

# **Applicazioni delle piante geneticamente modificate**

# Principali caratteri ingegnerizzabili

miglioramento nel controllo di agenti patogeni e infestanti



- resistenza a patogeni (virus, batteri e funghi)
- resistenza agli insetti
- tolleranza agli erbicidi

miglioramento delle proprietà agronomiche



- resistenza al freddo
- aumento della tolleranza allo stress idrico
- aumento della tolleranza al sale

miglioramento delle qualità dopo il raccolto



- ritardo nella maturazione dei frutti
- ritardo nella senescenza dei fiori

miglioramento delle qualità nutrizionali



- aumento del contenuto di vitamine
- aumento del contenuto di lisina e amminoacidi solforati

## altre applicazioni

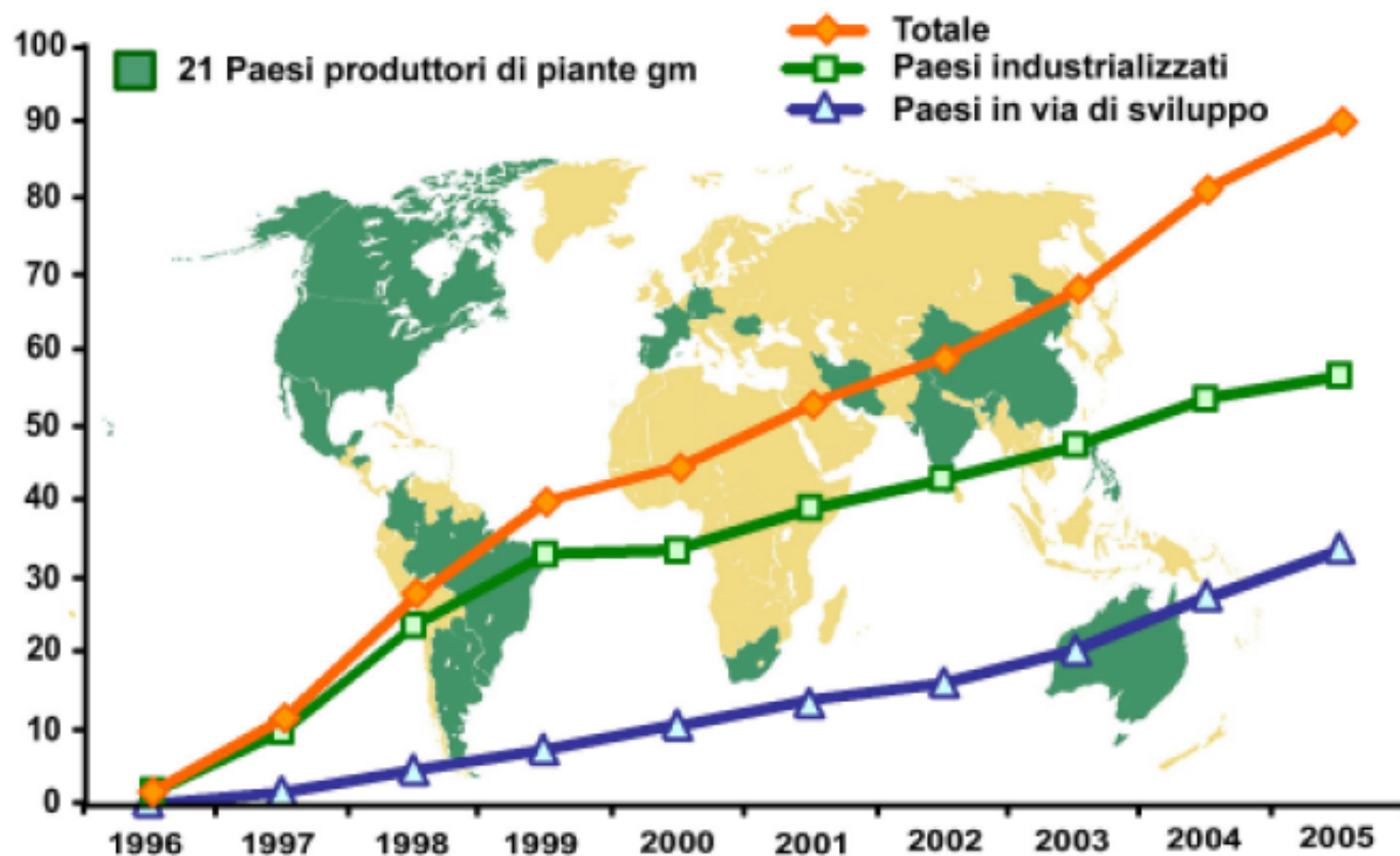
- produzione di vaccini
- produzione di proteine di interesse
- produzione di metaboliti secondari

# LO STATO ATTUALE DELLE COLTIVAZIONI TRANSGENICHE NEL MONDO

*dati estratti da:* Clive James, 2005: Global Review of Commercialized Transgenic crops. Published as ISAAA Briefs (International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications)  
[www.ISAAA.org](http://www.ISAAA.org)

# SUPERFICIE GLOBALE COLTIVATA CON PIANTE GM

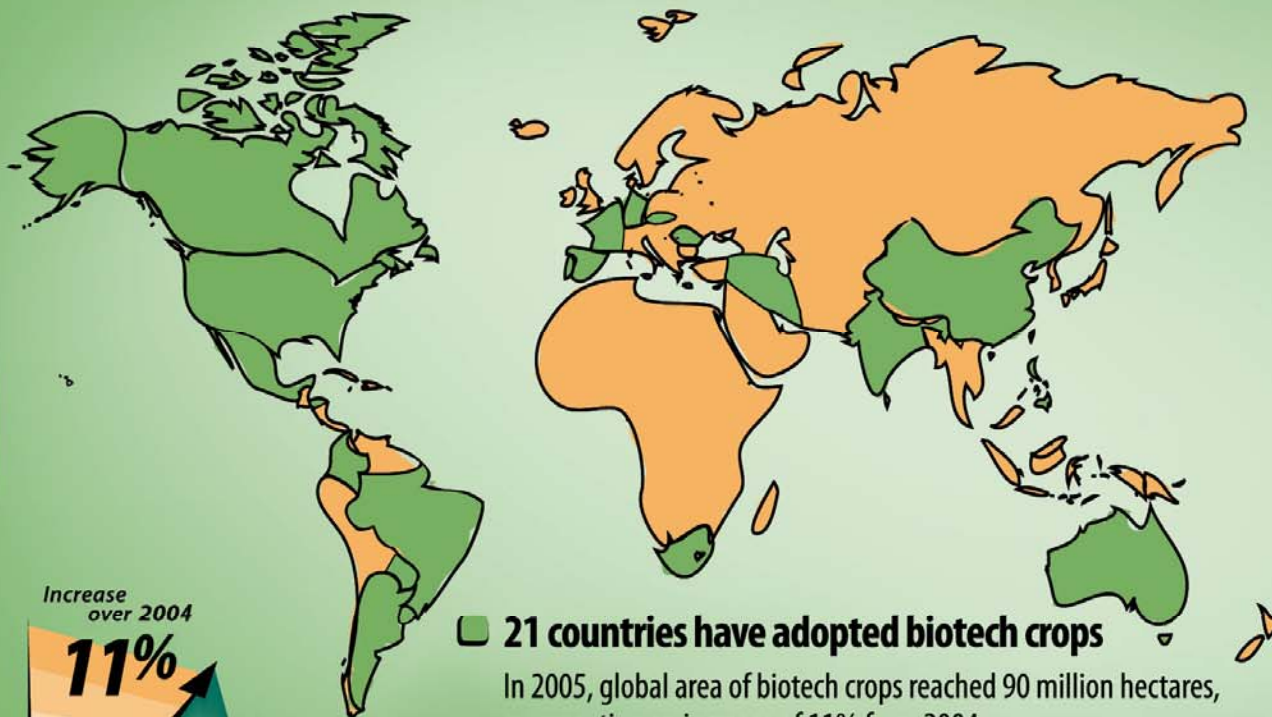
Milioni di ettari (1996-2005)



*Incremento dell'11% pari a 9,0 milioni di ettari tra il 2004 e il 2005.*

Fonte: Clive James, 2005.

# Global Status of Biotech Crops in 2005



## BIOTECH MEGA-COUNTRIES

### 50,000 hectares or more

|               |              |
|---------------|--------------|
| USA:          | 49.8 million |
| Argentina:    | 17.1 million |
| Brazil:       | 9.4 million  |
| Canada:       | 5.8 million  |
| China:        | 3.3 million  |
| Paraguay:     | 1.8 million  |
| India:        | 1.3 million  |
| South Africa: | .5 million   |
| Uruguay:      | .3 million   |
| Australia:    | .3 million   |
| Mexico:       | .1 million   |
| Romania:      | .1 million   |
| Philippines:  | .1 million   |
| Spain:        | .1 million   |

### 50,000 hectares or less

Columbia Iran Honduras Portugal  
Germany France Czech Republic

Increase  
over 2004

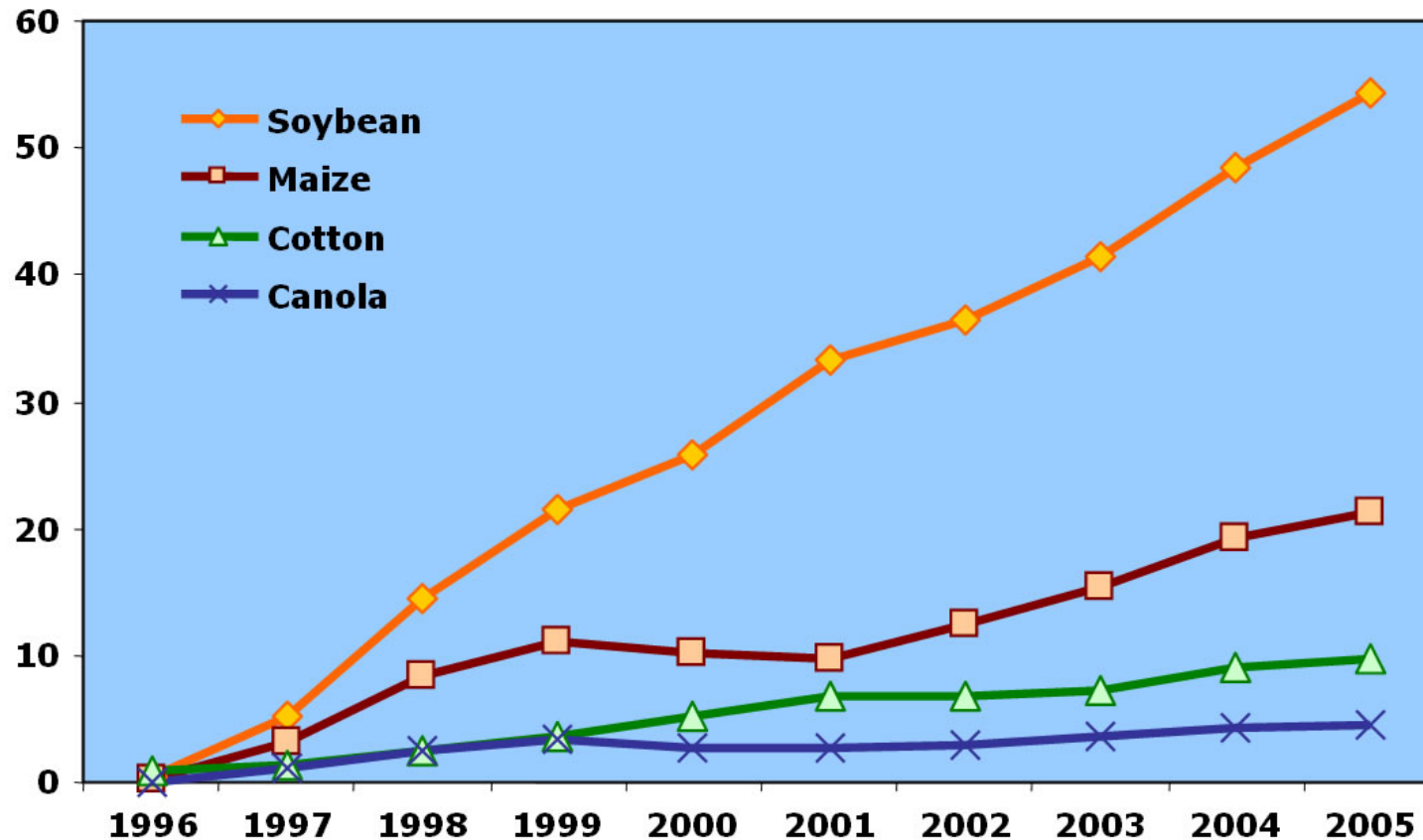
**11%**

## 21 countries have adopted biotech crops

In 2005, global area of biotech crops reached 90 million hectares, representing an increase of 11% from 2004, equivalent to 9 million hectares.

Source: Clive James, 2005 ISAAA Briefs 34

# Global Area (Million Hectares) of Biotech Crops, 1996 to 2005: by Crop



Source: Clive James, 2005

**Soia 60% delle coltivazioni GM**

**Mais 24%**

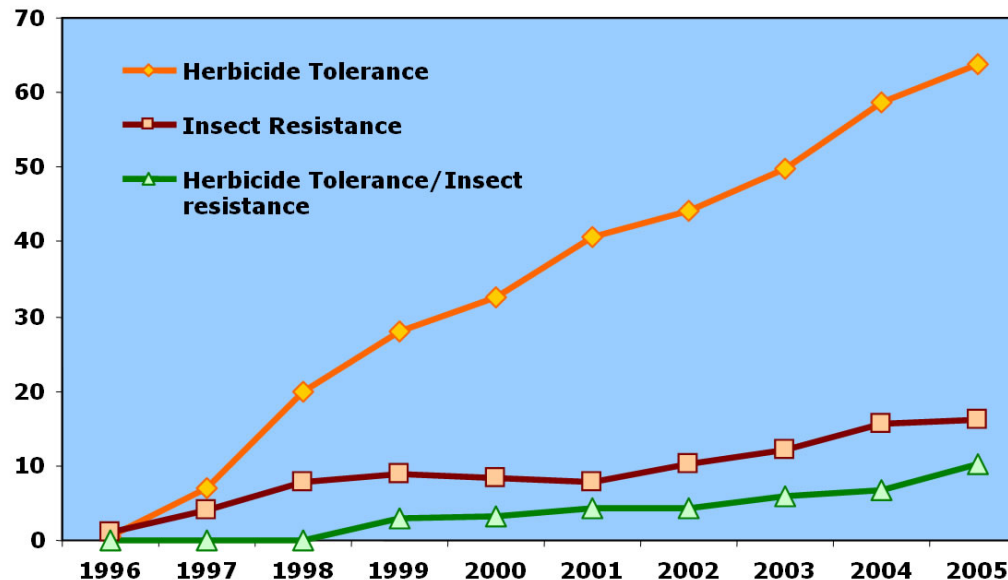
**Cotone 11%**

**Colza 5%**

# I caratteri più diffusi nelle attuali varietà GM sono:

**Tolleranza ad erbicidi**  
**Resistenza ad insetti**

Global Area (Million Hectares) of Biotech Crops,  
1996 to 2005: by Trait



Source: Clive James, 2005



Resistenza agli insetti

# Tossina *Bt*

endotossina prodotta da *Bacillus thuringiensis*

- Il pesticida "biologico" più ampiamente utilizzato da circa 50 anni
- 2% del mercato globale degli insetticidi nel 1995
- "nemico naturale" di molti insetti
- Usato ampiamente contro zanzare e mosche

## Problemi

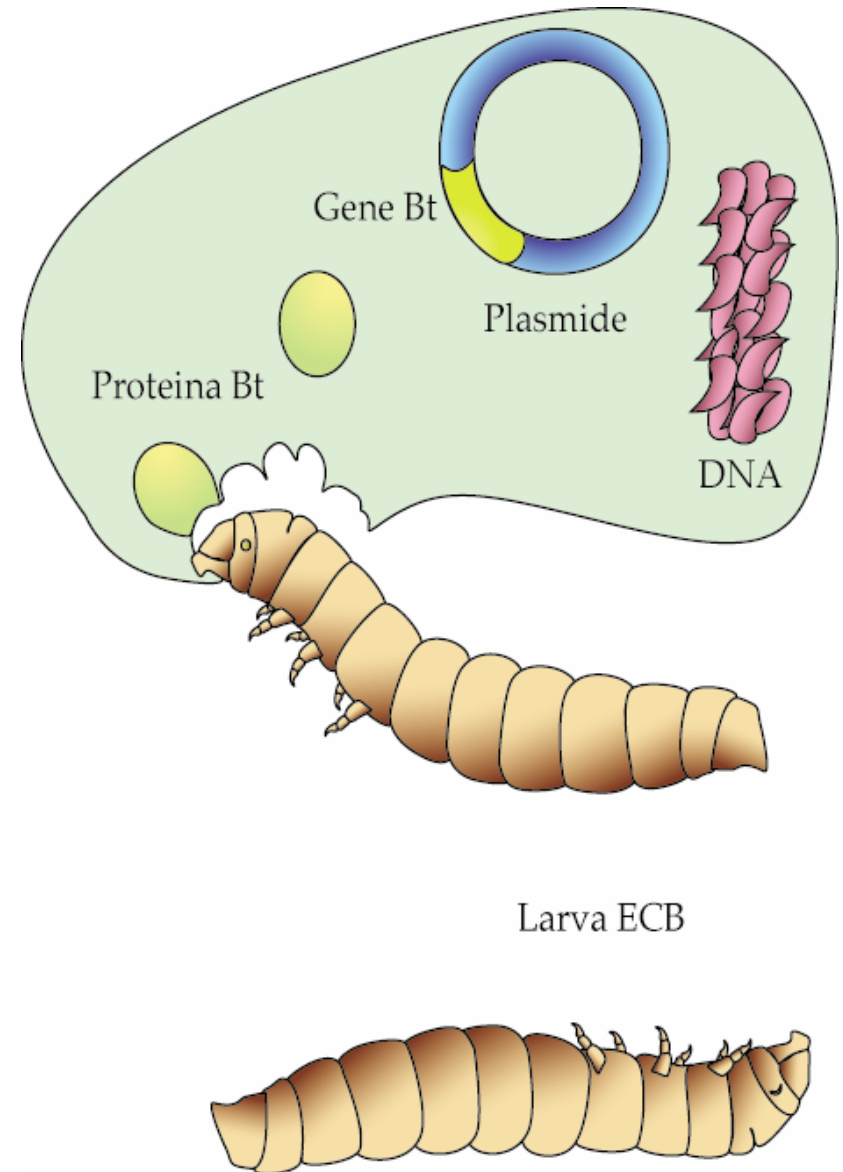
- Mancanza di stabilità
- Bassa permeabilità nei tessuti vegetali

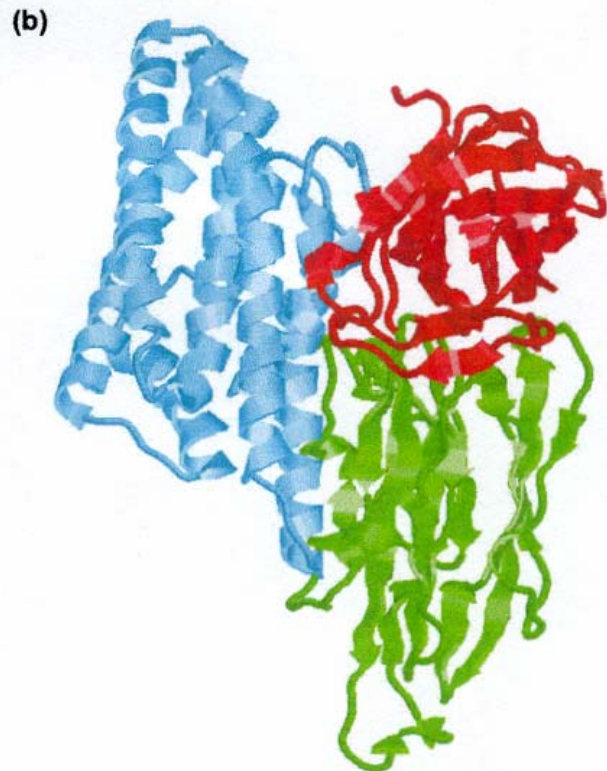
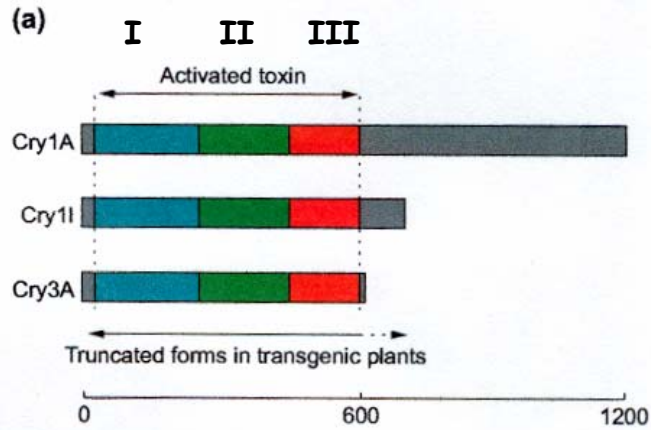


Courtesy USDA

# Modo di azione delle tossine di *Bacillus thuringiensis*

- La tossina si inserisce nella membrana delle cellule epiteliali dell'intestino creando un canale ionico
- Ciò determina un'alterazione dei flussi ionici e quindi la lisi delle cellule epiteliali
- L'insetto smette di mangiare, si disidrata e muore





La tossina è attivata dal taglio proteolitico della regione N-terminale

I tre domini della tossina attiva sono conservati nelle diverse classi

**dominio I:** consente il passaggio attraverso la membrana dell'epitelio intestinale

**dominio II:** riconoscimento del recettore

**dominio III:** legame con il recettore

# STRATEGIA

Inserire il gene per la proteina Bt in piante di mais in modo che la pianta sia costantemente protetta dall'attacco degli insetti

Ciò permette di ridurre drasticamente l'impiego di pesticidi chimici



# mais MON810

Monsanto



mais Bt



## PIANTE TRANSGENICHE CON LA TOSSINA BT

- Pomodoro
- Tabacco
- Patata
- Riso
- Mais
- Mela
- Melanzana
- Colza
- Alfalfa
- Noce
- Pioppo
- Abete rosso
- Mirtillo nero
- Cotone

# 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

# FLAVR SAVR Tomato

1° alimento geneticamente modificato  
Calgene, Inc. (Davis, CA) 1994

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

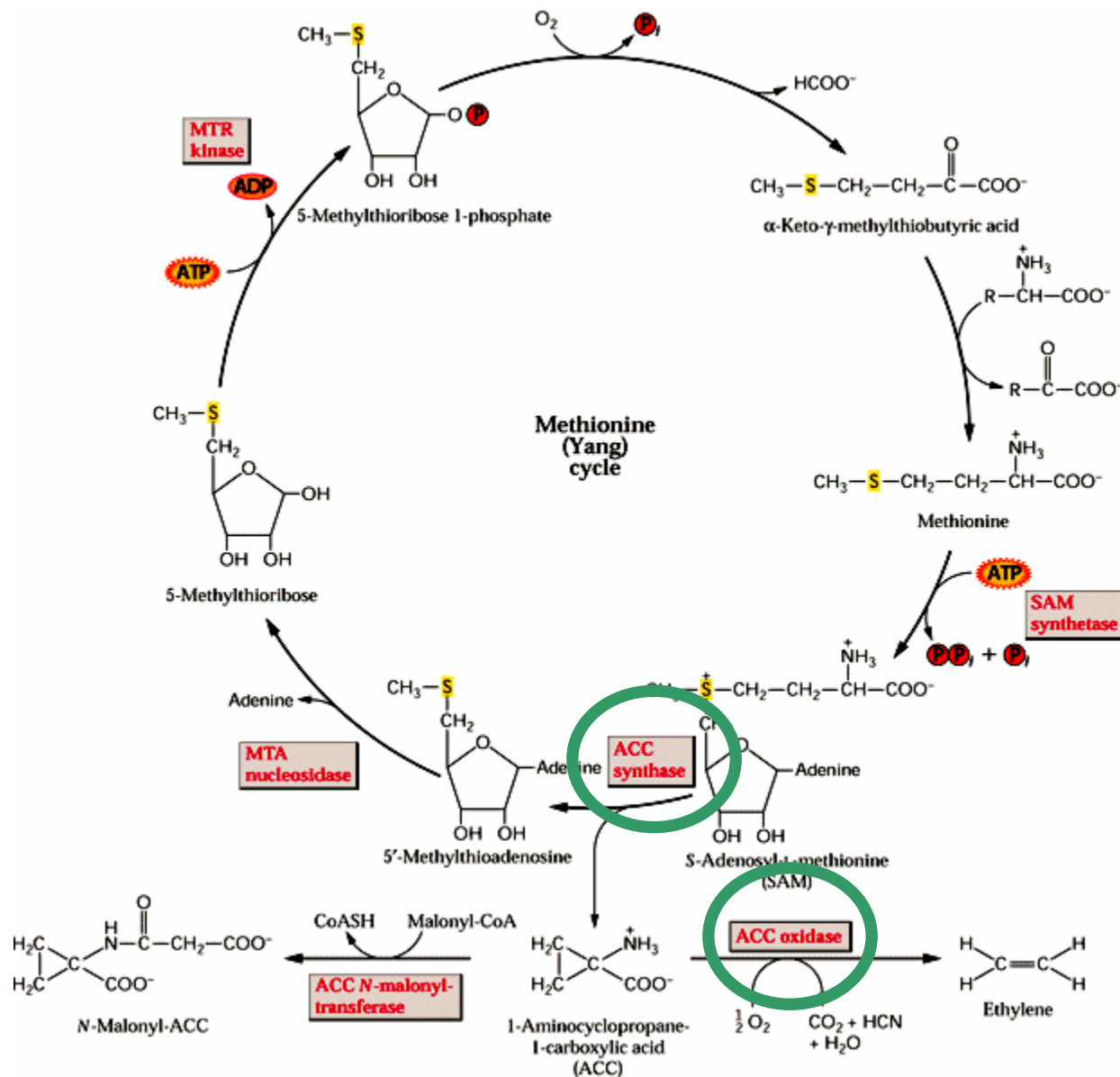
- Spegnerne il gene per la PG
- In assenza di PG --> assenza di degradazione della pectina

**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

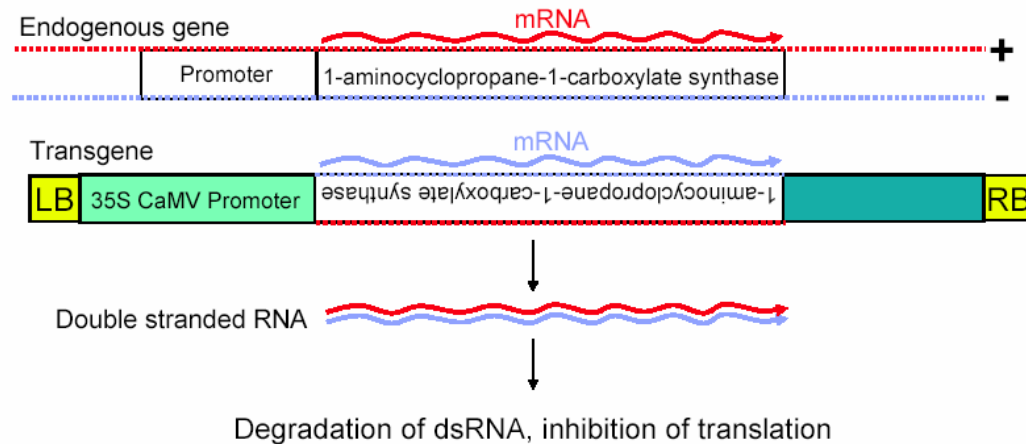
# ALTRA STRATEGIA

## BLOCCARE LA SINTESI DELL'ETILENE, ORMONE CHE REGOLA LA MATURAZIONE DEL FRUTTO



- ACC-sintasi  
anti-senso

## Antisense Suppression of Genes



- Ethylene biosynthesis blocked
- Tomato fruit ripening inhibited

## controllo della maturazione del frutto

controllo



transgenico



transgenico +  
etilene



# 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



# MIGLIORAMENTO DELLE QUALITA' NUTRIZIONALI

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

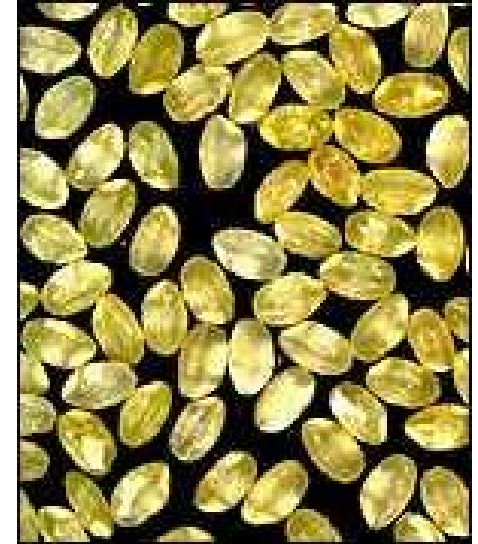
# GOLDEN RICE

Il riso brillato non contiene  $\beta$ -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)



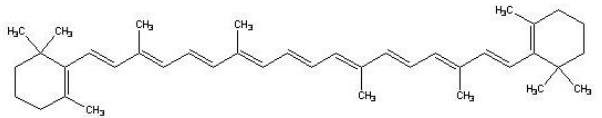
# GOLDEN RICE

## Il riso brillato non contiene $\beta$ -carotene

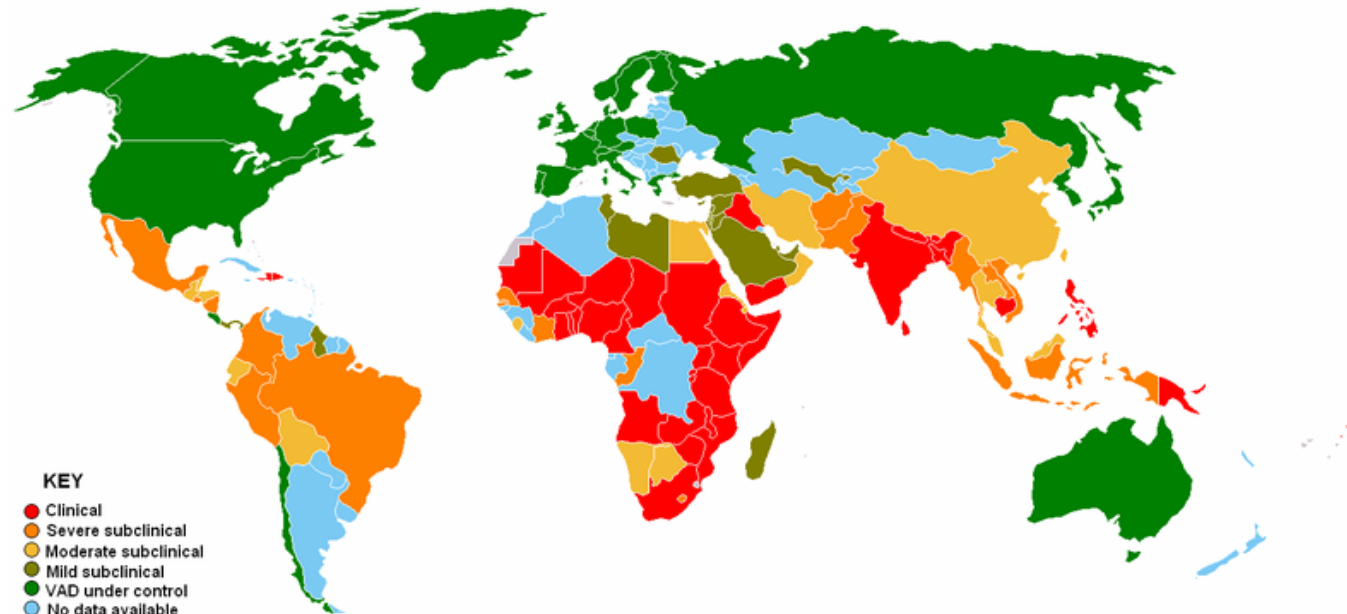
# 200 milioni di donne e bambini sono affetti da carenza di Vitamina A

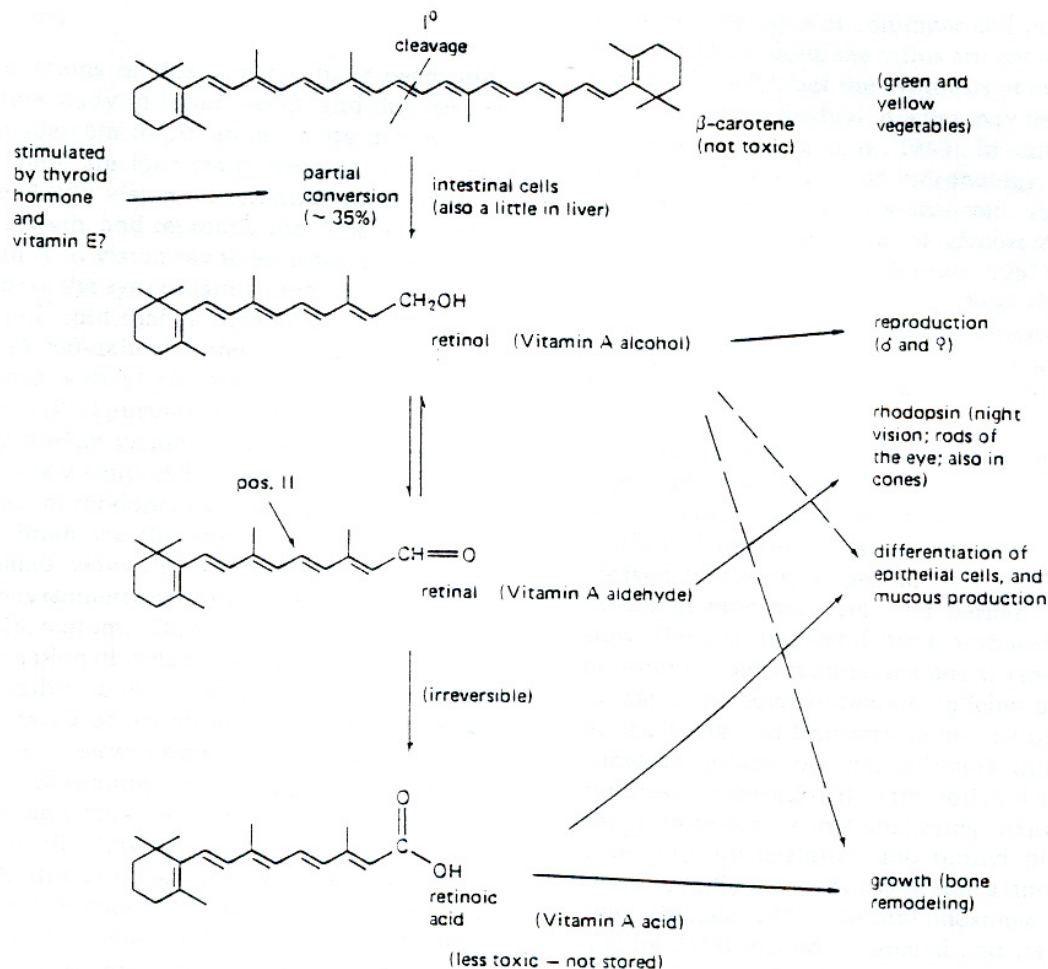
**ogni anno circa 500000 bambini diventano ciechi**

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



## $\beta$ -carotene



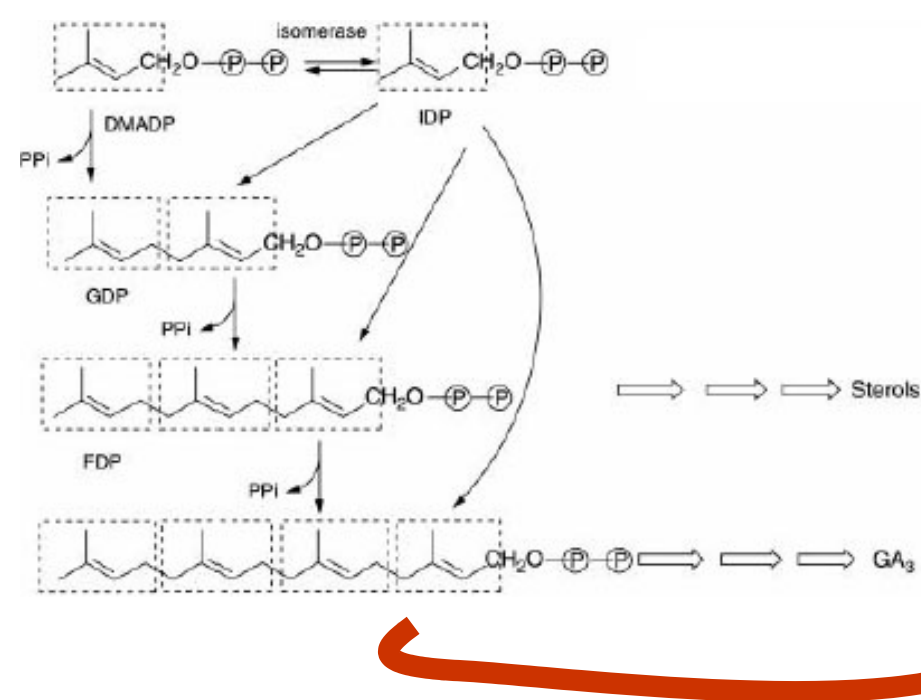


## FUNZIONI

- Visione
- Differenziamento cellule epiteliali
- Fertilità
- Cheratinizzazione

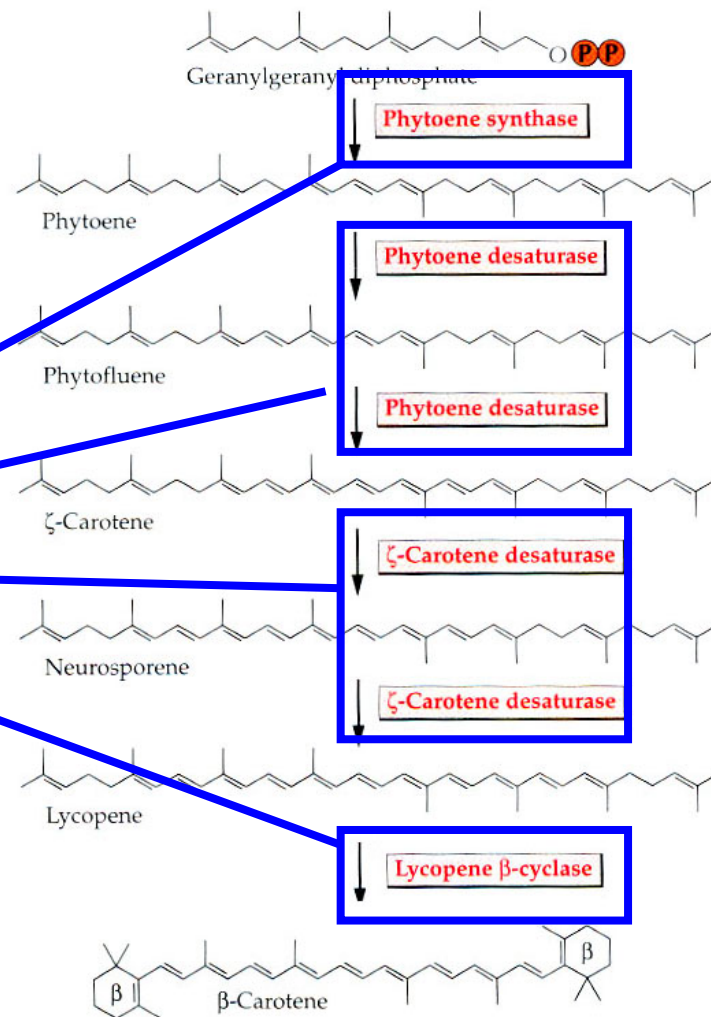
## CARENZA VITAMINA A

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



**enzimi  
mancanti  
nel riso**

**via biosintetica dei  
carotenoidi**





Ingo Potrykus (Svizzera)  
Peter Beyer (Germania)

**Far produrre al riso il  $\beta$ -carotene  
anche a livello dell'endosperma del  
seme**

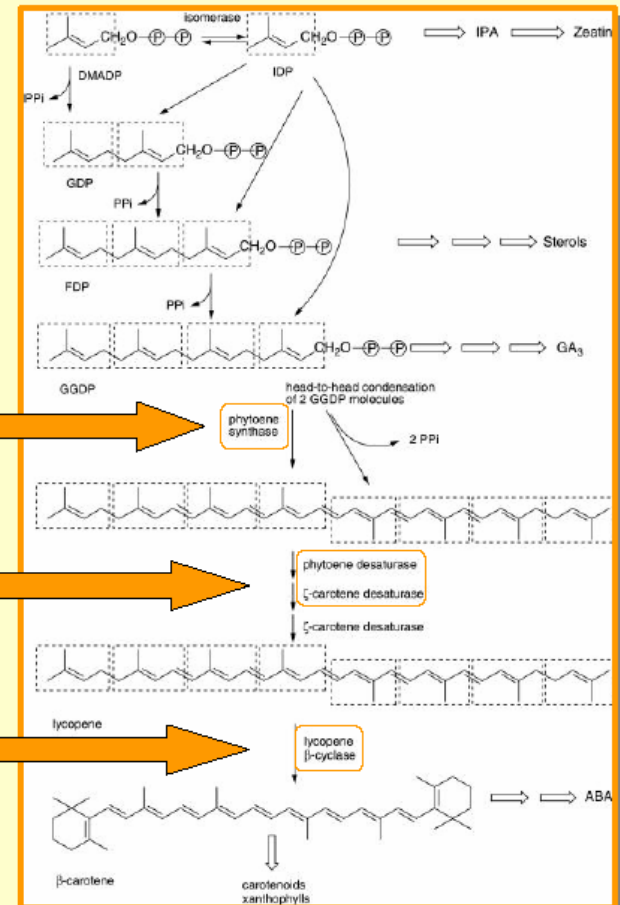
**Geni aggiunti nel  
GOLDEN RICE, per  
completare la parte  
mancante della via  
biosintetica dei  
carotenoidi**



*psy*  
(fitoene sintasi  
di narciso)

*ctr 1*  
(carotene desaturasi  
batterica)

*lcy*  
(licopene beta-  
ciclastasi di narciso)



# Engineering the Provitamin A ( $\beta$ -Carotene) Biosynthetic Pathway into (Carotenoid-Free) Rice Endosperm

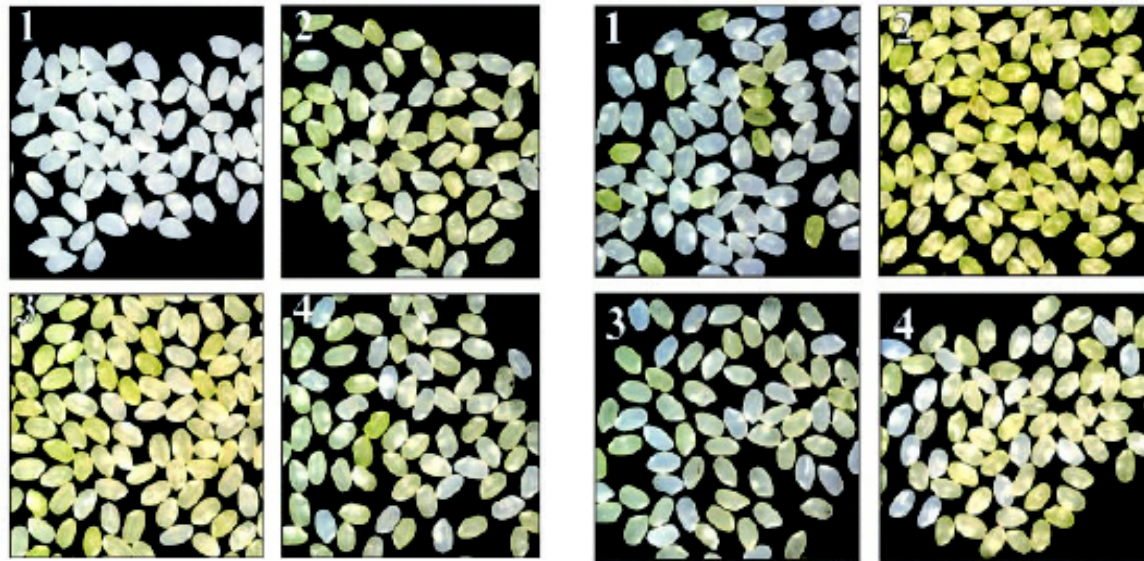
Science vol. 287

14 Jan 2000

Xudong Ye,<sup>1\*†</sup> Salim Al-Babili,<sup>2\*</sup> Andreas Klöti,<sup>1‡</sup> Jing Zhang,<sup>1</sup>  
Paola Lucca,<sup>1</sup> Peter Beyer,<sup>2§</sup> Ingo Potrykus<sup>1§</sup>

- 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**

controllo →



linee con diversi livelli di sintesi di  
 $\beta$ -carotene

Le migliori ne contengono 2  $\mu\text{g/g}$  di riso

Narciso

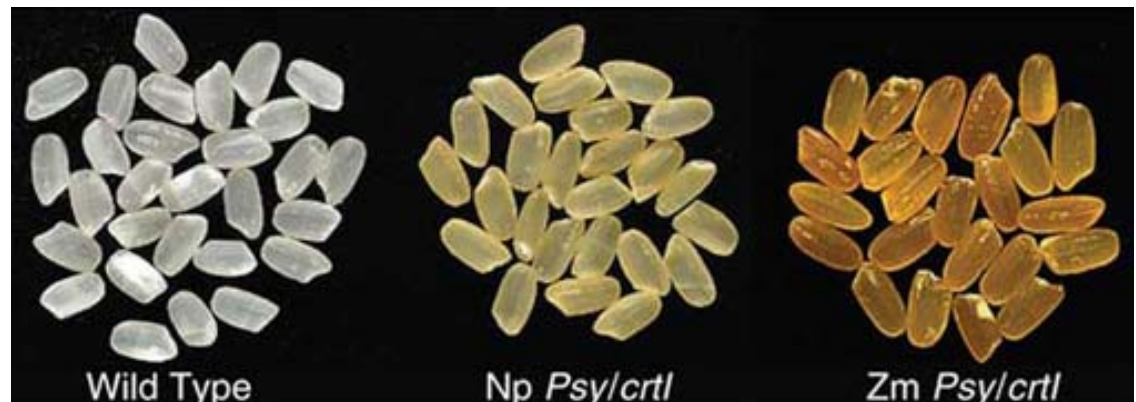
Mais

2005

**GOLDEN RICE II**

fitoene sintasi di mais

riso con livelli molto  
maggiori di  $\beta$ -carotene



golden rice

golden rice II

# 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

# LE PIANTE COME BIOREATTORI

## POSSIBILI PRODOTTI

- Anticorpi
- Proteine di interesse farmaceutico
- Vaccini edibili
- Metaboliti secondari
- Polimeri biodegradabili

# "Plantibodies"

scopo diagnostico e terapeutico

CaroRx

| Application and specificity                  | Promoter                             | Signal sequences                               | Antibody name or type        | Plant                                                                            | Expression levels                                       | Refs |
|----------------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|------|
| Dental caries; streptococcal antigen I or II | CaMV 35S                             | Murine IgG signal peptides                     | Guy's 13 (SIgA) <sup>a</sup> | <i>Nicotiana tabacum</i>                                                         | 500 µg/g FW <sup>b</sup> leaves                         | 8,11 |
| Diagnostic; anti-human IgG                   | CaMV 35S                             | Murine IgG signal peptides                     | C5-1 (IgG)                   | Alfalfa                                                                          | 1.0% TSP <sup>c</sup>                                   | 4    |
| Cancer treatment; carcinoembryonic antigen   | Maize ubiquitin                      | Murine IgG signal peptide; KDEL                | ScFvT84.66 (ScFv)            | Wheat                                                                            | 900.0 ng/g leaves;<br>1.5 µg/g seed                     | 5    |
| Cancer treatment; carcinoembryonic antigen   | Maize ubiquitin                      | Murine IgG signal peptide; KDEL                | ScFvT84.66 (ScFv)            | Rice                                                                             | 29.0 µg/g leaves;<br>32.0 µg/g seed;<br>3.8 µg/g callus | 5,6  |
| Cancer treatment; carcinoembryonic antigen   | Enhanced CaMV 35S                    | Murine IgG signal peptide; KDEL                | ScFvT84.66 (ScFv)            | Rice                                                                             | 27.0 µg/g leaves                                        | 5    |
| Cancer treatment; carcinoembryonic antigen   | Enhanced CaMV 35S                    | TMV Ω leader; murine IgG signal peptides; KDEL | T84.66 (IgG)                 | <i>Nicotiana tabacum</i><br>(transiently with <i>Agrobacterium</i> infiltration) | 1.0 µg/g leaves                                         | 13   |
| B-cell lymphoma treatment; idiotype vaccine  | TMV subgenomic coat protein promoter | Rice α-amylase                                 | 38C13 (scFv)                 | <i>Nicotiana benthamiana</i>                                                     | 30.0 µg/g leaves                                        | 9    |
| Colon cancer; surface antigen                | TMV subgenomic promoter U5 CP        | Murine IgG signal peptide; KDEL                | C017-1A (IgG)                | <i>Nicotiana benthamiana</i>                                                     | Not reported                                            | 10   |
| Herpes simplex virus 2                       | CaMV 35S                             | Tobacco extensin signal peptide                | Anti-HSV-2 (IgG)             | Soybean                                                                          | Not reported                                            | 3    |

CEA: glicoproteina tumorale  
scopo diagnostico

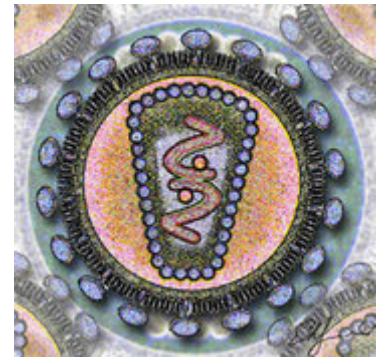
applicazione topica previene la trasmissione del virus

<sup>a</sup>SIgA, secretory IgA.

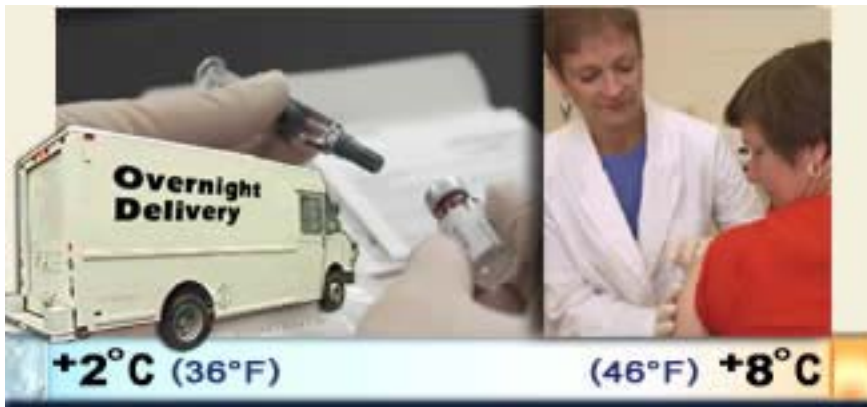
<sup>b</sup>FW, fresh weight.

<sup>c</sup>TSP, total soluble protein.

# VACCINI EDIBILI



- I vaccini attuali sono costosi
- Sono richieste infrastrutture per il trasporto e la somministrazione (problemi logistici ed economici)



Problema per i paesi poveri

# Vantaggi della produzione in piante transgeniche:

Coltivazione in loco; basso costo

Non è necessario personale per la somministrazione del preparato

Disponibili indefinitamente (ogni anno si riseminano)

# Proteine espresse in piante transgeniche con applicazioni come vaccini animali e umani

| Source of the protein and target species for the vaccine     | Protein or peptide expressed | Plant expression system      | Maximum recorded expression level in <i>planta</i> | Integrity, immunogenicity and protective capacity of the vaccine                                                         | Refs     |
|--------------------------------------------------------------|------------------------------|------------------------------|----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| Enterotoxigenic <i>E. coli</i> (humans)                      | Heat-labile toxin B-subunit  | Tobacco                      | <0.01% TSP <sup>a</sup>                            | Intact protein forms multimers and is immunogenic when administered orally                                               | 14       |
| Enterotoxigenic <i>E. coli</i> (humans)                      | Heat-labile toxin B-subunit  | Potato                       | 0.19% TSP                                          | Receptor-binding activity and immunogenic and protective when administered orally                                        | 14,22,25 |
| Enterotoxigenic <i>E. coli</i> (humans)                      | Heat-labile toxin B-subunit  | Maize                        | Not given                                          | Immunogenic and protective when administered orally                                                                      | 30       |
| <i>Vibrio cholerae</i> (humans)                              | Cholera toxin B-subunit      | Potato                       | 0.30% TSP                                          | Intact protein forms multimers, has receptor-binding activity and is immunogenic and protective when administered orally | 18,19    |
| Hepatitis B virus (humans)                                   | Envelope surface protein     | Tobacco                      | <0.01% TSP                                         | Virus-like particles form and extracted protein is immunogenic when administered by injection                            | 15,23    |
| Hepatitis B virus (humans)                                   | Envelope surface protein     | Potato                       | <0.01% FW <sup>b</sup>                             | Immunogenic when administered orally                                                                                     | 31       |
| Hepatitis B virus (humans)                                   | Envelope surface protein     | Lupin ( <i>Lupinus</i> spp.) | <0.01% FW                                          | Immunogenic when administered orally                                                                                     | 27       |
| Hepatitis B virus (humans)                                   | Envelope surface protein     | Lettuce                      | <0.01% FW                                          | Immunogenic when administered orally                                                                                     | 27       |
| Norwalk virus (humans)                                       | Capsid protein               | Tobacco                      | 0.23% TSP                                          | Intact protein and virus-like particles form, immunogenic when administered orally                                       | 16       |
| Norwalk virus (humans)                                       | Capsid protein               | Potato                       | 0.37% TSP                                          | Virus-like particles form and immunogenic when administered orally                                                       | 16,26    |
| Rabies virus (humans)                                        | Glycoprotein                 | Tomato                       | 1.00% TSP                                          | Intact protein                                                                                                           | 17       |
| Human cytomegalovirus (humans)                               | Glycoprotein B               | Tobacco                      | <0.02% TSP                                         | Immunologically related protein                                                                                          | 32       |
| Rabbit hemorrhagic disease virus (rabbits)                   | VP60                         | Potato                       | 0.30% TSP                                          | Immunogenic and protective when administered by injection                                                                | 28       |
| Foot-and-mouth disease virus (agricultural domestic animals) | VP1                          | <i>Arabidopsis</i>           | Not given                                          | Immunogenic and protective when administered by injection                                                                | 20       |
| Foot-and-mouth disease virus (agricultural domestic animals) | VP1                          | Alfalfa                      | Not given                                          | Immunogenic and protective when administered by injection or orally                                                      | 24       |
| Transmissible gastroenteritis coronavirus (pigs)             | Glycoprotein S               | <i>Arabidopsis</i>           | 0.06% TSP                                          | Immunogenic when administered by injection                                                                               | 21       |
| Transmissible gastroenteritis coronavirus (pigs)             | Glycoprotein S               | Tobacco                      | 0.20% TSP                                          | Intact protein and immunogenic when administered by injection                                                            | 29       |
| Transmissible gastroenteritis coronavirus (pigs)             | Glycoprotein S               | Maize                        | <0.01% FW                                          | Protective when administered orally                                                                                      | 30       |

<sup>a</sup>TSP, total soluble protein.  
<sup>b</sup>FW, fresh weight.

# PRINCIPALI CRITICHE MOSSE AGLI OGM

- resistenza agli insetti: possibilità che si sviluppino insetti resistenti
- 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

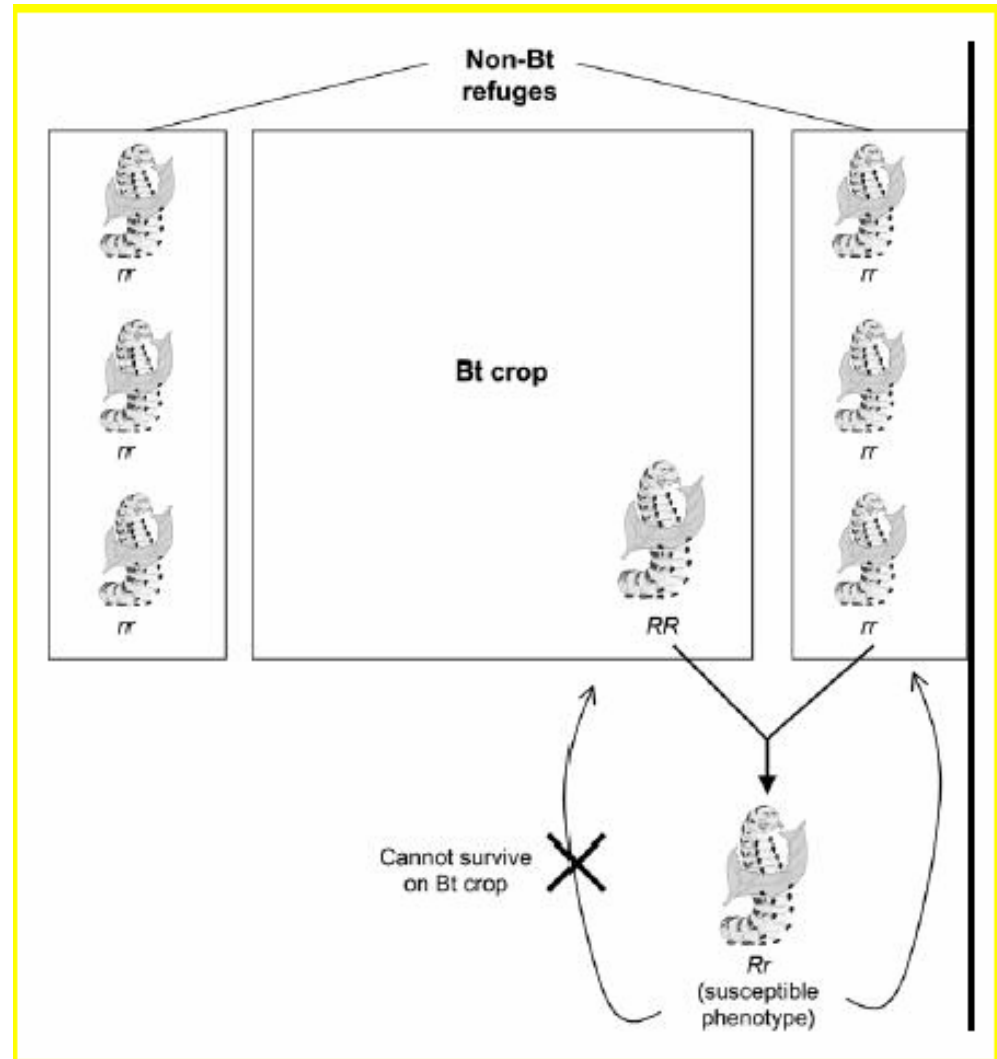
resistenza agli insetti: possibilità  
che si sviluppino insetti resistenti

## Strategia "High dose/refuge"

Accanto all'area coltivata con la varietà transgenica che produce un'alta dose di proteina Bt, vengono create "aree rifugio" coltivate con varietà non transgeniche.

Solo insetti RR resistenti omozigoti (molto rari) possono tollerare elevati livelli di Bt.

Incrociandosi con insetti non-resistenti (rr) nelle zone-rifugio daranno una progenie ibrida (Rr) non-resistente.



# PRINCIPALI CRITICHE MOSSE AGLI OGM

- resistenza agli insetti: possibilità che si sviluppino insetti resistenti

- 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

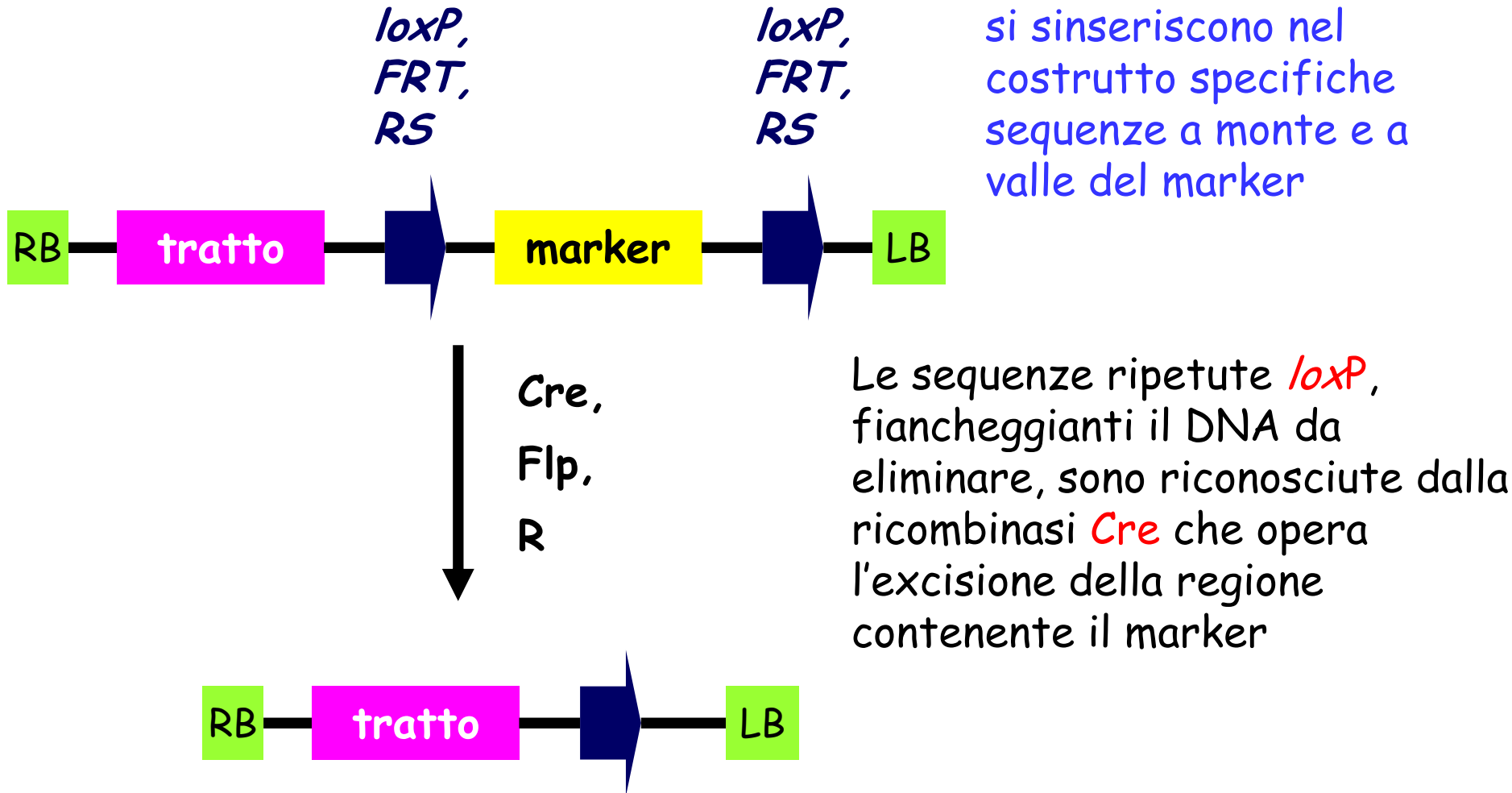
## PERCHÉ?

- 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

E' possibile eliminare il marker per la resistenza all'antibiotico una volta selezionata la pianta trasformata

## RICOMBINAZIONE SITO-SPECIFICA

sistemi basati su ricombinasi microbiche



# PRINCIPALI CRITICHE MOSSE AGLI OGM

- resistenza agli insetti: possibilità che si sviluppino insetti resistenti
- presenza del gene marcatore per la resistenza a un antibiotico



possibilità di sviluppo di  
microrganismi resistenti (flora  
intestinale)

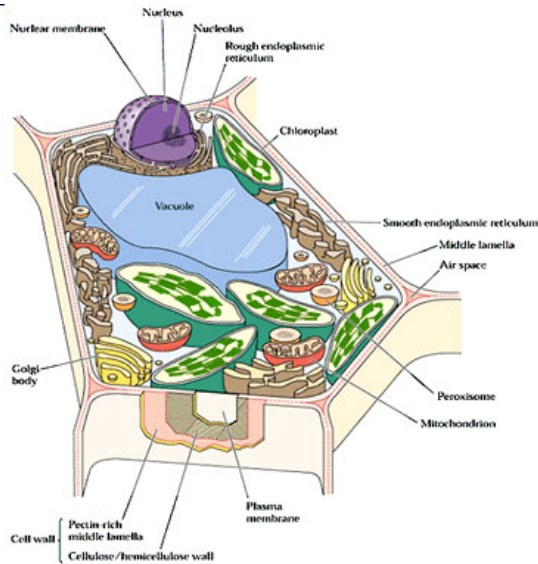
- flusso genico - dispersione del transgene attraverso l'ibridazione

# Trasformazione di cloroplasti

I cloroplasti si trasmettono per eredità materna



**NON SONO PRESENTI NEL POLLINE**



Si utilizza il sistema biolistico e vettori specifici con il gene da inserire.

Inserimento per ricombinazione omologa.

## VANTAGGI

- ➔ elevato numero di copie del transgene (il genoma del plastide è poliploide)
- ➔ capacità dei cloroplasti di formare legami disolfuro (proteine di interesse farmaceutico, vaccini)

Table 2. Foreign gene expression in chloroplasts of higher plants<sup>a</sup>

| Genes and use                               | Gene products and use                                 | Refs         |
|---------------------------------------------|-------------------------------------------------------|--------------|
| <b>Selectable markers and reporters</b>     |                                                       |              |
| <i>aadA</i>                                 | Aminoglycoside-3'-adenylyltransferase                 | [14]         |
| <i>npth</i>                                 | Neomycin phosphotransferase                           | [52]         |
| <i>codA</i>                                 | Cytosine deaminase                                    | [53]         |
| <i>BADH</i>                                 | Betaine aldehyde dehydrogenase                        | [4]          |
| <i>uidA</i>                                 | $\beta$ -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]         |
| <b>Plant traits: herbicide resistance</b>   |                                                       |              |
| <i>aroA</i>                                 | Glyphosate resistance                                 | [2,19]       |
| <i>bar</i>                                  | Bialaphos resistance                                  | [18,20]      |
| <b>Insect resistance</b>                    |                                                       |              |
| <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]          |
| <b>Pathogen resistance</b>                  |                                                       |              |
| <i>msi-99</i>                               | Bacterial, fungal resistance                          | [17]         |
| <b>Drought or salt tolerance</b>            |                                                       |              |
| <i>tps1</i>                                 | Trehalose phosphate synthase                          | [8]          |
| <i>BADH</i>                                 | Betaine aldehyde dehydrogenase                        | [4]          |
| <b>Amino acid biosynthesis</b>              |                                                       |              |
| <i>EPSPS</i>                                | 5-enol-pyruvyl shikimate-3-phosphate synthase         | [2,19]       |
| <i>ASA2</i>                                 | Anthrnilate synthase (AS) $\alpha$ -subunit           | [55]         |
| <b>Phytoremediation</b>                     |                                                       |              |
| <i>merA</i>                                 | Mercuric ion reductase                                | <sup>b</sup> |
| <i>merB</i>                                 | Organomercurial lyase                                 | <sup>b</sup> |
| <b>Non-plant traits: biopharmaceuticals</b> |                                                       |              |
| <i>hST</i>                                  | Human somatotropin                                    | [7]          |
| <i>HSA</i>                                  | Human serum albumin                                   | <sup>c</sup> |
| <i>msi 99</i>                               | Anticancer, lytic antibiotic                          | [17]         |
| <i>proinsulin</i>                           | Human insulin $\alpha$ , $\beta$ chains               | <sup>d</sup> |
| <i>IFN <math>\alpha</math> 5</i>            | Human interferon $\alpha$ 5                           | <sup>e</sup> |
| <b>Monoclonals</b>                          |                                                       |              |
| <i>Guy's 13</i>                             | For dental caries against <i>Streptococcus mutans</i> | <sup>c</sup> |
| <b>Biomedical polymer</b>                   |                                                       |              |
| <i>gvgvp-120</i>                            | Bioelastic protein-based polymer                      | [21]         |
| <b>Edible vaccines</b>                      |                                                       |              |
| <i>ctxB</i>                                 | Cholera toxin $\beta$ -subunit                        | [6]          |