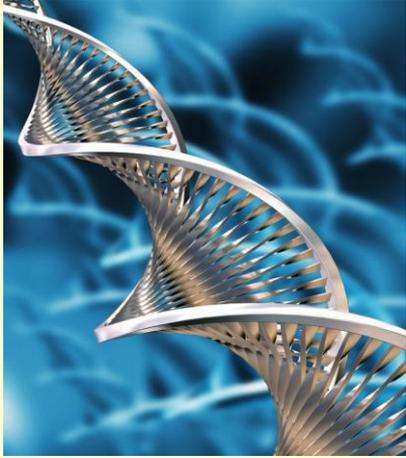


BIOTENOLOGIE VEGETALI



Le biotecnologie stanno rivoluzionando tutto il campo dell'agricoltura attraverso la creazione di una gamma sempre più estesa di nuove varietà vegetali.



Le biotecnologie hanno lo scopo di originare varietà sempre meno influenzabili dall'ambiente circostante e richiedenti minime quantità di prodotti chimici per il completamento del loro ciclo biologico.

Tra i principali miglioramenti previsti per il prossimo futuro con l'ausilio delle biotecnologie:

1. Il miglioramento della resistenza a specifici erbicidi (a stress abiotici)



Ridurre l'uso di prodotti chimici
Scarsamente tossici per i mammiferi
Rapidamente degradabili

2. Il miglioramento della resistenza agli insetti nocivi e alle malattie causate da agenti microbici



Piante transgeniche con geni derivati da *Bacillus thuringiensis* sono eccezionalmente resistenti all'attacco di numerose specie di insetti nocivi

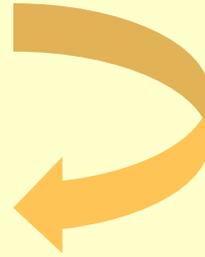
Cotone, pomodoro, frumento ecc.

3. Il miglioramento delle caratteristiche post-raccolto

Le perdite nelle fasi di stoccaggio e di trasporto di alcuni prodotti agricoli possono arrivare al 40% negli USA e in Europa, e fino all'80% negli altri paesi



Principalmente causate da malattie e insetti



anche problemi di altra natura, come le ammaccature, i danni causati dal freddo o dal calore, l'eccessiva maturazione, sapori ed odori sgradevoli.



l'enzima **poligalatturonasi** degrada i componenti della parete cellulare così che, maturando, il frutto diventa più molle. In USA pomodoro transgenico per l'inibizione delle poligalatturonasi, il frutto è meno deperibile



La Rivoluzione verde

Termine coniato da William Gaud, direttore dell'Agenzia Americana per lo Sviluppo Internazionale (marzo 1968)



Movimento per aumentare le rese attraverso:

- Nuove varietà coltivate
- Irrigazione
- Fertilizzanti
- Pesticidi
- Meccanizzazione

in un momento storico in cui pareva che l'aumento della popolazione mondiale avesse superato la capacità dell'agricoltura mondiale di produrre cibo

Rivoluzione Verde

- Uno sforzo internazionale programmato e finanziato da:
 - Fondazione Rockefeller
 - Fondazione Ford
 - I governi di molti paesi in via di sviluppo
 - FAO
- Teso a eliminare la fame nel mondo attraverso il miglioramento della produzione agricola
- Norman Borlaug è stato una figura chiave

Perché necessaria una Rivoluzione Verde?

- Centri urbani sempre più popolosi
- Rapido aumento della popolazione
- Produzione di cibo non al passo con tale aumento



Pratiche tradizionali

- Poco fertilizzante
- Scarsa irrigazione
- Agricoltura di sussistenza
- Varietà convenzionali

Varietà tradizionali

- Bassa risposta ai fertilizzanti
 - aumentata crescita vegetativa
 - porta all'allettamento



frumento



orzo

Varietà tradizionali

- HI = 0.3 (30% granella, 70% paglia)
- Biomassa = 10-12 t/ha
- Potenziale produttivo ~ 4 t/ha
- Rese adeguate in alcune annate
- Rese NON adeguate in altre (instabilità produttiva)
- Grande variabilità fra un campo e l'altro
- Richiedono lunga stagione di crescita



Nuove varietà altamente produttive

- Varietà di riso e frumento semi-nane
- Buona risposta ai fertilizzanti
- HI = 0.5 (50% granella, 50% paglia)
- Biomassa = 20 t/ha
- Potenziale produttivo ~ 10 t/ha
- Uniformità
- Maturazione anticipata



La rivoluzione verde



-
- Lo stesso si può dire per le varietà di riso oggi presenti sul mercato
-

Che cosa è stato migliorato?

la capacità di partizione della materia secca è migliorata:

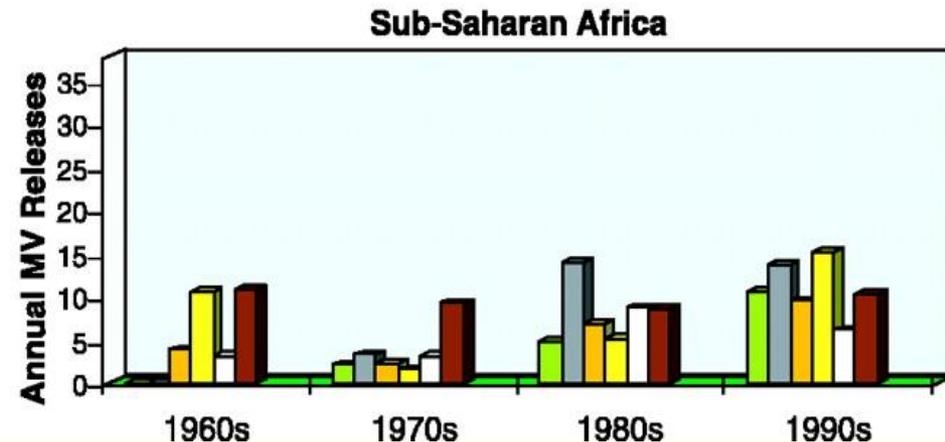
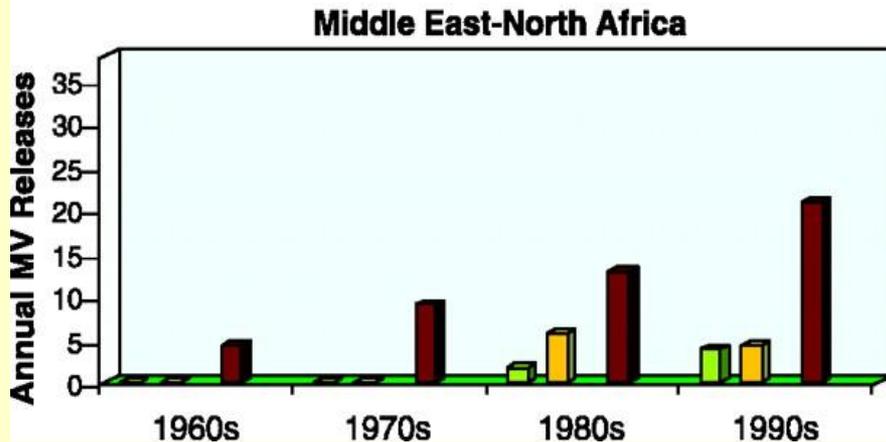
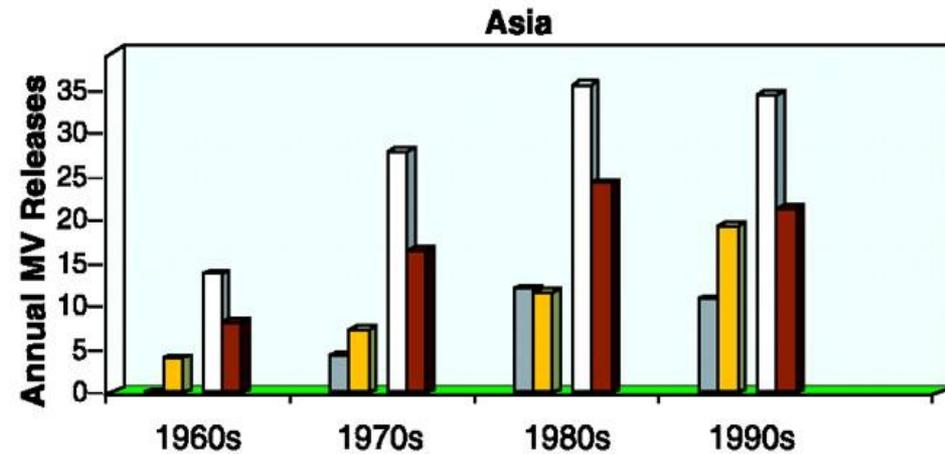
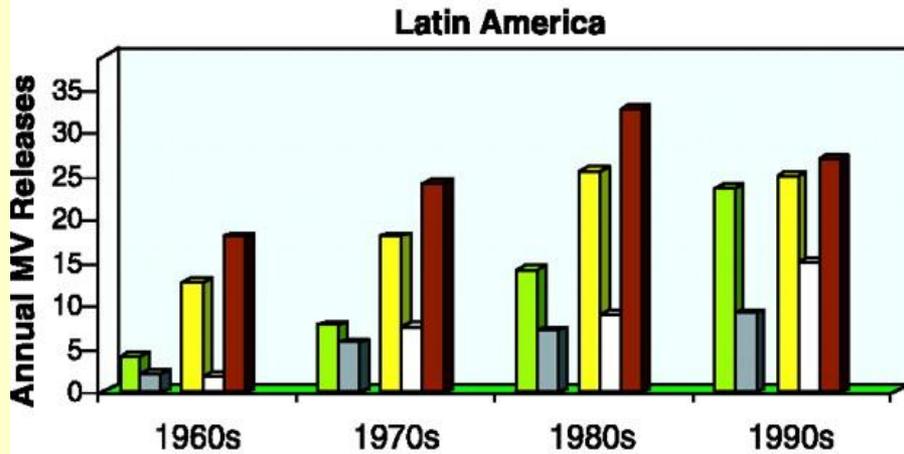
in 100 anni dal 30% al 50% dell'Harvest Index.

Ora siamo vicini al limite fisiologico,
ed occorre cambiare metodo.

yield= (nr. spighe/m²) X (nr. semi/spiga) X peso seme

Rilascio annuale di varietà moderne

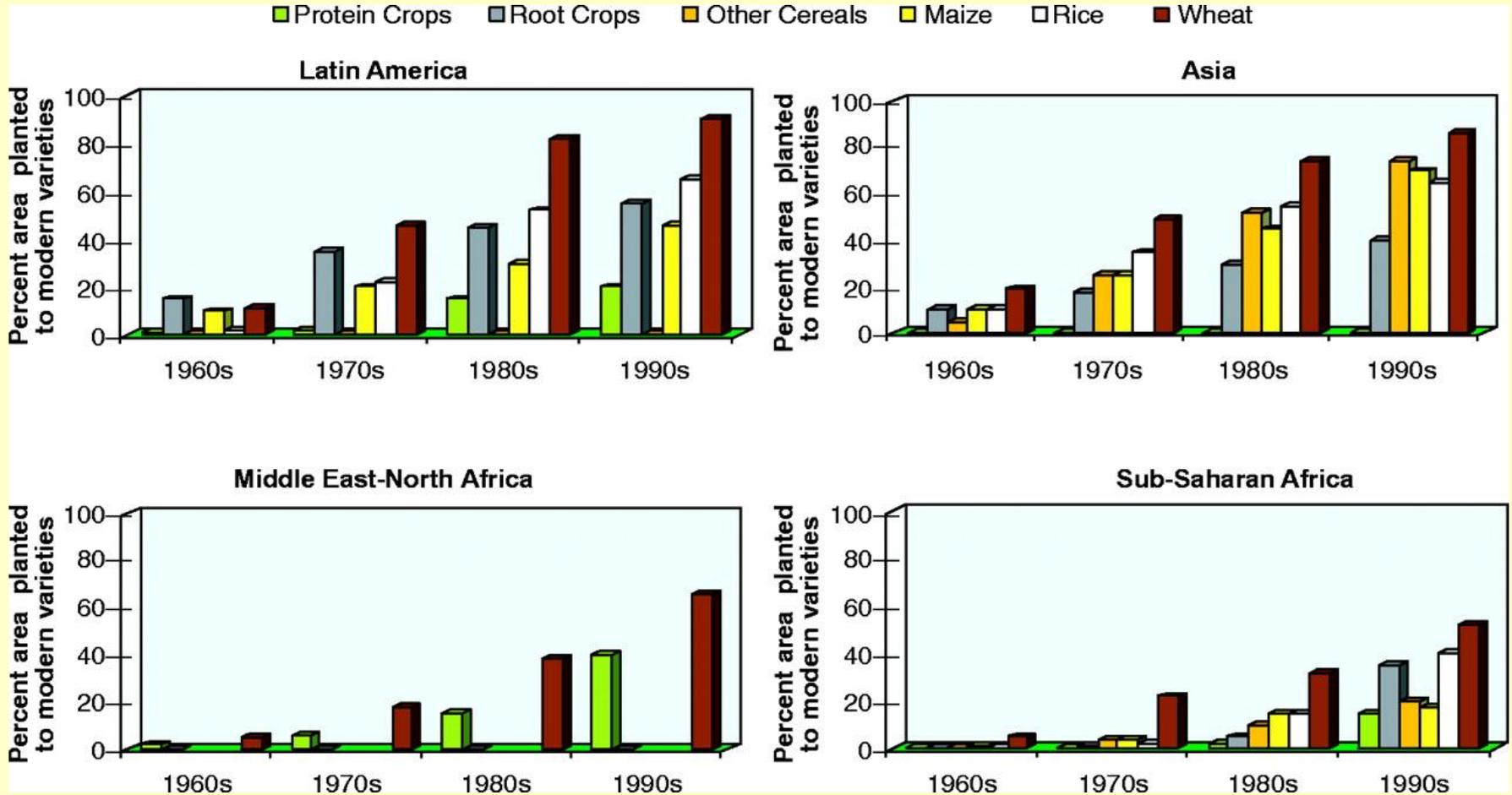
■ Protein Crops ■ Root Crops ■ Other Cereals ■ Maize □ Rice ■ Wheat



tra gli anni 60 e il 2000 sono state rilasciate più di 8000 varietà moderne per le 11 specie di importanza alimentare.

Oltre al frumento e al riso si trovano anche il sorgo, l'orzo, il mais, la patata.

Percentuale del terreno seminato con varietà moderne



Epoche di spigatura/fioritura/maturazione



- Precocità/tardività della raccolta
- Possibilità di effettuare più raccolti in una stagione produttiva
- In riso le varietà tradizionali maturavano in 160-170 giorni
- Il miglioramento ha portato a varietà che maturano in 110 o anche 105 giorni
- In genere il controllo di questi caratteri è quantitativo, ma alcuni geni di maggior effetto sono stati identificati

Adattamento

- Adattamento delle varietà migliorate a una vasta gamma di areali di coltivazione
- Es. latitudini diverse/stagioni diverse - insensibilità al fotoperiodo e alla vernalizzazione

Resistenza a stress abiotici e biotici

Qualità La definizione di qualità dipende dall'uso del prodotto agricolo e da chi lo consumerà

Qualità

ESEMPI in CEREALI:

CONTENUTO DI PROTEINE

- Riso: ampia variabilità genetica, elevata ereditabilità
- Mais: esperimento condotto in Illinois ha portato in 70 generazioni il contenuto proteico dal 10,9% al 26,6%

COMPOSIZIONE AMINOACIDI

- Cereali poveri di lys e in mais trp

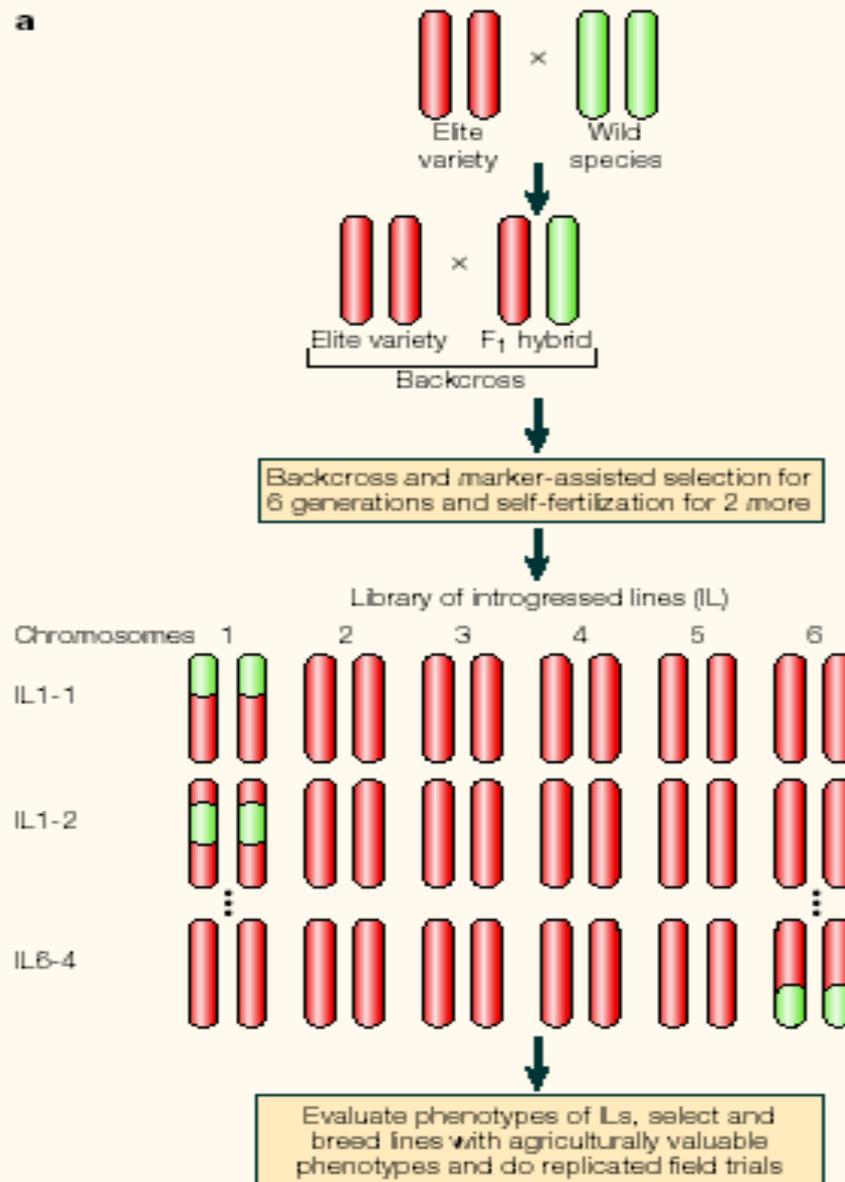
COMPOSIZIONE AMIDO (rapporto amilosio/amilopectina)

- Alto contenuto amilosio, maggiore resistenza alla cottura, risultato meno "appiccicoso" (preferito nel Sud Asiatico)
- Basso contenuto amilosio, risultato "appiccicoso" (preferito in Cina, Giappone e Corea)

Approccio classico per il miglioramento genetico delle piante



Approccio classico per il miglioramento genetico delle piante



Alcuni tipi di riso



Conventional plant type

**high-yielding
high-tillering**

'Super Rice'

Semidwarf (*sd-1*), “green revolution” rice, contains a defective gibberellin 20-oxidase gene

Wolfgang Spielmeier^{**†}, Marc H. Ellis^{*}, and Peter M. Chandler

Division of Plant Industry, Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, GPO Box 1600, Canberra ACT 2601, Australia

PNAS 2002, 99:9043

A mutant gibberellin-synthesis gene in rice

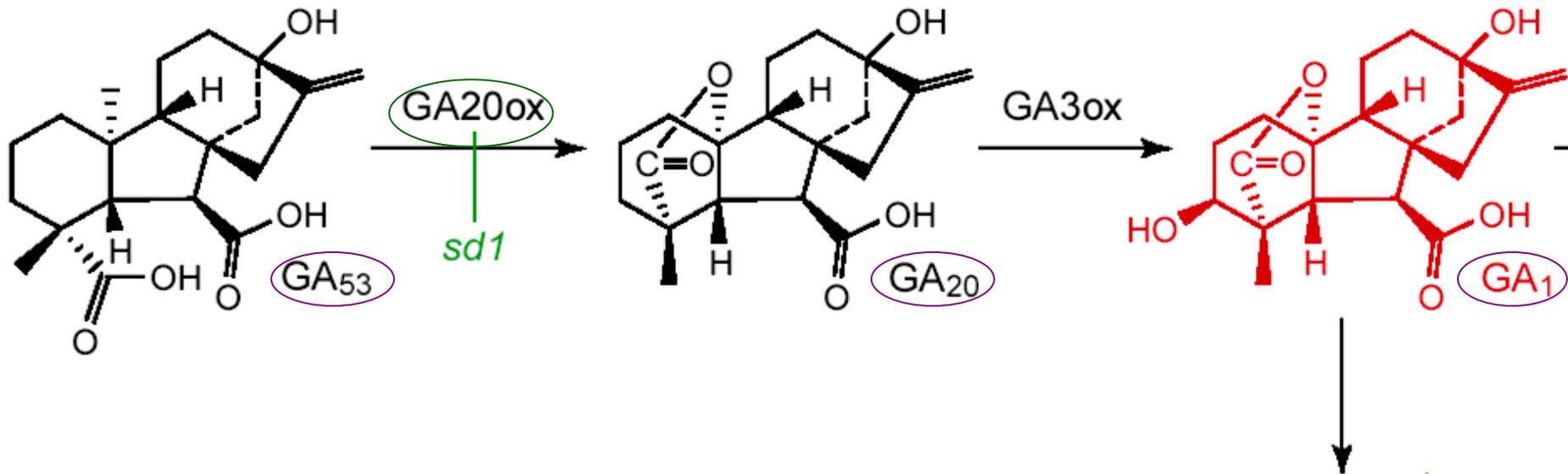
New insight into the rice variant that helped to avert famine over thirty years ago.

Sasaki et al., Nature 2002, 416:701

- Piante *sd1* recuperano statura normale se trattate con GA
- Accumulano l'intermedio GA53, ma hanno bassi livelli di GA20
- La conversione di GA53 in GA20 è catalizzata dall'enzima GA20 ossidasi (GA20ox)...

Le gibberelline (GA)

(a)



Composto biologicamente attivo:
stimola la crescita

gibberellins show many physiological effects, each depending on the type of gibberellin present as well as the species of plant.

Stimulate stem elongation by stimulating cell division and elongation.

Stimulates bolting/flowering in response to long days.

Breaks seed dormancy in some plants.

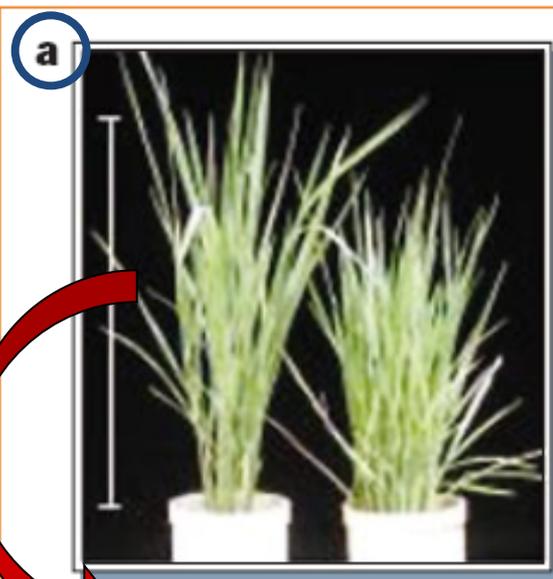
Stimulates enzyme production (α -amylase) in germinating cereal grains for mobilization of seed reserves.

Induces maleness in dioecious flowers (sex expression).

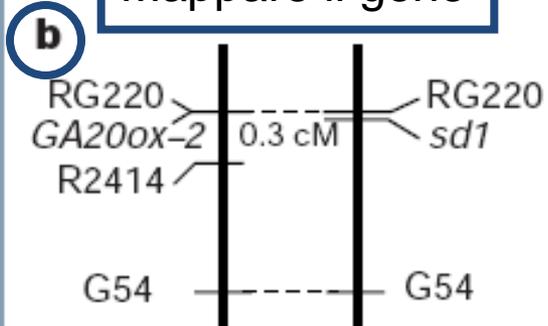
Can cause parthenocarpic (seedless) fruit development.

Can delay senescence in leaves and citrus fruits.

Sd1 codifica per GA20ox-2?



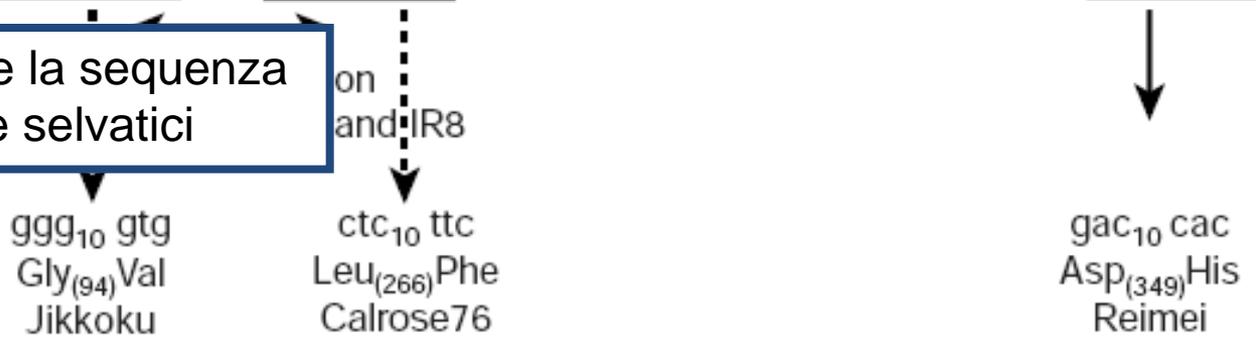
Mappare il gene



Analizzare l'espressione nei diversi tessuti della pianta



Confrontare la sequenza in mutanti e selvatici



Mutanti semi-dwarf (sd-1)

Mutazioni indipendenti:

delezione di 280 bp all'interno della regione codificante (codifica per una proteina non funzionale) in *O. indica*

sostituzione di un a.a.determina la perdita di funzione in *O. japonica*

I geni della rivoluzione verde

GAI

Repressore trascrizionale

(regola negativamente la risposta alle GA)

Wild-type

GA



media la fosforilazione e degradazione del prodotto genico di GAI

mutante dwarf

GA



Non avviene la degradazione di GAI (la GA non riconosce GAI) ed i geni inducibili da GA sono repressi



è una **gain of function** mutation

GAI mutato non risponde al segnale delle GA e reprime i geni responsabili dell'altezza

In frumento, mais e orzo mutanti nani con mutazioni puntiformi o piccole delezioni in GAI

Non rispondono alla GA (endogena o esogena)

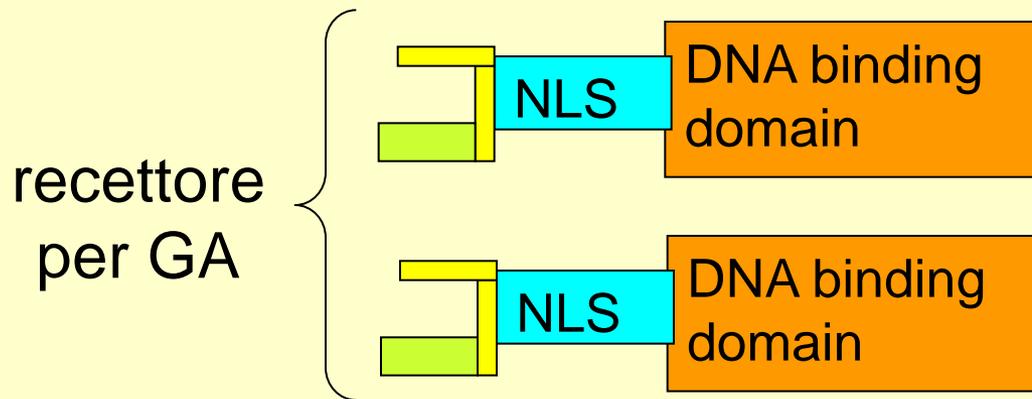
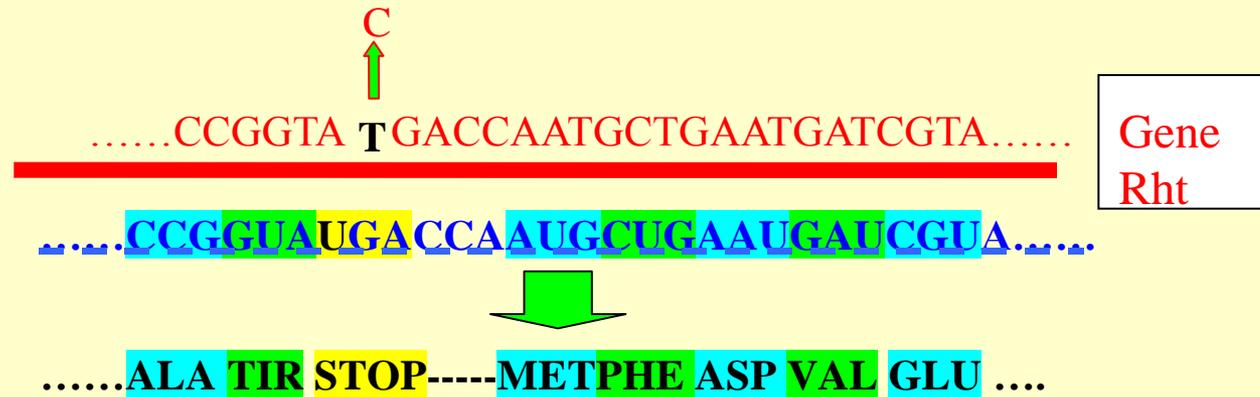
Mutanti simili a gai:

<i>rht-B1b</i>	(frumento nano)	★
<i>rht-D1b</i>	(frumento nano)	★
<i>slr1-1</i>	(riso nano)	★
Sln	(in orzo)	★
d8	(in mais)	★

★ Mutanti della green revolution

★ Geni e mutanti di possibile valore

Esempio di mutazione nel gene Rht di frumento



La mutazione porta alla mancata traduzione della regione N-terminale della proteina che funziona da recettore per la GA.



le piante sono insensibili alla GA e sono ridotte in altezza (Rht: reduced height)

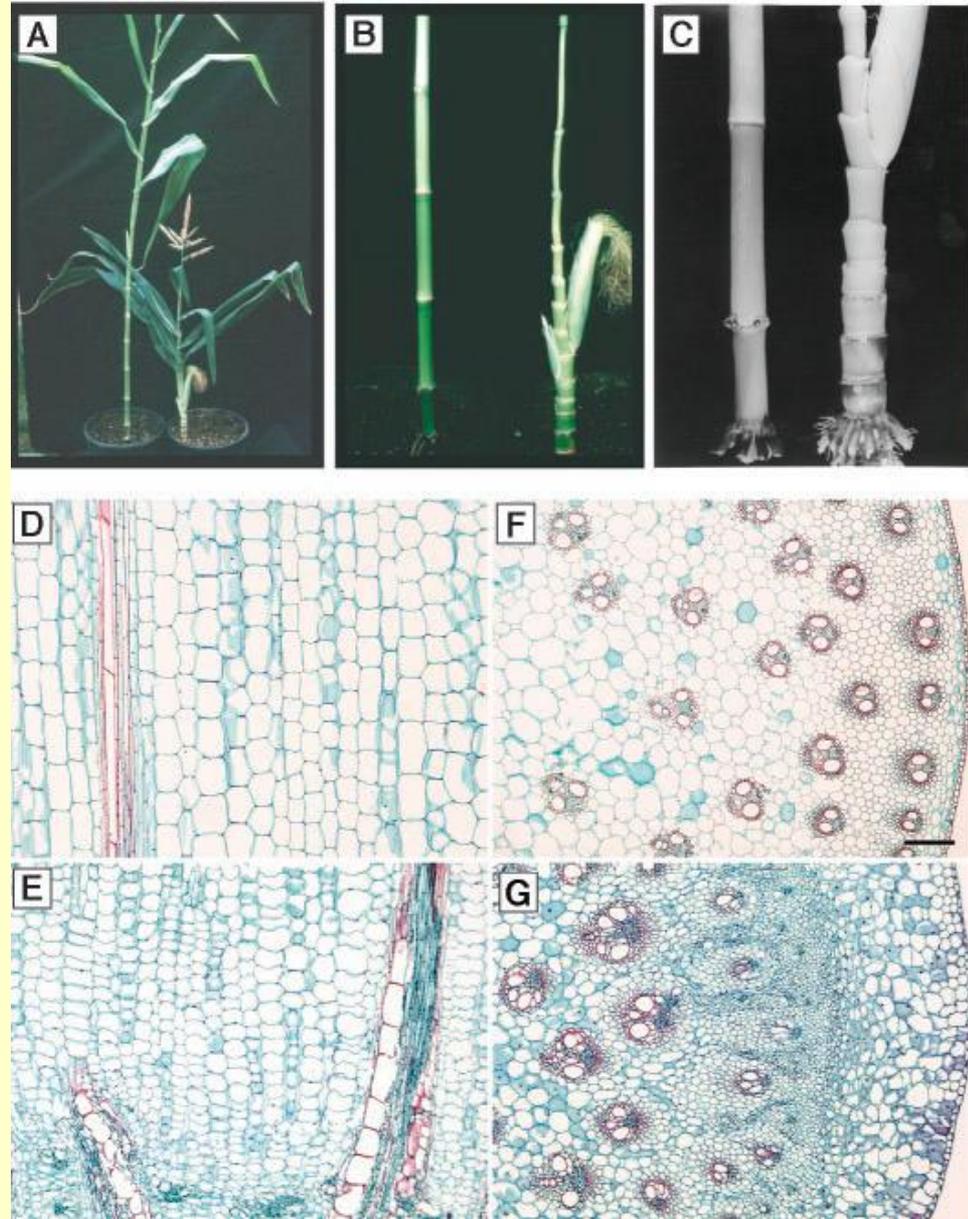
Un altro esempio

La mutazione Brachytic2 (br2) in
mais e sorgo

È alterato il trasporto polare delle
auxine

MDR transporter

P-GP modulano il trasporto dell'auxina





Un altro esempio

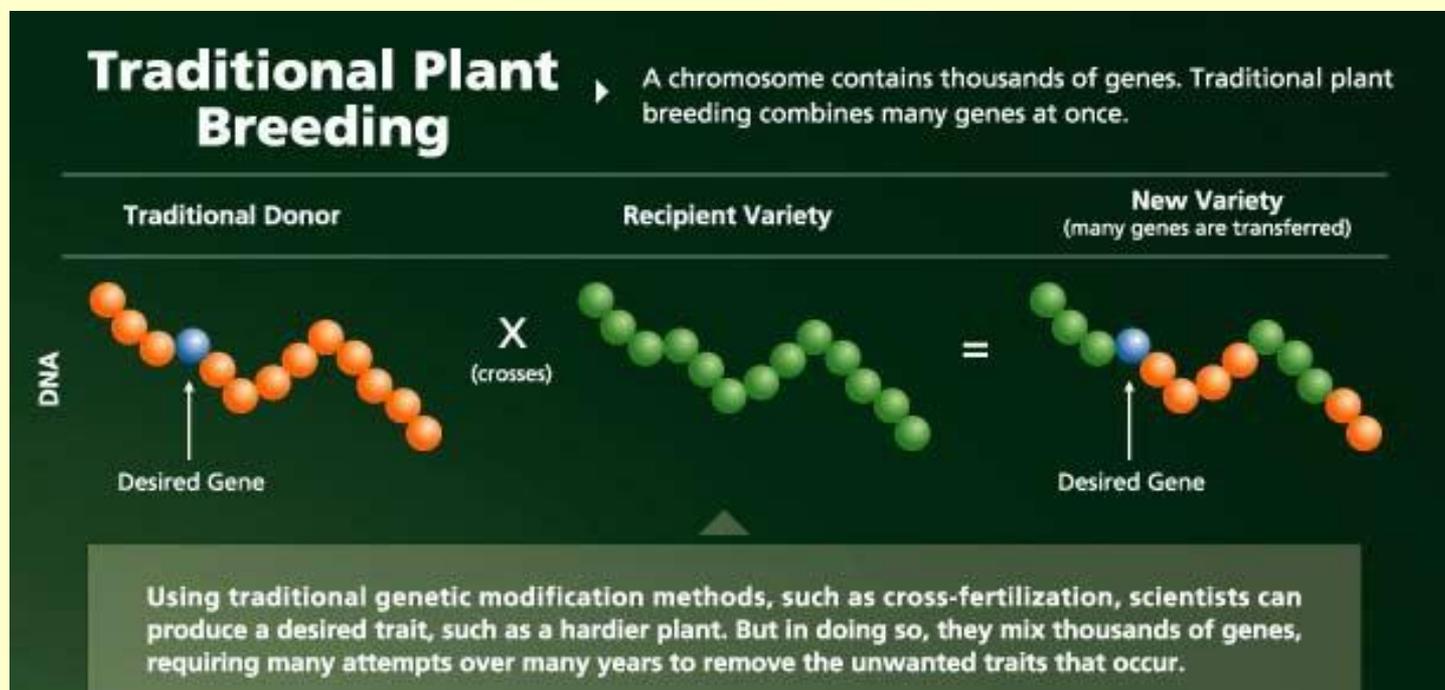
Dw3 in sorgo

Sorgo simile al mais

Ormoni e architettura della pianta

necessità di conoscere la funzione genica e le interazioni dei prodotti genici per migliorare le varietà

- ◇ Approfondire l'apparato radicale
- ◇ Migliorare la distribuzione degli assimilati
- ◇ Aumentare l'efficienza fotosintetica



Il miglioramento tradizionale (ed in larga misura anche quello a base molecolare) ha alcuni limiti:

1. produce mescolamento del germoplasma da migliorare con numerosi geni della specie donatrice trasferiti insieme al gene di interesse
2. necessita di notevoli tempi e costi necessari per i processi di incrocio, selezione e reincrocio;
3. non è sempre semplice trovare varietà, anche selvatiche, che incrociate producono un beneficio nella produttività della pianta

The Green Revolution saw cereal crop yields triple in some areas, thanks mainly to the development of new, semi-dwarf varieties.

Although the dwarf trait can be bred into wheat by conventional methods, it has not been widely used in other cereals.

Current trends suggest that we need a second "Green Revolution" to feed the growing population on the land currently available for cultivation

The "*GAI*" gene from the non-crop plant *Arabidopsis* was found by John Innes Centre scientists to be the equivalent of the cereal *Rht* gene of the Green Revolution

Gibberellin promotes plant growth, and the *GAI* gene determines how the plant responds to this hormone. Plants carrying an altered version of the *GAI* gene are less sensitive to gibberellin, so are dwarf. Scientists soon realised that *GAI* is the *Arabidopsis* equivalent of the cereal *Rht* gene of the Green Revolution.

Using genetic modification, new dwarf varieties of cereal crops other than wheat will be possible

more flexibility in controlling plant growth to potentially improve plant performance and yield.

Other changes to plant architecture might also be possible in future that could also improve crop yields. The discovery of the *GAI* gene has revealed that it is possible to alter plant height and dramatically increase crop yield. Other modifications are also possible, for example changing the root architecture might enable increased uptake of nutrients and water from the soil, while changing the arrangement of leaves might help the plant to make the most of the available light.

GM-assisted plant breeding could provide a key to a second Green Revolution needed to provide enough food to support the population. The first Green Revolution, despite its massive beneficial impact, is now seen as being relatively crude. It depended on plant breeding, but also required farmers to use increased amounts of fertilizer on their crops. This meant it didn't benefit many poorer farmers who didn't have access to these chemicals. Also excessive use of chemical fertilisers can have a harmful effect on the environment. This case study shows how *GAI* allows breeders access to useful genes not available by conventional breeding and to tailor these genes in precise ways to deliver desirable outcomes.

The potential for GM technology to improve crop yield still further is a valuable step towards the goal of a second Green Revolution with less dependence on chemical inputs

L'approccio transgenico

Newer methods of genetic modification, in the form of genetic engineering, are more precise and predictable—and faster. By controlling the insertion of one or two genes into a plant, scientists can give it a specific new characteristic without transferring undesirable traits.

Modern Plant Breeding (genetic engineering)

Using plant biotechnology, a single gene may be added.

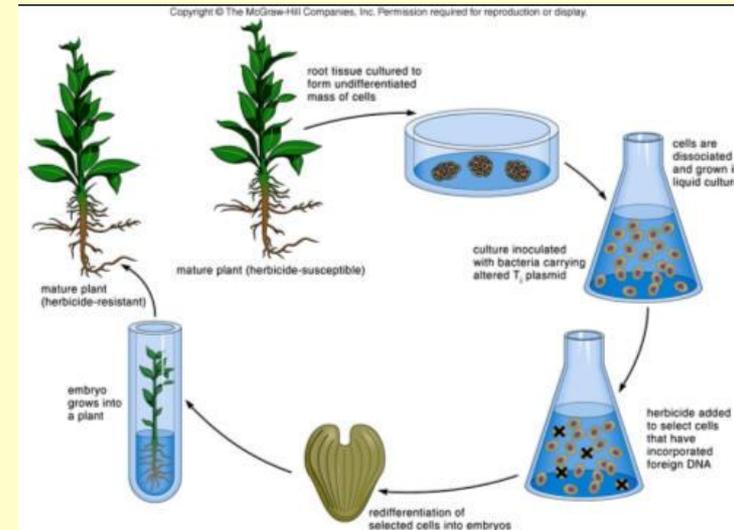


Infographic: FDA/Michael Esmarh

è essenziale svolgere molta ricerca di base per identificare nuovi geni in grado di conferire potenziali benefici

L'approccio transgenico

I geni più ricercati sono quelli in grado di migliorare la qualità del prodotto e conferire resistenza a stress di tipo biotico e abiotico



Una volta individuato, il gene d'interesse deve essere introdotto nel background genetico più semplice da trasformare.

Quindi le piante che portano il transgene devono essere selezionate e il livello di espressione del transgene verificato.



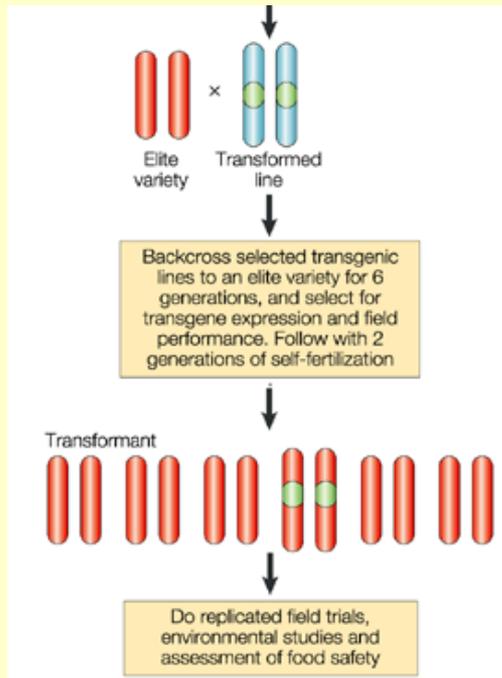
trasformanti
analizzati per diverse generazioni,
fenomeni di silenziamento sono piuttosto
comuni



dipendono dalla specie trasformata e dal
tipo di tecnica utilizzata per la
trasformazione.



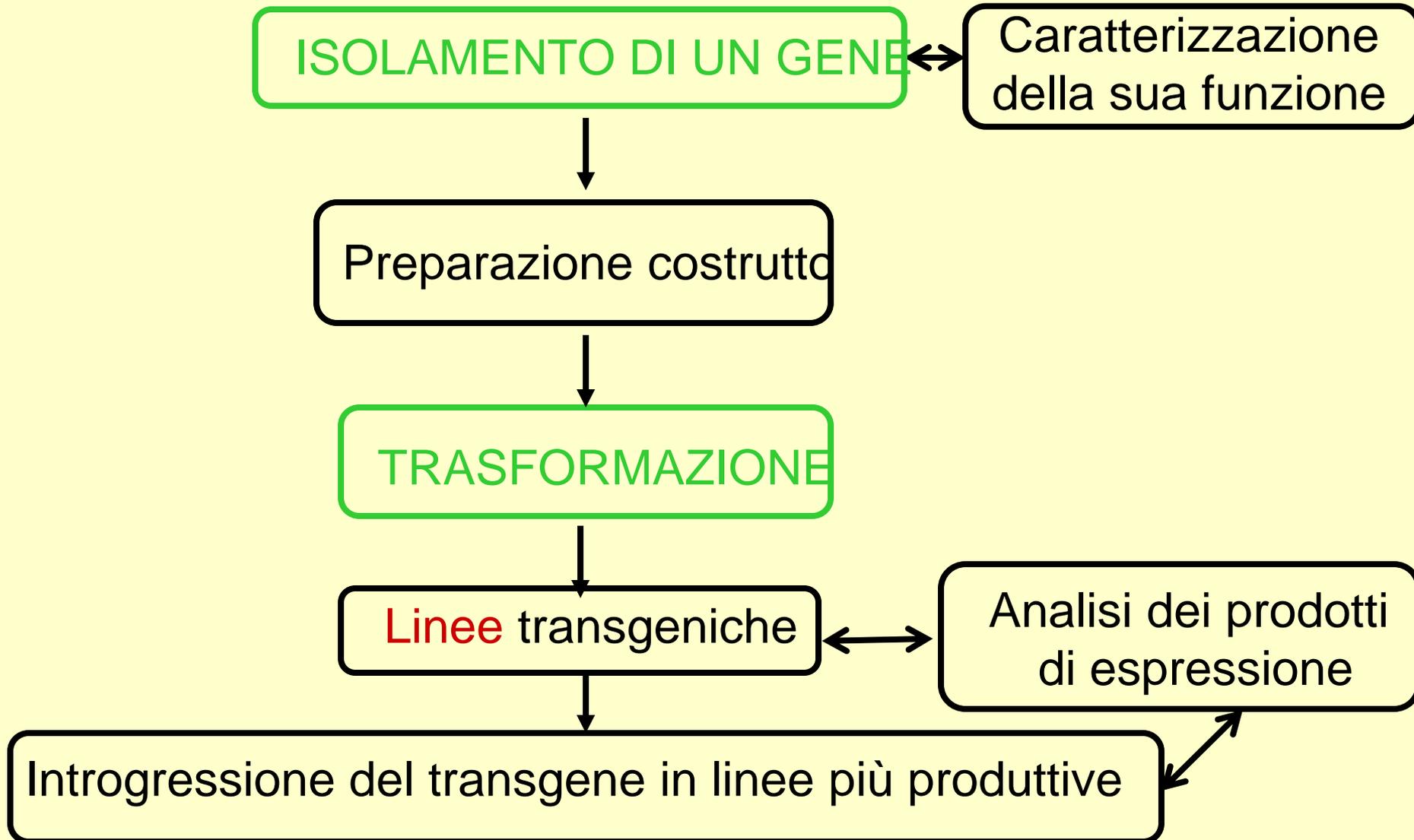
Transgenic plants in glass house



Quando una pianta contenente il transgene
espresso al livello desiderato è stata individuata,
si procede al suo "backcross" con una varietà
d'elite

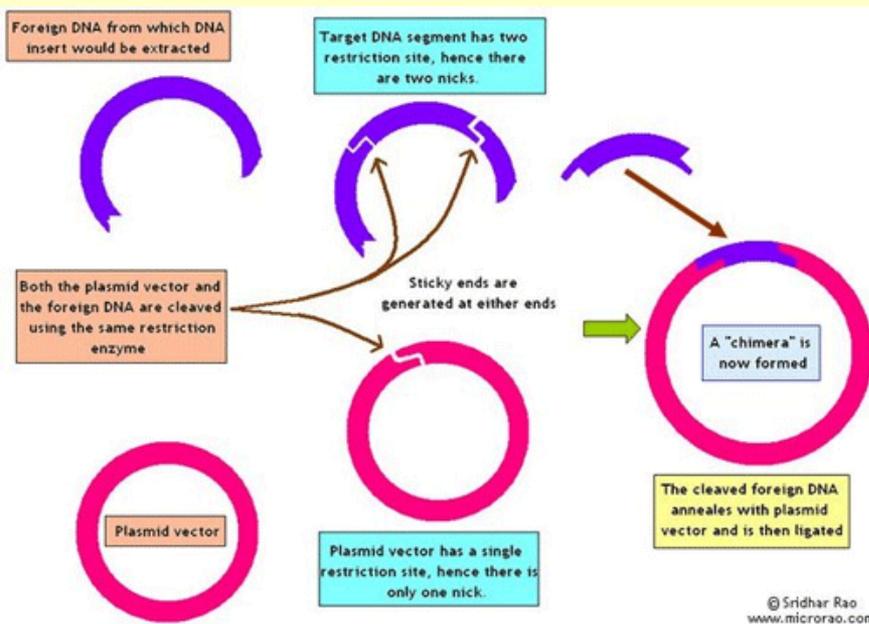
una nuova varietà modificata soltanto in un tratto
genetico

Approccio biotecnologico per il miglioramento genetico delle piante



Il miglioramento genetico biotecnologico

richiede la conoscenza approfondita a livello molecolare del gene o dei geni che controllano il carattere oggetto di studio



I passaggi limitanti sono:
isolamento e clonaggio
trasformazione.

Si parla di linee transgeniche, poichè si assume che il transgene si sia inserito in posizioni differenti nel genoma di ognuna.

Effetto di posizione

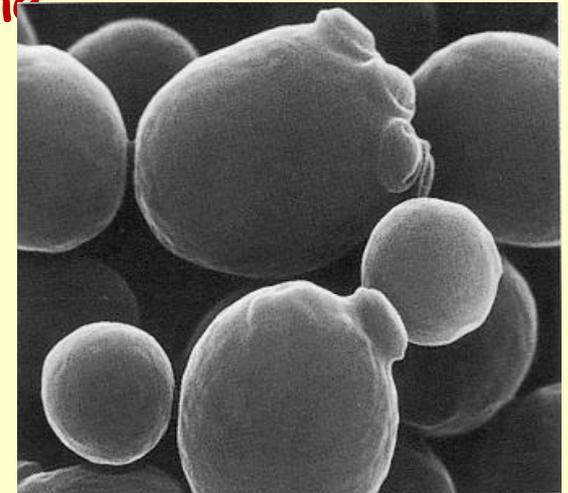
introgredire il transgene in linee più produttive,

Linee trasformabili non sempre sono le più produttive

è necessario mettere in atto delle procedure per la **verifica della trasformazione**:

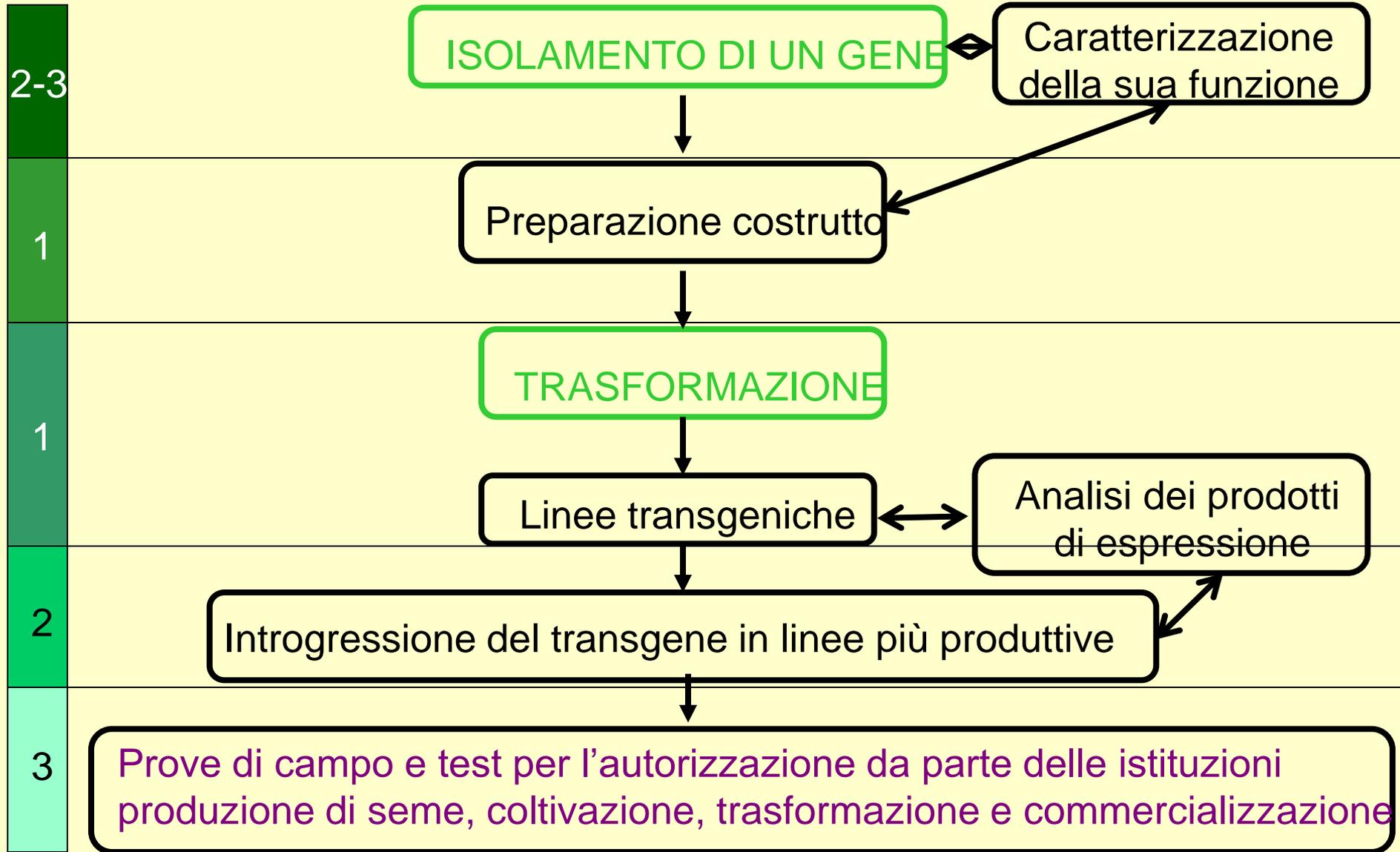
1. si può inserire il gene in *protoplasti di tabacco* (trasformazione transiente) per verificare, mediante antibiotici, la presenza della proteina codificata dal gene; questo assicura che la trasformazione conduca alla produzione di proteine

2. Un altro test contempla *l'espressione eterologa in lievito*, e consente di vedere (in un sistema eucariotico) se la proteina viene processata correttamente.



Scala temporale per lo sviluppo di prodotti vegetali transgenici

anni



Requisiti essenziali per la produzione di piante transgeniche

- Disponibilità di un **tessuto vegetale** che includa cellule competenti per la rigenerazione di una pianta intera (cellule target)
- Un **sistema per introdurre** DNA nelle cellule target
- Una procedura per **selezionare e rigenerare le piante** trasformate
- Verificabilità della avvenuta trasformazione

Requisiti essenziali per la produzione di piante transgeniche

- Disponibilità di DNA clonato da introdurre nella pianta attraverso la creazione di un COSTRUTTO (promotore, CDS, terminatore; marker; reporter)

Obiettivi

- Rigenerazione di una pianta transgenica fertile
- Presenza di una o poche copie del transgene
- Trasmissione mendeliana semplice del transgene
- Espressione corretta e consistente del transgene

Gli scopi del biotecnologo:

1. CONTROLLARE L'ESPRESSIONE DEL TRANSGENE
2. CONTROLLARE LA STABILITA' DELLA PROTEINA
3. CONTROLLARE L'INTEGRAZIONE DEL TRANSGENE

The Next Green Revolution?



Norman Borlaug
Nobel Peace Prize

- Biotechnology will help developing countries accomplish things that they could never do with conventional plant breeding"
- "I believe genetically modified food crops will stop world hunger."

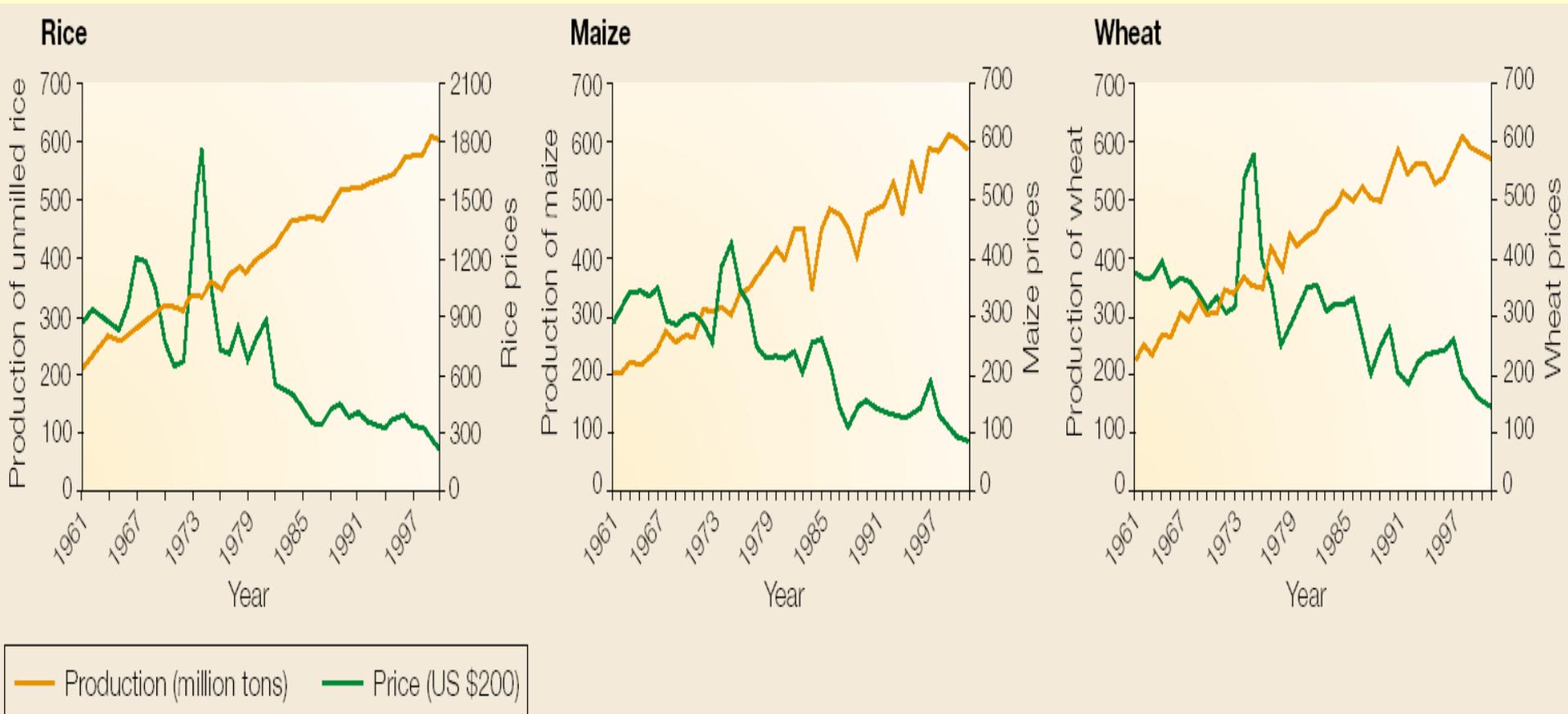
The Next Green Revolution?



Norman Borlaug
Nobel Peace Prize

- Biotechnology helps farmers produce higher yields on less land.
- Technology allows us to have less impact on soil erosion, biodiversity, wildlife, forests, and grasslands
- To achieve comparable yields (1950-1999) with old farming methods, would have needed an additional 1.8 Billion hectares of land

L'impatto della green revolution



Impact on food production

Impact on socio-economic conditions

Impact on environmental sustainability