

IZS Lazio e Toscana

*AGGIORNAMENTO SULLE TECNICHE DI MIGLIORAMENTO GENETICO
DELLE PIANTE (NEW BREEDING TECHNIQUES-NBT)*

Roma, 9 Marzo 2017

DANIELA
VINCIGUERRA

Descrizione delle nuove tecniche di miglioramento
genetico nel settore agroalimentare



Centro di Riferenza Nazionale per la ricerca di OGM

National Reference Laboratory for GM Food and Feed, Italy



Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana

Agenda

- **Tecniche di incrocio convenzionali**

Breeding classico e mutagenesi

- **Effetti non intenzionali**

- **Tecniche consolidate di modifica genetica**

• Elettroporazione metodo biolistico

Agrobacterium tumefaciens

- **Effetti non intenzionali**

- **Nuove tecniche di incrocio**

Modificazioni epigenetiche (RdDM)

Cisgenesi e Intragenesi

Reverse Breeding

Agroinfiltrazione

Innesto di una pianta non-GM su portinnesto GM



Organismi viventi e miglioramento genetico

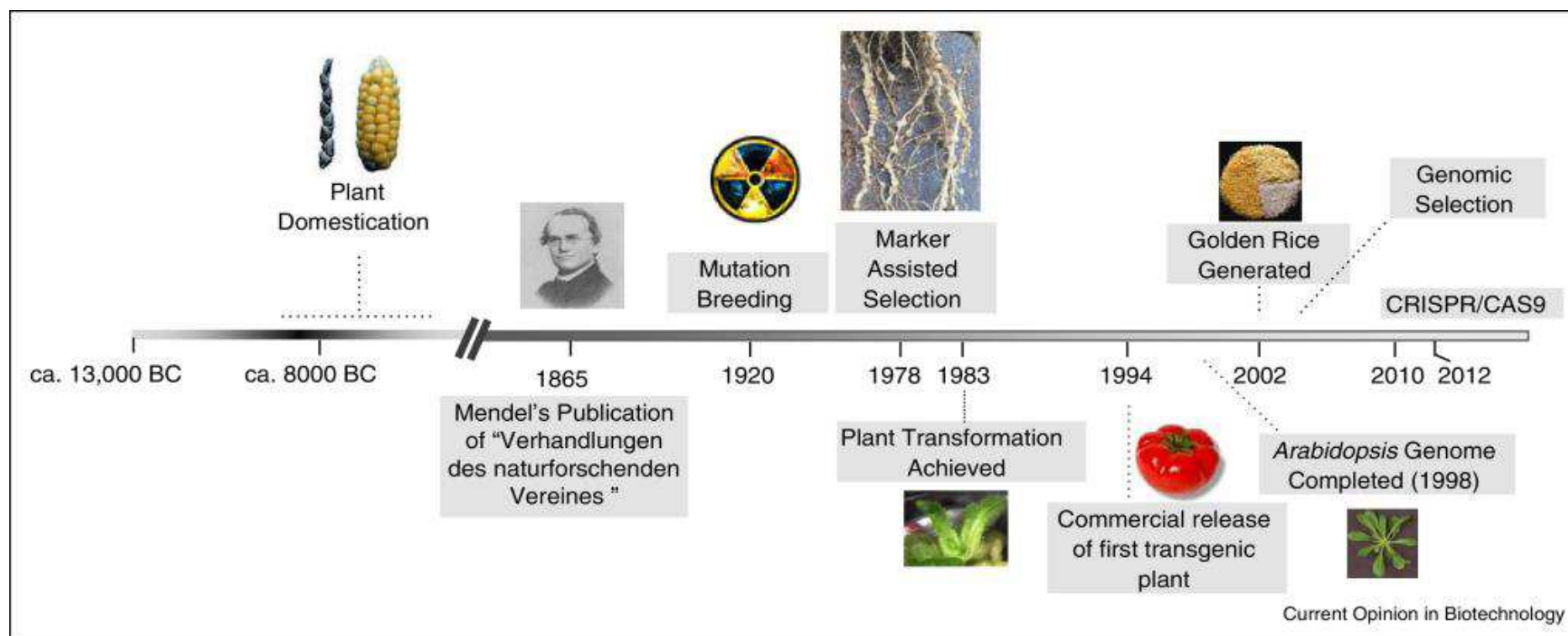
Tutti gli organismi viventi sono soggetti ad alterazioni del loro patrimonio genetico che avvengono spontaneamente o in seguito ad alcuni fattori ambientali.

Il miglioramento genetico sfrutta la diversità genetica naturale o indotta attraverso l'utilizzo di diverse tecniche per selezionare piante con le caratteristiche desiderate in tempi più brevi





Storia del miglioramento genetico nelle piante



L'agricoltura, sin dall'antichità, si è sviluppata utilizzando tecniche di incrocio e selezione finalizzati ad aumentare la produttività e la qualità dei prodotti coltivati.



Le Tecniche di miglioramento genetico

Tecniche di miglioramento genetico convenzionali
(Conventional breeding techniques - CBT)

Tecniche consolidate di modifica genetica
(Established Techniques of Genetic Modification - ETGM)

Nuove tecniche di miglioramento genetico
(New Breeding Techniques - NBT)

Attualmente il miglioramento genetico in campo agricolo ha a disposizione diversi metodi che possono essere divisi in tre grandi gruppi: tecniche di incrocio convenzionali, tecniche consolidate di modifica genetica e nuove tecniche di incrocio.



Tecniche di miglioramento genetico convenzionali (Conventional breeding techniques - CBT)

Le tecniche di incrocio convenzionali (Conventional Breeding Techniques - CBT) sono quelle tecniche e metodi utilizzati tradizionalmente dagli agricoltori e dai produttori di sementi; queste comprendono:

Selezione semplice (origine addomesticazione delle piante)

Breeding classico (Intraspecies and interspecies crossing)

ibridazione somatica (Somatic hybridisation)

vigore dell'ibrido (Hybridization for vigour)

Mutagenesi (Mutation breeding)

tecniche di incrocio multiplo (Translocation breeding)

induzione della poliploidia (Doubled haploids and polyploidy induction)



Breeding Classico: evidenziare la variazione

1-Produrre o evidenziare la variazione :

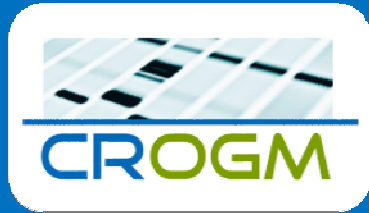
Utilizzo della variazione naturale già esistente all'interno della specie

2- Incrocio sessuale :

Incrocio tra due parentali scelti opportunamente

3- Identificare e Selezionare :

Analisi della progenie alla ricerca di una nuova combinazione (ricombinanti)
creatasi tramite la meiosi tra gli alleli dei due parentali



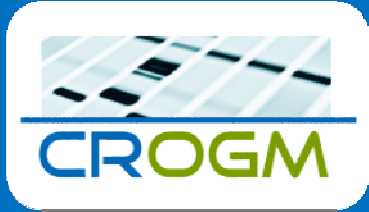
Tipologia di selezione nel breeding classico

Selezione massale

Selezione ricorrente

Backcross

Backcross e Selezione assistita da marcatori
molecolari



Selezione basata sul fenotipo

• Selezione massale:

- si basa sulla diversità genetica della popolazione;
- non viene creata ulteriore variabilità ;
- miglioramento della performance dell'intera popolazione

Selezione ricorrente :

- Creazione di variabilità
- Valutazione delle piante create;
- Nuovo gruppo di genitori selezionati;
- Incrocio in tutte le combinazioni possibili,

Lento e ambiente dipendente.



Backcross e marcatori molecolari

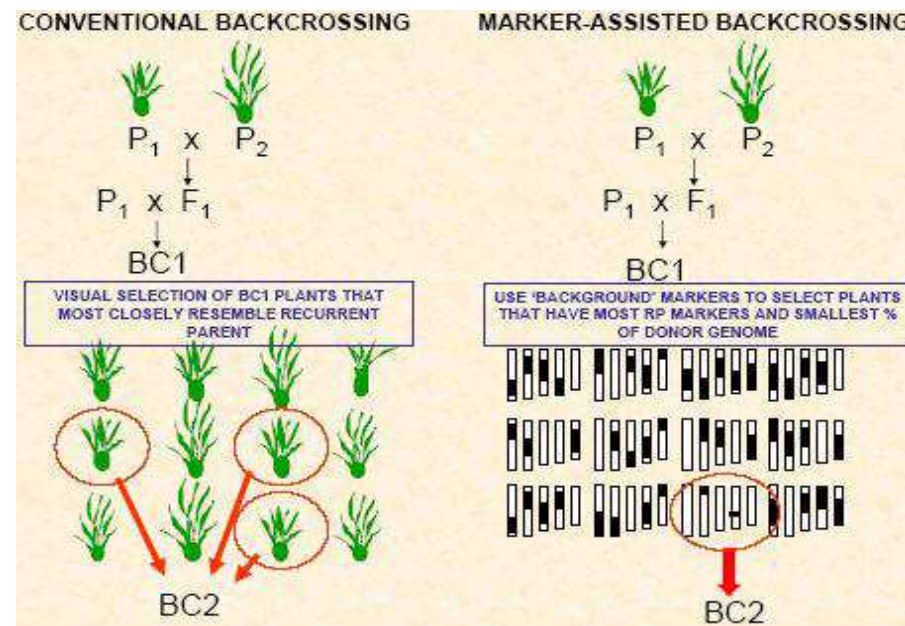
- Backcross o reincrocio tra un ibrido F1 e uno dei suoi parentali (ricorrente), non per creare nuove varietà ma per aumentare la % del genoma del ricorrente. Ci vogliono almeno 5-6 BC per completare la «pulizia» del genoma.

Conventional backcrossing VS

Marker-assisted backcrossing

Si velocizza il processo !!

L'uso di marcatori molecolari è molto efficace nel miglioramento genetico delle piante perchè consente di identificare le linee parentali per un determinata caratteristica e di selezionare velocemente nella progenie di un incrocio la pianta portatrice dei fattori genetici determinanti le caratteristiche che si vogliono sottoporre a miglioramento.





Mutagenesi - Mutation breeding

Questa tecnica comporta l'esposizione di piante o semi ad *agenti mutageni fisici e chimici* che inducono cambiamenti random nel DNA. Le mutazioni possono interessare singoli nucleotidi o possono determinare inversioni , traslocazioni o delezioni di frammenti di DNA.

pompelmo rosa
(Texas red)

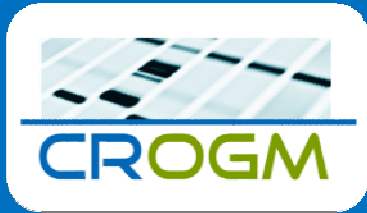


Ottenuto per radiazione
il gene codificante l'enzima che
degrada il pigmento rosso in
uno incolore è stato reso
knockout



grano duro CRESO

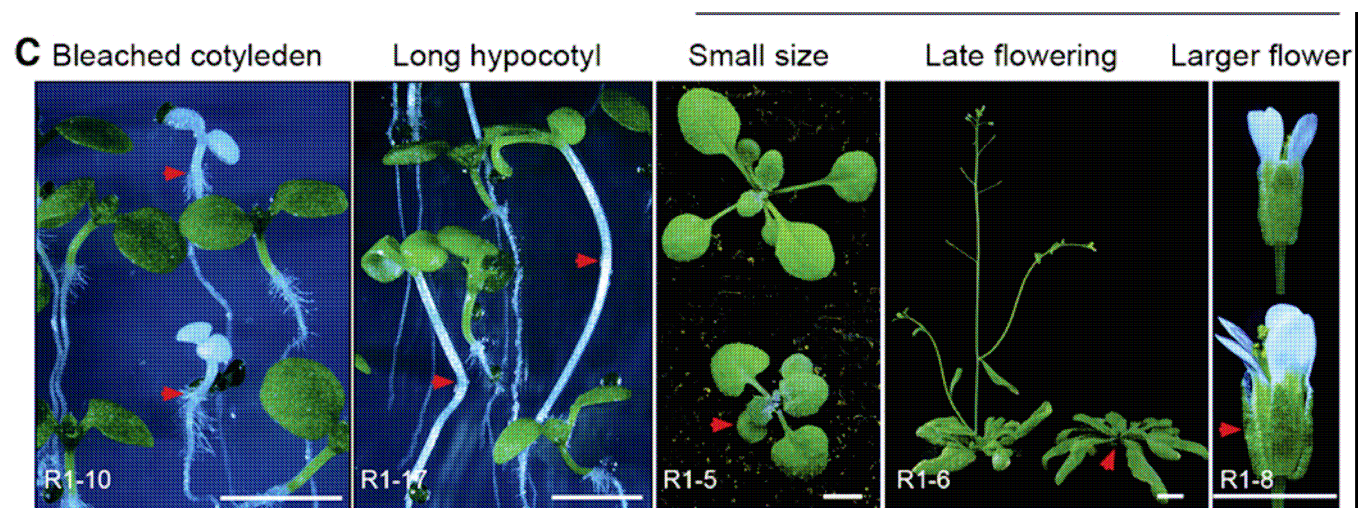
Ottenuto per irraggiamento
con neutroni



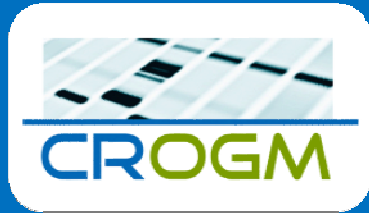
Mutagenesi - Variazione Somaclonale

Fenomeno rilevante per tutte le tecniche di plant breeding che ricorrono all'utilizzo di colture in vitro di cellule o tessuti vegetali, e risulta nella comparsa di cambiamenti genetici ed epigenetici spontanei, denominati variazioni somaclonali, in particolare dopo passaggi multipli di cellule in cultura.

Regeneration-Induced "Somaclonal" Variation in *Arabidopsis Thaliana* (C.Jiang et al 2011)



Esempio di variazione somaclonale in piante di *Arabidopsis Thaliana* rigenerate dal callo.



Effetti non intenzionali (Unintended effects)

Effetti diversi da quelli che si intende generare con l'impiego delle tecniche di miglioramento genetico

- **Cambiamenti non intenzionali**

Ulteriori cambiamenti introdotti nell'organismo rispetto a quelli che si intende generare

Dipendono dalla tecnica impiegata e dall'organismo target (piante, animali o microorganismi)

- **Effetti non intenzionali di cambiamenti intenzionali**

Effetti non previsti della modifica introdotta intenzionalmente

Dipendono da fattori ambientali e dall'interazione con altri geni

Fenomeni generali che possono avvenire con qualsiasi tecnica di breeding impiegata

Possono dipendere da modificazioni epigenetiche o da interazioni con altri geni



Effetti non intenzionali (Unintended effects)

1) Effetti off-target

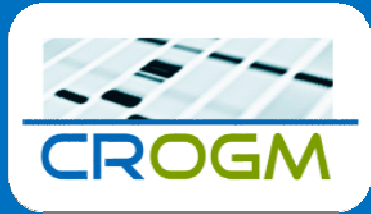
Una specifica modifica viene introdotta in una sequenza genetica identica o simile a quella "target" ma in un'altra localizzazione genomica

2) Effetti di posizione

Variazione di espressione esibita da due transgeni identici inseriti in due diverse posizioni del genoma

3) Effetti pleiotropici

Un gene influenza due o più tratti fenotipici apparentemente non correlati



Effetti non intenzionali delle CBT

Breeding Classico

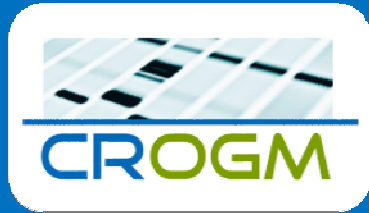
Le piante ottenute nella prima generazione ereditano una serie di tratti non desiderati dalla linea parentale oltre a quello desiderato → potrebbero esserci effetti pleiotropici o sull'espressione di altri geni

Il fenomeno di ricombinazione meiotica potrebbe portare alla trasmissione di un elevato numero di tratti indesiderati, non tutti eliminabili con il backcrossing.

Il tasso di mutazione spontanea potrebbe portare all'accumulo di ulteriori effetti non intenzionali

Mutagenesi

Processo che comporta l'introduzione di un gran numero di mutazioni casuali nel genoma ("off-target") e che possono essere mantenute se non causano la comparsa di tratti fenotipi svantaggiosi



Tecniche consolidate di modifica genetica (Established Techniques of Genetic Modification - ETGM)

Le piante geneticamente modificate (**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, con lo scopo di introdurre nuovi caratteri

PGM di prima generazione

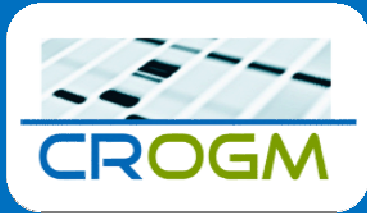
Miglioramento delle caratteristiche agronomiche:

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

PGM di seconda e terza generazione

Miglioramento delle caratteristiche, qualitative, nutrizionali e farmacologiche :

- Resistenza a siccità,
- Capacità di fissare l'azoto,
- Crescita in suoli con elevata salinità, acidità, alte concentrazioni di Boro e di alluminio
- Proprietà integrative alla dieta
- Valenze nutrizionali o terapeutiche



Produzione di piante GM

1) Preparazione del costrutto da utilizzare per la trasformazione

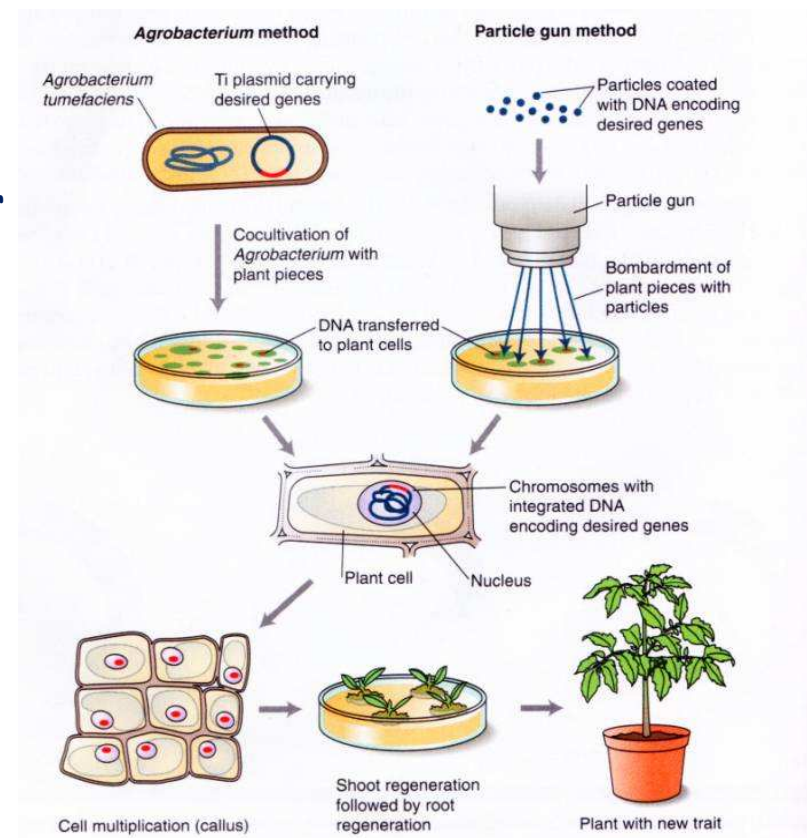
- Scelta della sequenza di DNA e taglio con enzima di restrizione
- Taglio del plasmide con lo stesso enzima di restrizione per generare estremità compatibili
- Inserimento del tratto di DNA scelto
- "ligation"
- Costrutto: plasmide + transgene

2) Clonaggio : una volta ottenuto il costrutto genico , occorre produrre un elevato numero di copie inserendolo in batteri in grado di amplificarlo

3) Trasformazione genetica: inserimento del costrutto nel tessuto vegetale

4) Selezione: assistita mediante appositi marcatori

5) Rigenerazione : del tessuto vegetale a pianta intera (PGM)

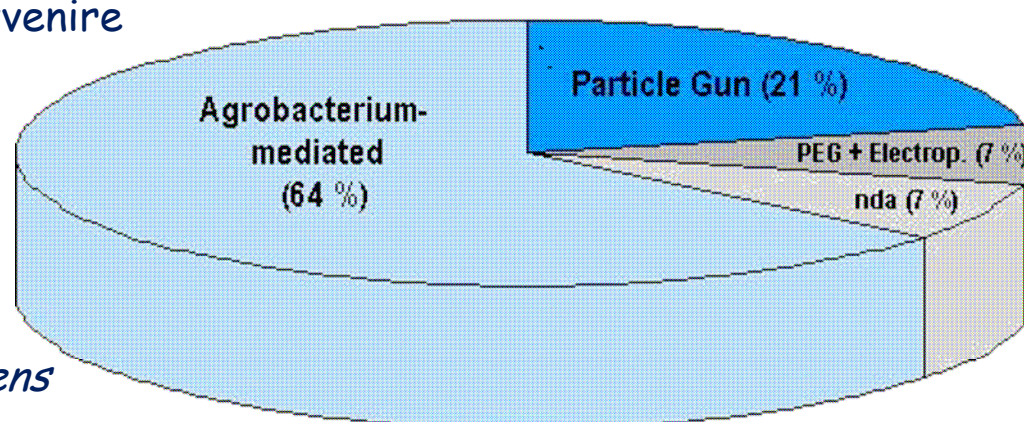


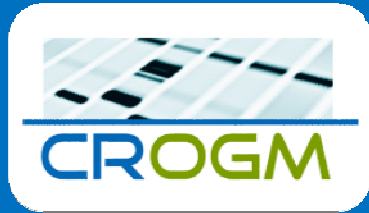


Metodi di trasformazione

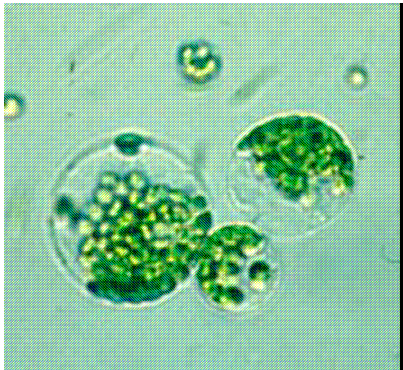
L'inserzione di un tratto di DNA estraneo (costrutto genico) nel genoma di una pianta può avvenire
Attraverso diverse modalità :

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





Trasferimento diretto del DNA Elettroporazione

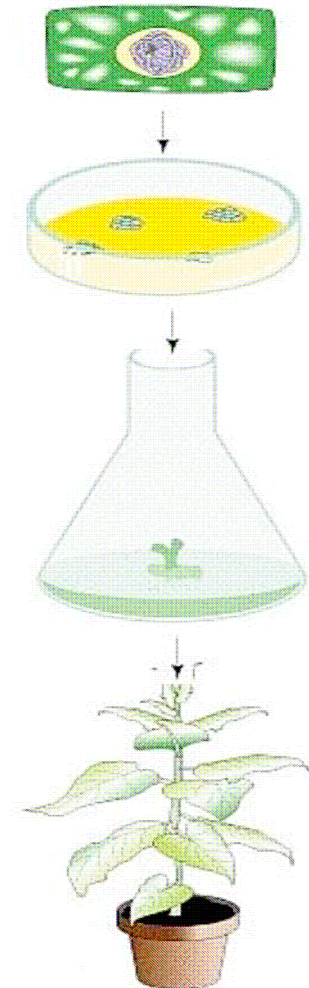


1- È necessario eliminare la parete di cellulosa delle cellule vegetali (cellulasi fungine) per ottenere i protoplasti

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

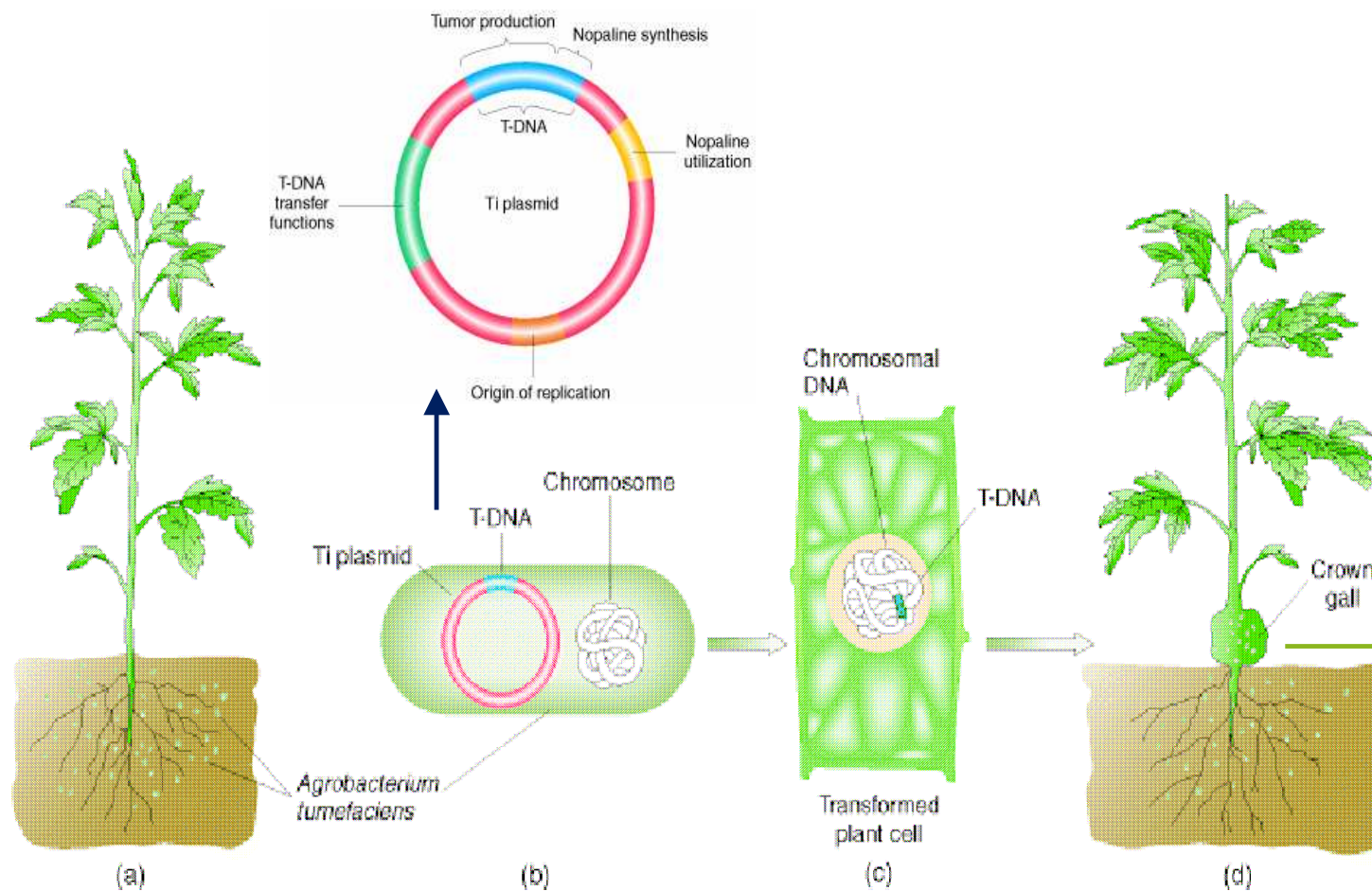
3- Dopo elettroporazione i protoplasti vengono fatti crescere in colture tissutali con specifici livelli di fitormoni prima di procedere alla selezione della pianta transgenica

Es. mais BT11, T25, riso LRICE06

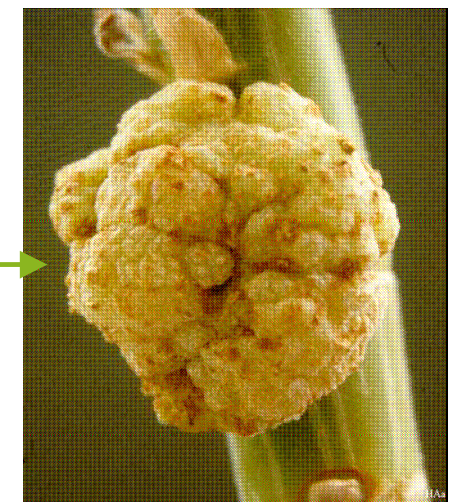




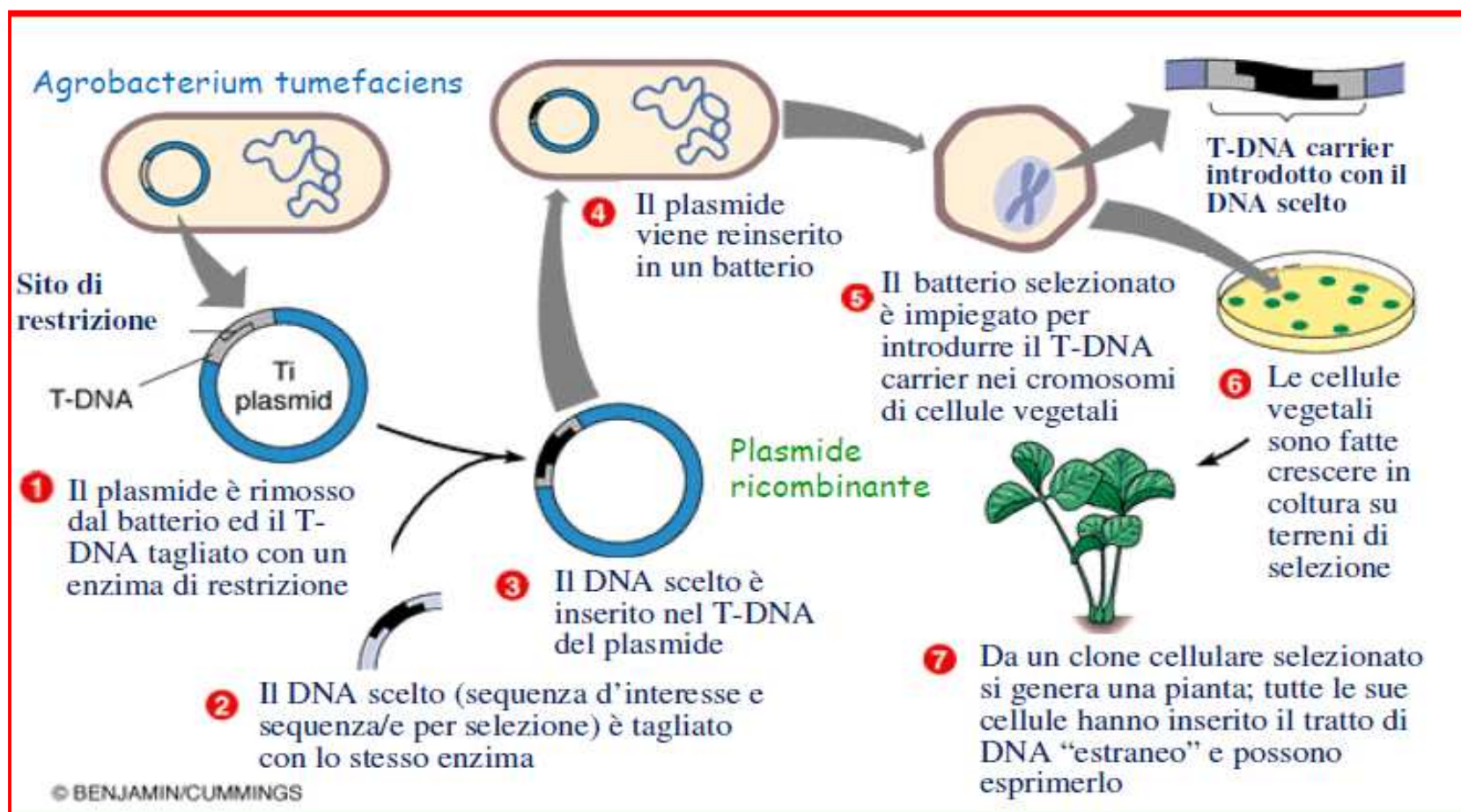
Agrobacterium tumefaciens



L'Agrobacterium tumefaciens in natura determina il tumore della «galla del colletto»

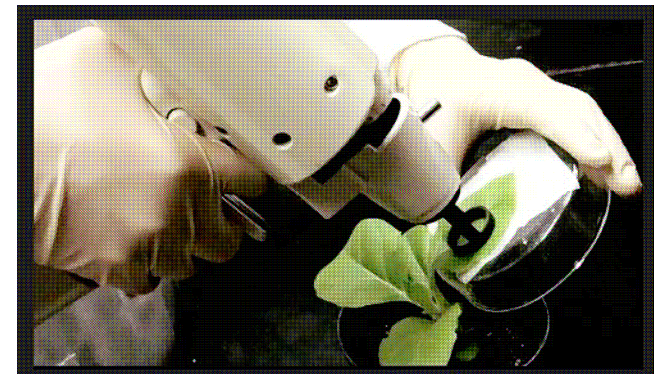
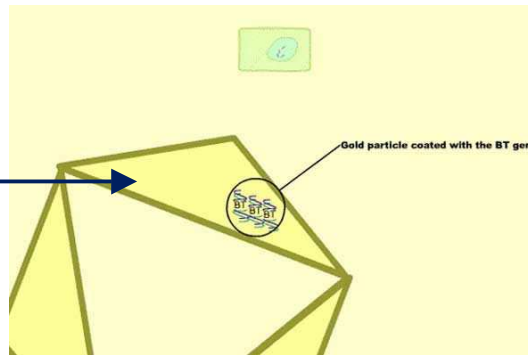
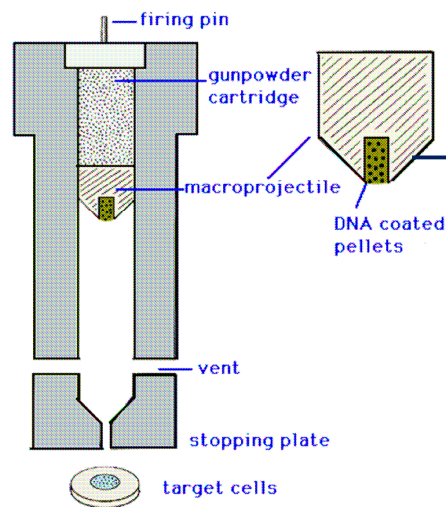


Agrobacterium tumefaciens





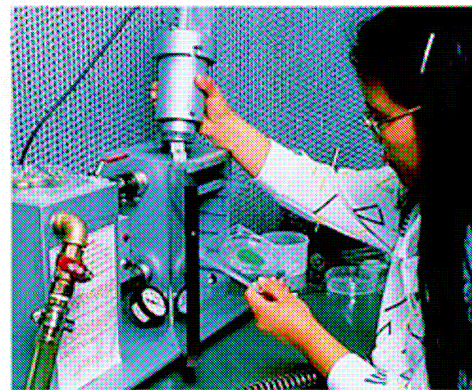
Metodo Biolistico Bombardamento con Microparticelle



Possibili bersagli

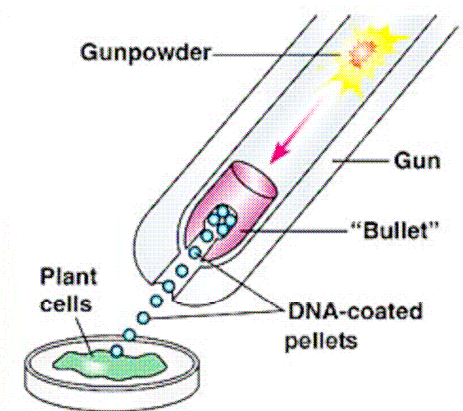
- Foglie intatte
- Chicchi
- Sospensioni di cellule embrionali

Es. mais BT176



(a)

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

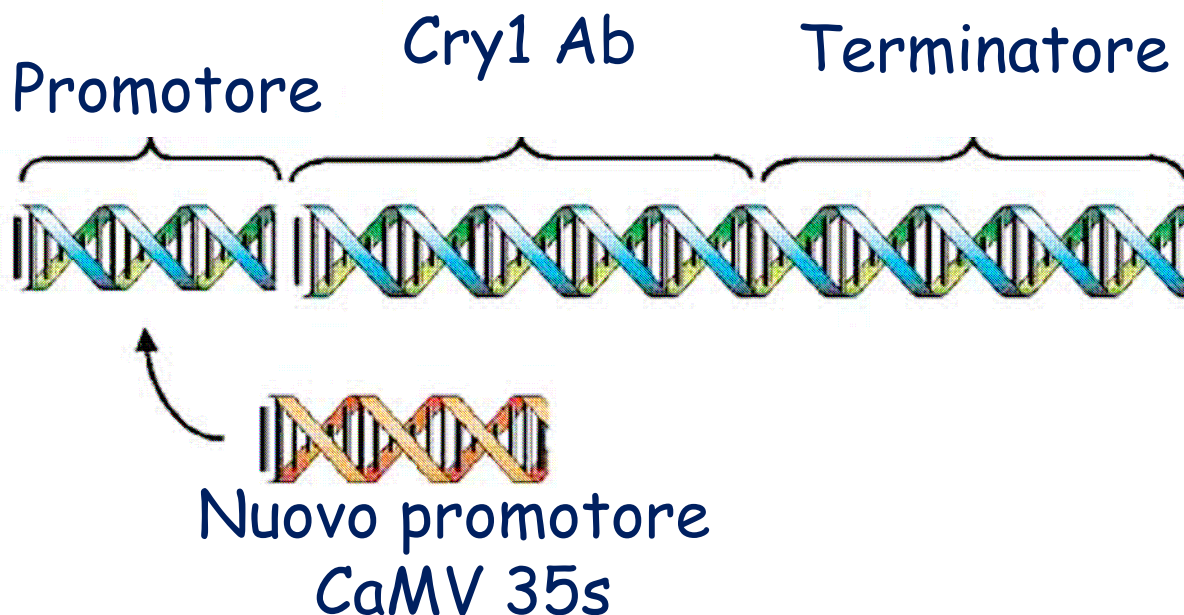


(b)



Esempio di pianta Transgenica: Mais Bt176

Gene codificante per la proteina Bt(Cry1Ab)



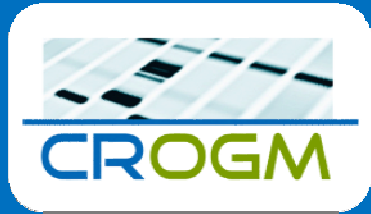
Nel genoma della pianta
sono state inserite:

- 6 copie del gene
CryIAb(resistenza agli
insetti) ;

- 6 copie del gene bla
(resistenza alle
penicilline);

- 2 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



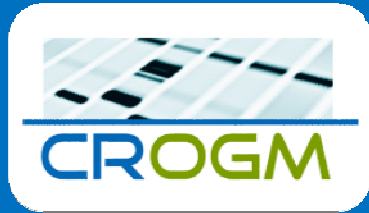
Effetti non intenzionali delle ETGM

- Mutagenesi inserzionale dovuta all'inserimento casuale del transgene nel genoma della pianta ricevente
- Effetti di posizione (dipendono da dove si inserisce il transgene) → influenza sull'espressione di altri geni
- Variazioni somaclonali → cambiamenti genetici o epigenetici che insorgono nelle cellule o nei tessuti vegetali coltivati in vitro, in particolare dopo molti passaggi delle cellule in coltura.



Nuove tecniche di miglioramento genetico (New Breeding Techniques - NBT)

- Genome editing :
Mutagenesi diretta da oligonucleotidi (ODM)
Nucleasi sito specifiche (SDN)
- Modificazioni epigenetiche (metilazione del DNA dipendente dall'RNA- RdDM)
- Cisgenesi e Intragenesi
- Reverse Breeding
- Agroinfiltrazione
- Innesto di una pianta non-GM su portinnesto GM



Modificazioni epigenetiche (metilazione del DNA dipendente dall'RNA- RdDM)

Modifiche epigenetiche: modifiche ereditabili che variano l'espressione genica senza alterare la sequenza nucleotidica del DNA .

Caratteristiche della tecnica :

- sequenza nucleotidica della pianta invariata;
- metilazione del DNA e conseguente minor attività o silenziamento di geni target. .

Utilizzo di molecole dsRNA omologhe al sito target e ottenute tramite ;

- Virus Induced Gene silencing (VIGS)
- Introduzione di un transgene

Risultato:

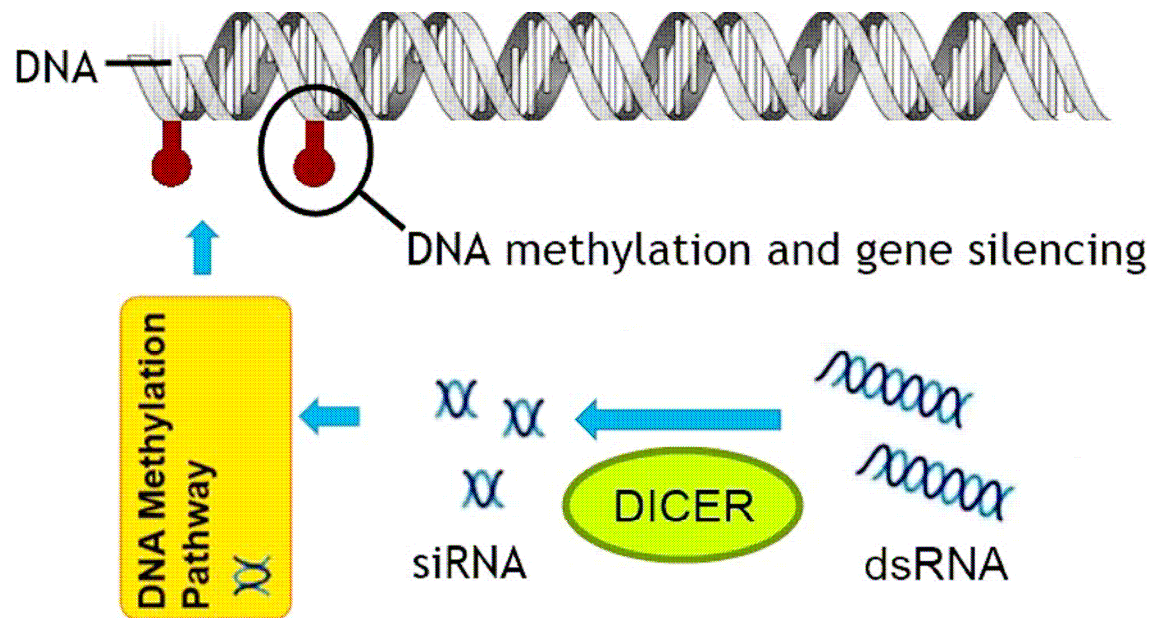
- silenziamento del gene nelle generazioni future
- perdita del materiale genetico codificante dsRNA ;

VIGS : perdita del materiale genetico durante la meiosi;

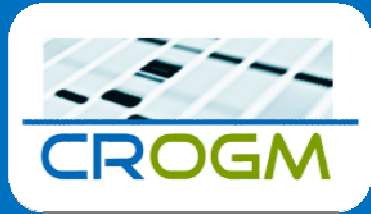
transgene : rimosso tramite incrocio con piante che non lo contengono.

Il prodotto finale non è geneticamente modificato.

Meccanismo molecolare della tecnica RdDM



Nella figura è rappresentato il meccanismo molecolare della tecnica RdDM. Molecole di dsRNA vengono riconosciute dal meccanismo di difesa della pianta. L'enzima DICER effettua un clivaggio convertendole in piccole molecole di RNA interfering (siRNA). Queste molecole attivano il pathway della metilazione del DNA nella pianta, determinando: metilazione del DNA e il silenziamento di geni target senza alterare la sequenza del DNA.

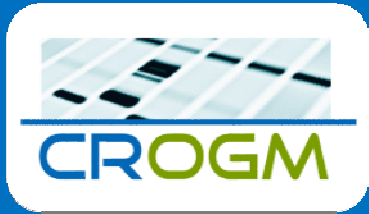


Campi di applicazione delle RdDM

Le RdDM possono essere utilizzate per migliorare un'ampia varietà di caratteristiche vegetali tramite l'inibizione dell'attività di geni endogeni target, senza alterazione del materiale genetico.

Esempi di caratteristiche vegetali che possono essere migliorate sono:

- Tolleranza alla siccità e al calore (rendendo possibile la crescita di colture anche sotto condizioni climatiche sfavorevoli).
- Resistenza alle malattie o agli insetti (con conseguente minor utilizzo di prodotti chimici per la protezione delle colture)
- Prolungata data di scadenza
- Miglioramento nelle qualità nutrizionali e di gusto o differenti colori



Cisgenesis e Intragenesi

Nelle tecniche di cisgenesis e l'intragenesi la sequenza di DNA esogena utilizzata può derivare esclusivamente dalla **stessa specie**, da **specie sessualmente compatibili** o che possono essere incrociate con le tecniche di miglioramento genetico convenzionali (CTB).

La **cisgenesis** è una tecnica molto simile al breeding classico ma permette un trasferimento genico più preciso fra specie vegetali strettamente correlate. Con questa metodica, uno specifico tratto, che conferisce ad esempio resistenza alle malattie, è trasferito da una stessa specie ad un'altra, senza alterare il corredo genetico complessivo della pianta.

Nell'**intragenesi** i nuovi elementi introdotti sono una ricombinazione di elementi di regolazione e/o sequenze codificanti.

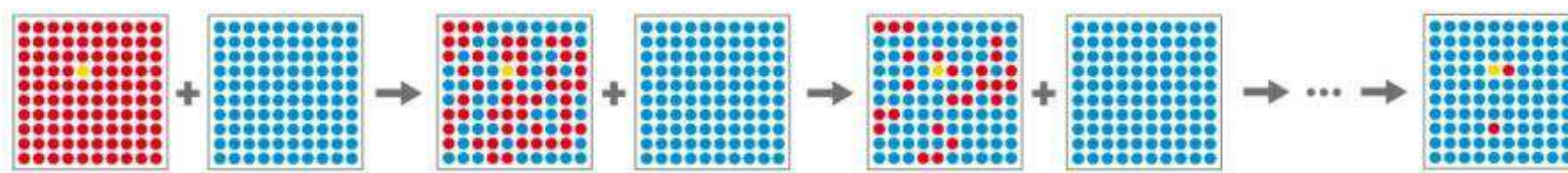
Caratteristiche:

- È una metodica più veloce rispetto al processo naturale;
- Viene introdotta esclusivamente la caratteristica desiderata, quindi non servono ulteriori crossing per eliminare eventuali caratteristiche indesiderate.

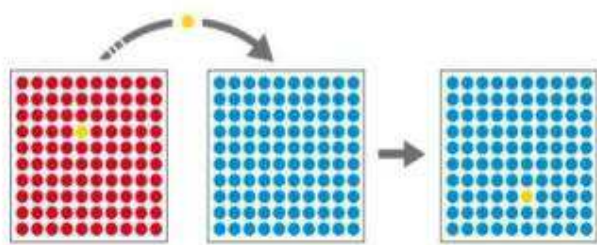


Cisgenesi vs Conventional breeding

Conventional breeding



Cisgenesis



Confronto fra breeding classico e cisgenesi rispetto all'introduzione di una singola caratteristica desiderata (evidenziata in giallo) dalla pianta "donatrice" (in rosso) alla pianta ricevente (in blu) .



Cisgenesis e Intragenesi

Plant Biotechnology
Journal

aab
Association of Applied Biologists

SEB
Society for
Experimental Biology

Plant Biotechnology Journal (2013) 11, pp. 395–407

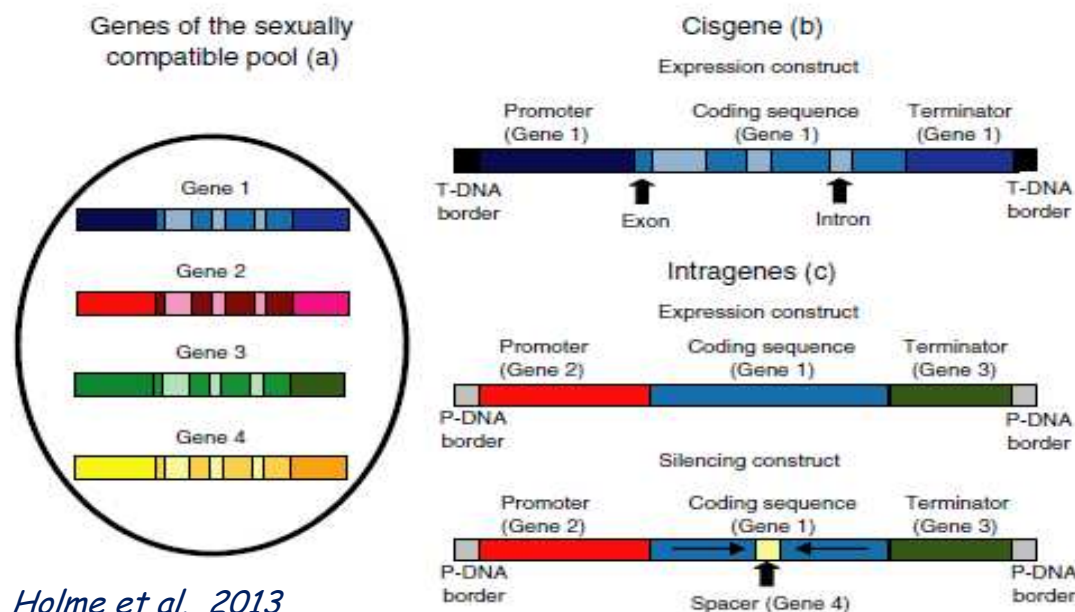
doi: 10.1111/pbi.12055

Review article

Intragenesis and cisgenesis as alternatives to transgenic crop development

Inger Bæksted Holme*, Toni Wendt and Preben Bach Holm

Department of Molecular Biology and Genetics, Faculty of Science and Technology, Aarhus University, Research Centre Flakkebjerg, Slagelse, Denmark



Holme et al., 2013

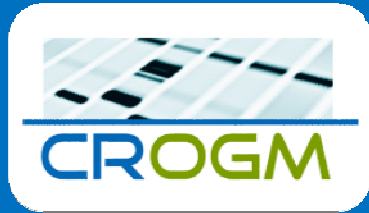
Nella figura sono rappresentati costrutti intragenici e cisgenici. Il cisgene è una copia identica al gene presente nel pool genico della specie sessualmente compatibile. l'intragene è una ricombinazione di elementi isolati da diversi geni presenti all'interno del pool genico di specie sessualmente compatibile. Con queste tecniche possono essere progettati costrutti che promuovono sia l'espressione che il silenziamento genico



Campi di applicazione della Cisgenesi ed Intragenesi

campi di applicazione :

- migliorare la resistenza duratura alle malattie in un gran numero di colture, come patate, mele e banane, consentendo di applicare meno pesticidi;
- introdurre resistenza alla muffa nelle varietà di uva presenti, contribuendo significativamente alla produzione senza modificare le caratteristiche e la qualità del prodotto;



Reverse breeding

Il reverse breeding permette lo sviluppo di nuove varietà attraverso incroci classici consentendo di fissare un genotipo eterozigote che presenta combinazioni alleliche desiderabili

Principio della tecnica :
si basa su due passaggi essenziali:

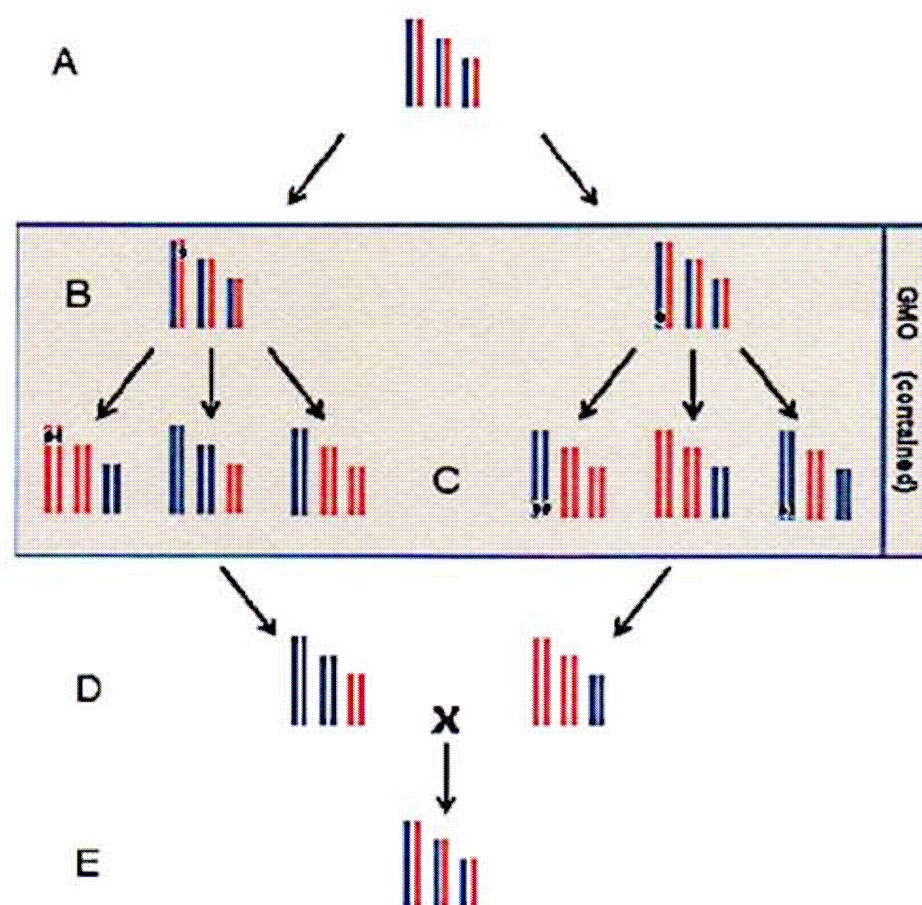
- 1) la soppressione della ricombinazione in una pianta selezionata ;
- 2) rigenerazione di piante adulte omozigoti, da spore contenenti cromosomi non ricombinati, contenenti ciascuna metà del genoma dell'eterozigote selezionato.

La soppressione della ricombinazione tra coppie di cromosomi omologhi, durante la meiosi è ottenuta mediante introduzione di costrutti transgenici con meccanismo di silenziamento (RNA *interference*, RNAi o *post-transcriptional gene silencing* - PTGS-) o che presentano la forma dominante negativa di geni coinvolti nella ricombinazione

La cassetta genica viene eliminata nella progenie tramite segregazione in modo che le piante così ottenute non presentano modificazioni genetiche.



Reverse breeding



Fasi coinvolte nel Reverse Breeding

A= ibrido originale;

B=trasformanti(organismo intermedio);

C= doppio aploide(organismo intermedio);

D=linea parentale omozigote

E=Progenie eterozigote ricostruita

Il reverse breeding consente la produzione di piante ibride in tempi più brevi rispetto alle CBT.

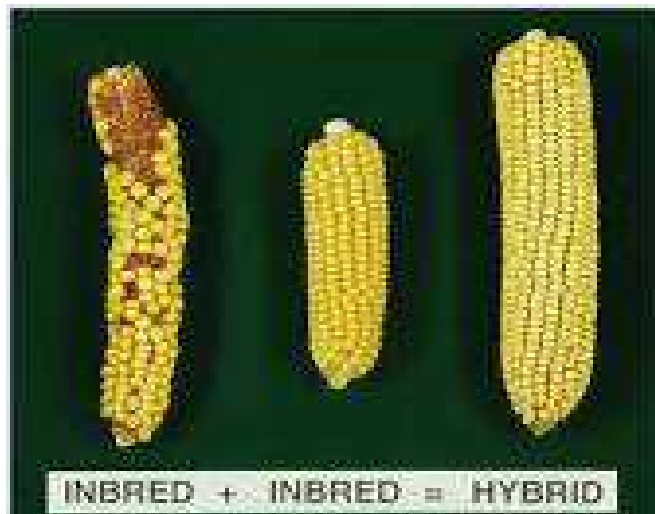
- Scelta della pianta con la caratteristica desiderata (A)

- Soppressione della ricombinazione genica e origine di linee parentali omozigoti della pianta selezionata. (fase di modificazione genetica in cui si generano piante intermedie GMO) (B-C)

- Generazione di linee ibride che ricostituiscono la composizione genetica originale della pianta selezionata (non contengono la modificazione genetica) (D-E)



Reverse breeding



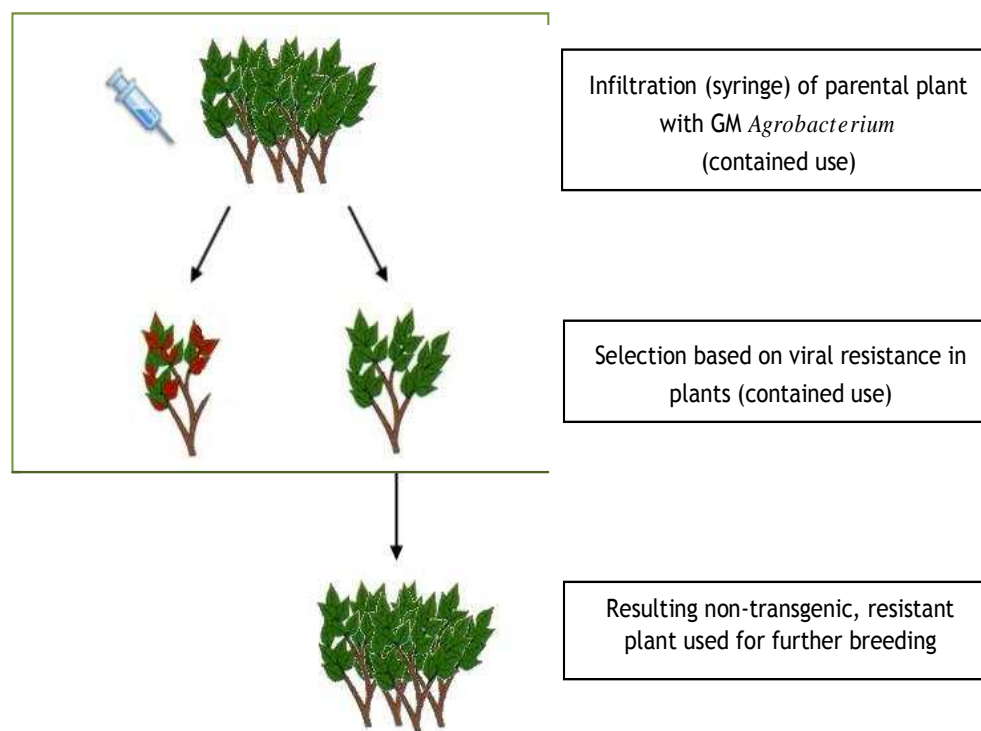
Il "Vigore dell'ibrido" è essenziale per produrre varietà ad alto rendimento in molte colture. *Source: Nature genetics, volume 44, 2012*

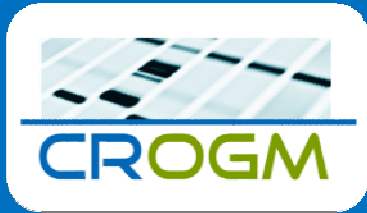
Il Reverse Breeding crea nuove varietà ibride di piante eterozigoti con "**Vigore dell'ibrido**", difficili da ottenere e, dispendioso in termini di tempo, con le tecniche di breeding classico. Gli ibridi eterozigoti "classici" sono difficili da mantenere per via della ricombinazione genetica dei cromosomi. La tecnica prevede l'uso di DNA ricombinante, (intemedio-GM) ma le linee omozigoti selezionate e la loro progenie non sono transgeniche, risultando quindi simili a quelle che possono essere prodotte con usando tecniche di breeding classico



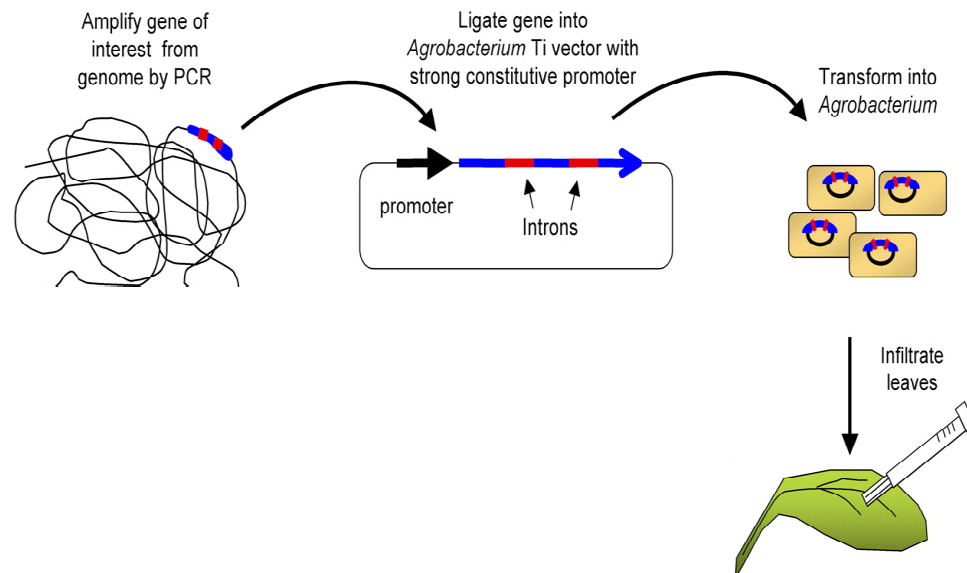
Agroinfiltrazione

Agroinfiltrazione : tecnica che consente di introdurre all'interno della pianta un costrutto genico in modo transiente tramite *Agrobacterium*





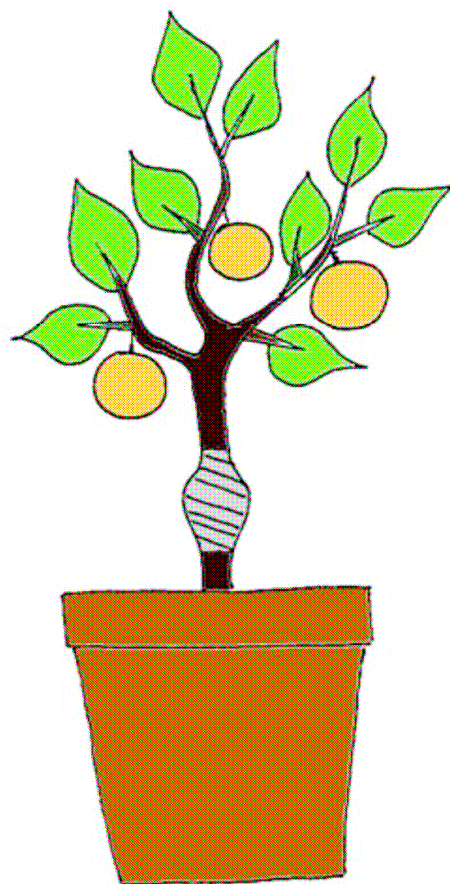
Agroinfiltrazione



I virus delle piante sono responsabili di importanti malattie vegetali. Sebbene molti test di resistenza sono semplici da effettuare, alcuni virus non possono essere trasmessi alla pianta tramite inoculazione meccanica, ma richiedono l'utilizzo di un insetto come vettore, e questo può rappresentare un ostacolo per la selezione di piante resistenti in programmi di selezione vegetale. La capacità di *Agrobacterium tumefaciens* di trasferire materiale genetico virale è stata sfruttata per mimare l'infezione virale ed identificare le piante che presentano il gene per la resistenza. L'agroinfiltrazione viene proposta come interessante tecnica alternativa per introdurre virus nella pianta.



Innesto di pianta non-GM su portainnesto GM



Non-GM scion

GM rootstock

La tecnica dell'innesto consiste nell'inserire una parte vegetativa di una pianta (germoglio non-GM), di solito un germoglio o una gemma, su un'altra pianta portatrice di radici (portainnesto-GM). Viene stabilito il normale flusso vascolare, i germogli-GM del portainnesto vengono generalmente eliminati, in modo che tutte le parti aeree della pianta innestata rechino le caratteristiche del germoglio non-GM. L'innesto è una tecnica comunemente utilizzata in orticoltura per combinare la qualità dei prodotti raccolti germoglio non-GM con le caratteristiche benefiche del portainnesto-GM, come la resistenza alle malattie del suolo o un più efficiente assorbimento dei nutrienti in una resa più alta.

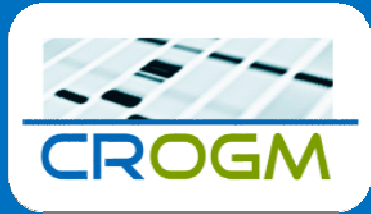
Image adapted from:

<http://ipts.jrc.ec.europa.eu/presentations/documents/15group4.pdf>



Tabelle riassuntiva

	Modifica della sequenza	Presenza di DNA esogeno nel prodotto finale (o intermedio)
RdDM	No	No (possibile presenza di prodotto intermedio)
Cisgenesi Intragenesi	Si	Si (derivante dalla stessa specie o specie correlate)
Reverse breeding	No	No nel prodotto finale (si nel prodotto intermedio)
Agroinfiltrazione	No (tranne nel punto di integrazione)	SI (in cellule somatiche)
Innesto di pianta GM su porta	Si nel portainnesto, No nell'innesto dei sui fiori e frutti	Si, nel portainnesto No, nell'innesto dei sui fiori e frutti



Coming Soon....

