



VITE E BIOTECNOLOGIE: TRA PASSATO E FUTURO

R.Vignani

Dipartimento di Scienze Ambientali "G. Sarfatti"
Università di Siena
VIGNANI@unisi.it



Breve *excursus* sulle biotecnologie

- Definizione *preistorica* di biotecnologie
- Definizione *storica* di biotecnologie dagli anni ottanta

Processi fermentativi





Definizione *storica* di biotecnologie

anticorpi

Impiego di microrganismi
per il recupero ambientale

Moderna biologia molecolare



Quali applicazioni biotech?

Vite-prodotto
finale

Genetica della
vite



Fermentazione

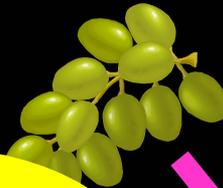
**Miglioramento genetico
dei lieviti**



Miglioramento genetico

- Fisiologia vegetale
 - Genetica

- Clonaggio e caratterizzazione genica
- Marcatori molecolari
- Profili di espressione genica
- Trasformazione genetica



- Isolamento di protoplasti e linee cellulari
- Analisi citologiche, di microscopia elettronica (TEM, SEM)
- Microscopia a fluorescenza (CONFOCALE)
Impiego di anticorpi test elisa

Cantina,
processi
fermentativi

Patologia vegetale

- *In vitro* culture
- Risanamento di cloni
- Diagnosi di patologie

Genomica, proteomica e bioinformatica

- **Genomica:** la scienza che individua la struttura, il ruolo e la funzione biologica di molti geni contemporaneamente
- **Genomica strutturale:** comprende mappaggio genetico, fisico, e il sequenziamento dell'intero genoma
- **Genomica comparativa:** relazione funzionale tra geni di organismi diversi
- **Genomica funzionale:** ricerca del ruolo funzionale dei geni
- **Proteomica:** la definizione molecolare del fenotipo (panorama proteico espresso in senso spazio-temporale)
- **Bioinformatica:** metodologie di tipo matematico e statistico che consentono il processamento di dati biologici (sequenze di DNA, RNA, aa)





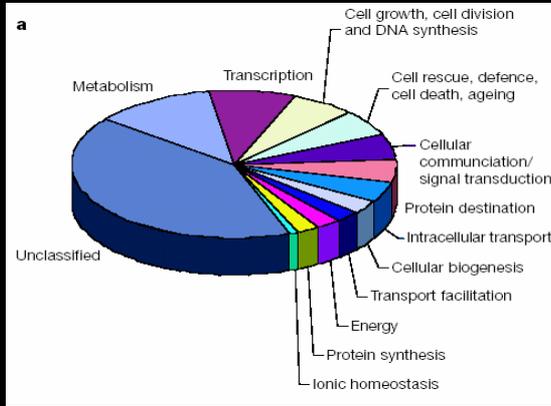
Sequenziamento genomi: lo stato dell'arte

	N° geni	% di geni individuati	fine
E. Coli	4,288	60	1997
Yeast	6,600	40	1996
C. Elegans	19,000	40	1998
Drosophila	12,000-14,000	25	1999
Rice	25,000	30	2000
Arabidopsis	25,000	40	2000
Mouse	60,000-100,000	10-20	2001
Human	60,000-100,000	10-20	2000/3



STATO ATTUALE GENOMICA VEGETALE

- Riso
- Patata
- Pomodoro
- Arabidopsis thaliana (126 Mb)
- Vite (470 Mb)
- Genoma umano 3000 Mb



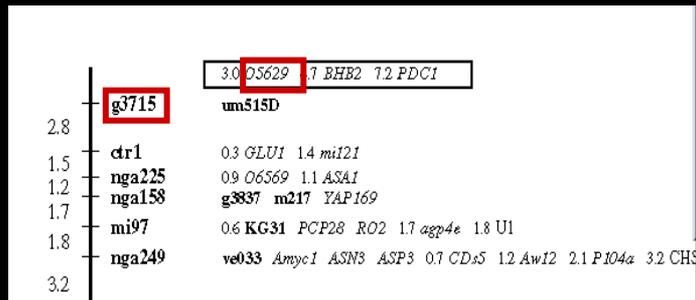
The Arabidopsis Genome Initiative, 2000, Nature, 408:796-815



Cromosoma 1 di *A. thaliana*



- Target BACs
- Sequenza in corso
- Sequenza completata
- Finita TIGR
- Shotgun completato da TIGR



Distanza relativa di marcatori mostrati nella parte alta della mappa rispetto ad altri marcatori. I nuovi vengono posizionati rispetto ai marcatori noti. Per i marcatori dell'esempio O5629 è a 3cM rispetto a g3715 che è il marcatore più estremo per questo cromosoma

cM unità di distanza genetica basata sulla frequenza di ricombinazione-1cM rappresenta 1% di eventi di ricombinazione



Marker-Assisted Selection [MAS]- QTLs

- La maggior parte dei caratteri non è controllata da singoli geni, ma da un set di geni che opera in cooperazione. Il fenotipo conseguente varia in maniera continua e non discreta. Questi caratteri vengono definiti **quantitativi**. Caratteri suscettibili di cambiamenti drastici (es. resistenza ad un patogeno) vengono definiti **qualitativi**.
- Il mappaggio genetico di singoli geni viene effettuato osservando la segregazione del carattere qualitativo da esso determinato
- Per i caratteri quantitativi sono definite le QTL (Quantitative Trait Loci) che individuano regioni cromosomiche localizzate o intersperse che sono ritenute influenzare il tratto fenotipico quantitativo. Queste regioni vengono tracciate mediante posizionamento di marcatori genetici



Principio della sintenia e geni ortologi

- ◆ **Sintenia:** esistono “blocchi” di geni che conservano la loro posizione sul cromosoma anche in organismi filogeneticamente distanti
- ◆ **Geni candidati ortologi:** geni diversi (spesso appartenenti a organismi diversi) la cui funzione possa essere induttivamente supposta simile



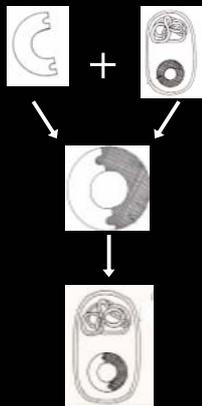
Strategie biotech per il miglioramento genetico della vite

- MAS=Marker Assisted selection (genomica, marcatori a DNA, proteomica)
- analisi delle riserve di biodiversità
- Risanamento di cloni
- Micropropagazione

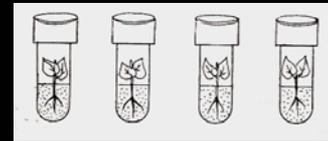
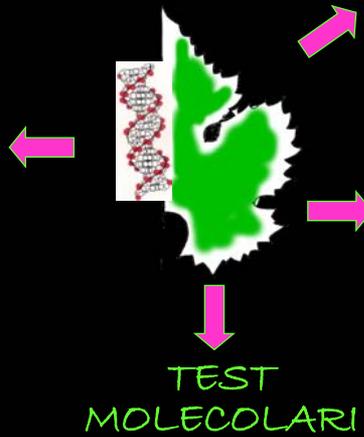




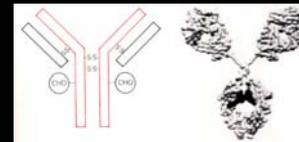
alcune applicazioni biotecnologiche alla vite



tecnologie del DNA ricombinante



micropropagazione



tecniche immunoenzimatiche

TEST MOLECOLARI



Marker-Assisted Selection [MAS]- Techniques

La maggior parte delle mappe genetiche consiste nel posizionamento di marcatori “anonimi” il cui ruolo funzionale è ignoto

I marcatori molecolari possono essere generati mediante tecniche diverse di biologia molecolare o biochimica. Ogni tecnica adottata possiede vantaggi, svantaggi e peculiarità.

Questi marcatori possono evidenziare **geni** (cDNA, RFLP o EST markers), **proteine** (isoenzimi) o **regioni** non necessariamente codificanti **del DNA** (RFLP genomico, RAPD o microsatellite).

Essi possono essere basati sull'uso di enzimi di digestione con enzimi di restrizione, separazione elettroforetica e ibridazione, o PCR e rilevamento delle regioni amplificate. Possono essere variabili in affidabilità e costi, più o meno versatili nella capacità di rilevare polimorfismi.

Ciascun marcatore mantiene un proprio ambito di applicabilità. Non esiste il marcatore perfetto, solo quello più adatto.



Marker-Assisted Selection [MAS]- Techniques

RFLPs Restriction Fragment Length Polymorphism. Questa tecnica richiede di isolare un frammento genomico che potrà essere utilizzato come probe o sonda. La tecnica si basa sull'isolamento del DNA genomico da saggiare che viene sottoposto a digestione mediante enzimi di restrizione. I frammenti di DNA genomico vengono separati mediante elettroforesi su gel di agarosio e trasferiti su una membrana (nylon o nitrocellulosa). Questa membrana è sottoposta ad ibridazione con la sonda marcata (isotopi radioattivi o fluorescenti) che evidenzierà i corrispondenti frammenti sul DNA genomico. Il polimorfismo si evidenzia mediante un'alterazione del pattern di bande riconosciute dal probe.

Questa tecnica è laboriosa, ma ripetibile e affidabile. Per questo è stata frequentemente impiegata per studi di identità genetica e mappaggio.



Marker-Assisted Selection [MAS]- Techniques



RAPDs. Il test è basato su PCR che utilizza un solo random primer (10 bp con contenuto variabile di GC che regola la stringenza del sistema di analisi). I frammenti amplificati vengono risolti su un comune gel di agarosio. La PCR consente di evidenziare il profilo di amplificazione dell'intero genoma (fingerprinting). Il test è di facile utilizzo, ma scarsamente adatto al fingerprint di genomi complessi.

Marker-Assisted Selection [MAS]- Techniques



Microsatelliti. I microsatelliti identificano regioni ipervariabili del genoma. Un microsatellite (**simple sequence repeat (SSR)**), correlato anche ad altre classi di sequenze ripetute come gli **short tandem repeat (STR)** o **variable number tandem repeat (VNTR)**) consiste in una regione in cui solo due o tre dei 4 nucleotidi viene ripetuta più volte (es. CACACA; CATCATCAT, ecc.) ed è fiancheggiato da regioni a sequenza univoca. Inizialmente i microsatelliti devono essere isolati mediante caratterizzazione di una library genomica, ma una volta decodificate le sequenze fiancheggianti è sufficiente una PCR ed un sistema di rilevamento dei frammenti amplificati (alleli) per evidenziare la variabilità genomica. Esistono diverse ipotesi sulla generazione dei meccanismi molecolari che generano variabilità allelica nelle regioni ripetute. Il test dei microsatelliti è comunemente impiegato in studi di fingerprinting, di mappaggio e di genetica di popolazione. Sono marcatori co-dominanti.



Marker-Assisted Selection [MAS]- Techniques



AFLP (Amplified fragment Length Polymorphism). La tecnica si basa sulla digestione del DNA genomico con enzimi di restrizione a taglio frequente (tipicamente EcorI e MseI). Ai frammenti digeriti vengono ligati degli adattatori sintetici su cui vengono disegnati dei primers per PCR. La miscela dei frammenti viene sottoposta a pre-amplificazione (in cui tutti i frammenti presenti vengono similmente amplificati). Una frazione rappresentativa di questi viene sottoposta ad un nuovo ciclo di amplificazione in cui ai primer vengono attaccate delle basi selettive. Un primer è marcato (isotopi o fluorocromi) e ciò consente di ottenere un fingerprint consistente in un pattern di bande elettroforetiche, tipico per ciascun organismo.



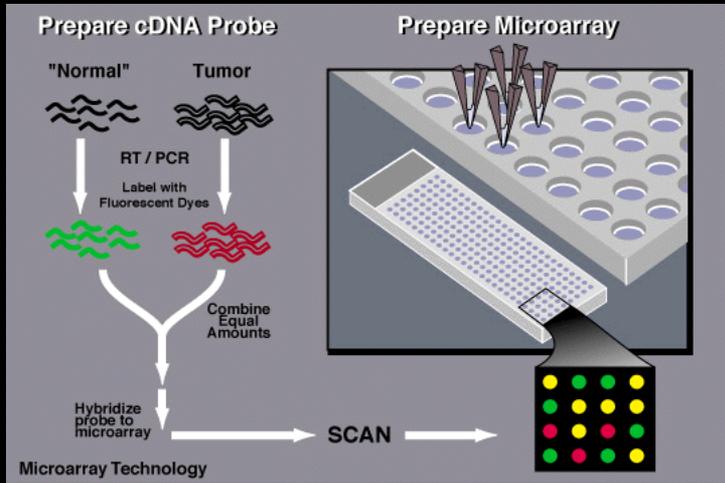
Marker-Assisted Selection [MAS]- Techniques

Single-nucleotide polymorphisms (SNPs). Sono mutazioni puntiformi che ricorrono specialmente in regioni non codificanti, ma non esclusivamente, il cui rilevamento può essere impiegato in studi di identificazione genetica, diagnosi di patologie, genetica di popolazione. La valutazione di uno SNP è valida all'interno di raggruppamenti tassonomici simili (ordine o specie); perde di valore se si comparano ortologi di ordini o taxa distanti. Gli SNP di tipo III sono presenti nel genoma umano ogni 500, 1000 bp, e complessivamente sono stimati in numero di 3 milioni. Rappresentano un marcatore di ultima generazione essendo possibile rilevare la loro presenza con sistemi di analisi di frammenti ad alta resa e sequenziatori automatici.

Marker-Assisted Selection [MAS]- IL FUTURO

Il vantaggio derivante dall'impiego di marcatori molecolari alla vite consiste nella possibilità di abbattere i tempi e gli schemi del miglioramento genetico tradizionale. In un futuro prossimo, la possibilità di individuare marcatori funzionali o aumentare il numero di marcatori associati a QTL importanti per la vite potrebbe rivelarsi cruciale per il sostenimento dell'economia legata a questa coltura tradizionale.

I DNA "Chips"



DNA Chips Competing and Complementary Technologies

Technology	Description	Advantages Over DNA Chips	Disadvantages Compared to DNA Chips
Southern and northern blots	Standard techniques for identifying DNA sequences and for studying changes in gene expression.	Technique can be optimized for each hybridization event.	Slow, laborious, and low-throughput.
Microsphere array technology	Competing technology that immobilizes DNA to the surface of coated beads instead of to the surface of chips.	Hybridization occurs in solution, which increases the rate; in addition the quality control is easier because aliquots of a larger batch can be tested.	The density is not as high as most DNA chips; in addition the technology is not as widely accepted as DNA chips.
Subtraction libraries or differential display technologies	Complementary technology in which mRNA pools between two tissue samples, such as diseased versus healthy, are matched up, and the differentially expressed genes are subtracted out.	Differences in gene expression are discovered without knowing anything about the genes in advance.	These methods are laborious and insensitive.
Serial Analysis of Gene Expression (SAGE)	Complementary technology in which sequence tags are used to measure levels of expression.	More comprehensive technique for studying gene expression changes.	This method is also laborious and insensitive.

Il vantaggio principale dei chips è l'alta processività



Websites sulla genomica della vite: il panorama internazionale

- Centri di ricerca ed istituzioni pubbliche
- Database e riferimenti bibliografici (websites on genetic and genomics on grapevine-Paul Evans, USA)
- BAC libraries mappaggio fisico (AF. Adam-Blondon, F)
- ESTs e profili trascrizionali
- Marcatori molecolari
- “VIGNA”/libro bianco sul “progetto genoma vite”



Genomica, proteomica e metabolomica

- Scopi delle applicazioni biotech
- Biotech “non invasivo”
- PCR e sistemi automatici di analisi





La biologia molecolare nelle applicazioni alla vite

- Sviluppo della genomica
- Scopi delle applicazioni biotech (descrizione della struttura primaria del genoma, approfondimento della fisiologia, **descrizione genotipica**)
- MARCATORI A DNA (RFLPs, RAPDs, microsatelliti, AFLPs)

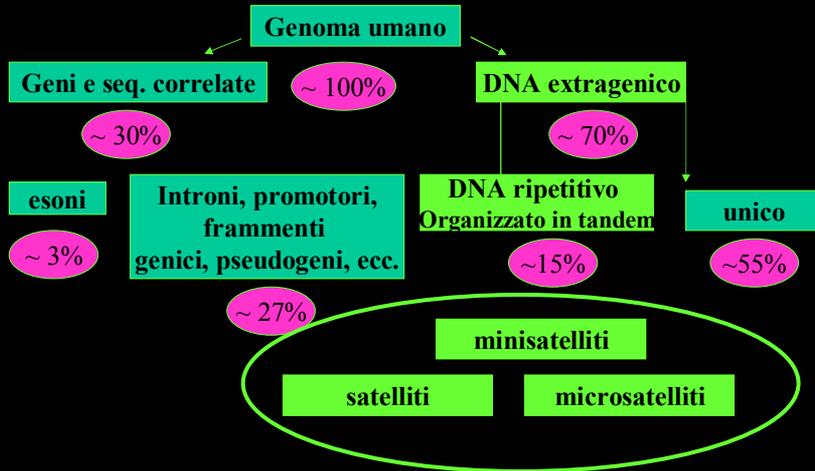


L'universalità dei test molecolari: l'orizzonte scientifico

- applicazione dei test nella medicina forense: dal 1985 almeno 50,000 casi legali sono stati risolti grazie ai test del DNA
- analisi di paternità, riconoscimento di resti seguenti a disastri o incidenti, omicidi, stupri, ecc.,
- diagnostica medica
- genetica di popolazione



I microsatelliti: “junk-DNA”?



I microsatelliti sono sequenze ubiquitarie

- Nei procarioti svolgono un ruolo nella regolazione genica
- Negli eucarioti è stata dimostrata la presenza di elementi tipo microsatellite a livello dei promotori
- Un'alterazione nella struttura dei microsatelliti è associata ad alcuni tipi di patologie (Huntington's disease, tumori, ecc.)
- Relitti di parti geniche, riserve di variabilità genomica
- Potrebbero derivare da “errori” dei complessi enzimatici deputati alla replicazione del DNA