

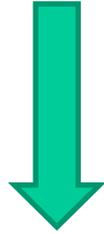
Che cosa si può fare con le piante transgeniche?

- Esprimere **geni eterologhi** (da altre specie)
- Sovraesprimere o controllare l'espressione di geni endogeni
- “Spegnere” un gene specifico sfruttando il fenomeno del **silenziamento genico**

Per scopi di ricerca:

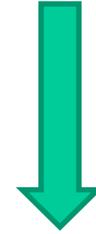
- studiare come regola l'espressione di un gene un promotore;
- produrre mutazioni in geni di cui si vuole studiare la funzione (reverse genetics);
- identificare nuovi geni (T-tagging).

CLASSICAL BREEDING



Viene modificato l'intero genoma (incrocio)

TRANSGENESIS



Viene modificata una parte limitata del genoma

1. Sequenza
2. Ordine delle sequenze
3. Sistema di regolazione

POSSIBILI INTERVENTI

1. Wild transfer (trans-genico)
2. Close transfer (cis-genico)
3. Tweaking (controllo espressione)

Il mais trasformato con la tossina del *Bacillus thuringiensis*

Mais Bt transgenico / Mais non transgenico



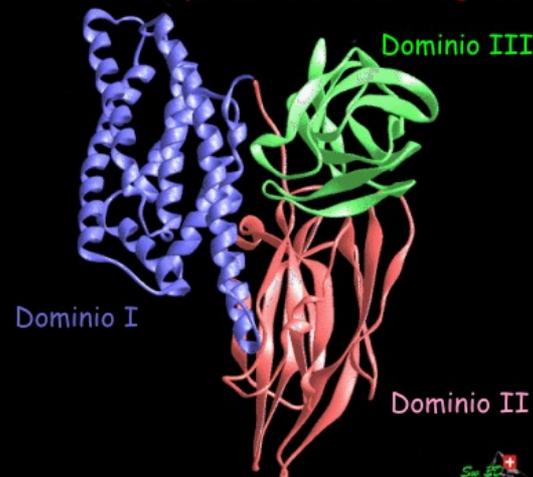
Piralide adulta



Larva di piralide



Endotossina prodotta da *B. thuringiensis*



La tossina intera è 1800 bp

B. thuringiensis kurstaki
Bt11_CryIA
Putative Bt176 CryIA
Mon810_CryIA

```
      80      90      100     110     120     130     140
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ATTCCTTATAATTGTTTAAAGTAAACCTGAAGTAGAAGTATTAGGTGGAGAAAGAATAGAAACTGGTTACA
ATTCCATACAACCTGCTTGAGTAAACCCAGAAGTTGAAGTACTTGGTGGAGAACGCATTGAAAACCGGTTACA
ATCCCCTACAACCTGCCTGAGCAACCCCGAGGTGGAGGTGCTGGGCGGCAGCGCATCGAGACCGGCTACA
ATCCCCGTACAACCTGCCTCAGCAACCCCTGAGGTCGAGGTGCTCGGCGGTGAGCGCATCGAGACCGGTTACA
```

B. thuringiensis kurstaki
Bt11_CryIA
Putative Bt176 CryIA
Mon810_CryIA

```
      150     160     170     180     190     200     210
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CCCCAATCGATATTTCTTGTGCGCTAACGCAATTTCTTTTGAGTGAATTTGTTCCCGGTGCTGGATTTGT
CTCCCATCGACATCTCCTTGTCTTGACACAGTTTCTGCTCAGCGAGTTCGTGCCAGGTGCTGGGTTTCGT
CCCCCATCGACATCAGCCTGAGCCTGACCCAGTTCTTCTGCTGAGCGAGTTCGTGCCCGGCGCCGGCTTCGT
CCCCCATCGACATCTCCTTCTCCCTCACGCAGTTCTTCTGCTCAGCGAGTTCGTGCCAGGCGCTGGCTTCGT
```

B. thuringiensis kurstaki
Bt11_CryIA
Putative Bt176 CryIA
Mon810_CryIA

```
      220     230     240     250     260     270     280
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GTTAGGACTAGTTGATATAATATGGGGAATTTTTGGTCCCTCTCAATGGGACGCATTTCTTGTACAAATT
TCTCGGACTAGTTGACATCATCTGGGGTATCTTTGGTCCATCTCAATGGGATGCATTCTTGGTGCAAATT
GCTGGGCCTGGTGGACATCATCTGGGGCATCTTCGGCCCCAGCCAGTGGGACGCCTTCTTGGTGCAATC
CCTGGGCCTCGTGGACATCATCTGGGGCATCTTTGGCCCCCTCCAGTGGGACGCCTTCTTGGTGCAATC
```

Pomodoro geneticamente modificato per un gene endogeno (poligalatturonasi, PG)



Pomodoro *Flavr-Savr*

Piante transgeniche resistenti ai virus



[Wageningen University, Laboratory of Virology]

- **PGM di I generazione:** piante transgeniche costituite per incrementare la produttività, migliorando le difese contro patogeni e avversità ambientali, ridurre i costi e facilitare le pratiche agronomiche (es. mais-Bt; soia Round- up Ready).
- **PGM di II generazione:** piante transgeniche costituite per migliorare la qualità dei prodotti finali (es. Golden rice).
- **PGM di III generazione:** piante transgeniche costituite per ottenere prodotti con nuove proprietà come vaccini, componenti del sangue, anticorpi, vitamine, ormoni e enzimi terapeutici di origine umana o animale, cosmetici, bioplastiche.

Piante autorizzate nel mondo

Specie	Transgeni	Caratteri principali
Mais	Cry 1A(b) EPSPS <i>pat</i> Barnase	Resistenza a lepidotteri Tolleranza a glifosate Tolleranza a glufosinato-ammonio Maschiosterilità
Pomodoro	PG antisenso ACC-sintasi	Ritardata marcescenza Ritardata maturazione
Soia	EPSPS Δ 1,2 desaturasi	Tolleranza a glifosate Aumento di acido oleico
Patata	Cry 3A CP	Resistenza coleotteri Resistenza a virus PVY
Cotone	Nitrilasi EPSPS Acetolattato-sintasi	Tolleranza a bromossinile Tolleranza a glifosate Tolleranza sulfonilurea
Colza	ACP tioesterasi EPSPS, Gox <i>pat</i> Barnase Nitrilasi 3-fitasi	Incremento in acido laurico Tolleranza a glifosate Tolleranza a glufosinato-ammonio Maschiosterilità Tolleranza a bromossinile Degradazione dei fitati
Bietola	EPSPS <i>pat</i> CP	Tolleranza a glifosate Tolleranza a glufosinato-ammonio Resistenza a WMV2, CMV e ZYMV
Lino	Acetolattato-sintasi	Tolleranza a sulfonilurea
Melone	Sam-K	Ritardata maturazione
Radicchio	Barnase	Maschiosterilità



Cotone-Bt: trasformazione con il gene *cry1* codificante la tossina di *Bacillus thuringiensis*



Pioppo Bt



Foglie di pioppo transgenico resistente agli insetti in seguito ad inserimento del gene Bt

Patata New-leaf

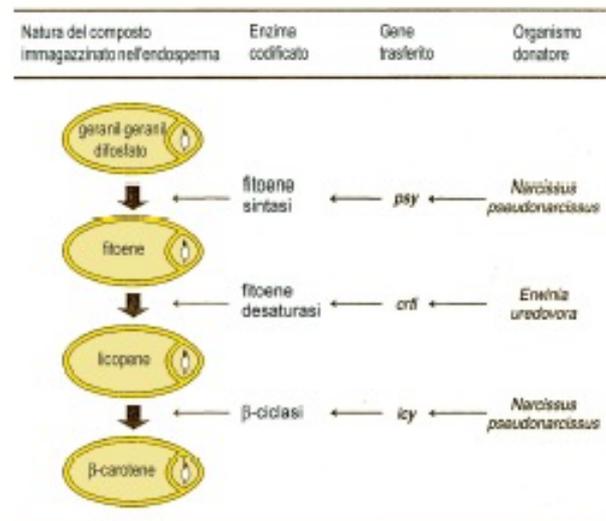
Dorifora
(*Leptinotarsa decemlineata*)



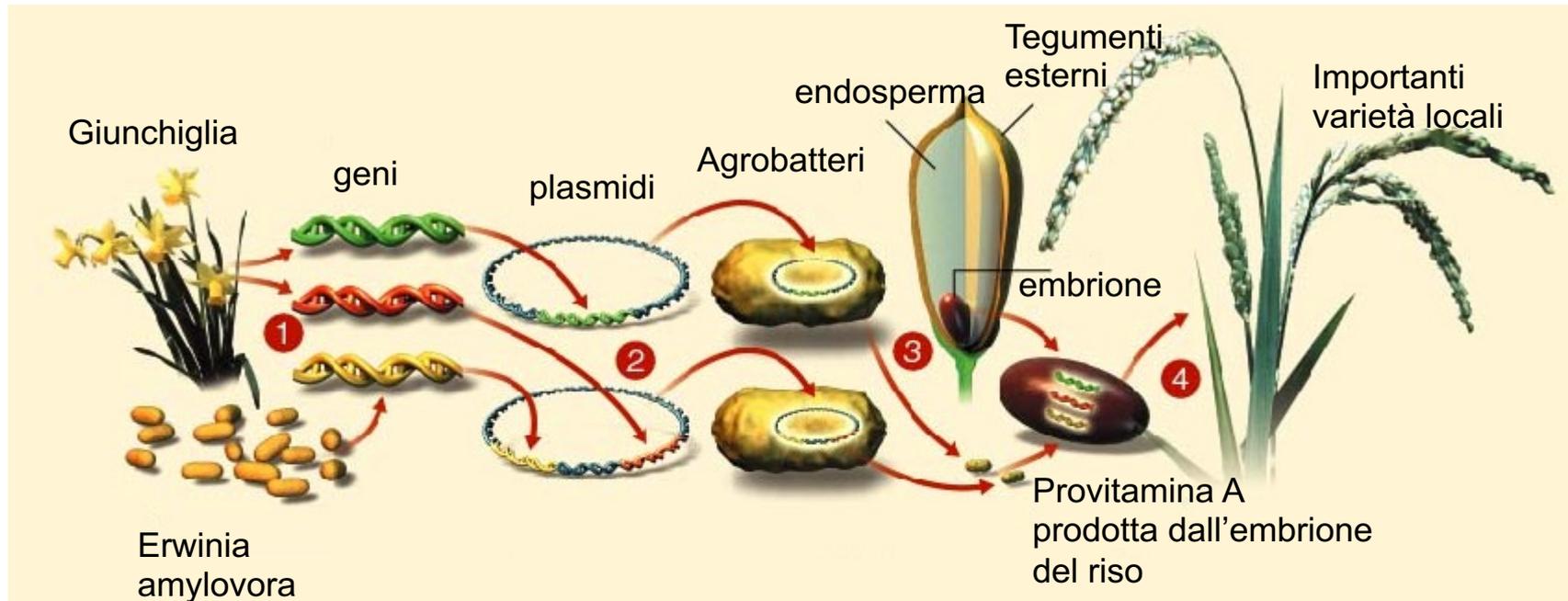
Mais-RR (Roundup Ready)



“Golden-rice”



Le possibilità applicative delle PGM di II e III generazione



1 I geni che danno al golden rice la possibilità di sintetizzare il beta-carotene nel suo endosperma (parte interna della cariosside) provengono dalla giunchiglia e da un batterio (*Erwinia amylovora*)

2 Questi geni con i loro **promotori** sono inseriti in un **plasmidi** presenti nell'*Agrobacterium tumefaciens*

3 Questi *Agrobatteri* sono poi addizionati a contenitori in cui sono presenti embrioni di riso. Durante il processo di infezione degli embrioni sono trasferiti anche i geni per la produzione del beta-carotene

4 La pianta transgenica di riso viene incrociata con varietà locali già perfettamente acclimate nelle regioni in cui si intende introdurre la pianta geneticamente modificata.

In questo caso si mira a fornire del riso arricchito in vitamina A. La carenza di tale vitamina, particolarmente presente nei paesi dove la dieta è basata su questo cereale, comporta una maggiore incidenza della cecità nei bambini.

Golden rice: primo esempio concreto di applicazione dell'ingegneria genetica per il miglioramento della qualità nutrizionale dei semi



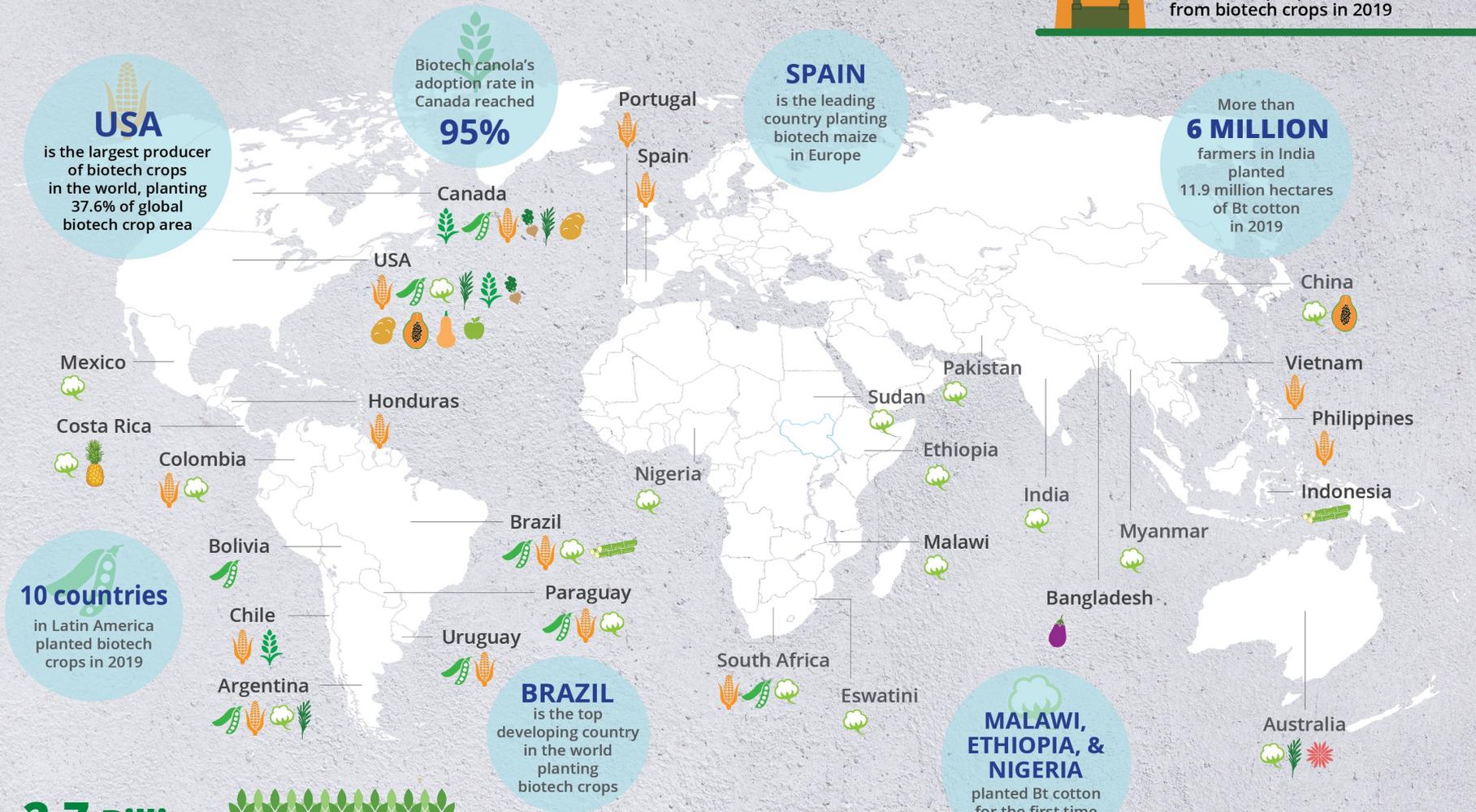
Do you know where biotech crops are grown?

More than 30 countries have planted biotech crops since 1996. See where they were grown in 2019.



17 MILLION

small, resource-poor farmers and their families totaling >65 million people benefited from biotech crops in 2019



2.7 Billion

hectares of biotech crops planted since 1996



Soybeans	Alfalfa	Eggplant
Maize	Papaya	Sugarcane
Cotton	Squash	Pineapple
Canola	Potato	Safflower
Sugar beets	Apples	

For more information on biotech crops, visit www.isaaa.org

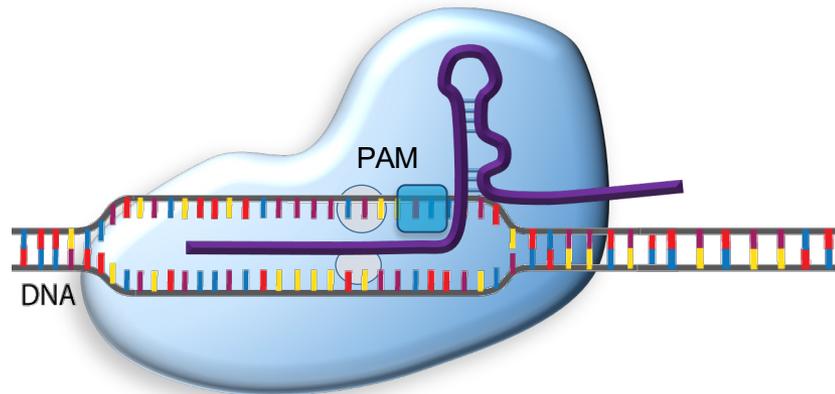


NUOVE TECNOLOGIE: “GENOME EDITING”

I limiti della trasformazione nucleare

- Elevata variabilità nel grado di espressione del gene a causa dell'effetto di posizione.
- Procedure molto lunghe per introdurre più geni: ci sono voluti 7 anni di lavoro per introdurre in riso un set di 3 geni (golden rice); questa catena genica produce beta-carotene il precursore della vitamina a.

RNA based genome engineering platform



Il sistema CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats and CRISPR-associated) ha rivoluzionato la biologia molecolare.

Il sistema permette di determinare la produzione di “DNA double-strand breaks (DSB)” potenzialmente in ogni sito del genoma.

E anche se questo era possibile in precedenza utilizzando diverse tecnologie il sistema CRISPR/Cas è vantaggioso perché la specificità di sequenza è ottenuta mediante sequenze a RNA che possono essere disegnate facilmente.

Nel sistema naturale un complesso della proteina multi-dominio Cas9 e 2 brevi RNAs, tracrRNA e crRNA, taglia plasmidi esogeni o DNA virali che entrano nella cellula batterica.

La possibilità di taglio dipende dalla presenza di un breve motivo di sequenza localizzato in prossimità della sequenza bersaglio denominato proto-spacer adjacent motif (PAM).

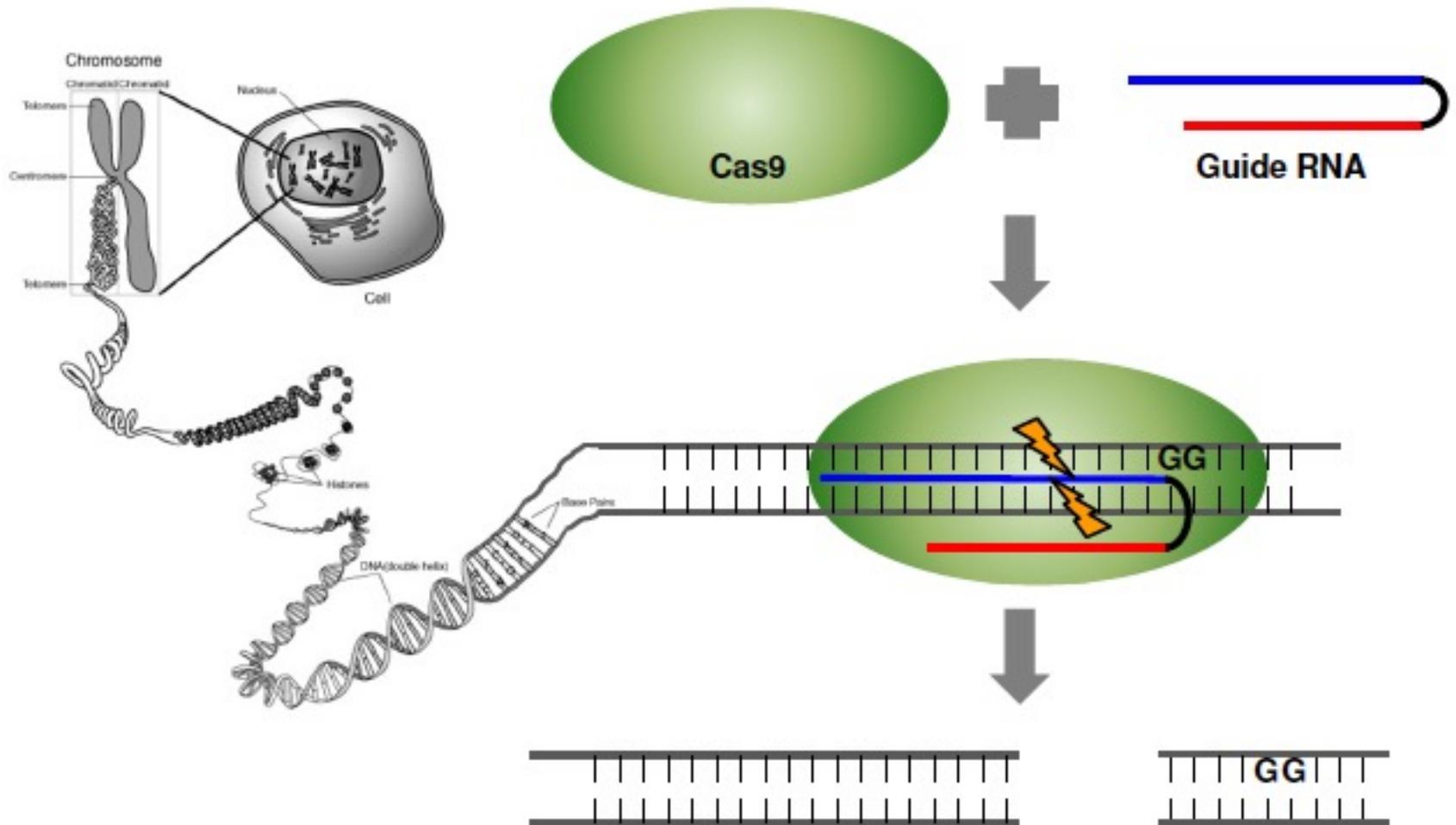
Cas9 contiene due domini nucleasici, RuvC e HNH, ciascuno in grado di tagliare un filamento interessando 3 bp a valle di PAM.

Nella sua applicazione più semplice il sistema CRISPR/Cas può essere utilizzato per mutagenesi sequenza-specifica che è attualmente una procedura di routine.

La procedura è utilizzata principalmente per alterare sequenze codificanti per analizzare la loro funzione ma può ugualmente essere impiegata per migliorare caratteri di interesse agronomico nelle specie coltivate.

In realtà il sistema CRISPR/Cas è molto versatile perché Cas9 può essere modificata in una proteina che lega il DNA mutando i suoi due domini

CRISPR-Cas9 RNA-Guided Endonuclease



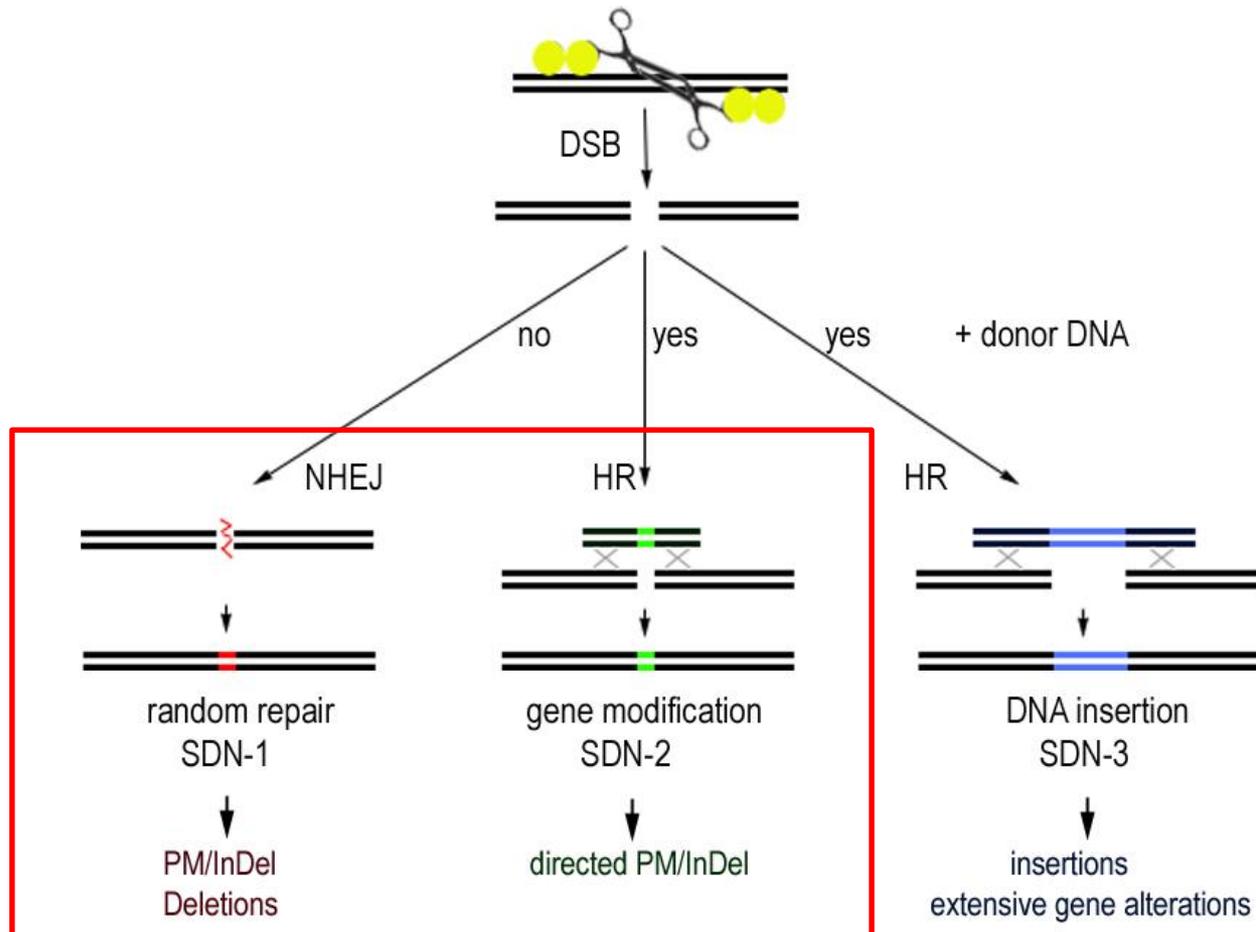
Questo rende possibile l'uso di CRISPR/Cas per molte manipolazioni di natura diversa quali:

- La regolazione dell'espressione genica;
- L'introduzione di modifiche epigenetiche;
- La visualizzazione di loci genomici in cellule viventi.

La diversità dei sistemi naturali CRISPR/Cas è notevole e ancora non completamente chiarita e sfruttata ma sfruttabile nel futuro con strumenti biotecnologici

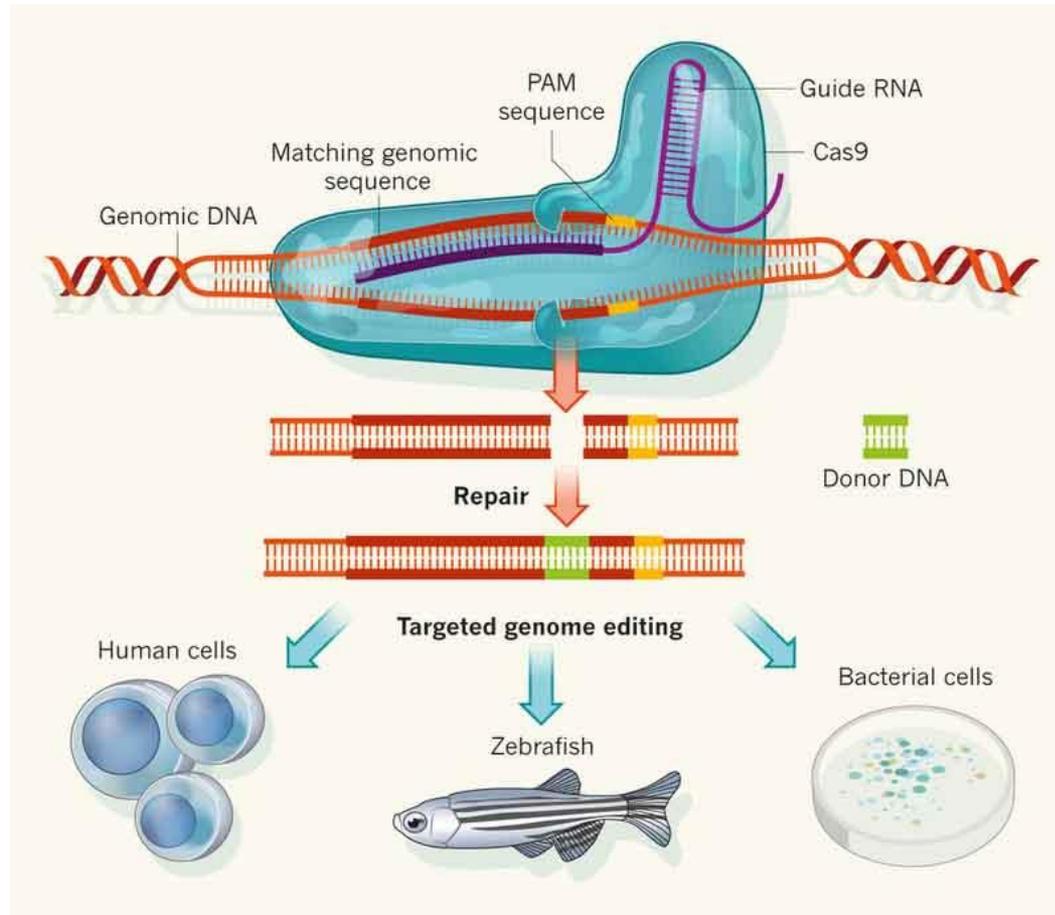
Tra i tre sistemi disponibili il metodo più promettente è al momento il sistema CRISPR associato all'enzima Cas9 (CRISPR/Cas9). L'enzima Cas9 è stato isolato nel batterio *Streptococcus pyogenes* e fa parte della famiglia delle nucleasi, enzimi in grado di tagliare il DNA. Cas9 viene diretto verso sequenze specifiche nel genoma attraverso una molecola di RNA-guida, questa può essere artificialmente creata all'occorrenza e in maniera specifica per il sito che deve riconoscere e penetrare all'interno della cellula da mutagenizzare insieme al gene che codifica Cas9. La molecola di RNA-guida indirizza la nucleasi sul sito bersaglio, al che la nucleasi Cas9 taglia il DNA che conseguentemente viene riparato dalla cellula con tre possibili risultati, a seconda che la Nucleasi Sito Diretta (SDN) sia programmata per operare:

MIGLIORAMENTO GENETICO E “GENOME EDITING”: NUOVE TECNOLOGIE



Modificazioni mirate analoghe a quelle spontanee

CRISPR/CAS: NUCLEASI DIRETTA DA RNA



Modificazioni mirate analoghe a quelle spontanee