

TRASFORMAZIONE di ORGANISMI VEGETALI

- Negli ultimi venti anni, i metodi di trasformazione di cellule vegetali si sono perfezionati e sono diventati affidabili.
- Ad oggi sono trasformate con successo più di 120 specie vegetali e numerose piante transgeniche, o loro derivati, sono oggi regolarmente commercializzate.
- Nonostante una diffusa ostilità di larghi strati dell'opinione pubblica riguardo alle piante transgeniche, è certo che queste piante si stanno diffondendo rapidamente: negli USA le coltivazioni di mais transgenico stanno per soppiantare quelle di mais tradizionale.
 - ◆ La **prima cellula vegetale** resistente agli antibiotici è stata prodotta dalla Monsanto nel 1982. La **prima pianta transgenica** è stata invece prodotta nell'università belga di Gent nel 1983

- In teoria la trasformazione vegetale offre l'opportunità di introdurre geni di qualunque origine nelle cellule vegetali. Queste cellule vengono, quindi, rigenerate producendo piante transgeniche che contengono ed esprimono la nuova informazione genetica.
- La maggior parte delle piante transgeniche viene generata usando due metodi generali che sono:

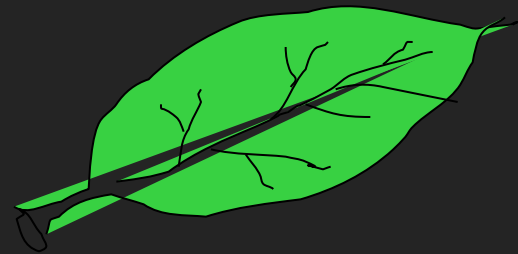
* **La trasformazione mediata da *Agrobacterium***

* **La trasformazione diretta con DNA (tecniche biolistiche, elettroporazione, permeabilizzazione di protoplasti mediata da PEG)**

La totipotenza delle cellule vegetali e le tecniche di propagazione *in vitro*

- A differenza delle cellule animali che possono rigenerare altri organismi SOLO a partire da cellule della linea germinale, **nelle piante qualunque tessuto può rigenerare una pianta intera**
- Lo stadio differenziativo dei tessuti vegetali è reversibile e può essere manipolato *in vitro* variando il rapporto di **auxina** e **citochinina**, due ormoni vegetali che regolano proliferazione e differenziamento
- Con tecniche di micropropagazione *in vitro*, utilizzando degli espianti, si può indurre la perdita del programma differenziativo.
- i calli sono colture di tessuti indifferenziati, che possono essere mantenute per lungo tempo in coltura, da cui possono essere rigenerate piante intere e fertili variando il rapporto aux/ck. Un **alto** rapporto **aux/ck** induce differenziamento radicale, mentre un **basso** rapporto **aux/ck** induce differenziamento vegetativo.

Due metodi per coltivare in vitro tessuti vegetali indifferenziati: la coltura di calli e la coltura di protoplasti



Foglia sterilizzata

Coltura di calli

Espianto fogliare su terreno
a bassa concentrazione
di fitormoni



Formazione di callo



Sub-coltivazione del callo



Induzione di germogli
su terreno a **basso rapporto
auxina/citochinina**



Induzione di radici
su terreno ad **alto rapporto
auxina/citochinina**



Coltura di protoplasti



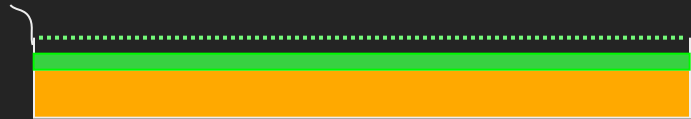
Si sterilizza una foglia e si "pela" uno strato di epidermide



Si pone lo strato di epidermide su un terreno contenente cellulasi e pectinasi



Centrifugazione e recupero dei protoplasti



Coltura dei protoplasti su cellule nutritive



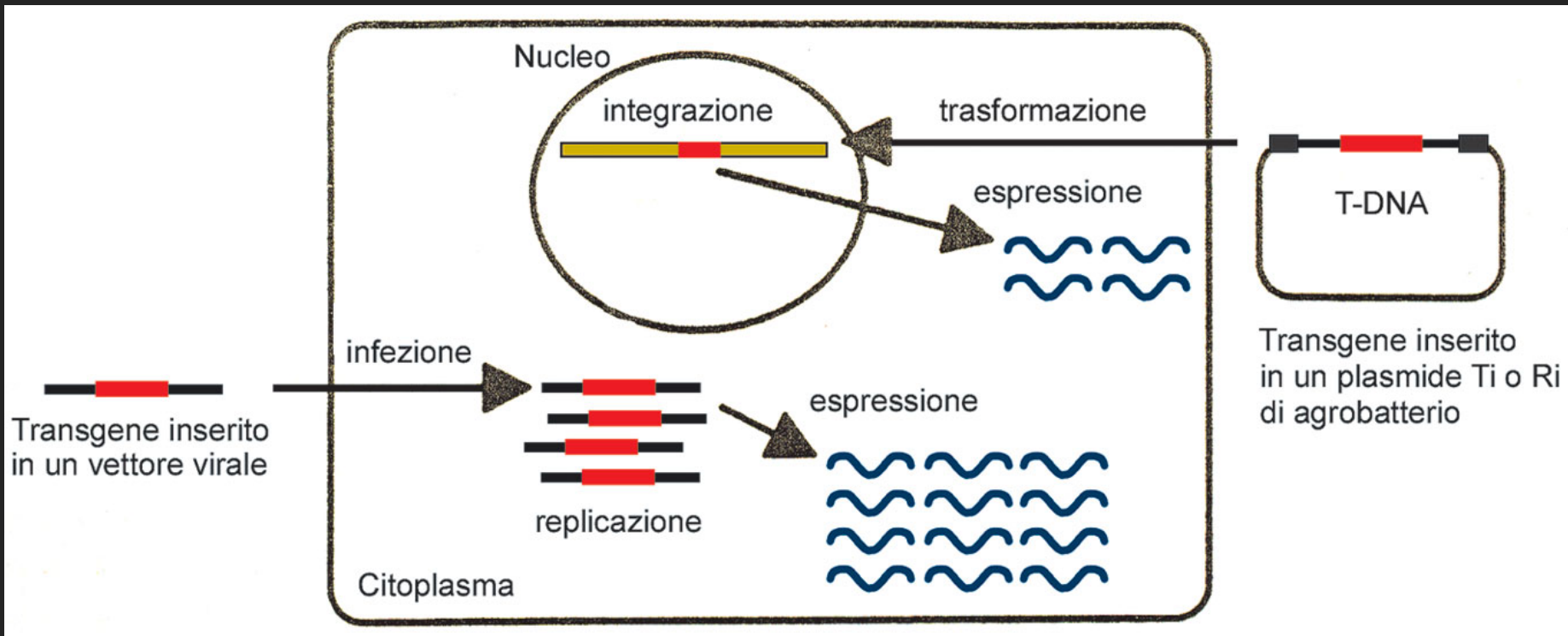
Coltura di callo

Rigenerazione

Coltura di cellule in sospensione



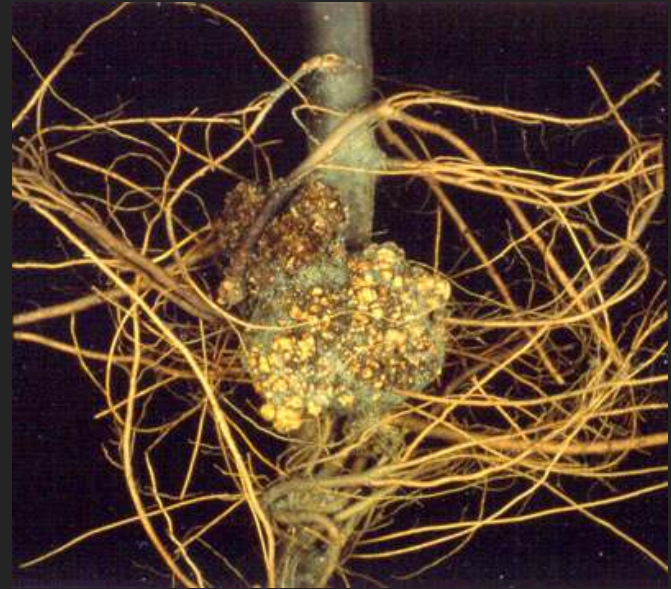
Confronto tra vettori virali e plasmidici riguardo alle loro modalità di espressione.



Agrobacterium

- batterio Gram-negativo del suolo che è in grado di infettare numerose piante dicotiledoni, inducendo, in corrispondenza di una lesione, caratteristiche alterazioni morfologiche e differenziate, tumorali, come:
 - "crown gall" nel caso di *A.tumefaciens*, galla del colletto
 - "hairy roots" nel caso di *A.rhizogenes*, proliferazione di radici avventizie
- La virulenza di questi ceppi è associata alla presenza di grossi plasmidi, chiamati:
 - Ti ("Tumor inducing") - *A.tumefaciens*
 - Ri ("Root inducing") - *A.rhizogenes*

Agrobacterium tumefaciens e *rhizogenes*

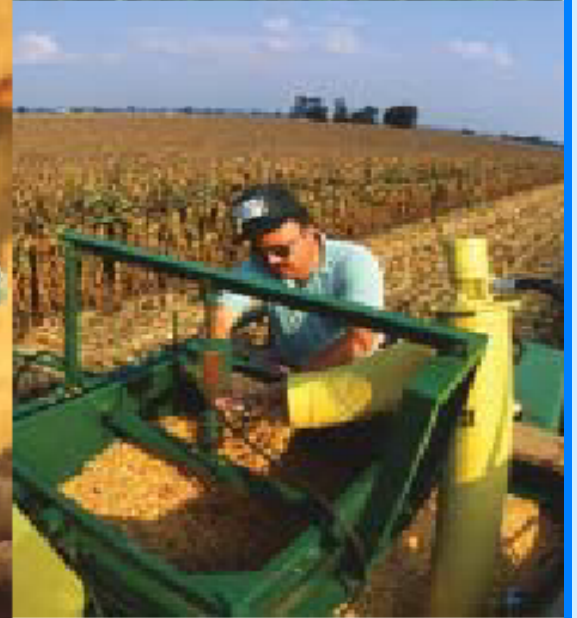


- Ceppi avirulenti non possegono i plasmidi **Ti** o **Ri**; tuttavia se questi plasmidi vengono trasferiti nei ceppi avirulenti per coniugazione o trasformazione, questi ceppi diventano virulenti.

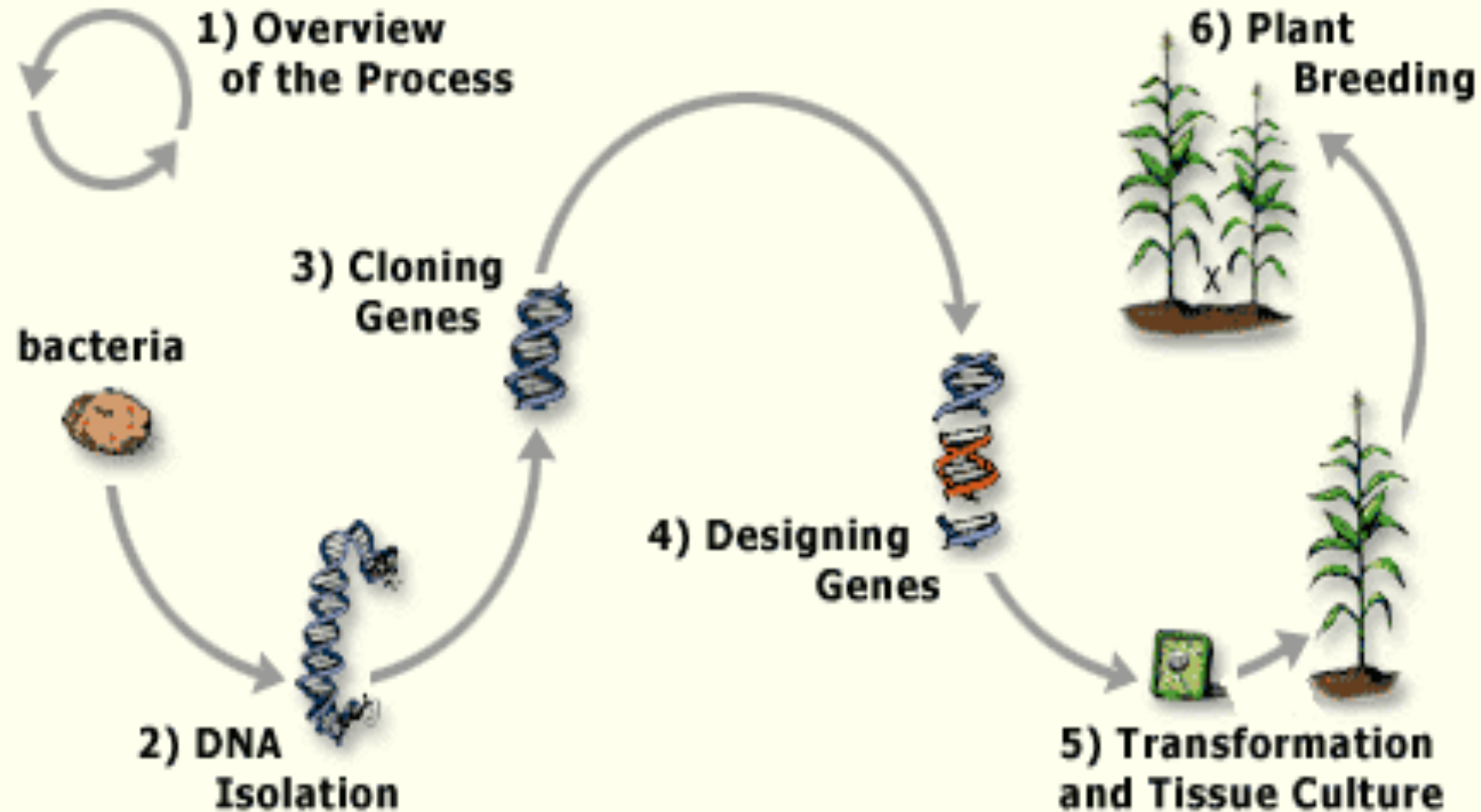
- la formazione del tumore è dovuta alla trasformazione della cellula vegetale:

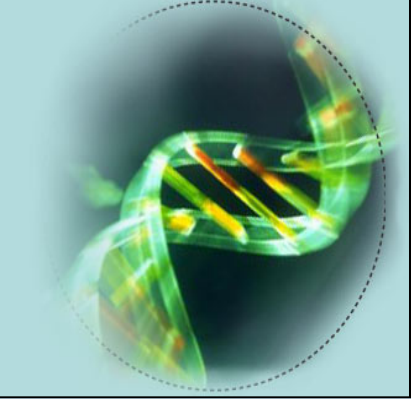
un frammento di DNA batterico (**T-DNA**) viene trasferito dal batterio alla cellula vegetale e si integra **STABILMENTE** nel genoma della pianta, inducendo nelle piante infettate le caratteristiche modificazioni morfologiche e differenziative.

Integrazione ed espressione di geni esogeni in piante transgeniche



Produzione cultivar transgeniche

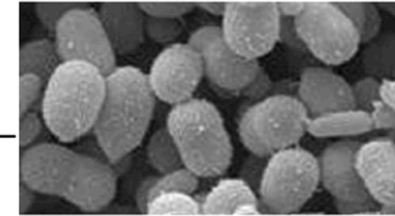
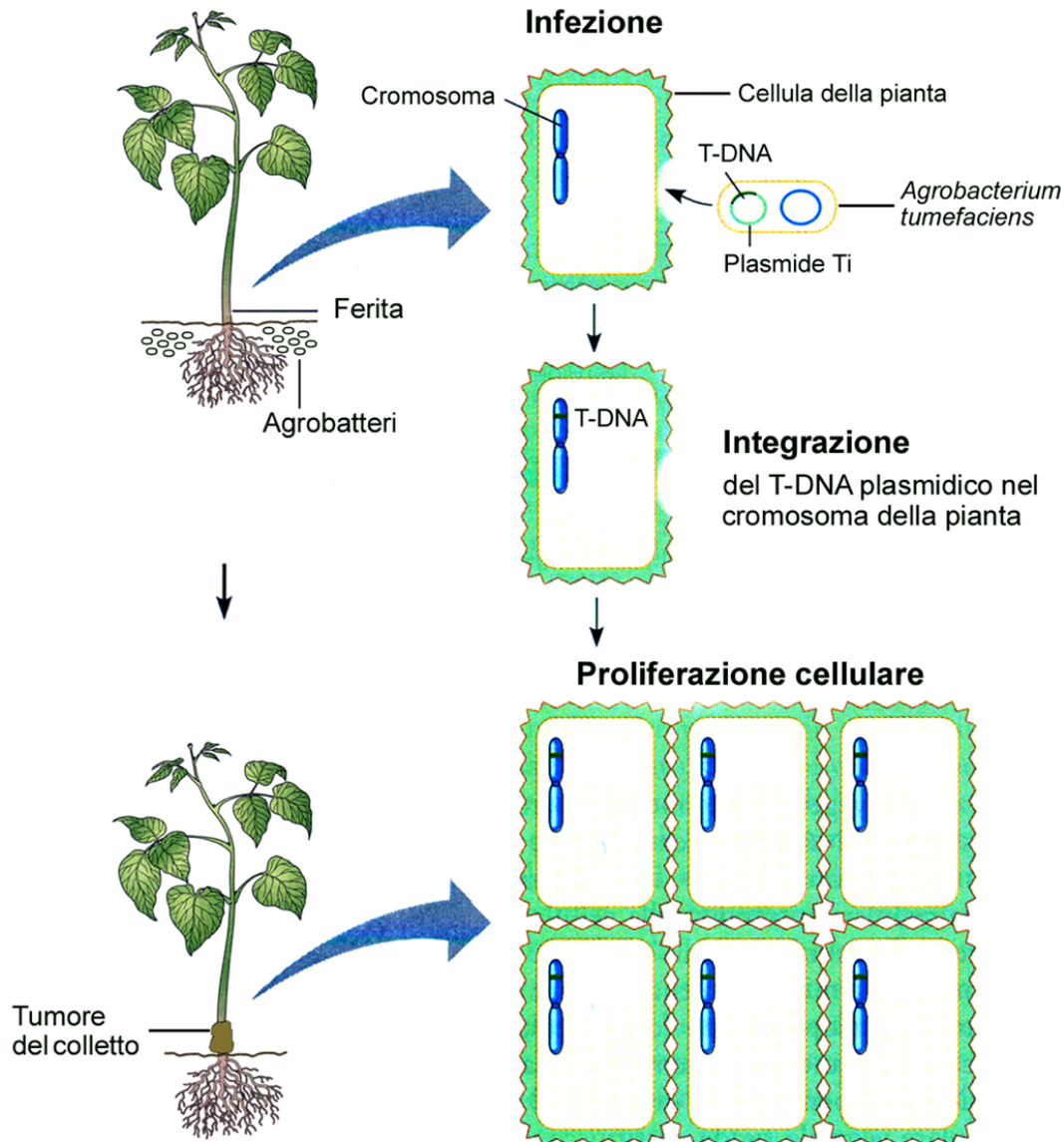




INTRODUZIONE DI UN COSTRUTTO GENICO IN UNA CELLULA VEGETALE (Trasformazione genetica)

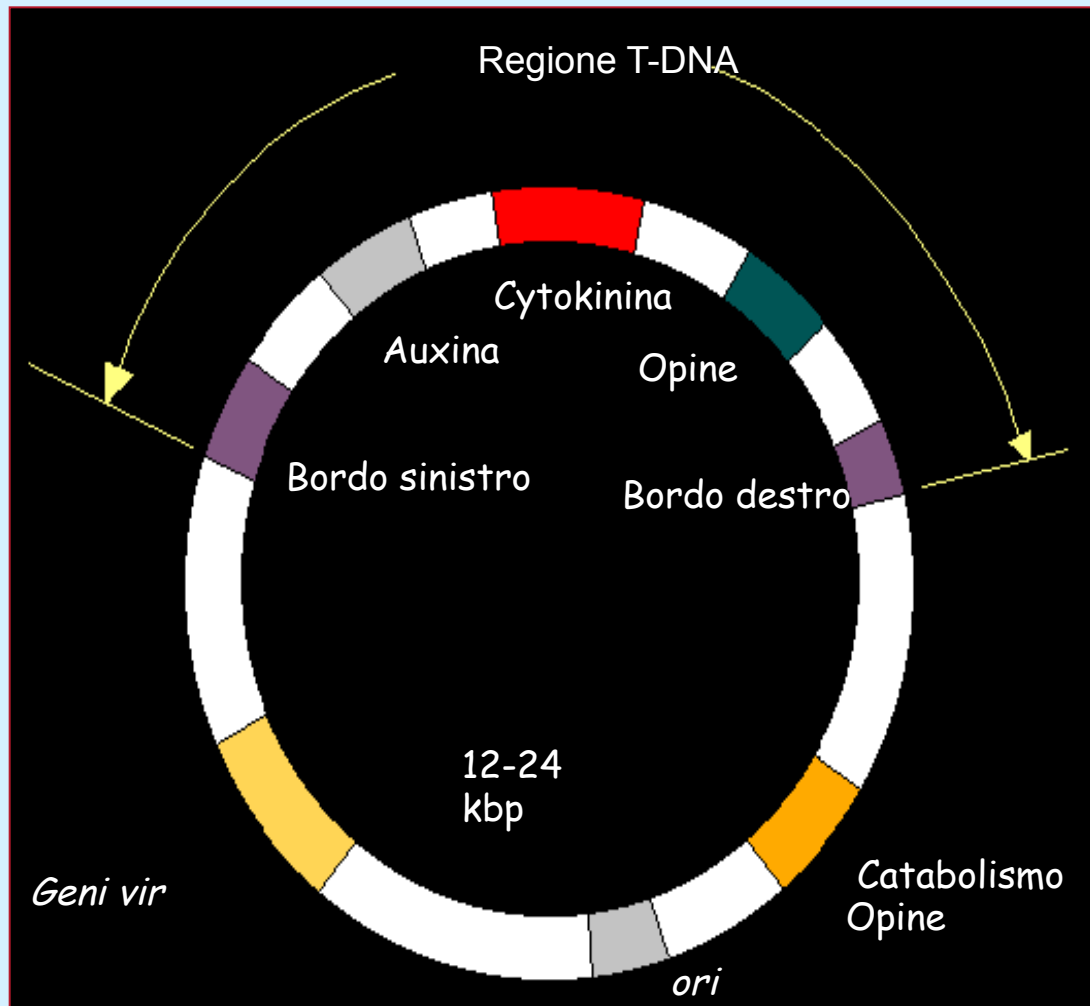
- Infezione con *Agrobacterium*
- Metodo biolistico (sinonimi: "Gene gun" o bombardamento con microproiettili)
- Microiniezione
- Elettroporazione

Tumore del colletto indotto da *Agrobacterium tumefaciens* in molte specie ornamentali e fruttifere.



Tumore del colletto nella vite

Regione T-DNA (12-24 kb) del plasmide Ti dell'*Agrobacterium tumefaciens*



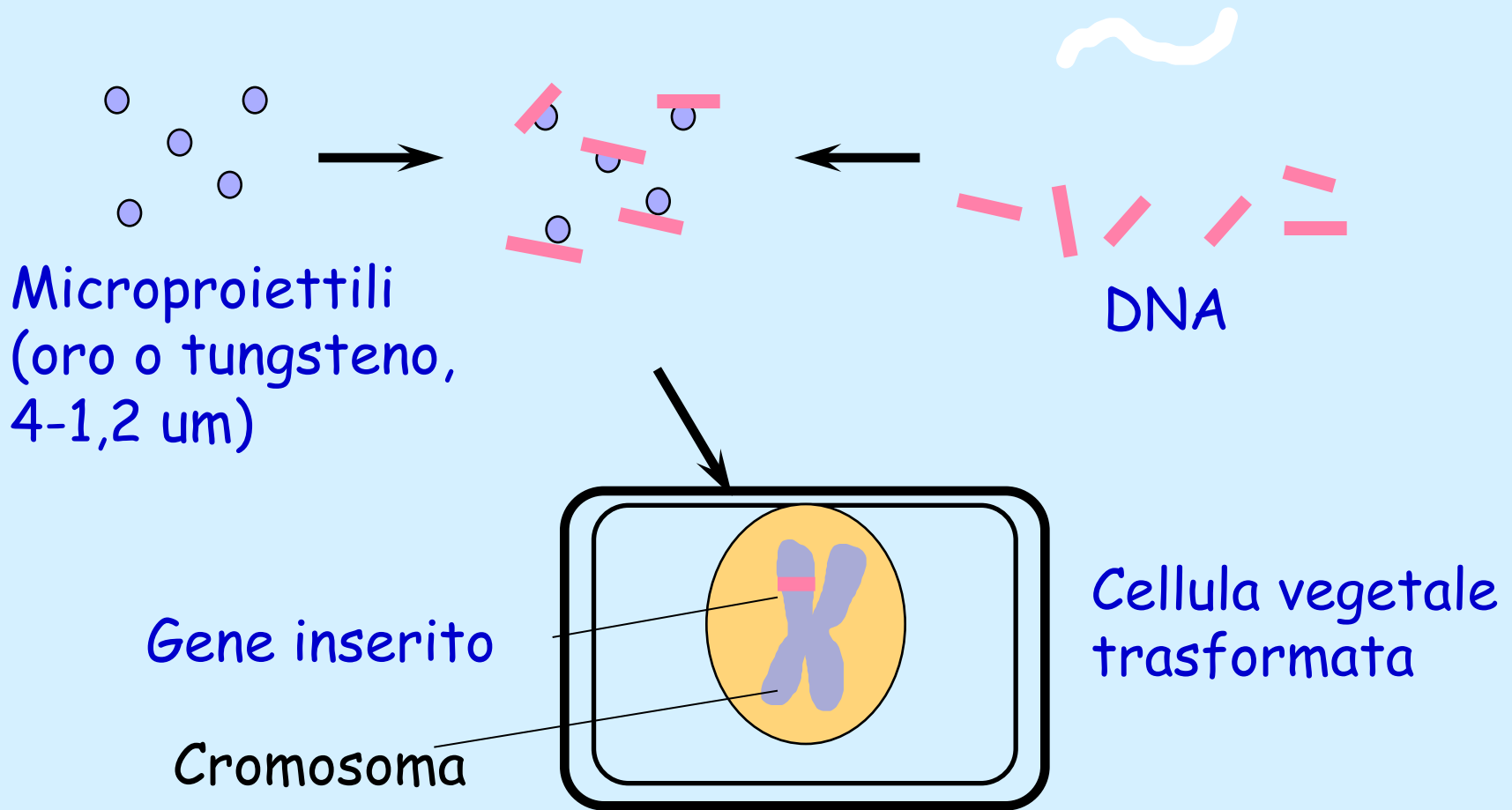
• *Geni vir*: essenziali per il trasferimento e l'integrazione della regione T-DNA

• *Auxine* *iaaM* e *iaaH*: sintetizzano gli ormoni auxinici della crescita (acido indolacetico)

• *Citochinine* - gene *ipt*: sintetizza la citochinina. Promuovono la crescita cellulare e la formazione delle galle

• *Opine*: sono prodotti di reazioni di condensazione tra aminoacidi e ketoacidi (es. nopaline, octopine, agropine). Sintetizzate e secrete dalle galle sono utilizzate come fonte di carbonio dall'*Agrobacterium*

Metodo biolistico ("Gene gun")



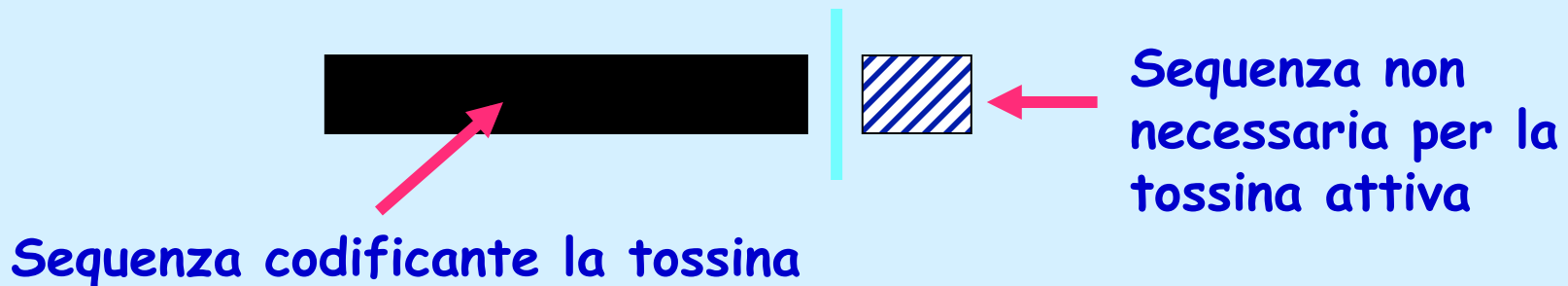
Bombardamento, per mezzo di un acceleratore che consente di sparare nel nucleo di cellule intatte microparticelle di metallo rivestite di DNA plasmidico (metodo biolistico, da biologico-balistico).

Identificazione e clonaggio del gene di interesse

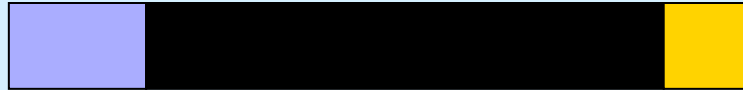
- La fase più limitante nel processo di transgenesi.
- I laboratori pubblici e privati sono impegnati in esperimenti per l'identificazione, localizzazione, caratterizzazione e clonaggio di geni di importanza agronomica.

Modifica sequenza codificante

- Spore del batterio del suolo *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) contengono una proteina cristallina (*Cry*). Nello stomaco degli insetti, i cristalli si rompono e rilasciano una tossina che si lega e produce pori nella parete intestinale.
- Un gene troncato *Cry* viene usato nelle colture *Bt*.



Aggiunta di sequenze di DNA per il controllo dell'espressione genica



Promotore

Sequenza Bt Sequenza
codificante terminatrice

- Il **promotore** controlla la trascrizione e dove, quando e quanto prodotto genico viene sintetizzato.
- La **sequenza terminatrice** è alla fine del gene

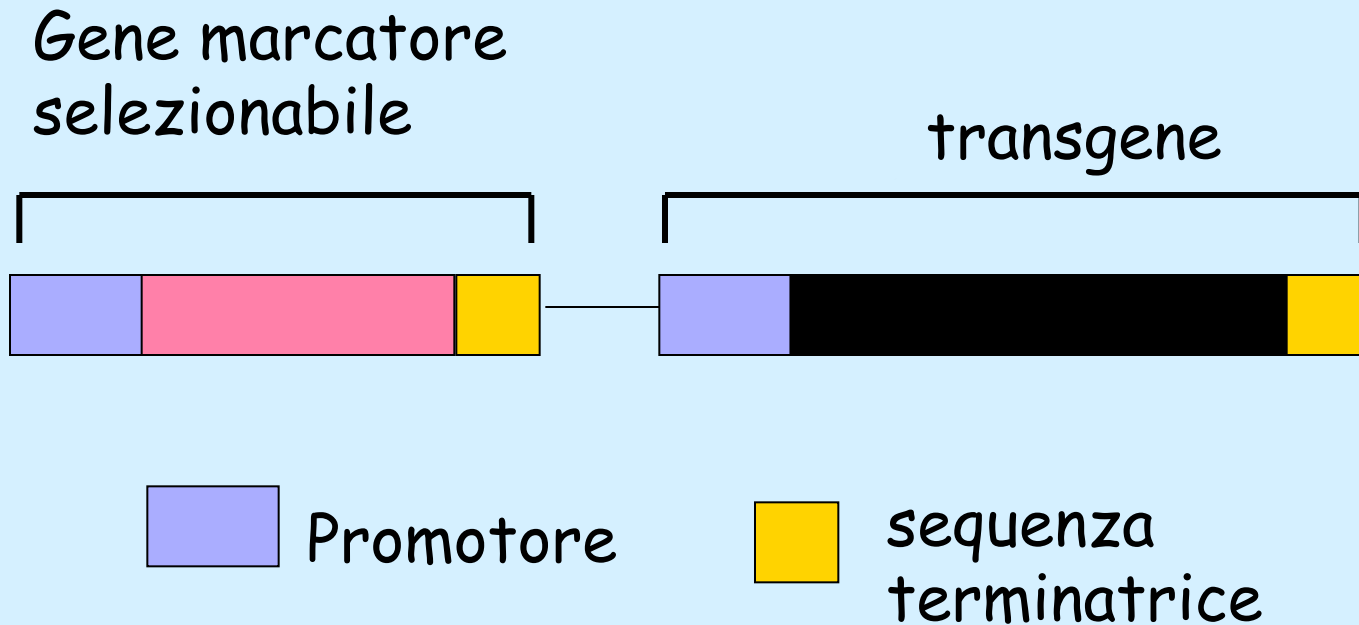
Marcatori selettivi

La trasformazione genetica è un processo con bassa efficienza (0,5 a 5%)

Un requisito fondamentale per la produzione di piante transgeniche è la capacità di distinguere le cellule che hanno integrato il transgene da quelle non trasformate

Marcatori selettivi

Un gene che codifica per un enzima viene inserito nel costrutto con il gene d'interesse:



Marcatori selettivi

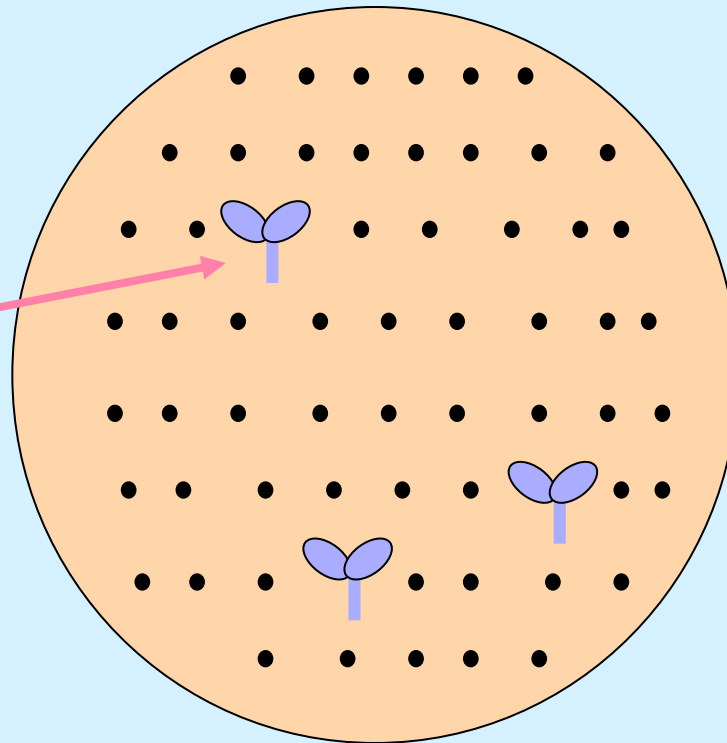
I geni marcatori tradizionalmente usati nella trasformazione genetica delle piante possono essere suddivisi in due gruppi principali:

- geni che conferiscono resistenza agli antibiotici (per esempio **kanamicina**, **igromicina**, **streptomicina**);
- geni che conferiscono resistenza agli erbicidi (**fosfinotricina**, **bialaphos**, **glifosilato**, **dalafon**)

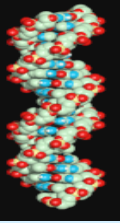
Marcatori selettivi

Per l'identificazione delle cellule o tessuti trasformati che hanno il transgene è necessaria la coltura in un mezzo contenente un antibiotico (p.e. kanamicina) o un erbicida (p.e. Bialaphos).

Trasformante
positivo




PRODUZIONE DI PIANTE TRANSGENICHE: utilizzo di geni marcatori selezionabili



GENI MARCATORI COMUNEMENTE UTILIZZATI NELLA TRASFORMAZIONE GENETICA DELLE PIANTE

Resistenza ad
ERBICIDI

bar (*Streptomyces Higroscopicus*)  Bialaphos
pat (*Streptomyces Viridochromogenes*)

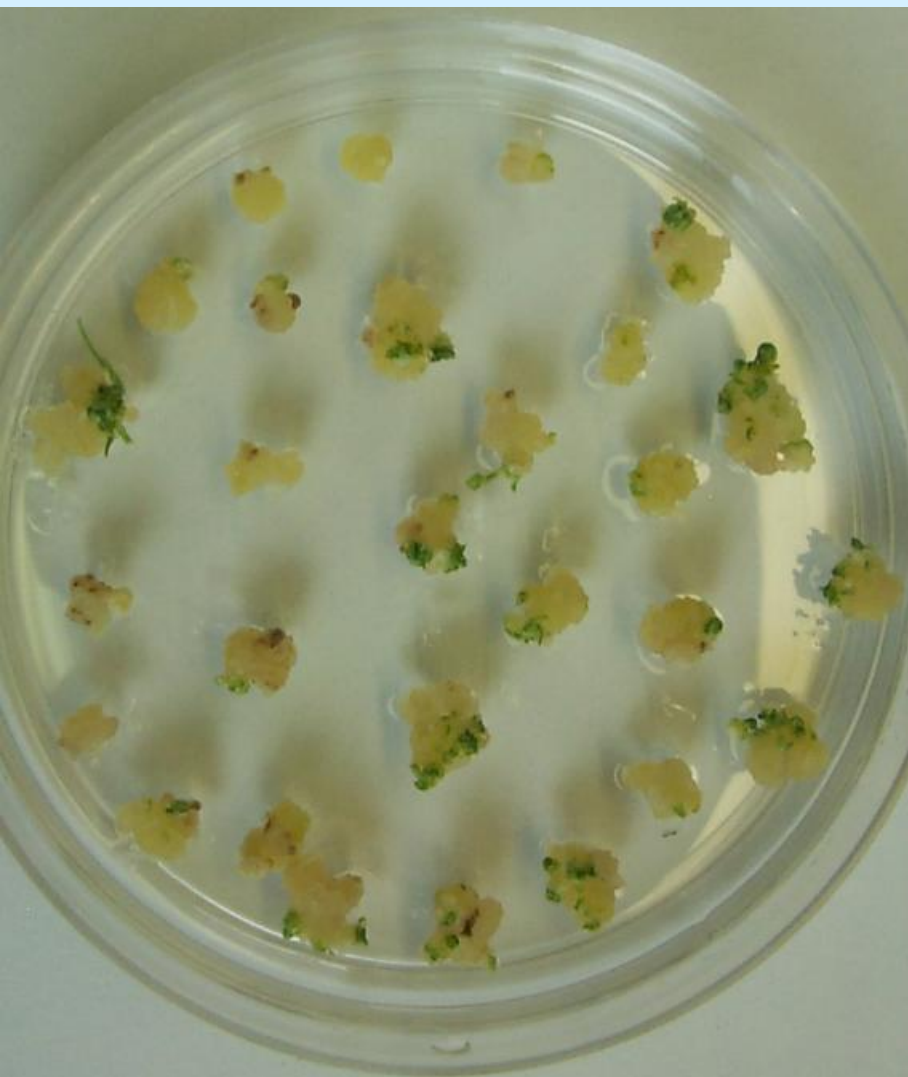
Resistenza ad
ANTIBIOTICI

nptII  Neomicina e Kanamicina

cat  Cloramfenicolo

hpt/hph  Igromicina B

Marcatori selettivi



Marcatori selettivi



Regolamento CE n. 1829 /2003

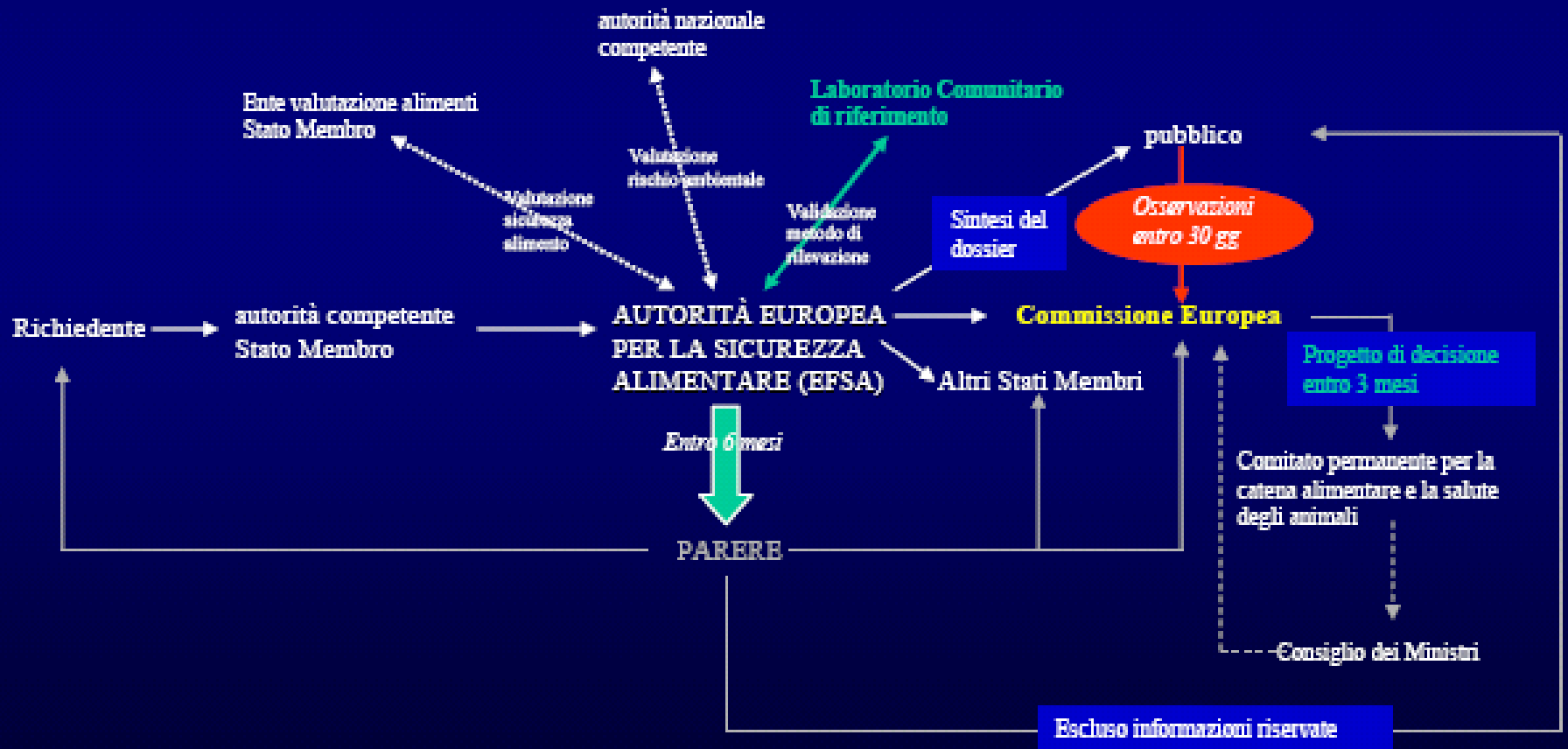
*Relativo agli alimenti ed ai
mangimi geneticamente
modificati*

OBIETTIVI

- a) **Istituisce procedure comunitarie per l'autorizzazione all'immissione in commercio**
- b) **Estende le norme in tema di etichettatura a tutti gli alimenti e mangimi geneticamente modificati**

Regolamento (CE) n. 1829/2003

- Procedura di autorizzazione (articoli 5, 6, 7)



REGOLAMENTO (CE) N° 1829/2003

Etichettatura (Capo II, sez. 2; Capo III, sez. 2)

Per gli OGM autorizzati:

- vige l'obbligo di etichettatura per percentuali di OGM $> 0,9\%$ rispetto ai singoli ingredienti alimentari o ai singoli mangimi;
- non sussiste obbligo di etichettatura a percentuali di OGM $\leq 0,9\%$ purché la presenza di OGM sia accidentale o tecnicamente inevitabile \Rightarrow gli operatori devono dimostrare di avere preso tutte le misure appropriate per evitarne la presenza.



contiene "INGREDIENTE GM "

TRACCIABILITA'



Regolamento (CE) n. 1831/2003 *concernente
l'etichettatura e la tracciabilità degli OGM*

**Obbligatorietà della tracciabilità
per tutti i prodotti contenenti OGM
compreso le merci sfuse**

CONTAMINAZIONE
ACCIDENTALE OGM
AUTORIZZATI

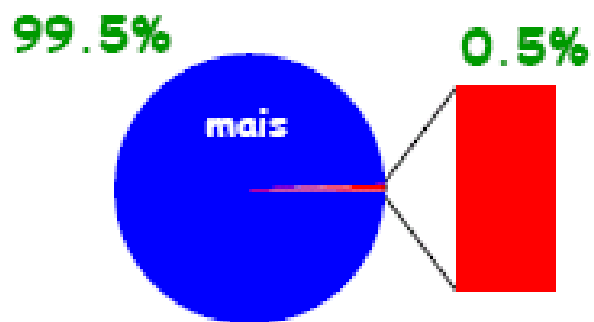
LIMITE 0,9%

OGM NON AUTORIZZATI

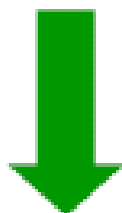
LIMITE 0,5%

(ma hanno un parere scientifico favorevole)

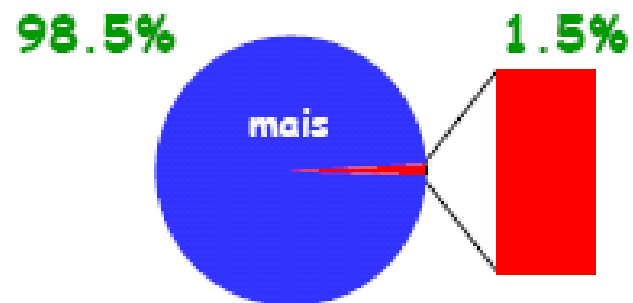
OGM non autorizzati e che non hanno
ricevuto un parere scientifico
ILLEGALI



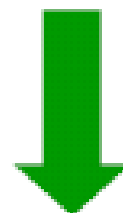
■ mais
■ mais GM



etichettatura
non richiesta



■ mais
■ mais GM



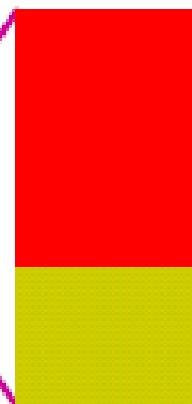
etichettatura
richiesta

98.8%



mais

0.8%

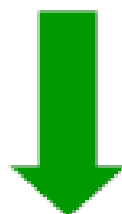


■ mais

■ GM mais A

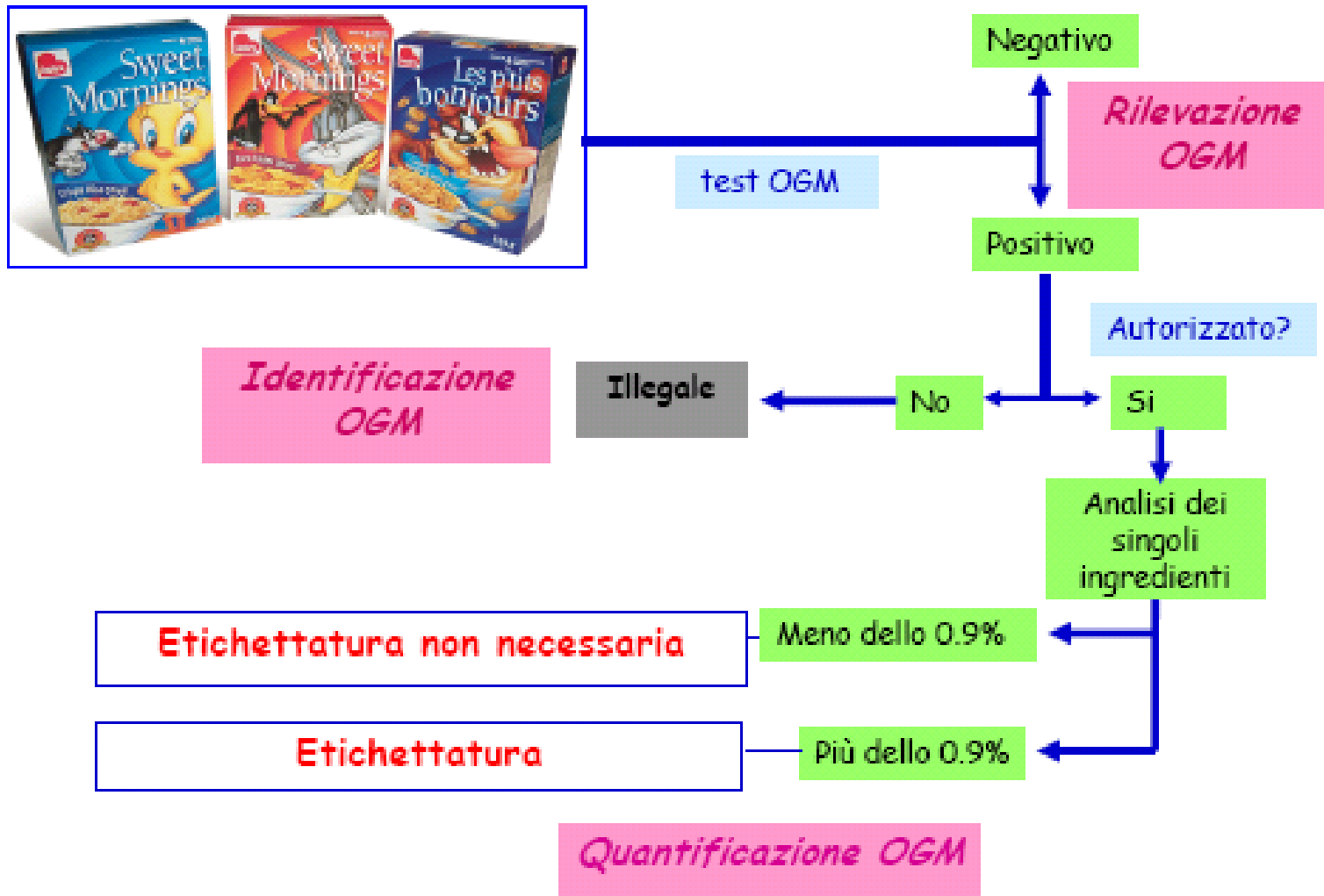
■ GM mais B

0.4%



etichettatura
richiesta

Il controllo analitico degli OGM



Problematiche analitico metodologiche nella tracciabilità degli OGM

+ INDIVIDUAZIONE:

l'obiettivo è di determinare se un prodotto contiene OGM o no (non da notizie sul tipo di OGM);

+ IDENTIFICAZIONE:

lo scopo è di identificare i diversi OGM presenti nel campione e verificare se essi siano autorizzati o no;

+ QUANTIFICAZIONE DI OGM:

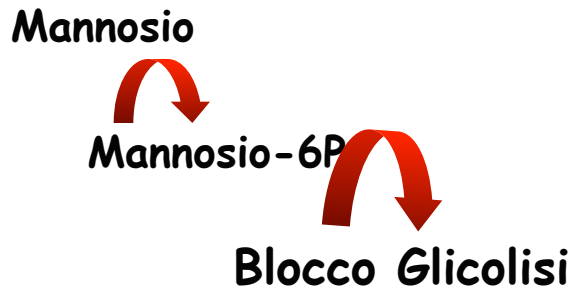
lo scopo è di determinare la quantità dell'OGM presente e valutarne la conformità con la normativa attuale.

Metodologie per il rilevamento di OGM

- Metodi fenotipici per il rilevamento di OGM
- Reazione immunologica con anticorpi specifici (saggio ELISA, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
- Metodi di rilevamento basati sul DNA:
 - Amplificazione del DNA mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) convenzionale
 - Amplificazione del DNA mediante PCR real time
- Tecnologie Micro-array

Metodi fenotipici per il rilevamento di OGM contenenti il gene marcatore *pmi*

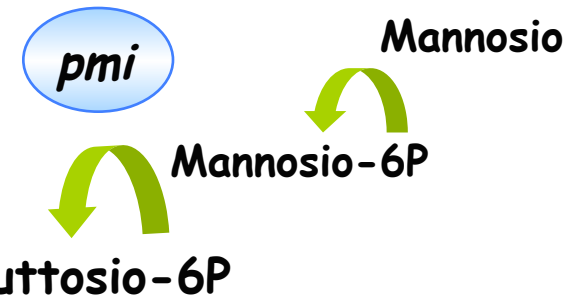
PIANTE WILD-TYPE (prive di PMI)



Inibizione
Crescita



PIANTE TRANSGENICHE (contenenti il PMI)



Glicolisi

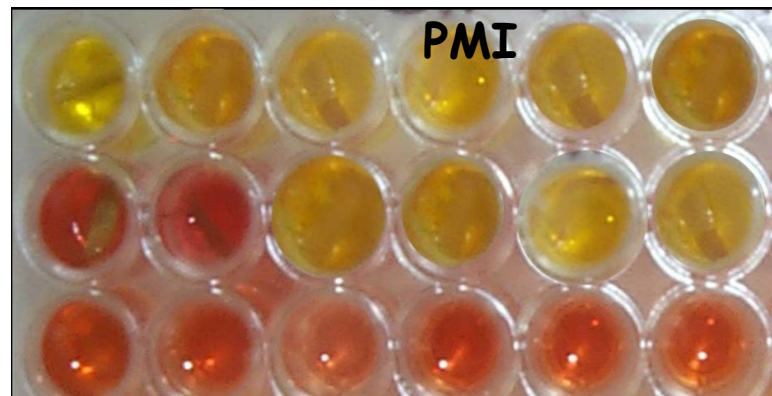


*Il gene *pmi* può essere utilizzato come marcatore per la selezione di piante transgeniche perché ne permette la sopravvivenza in presenza di mannosio*

Metodi fenotipici per il rilevamento di OGM contenenti il gene marcatore *pmi*

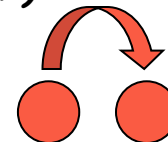
Saggio d'espressione con il Clorofenolo Rosso (CPR)

CPR = indicatore di pH; a pH 6 → colore rosso

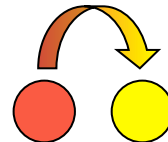


(Terreno selettivo + 50 mg/ L CPR)

NON TRASFORMATI: inibizione crescita

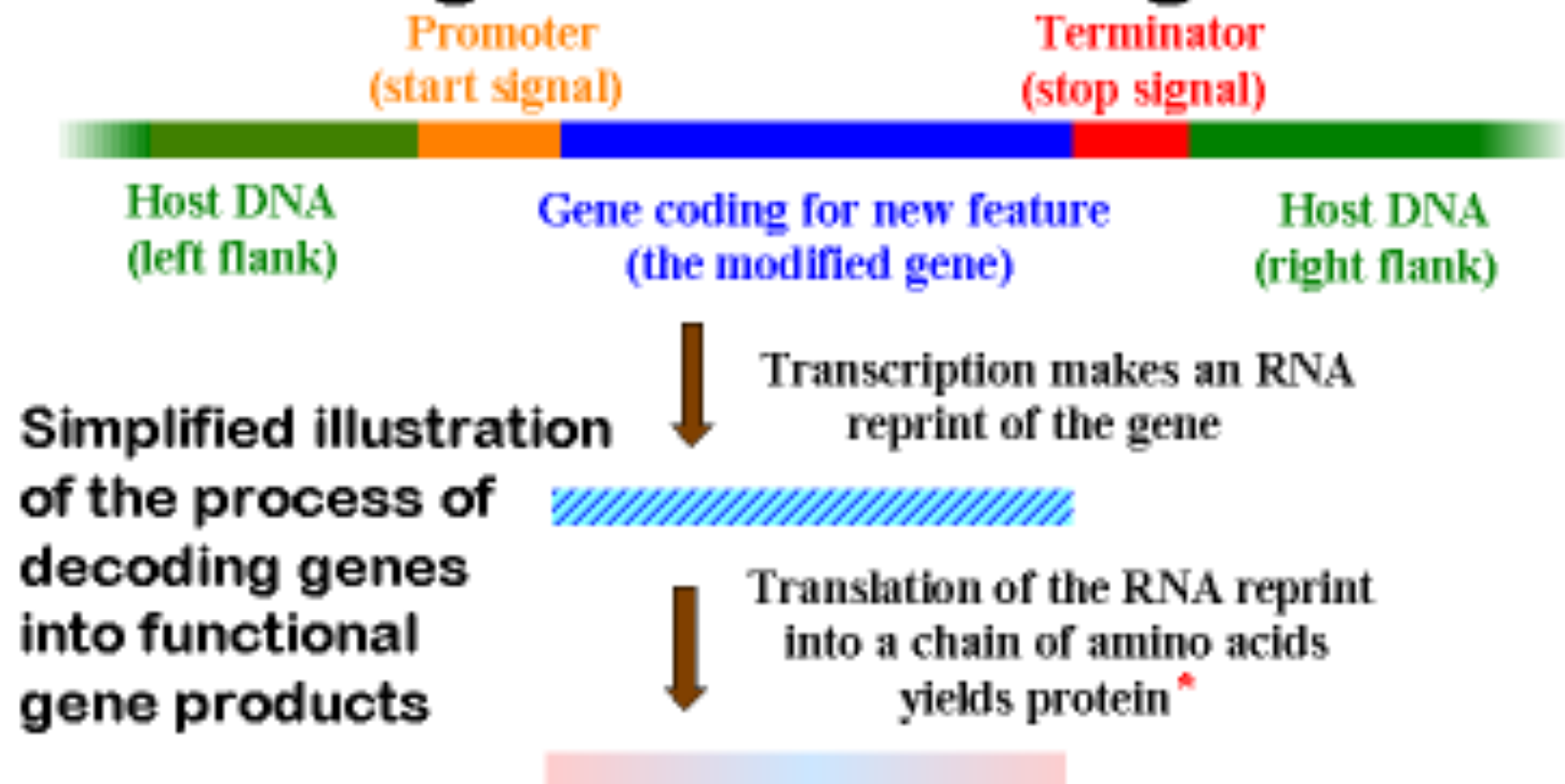


TRASFORMATI: rilascio metaboliti acidi



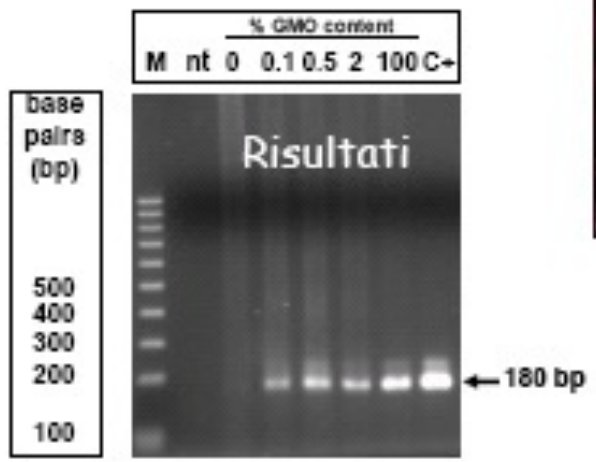
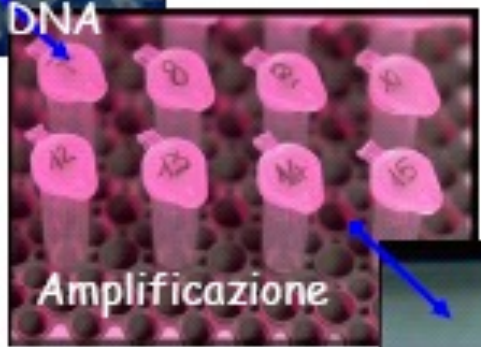
Gene construct

FIG.2



*A protein is usually composed of more than one chain of amino acids

metodi basati sulla determinazione del DNA



DIAGNOSTICA degli OGM negli ALIMENTI

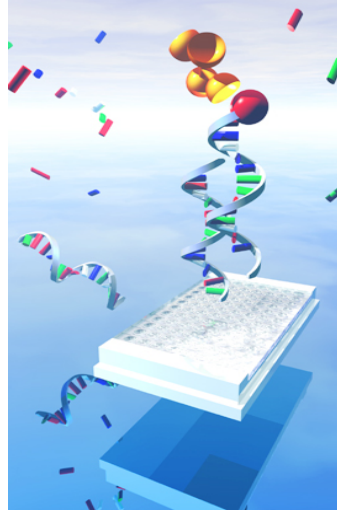


TEST sulle PROTEINE



Rilevazione immunologica della proteina codificata dal transgene (ELISA)

- Quali- / quantitativo
- Rapido
- Test da campo



TEST sul DNA



Ricerca del transgene e di sequenze ad esso correlate (Real-time PCR)

- Quali- / quantitativo
- Rapido
- Sensibile (limite = 0.0001%)



- Richiede materie prime non lavorate
- L'espressione delle proteine è spesso tessuto-specifica e sviluppo-dipendente

- Degradazione del DNA
- Presenza di inibitori della polimerasi
- Possibili contaminazioni con DNA estraneo
- Non tutti i derivati alimentari contengono DNA (es. olio di semi di mais)

GENI BERSAGLIO nell'analisi qualitativa degli alimenti

Elementi caratteristici dei costrutti ricombinanti



PCR QUALITATIVA

Amplificazione di una delle seguenti sequenze:

Promotore CaMV 35S

tNOS

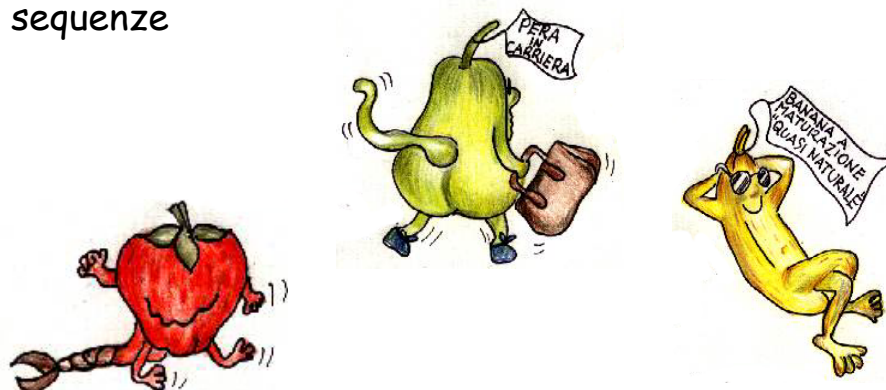
Gene marcatore

Amplificazione di geni sicuramente presenti nel campione (es. lectina della soia, zeina del mais)

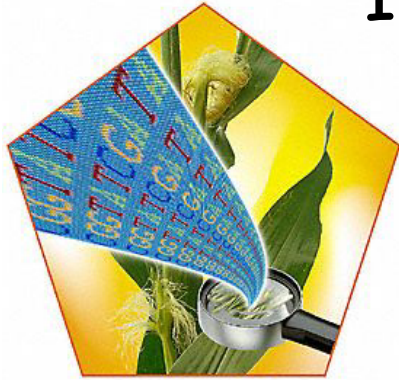
Individuazione del transgene

(è disponibile una banca dati che contiene tutte le sequenze di DNA depositate nei brevetti a livello mondiale)

PCR QUANTITATIVA



ITER per il RILEVAMENTO di OGM negli alimenti mediante TEST sul DNA



I° STEP

Analisi qualitativa (screening)

Rivela la presenza/assenza dell'OGM nel campione

Si ricerca la presenza di sequenze regolatrici comuni alla maggior parte degli OGM

risultato
positivo

risultato
negativo

Si identifica il transgene presente, verificando se è uno di quelli autorizzati in commercio

L'analisi si arresta

Nessun transgene
autorizzato

Transgene autorizzato

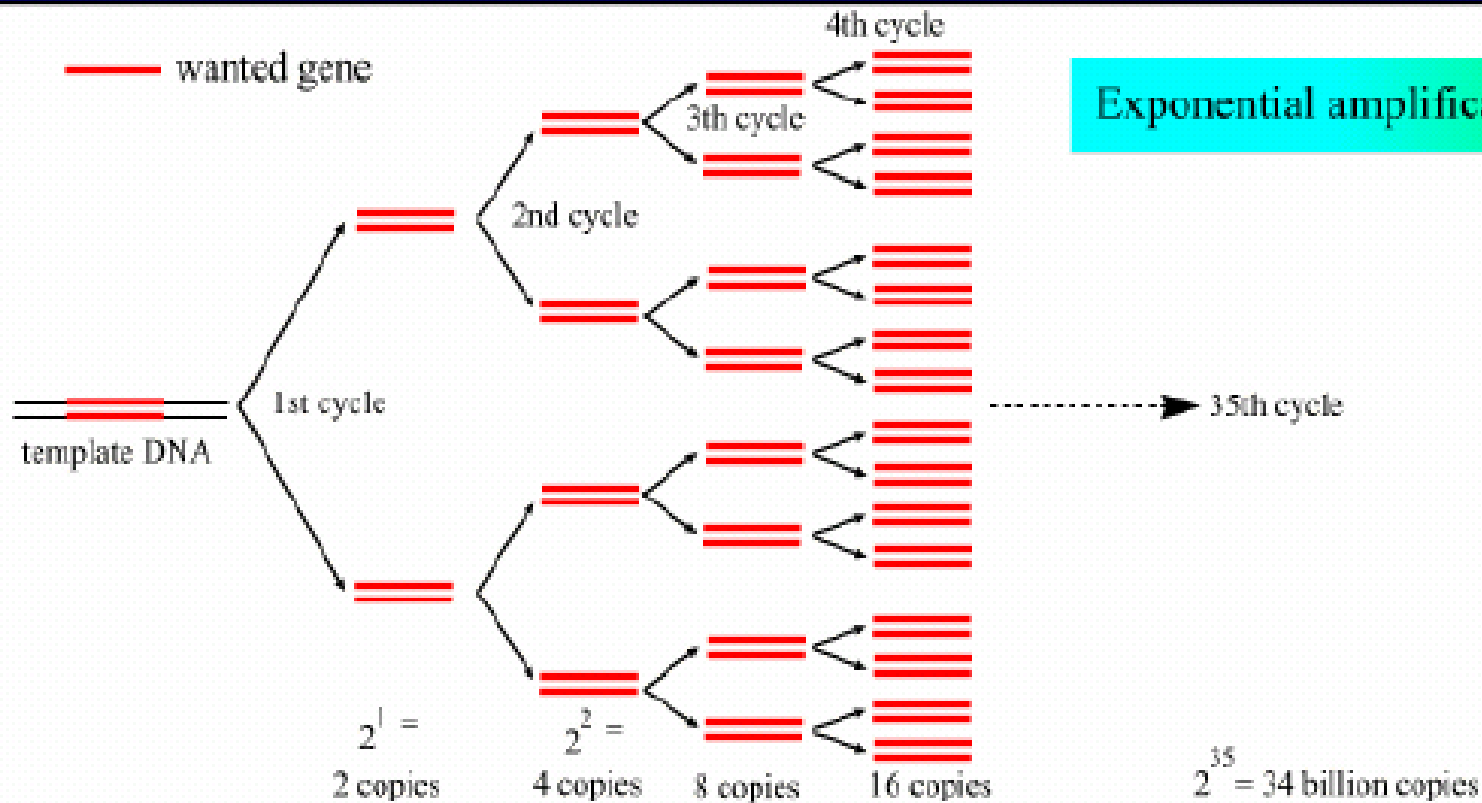
II° STEP

Analisi quantitativa

Se i singoli ingredienti superano la percentuale dell'1% scatta l'obbligo di riportarne la presenza in etichetta

Alimento illegale

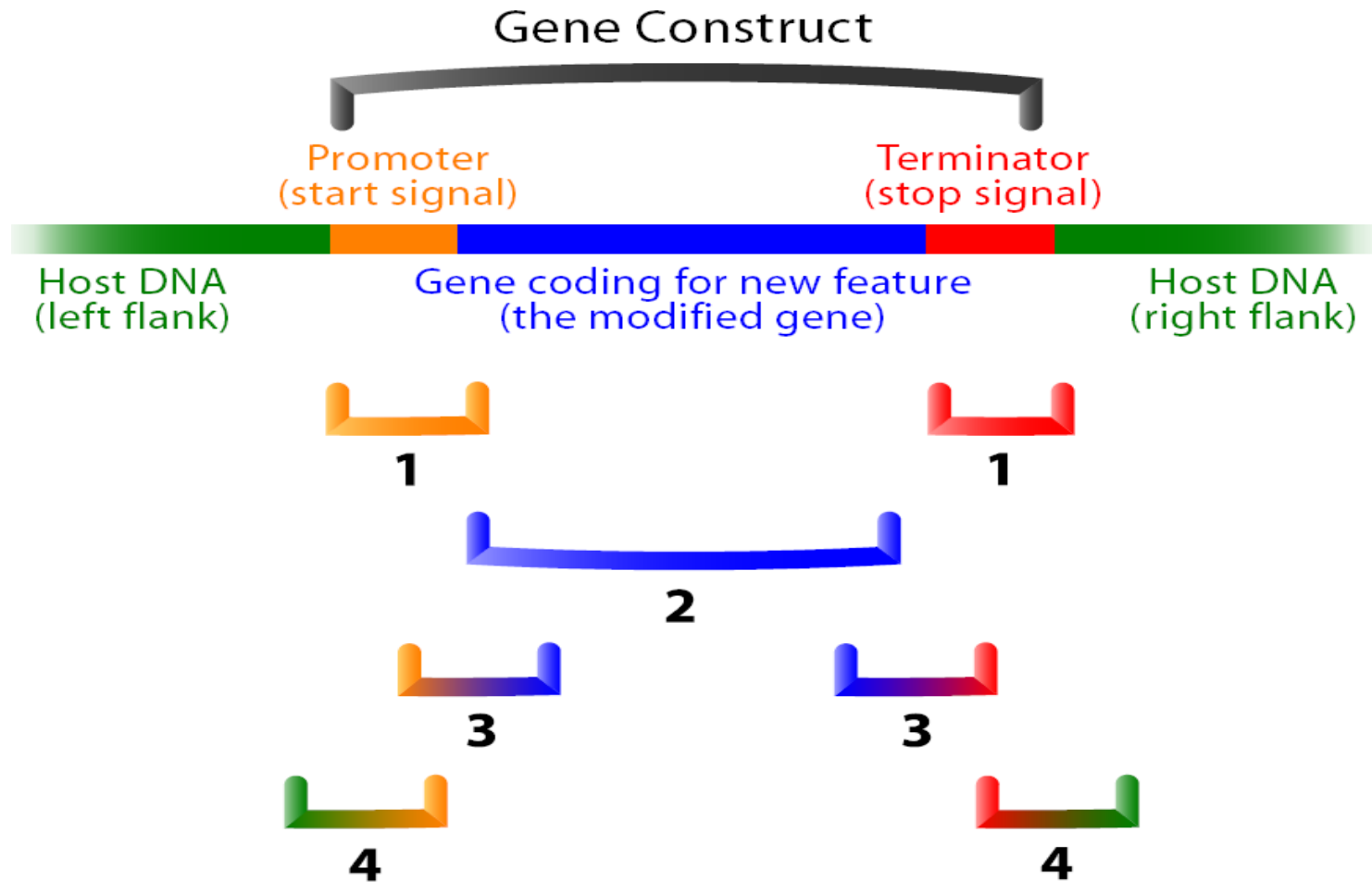
Polymerase Chain Reaction (PCR)



(Andy Vierstraete 2001)

Metodi di rilevamento basati sul DNA:

Amplificazione del DNA mediante PCR convenzionale



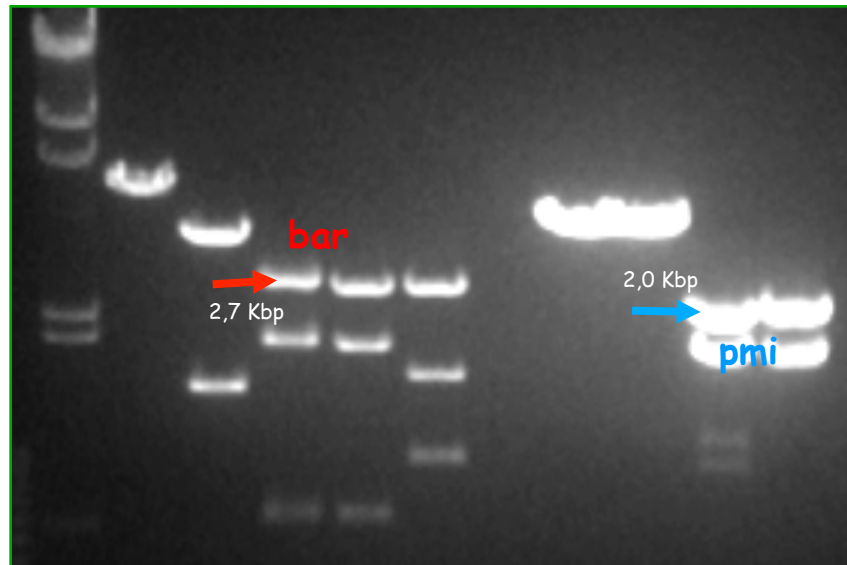
Targets for PCR based detection of genetic modifications,
ordered after degree of specificity:
1 = low specificity, 4 = transformation event specific

Geni comunemente coinvolti utilizzabili per la determinazione degli OGM

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

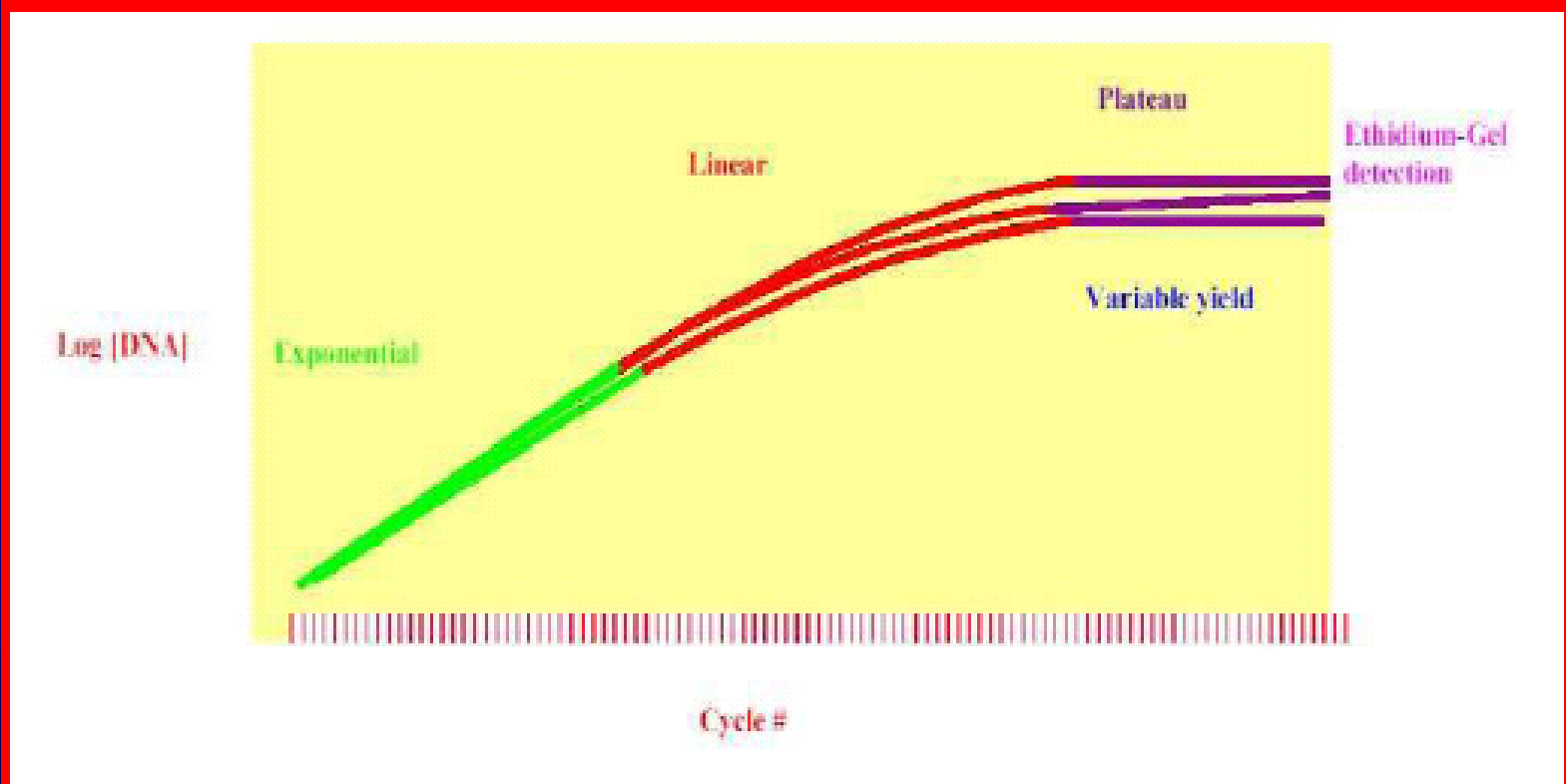
Primers per PCR disegnati sulla base di queste sequenze

Metodi di rilevamento basati sul DNA: Amplificazione del DNA mediante PCR convenzionale



Digestione enzimatica

PCR: l'amplificazione del bersaglio è esponenziale



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%

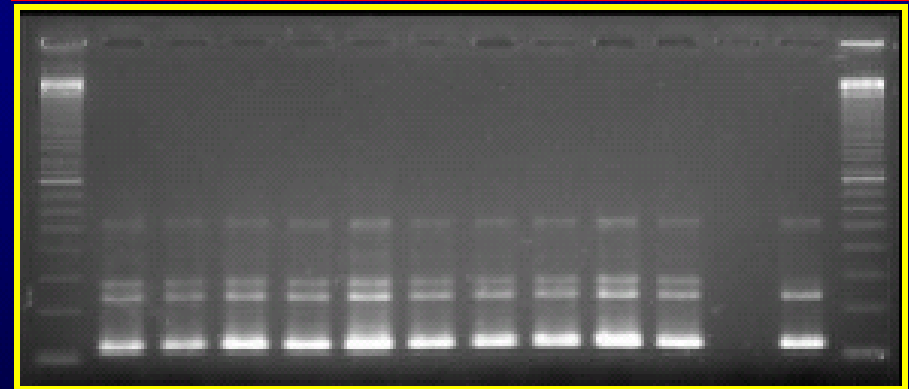
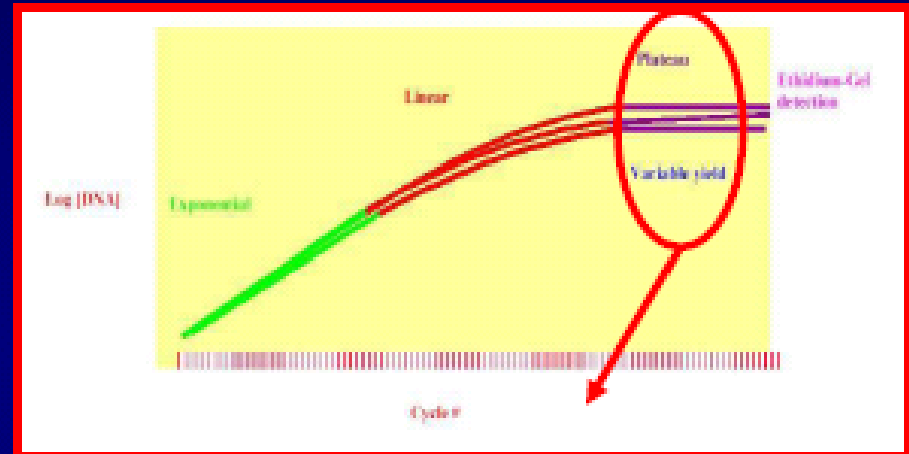
- Real-time PCR

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

Limite di rilevazione circa 0.1%

PCR "end point"

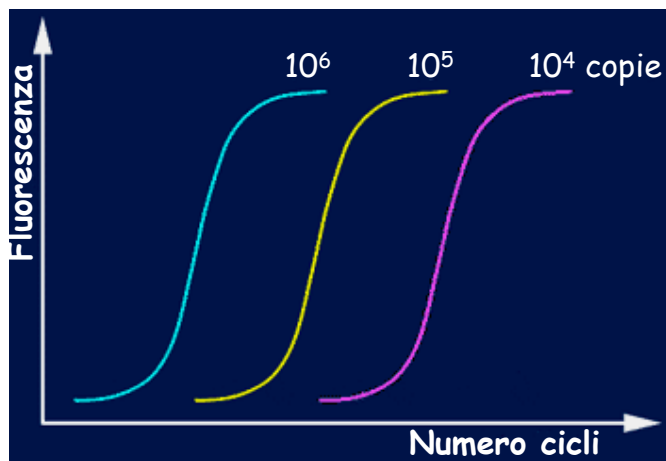
- analizza gli amplificati nella fase di plateau
- fornisce poche informazioni su quantità e qualità del DNA



QUANTIFICAZIONE del PRODOTTO di PCR

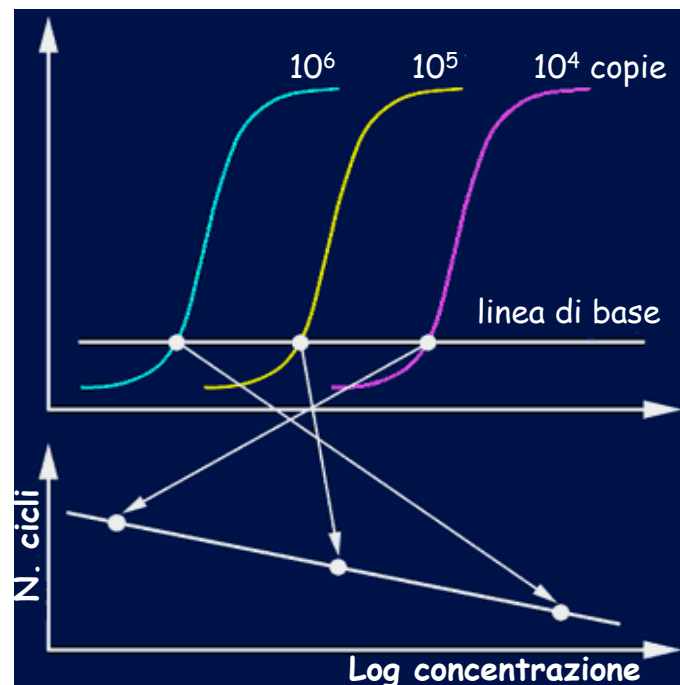
Identificando il primo ciclo della PCR in corrispondenza del quale inizia l'amplificazione esponenziale del prodotto è possibile quantificare la concentrazione iniziale del DNA bersaglio.

Curva di fluorescenza di campioni a concentrazione nota



La linea di base identifica il ciclo in corrispondenza del quale inizia l'aumento esponenziale della fluorescenza per ciascun campione.

Estrapolazione della curva standard



Riportando in grafico il valore di intersezione con la linea di base in funzione del Log della concentrazione iniziale di ciascun campione si ottiene la curva standard da cui si può estrapolare il valore della concentrazione di campioni a titolo ignoto.

PCR real time: analisi quantitativa

