

Produzione ed Impiego delle Piante Geneticamente Modificate



Antonella Froiio

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana
Centro di Referenza Nazionale per la ricerca di OGM

DEFINIZIONE DI OGM



OGM "Organismo il cui materiale genetico è stato modificato in modo diverso da quanto si verifica in natura con l'accoppiamento e/o la ricombinazione genetica naturale" (Dir. 2001/18/CE)



L'INGEGNERIA GENETICA E GLI OGM



Le tecniche di ingegneria genetica consentono di produrre OGM introducendo geni estranei provenienti da:

- **Microrganismi** (procarioti ed eucarioti)
- **Animali**
- **Vegetali**

L'obiettivo è in genere quello di conferire caratteristiche utili

PIANTE GENETICAMENTE MODIFICATE (PGM)



Le PGM sono piante nelle quali è stato inserito un gene proveniente da un organismo "donatore" che può appartenere alla stessa specie della pianta "ricevente", oppure a specie diverse, o addirittura a regni diversi.



PIANTE TRANSGENICHE DI PRIMA GENERAZIONE



Miglioramento delle caratteristiche agronomiche:

- Aumento della resistenza agli insetti
- Tolleranza agli erbicidi
- Aumento della resistenza alle malattie



PIANTE TRANSGENICHE DI SECONDA GENERAZIONE

(la maggior parte in fase di sviluppo o sperimentazione)



Miglioramento delle caratteristiche qualitative, nutrizionali, farmacologiche:

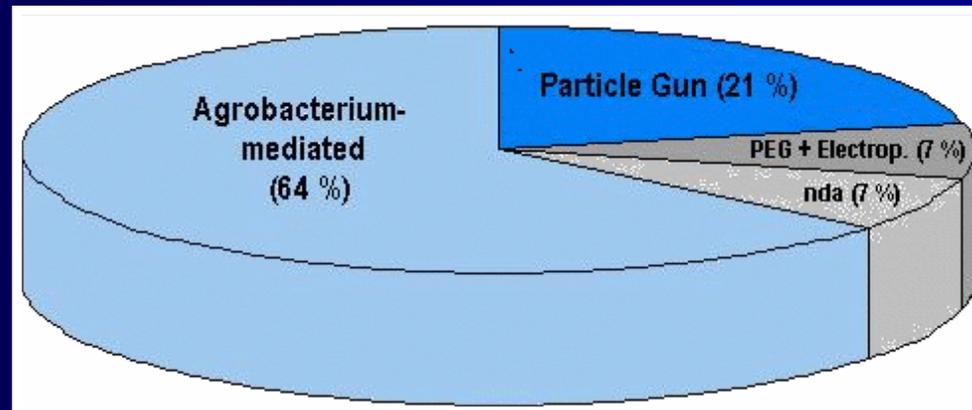
- Resistenza a siccità, appassimento
- Capacità di fissare l'azoto
- Crescita in suoli con elevata salinità, acidità, alte concentrazioni di boro o alluminio
- Ritardata maturazione dei frutti
- Ridotta allergenicità
- Proprietà integrative della dieta
- Valenze nutrizionali o terapeutiche

METODICHE DI TRASFORMAZIONE DELLE PIANTE



L'inserzione di un tratto di DNA estraneo (costrutto genico) nel genoma di una pianta può avvenire secondo diverse modalità:

- Metodi diretti (elettroporazione)
- Metodi biolistici
- Metodi dell'*Agrobacterium tumefaciens*



Fonte: BATS (Centre for Biosafety Assessment, Technology and Sustainability), Switzerland

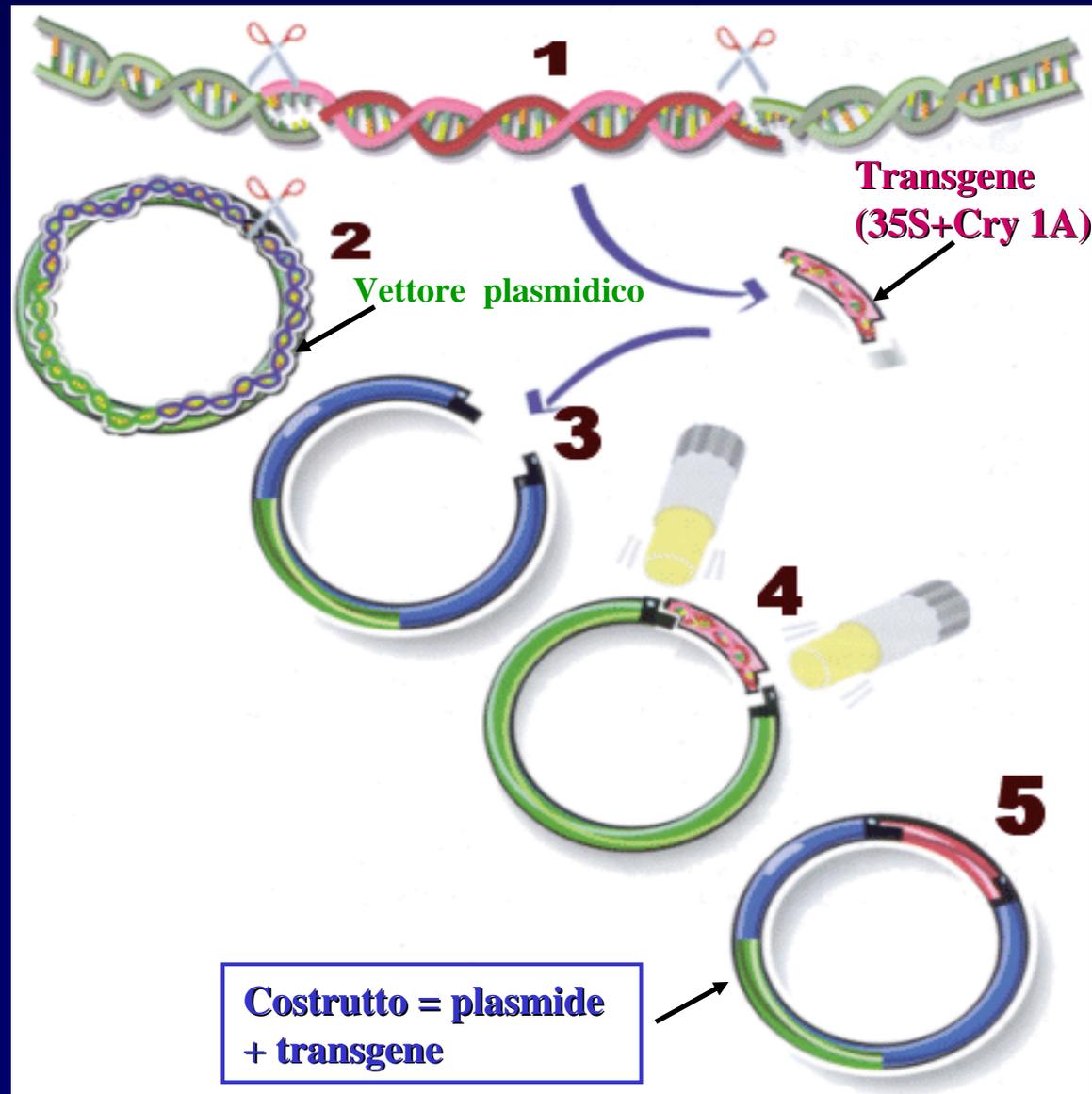
PREPARAZIONE DEL COSTRUTTO DI DNA PER LA TRASFORMAZIONE

1) Scelta della/e sequenza/e di DNA e taglio con un enzima di restrizione

2) Taglio del plasmide con lo stesso enzima di restrizione per generare estremità compatibili

3) Inserimento del/i tratto/i di DNA scelto/i

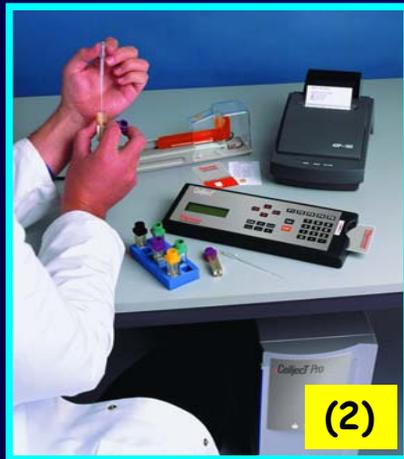
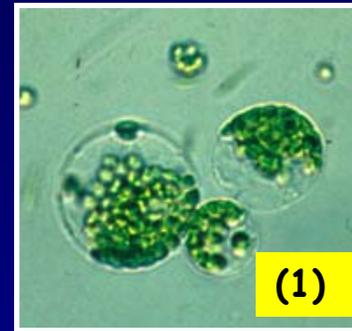
4) "ligation"



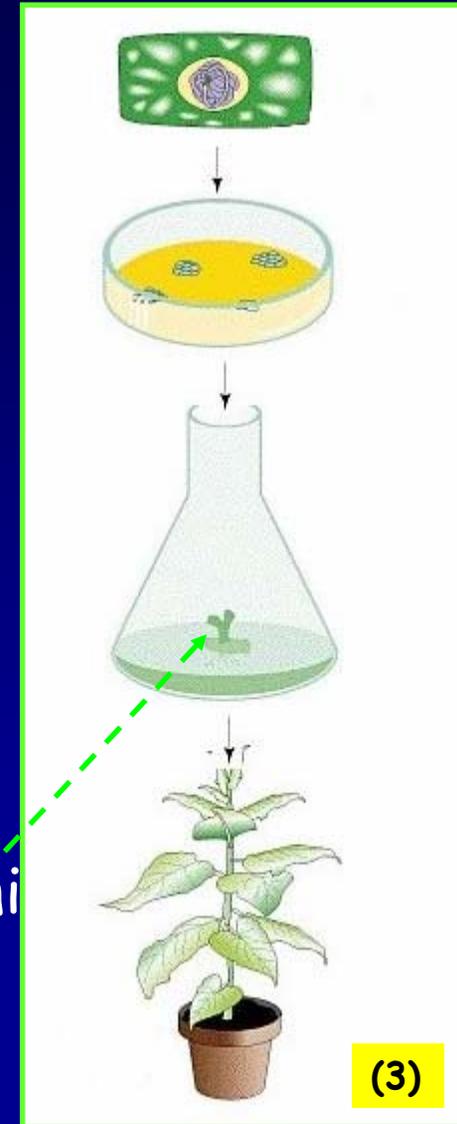
TRASFERIMENTO DIRETTO DI DNA (Elettroporazione)

(1) È necessario eliminare la parete di cellulosa delle cellule vegetali (cellulasi fungine) per ottenere i **protoplasti**

(2) I **protoplasti** in sospensione insieme ai costrutti di **DNA** vengono sottoposti ad impulsi elettrici ad alto voltaggio



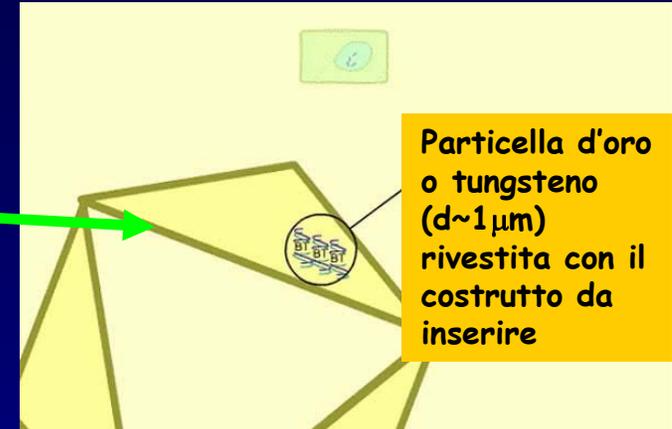
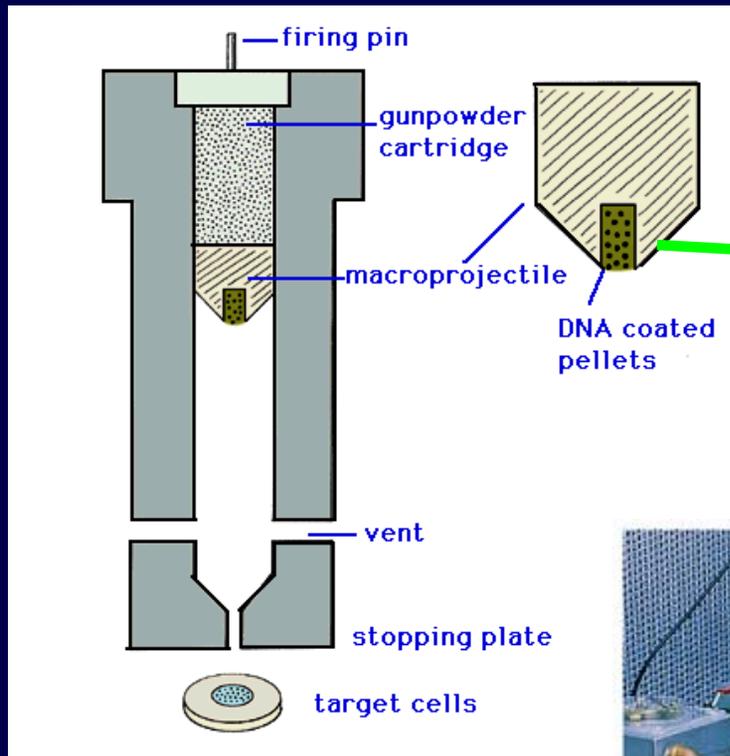
(3) Dopo **elettroporazione** i **protoplasti** vengono fatti crescere in colture tissutali con specifici livelli di fitormoni prima di procedere alla selezione della **piantina transgenica**



Non è sempre facile rigenerare
piante intere da protoplasti...

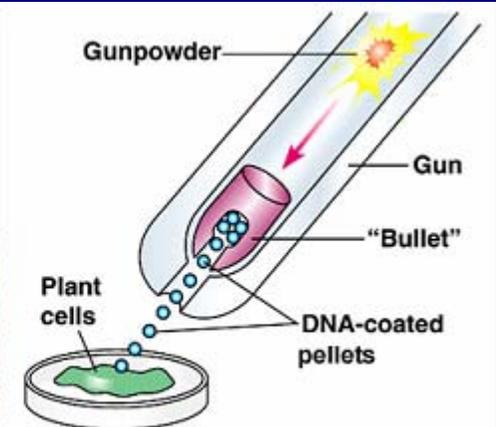
...è possibile allora ricorrere al
bombardamento di cellule con
pareti intatte mediante la
tecnica **BIOLISTICA**

BOMBARDAMENTO CON MICROPARTICELLE



(a)

Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.



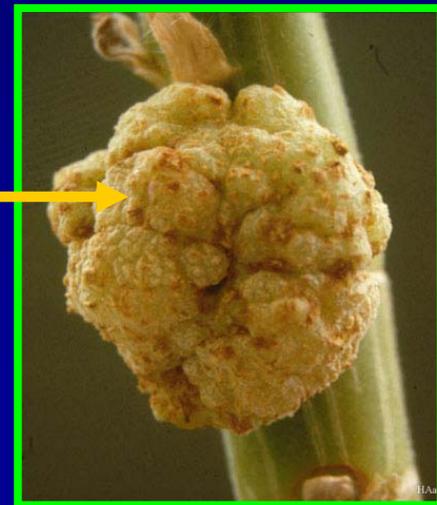
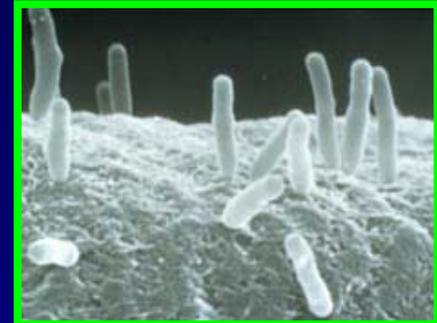
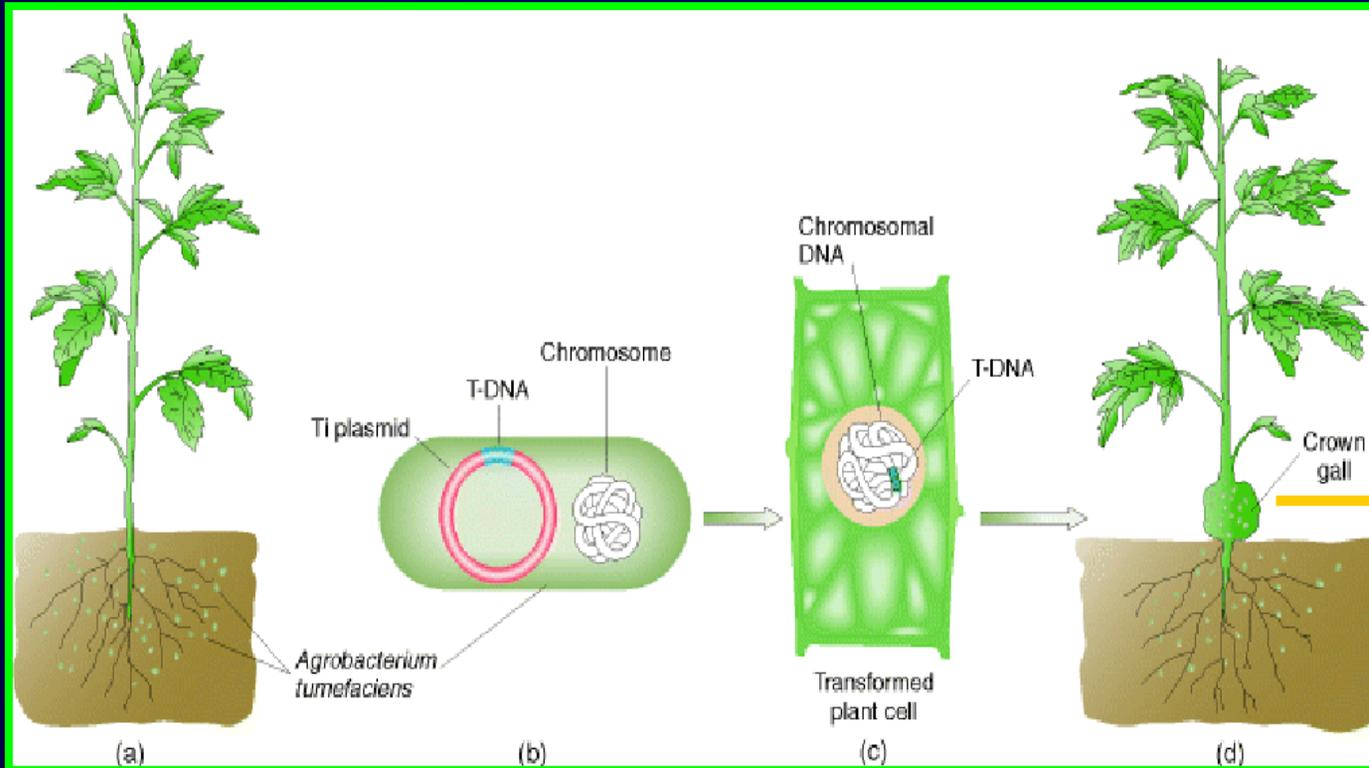
(b)

Possibili bersagli

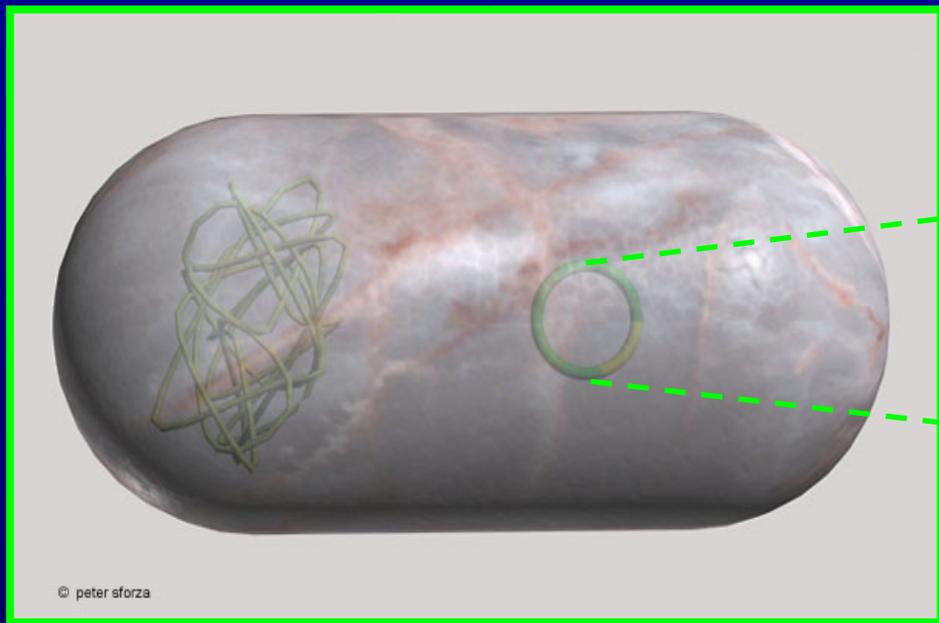
- . Foglie intatte
- . Chicchi
- . Sospensioni di cellule embrionali

Es. mais Bt176 e soia RR

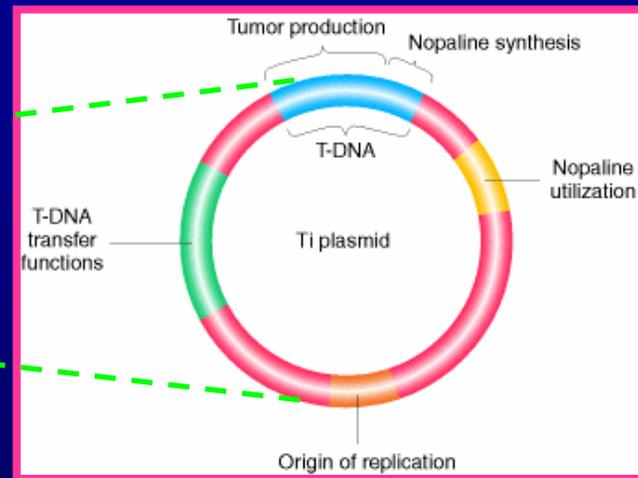
L'AGROBACTERIUM TUMEFACIENS IN NATURA: I TUMORI DELLA GALLA DEL COLLETTO



L'*Agrobacterium tumefaciens*, il "plasmide Ti" ed il "T-DNA"



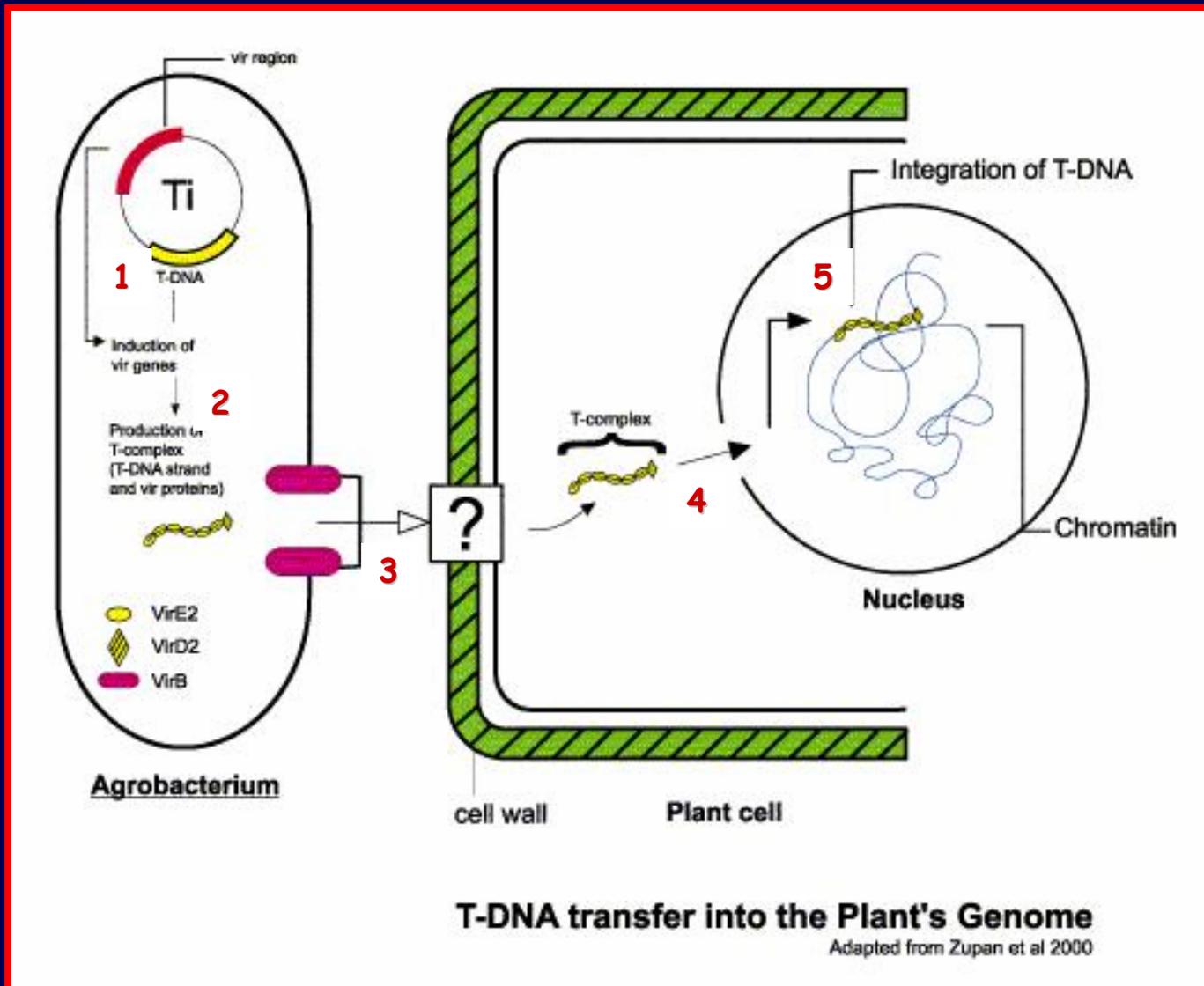
© peter sforza



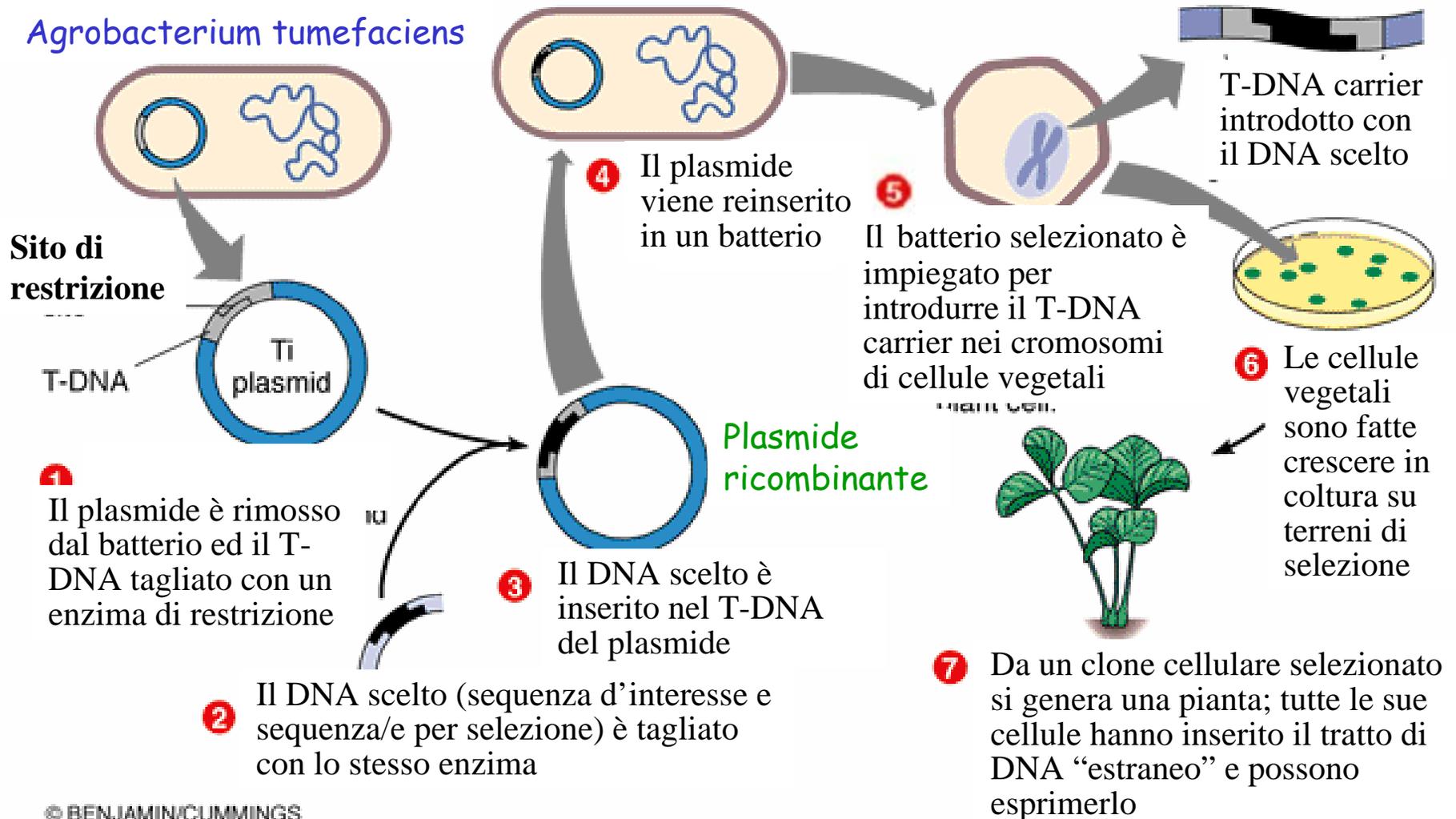
Tumor Inducing plasmids (200 kb)

- . Nopaline plasmids
- . Octopine plasmids
- . Agropine plasmids
- . Ri plasmids

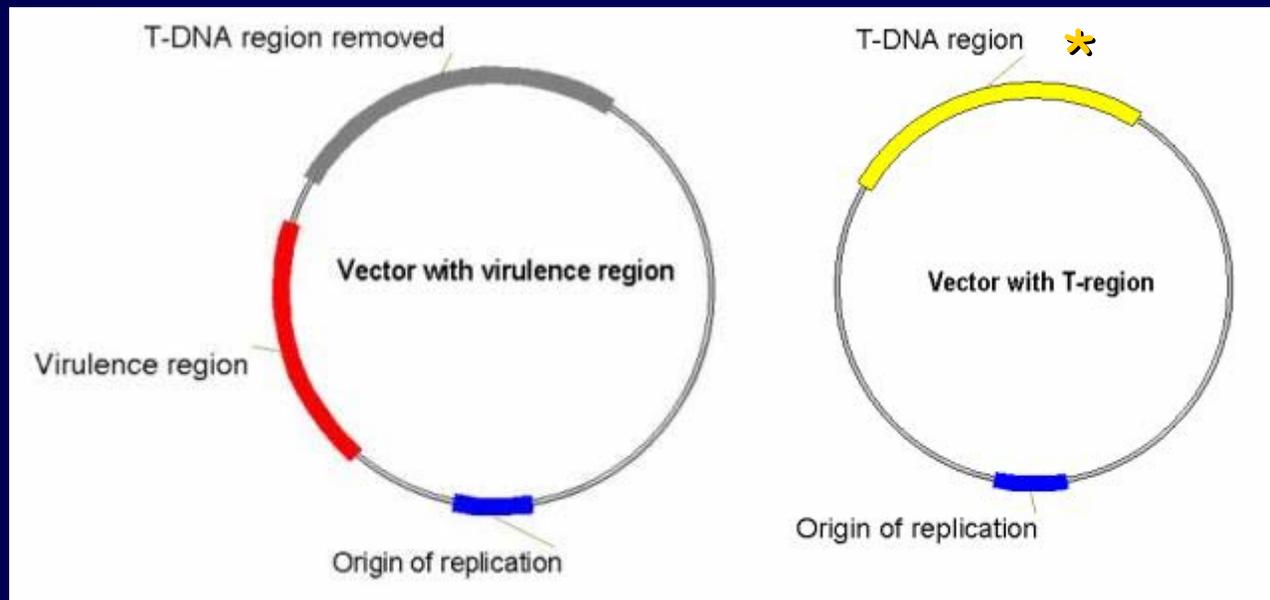
Ipotesi di meccanismo di trasferimento in natura del "T-DNA" del plasmide Ti



Schema semplificato della produzione di piante GM con *Agrobacterium tumefaciens*

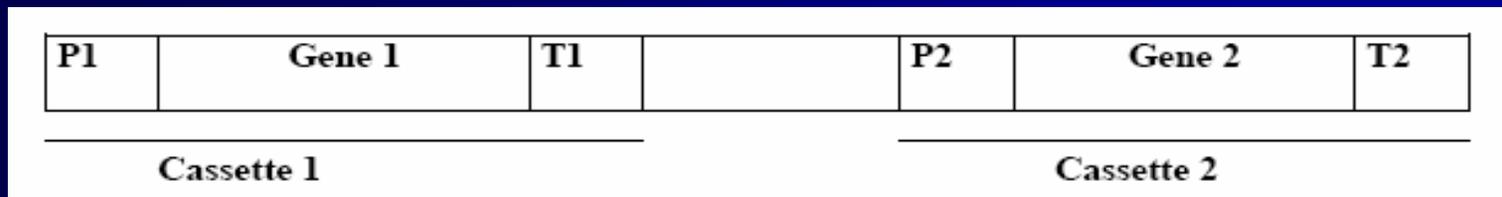
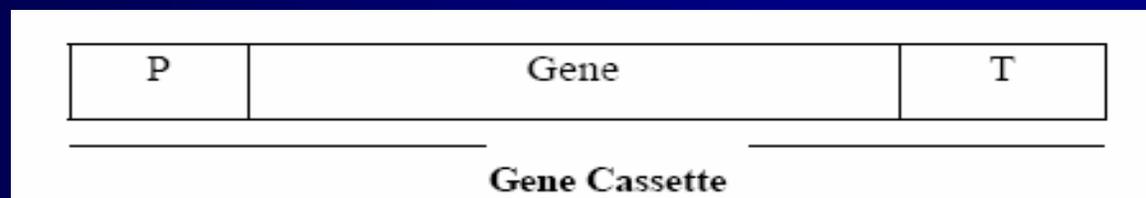
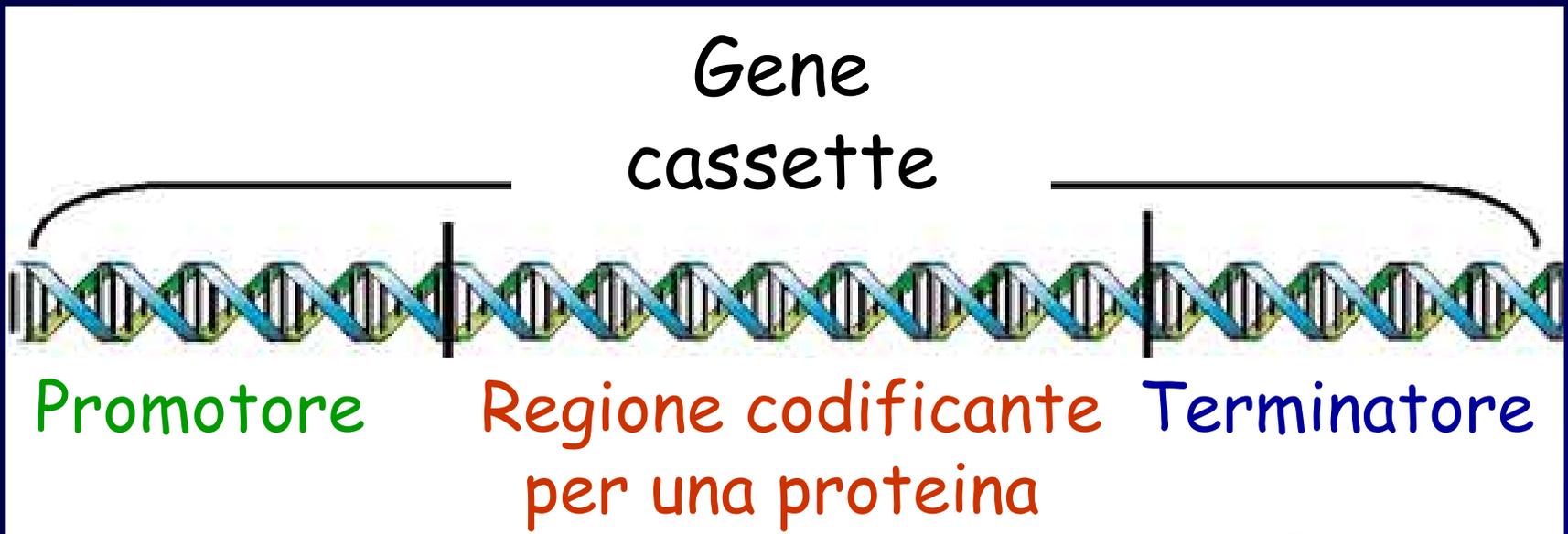


Uno dei sistemi più usati basati su *Agrobacterium tumefaciens*: il vettore binario



* T-DNA ingegnerizzato

Struttura minima di una cassetta genica



UN ESEMPIO:
IL MAIS Bt176



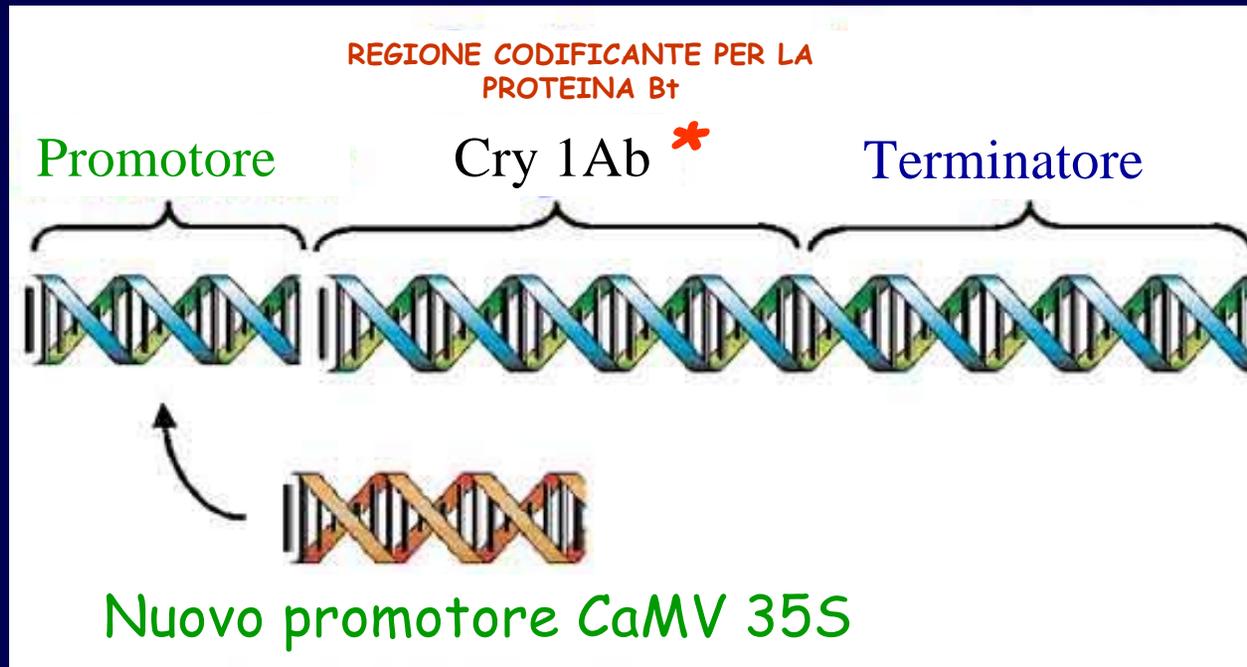
CARATTERISTICHE DEL MAIS Bt176

Nel genoma della pianta sono state inserite 6 copie del gene **Cry IAb** (resistenza agli insetti) e del gene **bla** (resistenza alle penicilline) ed almeno due copie del gene **bar** (tolleranza al glufosinato)



La pianta GM produce la **proteina tossica** per la piralide e riesce a crescere in presenza di erbicidi a base di **glufosinato**

GENE CODIFICANTE PER LA PROTEINA Bt(Cry 1Ab)



*Bacillus thuringiensis**



Produce proteine tossiche per gli insetti, impiegate come insetticidi biologici.

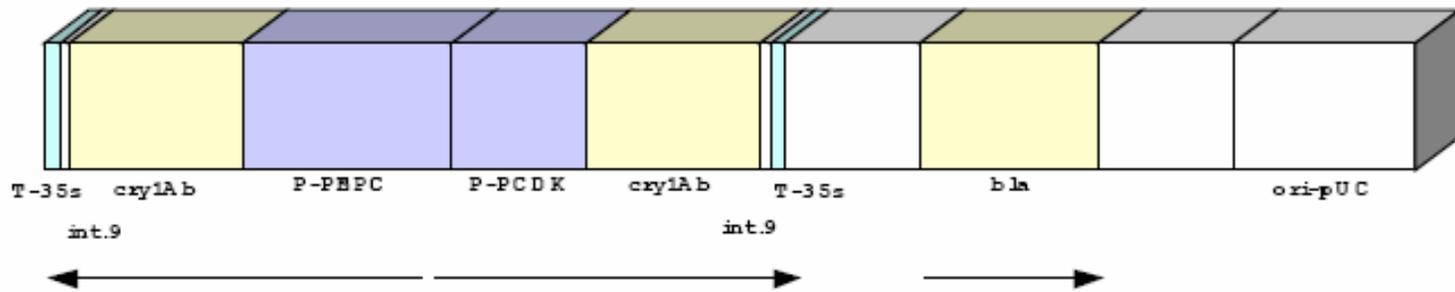


Piralide (*Ostrinia nubilalis*)

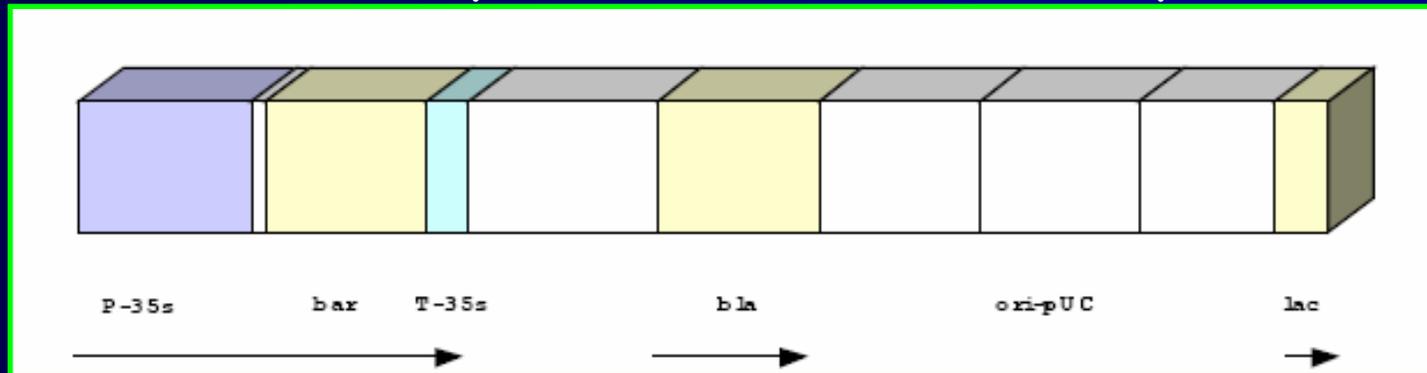


COSTRUTTI UTILIZZATI NEL MAIS Bt176

Costrutto pCIB4431 (derivato di pUC)



Costrutto pCIB3064 (derivato di pUC)



UN ESEMPIO PIÙ COMPLESSO:
UN EVENTO "DOUBLE STACKED"



COLZA MS8 × RF3

Linea MS8

- contiene il gene *barnase* derivato da *Bacillus amyloliquefaciens* ⇒ sterilità maschile
- contiene il gene *bar* isolato da *Streptomyces hygroscopicus* ⇒ tolleranza al glufosinato di ammonio

Linea Rf3

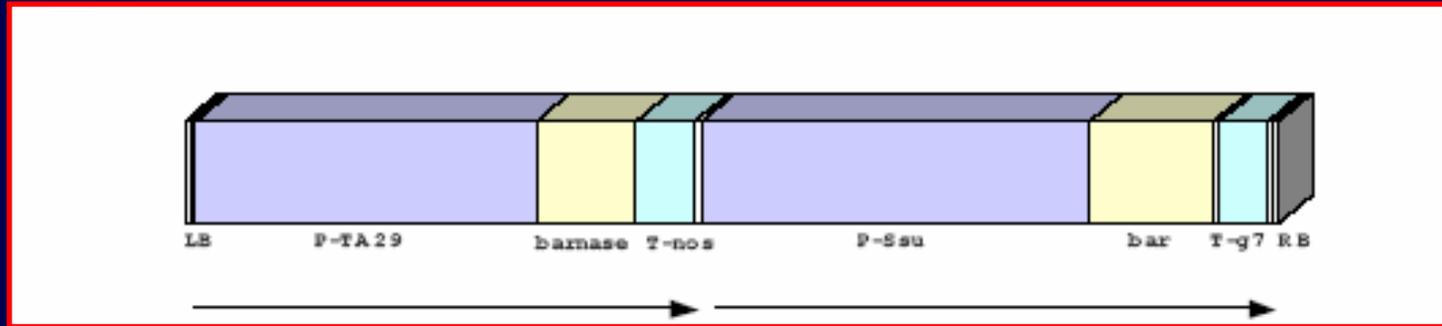
- contiene il gene *barstar* derivato da *B. amyloliquefaciens* ⇒ inibizione della RNasi codificata dal gene *barnase*
- contiene il gene *bar* isolato da *S. hygroscopicus* ⇒ tolleranza al glufosinato di ammonio



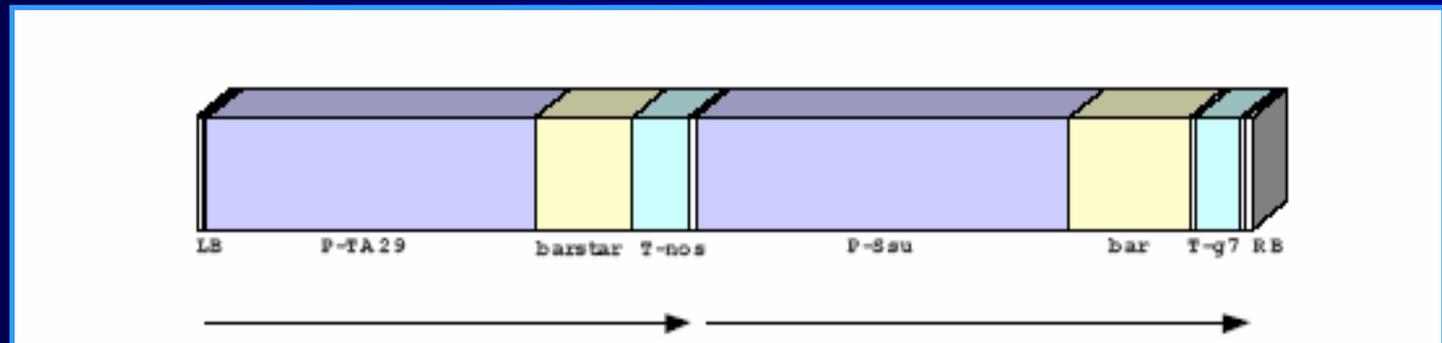
MS8 × RF3

- ripristino fertilità
- tolleranza glufosinato di ammonio
- maggiore vigore rispetto alle linee parentali

I "SINGOLI EVENTI" IN MS8 E RF3

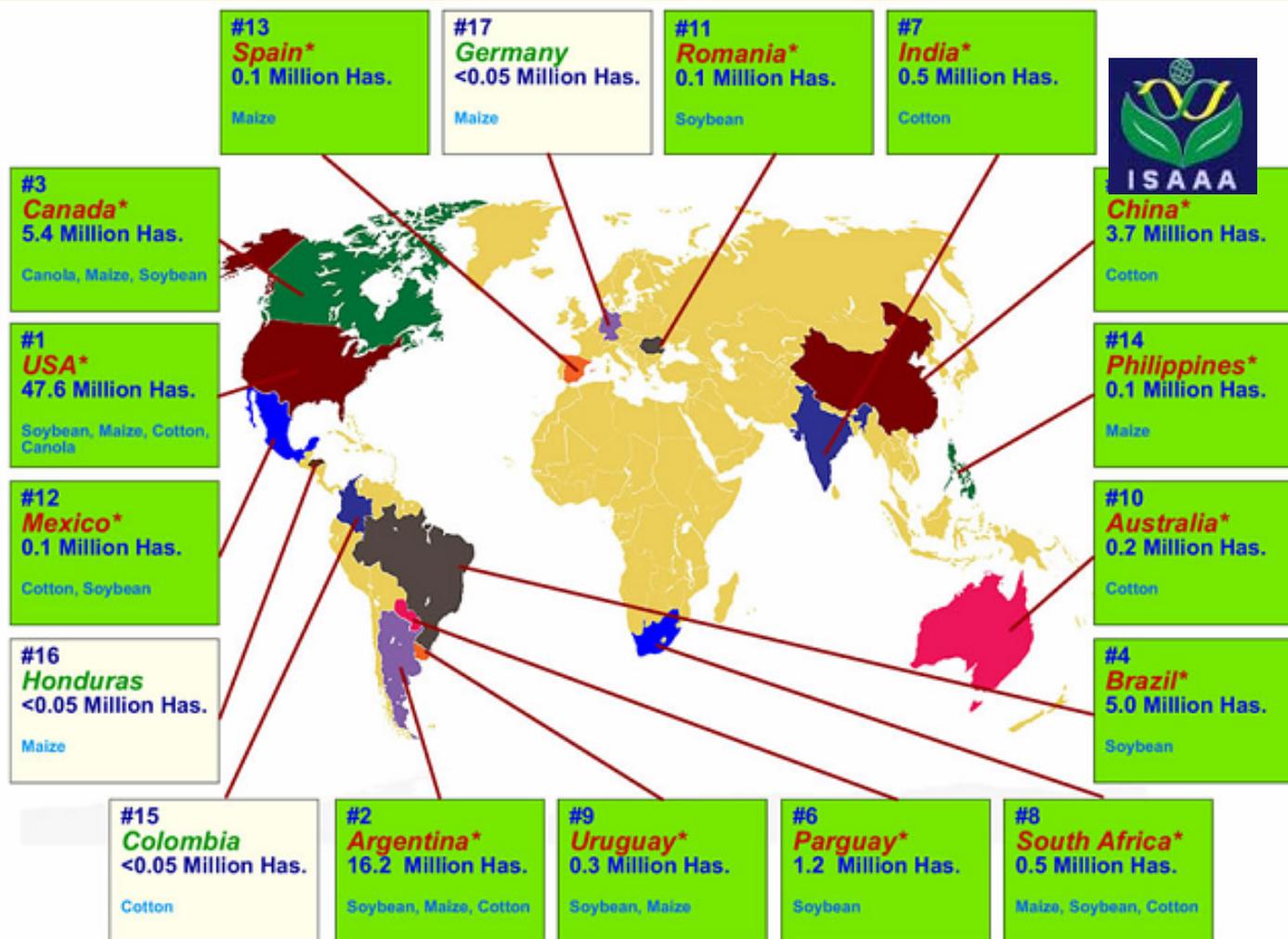


Regione T-DNA del costrutto usato per ottenere la linea transgenica MS8



Regione T-DNA del costrutto usato per ottenere la linea transgenica RF3

Cosa succede nei vari paesi
del mondo in relazione alle
colture transgeniche?



BIOTECH MEGA-COUNTRIES

50,000 hectares or more	
USA:	47.6 million
Argentina:	16.2 million
Canada:	5.4 million
Brazil:	5.0 million
China:	3.7 million
Paraguay:	1.2 million
India:	0.5 million
South Africa:	0.5 million
Uruguay:	0.3 million
Australia:	0.2 million
Romania:	0.1 million
Mexico:	0.1 million
Spain:	0.1 million
Philippines:	0.1 million
50,000 hectares or less	
Colombia	Honduras
Germany	

74.2

* 14 biotech mega-countries growing 50,000 hectares, or more, of biotech crops.

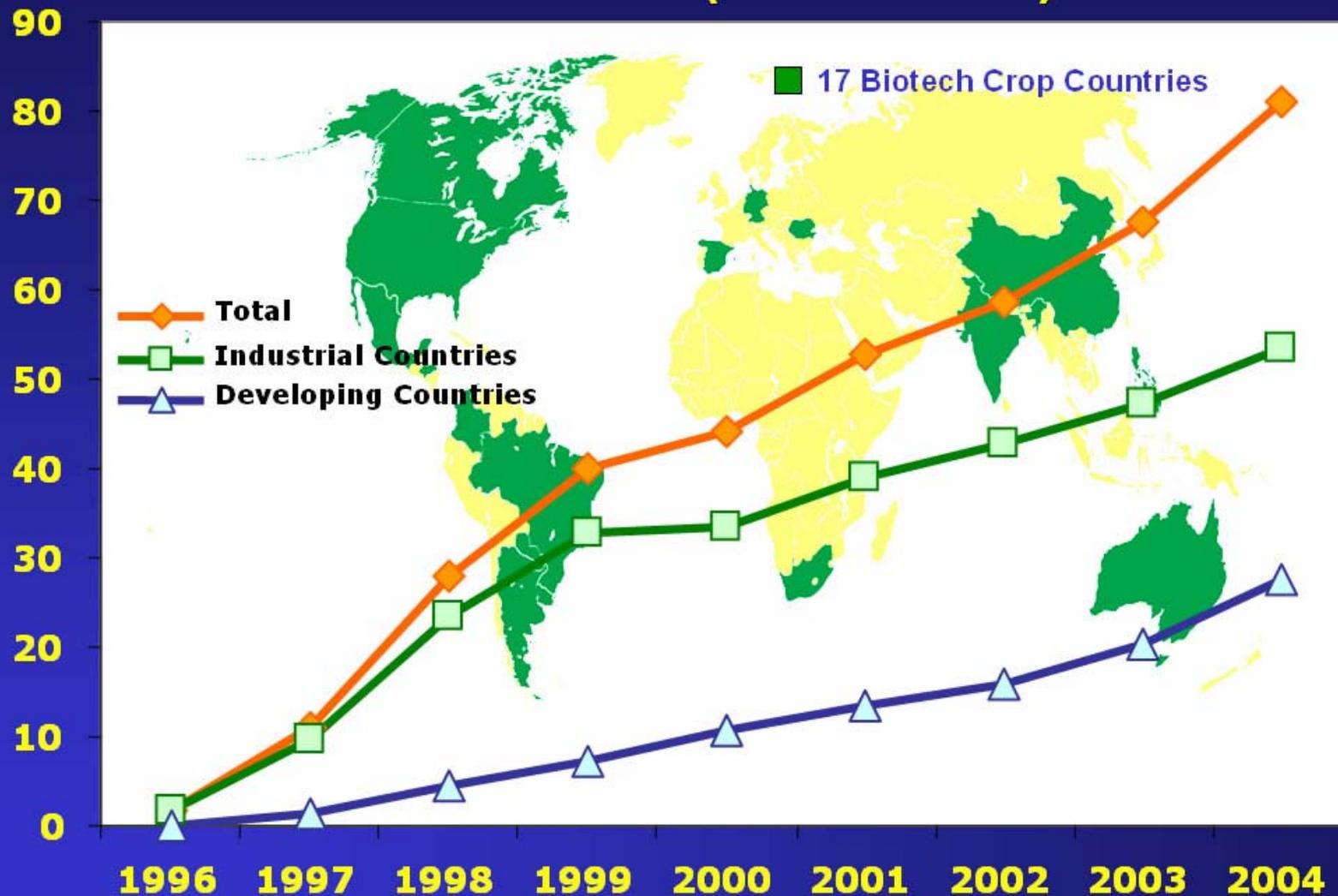
17 countries have adopted biotech crops

In 2004, global area of biotech crops was 81 million hectares representing an increase of 20% over 2003, equivalent to 13.3 million hectares.

Source: Clive James, 2004 ISAAA Briefs 32

ISAA
*International Service for the
 Acquisition of Agri-Biotech
 Applications*

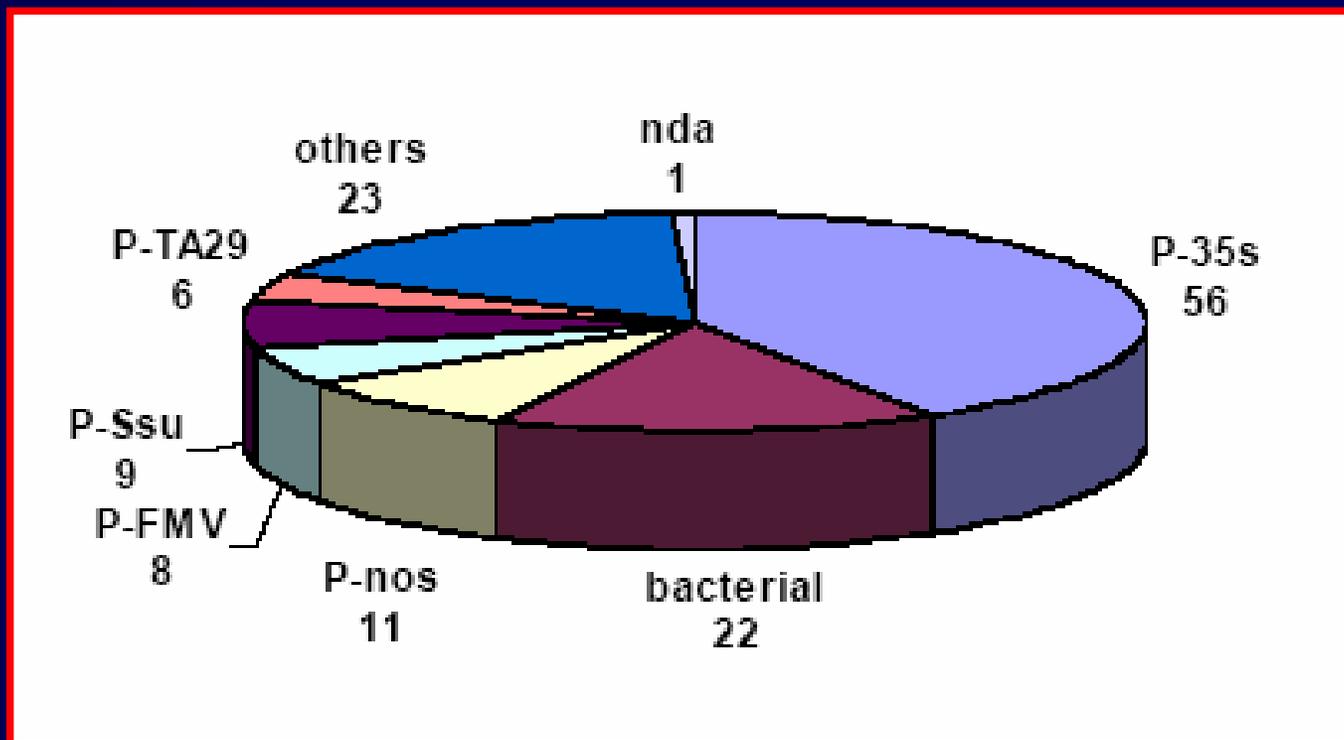
Global Area of Biotech Crops Million Hectares (1996 to 2004)



Increase of 20%, 13.3 million hectares or 32.9 million acres between 2003 and 2004

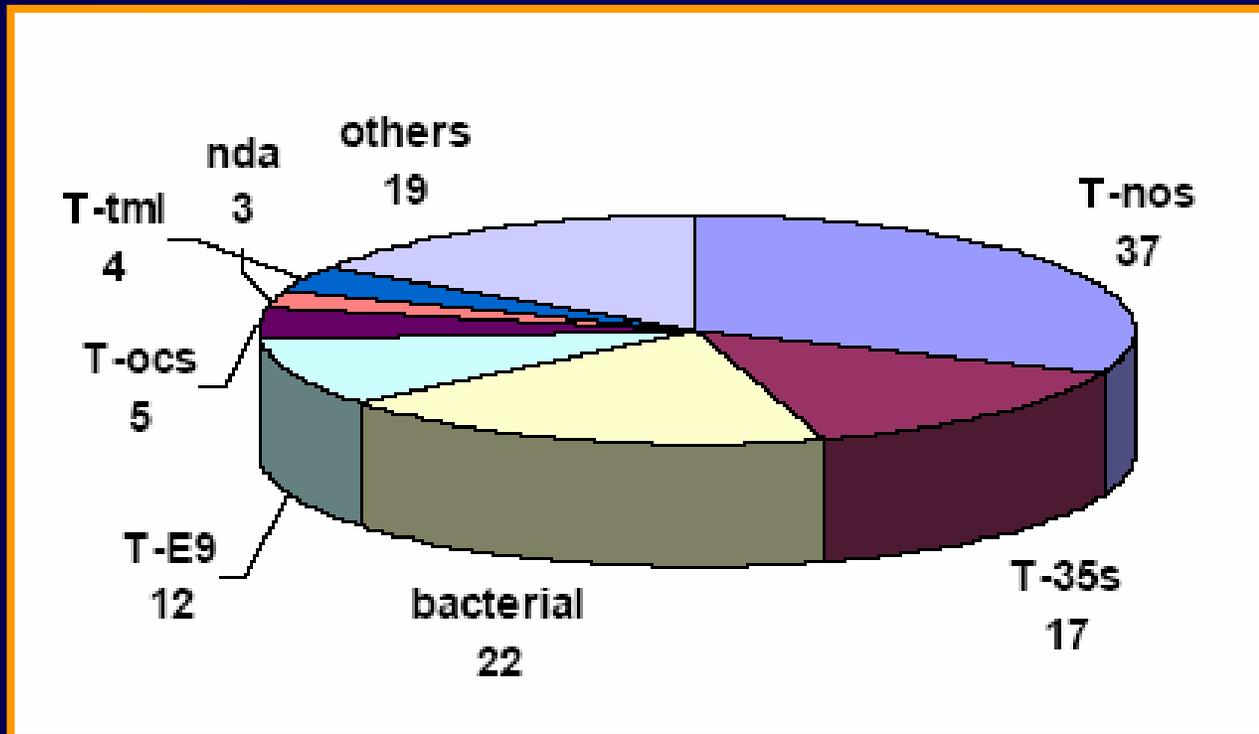
Source: Clive James, 2004

PROMOTORI MAGGIORMENTE USATI NELLE PIANTE GM



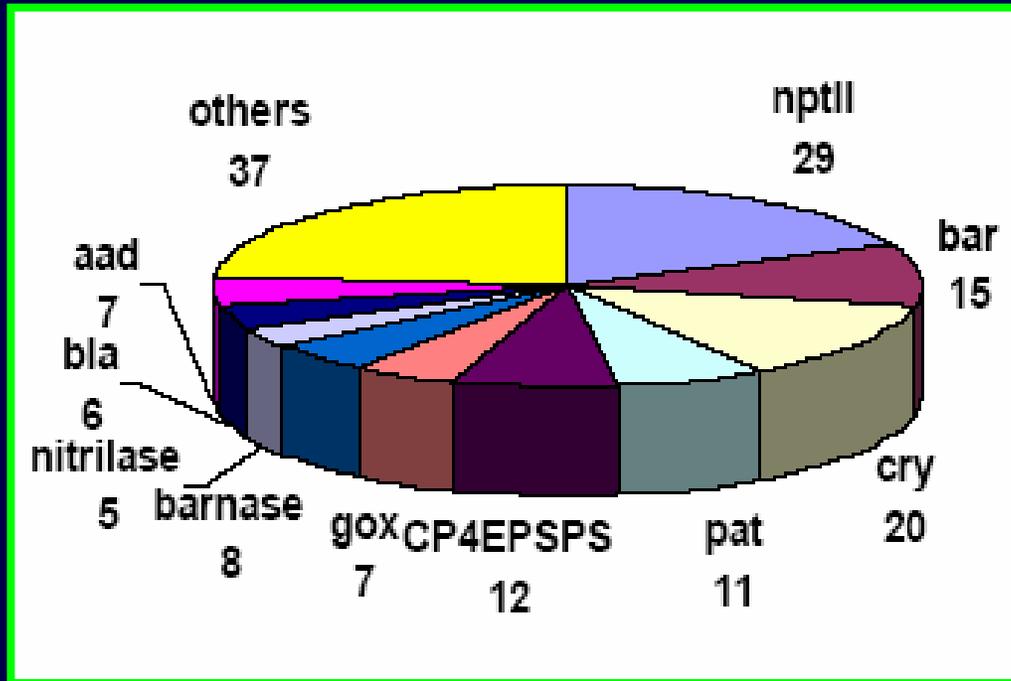
Fonte: BATS (Centre for Biosafety Assessment, Technology and Sustainability), Switzerland

TERMINATORI MAGGIORMENTE USATI NELLE PIANTE GM



Fonte: BATS (Centre for Biosafety Assessment, Technology and Sustainability), Switzerland

GENI MAGGIORMENTE USATI NELLE PIANTE GM



nptII: resistenza alla kanamicina

cry: resistenza ad insetti

bar: tolleranza al glufosinato

EPSPS: tolleranza al glifosato

pat: tolleranza al glufosinato

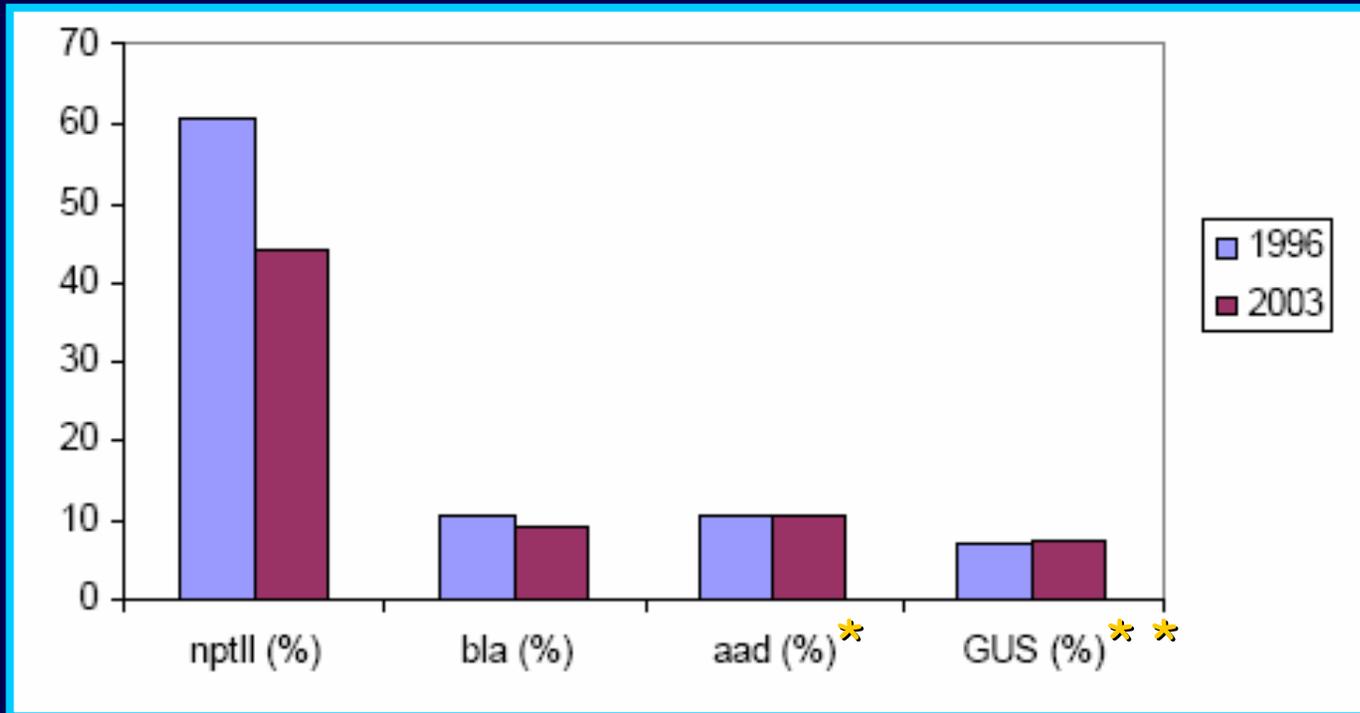
barnase: sterilità maschile

bla: resistenza alle penicilline

Fonte: BATS (Centre for Biosafety Assessment,
Technology and Sustainability), Switzerland

- . Glufosinato d'ammonio - BASTA®, LIBERTY®, RELY®, FINALE®, CHALLENGE®
- . Glifosato - Roundup®

PERCENTUALE DI PIANTE GM IN RELAZIONE AI MARCATORI DI SELEZIONE POSSEDUTI



Fonte: BATS (Centre for Biosafety Assessment, Technology and Sustainability), Switzerland

* amminoglicosil-adenil-transferasi → resistenza a sulfamidici

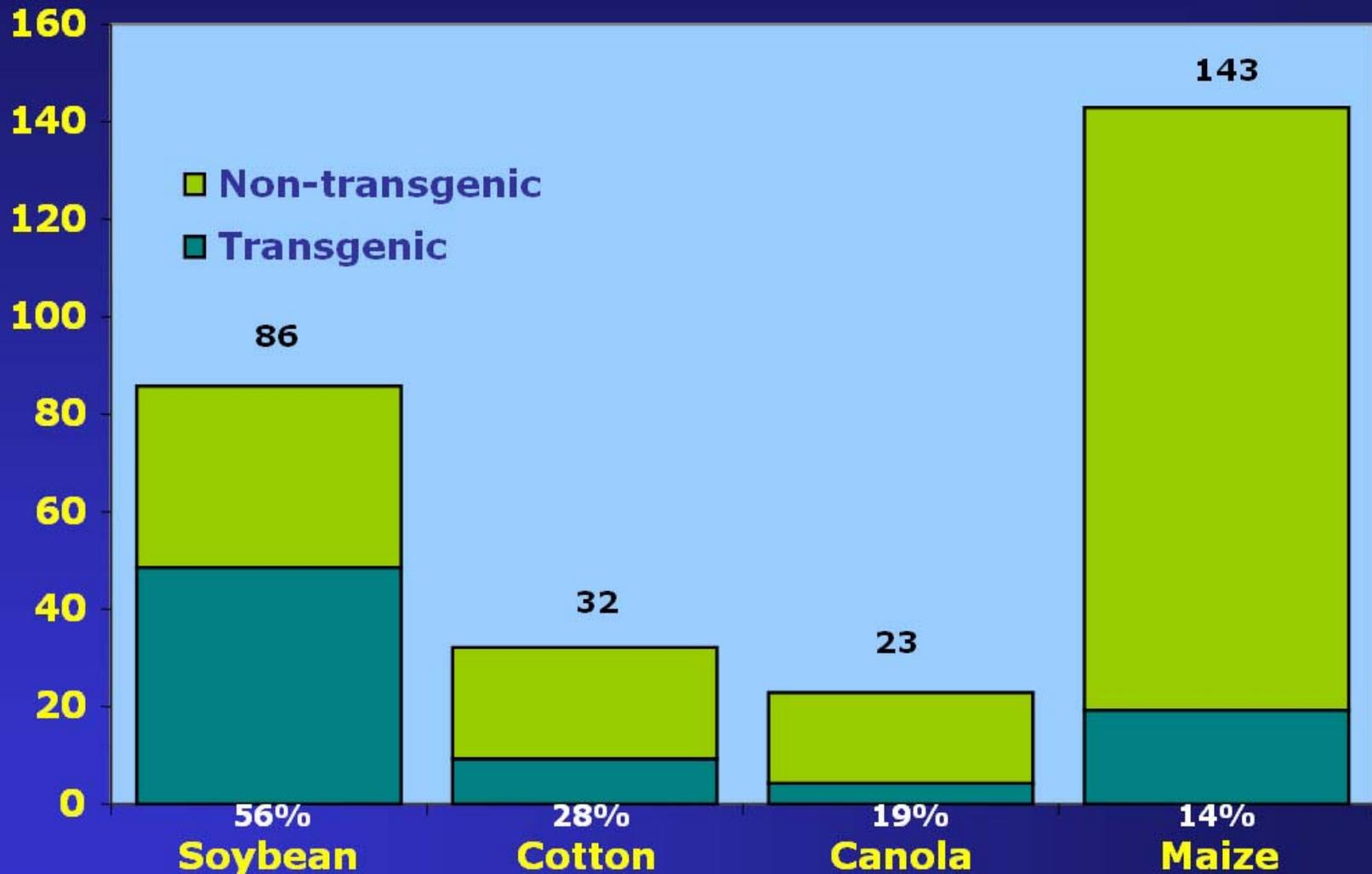
** β -glucuronidasi → gene reporter

PGM: superficie coltivata nel mondo in milioni di ettari

Fonte:ISAAA

PGM	2004
Soia tollerante ad erbicidi	48,4 (60%)
Mais Bt	11,2 (14%)
Cotone Bt	4,5 (6%)
Mais tollerante ad erbicidi	4,3 (5%)
Colza tollerante ad erbicidi	4,3 (5%)
Mais Bt/tollerante ad erbicidi	3,8 (4%)
Cotone Bt/tollerante ad erbicidi	3,0 (4%)
Cotone tollerante ad erbicidi	1,5 (2%)
Totale	81 (100%)

Global Adoption Rates (%) for Principal Biotech Crops (Million Hectares)



Source: Clive James, 2004



199 EVENTI APPROVATI NEL MONDO

(Fonte BATS : www.gmo-watch.org/gmo-watch)

Mais



23 EVENTI

- . Tolleranza ad erbicidi: glifosato, glufosinato
- . Resistenza agli insetti (Cry.): piralide
- . Tolleranza ad erbicidi e resistenza ad insetti
- . Resistenza a parassiti (CRW-Corn Rootworm)
- . Maschio sterile



Colza



27 EVENTI

- . Tolleranza a erbicidi: glifosato, glufosinato, ioxinil e bromoxinil
- . Alti livelli di acido laurico nell'olio

199 EVENTI APPROVATI NEL MONDO (2)

Soia



11 EVENTI

- . Tolleranza ad erbicidi: glifosato, glufosinato
- . Alti livelli di acido oleico

Cotone



15 EVENTI

- . Tolleranza ad erbicidi: glifosato, glufosinato, bromoxinil, sulfonilurea
- . Tolleranza ad erbicidi e resistenza ad insetti
- . Resistenza a virus



Pink bollworm

199 EVENTI APPROVATI NEL MONDO (3)

Riso



19 EVENTI

- . Tolleranza a erbicidi: glifosato, glufosinato
- . Resistenza a virus (RSV-Rice Strip Virus)
- . Ridotto contenuto di glutelina
- . Ridotta allergenicità - gene antisenso albumina

Patata



25 EVENTI

- . Resistenza ad insetti (CPB-Colorado Potato Beetle)
- . Resistenza a virus (PLRV-Potato Leaf Roll Virus)



199 EVENTI APPROVATI NEL MONDO (4)

Pomodoro



20 EVENTI

- . Resistenza ad insetti
- . Resistenza a virus (CMV-Cucumber Mosaic Virus)
- . Ritardo della maturazione (→biosintesi etilene)
- . Ritardato ammorbidimento (inibizione PG→pectina)

Fagiolo Adzuki



1 EVENTO

- . Resistenza ad insetti

199 EVENTI APPROVATI NEL MONDO (5)

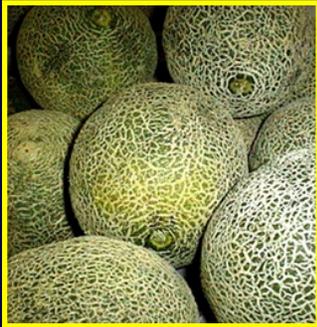
Broccolo



1 EVENTO

- . Tolleranza a glufosinato
- . Maschio sterile

Cantalupo



2 EVENTI

- . Ritardo della maturazione

Cavolfiore



1 EVENTO

- . Tolleranza a glufosinato
- . Maschio sterile

199 EVENTI APPROVATI NEL MONDO (6)

Barbabietola



2 EVENTI

- . Tolleranza a glifosato e glufosinato

Cetriolo



3 EVENTI

- . Resistenza funghi

Cicoria



3 EVENTI

- . Tolleranza a glufosinato
- . Maschio sterile

199 EVENTI APPROVATI NEL MONDO (7)

Crisantemo



3 EVENTI

- . Resistenza a viroidi

Garofano



28 EVENTI

- . Ritardo della maturazione
- . Alterazione colore
- . Tolleranza ad erbicidi
- . Aumento della conservabilità

Lino



1 EVENTO

- . Tolleranza ad erbicidi a base di solfonilurea nel suolo

199 EVENTI APPROVATI NEL MONDO (8)

Melone



1 EVENTO

- . Resistenza virus (CMV)

Papaya



1 EVENTO

- . Resistenza virus (PRSV-Papaya Ring Spot Virus)



Peperone



1 EVENTO

- . Resistenza virus (CMV-Cucumber Mosaic Virus)

199 EVENTI APPROVATI NEL MONDO (9)

Petunia



2 EVENTI

- . Resistenza virus
- . Colori alterati

Tabacco



2 EVENTI

- . Basso tenore di nicotina

Zucchini



2 EVENTI

- . Resistenza virus:
CMV, ZYMV (Zucchini Yellow Mosaic Virus), WMV (Watermelon Mosaic Virus)

