

# I PRIMI OGM



# COS'E' UN OGM

Si tratta di un organismo (ma la definizione è traslabile anche a cellule o tessuti) in cui è stato inserito un gene esogeno attraverso un processo di ingegneria genetica.

E' possibile distinguere OGM che hanno acquisito geni dalla stessa specie o specie affini sessualmente compatibili, definite CISGENICHE, da specie in cui il gene deriva da organismi filogeneticamente lontani, TRANSGENICHE.

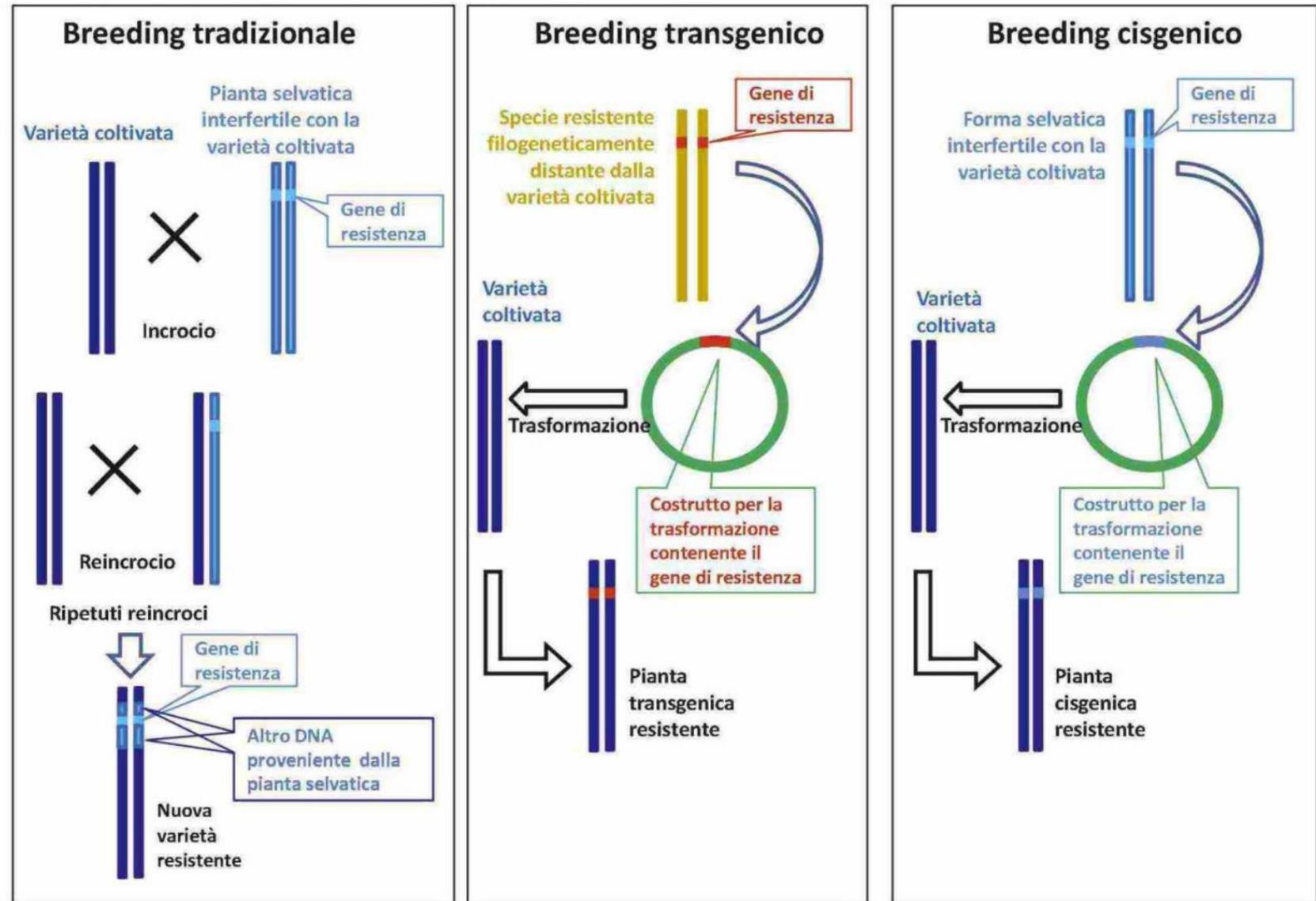
## LE DEFINIZIONI SONO UN PROBLEMA...politico ed economico **IMPORTANTE**

La Commissione Europea, nella direttiva 2001/18/CE definisce un OGM come “*un organismo, diverso dall'uomo, il cui materiale genetico è stato modificato in modo diverso da quanto avviene in natura [...]*” ; FAO, OMS e EFSA (Autorità Europea sulla Sicurezza del Cibo) seguono a ruota questa definizione. Negli Stati Uniti d'America, invece, la U.S. Department of Agriculture (USDA) ne da una definizione un po' più ampia. Secondo questo ente infatti, un OGM è un organismo ottenuto tramite modificazione genetica, quest'ultima definita come: “*La produzione di miglioramenti ereditabili, siano essi in piante o animali, tramite l'ingegneria genetica o altri metodi più tradizionali [...]*”

La differenza sostanziale tra cisgenico e transgenico è il concetto che un miglioramento genetico cisgenico potrebbe anche avvenire in modo 'naturale', con un breeding, in quanto le specie da cui si prende il gene sono affini.

Alla base di questo distinguo vi è una reale esigenza di molti Paesi di accedere a tecnologie moderne di miglioramento genetico che partono dal cisgenico per arrivare all'editing genomico secondo una normativa differente da quella degli OGM!

FIGURA 1 - Confronto tra metodi di breeding tradizionale, transgenico (ogm) e cisgenico per lo sviluppo di una pianta dotata di un particolare gene di resistenza



# OGM VEGETALI

Il grande interesse per gli OGM vegetali è ovviamente legato all'agricoltura in quanto gli obiettivi primari erano legati a migliorare ulteriormente le rese e ridurre danni da patogeni e stress abiotici. Inizialmente non vi furono resistenze. Che ruolo ha avuto la scienza?



Prima di conoscere la sequenza del DNA gli enzimi di restrizione sono stati ampiamente usati come strumenti molecolari.

1953 Pubblicazione della struttura del DNA

1957 postulato il dogma centrale (dal DNA all'RNA alle proteine)

1966 Decifrato il codice genetico

1970 Scoperta le trascrittasi inversa nei virus (dall'RNA al DNA)

1973 Tecnologia del DNA ricombinante: enzimi di restrizione e ligasi

1977 Scoperta degli introni: i geni non sono continui

**1983 Prima pianta GM: tabacco**

**1990 Primo cereale GM**

**1994 Primo alimento GM: pomodoro Flavr-Savr (Calgene)**

**1995 Prima sequenza genomica di un organismo: *E.coli***

**1996 Soia Roundup Ready e mais Bt coltivati commercialmente**

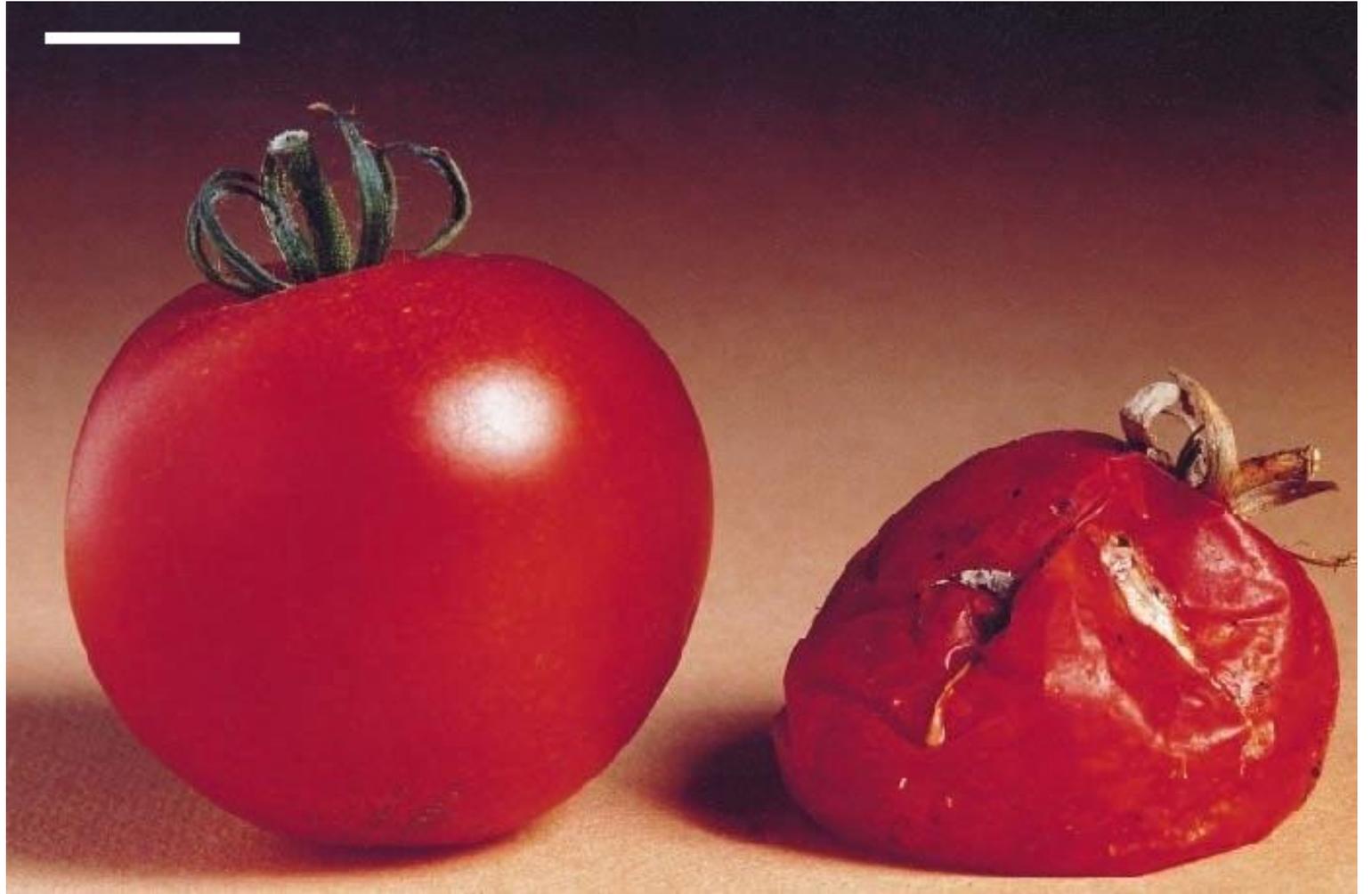
**2000 Prima sequenza genomica di un vegetale: *Arabidopsis thaliana***

**2001 Prima bozza della sequenza del genoma umano**

# PRIMO OGM?

Calgene (azienda californiana) pensò di aumentare la shelf life dei pomodori ed evitare il loro rammollimento rapido.

L'obiettivo dell'azienda è stato ridurre l'attività dell'enzima Poligalatturonasi (PG) che, degradando la pectina di parete provoca il rammollimento del frutto, inserendo un gene antisenso.

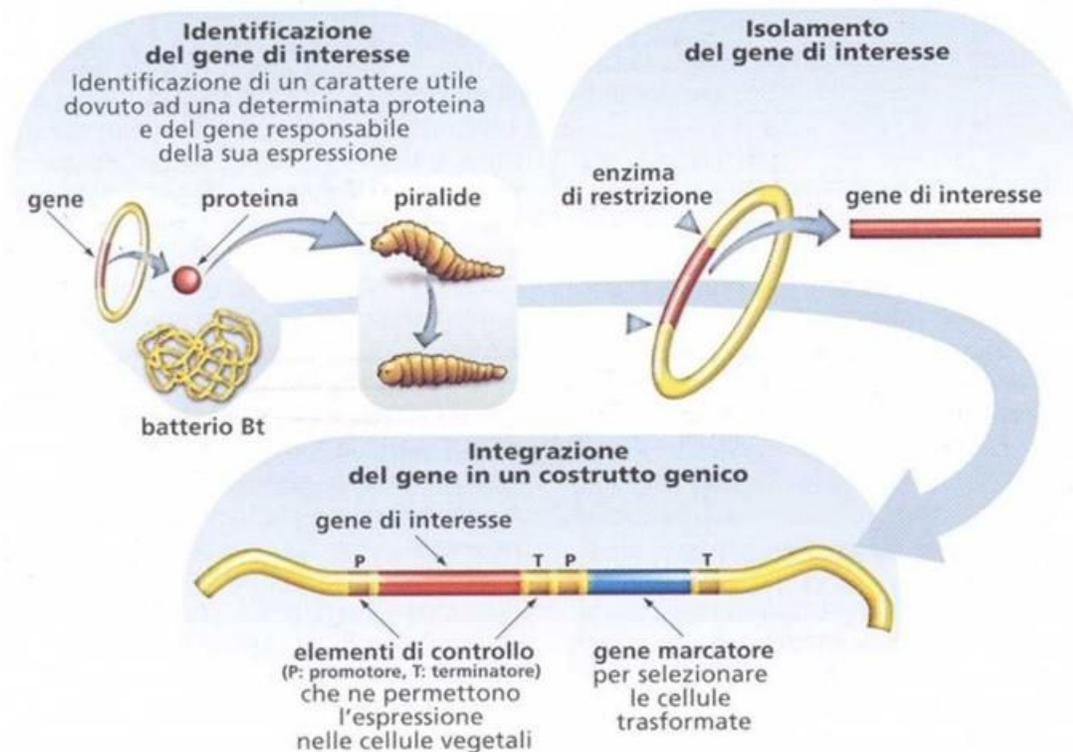


Nel 1994, la FDA concluse la valutazione del Flavr Savr dichiarando che il pomodoro “è sicuro come i pomodori allevati con mezzi convenzionali”. Inizia la commercializzazione. Non è stato un grande successo perché il pomodoro era comunque fragile, richiedeva tempi più lunghi e la varietà scelta aveva anche modesti interessi di mercato!

# IL MAIS CHE FECE SCALPORE

A partire dagli anni '90 anche grandi multinazionali iniziarono a lavorare con l'ingegneria genetica per migliorare specie di rilevanza mondiale. Uno dei grandi successi fu il mais Bt.

I *Bacillus thuringiensis* producono endotossine tossiche per diversi parassiti dei vegetali ma non per l'uomo e per gli animali superiori. Nello specifico, questa tossina provoca lesioni nella membrana cellulare di diverse specie di Lepidotteri.



- B.t. subsp. kurstaki* Lepidotteri
- B.t. subsp. aizawai* Lepidotteri
- B.t. subsp. israeliensis* Ditteri
- B.t. subsp. tenebrionis* Coleotteri (Crisomelidi)

Cry 1Ab  
Piralide del mais  
*Ostrinia nubilalis*



Cry 3A  
Dorifora della patata  
*Leptinotarsa decemlineata*



# IL MAIS CHE FECE SCALPORE

Quando venne presentato il mais MON 810 con la tossina Bt fù una grande opportunità e anche un'innovazione necessaria soprattutto contro la piralide.

Gli agricoltori e gli stakeholder di filiera sposarono la posposta pensando alla riduzione di impiego d'insetticidi e quindi minori spese, maggiore produttività e maggiore sostenibilità ambientale.

Il mais ogm crea le prime discussioni e problematiche . Prima sulla eticità della tecnologia ma poi tutto va sulla sicurezza per l'uomo e per l'ambiente!



**UN FATTO\_ I dati riportati nel report 2015 del PMEM - scrive l'EFSA - non indicano nessun effetto avverso sulla salute umana e animale o per l'ambiente derivante dalla coltivazione di mais MON 810 durante la stagione di crescita del 2015. Il Panel OGM perciò conclude che le attività di monitoraggio caso-specifico e di sorveglianza generale del mais MON 810 effettuate dal titolare non forniscano evidenze che invalidino la precedente valutazione di sicurezza effettuata dal Panel.**

# LA SICUREZZA POTREBBE ESSERE UN PRETESTO?

Le vere criticità su OGM nacquero più per la soia che per il mais. Nello specifico, nel 1995 Monsanto annunciò la commercializzazione della soia Roundup-Ready (RR). Si tratta di una pianta in cui è stato inserito il gene di resistenza all'erbicida glifosato prodotto in esclusiva dalla stessa Monsanto nel periodo compreso tra il 1970 e il 2000.



La soia RR di fatto crea una dipendenza diretta tra pianta ed erbicida e un monopolio della multinazionale.

Nel 2005, l'85% della soia coltivata negli USA era RR e nel mondo il 60%.

In pochi anni anche nel mais *Bt* venne inserito il gene per la resistenza al glifosato.

Oltre al primo vantaggio (resistenza a piralide) ne è stato inserito un'altro in grado di conferire resistenza a dosi molto più elevate di glifosato, in nome di un sicuro aumento della produzione per unità di superficie coltivata a mais, soia, cotone ed erba medica.

# LEGGI...ARRIVARONO IN RITARDO

**Direttiva 2001/18/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 12 marzo 2001, sull'emissione deliberata nell'ambiente di organismi geneticamente modificati e che abroga la direttiva 90/220/CEE del Consiglio.**

**La Direttiva dà attuazione al Protocollo di Cartagena e si basa sul principio di precauzione e prevede:**

- una valutazione ex ante, caso per caso, dei potenziali rischi che derivano dal rilascio nell'ambiente (ERA – Evaluation risk assessment) di un determinato OGM;**
- l'attuazione di un piano di monitoraggio post rilascio, al fine di rilevare eventuali effetti avversi non previsti dalla procedura di valutazione del rischio.**

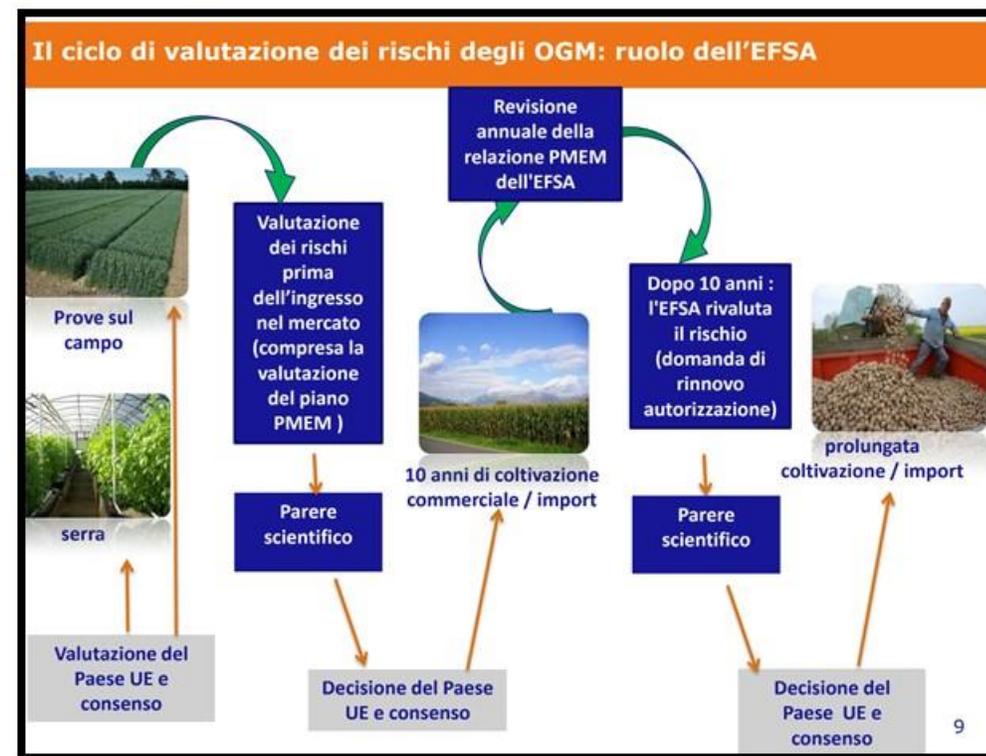
**In Italia la Direttiva 2001/18/CE è stata recepita nell'ordinamento nazionale con D. Lgs. 8 luglio 2003, n. 224, che, all'articolo 2, individua nel Ministero dell'ambiente e della tutela del territorio e del mare, l'autorità nazionale competente per l'applicazione delle disposizioni della direttiva stessa.**



# LEGGI...IL PERIODO DEL CAOS

- Regolamento CE n. 1829/2003 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 22 settembre 2003, relativo agli alimenti e ai mangimi geneticamente modificati;
- Regolamento CE n. 1830/2003 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 22 settembre 2003, concernente la tracciabilità e l'etichettatura di organismi geneticamente modificati e la tracciabilità di alimenti e mangimi ottenuti da organismi geneticamente modificati, nonché recante modifica della direttiva 2001/18/CE
- I regolamenti (CE) n° 1829/2003 e n° 1830/2003 definiscono, rispettivamente, **le norme per l'immissione in commercio e per l'etichettatura e tracciabilità** degli alimenti e mangimi geneticamente modificati.

IMP: Il regolamento (CE) n° 1829/2003 non abroga la direttiva 2001/18/CE (Valutazione del rischio). La valutazione del rischio è affidata a ERSAF (European Food Safety Authority). Nel 2004 EFSA approva 5 varietà di mais e 2 di colza. In Italia non si può comunque coltivarle.



# SITUAZIONE IN ITALIA

Gli OGM attualmente sviluppati, autorizzati e commercializzati sono piante (mais, soia, colza e cotone), modificate geneticamente per conferire loro caratteristiche che non hanno, come la resistenza a certi insetti o la tolleranza ad alcuni erbicidi.

In Italia, ad oggi, **nessuna di queste piante geneticamente modificate viene coltivata a fini commerciali**, anche se è consentita la commercializzazione dei loro prodotti nel rispetto delle regole di etichettatura.

Per avere informazioni aggiornate sugli OGM nel mondo c'è ISAAA-International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications

## About ISAAA

ISAAA is a not-for-profit international organization that shares the benefits of new bioscience technologies to key stakeholders, particularly resource-poor farmers in developing countries, through knowledge sharing, support to capacity building initiatives, and partnerships.

## Where are Biotech Crops Grown in the World?

26 countries planted 191.7 million hectares of biotech crops in 2018, the 23<sup>rd</sup> year of global commercialization of biotech crops



# UN PO' DI NUMERI

## GLOBAL STATUS OF COMMERCIALIZED BIOTECH/GM CROPS: 2018

*Biotech Crops Continue to Help Meet the Challenges of Increased Population and Climate Change*



**191.7** MILLION HECTARES  
BIOTECH CROPS

IN **26** COUNTRIES  
PLANTED BY **17** MILLION FARMERS

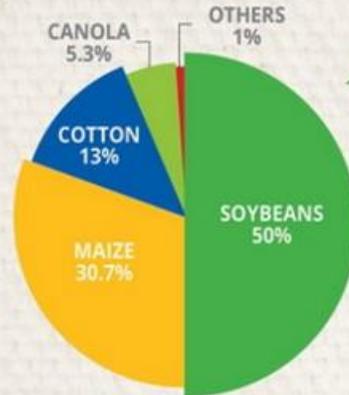
FASTEST ADOPTED CROP TECHNOLOGY IN RECENT TIMES

**70** COUNTRIES ADOPTED BIOTECH CROPS SINCE 1996,  
THE FIRST YEAR OF COMMERCIAL PLANTING



**BIOTECH CROP AREA INCREASED ~113-FOLD**  
**ACCUMULATED AREA IS 2.5 BILLION HECTARES**

### MAJOR BIOTECH CROPS

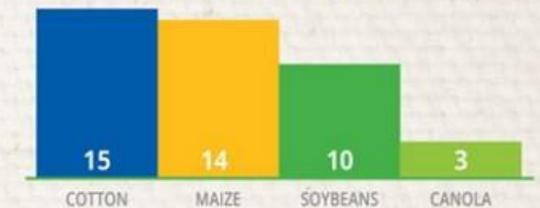


**SOYBEANS**  
HIGHEST ADOPTION WORLDWIDE  
**50%** OF BIOTECH CROP AREA

### OTHER BIOTECH CROPS GROWN IN 2018:



### NUMBER OF COUNTRIES GROWING MAJOR BIOTECH CROPS IN 2018



**4,349** APPROVALS FOR 387 BIOTECH EVENTS FOR 27 CROPS  
SINCE 1992 INCLUDING CARNATION, ROSE, AND PETUNIA



**MAIZE**  
MOST NUMBER OF APPROVED EVENTS  
**137 EVENTS IN 35 COUNTRIES**



**USA**  
MOST NUMBER OF GM EVENTS  
**544 APPROVED EVENTS**



**INDONESIA**  
PLANTED **BIOTECH SUGARCANE**  
FOR THE FIRST TIME IN 2018

**ESWATINI**  
PLANTED **BIOTECH COTTON**  
FOR THE FIRST TIME IN 2018



# UN PO' DI NUMERI



## BIOTECH SOYBEANS

FIRST COMMERCIAL PLANTING IN 1996

**95.9** MILLION HECTARES  
TOTAL AREA IN 2018

APPROVED FOR IMPORT IN  
**18 COUNTRIES**

PLANTED BY FARMERS IN  
**9 COUNTRIES**

USA BRAZIL ARGENTINA  
PARAGUAY CANADA URUGUAY  
BOLIVIA SOUTH AFRICA CHILE

**38** APPROVED EVENTS IN  
**31 COUNTRIES**

SOYBEANS **50%** OF THE WORLD'S  
ACCOUNT FOR BIOTECH CROP AREA

**USA** IS THE WORLD'S TOP PRODUCER  
OF SOYBEANS

**BRAZIL** IS THE TOP EXPORTER  
OF SOYBEANS IN THE WORLD

**78%**  
OF SOYBEAN GLOBAL  
AREA OF 123.5 MILLION  
HECTARES IN 2018  
IS BIOTECH

For more, download: [bit.ly/2018Soybeans](http://bit.ly/2018Soybeans)



## BIOTECH MAIZE

FIRST COMMERCIAL PLANTING IN 1996

**58.9** MILLION HECTARES  
TOTAL AREA IN 2018

APPROVED FOR IMPORT IN  
**15 COUNTRIES**

PLANTED BY FARMERS IN  
**14 COUNTRIES**

USA BRAZIL ARGENTINA CANADA PARAGUAY  
SOUTH AFRICA URUGUAY PHILIPPINES SPAIN COLOMBIA  
VIETNAM HONDURAS CHILE PORTUGAL

**137** APPROVED EVENTS IN  
**35 COUNTRIES**

MAIZE EVENT **NK603** RECEIVED **61 APPROVALS** FROM  
**28 COUNTRIES**

**30%**  
OF MAIZE GLOBAL  
AREA OF 197.2 MILLION  
HECTARES IN 2018  
IS BIOTECH

For more, download: [bit.ly/2018Maize](http://bit.ly/2018Maize)



## BIOTECH COTTON

FIRST COMMERCIAL PLANTING IN 1996

**24.9** MILLION HECTARES  
TOTAL AREA IN 2018

APPROVED FOR IMPORT IN  
**8 COUNTRIES**

PLANTED BY FARMERS IN  
**15 COUNTRIES**

USA BRAZIL ARGENTINA INDIA PARAGUAY  
CHINA PAKISTAN SOUTH AFRICA AUSTRALIA MYANMAR  
SUDAN MEXICO COLOMBIA COSTA RICA ESWATINI

**63** APPROVED EVENTS IN  
**27 COUNTRIES**

**INDIA** IS TOP COTTON PRODUCER  
IN THE WORLD

**7.5** MILLION FARMERS  
AND THEIR FAMILIES  
IN INDIA HAVE ENJOYED THE  
BENEFITS OF PLANTING BT COTTON

**76%**  
OF COTTON GLOBAL  
AREA OF 32.9 MILLION  
HECTARES IN 2018  
IS BIOTECH

For more, download: [bit.ly/2018Cotton](http://bit.ly/2018Cotton)



## BIOTECH CANOLA

FIRST COMMERCIAL PLANTING IN 1996

**10.1** MILLION HECTARES  
TOTAL AREA IN 2018

APPROVED FOR IMPORT IN  
**10 COUNTRIES**

PLANTED BY FARMERS IN  
**4 COUNTRIES**

USA CANADA AUSTRALIA CHILE

**37** APPROVED EVENTS IN  
**15 COUNTRIES**

**95%** BIOTECH CANOLA'S  
ADOPTION RATE IN CANADA

**CANADA** PLANTED 8.7 MILLION HECTARES  
BIOTECH CANOLA IN 2018  
**HERBICIDE TOLERANT**

**CHILE** GROWS BIOTECH CANOLA  
FOR SEED EXPORT

**29%**  
OF CANOLA GLOBAL  
AREA OF 34.7 MILLION  
HECTARES IN 2018  
IS BIOTECH

For more, download: [bit.ly/2018Canola](http://bit.ly/2018Canola)



## BIOTECH ALFALFA

FIRST COMMERCIAL PLANTING IN 2006

**1.3** MILLION HECTARES  
TOTAL AREA IN 2018

APPROVED FOR IMPORT IN  
**5 COUNTRIES**

PLANTED BY FARMERS IN  
**2 COUNTRIES**

USA CANADA

**5** APPROVED EVENTS IN  
**10 COUNTRIES**

CANADA PLANTED **HARVXTRA™**  
ALFALFA  
USA PLANTED **RR® & HARVXTRA™**  
ALFALFA

## HARVXTRA™ ALFALFA

WAS FIRST PLANTED IN 2016

**HIGH DEMAND FROM FARMERS**

- CONTAINS LESS LIGNIN
- HIGHER DIGESTIBILITY
- OFFERS 15-20% YIELD INCREASE

BIOTECH ALFALFA ADOPTION RATES IN THE USA  
AND CANADA IS LIKELY TO INCREASE AS MORE AND  
MORE FARMERS REALIZE THE BENEFITS OF THE  
TECHNOLOGY IN LIVESTOCK PRODUCTION AND FARM  
MANAGEMENT.

For more, download: [bit.ly/2018Alfalfa](http://bit.ly/2018Alfalfa)



### TOP 5 BIOTECH CROPS IN THE WORLD

WWW.ISAAA.ORG

AN ISAAA INFOGRAPHIC BY CLEMENT DIONGLAY

SOURCES: ISAAA Brief 54 ([bit.ly/ISAAABrief54](http://bit.ly/ISAAABrief54))  
ISAAA GM Approval Databases ([bit.ly/GMApprovalDatabase](http://bit.ly/GMApprovalDatabase))  
ISAAA Pocket K No. 2 ([bit.ly/PKNo2](http://bit.ly/PKNo2))

NOTE: In these ISAAA resources, the European Union (EU = 28 countries) is counted as one (1) country.

[www.facebook.com/isaaa.org/](https://www.facebook.com/isaaa.org/)

[www.instagram.com/isaaa\\_org/](https://www.instagram.com/isaaa_org/)

[www.twitter.com/isaaa\\_org/](https://www.twitter.com/isaaa_org/)

# UN PO' DI NUMERI

## 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



Source: ISAAA. 2019. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops in 2019. ISAAA Brief No. 55, ISAAA: Ithaca, NY.

For more information on biotech crops, visit [www.isaaa.org](http://www.isaaa.org)



# COME NASCE UN OGM?

La produzione di un OGM richiede un'attenta pianificazione di tre fasi.

**Fase 1:** Preparazione di un costrutto ovvero di un sistema capace di trasferire il gene (geni) esogeno nell'organismo target.

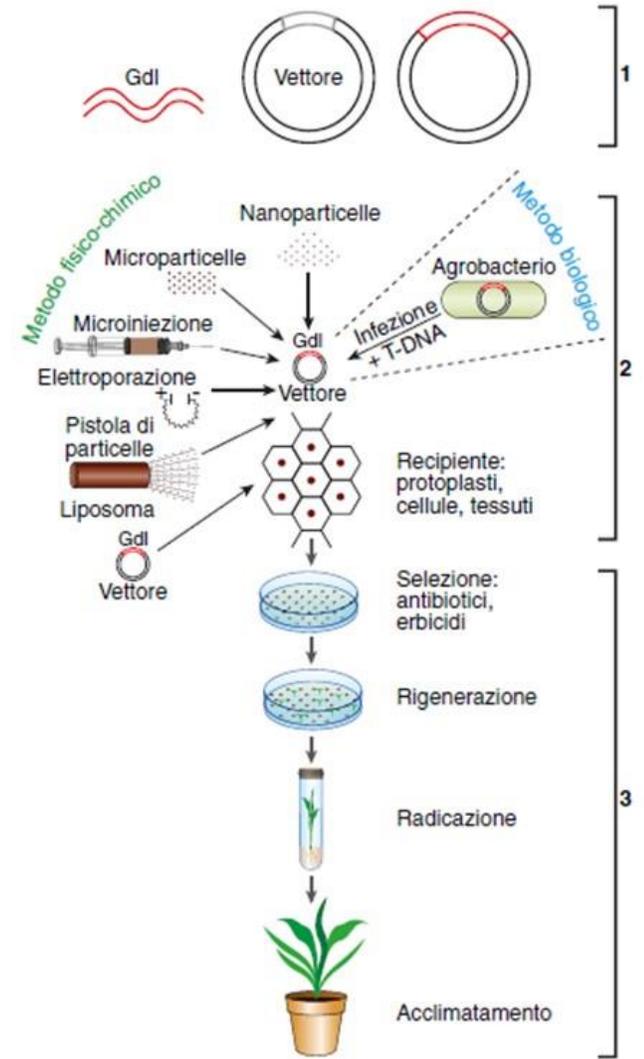
**Fase 2:** Definizione di un sistema di trasferimento capace di portare il costrutto nell'organismo ospite.

**Fase 3:** Un sistema di moltiplicazione della cellula trasformata e la generazione di un organismo adulto contenente il gene esogeno.

**Varianti:**

In linea generale si possono produrre OGM capaci di modificare sia il genoma nucleare, sia il genoma degli organelli.

In generale si predilige il target nucleare anche se l'interesse per gli organelli è aumentato sapendo che spesso questi vengono ereditati in via monoparentale e spesso sono assenti nel polline. Questo previene i fenomeni di inquinamento genetico.



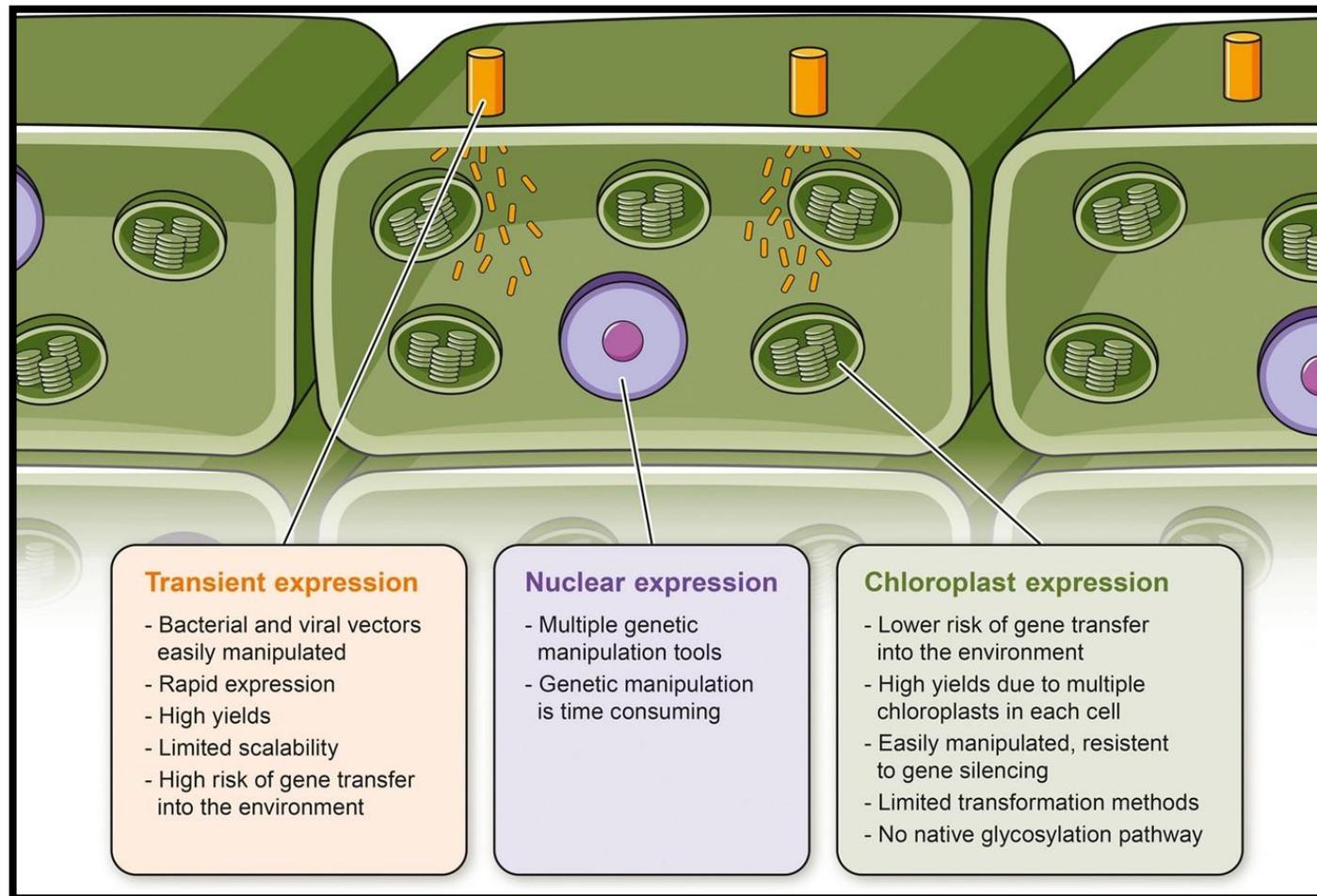
**Figura 12.1** Schema dei passaggi necessari per ottenere una pianta geneticamente modificata. Il Gdl deve essere clonato in un opportuno vettore d'espressione (1), che varierà a seconda del metodo usato per veicolare il transgene (2) nella cellula vegetale. In opportune condizioni di coltura e selezione avverrà il processo di rigenerazione (3) della pianta GM.

# STABILE O TRANSIENTE

Il processo di trasformazione genetica di una pianta può seguire diverse procedure a seconda delle finalità. La trasformazione può essere **STABILE** quando si usa un sistema ed un vettore che porta ad inserire **STABILMENTE** il DNA esogeno nel genoma dell'ospite. Il risultato è che questo DNA diventerà parte del genoma dell'ospite e sarà ereditato dalle cellule figlie dando origine ad organismi GM stabilmente.

Se l'obiettivo è studiare la funzione di un gene o valutare l'effetto di inserimento di un determinato frammento di DNA (es. silenziamento genico) è possibile anche seguire un processo di trasformazione **TRANSIENTE**. Solitamente si esegue su cellule in coltura ed il vettore usato pur entrando nel nucleo non promuove l'inserzione del gene esogeno nel genoma ospite. Il risultato sarà che le cellule figlie **NON** avranno il transgene.

	<i>Advantages</i>	<i>Disadvantages</i>
Stable transformation	<ul style="list-style-type: none"><li>• A transgenic line can be produced</li><li>• The target gene is inherited</li><li>• A metabolite can be constantly expressed</li><li>• Plants are used as biofactories</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Months to years in the transformation process</li></ul>
Transient transformation	<ul style="list-style-type: none"><li>• It is a fast method</li><li>• It can easily be scaled up for commercial uses</li><li>• It can be used to produce recombinant proteins</li><li>• It can be used for the targeted silencing of genes</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• It has a highly variable transformation efficiency</li></ul>



**Il trasferimento del DNA esogeno nell'ospite avviene con diversi metodi che possono sfruttare sistemi biologici (es. infezioni di virus e batteri) o sistemi chimico-fisici (scosse di corrente, metodi biolistici).**

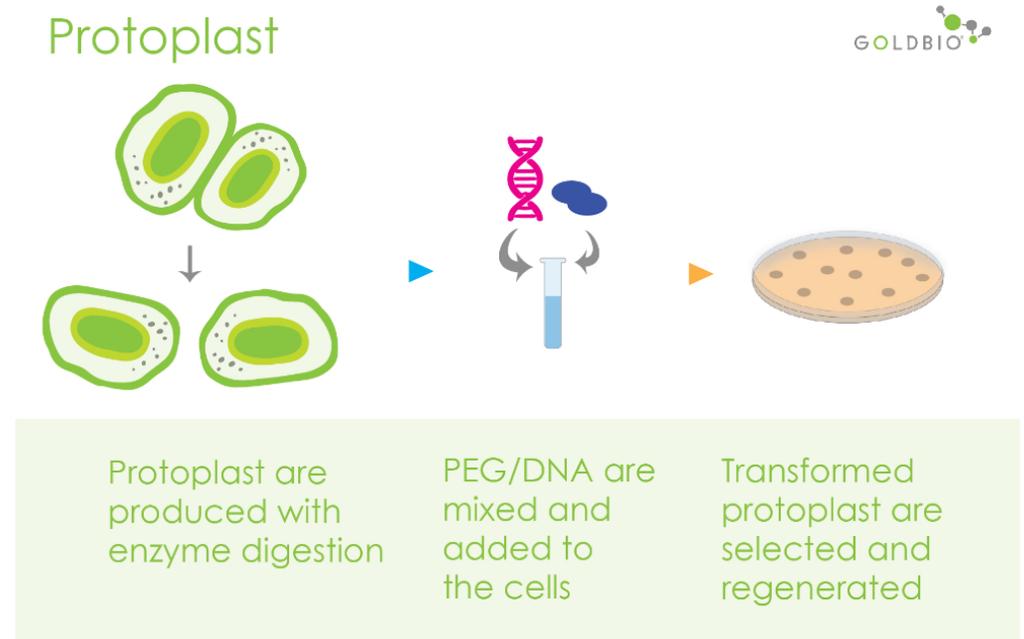
**Nel caso del processo di trasferimento stabile (nucleo o plastidi) l'inserimento del transgene nel DNA ospite avviene a opera degli enzimi dell'ospite mediante un processo di ricombinazione NON OMOLOGA. Nello specifico non c'è una omologia tra le regioni fiancheggianti del transgene ed il DNA dell'ospite, per questo si parla di RICOMBINAZIONE ILLEGITTIMA.**

**IMP: Questo tipo di ricombinazione NON permette di capire dove si inserirà il transgene.**

# I METODI CHIMICO-FISICI

I metodi chimico-fisici sfruttano reagenti e strumenti che favoriscono l'inserzione del DNA in cellula.

**1. TRASFORMAZIONE DI PROTOPLASTI CON PEG (Polietilenglicole).** IL PEG produce l'aggregazione di fosfolipidi che generano vescicole che avvolgono il DNA. I protoplasti possono inglobare queste vescicole ed internarle in cellula, portando quindi dentro il transgene. L'aspetto complesso è la rigenerazione della pianta a partire da protoplasti.

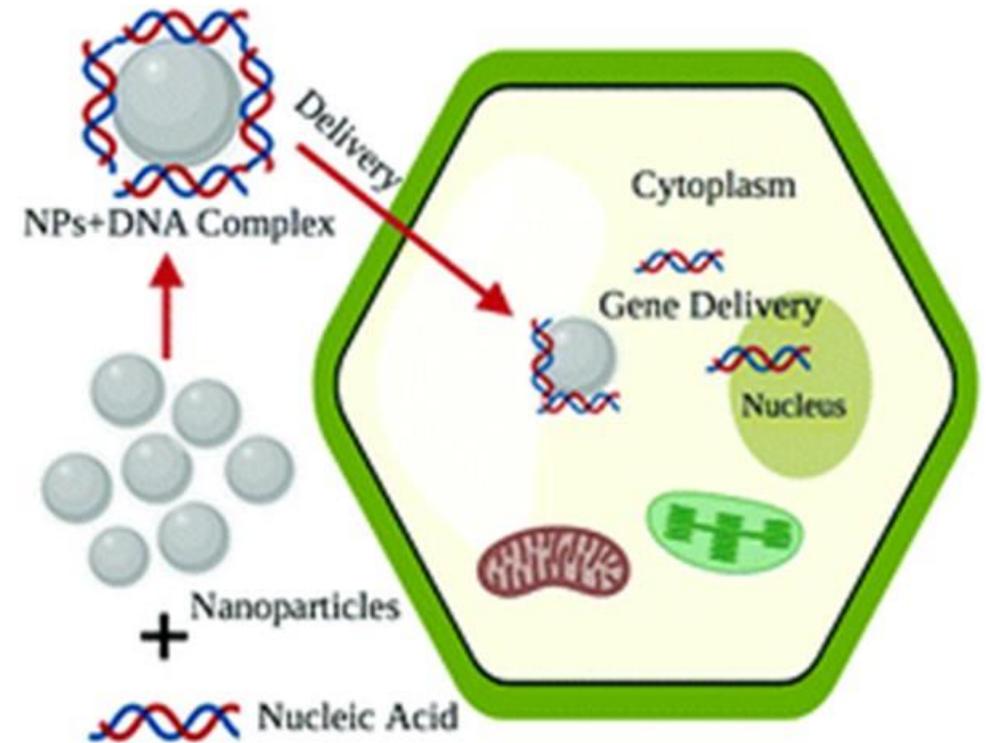
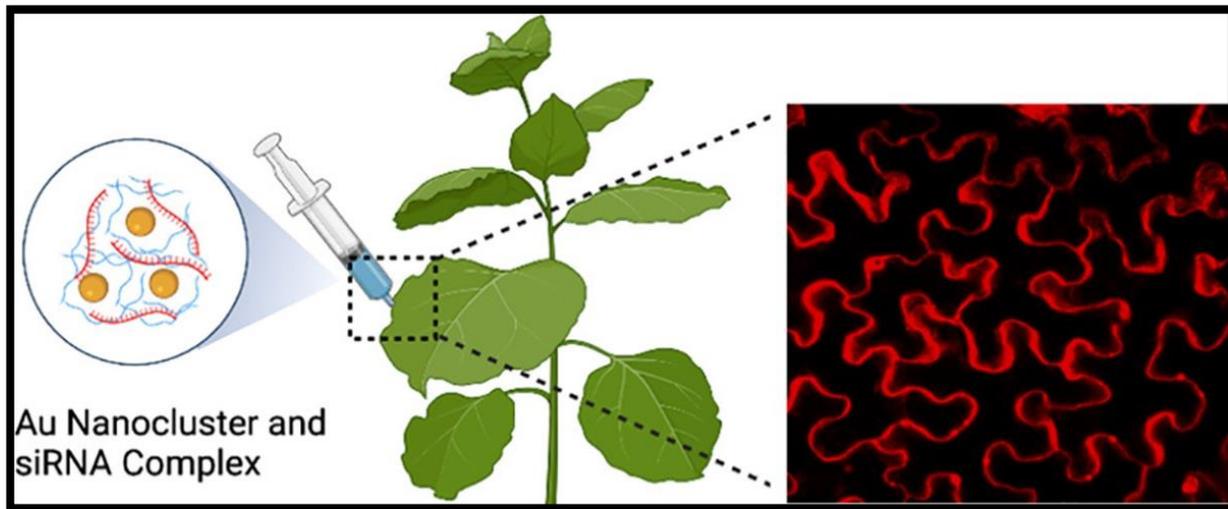


**2. ELETTROPORAZIONE.** Si tratta di un processo che sfrutta scariche elettriche capaci di interferire con i legami secondari dello strato fosfolipidico delle membrane. Gli impulsi possono creare dei pori transienti alle cellule vegetali e, se in soluzione sono presenti frammenti del DNA target, questo può entrare in cellula. In passato questo metodo è stato spesso impiegato per le trasformazioni transienti in sistemi modello come il tabacco.

### 3. NANOPARTICELLE

Di recente diverse nanoparticelle sono state impiegate come vettori fisici per trasferire soprattutto in modo transiente frammenti genici di DNA nelle piante.

Questo approccio è usato sempre per trasformazioni transienti e spesso per trasferire direttamente RNA antisenso e valutare l'effetto del silenziamento genico.



#### Articoli di interesse:

- Jat, Sanjeev K., Jaydeep Bhattacharya, and Manoj K. Sharma. "Nanomaterial based gene delivery: a promising method for plant genome engineering." *Journal of Materials Chemistry B* 8.19 (2020): 4165-4175.
- Ali, S. S., Al-Tohamy, R., Koutra, E., Moawad, M. S., Kornaros, M., Mustafa, A. M., ... & Sun, J. (2021). Nanobiotechnological advancements in agriculture and food industry: Applications, nanotoxicity, and future perspectives. *Science of the Total Environment*, 792, 148359.

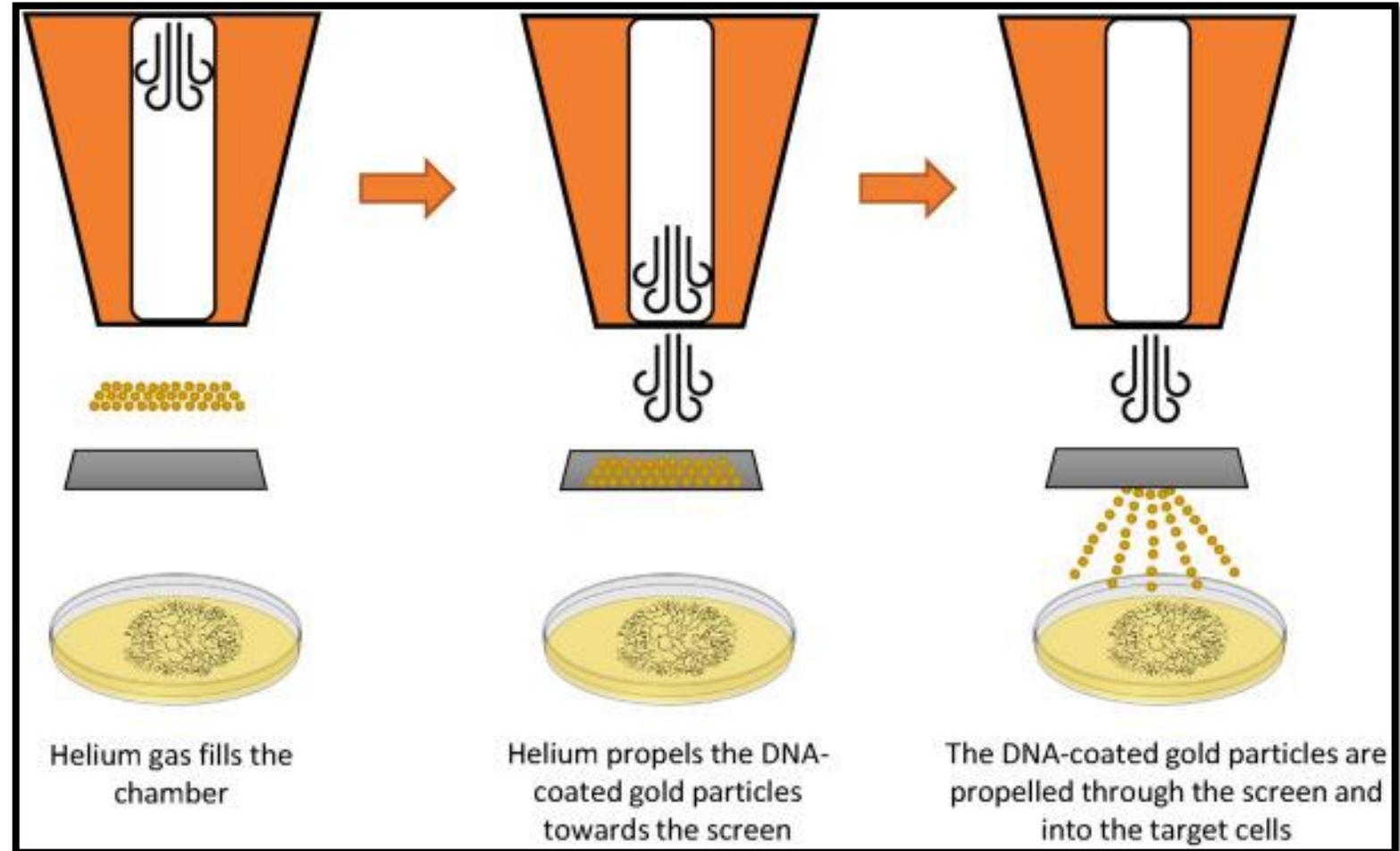
## 4. IL METODO BIOLISTICO

Rappresenta ad oggi il metodo fisico più efficiente in quanto sfrutta microproiettili metallici (oro) ricoperti di DNA che vengono accelerati ad altissima velocità (400 m/s) e si infrangono su una retina metallica che blocca i trasportatori e lascia passare solo le microparticelle ricoperte di DNA che entrano così in cellula.

Vi sono diverse variabili da considerare per ottimizzare l'efficacia che vanno dalle condizioni fisiche dello sparo (velocità, numero di particelle, distanza percorsa) alle caratteristiche del tessuto che viene sottoposto a trasformazione.

Non tutti i tessuti si trasformano con facilità e ovviamente si devono selezionare le cellule modificate stabilmente!

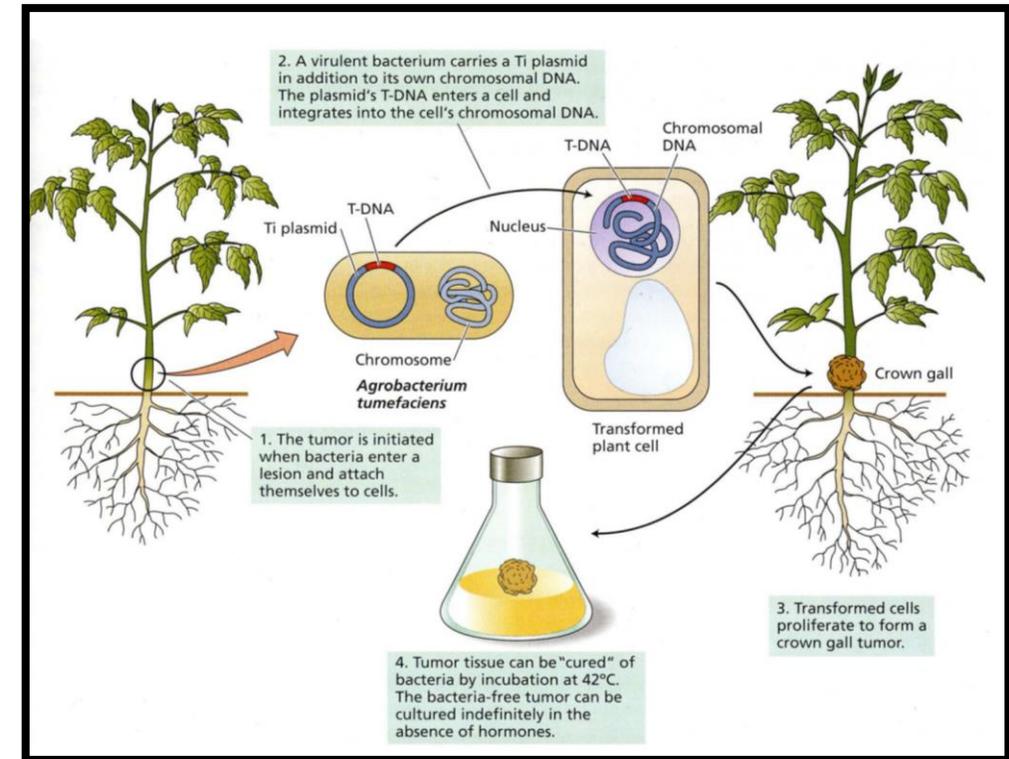
Tra i diversi metodi quello chimico-fisico è quello che consente una trasformazione stabile dell'organismo ospite.



# I METODI BIOLOGICI

Il metodo di trasformazione genetica mediato da vettore biologico per eccellenza è quello che sfrutta *Agrobacterium*, un fitopatogeno capace di infettare naturalmente le cellule vegetali. Esistono diverse specie di *Agrobacterium* ma il più usato è *A. tumefaciens*.

*Agrobacterium tumefaciens* è un agente di tumore batterico. Quando il batterio infetta piante legnose, parte del suo genoma, il tDNA del plasmide Ti, si inserisce nel genoma della cellula vegetale ospite. Questo DNA contiene informazioni per stimare la crescita e proliferazione delle cellule vegetali e per la biosintesi di Opine, aminoacidi non proteici necessari alla crescita del batterio. Il risultato di questo processo è la formazione di una galla (= tumore) che ospiterà il batterio stesso.



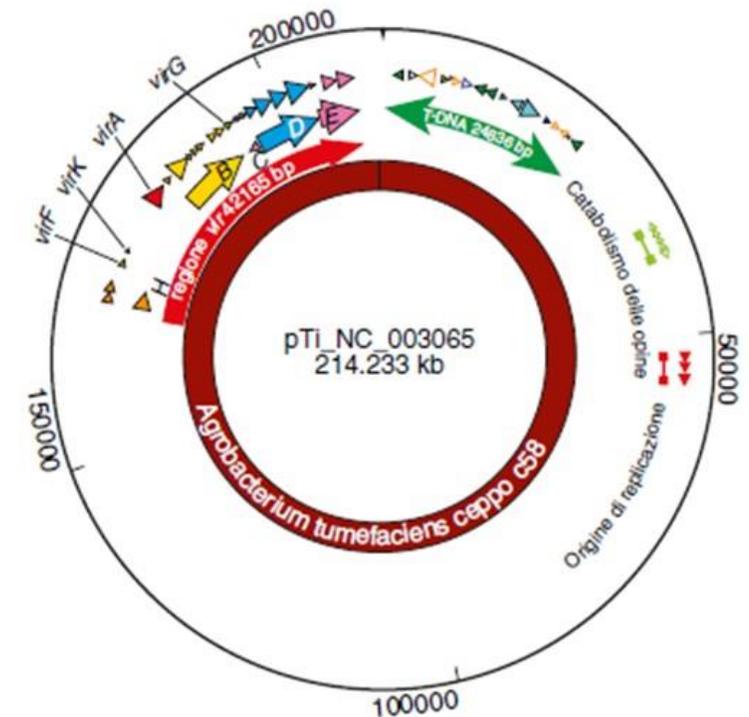
# Plasmide pTi e il T-DNA

Il plasmide Ti (*Tumor Inducin*) è un vettore medio grande (200-800 kb) che contiene una porzione T-DNA /Transfer DNA) che viene inserita nell'ospite. Per il batterio è importante inserire geni per la crescita e sviluppo del tessuto vegetali quindi capaci di stimolare auxine e citochinine. Altri geni fondamentali sono i fattori che stimolano la produzione di opine, aminoacidi non proteici necessari al batterio per crescere.

Non vi è un solo tipo di plasmide Ti in quanto in natura vi sono diverse varianti. Anche i geni del T-DNA sono variabili e possono essere in più copie.

Infine, le regioni fiancheggianti il T-DNA sono spesso regioni ripetute e comunque target di possibili enzimi di restrizione.

**Figura 12.4** Mappa del pTi del ceppo C58. Nella regione vir sono indicati, sulla circonferenza esterna, i geni e all'interno, con lo stesso colore, i corrispondenti cistroni. I geni del T-DNA sono indicati con diversi colori, che indicano i processi in cui sono coinvolti, seguendo i seguenti codici: verde per la sintesi di opine, arancione per gli oncogeni, azzurro per la sintesi di auxine, blu per la sintesi di citochinine, nero per funzioni accessorie. Alle estremità del T-DNA le teste di freccia verdi indicano i confini destro e sinistro. Sono indicate anche le regioni contenenti i geni per il catabolismo delle opine e le funzioni per la replicazione.



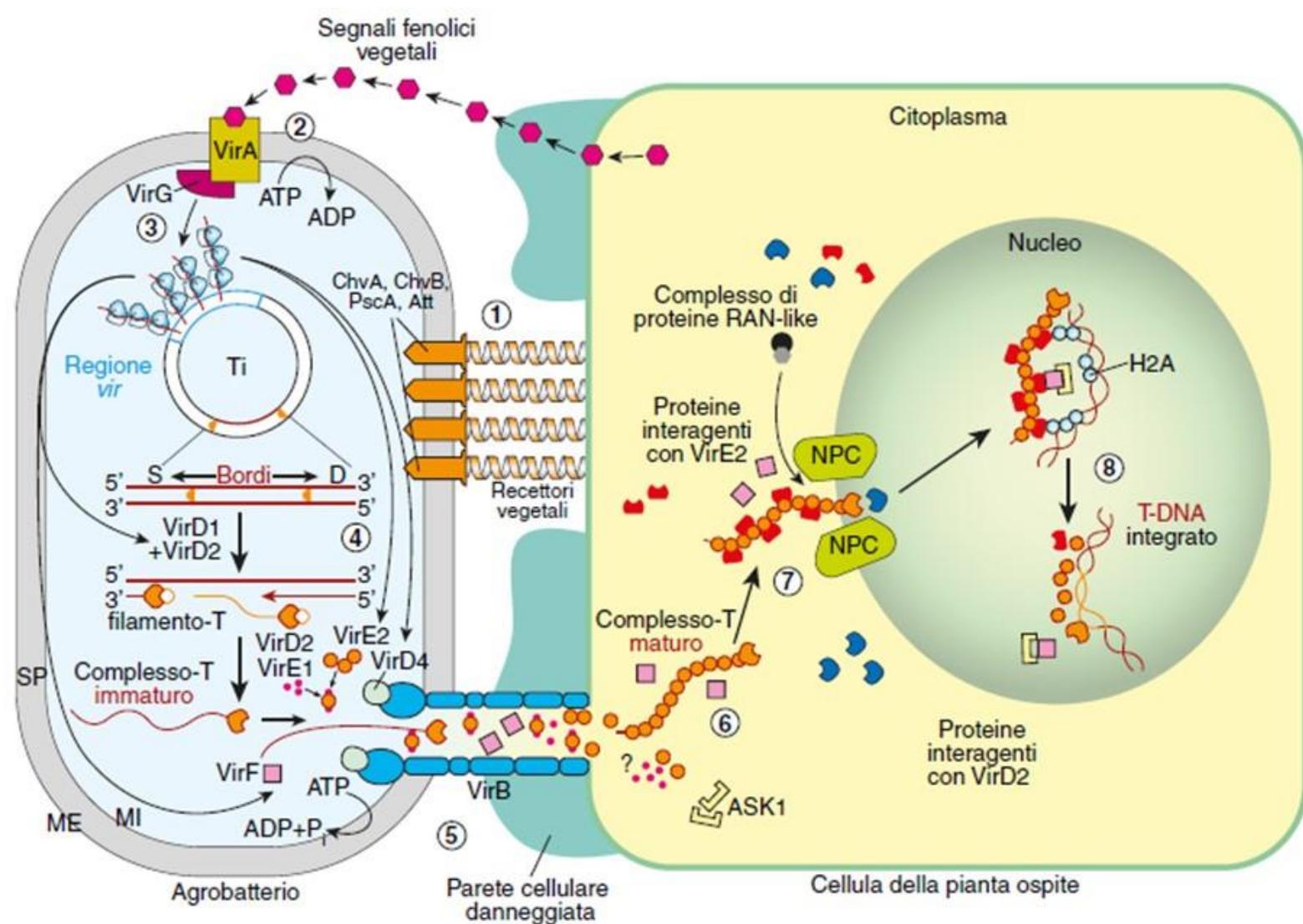
# L'infezione

La trasformazione genetica con *A. tumefaciens* sfrutta meccanismi naturali di infezione.

La prima fase è fondamentale! *Agrobacterium* grazie a 'geni sensori' è in grado di percepire lesioni a cellule e tessuti anche grazie all'emissione di fenoli da parte della pianta.

Da qui parte la trascrizione di geni batterici diretti al processo di infezione. Si inizia con l'adesione e successivamente si attivano i geni *vir* (geni di virulenza).

**TRASFERIMENTO:** quando si è aperta la strada, le proteine *Vir* attivano il trasferimento del T-DNA all'ospite

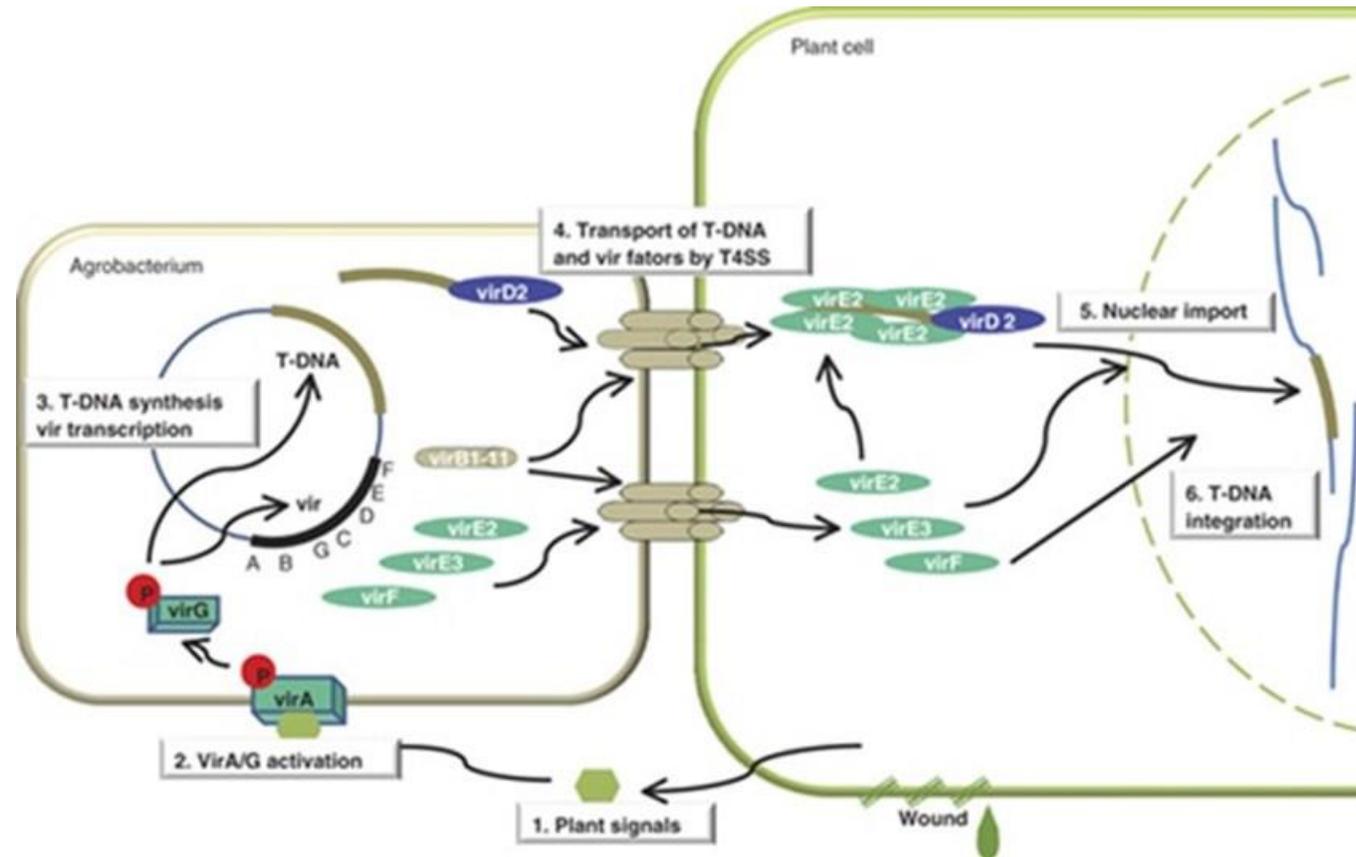


**Figura 12.5** Modello delle interazioni fisiche, chimiche e molecolari tra *Agrobacterium* e cellula vegetale durante il processo di trasformazione. Il processo è diviso in otto fasi che partono dal riconoscimento e adesione (1) del batterio alla cellula vegetale. La percezione (2) di specifiche molecole vegetali porta all'attivazione dei geni *vir* (3) e alla conseguente generazione del filamento-T (4). La costruzione di un complesso d'infezione (5) consente di veicolare il filamento-T e proteine *Vir* nella cellula vegetale, dove si assembla il complesso-T (6) che, mediante l'interazione con proteine vegetali viene trasportato nel nucleo (7) dove il T-DNA si integra nel genoma vegetale (8) utilizzando in gran parte il macchinario molecolare dell'ospite.

# Il trasferimento

Il sistema sviluppato dal batterio per effettuare il trasferimento del T-DNA è il pilo, che si forma grazie ad alcune proteine vir (virB, VirD4).

Durante il trasferimento del T-DNA vi è anche un'associazione di alcune proteine vir che non solo accompagnano il DNA verso l'ospite ma lo scortano nel nucleo dove svolgono anche azioni di supporto nel bloccare alcuni enzimi digestivi, ecc.

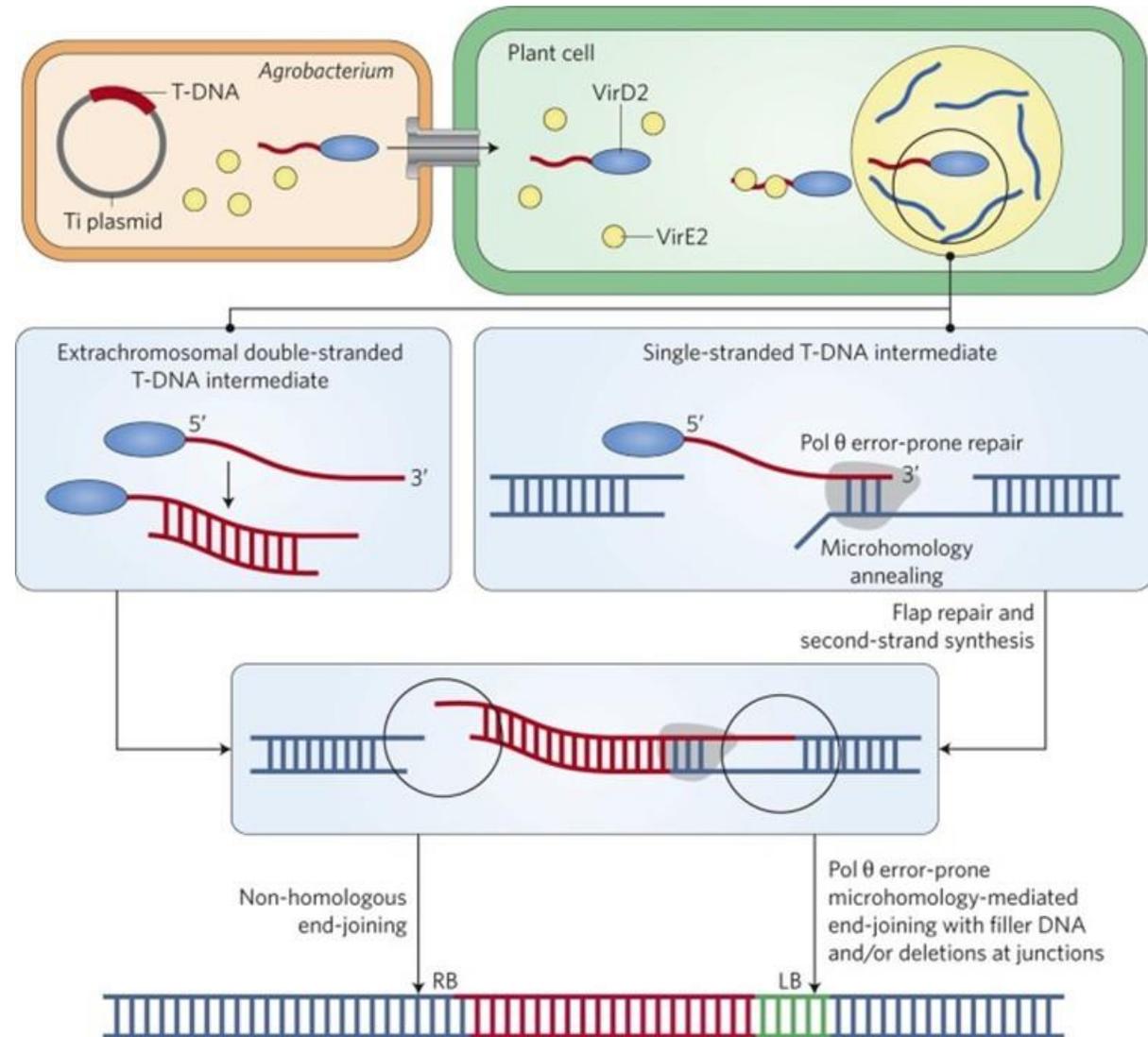


# L'integrazione nel genoma ospite

Il T-DNA deve essere inserito in modo stabile nel genoma vegetale. Questo avviene sia grazie a proteine vir (numerose e non tutte ancora note!) sia sfruttando proteine dell'ospite.

Il primo passaggio è trasformare il T-DNA da singolo filamento a doppio filamento. Questo processo sfrutta gli enzimi di replicazione della cellula vegetale. Questi stessi enzimi servono anche a creare una rottura nel DNA ospite dove si adagerà il T-DNA.

Va ricordato che l'inserzione del T-DNA avviene per ricombinazione NON omologa o illegittima. Questo significa che non serve una regione complementare e che il T-DNA può inserirsi un po' dove vuole!



# L'integrazione nel genoma ospite

L'inserimento non omologo non richiede quindi scambi di frammenti ma semplicemente un'azione delle ligasi e altri enzimi che connettono il T-DNA al DNA dell'ospite nelle porzioni di taglio.

Sono stati condotti molti studi per comprendere se vi fossero zone preferenziali di inserzione e regioni cromatiniche più predisposte. Ad oggi è possibile affermare che l'inserzione è casuale!

**Considerazione 1:** studi genomici hanno evidenziato che vi è una preferenza per regioni altamente espresse o per porzioni vicino a zone di attiva trascrizione; tuttavia si pensa che questo non sia legato alla capacità del meccanismo di inserzione di selezionare queste regioni, ma più a un meccanismo di selezione successiva di linee cellulari più efficaci.

**Considerazione 2:** Non essendo possibile direzionare l'inserzione non si può escludere che il T-DNA vada a modificare anche geni fondamentali per l'ospite piuttosto che alteri l'espressione genica di fattori di 'sicurezza' della piante e che si sviluppino rischi per la salute e l'ambiente. Questo è un tema caldo per la ricerca, per EFSA e per l'uso degli OGM.



# Agrobacterium e biotecnologie

Il pTi originario di *A. tumefaciens* per essere sfruttato come vettore di trasferimento genico è stato ampiamente modificato. Sono stati eliminati gli oncogeni ovvero i geni per la proliferazione cellulare che portavano alla galla. Sono stati anche eliminati geni inutili come quelli per le opine. Il pTi in questo stato si dice disarmato. Attenzione non devono tuttavia essere eliminati geni chiave dell'infezione e trasferimento.

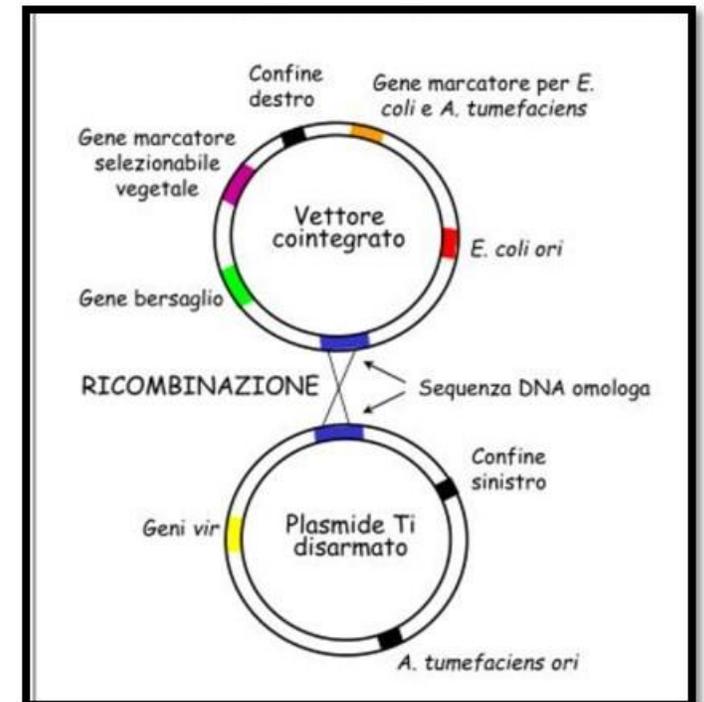
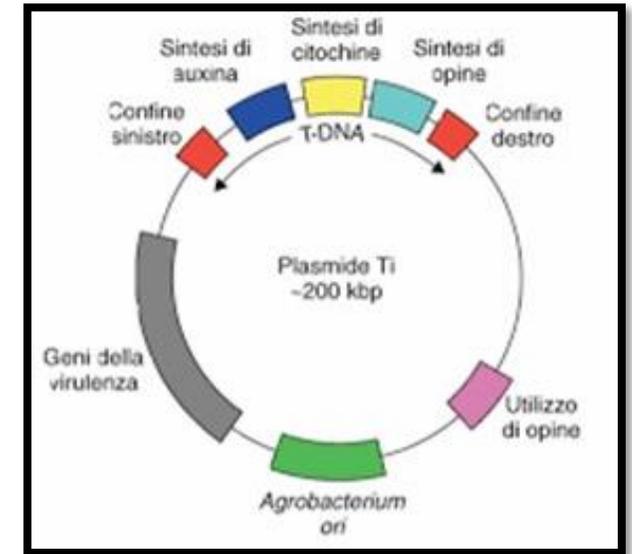
Nel tempo sono stati messi a punto due diversi meccanismi. Il sistema COINTEGRATO e quello BINARIO.

## APPROCCIO COINTEGRATO

Questo sistema è il primo che è stato utilizzato e prevede la sostituzione di parte del T-DNA con il gene di interesse. Per farlo è necessario creare un costrutto che solitamente viene predisposto in *E. coli*. Dato che è facilmente modificabile, questo prevede anche sequenze promotrici e geni reporter.

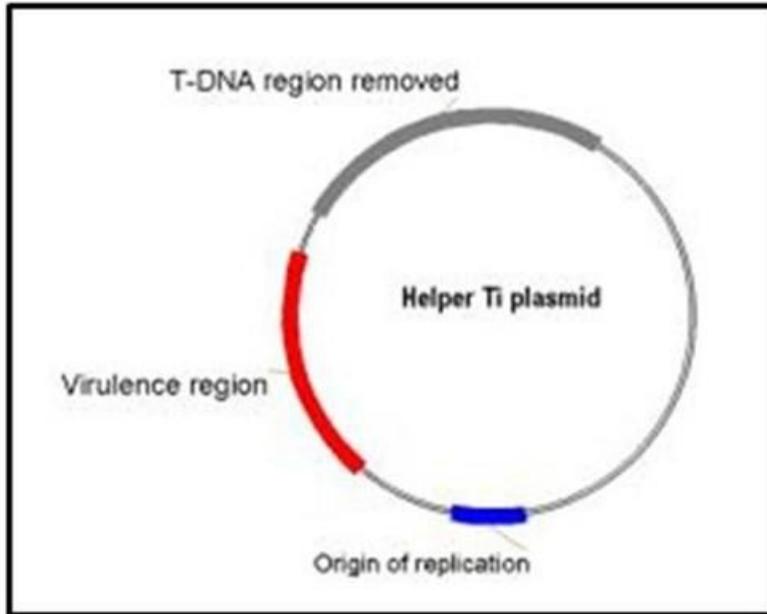
Una volta pronto si promuove una coniugazione batterica che trasferisce il plasmide di *E. coli* in *A. tumefaciens*. Qui attraverso eventi di ricombinazione omologa la porzione di interesse del plasmide di *E. coli* viene inserita nel T-DNA disarmato.

Si ottiene quindi un plasmide chimerico! Lo svantaggio di questo approccio, ormai quasi abbandonato, è che viene trasferito molto DNA poco utile sia di *E. coli* sia porzioni del pTi.



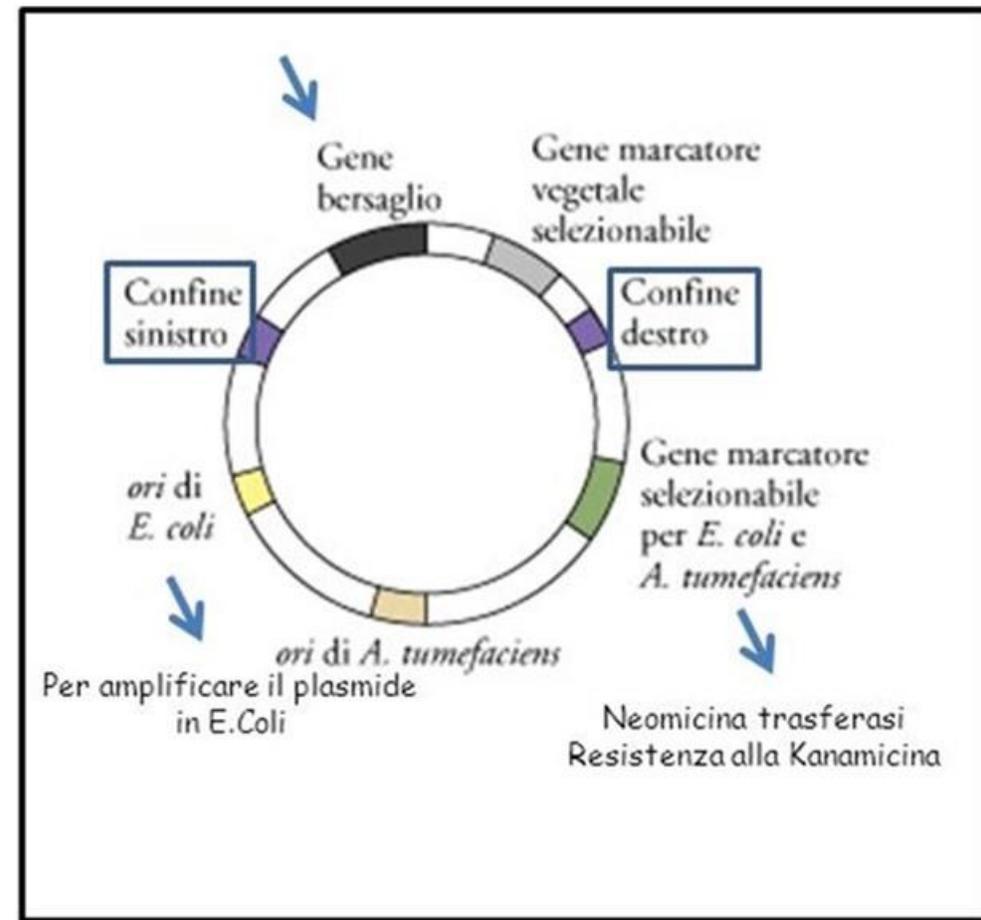
## APPROCCIO BINARIO

Questo sistema sfrutta un plasmide Ti disarmato ma che mantiene le capacità di infezione e di trasferimento. A questo si associa, nelle stesse cellule di *A. tumefaciens* usate nella trasformazione genetica, anche un plasmide non VIR in cui si inserisce il gene da trasferire.



geni VIR

Aiuta il trasferimento del T-DNA  
del VETTORE BINARIO



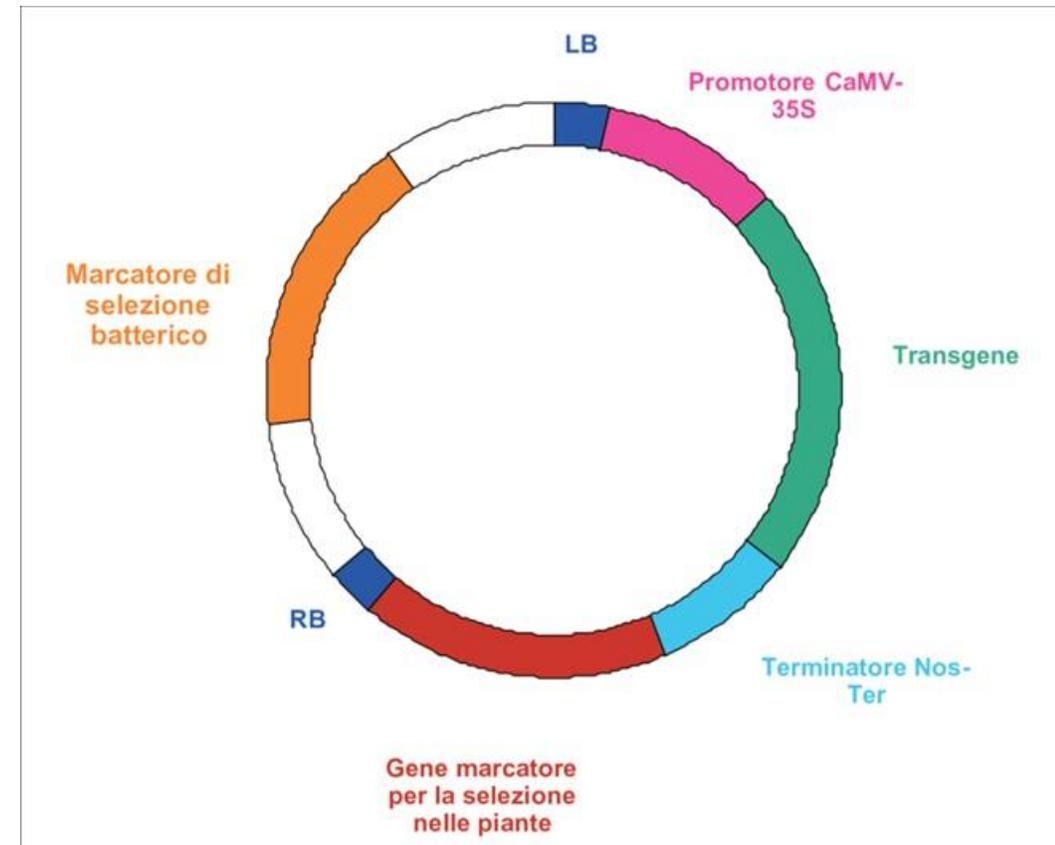
No geni VIR

Il vantaggio di questo sistema è che si possono avere agrobatteri commerciali contenenti i plasmidi Ti disarmati che possono essere trasformati con plasmidi preparati in *E. coli* in modo semplice e veloce. Oggi vi sono numerosi costrutti che funzionano bene e che possono essere resi specifici per determinate specie di piante o per capacità di trasferimento, ecc.

# I VETTORI

I costrutti che vengono utilizzati per la trasformazione genetica hanno tutti una base comune; promotore, gene target, gene reporter e terminatore. Solitamente i plasmidi commerciali presentano anche un cassetta di inserzione che si caratterizza per avere numerosi siti per enzimi di restrizione. Questo permette di inserire il gene esogeno utilizzando appunto enzimi batterici capaci di creare estremità coesive.

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



Le variabili che si possono considerare sono la tipologia del promotore e i geni report che si vogliono adottare. Quest'ultimo aspetto dipende da diversi fattori che sono sia scientifici, sia legislativi. Non sempre si possono usare geni reporter stabili che danno resistenze! Per esempio i geni che danno resistenza agli antibiotici sono stati molto criticati.

# Sistemi di selezione

I sistemi di selezione (geni di selezione/reporter) sono fondamentali in qualsiasi processo di trasformazione genetica in quanto solo un piccolo numero di cellule trattate riuscirà ad acquisire in modo stabile il transgene. E' quindi fondamentale avere un sistema in grado di distinguere le cellule transgeniche da quelle NON trasformate.

Nella tabella vi è una lista non esaustiva dei possibili sistemi di selezione. Questi si basano sia sulla capacità di fornire una nuova proprietà alla pianta trasformata (es. resistenza ad un antibiotico, capacità di metabolizzare un determinato substrato come il D-Mannosio come fonte di zucchero) oppure produrre una proteina marcatore come la GFP che può essere visualizzata al microscopio e permette di selezionare le cellule trasformate dalle altre.

Tabella 12.1 Caratteristiche di alcuni sistemi di selezione

Gene	Enzima	Sorgente	Tipo di selezione (+/-)	Agente di selezione
<i>ipt</i>	Isopentenil transferasi	<i>A. tumefaciens</i>	Fenotipica, +	Nessuno
<i>manA</i>	Fosfomannosio isomerasi	<i>E. coli</i>	Sorgente di C, +	D-mannosio
<i>xilA</i>	Xilosio isomerasi	<i>Streptomyces rubiginosus</i>	Sorgente di C, +	D-xilosio
<i>aadA</i>	Aminoglicoside-3" adenil transferasi	<i>Shigella sp.</i>	Antibiotico, -	Spectinomomicina, streptomomicina
<i>neo, nptII</i>	Neomicina fosfotransferasi	<i>E. coli</i>	Antibiotico, -	Neomicina, kanamicina
<i>ATWBC19</i>	Trasportatore ABC	<i>Arabidopsis</i>	Antibiotico, -	Kanamicina
<i>hph (aphIV)</i>	Igromicina fosfotransferasi	<i>E. coli</i>	Antibiotico, -	Igromicina B
<i>aaC3</i>	Aminoglicoside-N-acetil transferasi	<i>Serratia marcescens</i>	Antibiotico, -	Aminoglicosidi
<i>sull</i>	Diidropteroato sintasi	<i>E. coli</i>	Antibiotico, -	Sulfonamidi
<i>sat3</i>	Acetil transferasi	<i>Streptomyces sp.</i>	Antibiotico, -	Streptomomicina
<i>pat, bar</i>	Fosfinotricina acetil transferasi	<i>Streptomyces sp.</i>	Erbicida, -	Fosfinotricina
<i>EPSPS</i>	EPSPS	Petunia, mais, riso	Erbicida, -	Glifosato
<i>aroA</i>	EPSPS	<i>Salmonella typhimurium, E. coli</i>	Erbicida, -	Glifosato
<i>cp4 epsps</i>	EPSPS	<i>A. tumefaciens</i>	Erbicida, -	Glifosato
<i>CSR1-1, CSR1-2, CSR1-4, MALS</i>	Acetolattato sintasi	<i>Arabidopsis</i> , cotone	Erbicida, -	Sulfoniluree, imidazolinoni, clorosulfone,
<i>CYP1A1, CYP2C19</i>	Citocromo P450 monossigenasi	Uomo	Erbicida, -	Feniluree
<i>DAO1</i>	D-aminoacido ossidasi	<i>Rhodotorula gracilis</i>	Antimetabolita, +	D-serina, D-alanina
<i>DAO1</i>	D-aminoacido ossidasi	<i>Rhodotorula gracilis</i>	Antimetabolita, -	D-isoleucina, D-valina

# E' possibile eliminare il gene di selezione?

Le polemiche e le discussioni sugli OGM hanno aperto questioni ampie sulla sicurezza del processo e della pianta ottenuta.

Uno dei temi più discussi riguarda i fattori di selezione che nella prima generazione di OGM venivano inseriti stabilmente nel genoma ospite esattamente con il transgene. Questo alla lunga potrebbe portare a dei problemi anche semplicemente rubando 'energie' alla pianta in crescita.

C'è poi la polemica sui trasferimenti orizzontali di geni e quindi il rischio che geni di resistenza agli antibiotici finiscano dalla pianta ad altri organismi. Vero?



E' nata quindi l'esigenza di sviluppare sistemi in grado di eliminare il reporter dopo il suo uso. La prima strategia ha sfruttato due plasmidi diversi per il transgene e per il reporter che venivano co-trasferiti nella cellula vegetale. Si selezionavano quindi le cellule con il reporter e poi si verificava con una PCR la presenza anche del plasmide con il transgene. Successivamente si sfruttava la segregazione indipendente dei due geni nella progenie e si selezionava solo la linea con il transgene.

Sono stati anche sfruttati sistemi di excisione del gene reporter per esempio usando trasposoni associati al reporter stesso e poi attivandone la traslocazione/eliminazione. Altri sistemi molecolari raffinati si basano sull' induzione della ricombinazione sito specifica da parte di batteriofagi che vanno a riconoscere ed eliminare il transgene.

# La prima generazione di OGM

I primi OGM nati con approcci biolistici o mediati da *A. tumefaciens* si concentrarono su specie di grande valore e cercarono di affrontare problemi chiave dell'agricoltura post green revolution. Di seguito alcune classi di OGM.



# Innovazione tecnologica...e scientifica

Nonostante le prime generazioni di piante OGM avessero molti difetti e talvolta non fossero in grado di rispondere alle esigenze reali del mercato hanno avuto il pregio di stimolare l'innovazione tecnologica. Si è così compreso meglio come preparare un gene di interesse, come trasferirlo e integrarlo nel genoma. I metodi di prima generazione sono via via stati soppiantati da approcci più precisi, capaci di inserire il gene in determinate regioni, di potenziarne l'espressione o silenziarla, sino a riscriverne la sequenza.

