA</i>	–	<i>uidA</i>	<i>psbA</i>	[66]
NPTII	1.0%	pTNH32	<i>Prrn</i>	<i>rbcL</i>	<i>rbcL</i> ; 5AA	<i>neo</i>	<i>psbA</i>	[21]
NPTII	2.5%	pHK31	<i>Prrn</i>	<i>atp B</i>	–	<i>neo</i>	<i>rbcL</i> (1)	[69]
NPTII	7.0%	pHK30	<i>Prrn</i> (1)	<i>atp B</i>	<i>atp B</i> ; 14AA	<i>neo</i>	<i>rbcL</i> (1)	[22]
NPTII	4.0%	pHK60	<i>Prrn</i>	<i>atp B</i>	<i>atp B</i> ; 14AA ^c	<i>neo</i>	<i>rbcL</i> (1)	[22]
NPTII	4.7%	pHK35	<i>Prrn</i>	<i>rbcL</i>	–	<i>neo</i>	<i>rbcL</i> (1)	[69]
NPTII	10.8%	pHK34	<i>Prrn</i> (2)	<i>rbcL</i>	<i>rbcL</i> ; 14AA	<i>neo</i>	<i>rbcL</i> (1)	[22]
NPTII	0.31%	pHK64	<i>Prrn</i>	<i>rbcL</i>	<i>rbcL</i> ; 14AA ^c	<i>neo</i>	<i>rbcL</i> (1)	[22]
NPTII	23.0%	pHK40	<i>Prrn</i>	<i>T7 g10</i>	–	<i>neo</i>	<i>rbcL</i> (1)	[23]
NPTII	16.4%	pHK38	<i>Prrn</i>	<i>T7 g10</i>	<i>T7 g10</i> ; 14AA	<i>neo</i>	<i>rbcL</i> (1)	[23]
NPTII	0.16%	pHK39	<i>Prrn</i>	<i>T7 g10</i>	synthetic	<i>neo</i>	<i>rbcL</i> (1)	[23]
TetC	25.0%	pJST10	<i>Prrn</i>	<i>T7 g10</i>	–	<i>tetC-AT</i>	<i>rbcL</i> (1)	[38]
TetC	10.0%	pJST11	<i>Prrn</i>	<i>atpB</i>	–	<i>tetC-GC</i>	<i>rbcL</i> (1)	[38]
TetC	10.0%	pJST12	<i>Prrn</i>	<i>T7 g10</i>	–	<i>tetC-AT</i>	<i>rbcL</i> (1)	[38]
EPSPS	0.001%	PMON30123	<i>Prrn</i>	<i>rbcL</i>	–	CP4bact	<i>rps16</i> (2)	[31]
EPSPS	0.002%	PMON30130	<i>Prrn</i>	<i>rbcL</i>	–	CP4synt	<i>rps16</i> (2)	[31]
EPSPS	0.2%	PMON38773	<i>Prrn</i>	<i>T7 g10</i>	–	CP4bact	<i>rps16</i> (2)	[31]
EPSPS	0.3%	PMON38798	<i>Prrn</i>	<i>T7 g10</i>	–	CP4synt	<i>rps16</i> (2)	[31]
EPSPS	> 10.0%	PMON45259	<i>Prrn</i>	<i>T7 g10</i>	GFP; 14AA	CP4synt	<i>rps16</i> (2)	[31]
GFP	5.0%	PMON30125	<i>Prrn</i> (3)	<i>rbcL</i>	–	<i>gfp</i>	<i>rps16</i> (2)	[55]
GFP	5.0%	MR220	<i>Prrn</i> (3)	<i>rbcL</i>	–	<i>gfp</i>	<i>rps16</i> (2)	[46]
AAD-GFP	8.0%	pMSK56	<i>Prrn</i> (1)	<i>atp B</i>	<i>atp B</i> ; 14AA	<i>aadA-gfp</i>	<i>psbA</i>	[59]
AAD-GFP	18.0%	pMSK57	<i>Prrn</i> (2)	<i>rbcL</i>	<i>rbcL</i> ; 14AA	<i>aadA-gfp</i>	<i>psbA</i>	[59]
Ubiquitin-somato tropin	7.0%	PMON38794	<i>Prrn</i>	<i>T7 g10</i>	–		<i>rps16</i> (2)	[41]
PAT	> 7.0%	pKO3	<i>Prrn</i> (1)	<i>atpB</i>	<i>atp B</i> ; 14AA	<i>s-bar</i>	<i>rbcL</i> (1)	[45]
PAT	> 7.0%	pKO18	<i>Prrn</i> (1)	<i>atpB</i>	<i>atp B</i> ; 14AA	<i>b-bar2</i>	<i>rbcL</i> (1)	[45]
Cry1Ac	5.0%	pZS224	<i>Prrn</i> (3)	<i>rbcL</i>	–	<i>cry1A(c)</i>	<i>rps16</i> (2)	[36]
Cry2Aa2	3.0%	pZS-KM-cry2A		Bt	–	<i>cry2Aa2</i>	?	[70]
Cry2Aa2, 20-kDa; 29 kDa; CTB	45.3%	pLD-BD Cry2Aa2	2x- <i>Prrn</i>	Bt	–	<i>orf1-orf2-cry2Aa2</i>	<i>psbA</i>	[63]
	4.1%	pLD-LH-CTB	2x- <i>Prrn</i>	synthetic	–	<i>ctxB</i>	<i>psbA</i>	[71]

Table 2. Foreign gene expression in chloroplasts of higher plants^a

Genes and use	Gene products and use	Refs
Selectable markers and reporters		
<i>aadA</i>	Aminoglycoside-3'-adenylyltransferase	[14]
<i>nptII</i>	Neomycin phosphotransferase	[52]
<i>codA</i>	Cytosine deaminase	[53]
<i>BADH</i>	Betaine aldehyde dehydrogenase	[4]
<i>uidA</i>	β -glucuronidase	[12]
<i>cat</i>	Chloramphenicol acetyl transferase	[9,11]
<i>gfp</i>	Green fluorescent protein	[24,54]
<i>aadA:gfp</i>	Selectable or screenable fusion protein	[47]
Plant traits: herbicide resistance		
<i>aroA</i>	Glyphosate resistance	[2,19]
<i>bar</i>	Bialaphos resistance	[18,20]
Insect resistance		
<i>Cry1Ac</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt) toxin	[15]
<i>Cry2Aa2</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt) toxin	[16]
<i>Cry2Aa2</i> operon	<i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt) toxin	[3]
Pathogen resistance		
<i>msi-99</i>	Bacterial, fungal resistance	[17]
Drought or salt tolerance		
<i>tps1</i>	Trehalose phosphate synthase	[8]
<i>BADH</i>	Betaine aldehyde dehydrogenase	[4]
Amino acid biosynthesis		
<i>EPSPS</i>	5-enol-pyruvyl shikimate-3-phosphate synthase	[2,19]
<i>ASA2</i>	Anthranilate synthase (AS) α -subunit	[55]
Phytoremediation		
<i>merA</i>	Mercuric ion reductase	^b
<i>merB</i>	Organomercurial lyase	^b
Non-plant traits: biopharmaceuticals		
<i>hST</i>	Human somatotropin	[7]
<i>HSA</i>	Human serum albumin	^c
<i>msi 99</i>	Anticancer, lytic antibiotic	[17]
<i>proinsulin</i>	Human insulin α , β chains	^d
<i>IFN α 5</i>	Human interferon α 5	^e
Monoclonals		
<i>Guy's 13</i>	For dental caries against <i>Streptococcus mutans</i>	^c
Biomedical polymer		
<i>gvgvp-120</i>	Bioelastic protein-based polymer	[21]
Edible vaccines		
<i>ctxB</i>	Cholera toxin β -subunit	[6]

Proteine di interesse farmaceutico e vaccini espressi in cloroplasti

Therapeutic proteins	Gene	Site of integration	Promoter	5'/3' regulatory elements	% tsp expression	Lab
Elastin derived polymer	EG121	<i>rrnL/rrnA</i>	Prrn	T7gene10/ <i>TpsbA</i>	ND	Daniell
Human somatotropin	<i>hST</i>	<i>rrnV/rps12/7</i>	Prrn ^a , <i>PpsbA</i> ^b	T7gene10 ^a or <i>psbA</i> ^b / <i>Trps16</i>	7.0% ^a and 1.0% ^b	Monsanto
Cholera toxin	<i>CtxB</i>	<i>rrnL/rrnA</i>	Prrn	Ggagg/ <i>TpsbA</i>	4.1%	Daniell
Antimicrobial peptide	MSI-99	<i>rrnL/rrnA</i>	Prrn	Ggagg/ <i>TpsbA</i>	21.5%	Daniell
Insulin like growth factor	IGF-1	<i>rrnL/rrnA</i>	Prrn	<i>PpsbA/TpsbA</i>	33%	Daniell
Interferon alpha 5	INFα5	<i>rrnL/rrnA</i>	Prrn	<i>PpsbA/TpsbA</i>	ND	Daniell
Interferon alpha 2b	INFα2B	<i>rrnL/rrnA</i>	Prrn	<i>PpsbA/TpsbA</i>	19%	Daniell
Tetanus toxin	<i>TetC</i> (bacterial and synthetic)	<i>rrnV/rps12/7</i>	Prrn	T7 gene 10 ^a , <i>atpB</i> ^b / <i>TrbcL</i>	25% ^a , 10% ^b	Maliga
Human serum albumin	<i>hsa</i>	<i>rrnL/rrnA</i>	Prrn ^a , <i>PpsbA</i> ^b	ggagg ^a , <i>psbA</i> ^b / <i>TpsbA</i>	0.02% ^a , 11.1% ^b	Daniell
Interferon gamma	<i>IFN-γ</i>	<i>rbcl/accD</i>	<i>PpsbA</i>	<i>PpsbA/TpsbA</i>	6%	Reddy
Monoclonal antibodies	Guy's 13	<i>rrnL/rrnA</i>	Prrn	Ggagg/ <i>TpsbA</i>	ND	Daniell
Anthrax protective antigen	<i>Pag</i>	<i>rrnL/rrnA</i>	Prrn	<i>PpsbA/TpsbA</i>	18.1%	Daniell
Plague vaccine	CaF1~LcrV	<i>rrnL/rrnA</i>	Prrn	<i>PpsbA/TpsbA</i>	14.8%	Daniell
Canine Parvovirus (CPV)	CTB-2L21/ GFP-2L21	<i>rrnL/rrnA</i>	Prrn	<i>PpsbA/TpsbA</i>	31.1%, 22.6%	Daniell/Veramendi

ANALISI QUALITATIVA E QUANTITATIVA DEGLI OGM

Analisi qualitativa

verificare la presenza o meno di OGM

Analisi quantitativa

determinare "quanto" OGM c'è



test OGM

Negativo

*Rilevazione
OGM*

Positivo

Autorizzato?

No

Illegale

Sì

*Identificazione
OGM*

Analisi dei
singoli
ingredienti

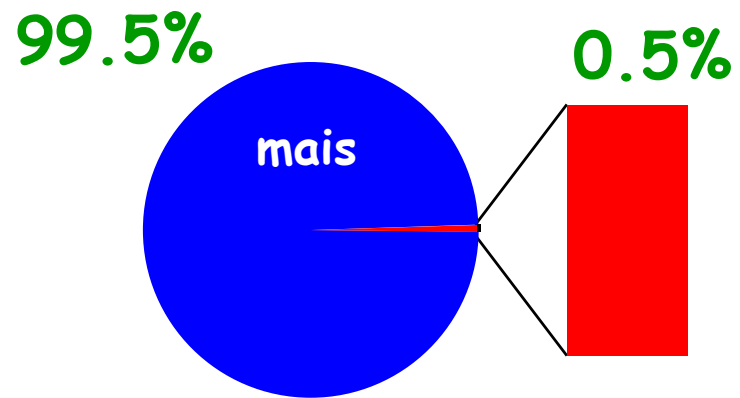
Etichettatura non necessaria

Meno dello 0.9%

Etichettatura

Più dello 0.9%

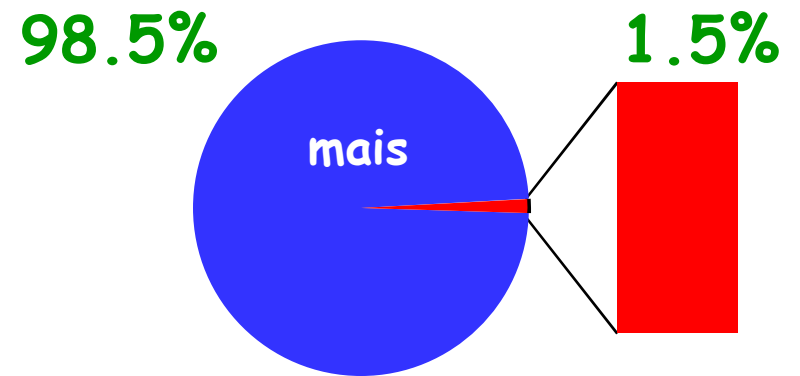
Quantificazione OGM



■ mais
■ mais GM



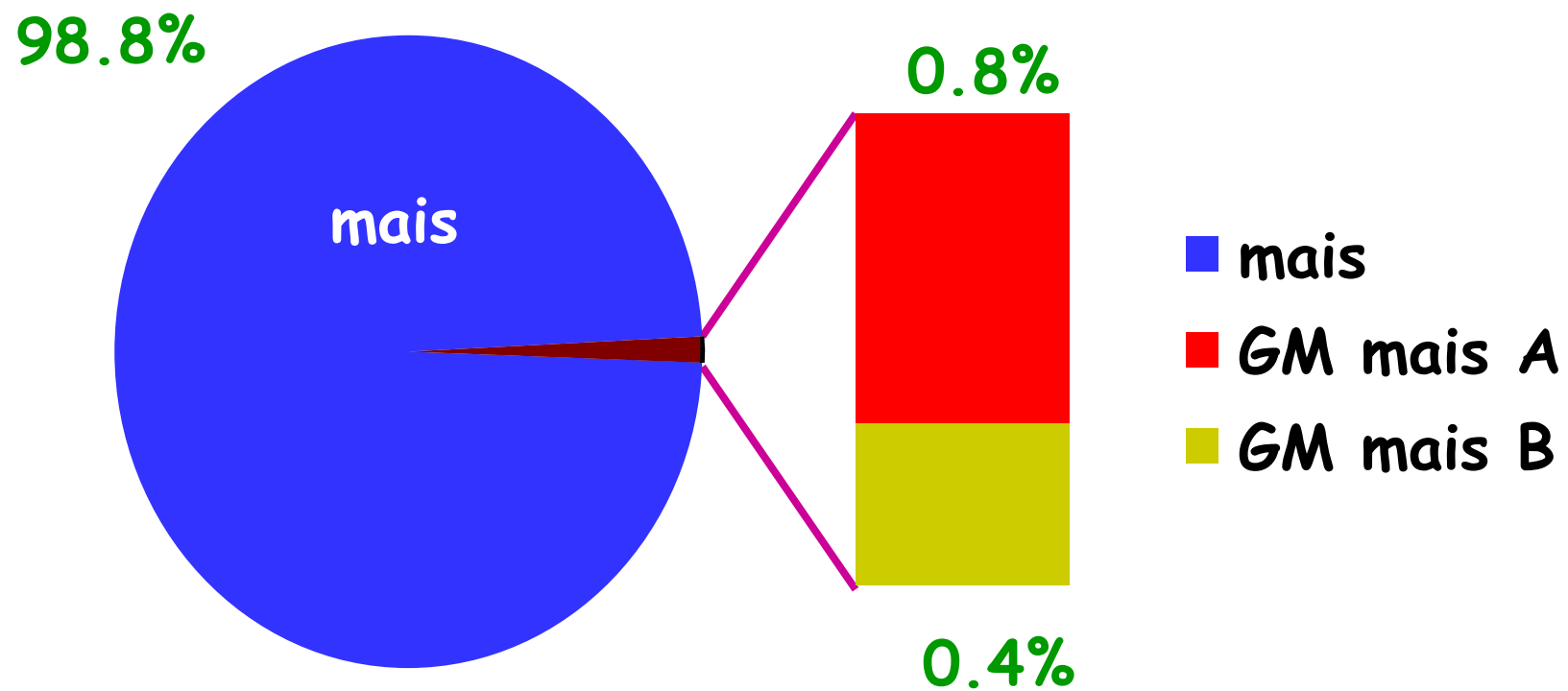
etichettatura
non richiesta



■ mais
■ mais GM



etichettatura
richiesta



etichettatura
richiesta

Strategie per l'identificazione di OGM

- metodi basati sulla determinazione della proteina
 - Western Blot
 - ELISA
- metodi basati sulla determinazione del DNA
 - Southern Blot
 - PCR qualitativa
 - PCR quantitativa

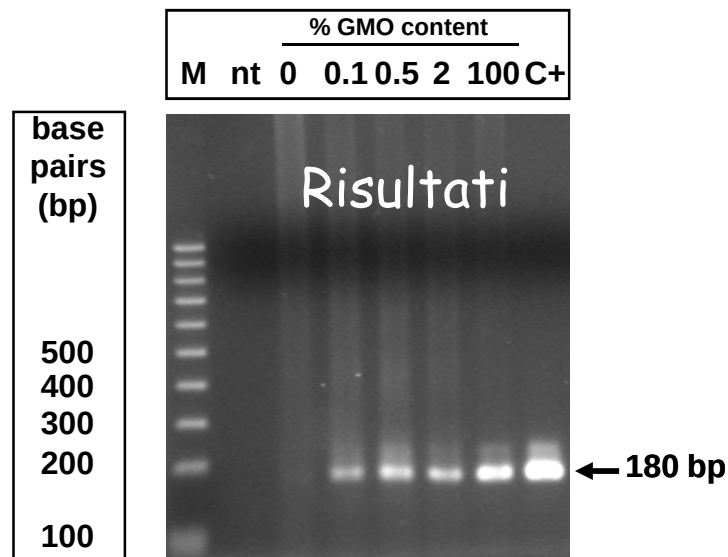
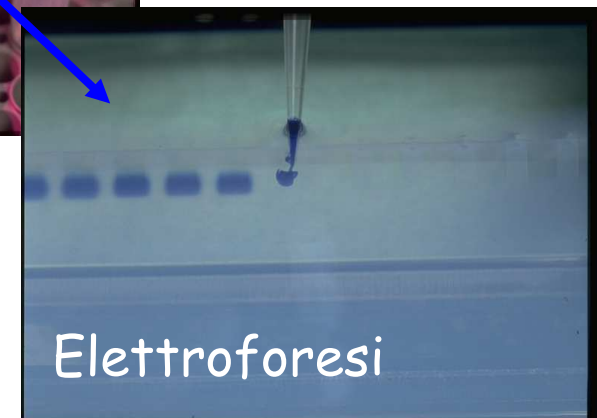
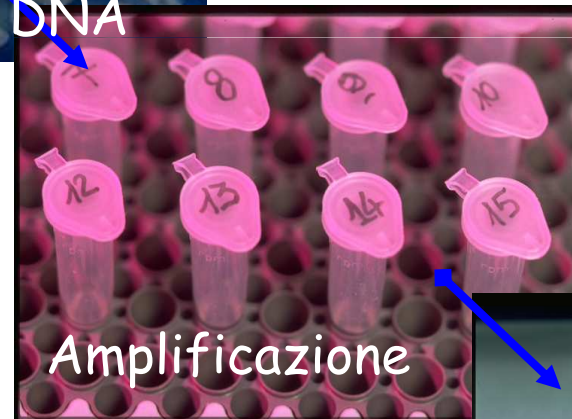
metodi basati sulla determinazione della proteina

esistono anticorpi per le proteina CP4 EPSPS
e Cry 1Ab (Bt)

L'ELISA può essere usato per screening

Il western blotting ha un uso confinato alla
ricerca

metodi basati sulla determinazione del DNA

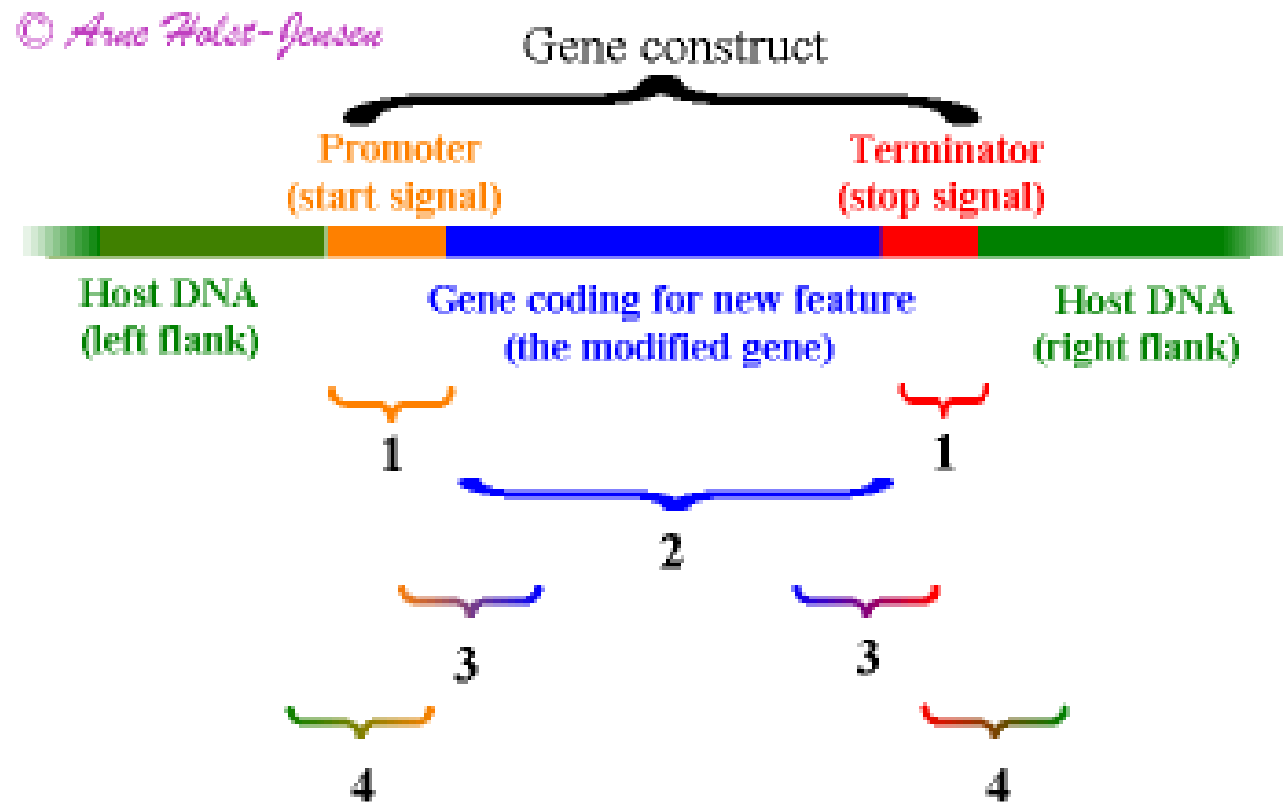


Sequenze comunemente coinvolte utilizzabili per la determinazione degli OGM

- CaMV 35S promoter
- NptII
- Nos terminator
- *bar*
- *pat*

Primers per PCR disegnati sulla base di queste sequenze

Specificità nella scelta dei primers



**Targets for PCR based detection of genetic modifications,
ordered after degree of specificity:**

1 = low specificity, 4 = transformation event specific

PCR quantitativa

due metodi di base

- Quantitative end-point PCR

Competizione tra un DNA standard e il DNA da determinare

Limite di rilevazione circa 0.1%

- Real-time PCR

La concentrazione del DNA può essere determinata dal ciclo di amplificazione durante la fase esponenziale

Limite di rilevazione circa 0.1%

Real-Time PCR - Determinazione del ciclo soglia

