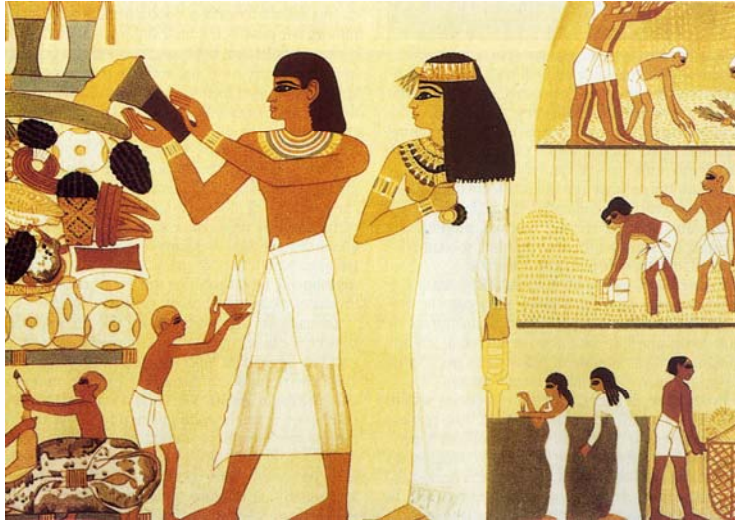


BIOTECNOLOGIA

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

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



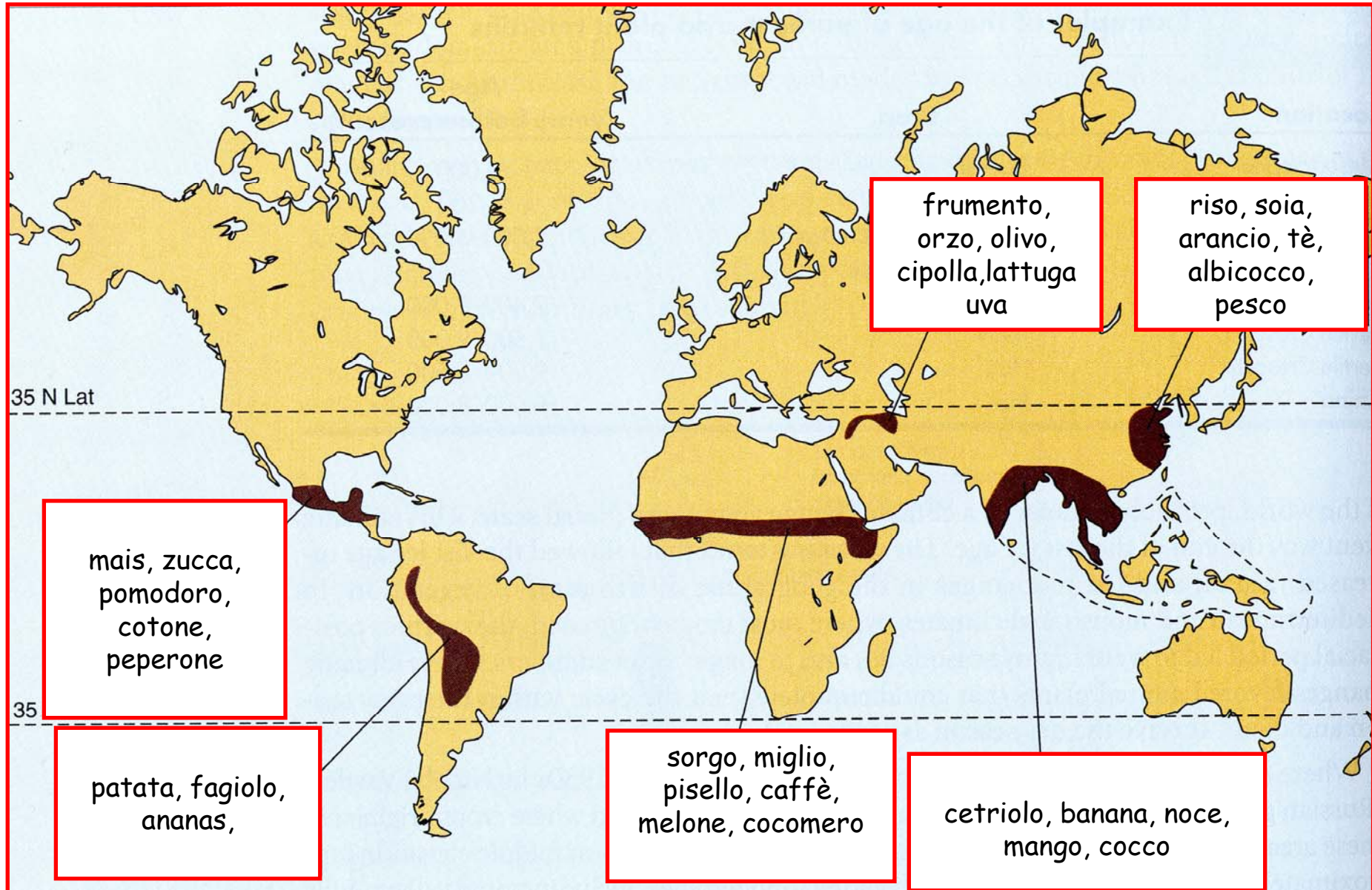
circa 10000 anni fa

raccoglitore ➡ agricoltore

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



Centri di Origine dell'agricoltura



TEOSINTE è il progenitore selvatico del mais



teosinte →

mais →



progenitore del frumento



bacelli di
pisello

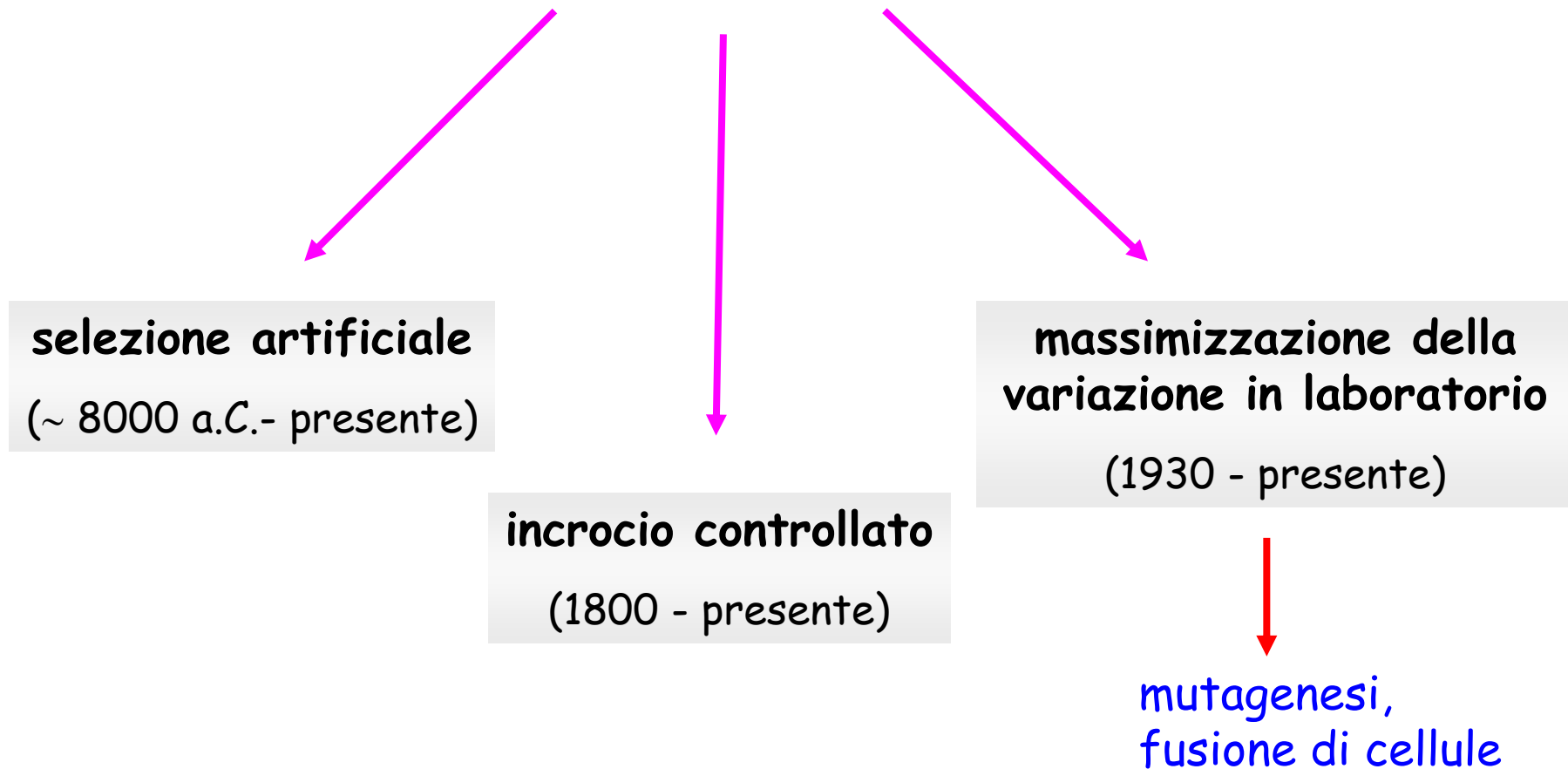


selvatico

domesticato

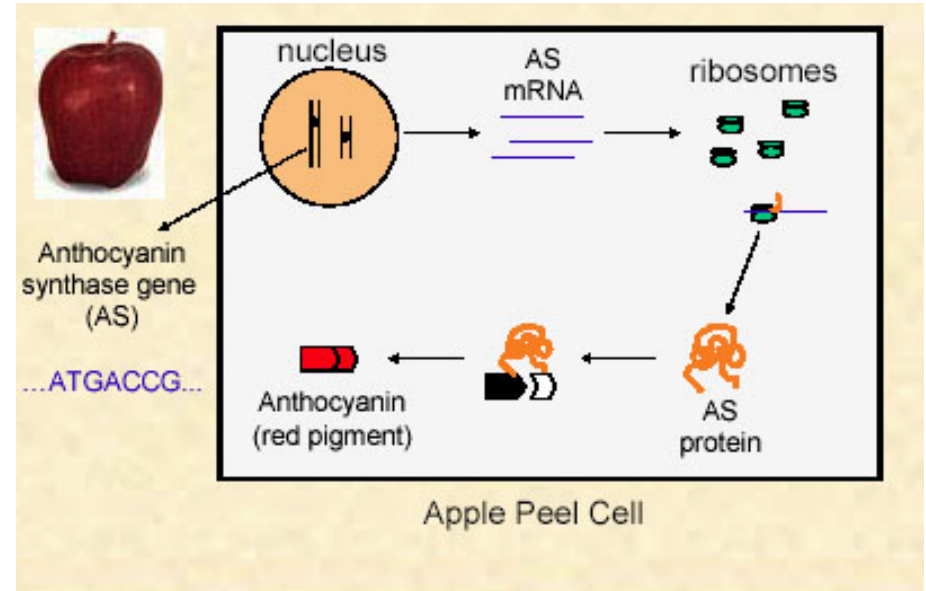
PLANT BREEDING

MIGLIORAMENTO GENETICO VEGETALE



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...

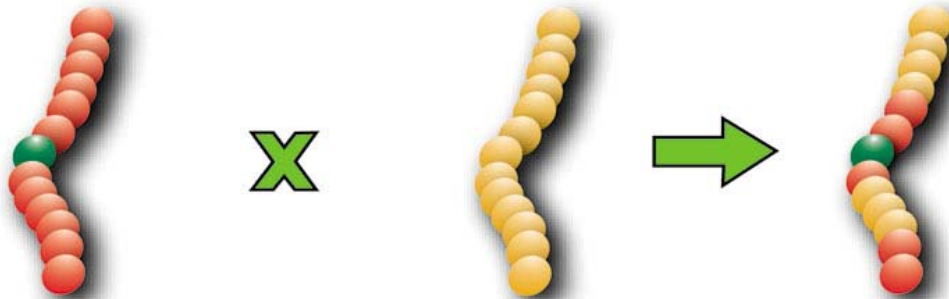
...AT_C...

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

INCROCIO



mandarino



arancio

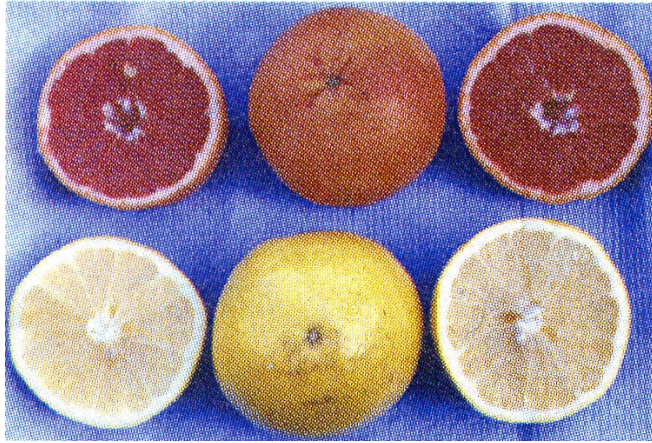


clementina



Tutte le varietà commerciali sono
state ottenute attraverso il
miglioramento genetico tradizionale





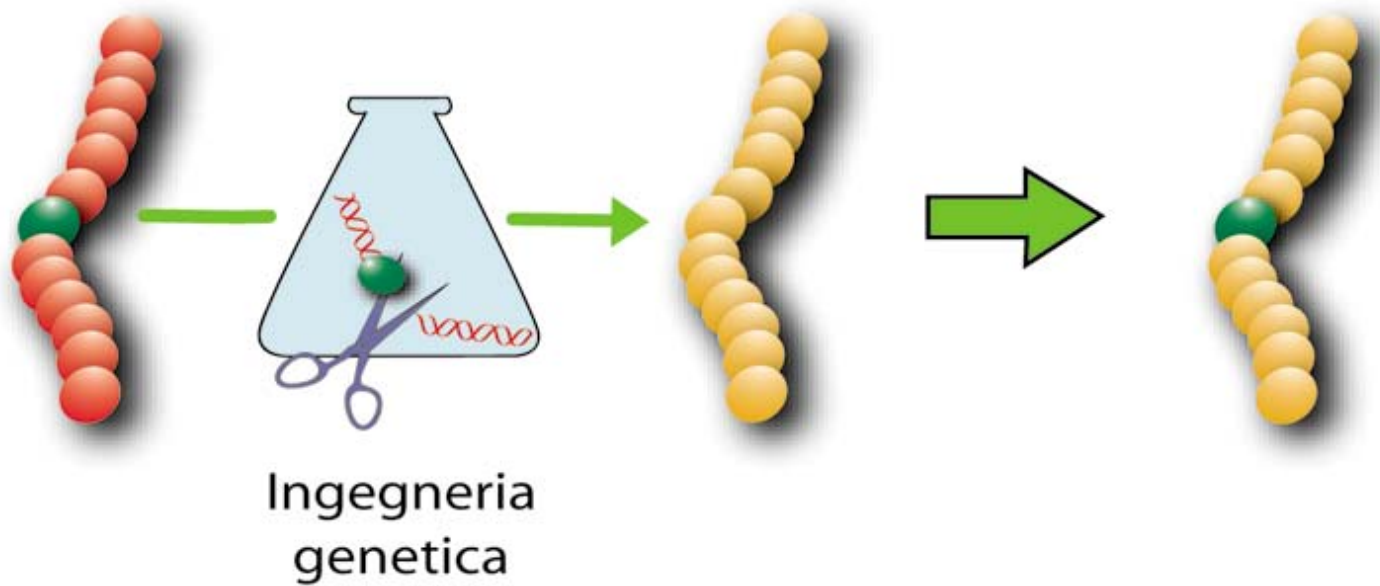
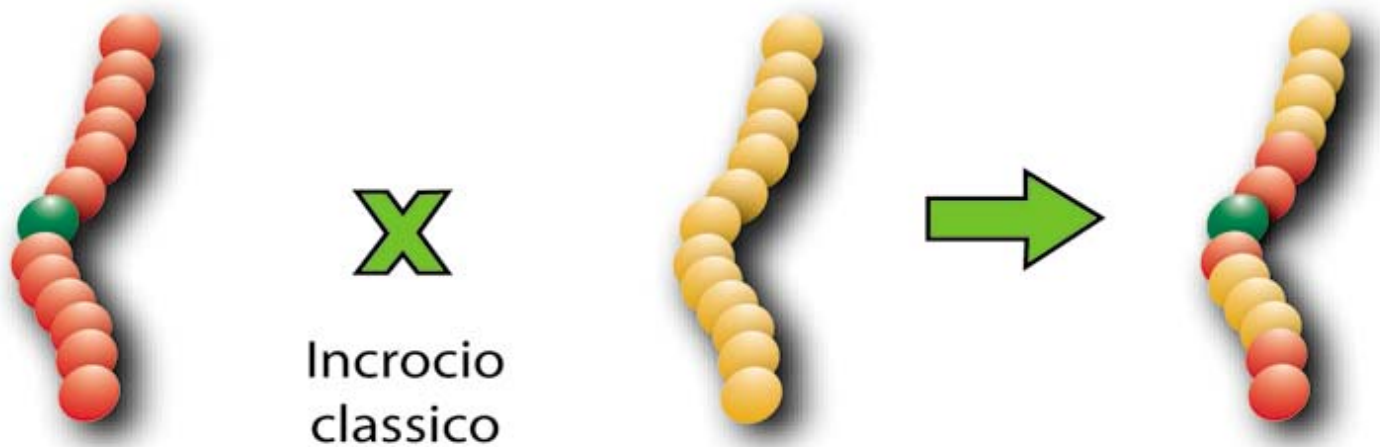
pompelmo rosa (Texas red)

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



OGM

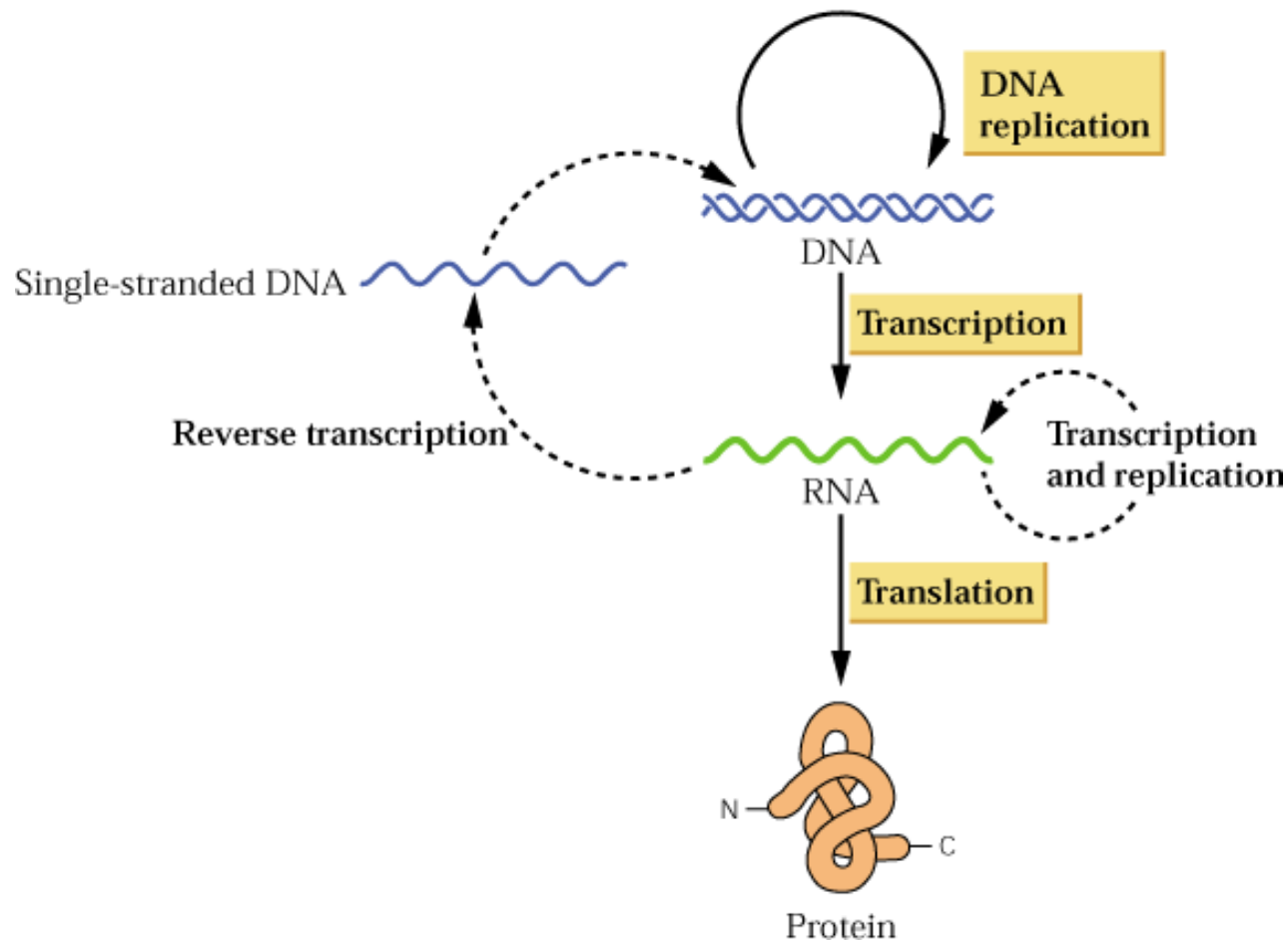
ORGANISMI GENETICAMENTE MODIFICATI

PGM

PIANTA GENETICAMENTE MODIFICATA

PIANTA TRANSGENICA

UNA PIANTA NELLA QUALE, MEDIANTE INGEGNERIA GENETICA, SONO STATE INTRODOTTE UNA O PIÙ COPIE DI UN GENE PROVENIENTE DA UN ORGANISMO DIVERSO O ULTERIORI COPIE DI UN GENE GIÀ PRESENTE NELLA STESSA SPECIE



Il **DNA esogeno** inserito nella pianta viene trascritto in RNA **messaggero** che a sua volta è tradotto in proteina.

La pianta transgenica produrrà la proteina esogena.

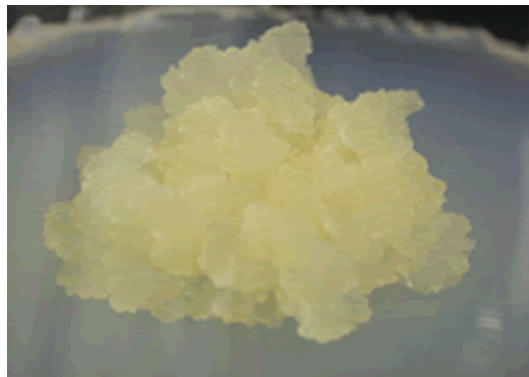
Generazione di piante transgeniche

L'elemento chiave che permette di trasformare la pianta è la capacità unica delle cellule vegetali di crescere, dividersi e rigenerare l'intera pianta

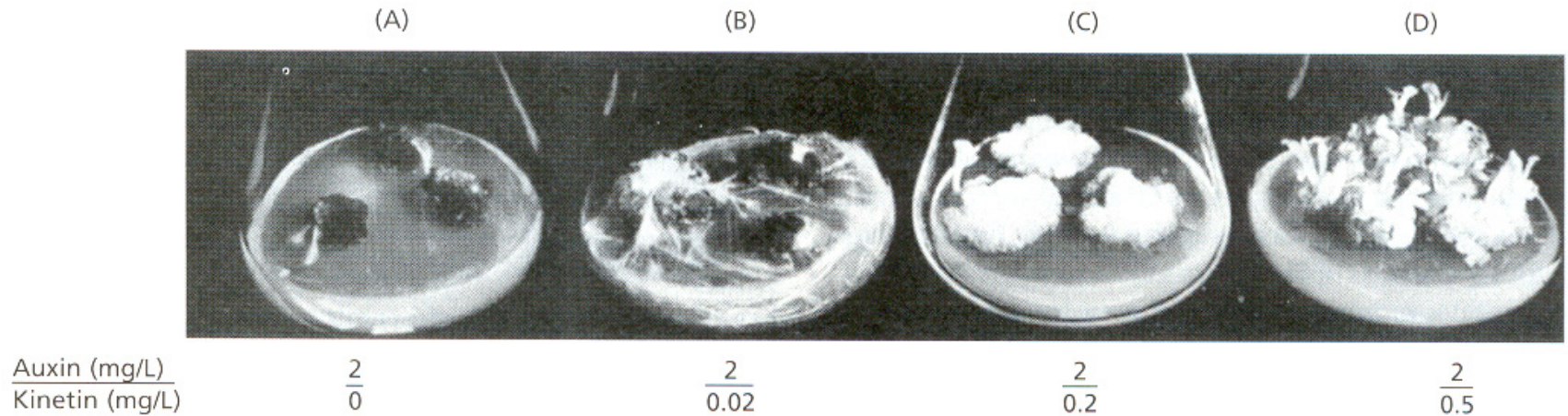


TOTIPOTENZA

Cellule vegetali private della parete cellulare (**protoplasti**) o parti di tessuto possono essere coltivate "in vitro", in appropriate condizioni, in modo da formare una massa di tessuto indifferenziato noto come callo



variando la concentrazione degli ormoni auxina e citochinina è possibile far sviluppare ai calli in coltura radici o coleottili



Dal callo si rigenererà l'intera pianta



metodi di trasferimento del DNA

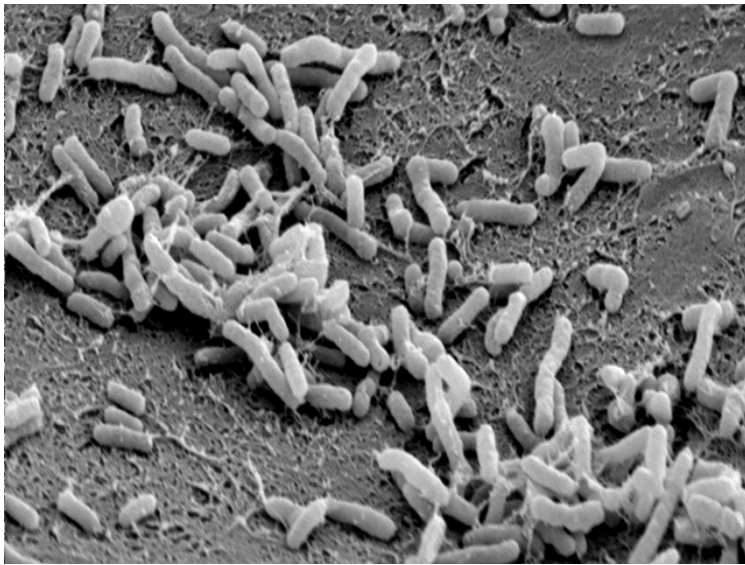
```
graph TD; A[metodi di trasferimento del DNA] --> B[Agrobacterium tumefaciens]; A --> C[Trasferimento diretto del DNA]; B --> D[Agrobacterium rhizogenes]; C --> E[sistema biolistico]; C --> F[trasformazione protoplasti]; C --> G[microiniezione];
```

Agrobacterium
tumefaciens

Agrobacterium
rhizogenes

Trasferimento
diretto del DNA

- sistema biolistico
- trasformazione protoplasti
- microiniezione



Agrobacterium

batterio del suolo Gram-negativo
infetta numerosi generi di piante
(*Brassica*, *Lilium*,
Lycopersicon, *Nicotiana*)

Agrobacterium tumefaciens

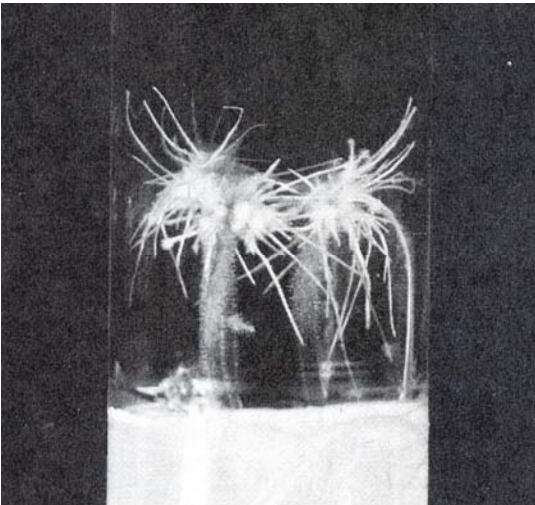
induce la formazione di tumori

galla del colletto →

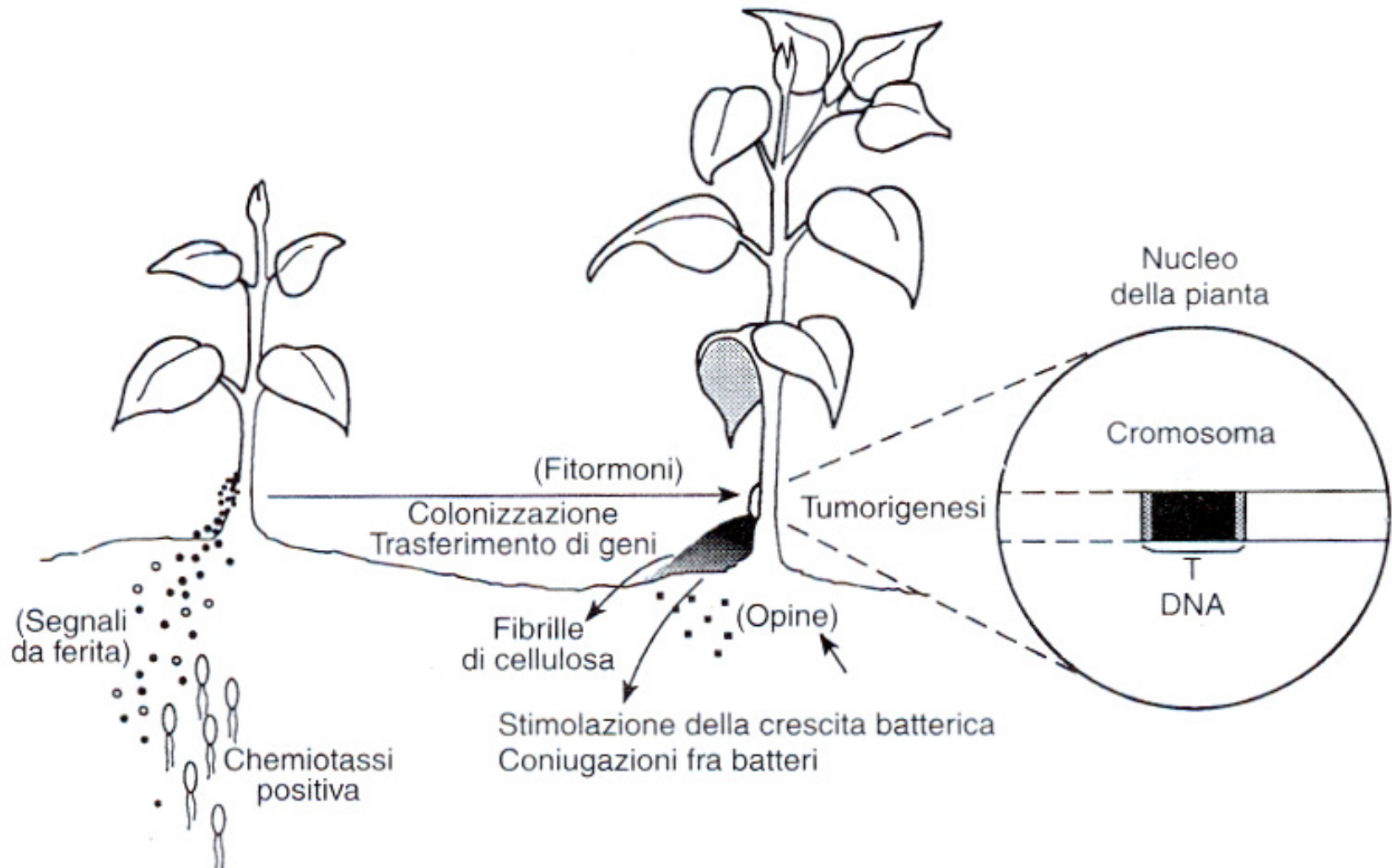


Agrobacterium rhizogenes

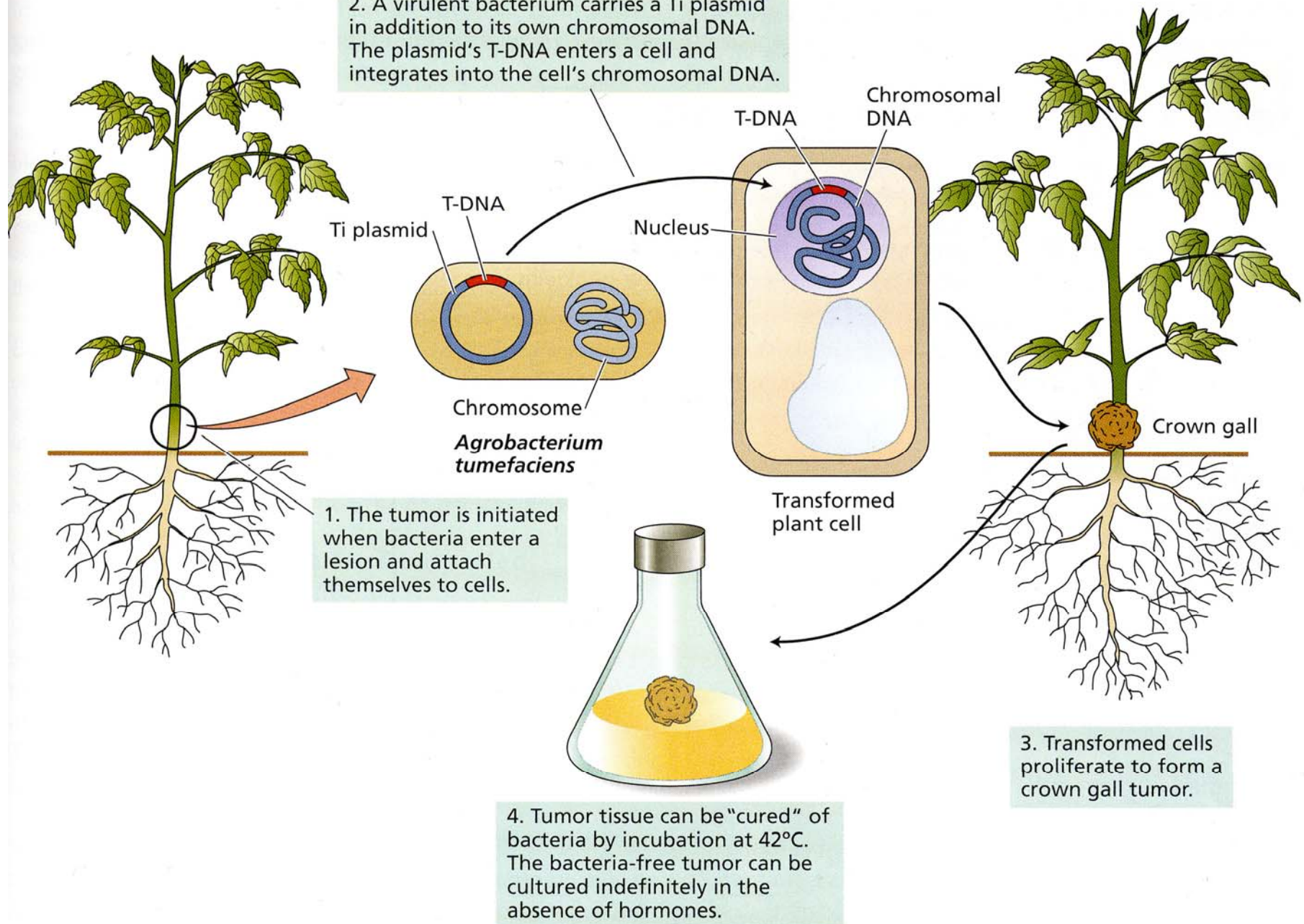
← induce la formazione di radici
avventizie nel sito di infezione



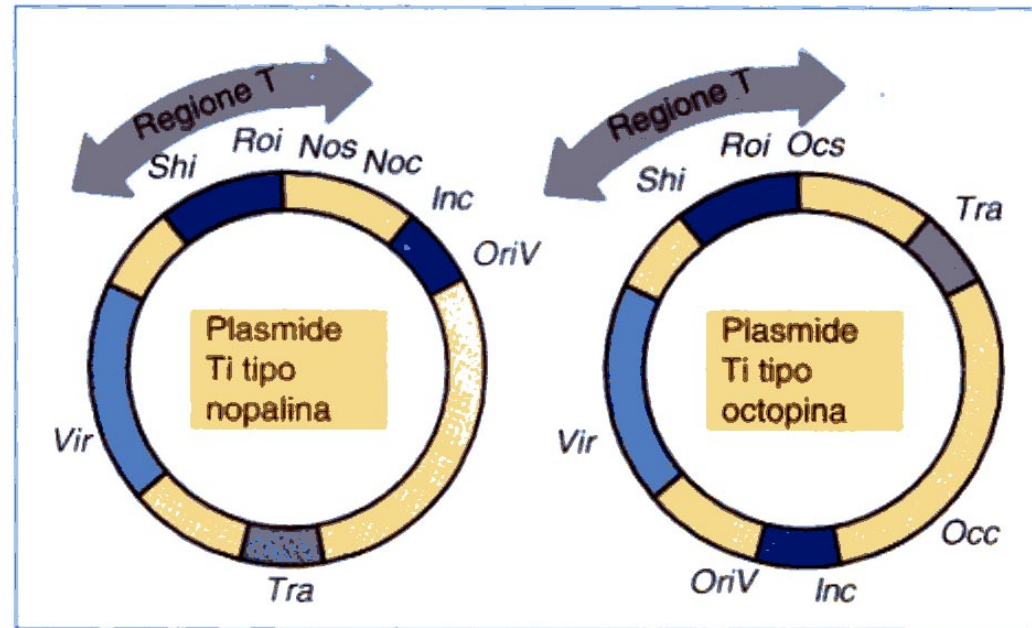
- Il fenotipo alterato è una conseguenza della trasformazione della cellula vegetale
- Il batterio è in grado di trasferire DNA nella cellule vegetali



2. A virulent bacterium carries a Ti plasmid in addition to its own chromosomal DNA. The plasmid's T-DNA enters a cell and integrates into the cell's chromosomal DNA.



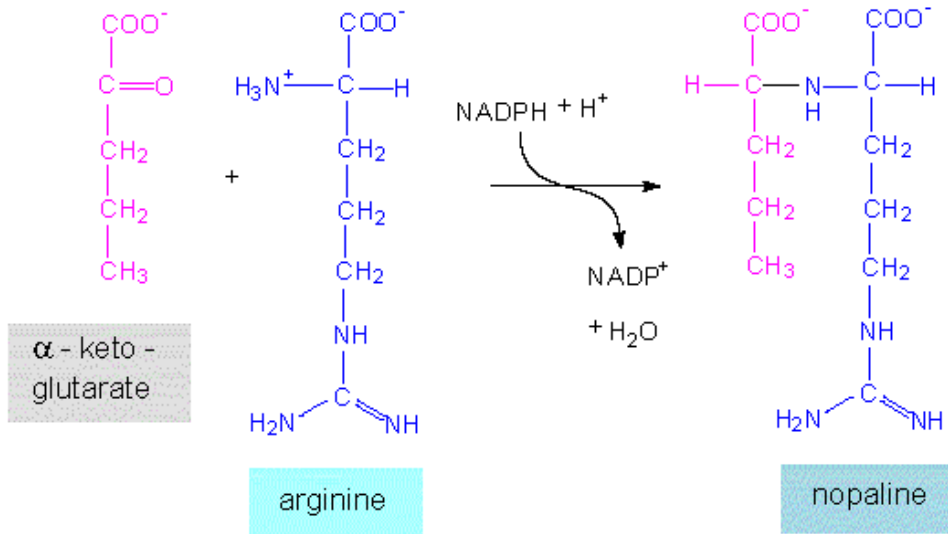
Plasmide Ti (Tumor inducing)



Locus

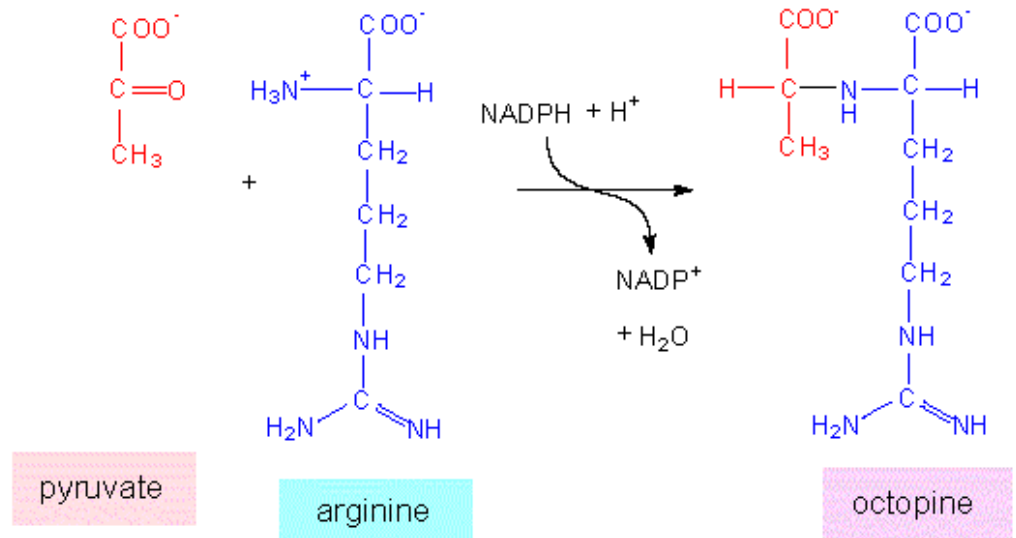
Funzione

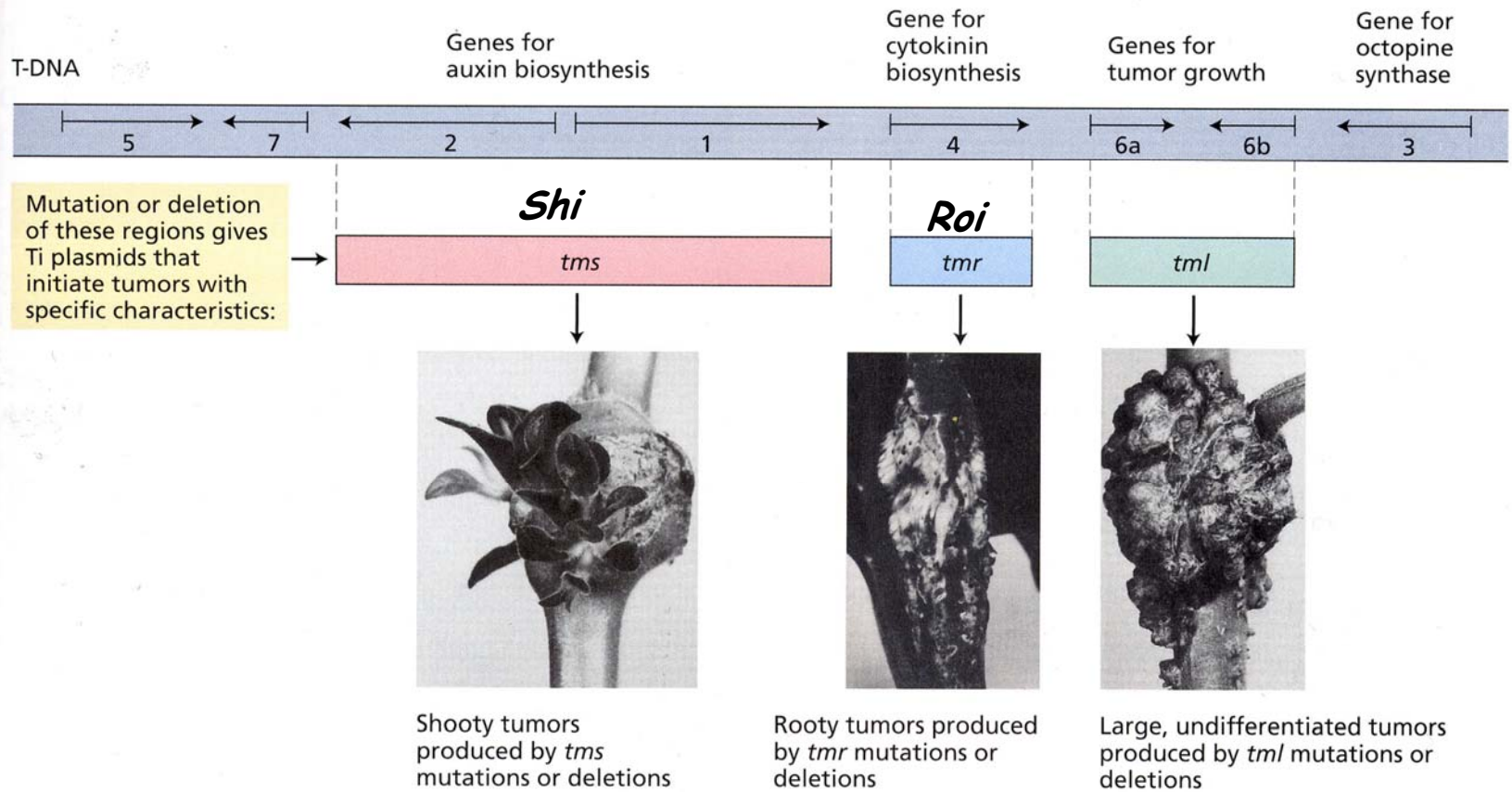
<i>Vir</i>	Trasferimento DNA
<i>Shi</i>	Induzione dei coleottili
<i>Roi</i>	Induzione delle radici
<i>Nos</i>	Sintesi della nopalina
<i>Noc</i>	Catabolismo della nopalina
<i>Ocs</i>	Sintesi della octopina
<i>Occ</i>	Catabolismo della octopina
<i>Tra</i>	Trasferimento di geni batterici
<i>Inc</i>	Geni di incompatibilità
<i>OriV</i>	Origine di replicazione



amminoacidi prodotti dalla pianta in seguito al trasferimento, dal plasmide Ti, dei geni codificanti per gli enzimi coinvolti nella loro sintesi

Agrobacterium utilizza tali sostanze come fonte di nutrimento





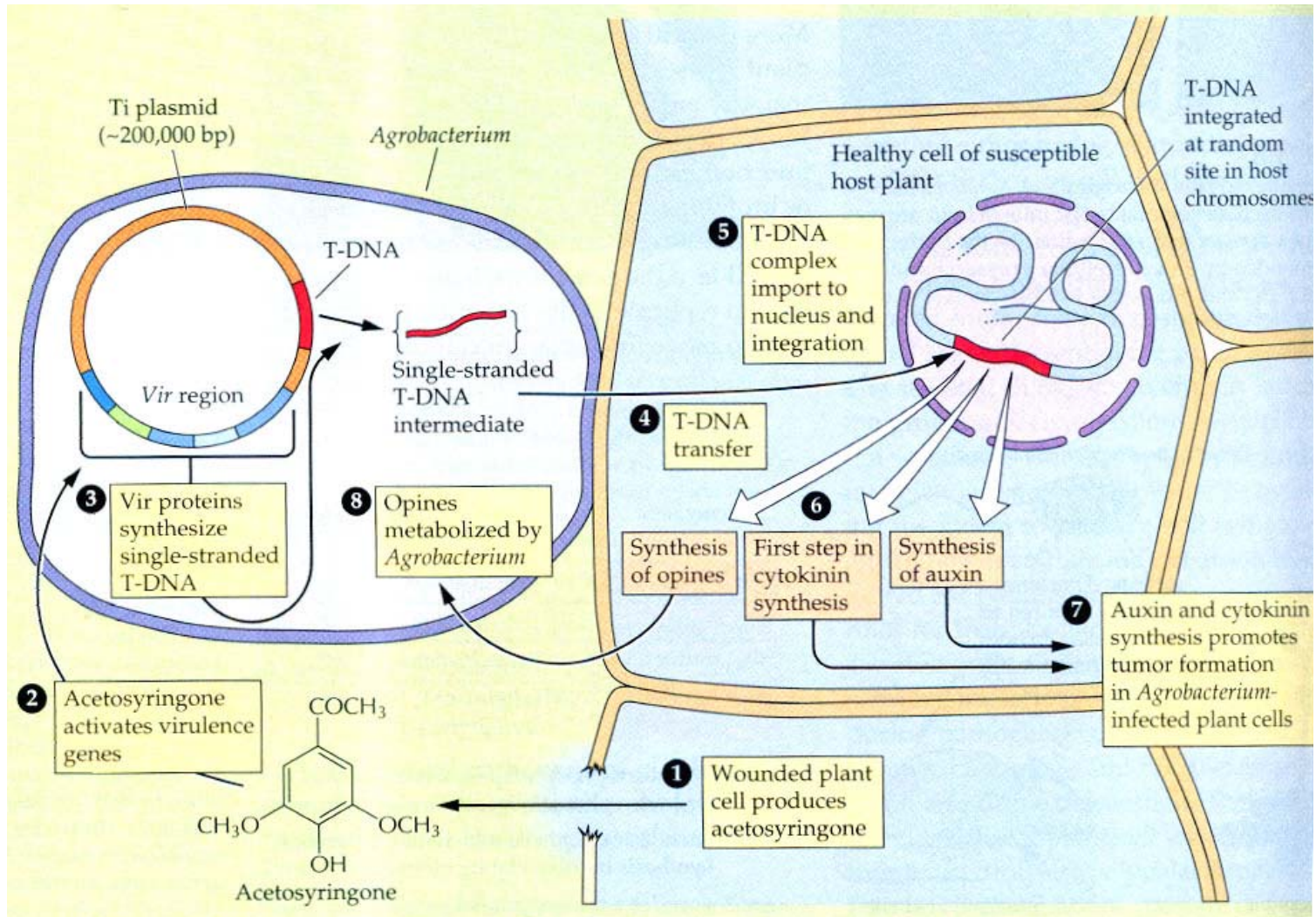
Gene 1 IAAM

Gene 2 IAAH

biosintesi auxina

Gene 4 ipt

biosintesi citochinine



1 ferita → produzione acetosiringone

2 acetosiringone → adescante chemiotattico
attivatore trascrizione geni *Vir*

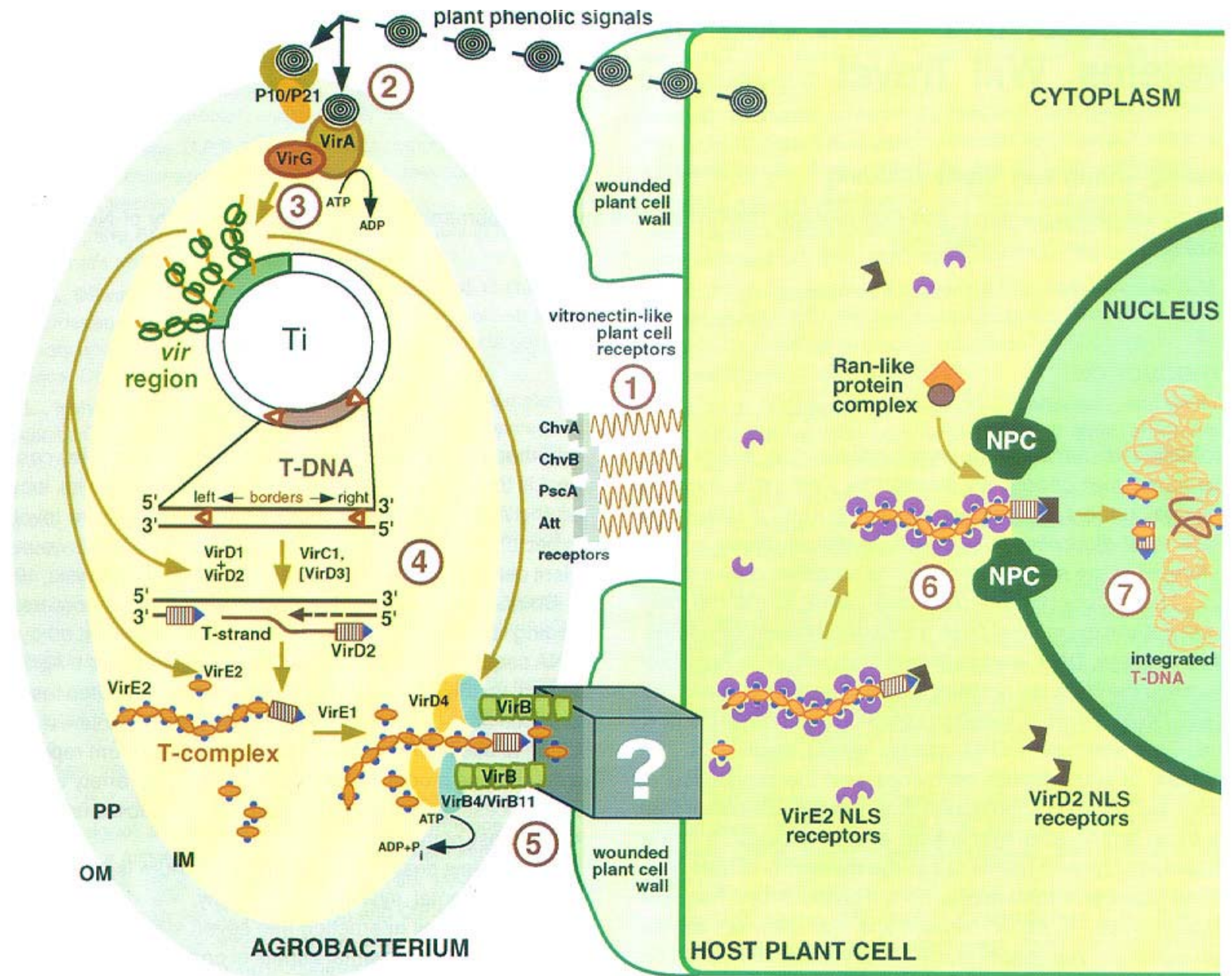
3 proteine *Vir* → produzione T-DNA
e suo targeting

4 trasferimento T-DNA

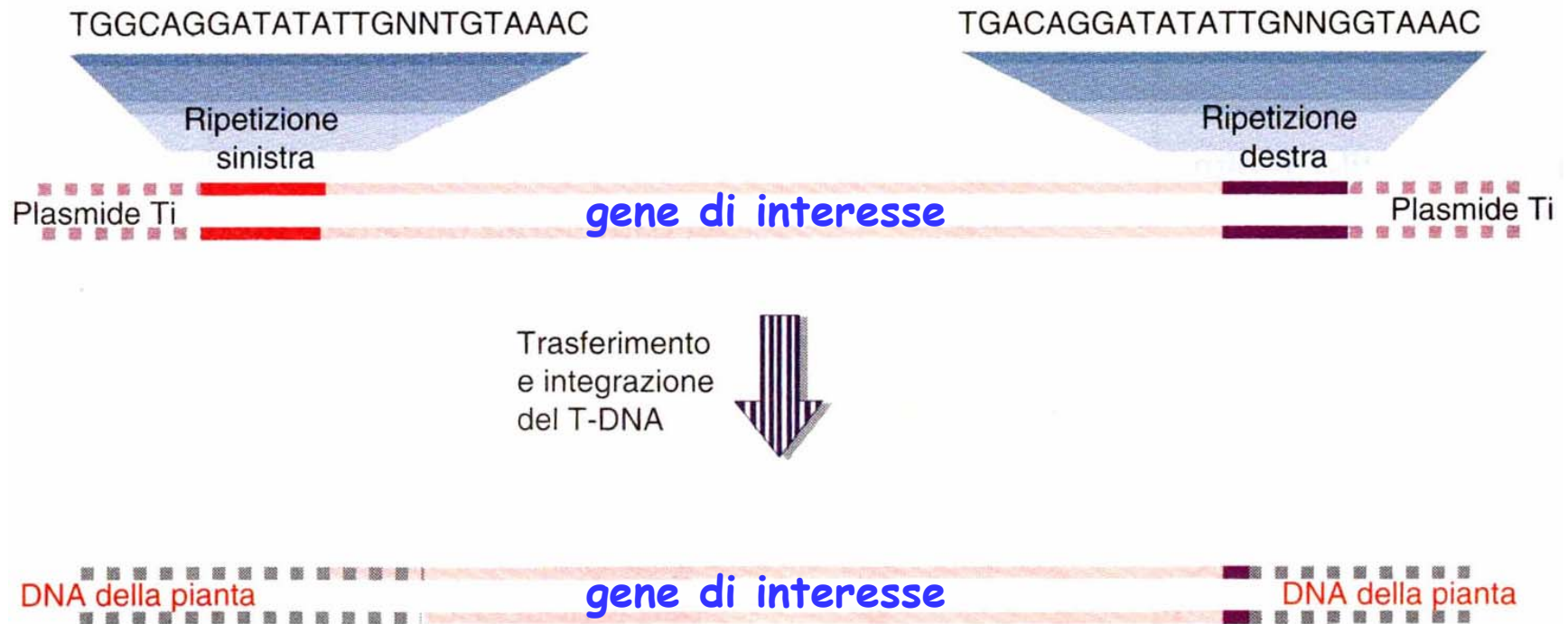
5 integrazione T-DNA

6 produzione ormoni e opine

7 formazione tumore



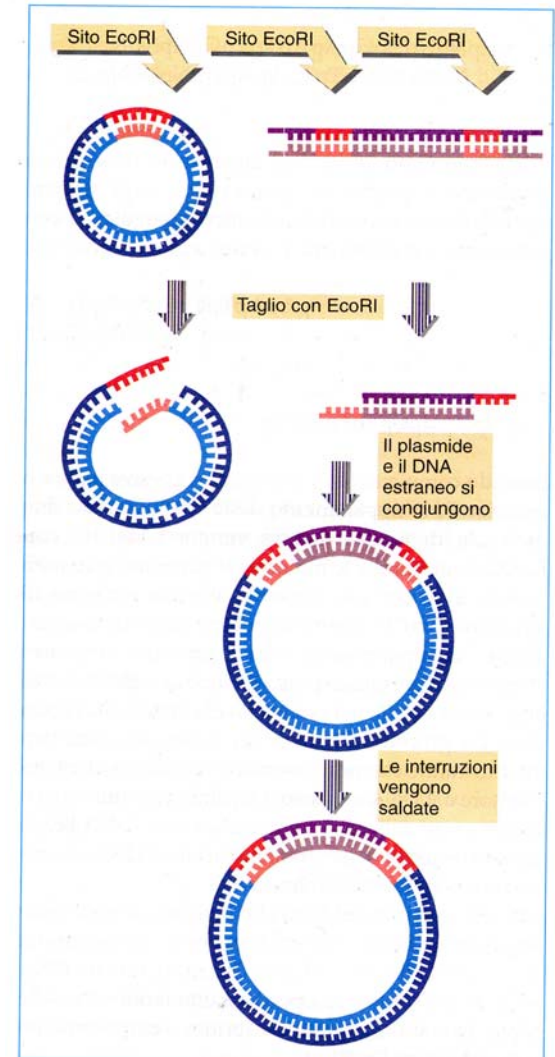
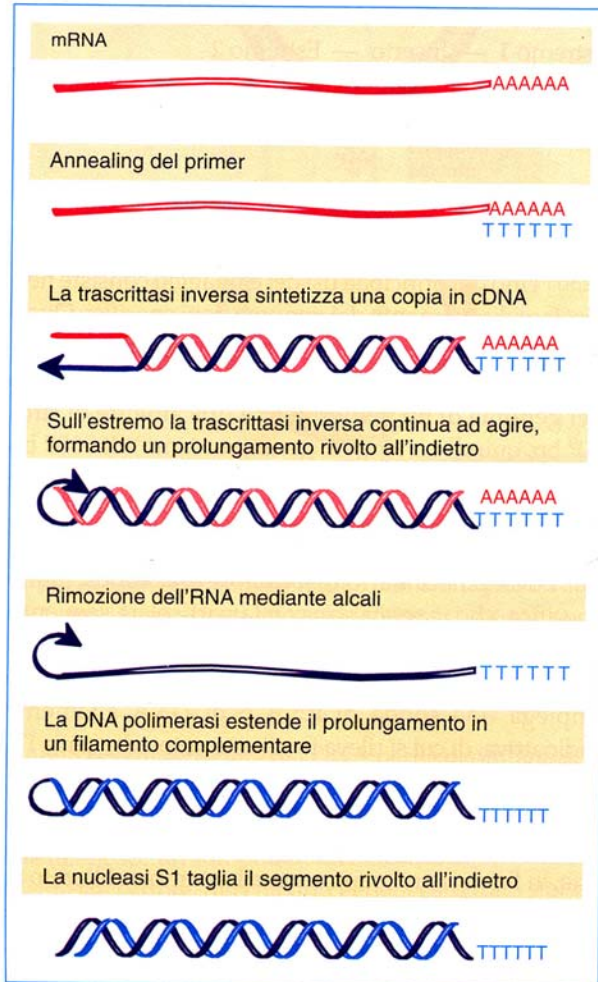
Agrobacterium è in grado di trasferire nel genoma vegetale qualsiasi sequenza si trovi delimitata dai **right** e **left borders**



Isolamento e clonaggio del gene di interesse

sintesi del cDNA

trascrittasi inversa: DNA-polimerasi
che utilizza l'mRNA come stampo



clonaggio del cDNA
in un plasmide

Il cDNA deve quindi essere trasferito nel plasmide Ti di *Agrobacterium tumefaciens*

Limitazioni all'uso di plasmidi Ti naturali

- la sovrapproduzione di auxina e citochinina (fenotipo tumorale) non permette la rigenerazione della pianta
- i geni per la biosintesi delle opine non sono necessari
- difficoltà nel manipolare plasmidi di dimensioni molto grandi come il plasmide Ti (200 kbp)
- non hanno un'origine di replicazione per *E. coli*



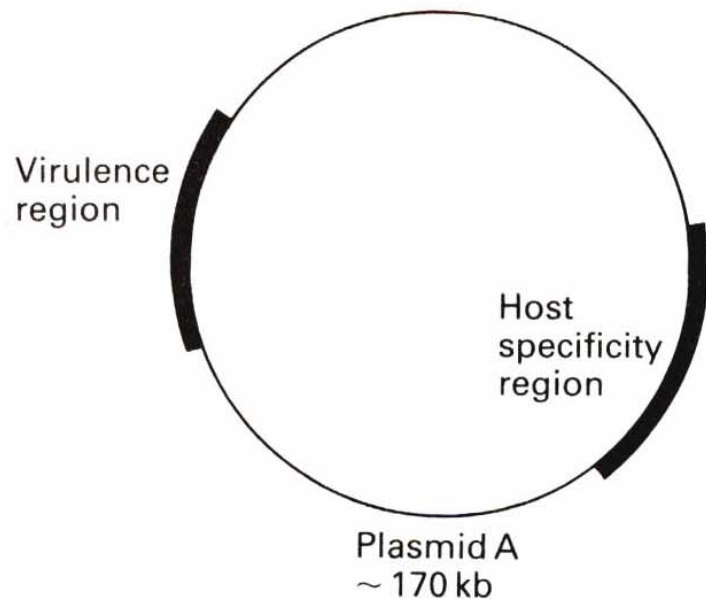
**sistema
vettore binario**

**sistema
vettore cointegrativo**

sistema vettore binario

Principio di base: DNA da trasferire e geni vir possono trovarsi su plasmidi differenti

plasmide Ti "disarmato"



vettore binario

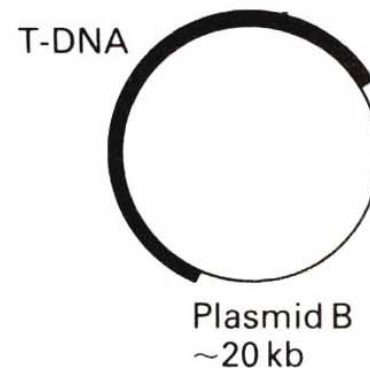
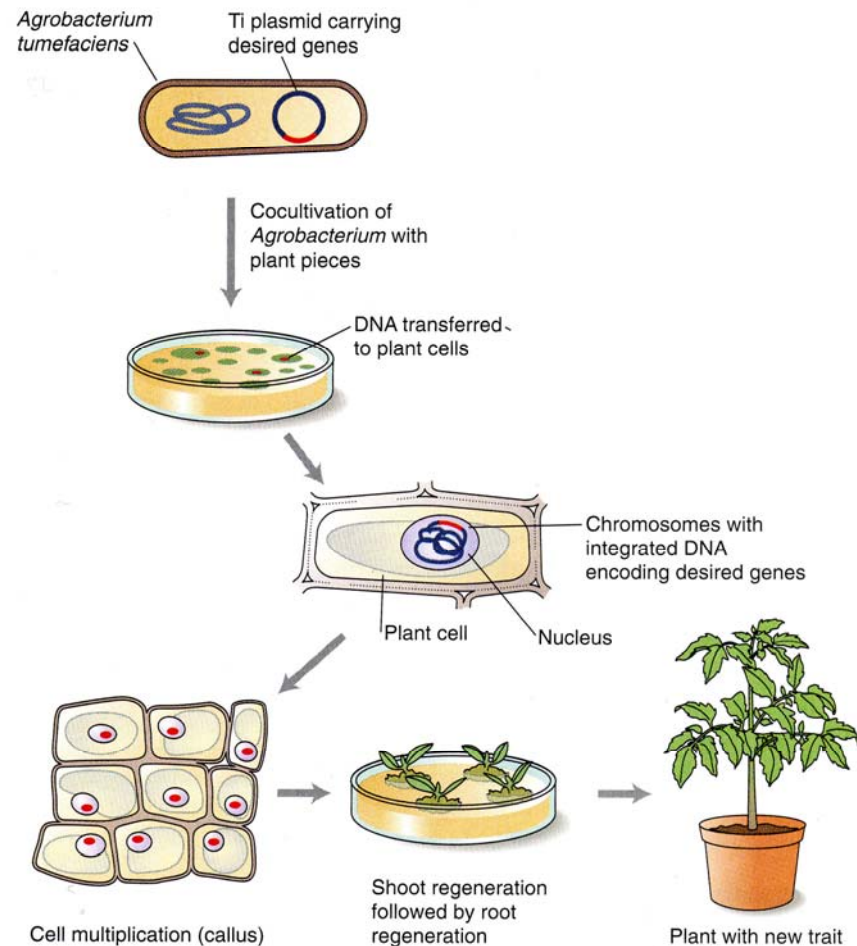


Figure 7.11 The binary vector strategy. Plasmids A and B complement each other when present together in the same *Agrobacterium tumefaciens* cell. The T-DNA carried by plasmid B is transferred to the plant chromosomal DNA by proteins coded by genes carried by plasmid A.

Per la trasformazione con *Agrobacterium* si utilizzano piccoli espianti di tessuti

foglie fusto radici gemme cotiledoni

da cui verrà rigenerata la pianta attraverso la formazione del callo



Con *Agrobacterium* si trasformano bene le dicotiledoni

- recentemente è stato dimostrato che è efficace anche per le monocotiledoni (maggiori difficoltà nella messa a punto di metodiche di rigenerazione)

Arabidopsis: trasformazione diretta dei semi
incubazione dei semi in soluzioni contenenti
Agrobacterium



crescita delle piantine trasformate



autofecondazione

metodi di trasferimento del DNA

```
graph TD; A[metodi di trasferimento del DNA] --> B[Agrobacterium tumefaciens  
Agrobacterium rhizogenes]; A --> C(Trasferimento diretto del DNA); C --> D[- sistema biolistico]; C --> E[- trasformazione protoplasti]; C --> F[- microiniezione];
```

*Agrobacterium
tumefaciens*

*Agrobacterium
rhizogenes*

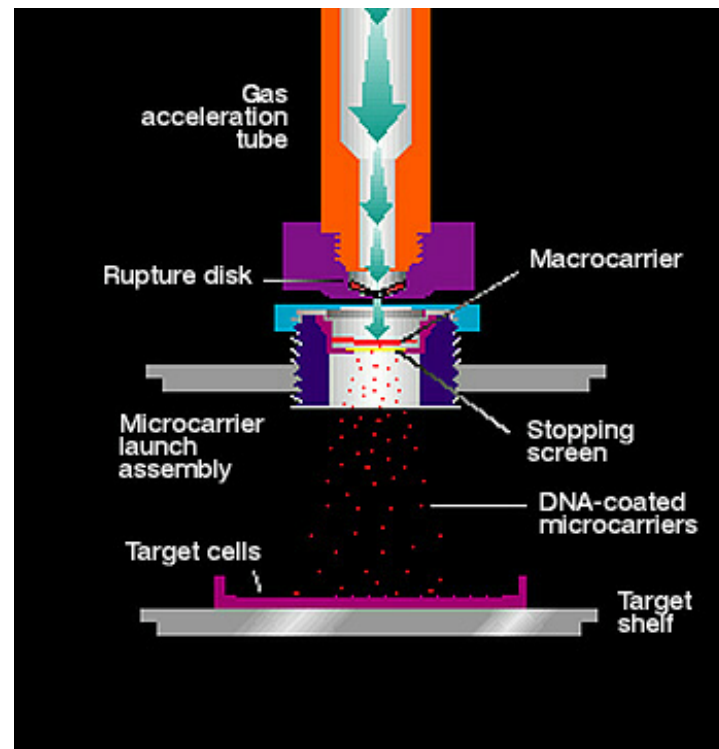
Trasferimento
diretto del DNA

- sistema biolistico
- trasformazione protoplasti
- microiniezione

SISTEMA BIOLISTICO PARTICLE GUN

1987 Sanford e colleghi

particelle di oro o tungsteno ricoperte di DNA vengono accelerate e "sparate" sul tessuto penetrando rilasciano il DNA che viene integrato nel genoma vegetale

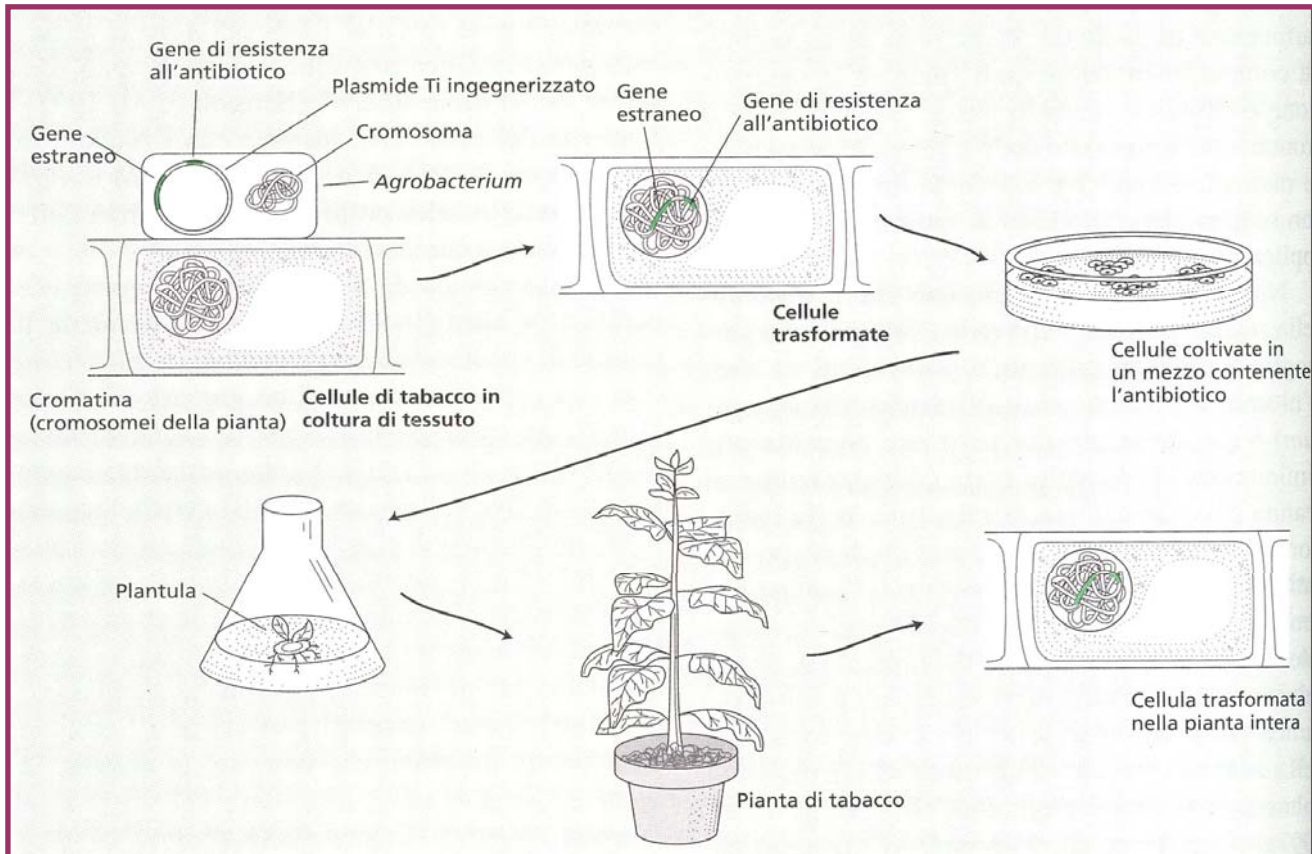


prima si usava
polvere da
sparo per
l'accelerazione
oggi He

SELEZIONE DELLE PIANTE TRASFORMATE

nel costrutto si inserisce un gene marcatore per la selezione

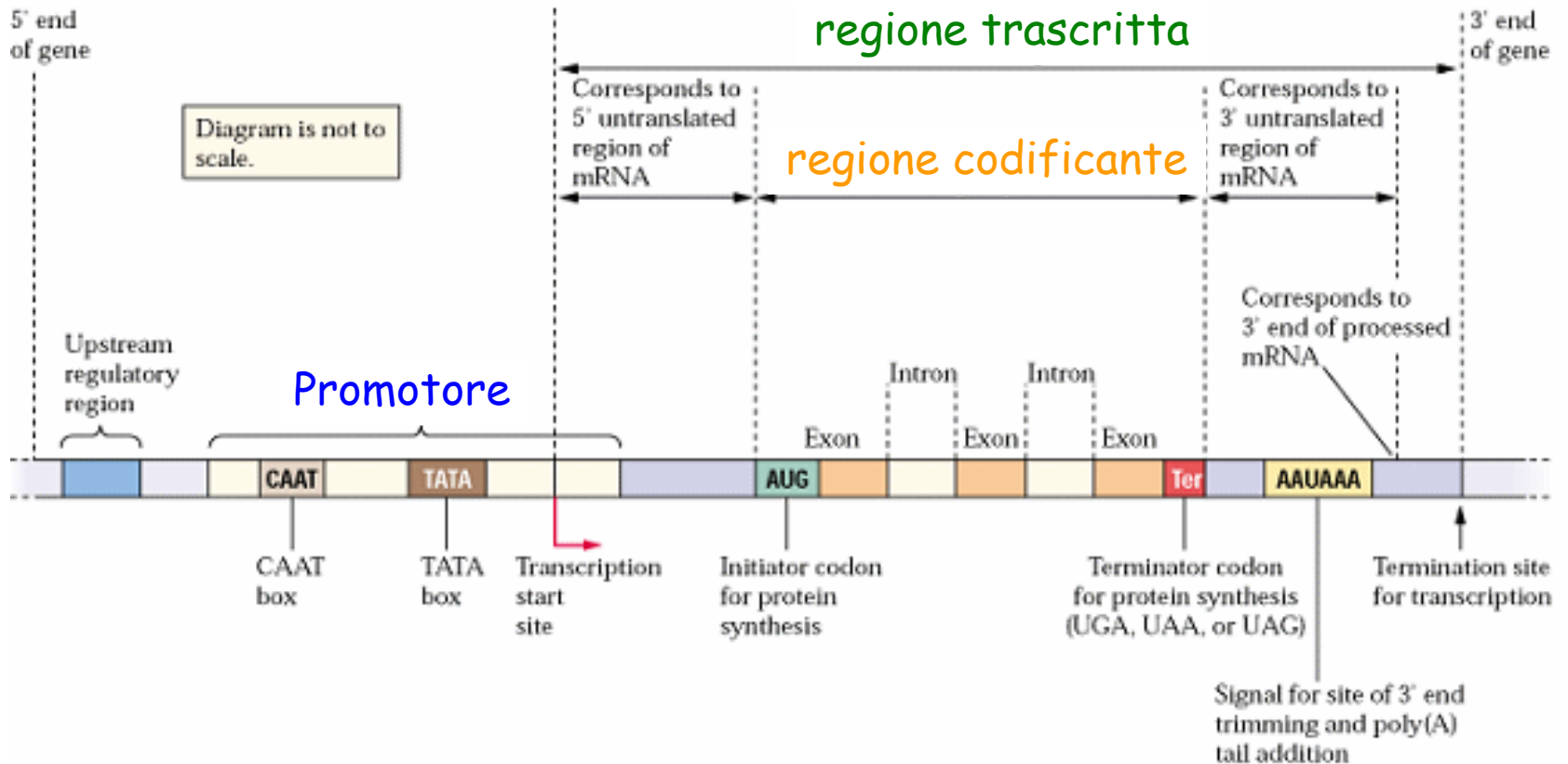
- Resistenza ad un **antibiotico**
- Resistenza ad un **erbicida**



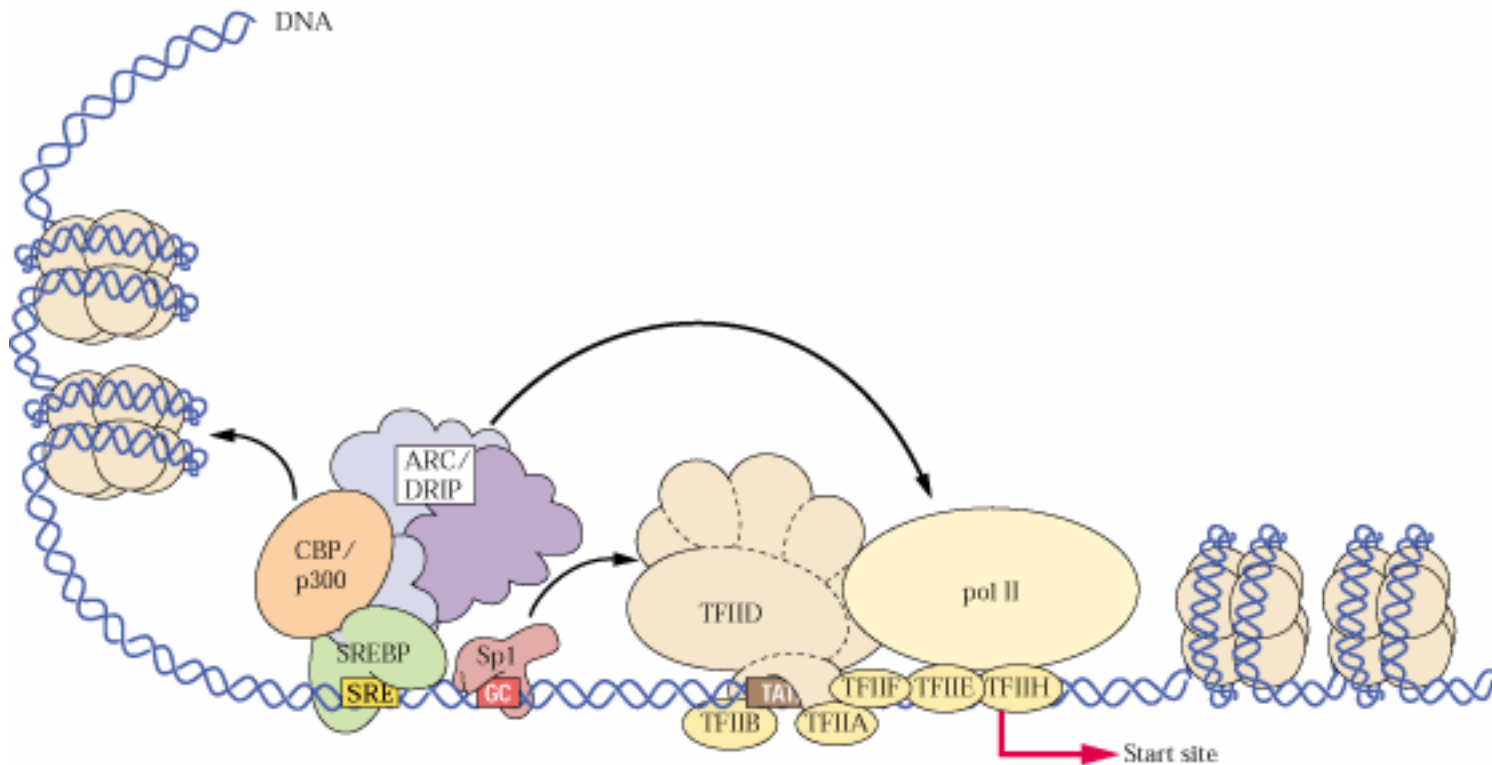
nel terreno di coltura viene aggiunto l'antibiotico o l'erbicida

COME SI PROGETTA UN COSTRUTTO TRANSGENICO?

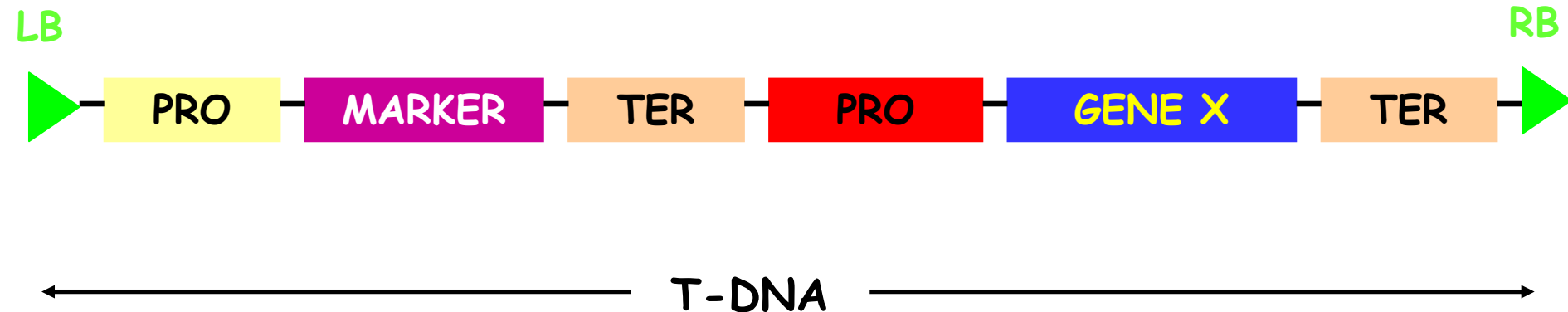
Struttura di un gene



l'RNA polimerasi e i fattori di trascrizione si legano al promotore e trascrivono il gene producendo l'RNA messaggero



COSTRUTTO TRANSGENICO



Per l'espressione del gene di interesse non è necessario utilizzare il promotore di quello specifico gene

- **Costitutivi**

- **CaMV 35S** (elevati livelli di espressione)
RNA 35S del virus a mosaico del cavolfiore
- **Actina di riso**
- **Ubiquitina di mais**
- **Nos, Ocs** (nopalina, octopina sintasi)

- **Inducibili**

- **espressione regolata dallo sviluppo**
- **indotti da luce, stress, ormoni**
- **da sostanze chimiche**

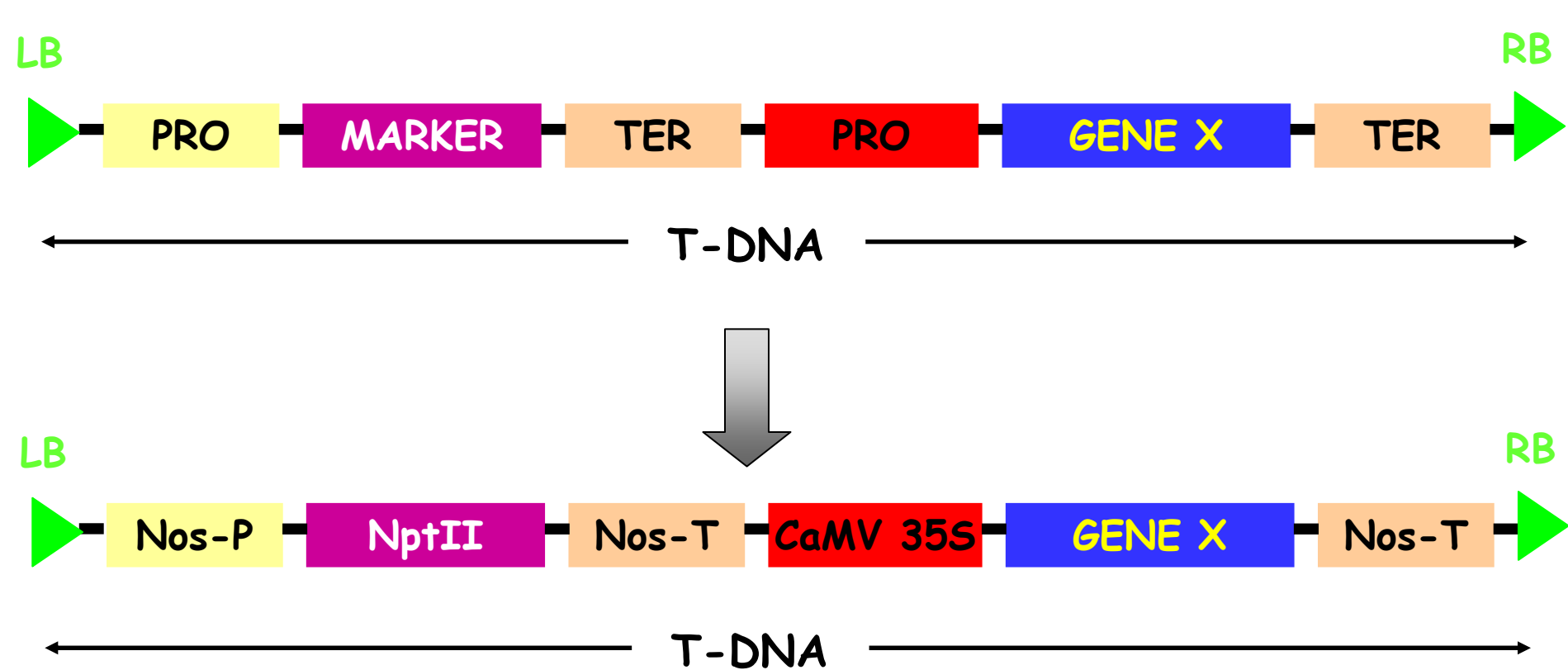
<i>Inducible promoters</i>	<i>Induction conditions</i>
Small subunit Rubisco	Light
Chlorophyll a/b binding protein	Light
Alcohol dehydrogenase-1	Anaerobiosis
Heat shock proteins	Heat shock
Chalcone synthase	Fungal elicitors
Potato inhibitor-II	Wounding

PROMOTORI

- Tessuto-specifici

- semi
- radici
- foglie
- polline
- etc.

<i>Tissue-specific promoters</i>	<i>Tissue expression</i>
α -Amylase	Aleurone
Glutenin	Endosperm
β -Hordenine	Endosperm
Phaseollin	Cotyledon



Nos-P

promotore del gene della Nopalina sintasi

NptII

Neomicina fosfotransferasi (resistenza alla Kanamicina)

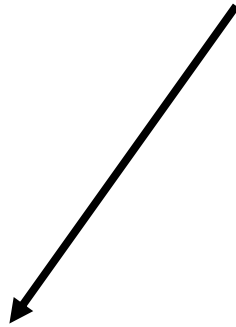
Nos-T

terminatore del gene della Nopalina sintasi

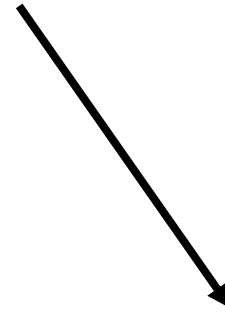
CaMV 35S

promotore del RNA 35S del virus a mosaico del cavolfiore

A che servono le piante transgeniche?



Applicazioni



Ricerca di base

Applicazioni

Tolleranza agli erbicidi

Resistenza a insetti e a patogeni

Resistenza a stress abiotici

Modificazione delle qualità nutrizionali (Vitamine, Amminoacidi, Amido)

Produzione di proteine di interesse farmaceutico
anticorpi
ormoni
vaccini edibili

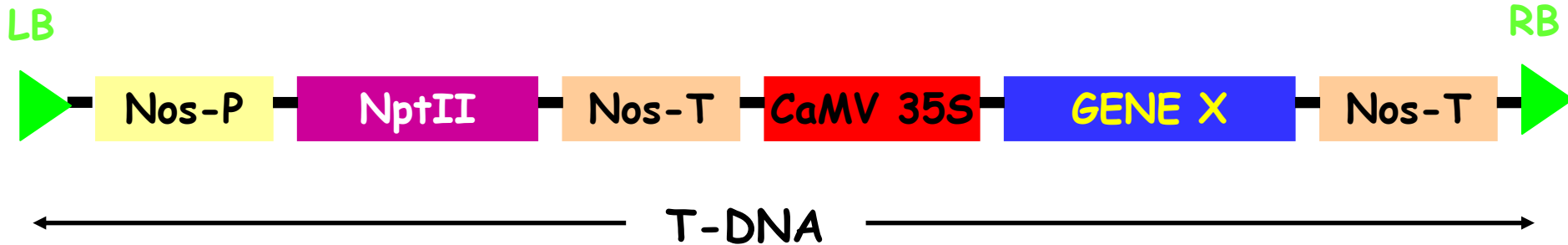
Ricerca di base

Favorire la comprensione e lo studio del ruolo fisiologico di molti geni



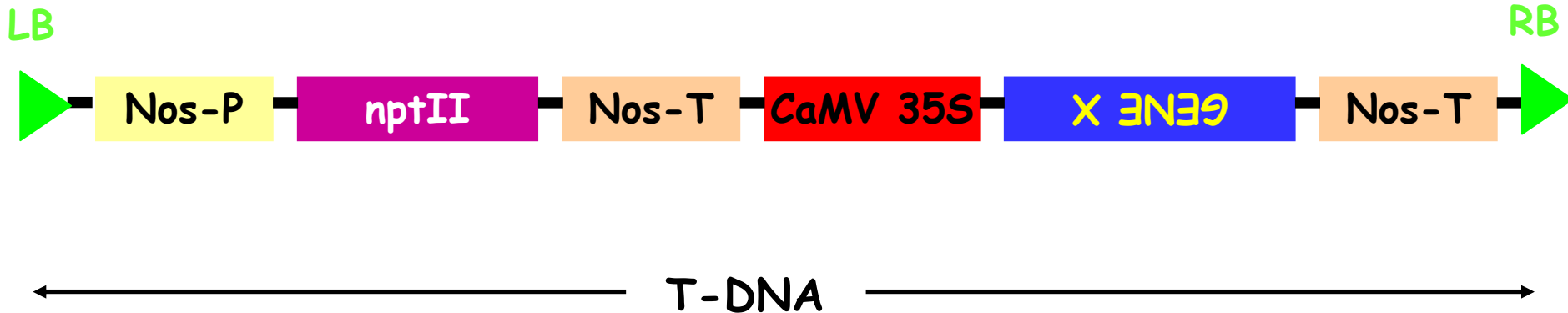
Effetti correlati alla sovraespressione o alla repressione di geni di interesse

Sovraespressione di un gene di interesse



- Trasformazione della pianta
- Analisi del fenotipo
- Saggi biochimico-funzionali

Riduzione dell'espressione di un gene di interesse



- Trasformazione della pianta
- Analisi del fenotipo
- Saggi biochimico-funzionali

Strategia ANTI-SENSO

5'  AGGTCAGTTA  3' **senso**
3'  TCCAGTCAAT  5'



mRNA 5'  AGGUCAGUUA  AAAAAA 3'

5'  TAACTGACCT  3' **anti-**
3'  ATTGACTGGA  5' **senso**



mRNA 5'  UAACUGACCU  AAAAAA 3'

5'  AGGUCAGUUA  AAAAAA 3'
3' AAAAAA  UCCAGUCAAU  5'

L'RNA a doppio filamento
viene degradato