

IL MIGLIORAMENTO GENETICO DELLE PIANTE AGRARIE

E' stato definito come :

- **L'arte** di discernere differenze economicamente importanti nel materiale vegetale per selezionare e moltiplicare i tipi migliori
- **La Manipolazione** della variabilità per indirizzare la composizione delle popolazioni delle piante coltivate verso un dato obiettivo
- **L'arte e la scienza** di cambiare e migliorare le piante nel corso delle generazioni



MIGLIORAMENTO GENETICO IN AGRICOLTURA

Il lontano passato

- La domesticazione delle piante

•Il recente passato

- La prima rivoluzione verde
- Gli ibridi
- Il miglioramento genetico moderno

•Presente e futuro

- NBT (new breeding techniques)

Il Lontano Passato (>10,000 anni fa circa)

L'UOMO HA INIZIATO A
MANIPOLARE LE PIANTE
DALL'INIZIO DELL'AGRICOLTURA.

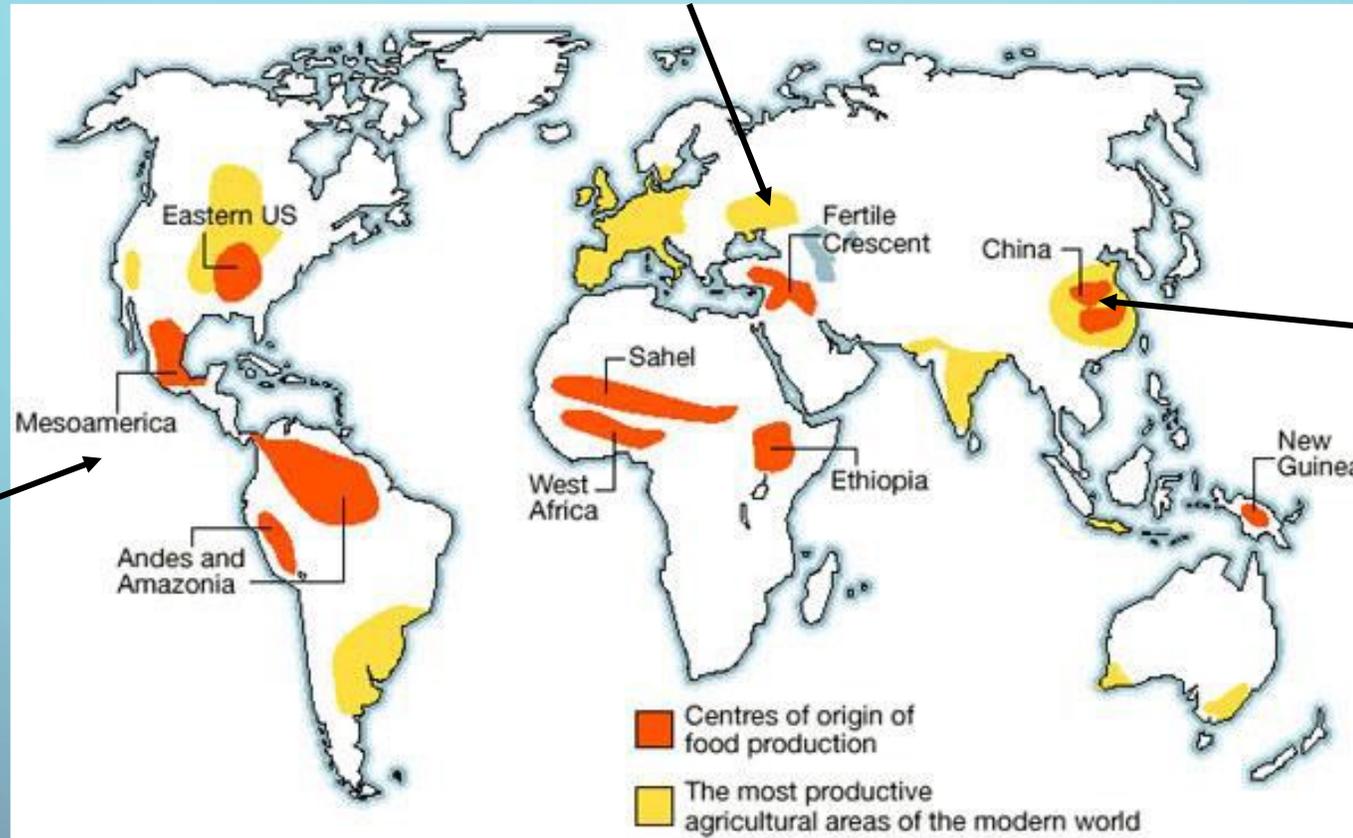
- Nella sua forma primitiva, questa attività prese l'avvio con il passaggio dell'uomo da una condizione di **cacciatore-raccoglitore** ad una di **allevatore-agricoltore**, processo graduale durante il quale le piante di interesse agrario furono trasformate da naturali (*wild*) a domesticate.



Le piante sono state domestiche contemporaneamente in differenti aree geografiche

Wheat, barley, pea, lentil
~ 13,000 years ago

Rice, soybean
~ 9000 years ago



Corn, squash, bean,
potato, tomato
~ 10,000 years ago

Che cosa è la domesticazione?

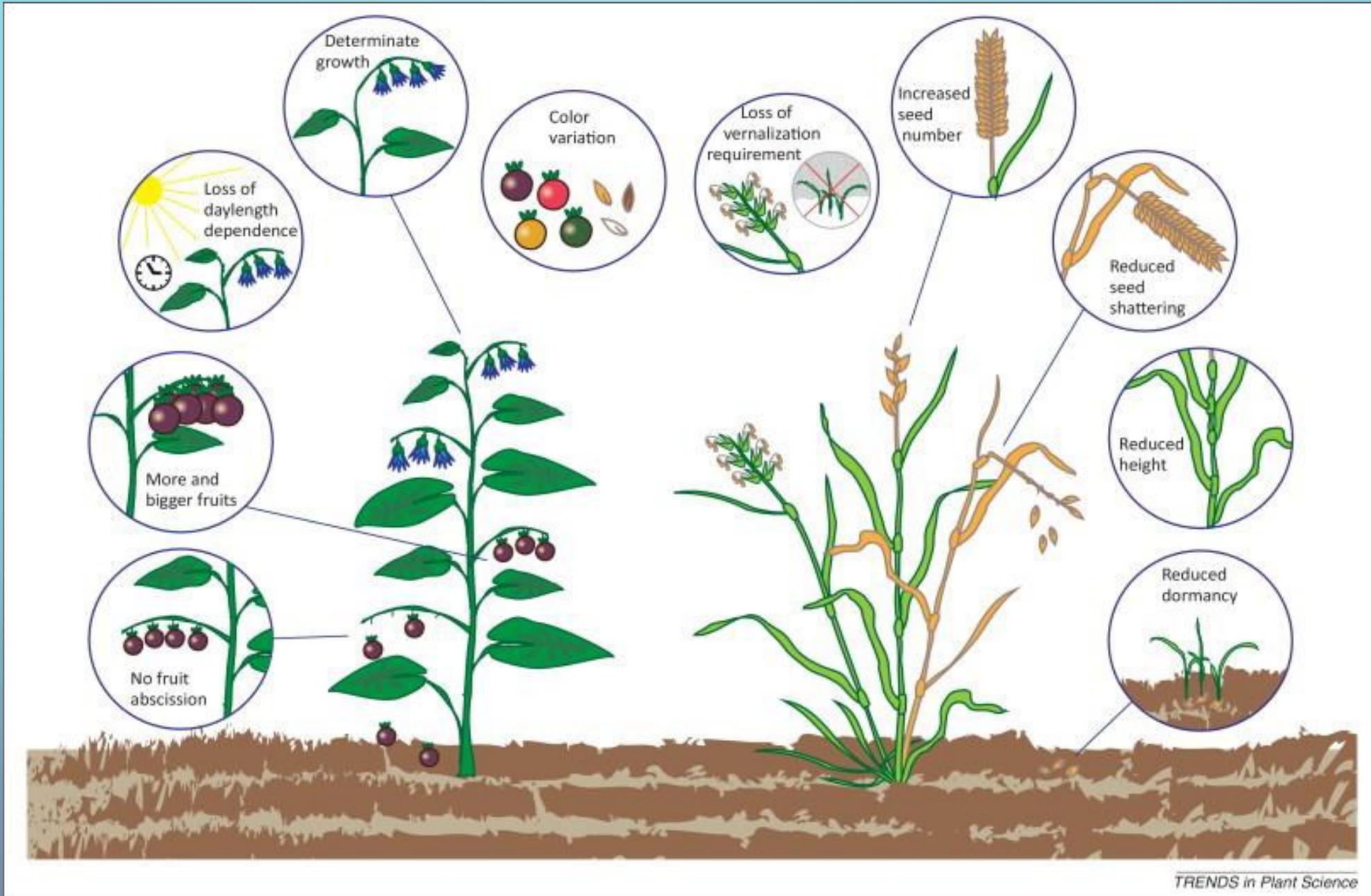
- **La domesticazione** è il processo per cui una specie viene trasferita da una situazione naturale ad una situazione che prevede l'intervento dell'uomo (coltivazione). Sancisce il passaggio dall'uomo raccoglitore all'uomo agricoltore
- Insita nel processo di domesticazione è **la selezione** da parte dell'uomo, che porta a caratteristiche morfologiche, fisiologiche, genetiche ereditabili nelle popolazioni, per renderle più adatte a soddisfare le sue esigenze.
- Questo tipo di **selezione** interessa un insieme di caratteristiche correlate che danno luogo a quella che oggi viene chiamata «**sindrome della domesticazione**»

Evoluzione durante la domesticazione

La domesticazione ha comportato trasformazioni genetiche delle piante che hanno riguardato :

- Perdita e riduzione della disseminazione;
- Perdita o riduzione della dormienza dei semi;
- Cambiamenti delle strutture produttive;
- Incremento della dimensione del seme e del frutto;
- Uniformità nella germinazione;
- Abito di crescita compatto;
- Sincronia dello sviluppo e della maturazione;
- Miglioramento della quantità, appetibilità, valore nutritivo e salubrità dei prodotti.

CARATTERI ALTERATI NEL CORSO DELLA DOMESTICAZIONE DELLE PIANTE



L'incremento della dimensione della spiga del mais

Pannocchie da siti archeologici
nella Valle di
Tehuacan, Mexico



7000 anni fa

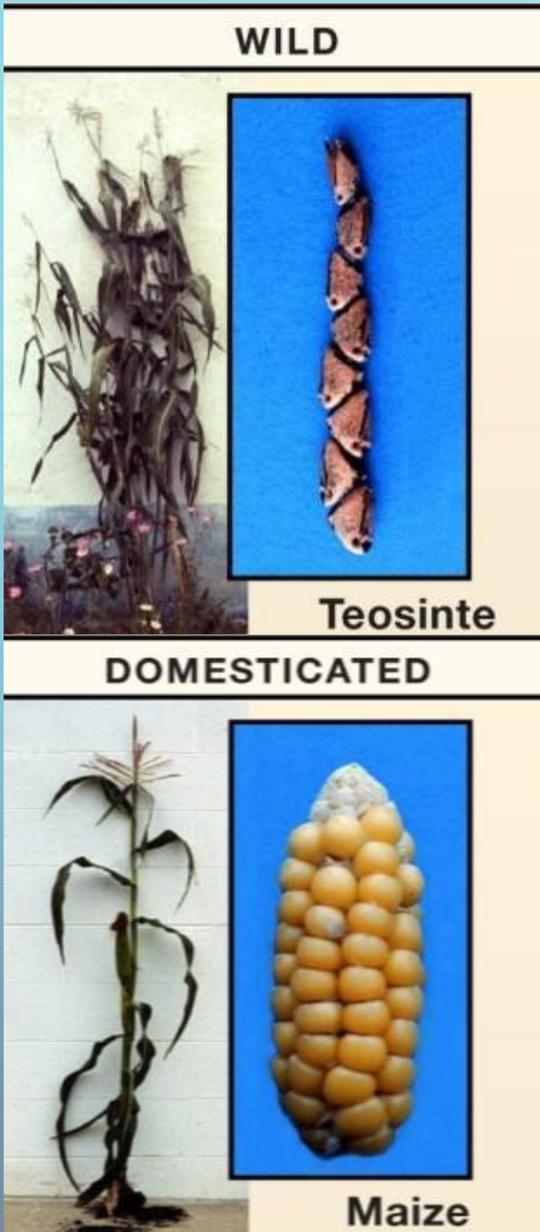


500 anni fa

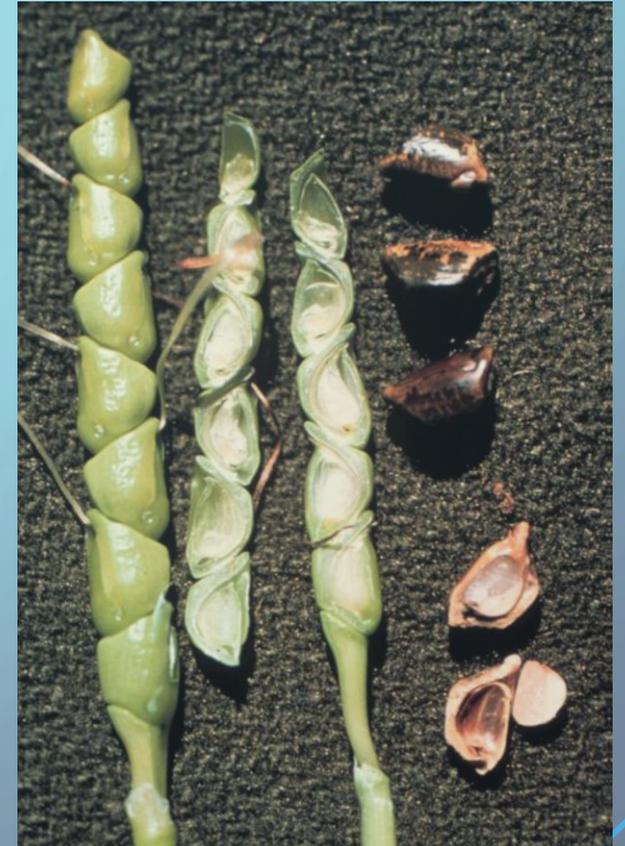


Popolazione di Teosinte, Jalisco (Messico)

L'eliminazione del rivestimento coriaceo intorno alla cariosside



Teosinte, l'ancestrale selvatico del mais ha un rivestimento coriaceo della cariosside. L'uomo ha selezionato contro questo carattere durante la domesticazione del mais.



La riduzione del numero di ramificazioni laterali e incremento della dimensione del seme

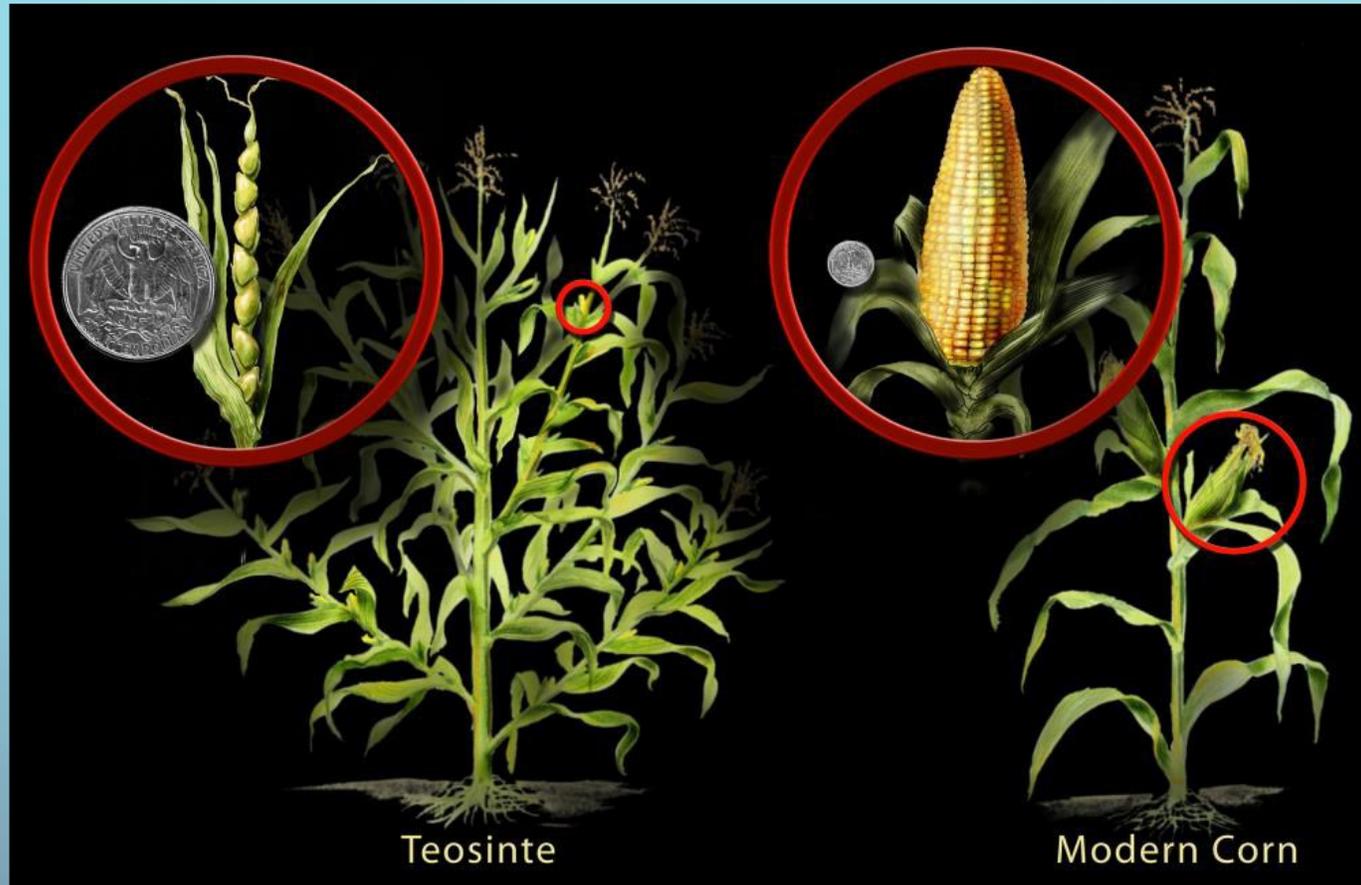
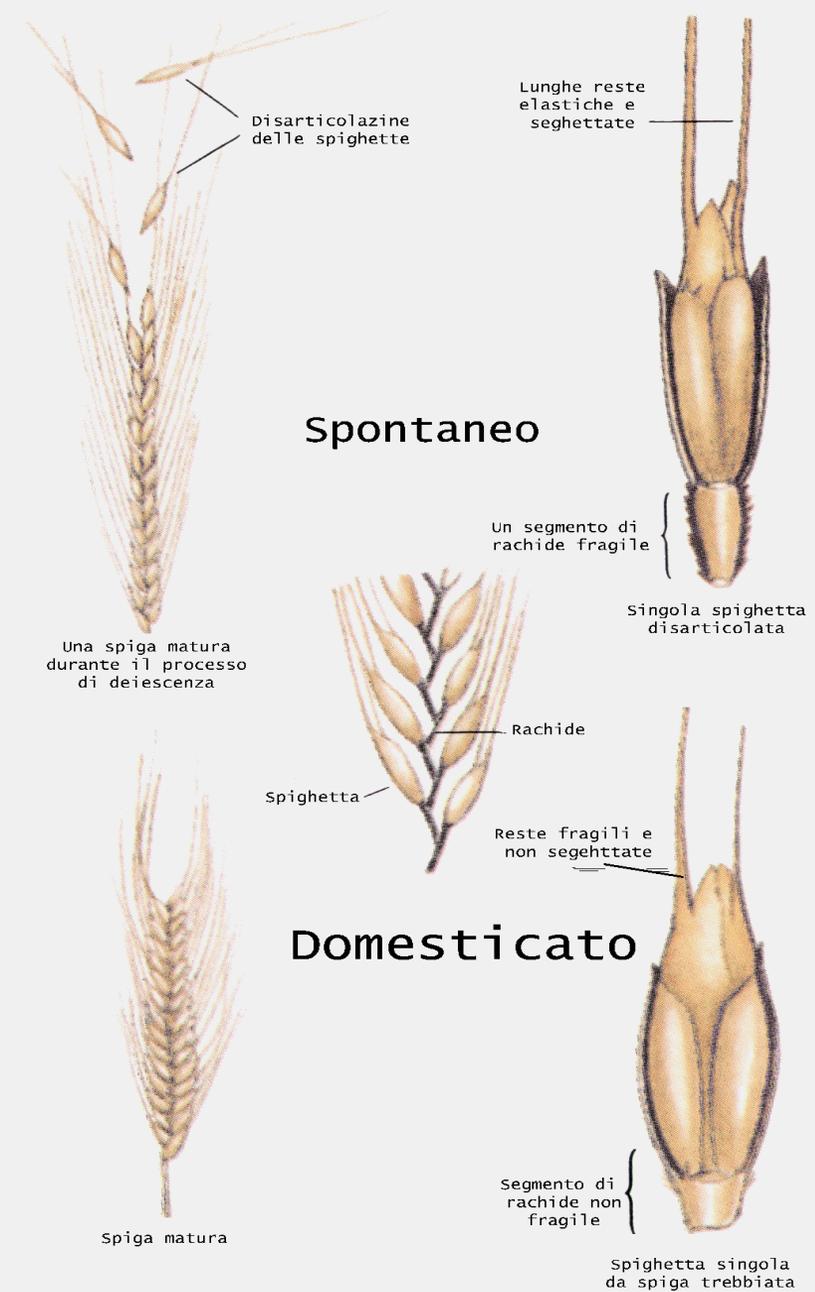


Image credit Nicolle Rager Fuller, National Science Foundation

Dispersione dei semi nel frumento e nelle specie selvatiche

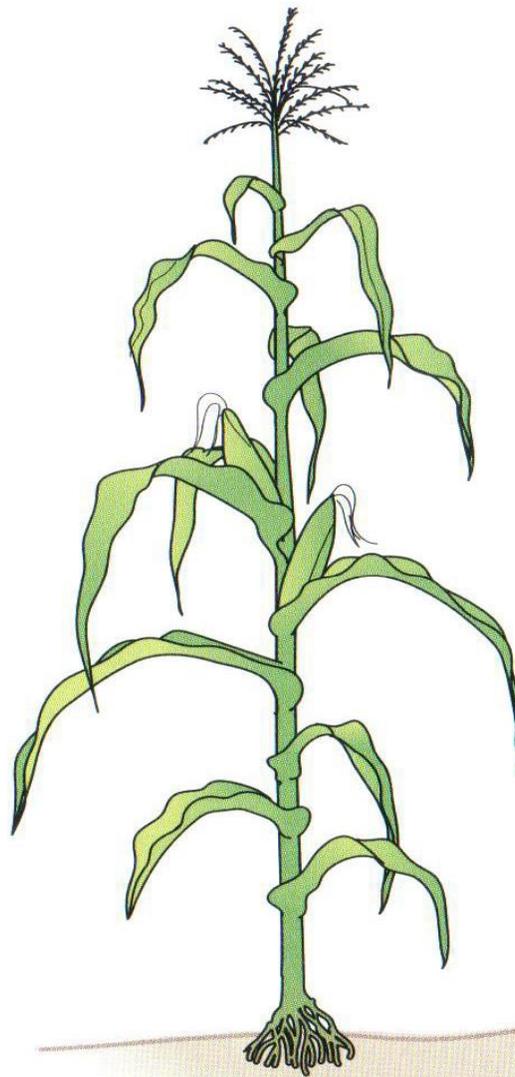




Selvatico

Coltivato

- Habitus di crescita



(a)



(b)



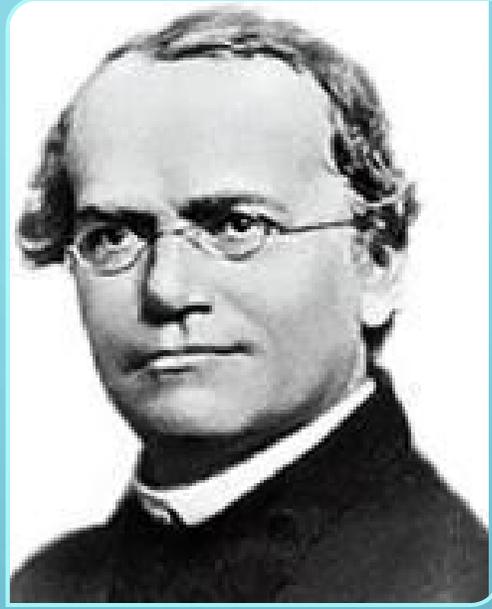
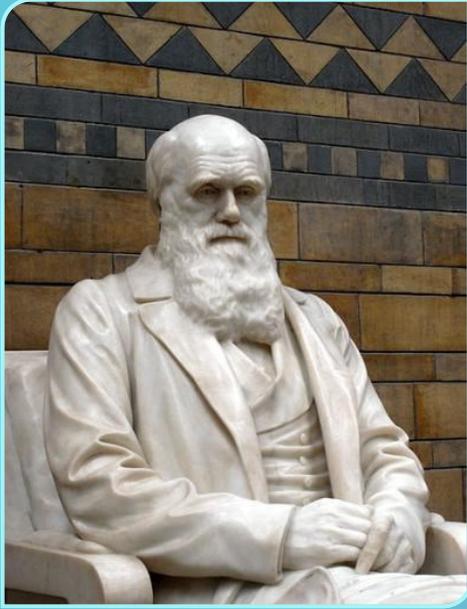
DIMENSIONI DEI FRUTTI E/O DELLE
ALTRE PARTI COMMESTIBILI

Conclusione : La domesticazione come base del miglioramento genetico moderno

Gli agricoltori della preistoria hanno selezionato quei caratteri (alleli) che hanno reso le piante selvatiche coltivabili (domesticate).

I “plant breeders” hanno selezionato ulteriori tratti genetici per produrre le piante coltivate che noi oggi conosciamo e di cui ci nutriamo.

- ❖ Durante le prime fasi dell'agricoltura l'uomo sviluppò quanto è ancora alla base del miglioramento genetico, **la selezione**, l'arte di discernere tra **la variabilità biologica** presente all'interno di una popolazione al fine di individuare le varianti più interessanti.
- ❖ **La selezione implica la presenza di variabilità genetica.**
- ❖ All'inizio del lavoro di selezione, la variabilità utilizzata era di origine naturale e la selezione basata unicamente sull'intuizione e la capacità di giudizio dell'operatore.
- ❖ Il moderno miglioramento genetico sfrutta invece approcci tecnologicamente avanzati per rendere il processo selettivo più preciso ed efficiente (**l'arte si è trasformata in scienza**).



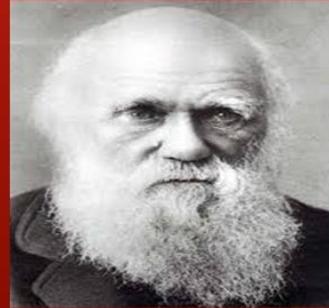
MENDEL E DARWIN PADRI DELLA SCIENZA DEL MIGLIORAMENTO GENETICO

Charles Darwin

Charles Darwin (1809 – 1882) è stato uno scienziato britannico conosciuto in tutto il mondo per aver ideato una teoria sull'evoluzione degli esseri viventi. Formulò questa sua teoria dopo aver fatto un viaggio attorno al mondo che gli ha permesso di scoprire molte informazioni che sono state fondamentali. Pubblicò la sua teoria sull'evoluzione delle specie nel libro *L'origine delle specie* (1859), che è rimasto il suo lavoro più noto.



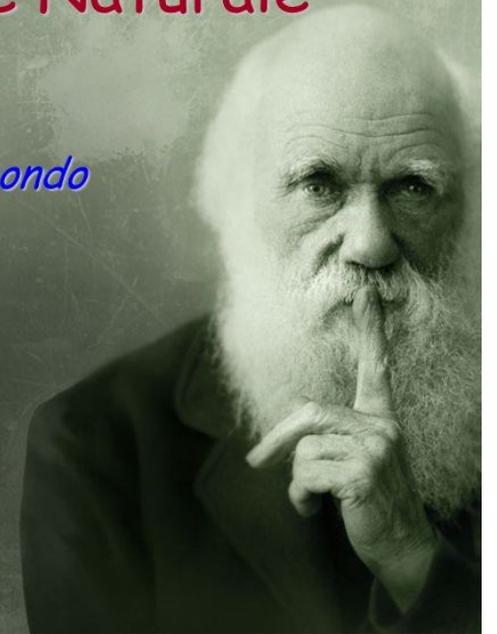
Darwin in età giovanile



Darwin in età avanzata

Charles Darwin e la Selezione Naturale

Un'idea che ha cambiato il mondo

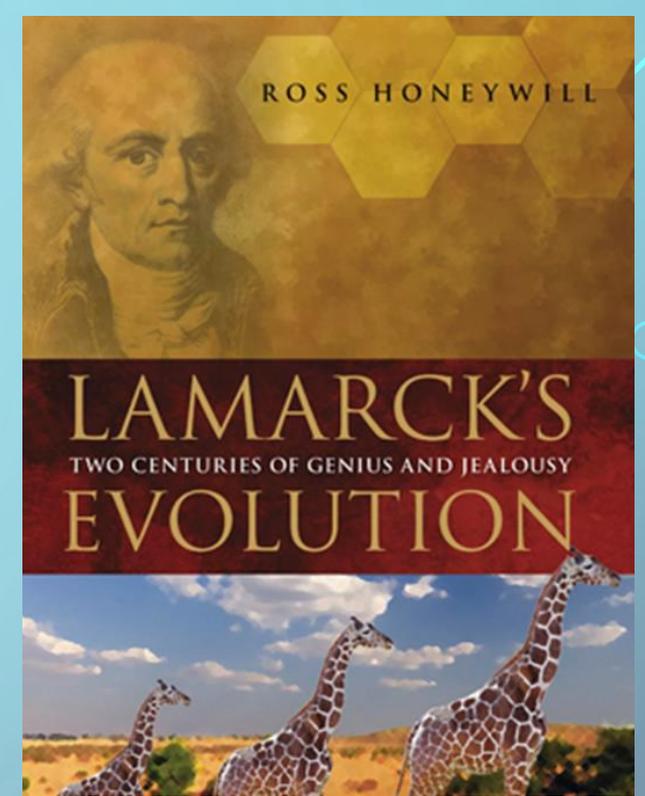
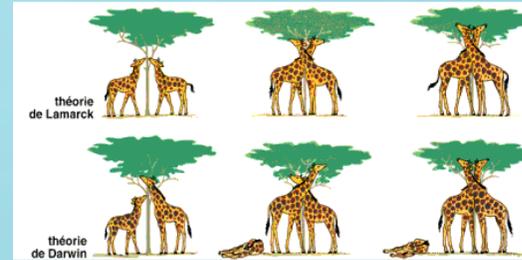


La teoria dell'evoluzione

L'evoluzione è stata spesso definita in due modi:

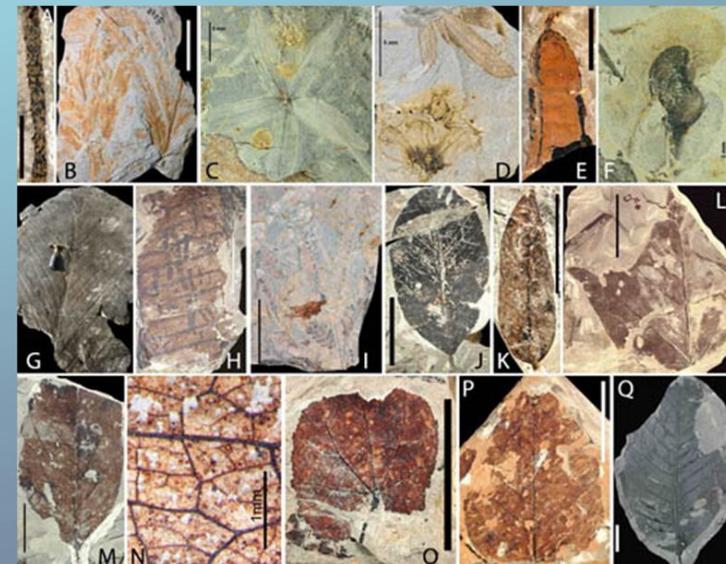
- 1-Cambiamento della frequenza genica.
- 2-Modifiche nella discendenza.

La seconda definizione è associata a Darwin (1809-1882) che concepì la teoria oggi chiamata darwinismo.



Alcuni studiosi, in particolare **Lamarck** (1744-1829), avevano suggerito che gli organismi cambiano nel tempo, un'idea incoraggiata dalla scoperta di numerosi fossili e dalla maggior estensione dell'età della Terra.

Lamarck però credeva nella **ereditarietà dei caratteri acquisiti**.

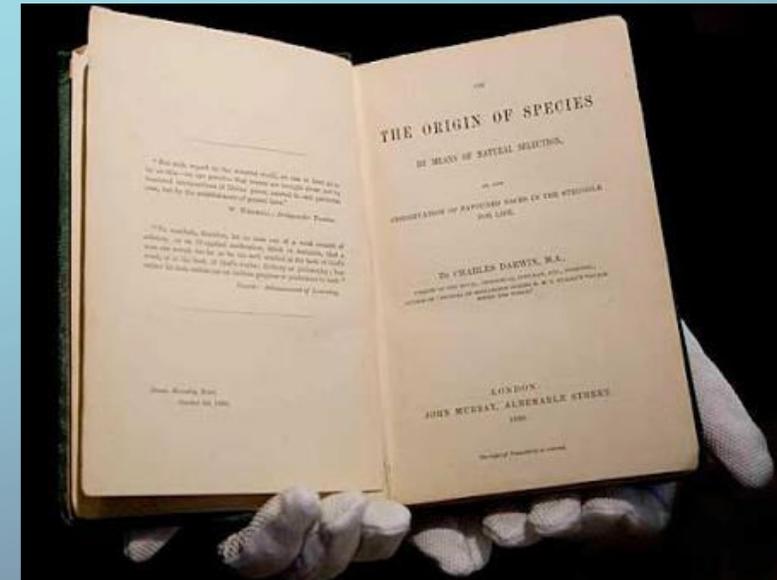


La teoria dell'evoluzione

Fu meglio elaborata da **Charles Robert Darwin** nel celebre libro *On the origin of species by means of natural selection* (1859) a seguito del celebre viaggio in America Latina a bordo della nave *Beagle*.

Come suggerisce il titolo del libro, secondo Darwin,

Come suggerisce il titolo del libro, secondo Darwin, l'evoluzione è il risultato della **selezione naturale** che consiste in un processo passivo per il quale, in una popolazione con **caratteri variabili**, in media sopravvivono e arrivano a riprodursi più frequentemente gli individui che **casualmente** presentano i caratteri più adatti all'ambiente naturale in cui vivono. L'ambiente opera sempre una selezione sugli individui perché le **risorse** necessarie alla vita sono **limitate**.

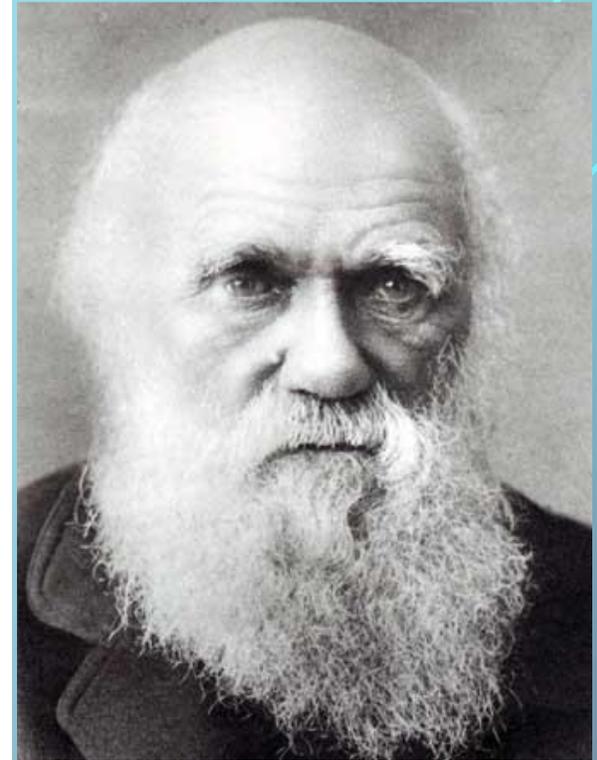
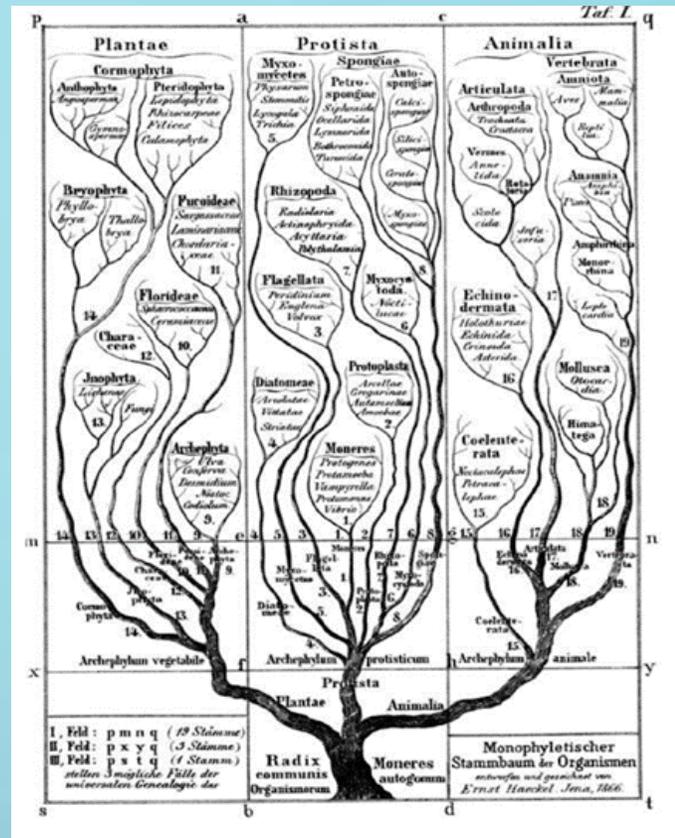


La teoria dell'evoluzione

L'idea darwiniana vede l'evoluzione come un accumulo graduale e selettivo di adattamenti ad una popolazione in un determinato ambiente e contemporaneamente un decremento dei caratteri sfavorevoli

Un ingrediente essenziale dell'evoluzione è la naturale **variabilità** tra individui

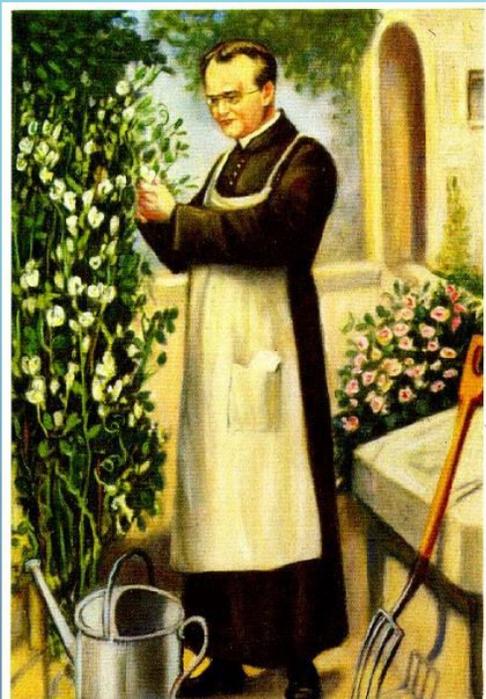
Darwin tuttavia non è riuscito a capire perché gli individui figli assomigliassero ai genitori e come insorgesse la variabilità dei caratteri nelle popolazioni



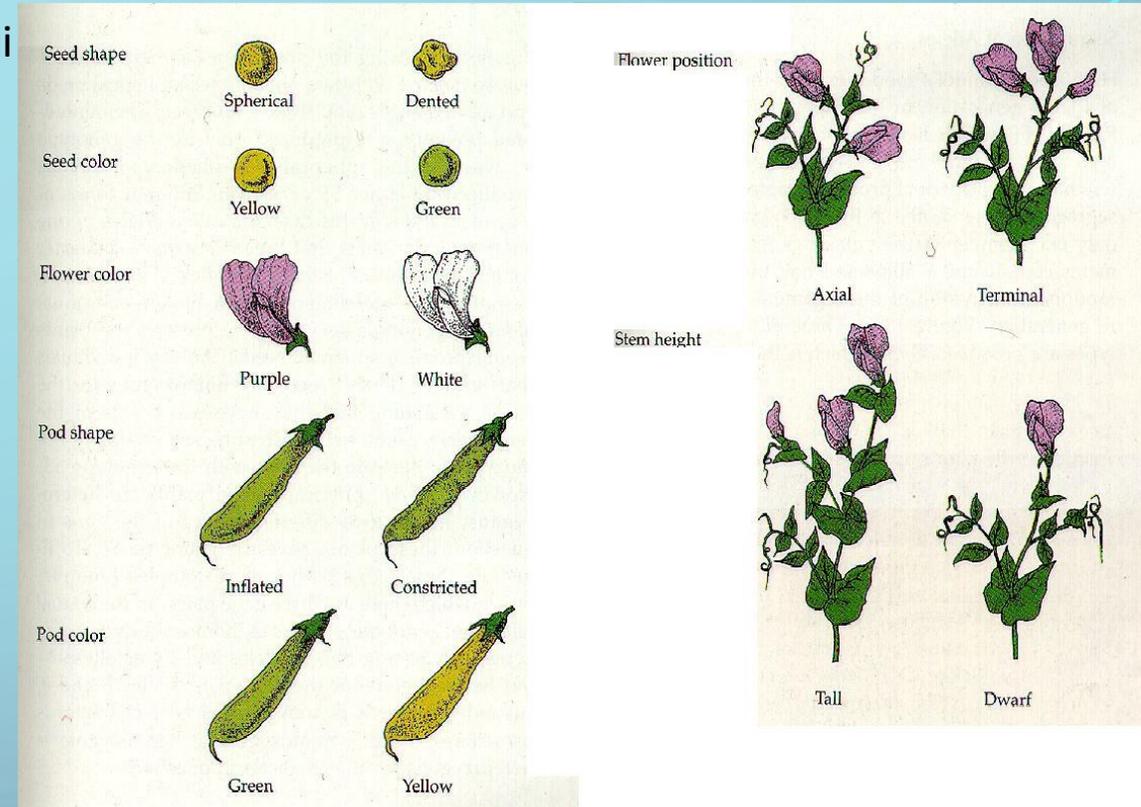
Nella sua massima accezione si può riassumere il Darwinismo nel concetto che «una **variazione ereditabile della fitness conduce alla selezione naturale e all'evoluzione**».

La teoria dell'evoluzione

Poco dopo la pubblicazione di Darwin, un monaco austriaco, **Gregor Mendel** (1822-1884), condusse eleganti esperimenti di ibridazione che dimostravano l'ereditarietà dei caratteri nel pisello comune da giardino. Questi esperimenti non furono apprezzati dagli studiosi fino all'inizio del XX sec., quando formarono le basi della genetica



Gregor Mendel



Mendel intuì che i caratteri venivano ereditati per mezzo di «particelle» separabili e ricombinabili secondo delle regole fisse.

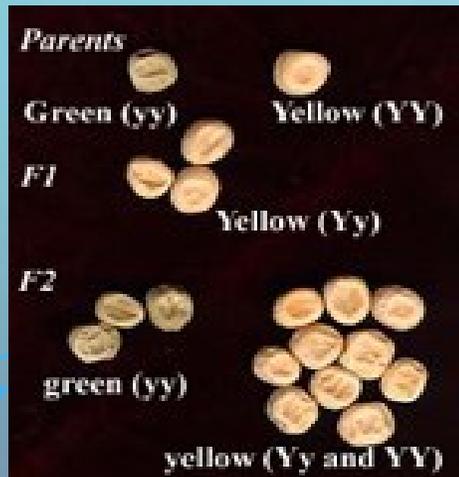
Le scoperte di Mendel furono rielaborate nel '900 quando si scoprì che le particelle altro non erano se non i **geni**.

GREGOR MENDEL (1822-1884)

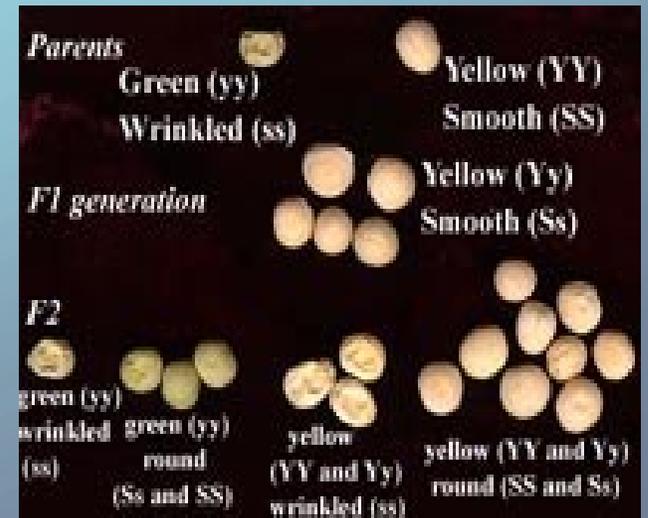


- Il miglioramento genetico delle piante è cambiato drasticamente dalla scoperta delle **leggi dell'eredità** e con lo sviluppo della **Genetica**
- **G. Mendel** fece le prime osservazioni sulla eredità di alcuni caratteri su piante di pisello

Un carattere è dominante e l'altro è recessivo



I geni sono ereditati indipendentemente



Principi genetici

- La **diversità** tra gli individui è alla base della genetica
- La **genetica** studia i meccanismi di trasmissione dei caratteri e come vengono espressi
- La **variabilità** tra gli individui è alla base della **selezione**
- Ciascuna cellula contiene almeno un set di informazione genetica: il **genoma**
- Un organismo **diploide** ha un set di cromosomi di origine materna e uno di origine paterna, e ciò spiega i semi gialli rugosi e verdi lisci negli esperimenti di Mendel

Principi genetici



J. Watson



F. Crick

- Un **cromosoma** è una lunga molecola di DNA a doppia elica
- La struttura a **doppia elica del DNA** fu scoperta da Watson e Crick
- I **geni** sono regioni della molecola di DNA
- Un gene specifica la struttura di una singola **proteina**
- Ciascuna proteina catalizza una reazione biochimica che porta alla formazione di altre molecole biologiche

- Un' altra scoperta genetica: il **sequenziamento del genoma umano**

Craig Venter e Francis Collins



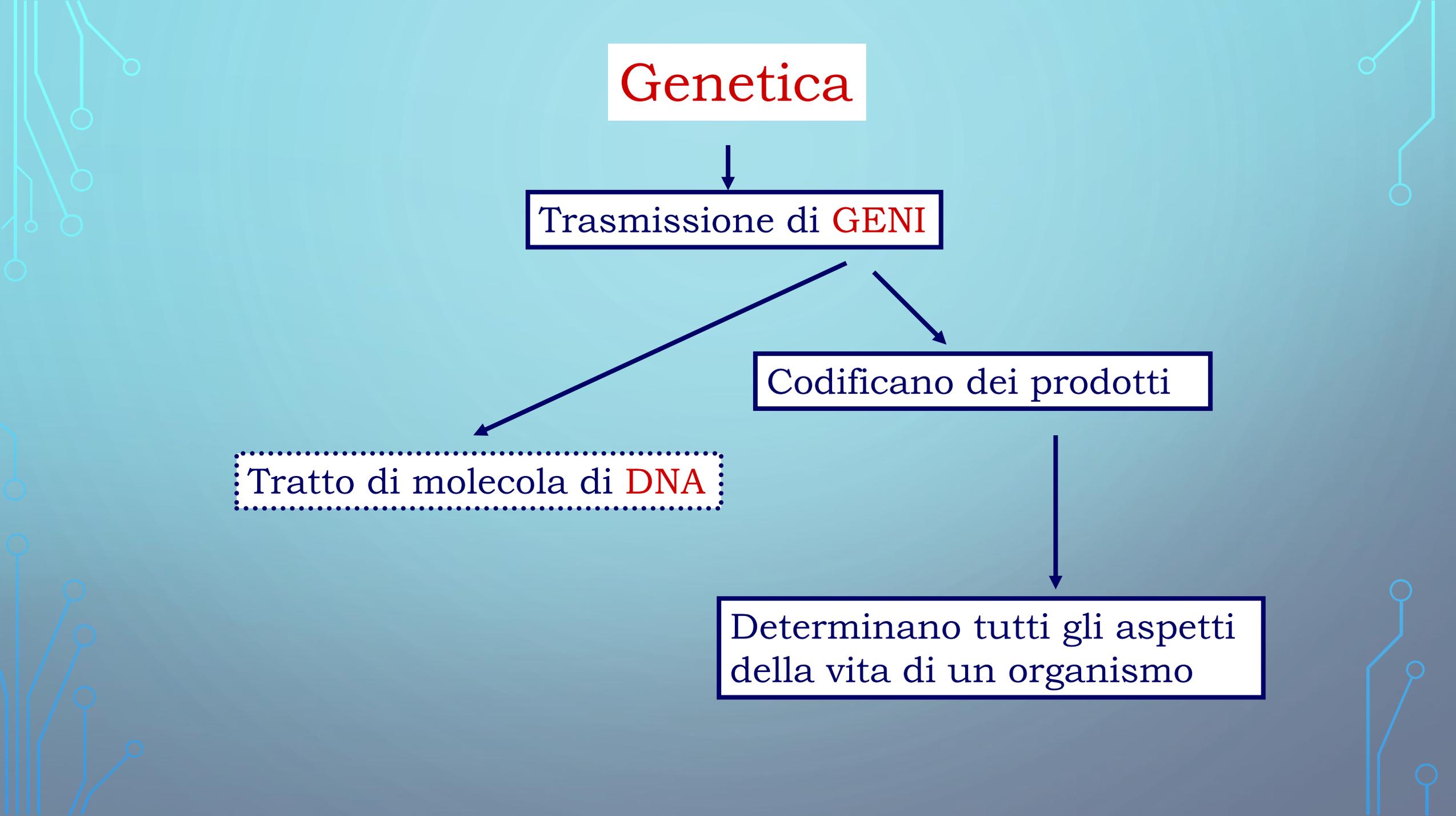
Genetica

Trasmissione di **GENI**

Codificano dei prodotti

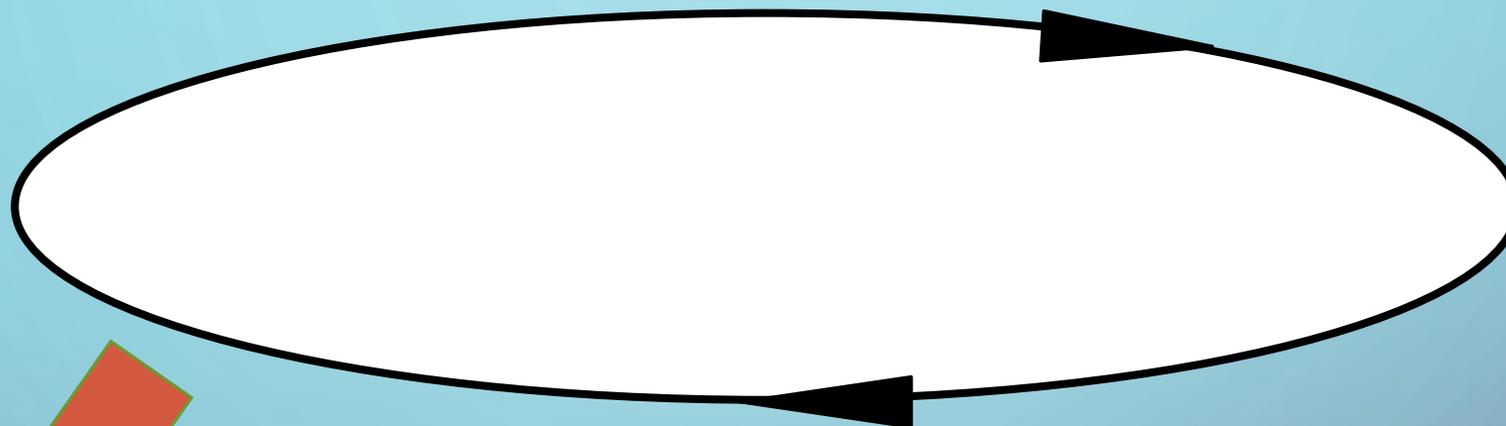
Tratto di molecola di **DNA**

Determinano tutti gli aspetti della vita di un organismo



IL “DOGMA CENTRALE” DEL MIGLIORAMENTO GENETICO

Studio e sfruttamento della variabilità genetica



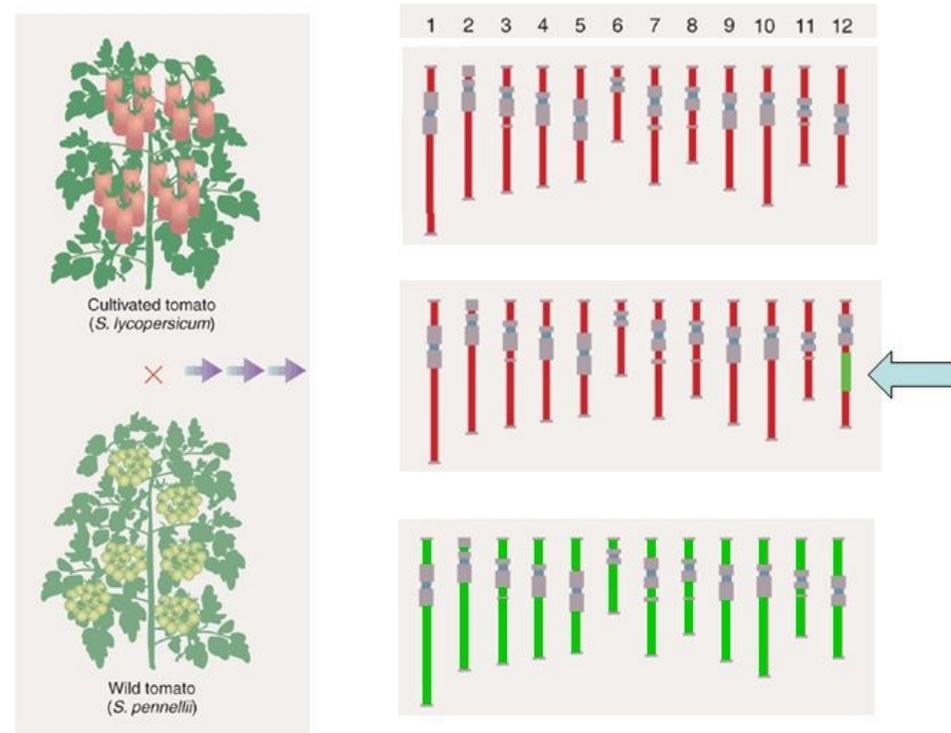
SELEZIONE

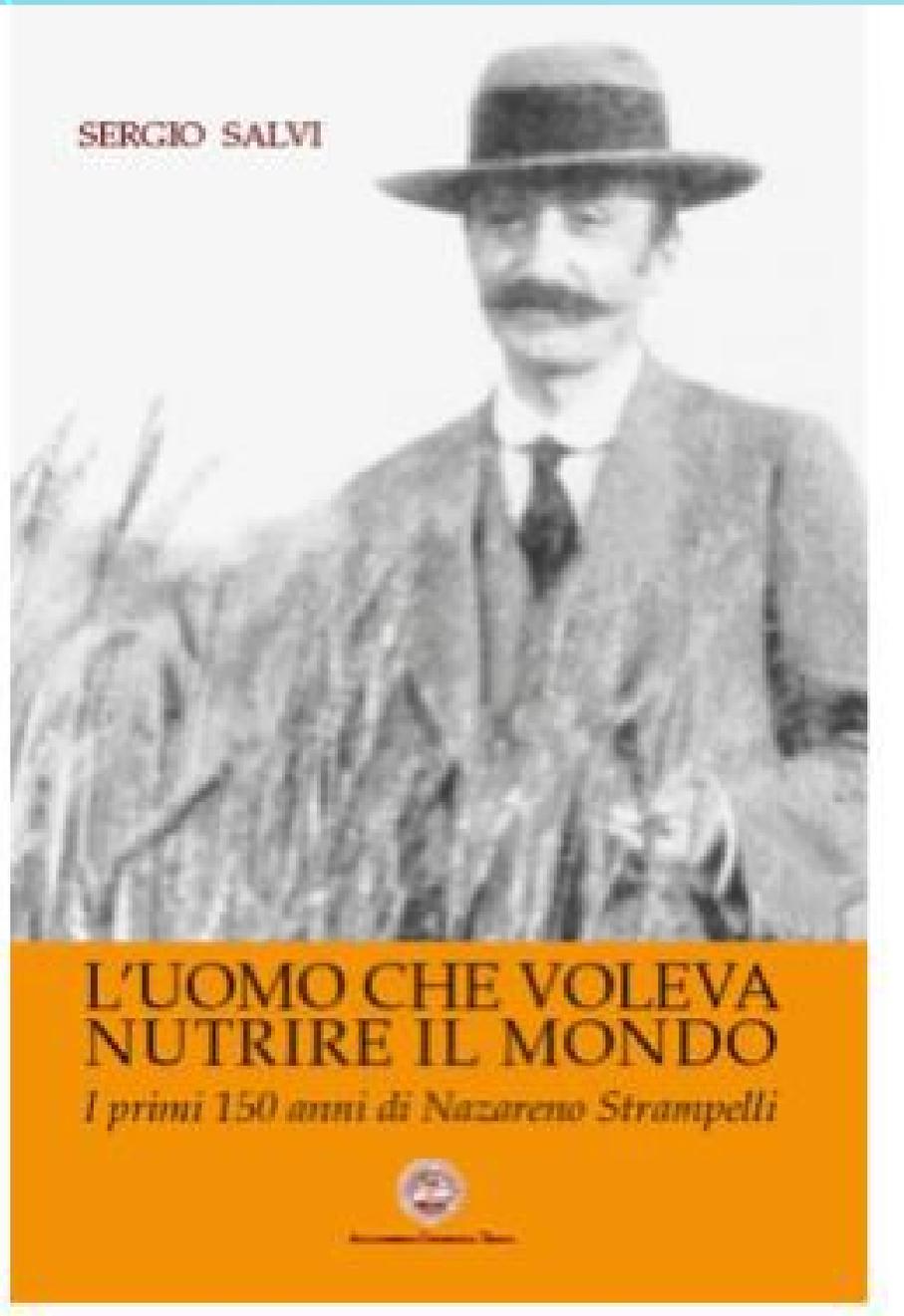


**RILASCIO NUOVE
CULTIVAR**

Miglioramento genetico: Incrocio e Selezione

MIGLIORAMENTO GENETICO E INTROGRESSIONE DI CARATTERI VIA REINCROCIO





Nazareno Strampelli

Nel **1903**, vinse il concorso per la Cattedra ambulante di granicoltura di Rieti, alla quale fu affidato il compito di migliorare la varietà locale di grano *Rieti*.

- Numerose furono le critiche a Strampelli anche da parte dell'Unione produttori grano da seme da lui stesso fondata, la quale allontanò coloro che utilizzavano i grani “modificati” dal genetista.

Ardito (1913): capostipite delle sementi elette

RIETI

varietà italiana resistente alla ruggine

X

WILHELMINA TARWE

varietà olandese molto produttiva

X

AKAKOMUGI

varietà giapponese resistente all'allettamento e precoce



Frumento "Ardito".

I “segreti” delle varietà di Strampelli

Le varietà di maggior successo hanno tre geni, portati da un segmento del cromosoma 2D:

- **Yr16** - conferisce resistenza alla ruggine
- **Rth8** - riduce l'altezza della pianta aumentando così la resistenza all'allettamento
- **Ppd-D1** - conferisce precocità sfuggendo così alla “stretta”

Norman Borlaug, “padre della rivoluzione verde”



Nel secondo dopoguerra, l'americano **Borlaug** introduce nei programmi di ibridazione e miglioramento dei frumenti un'altra serie di geni per bassa taglia, ancora di origine giapponese (“Norin 10” ed altri).

- Le varietà a taglia bassa che ne derivano sono **ad un tempo resistenti all'allettamento e alle ruggini.**

Sviluppo di varietà di frumenti altamente produttivi e resistenti all'allettamento
«*High Yielding varieties*»

Premio Nobel per la Pace 1970
Norman Borlaug **1914-2009**



La rivoluzione verde

Agricoltura ad alta resa con elevato input di sostanze chimiche
Alta resa: migliore assorbimento dei nutrienti, maggior biomassa

Rapida maturazione: nel riso dalla semina alla raccolta in 125 giorni
contro i 210 previsti (in Asia due cicli)

Habitus di crescita: semi-nano (90 cm contro i 120 del frumento)
Giappone, Filippine, USA

Riso: varietà Japonica e Indica
Oryza sativa L. ssp. *japonica*





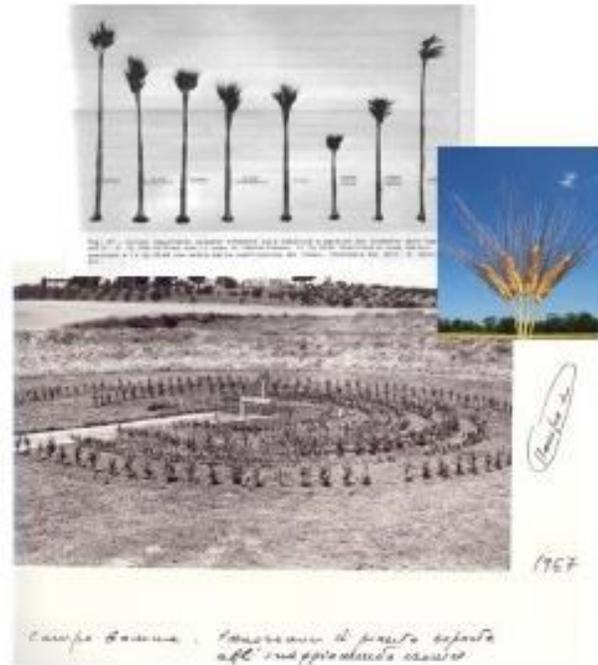
IL VIGORE IBRIDO

LA MUTAGENESI INDOTTA (1960)

- Mutageni chimici
- Mutageni fisici (radiazioni)
- Generano mutazioni casuali
- Si seleziona il fenotipo desiderato fra le piante mutagenizzate

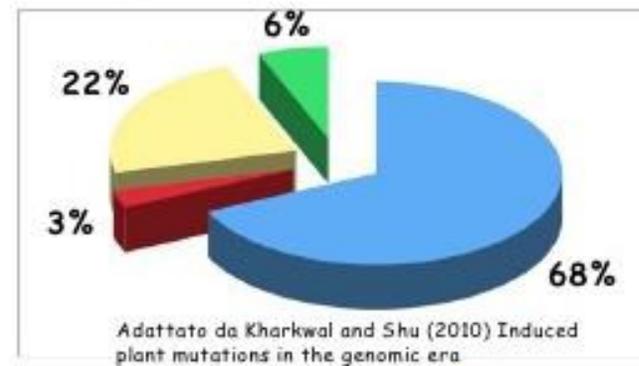


Frumento ottenuto mediante irraggiamento: il CRESO (1974)



> 3000 varietà ottenute mediante mutagenesi

- Alimentazione umana
- Industriale
- Fiori/piante ornamentali
- Alimentazione animale



ENEA

Agenzia nazionale per le nuove tecnologie, l'energia e lo sviluppo economico sostenibile

Fascination of Plants Day
18 Maggio 2012

I FONDAMENTI DEL PROGRESSO PRODUTTIVO

- La selezione genetica presuppone l'esistenza e disponibilità di variabilità genetica, o "biodiversità", di opportuna qualità.
- I fenotipi (genotipi) più idonei vengono scelti "selezionati" per la riproduzione.
- Nel passato, tale selezione era esercitata da parte **degli agricoltori**.
- Successivamente, è stata praticata da parte di figure più specializzate, **i genetisti agrari**, che dopo tentativi ripetuti e più o meno laboriosi, giungono a costituire nuove forme "**varietà**" migliorate, coltivate con più successo dagli agricoltori.



GLI ORGANISMI
SONO LA
CONSEGUENZA
DELLE
INTERAZIONI
TRA GENI E
AMBIENTE

Gli individui ereditano i geni e non i prodotti finali del loro sviluppo

Il genotipo è il corredo di geni di un individuo, carattere che rimane costante nell'arco della vita

Il fenotipo è dato dalle caratteristiche esteriori dell'organismo (insieme di aspetti morfologici, fisiologici, comportamentali) e cambia nell'arco della vita

Obiettivi generali

- Approvvigionamento di cibo a livello mondiale
- Ridurre l'impatto dell'agricoltura stessa sulla salute umana e sull'ambiente (es. attraverso la costituzione di varietà adatte a bassi input)
- Adattare l'agricoltura ai cambiamenti climatici in atto (es. alterando la fenologia)
- Valorizzare l'agricoltura locale
- Altro (biorimediazione, bioenergie)
- il M.G. soddisfa anche esigenze particolari di agricoltori, industria agraria, consumatori (produttività, adattabilità, qualità, facilità di meccanizzazione, etc.)



IL MIGLIORATORE DI PIANTE AGRARIE (*PLANT BREEDER*)

- Deve possedere adeguate conoscenze di genetica e deve possedere conoscenze in svariate discipline quali:

- Botanica

Patologia Vegetale

- Fisiologia

Entomologia

- Biochimica Vegetale

-

Agronomia

- Metodologia Sperimentale

- Trasformazione dei prodotti e statistica

Economia



Il miglioratore di piante agrarie (*plant breeder*)

Il miglioratore di piante non può essere soltanto genetista, come alcuni vorrebbero; egli deve possedere conoscenze "agronomiche" in settori molto vasti e cioè:

- ✓ **botanica**, per le nozioni di tassonomia, morfologia, biologia fiorale e riproduzione delle piante che sono necessarie per tutto il suo lavoro, ma in particolare per le prime fasi;
- ✓ **fisiologia**, perché la produttività e l'adattamento delle popolazioni sono legati alla risposta delle piante alle condizioni ambientali;
- ✓ **biochimica vegetale**, perché i processi enzimatici che sono preposti alle sintesi vegetali sono controllati geneticamente e possono essere indirizzati verso particolari obiettivi;
- ✓ **metodologia sperimentale e statistica**, per poter valutare razionalmente i materiali oggetto di miglioramento;
- ✓ **patologia vegetale ed entomologia agraria**, perché il miglioramento per la resistenza è un fine importante per il miglioramento;
- ✓ **agronomia**, per poter esaminare in pieno campo le popolazioni disponibili e formulare obiettivi e programmi di lavoro basati sulle tecniche colturali attuali e possibili;
- ✓ **tecniche di trasformazione dei prodotti**, perché l'agricoltura produce sempre più per l'industria ed è necessario conoscere il tipo di prodotto che meglio può soddisfare le sue esigenze;
- ✓ **economia**, perché è necessario conoscere le leggi e le tendenze del mercato per poter andare incontro a quelle che saranno le scelte dei consumatori nel medio e lungo periodo.

FASI DEL MIGLIORAMENTO GENETICO

- 1) Introduzione di specie coltivabili in una regione
- 2) Selezione all'interno delle varietà locali -> omogeneità genetica (svantaggiosa sul lungo termine, es. suscettibilità a malattie)
- 3) Incroci intra- ed interspecifici per creare variabilità e selezionare nuovi genotipi

Concetto di ideotipo

Modello di pianta che il costitutore ha in mente e si prefigge di ottenere quando inizia ad attuare il suo programma di miglioramento

- Diagnosi del problema: che caratteri si vuole migliorare?
- Ricerca delle soluzioni: approccio agronomico o genetico?
- Approfondimento analitico dell'ideotipo nell'ambito della specie su cui si intende lavorare (variabilità disponibile, etc.)
- Non esiste un ideotipo per tutti, specialmente per ciò che concerne l'adattabilità all'ambiente!
- L'ideotipo è un concetto dinamico, soprattutto per specie ortive

Miglioramento genetico delle colture agrarie

SELEZIONE BASATA SUL FENOTIPO:

- Si seleziona sulla base della variabilità osservata a livello fenotipico.
- Agisce sul fenotipo *in toto*.



SELEZIONE BASATA SUL GENOTIPO:

Si seleziona tramite il profilo molecolare (DNA) a loci associati ai geni preposti al controllo dei caratteri di interesse agronomico.

Agisce su regioni precise del genoma



Le Biotecnologie:

Sono tutte quelle tecnologie che utilizzano organismi viventi, (quali batteri, lieviti, cellule vegetali, cellule animali di organismi semplici o complessi) o loro componenti subcellulari purificati (organelli ed enzimi) allo scopo di ottenere quantità commerciali di prodotti utili all'uomo, oppure per migliorare le caratteristiche di piante ed animali o per sviluppare microrganismi utili per usi specifici.

Molte persone pensano che le biotecnologie sono nate solo negli ultimi tempi, ma in realtà esistono da migliaia di anni...

Le biotecnologie in campo vegetale

Complesso di mezzi adatti a superare le barriere che s'incontrano quando si opera la selezione con strumenti tradizionali

Incompatibilità sessuale

tra individui della stessa specie o si specie diverse, che limita la variabilità a disposizione per il lavoro di selezione

Il cambiamento

cui sono soggette le combinazioni genetiche nel corso delle prime riproduzioni dei processi di moltiplicazione (instabilità genetica)

Durata della selezione

imposta dal tipo di propagazione, dalla lunghezza del ciclo generazionale e dagli strumenti a disposizione per effettuare la selezione

Campi di applicazione delle biotecnologie

INDUSTRIA CHIMICA sintesi delle sostanze aromatiche, degli esaltatori del gusto e delle materie plastiche

INDUSTRIA ALIMENTARE produzione in larga scala di lieviti, alghe e batteri finalizzata alla sintesi di proteine, amminoacidi e vitamine

INDUSTRIA FARMACEUTICA sintesi di vaccini, ormoni, interferoni ed antibiotici

<u>AGRICOLTURA</u> miglioramento della qualità	⇒	valore nutritivo maggiore
riduzione impatto ambientale	⇒	eco-compatibile
maggiore produttività	⇒	riduzione dei costi

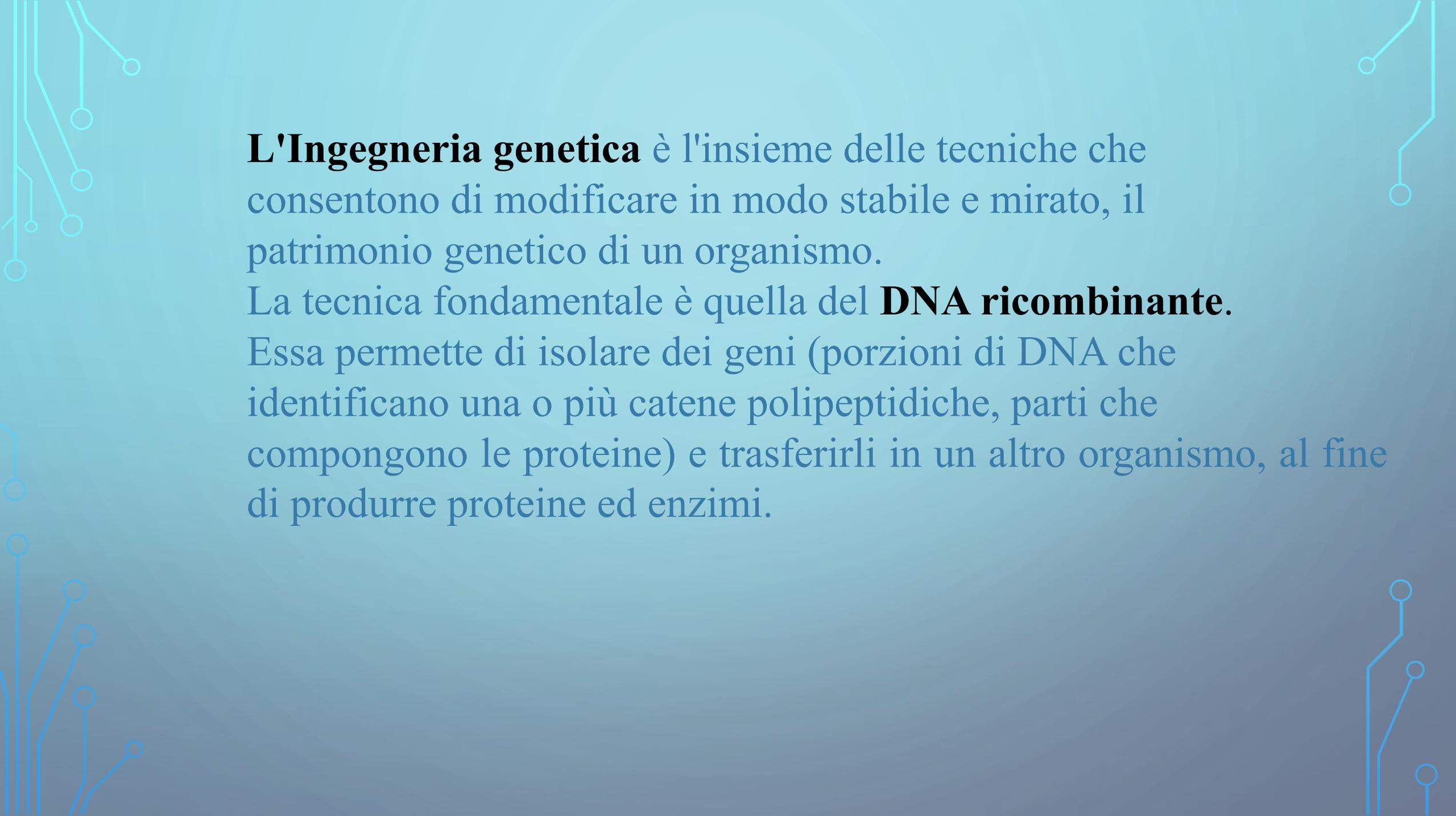
Infatti le biotecnologie si possono dividere in due tipi:

Tradizionali:

- La scoperta degli antibiotici
- L'uso dei vaccini
- I microrganismi delle fermentazioni

Innovative:

- tramite l'ingegneria genetica e l'uso della tecnologia del DNA ricombinante

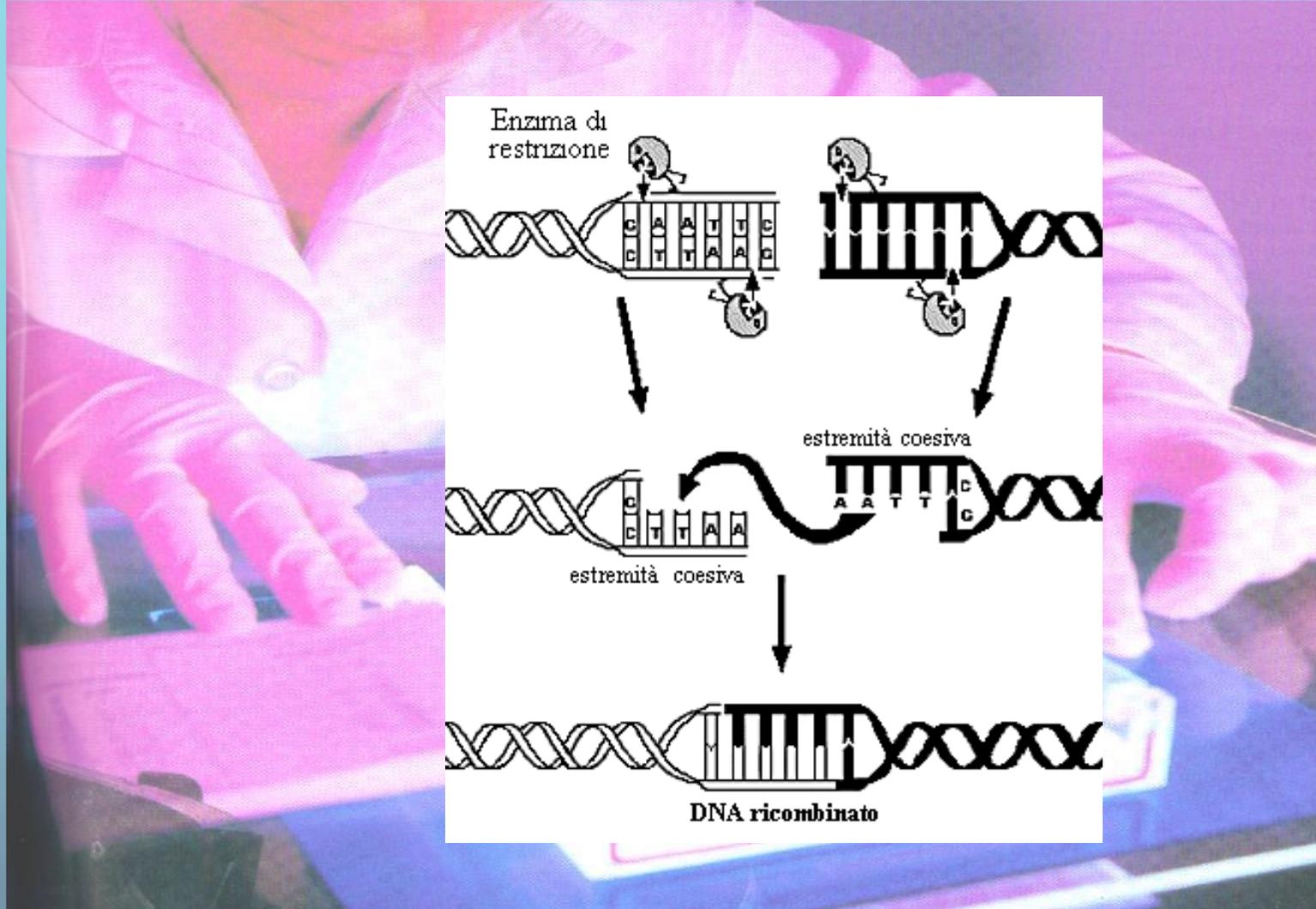


L'Ingegneria genetica è l'insieme delle tecniche che consentono di modificare in modo stabile e mirato, il patrimonio genetico di un organismo.

La tecnica fondamentale è quella del **DNA ricombinante**.

Essa permette di isolare dei geni (porzioni di DNA che identificano una o più catene polipeptidiche, parti che compongono le proteine) e trasferirli in un altro organismo, al fine di produrre proteine ed enzimi.

La scoperta degli Enzimi di Restrizione (1970) Nobel a Arber, Smith e Nathans (1978)



Le biotecnologie trovano applicazione in molteplici settori:

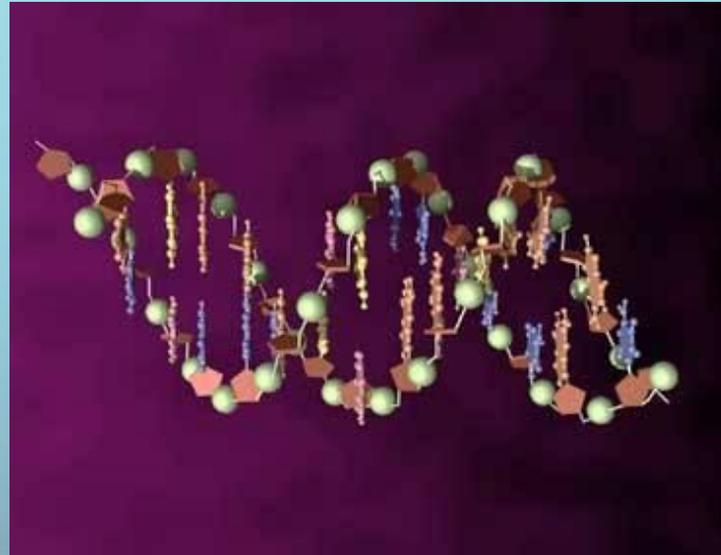
- 1) **Campo medico** (anticorpi monoclonali, cellule staminali, vaccini, terapia genica)
- 2) **Campo animale** (animali transgenici)
- 3) **Campo vegetale** (piante transgeniche)
- 4) **Campo ambientale** (detossificazione di sostanze inquinanti)

Esempi di proteine farmaceutiche prodotte in Micro-organismi Geneticamente Modificati

Proteina Eterologa	Micro-organismo Geneticamente Modificato	Utilizzo
Insulina umana	Batterio	Trattamento del diabete
Ormone della crescita	Batterio	Trattamento del nanismo
Interferone alfa	Batterio	Trattamento di infezioni virali e cancro
Vaccino per l'epatite B	Lievito	Prevenzione dell'epatite B

le biotecnologie vegetali

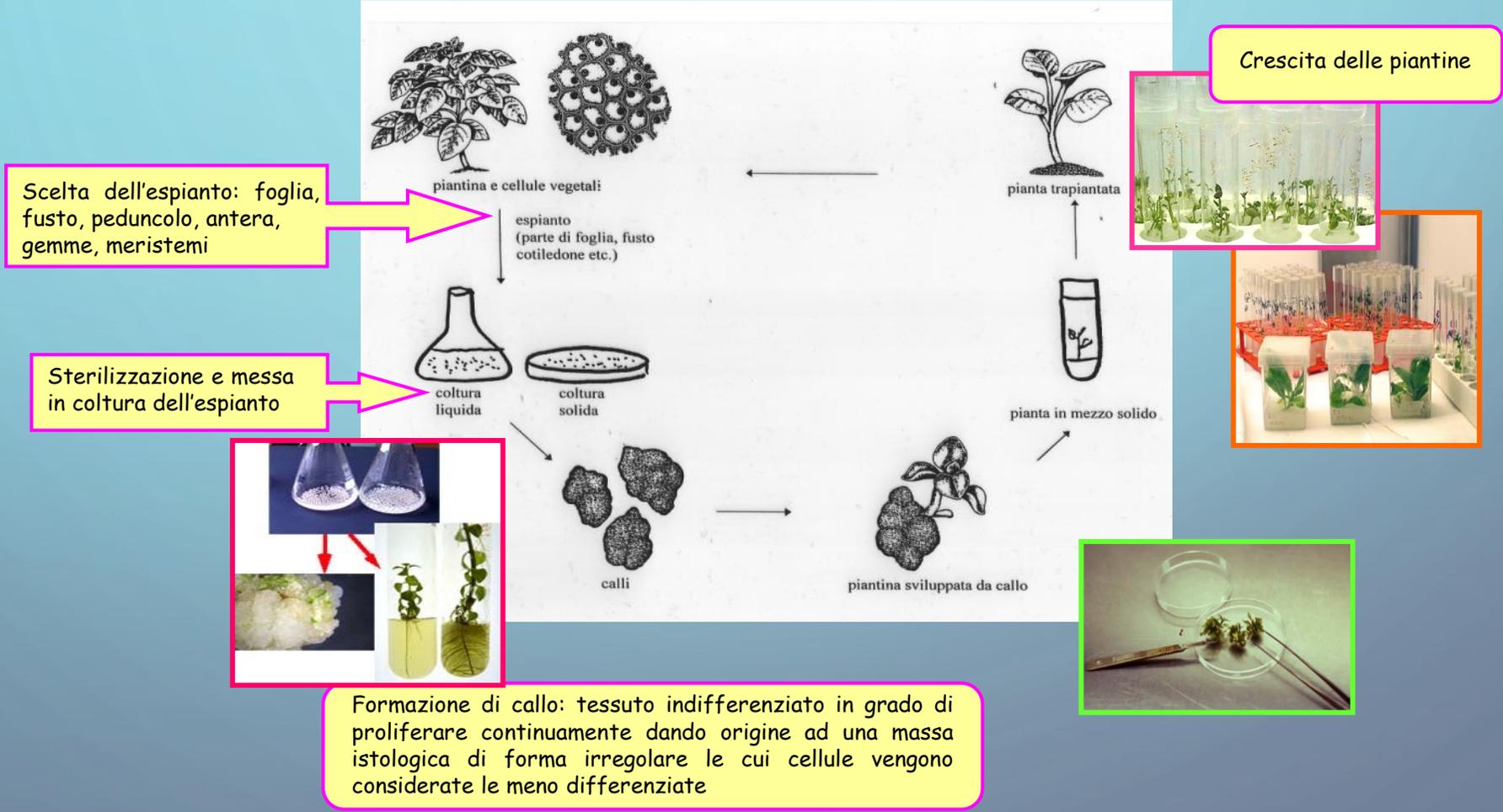
A fondamento del miglioramento genetico sta la manipolazione della variabilità genetica esistente **IN NATURA** e di quella nuova che viene creata **ARTIFICIALMENTE** dall'uomo



miglioramento genetico e biotecnologie
stessi scopi

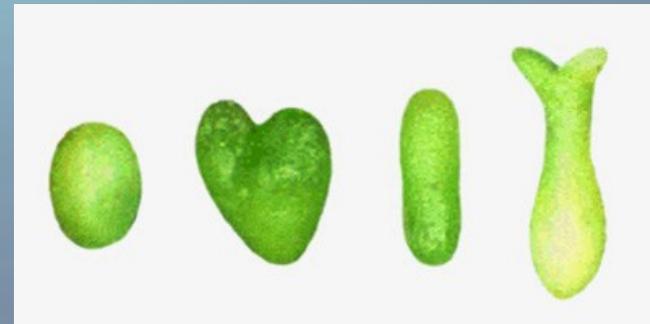
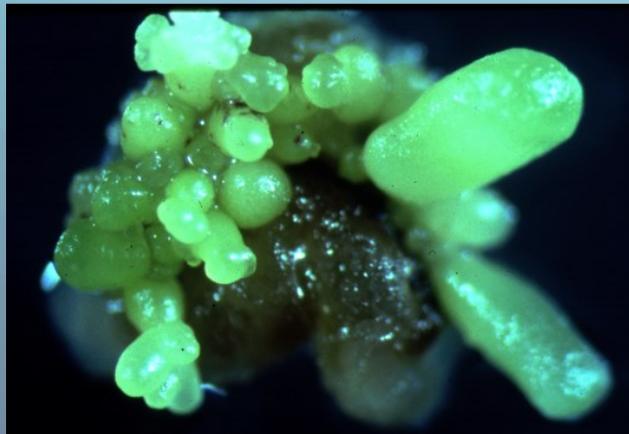
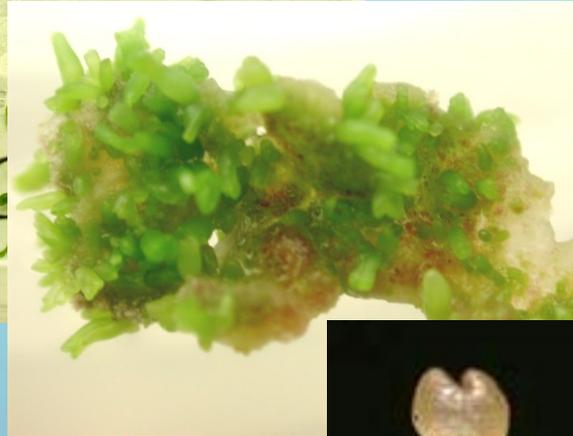
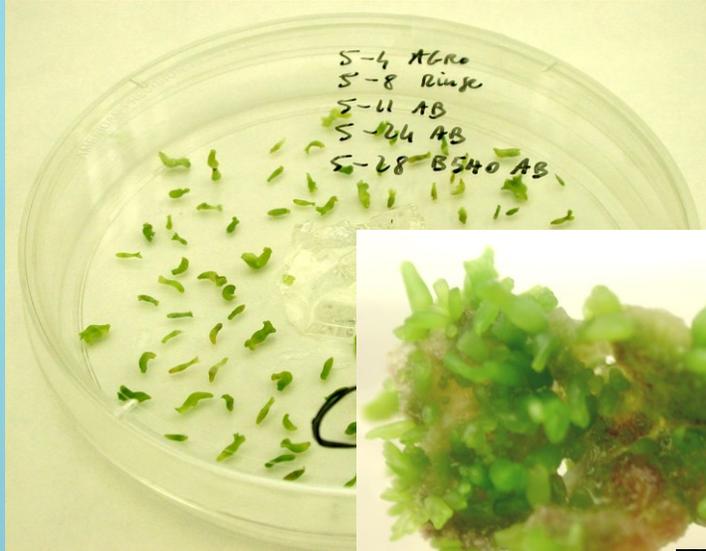
Coltura *in vitro* (1940)

Tutte quelle tecniche e metodologie che consentono di coltivare e rigenerare delle piantine da porzioni vegetali (organi, tessuti, cellule, protoplasti), posti su opportuni mezzi nutritivi in condizione di sterilità e in ambiente controllato



COLTURE IN VITRO

Totipotenza delle cellule vegetali



Colture cellulari

Le cellule vegetali possono essere allevate in vitro, ossia in un ambiente asettico, in cui le condizioni chimico-fisiche sono sotto controllo del ricercatore



Cellule vegetali allevate in mezzo liquido

Le colture cellulari possono essere impiegate:

- per scopi applicativi
(produzione di metaboliti)
- nella ricerca di base
(studio della biologia cellulare)

Colture cellulari



Propagazione clonale: moltiplicazione di germogli



Trattamento
Con citochinine



Pianta

Messa a dimora



Plantula



Miglioramento genetico Biotecnologico del Melone

- Coltura *in vitro***
 - 1. Rigenerazione
 - 2. Partenogenesi e Ginogenesi
 - 3. Ingegneria genetica
- Partenogenesi *in situ***

Plant Cell, Tissue and Organ Culture 40: 293-295, 1995.
© 1995 Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.

Research note

Genotype and medium affect shoot regeneration of melon

N. Ficcadenti¹ & G.L. Rotino²
¹Istituto Sperimentale per l'Orticoltura, Via Benedetto Croce no 47, 63100 Ascoli Piceno, Italy; ²Istituto Sperimentale per l'Orticoltura, Via Paullese no 28, 20075 Montanaso Lombardo (Milano), Italy

J. Genet. & Breed. 49: 359-364 (1995)

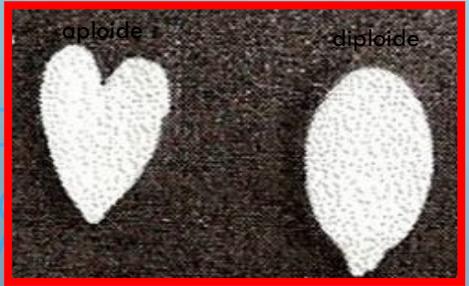
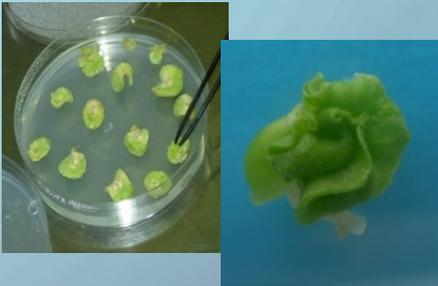
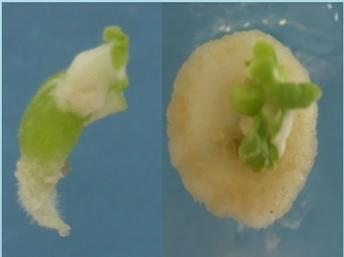
Influence of genotype on the induction of haploidy in *Cucumis melo* L. by using irradiated pollen

N. Ficcadenti^{1*}, P. Veronese², S. Sestili¹, P. Crinò², S. Lucretti², M. Schiavi¹ and F. Saccardo³

J. Genet. & Breed. 53: 255-257 (1999)

In vitro gynogenesis to induce haploid plants in melon *Cucumis melo* L.

N. Ficcadenti*, S. Sestili, S. Annibali, M. Di Marco and M. Schiavi
Research Institute for Vegetable Crops, Section of Ascoli Piceno Via Salaria 1, 63030, Monsampolo del Tronto, Italy. Fax no. +39 (735) 703684.



Plant Cell Tiss Organ Cult
DOI 10.1007/s11240-015-0875-3

CrossMark

ORIGINAL ARTICLE

In vitro plant regeneration from cotyledonary explants of *Cucumis melo* L. var. *cantalupensis* and genetic stability evaluation using RAPD analysis

Maria Silvia Sebastiani¹ · Nadia Ficcadenti¹

Received: 5 March 2015 / Accepted: 22 September 2015
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2015

Ginogenesi

Poster Abstract - F.42

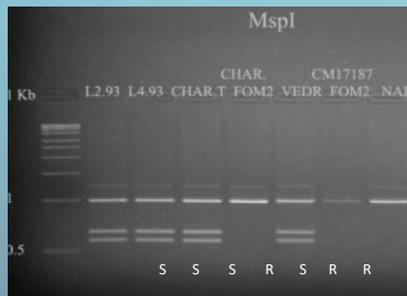
GENETIC CONTROL OF RESISTANCE TO RACE 1,2W OF *FUSARIUM OXYSPORUM* F. SP. *MELONIS* IN MELON (*CUCUMIS MELO* L.)

S. SESTILI*, L. NANNI**, A. MINOLLINI*, M. LUCIANI*, G. CAMPANELLI*, A. BELISARIO***, N. FICCADENTII*, R. PAPA**

Sviluppo di ibridi F1 e linee di melone resistenti alle razze 0, 1, e 1,2 di FOM
Inoculazioni artificiali *in vivo*



Impiego di marcatori molecolari associati alla resistenza alla razza 1 di FOM



Poster Abstract - C.25

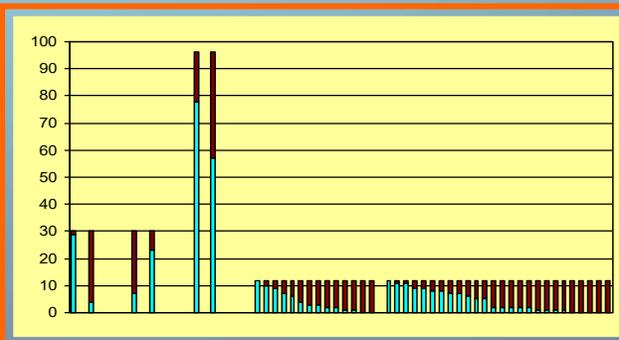
DEVELOPMENT OF MOLECULAR MARKERS LINKED TO THE RESISTANCE TOWARDS *FUSARIUM OXYSPORUM* F. SP. *MELONIS* RACE 1,2W IN MELON

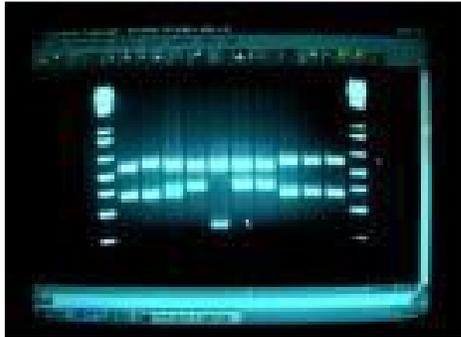
S. SESTILI*, G. CAMPANELLI*, V. FERRARI*, A. BELISARIO***, R. PAPA**, N. FICCADENTII*

*) CRA Research Institute for Vegetable Crops, Section of Ascoli Piceno, Via Salaria 1, 63030 Monsampolo del Tronto (AP), Italy - nadiarf@insinet.it

**) Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università Politecnica delle Marche, Via Brecce Bianche, 60131 Ancona, Italy

***) CRA Plant Pathology Research Institute, Via C.G. Bertero 22, Rome, Italy





IL CONTRIBUTO DELLE BIOTECNOLOGIE

- **Techniche di colture in vitro:**

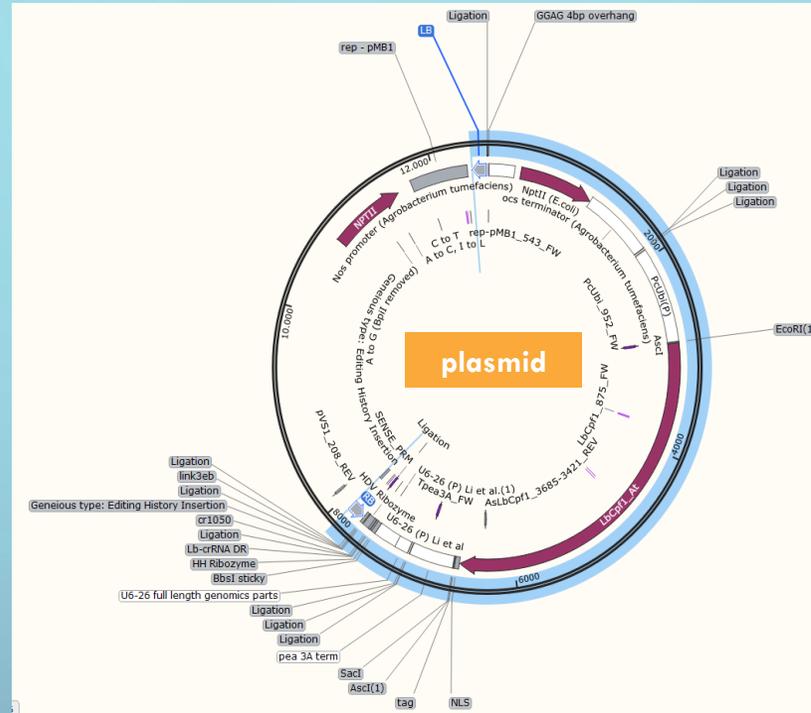
- micropropagazione
- produzione di doppi aploidi
- criopreservazione

- **Genomica**

- profili molecolari
 - mappatura del genoma
 - selezione assistita
 - genomica funzionale
 - clonaggio di geni/QTL
- **Ingegneria genetica**

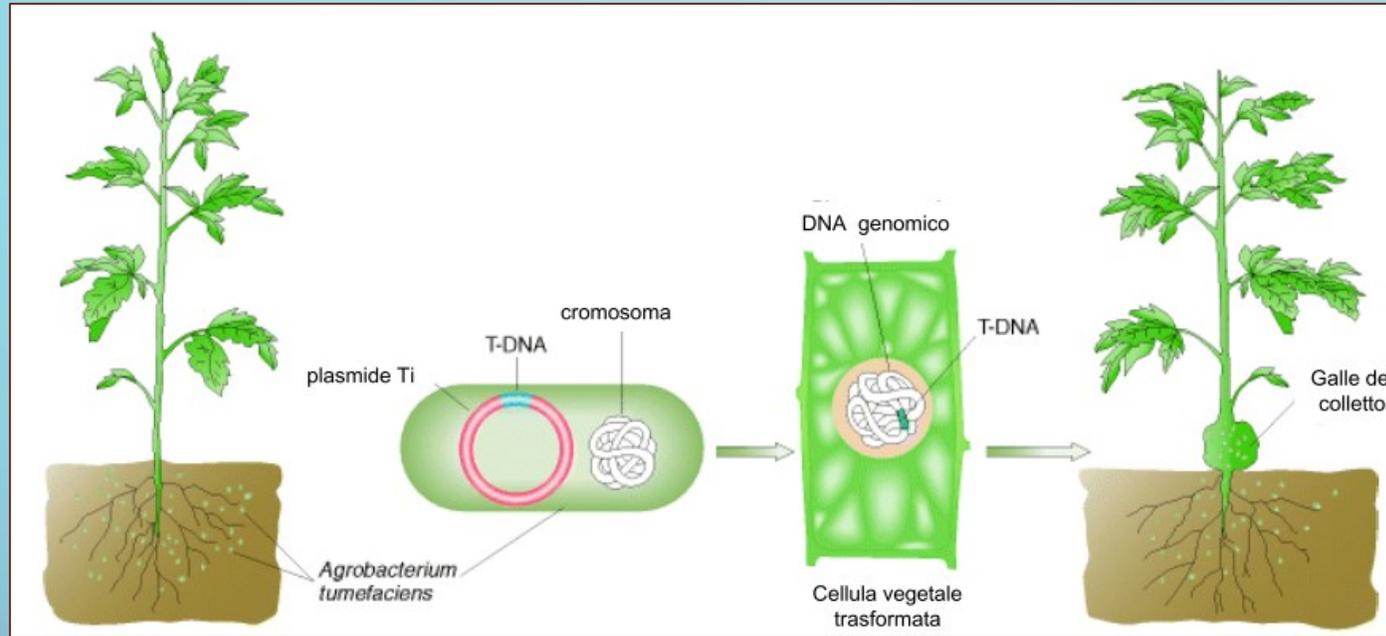
INGEGNERIA GENETICA

Plasmide



gene

TRASFORMAZIONE GENETICA

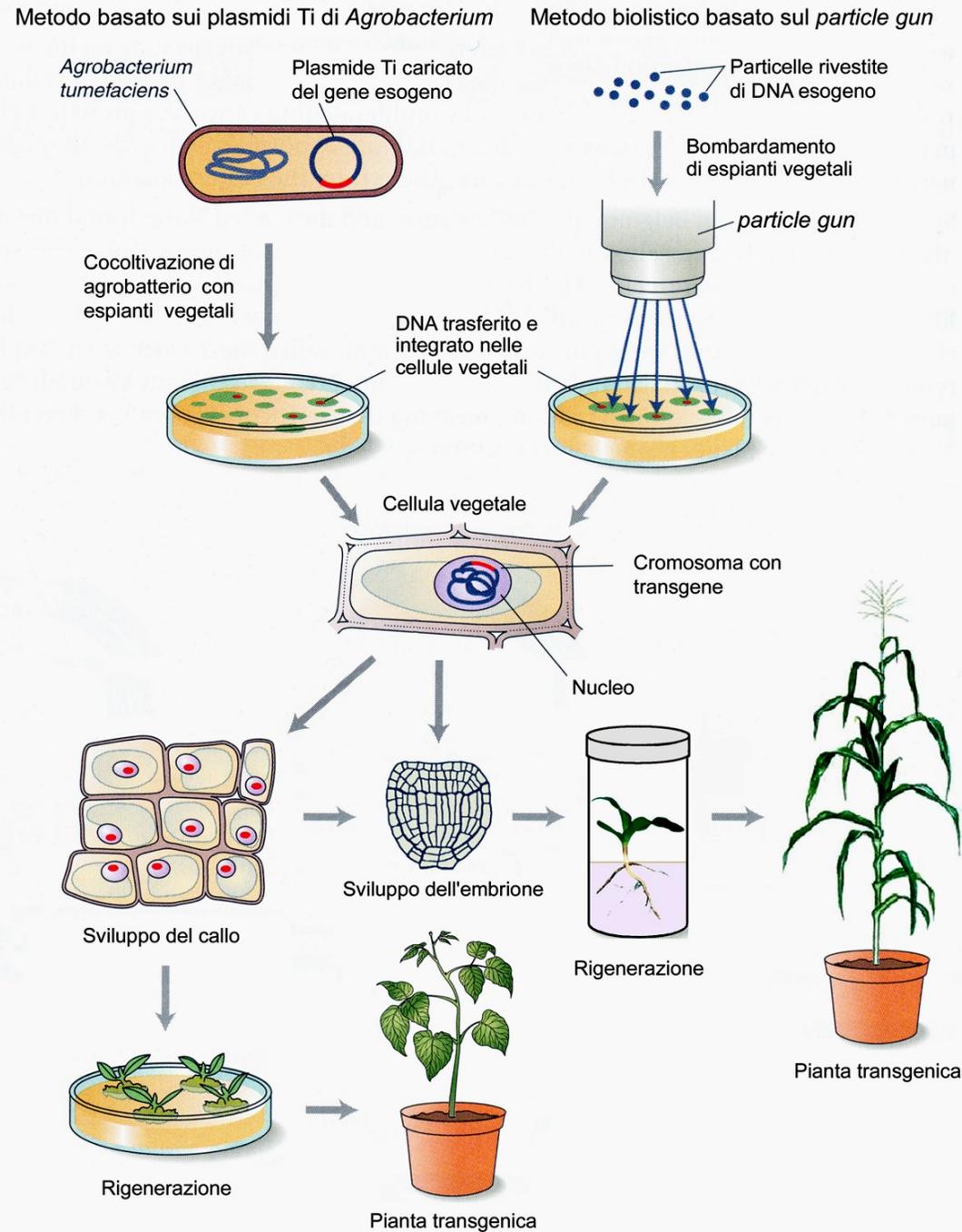


Il T-DNA del plasmide si integra nel genoma nucleare e i suoi geni vengono espressi come se fossero geni endogeni

Viene indotta la formazione della galla (oncogeni) e la biosintesi di amminoacidi (opine) utilizzabili solo dal batterio

Metodi più usati per il trasferimento genico nelle piante

Agrobacterium → dicotiledoni
(es. leguminose)
Particle gun → monocotiledoni
(es. cereali)





Home

VIB informs

VIB's Fact series

Fast Facts

About

The race towards the first genetically modified plant

19 June 2013

1983 was a great year for plant biology. First, Barbara McClintock was awarded the Noble prize for Physiology for the discovery of genetic transposition in maize. Second, four publications demonstrated the proof of concept of introducing genes into plants and opened the era of agriculture biotechnology.¹⁻⁴ The exciting race towards the first transgenic plant, which celebrates its thirtieth anniversary this year, deserves a historical reflection.

In the 1960s, two young post-doctoral researchers at Ghent University (Belgium) decided to work on plant tumors. Both not keen to use living animals as test systems, they thought they could learn something about animal tumors by studying the tumor-inducing plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens*. Already from the 1940s, many researchers from distinct disciplines showed their interest in *Agrobacterium* because of its unusual infection process. Although it was already suggested by Armin Braun in that time that bacterial DNA would be the underlying inducer of the typical 'crown-gall' plant tumors⁵ and although Rob Schilperoort detected *Agrobacterium* DNA in sterile crown gall tissue cultures⁶, it was the Ghent research group headed by Marc Van Montagu and Jeff Schell that discovered the Tumor-inducing plasmid of *Agrobacterium*.⁷ Having found an efficient DNA delivery system that would enable plant genetic engineering, a world-wide initiative was launched to unravel the details of the bacterial DNA transfer mechanisms. The race towards the first transgenic plant was declared open.

The group around Mary-Dell Chilton joined the race and demonstrated in the 1977 *Cell* paper that only a part of the Ti-plasmid, i.e. the T-DNA, was integrated into the plant genome.⁸ The top publications marched swiftly, and the Ghent lab answered in *Nature*⁹ and *Science*¹⁰ by showing that conserved regions flanking the T-DNA are involved in the integration process. In a very close sprint both groups showed in 1980 that the T-DNA was integrated into the nuclear plant DNA.^{11, 12} A next hurdle that had to be taken was the conversion of the Ti plasmid into a gene expression vector. The quest for such a vector was on-going in parallel in Ghent (Van Montagu/Schell), St Louis (Chilton) and in Leiden (Schilperoort). And although it was again the Ghent lab that designed the first non-oncogenic Ti plasmid¹³, the Rob Schilperoort group developed the most elegant



LA PRIMA PIANTA TRANSGENICA 1983

Coltura *in vitro* e Trasformazione genetica

Partenogenesi *in situ*

Ficcadenti *et al.*, 1995. *Journal Genetics and Breeding*, 49:359-364

Ficcadenti *et al.*, 2002. *Plant Disease*, 86(8):897-900

Embrione Aploide Embrionediploide



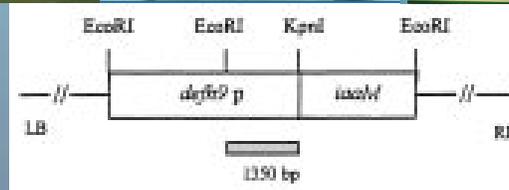
Ginogenesi *in vitro*

Ficcadenti *et al.*, 1999. *Journal Genetics and Breeding*, 53:255-257



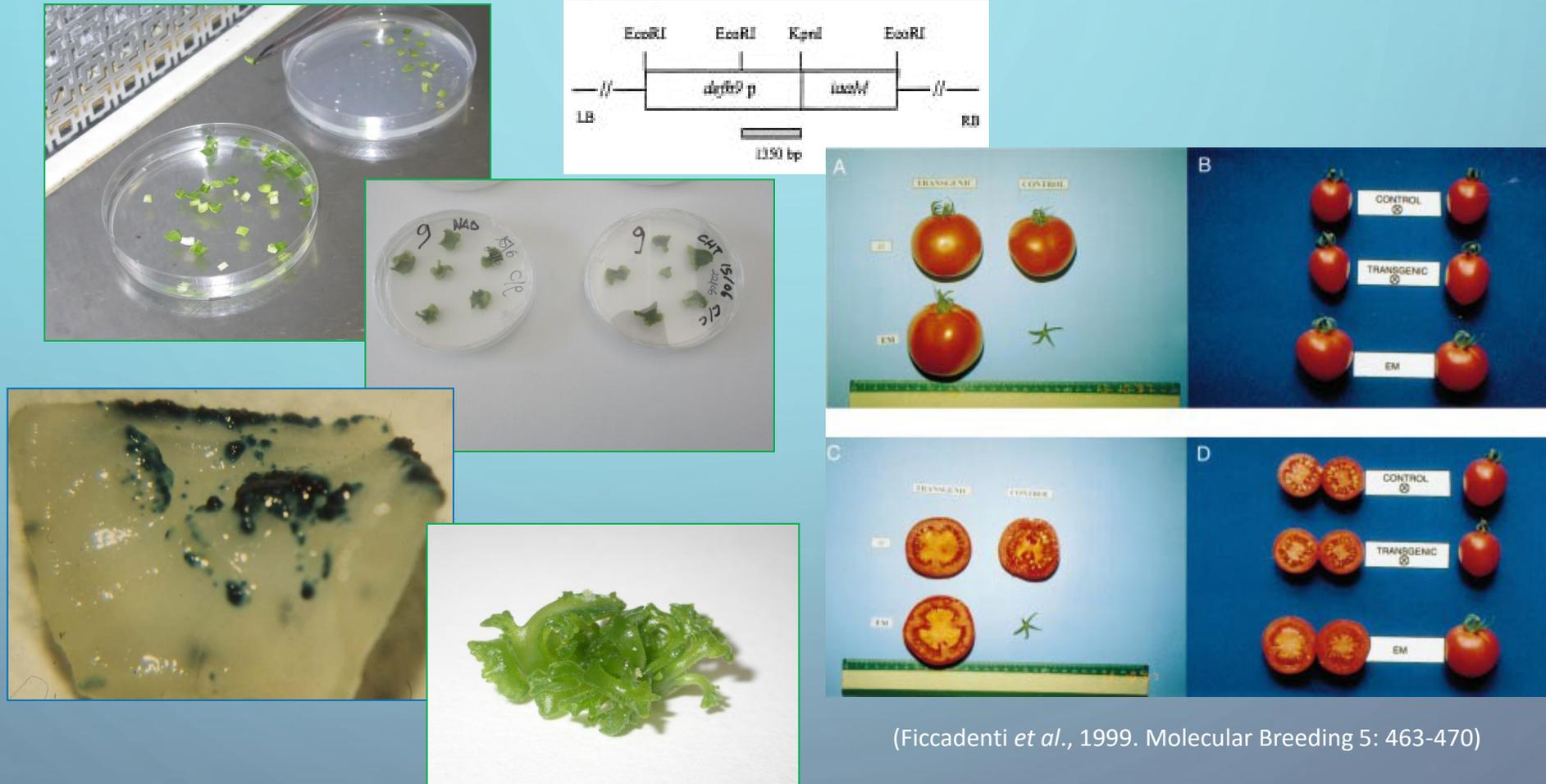
Introduzione del gene per la partenocarpia, *DefH9-iaaM*, in pomodoro e melone

Ficcadenti *et al.*, 1999. *Molecular Breeding* 5:463-470



Introduzione del gene *DefH9-iaaM* per il conferimento della partenocarpia in pomodoro e melone

Collaborazione con il Prof. Hans Sommer del Max Planck Institut di Colonia



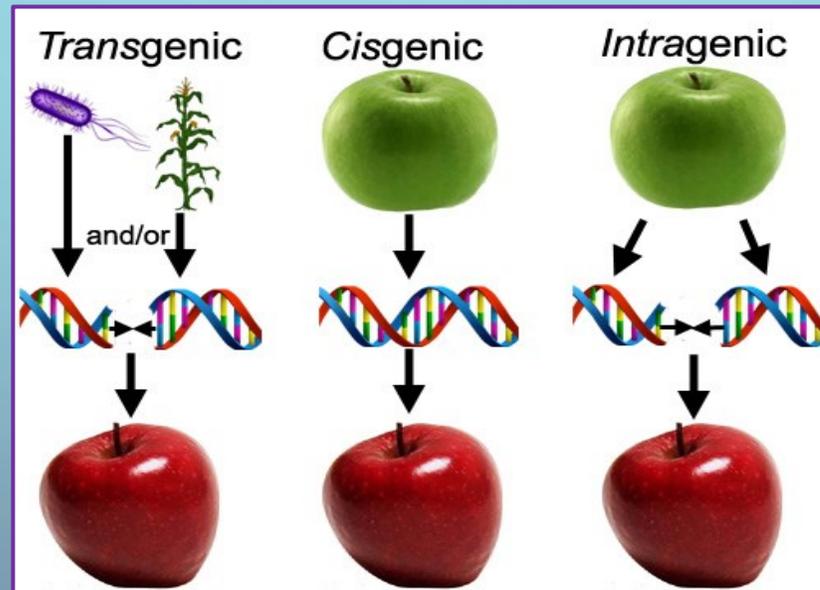
(Ficcadenti *et al.*, 1999. *Molecular Breeding* 5: 463-470)

Cisgenesis vs Transgenesis

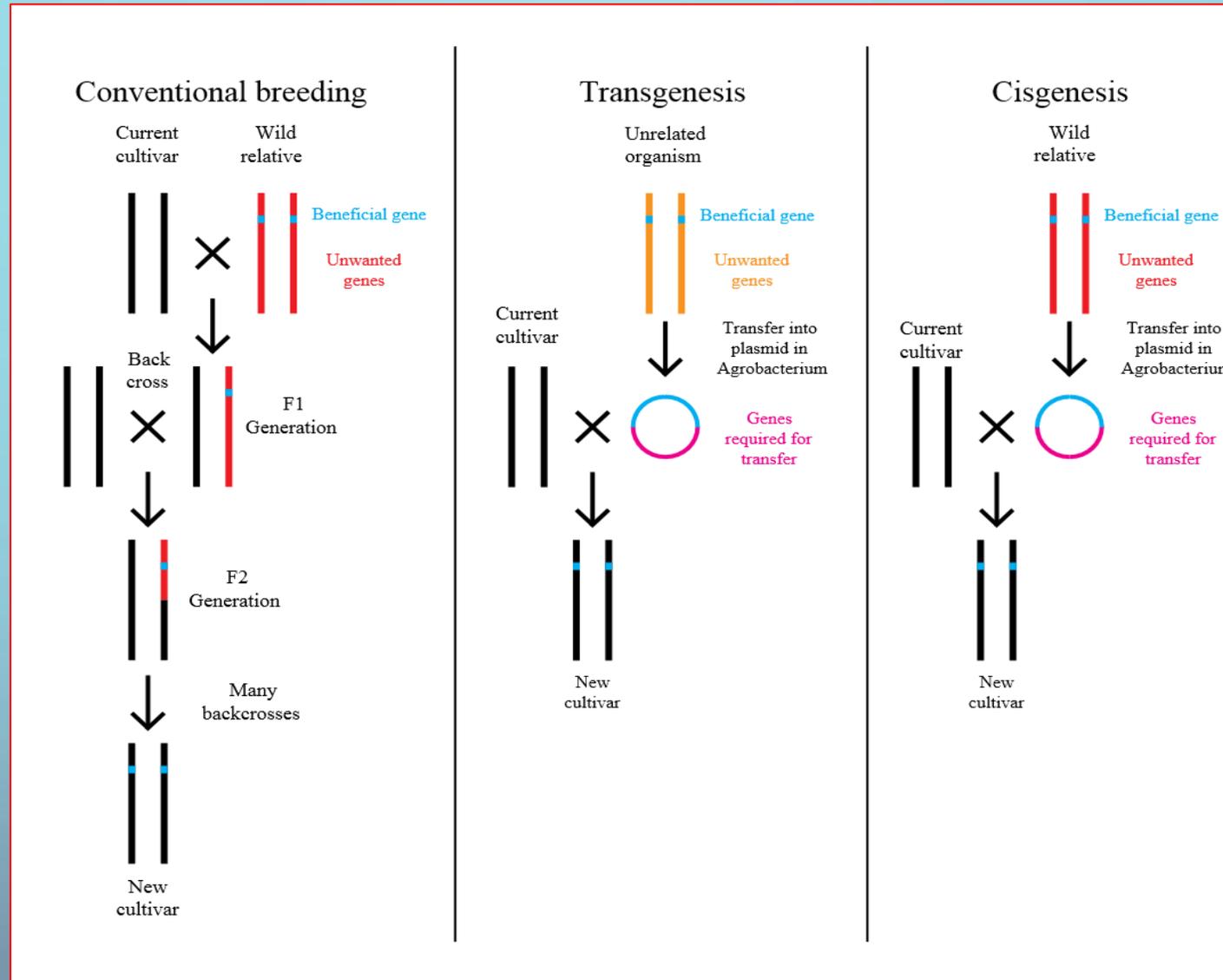
Il gene inserito è sotto il controllo del suo promotore nativo, contiene i propri introni e la sequenza terminatrice

Non si inseriscono geni esogeni ma geni provenienti dalla stessa specie vegetale

Mantiene il patrimonio genetico della cultivar originale dato che vengono inseriti uno o pochi alleli desiderati



Modificazioni mirate analoghe a quelle ottenibili da incrocio



GENOME EDITING

Impiego di nucleasi ingegnerizzate



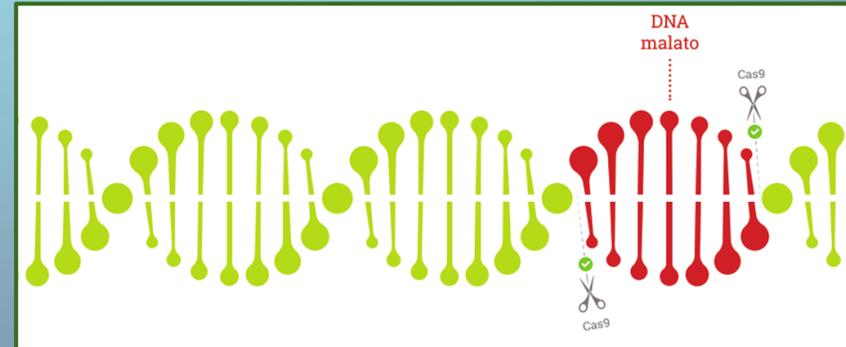
- Oligonucleotide Directed Mutagenesis (ODM)
- Homing Endonucleases (HE)
- Zinc Finger Nucleases (ZFN)
- Transcription Activator Like Effector Nucleases (TALEN)
- CRISPR/Cas9

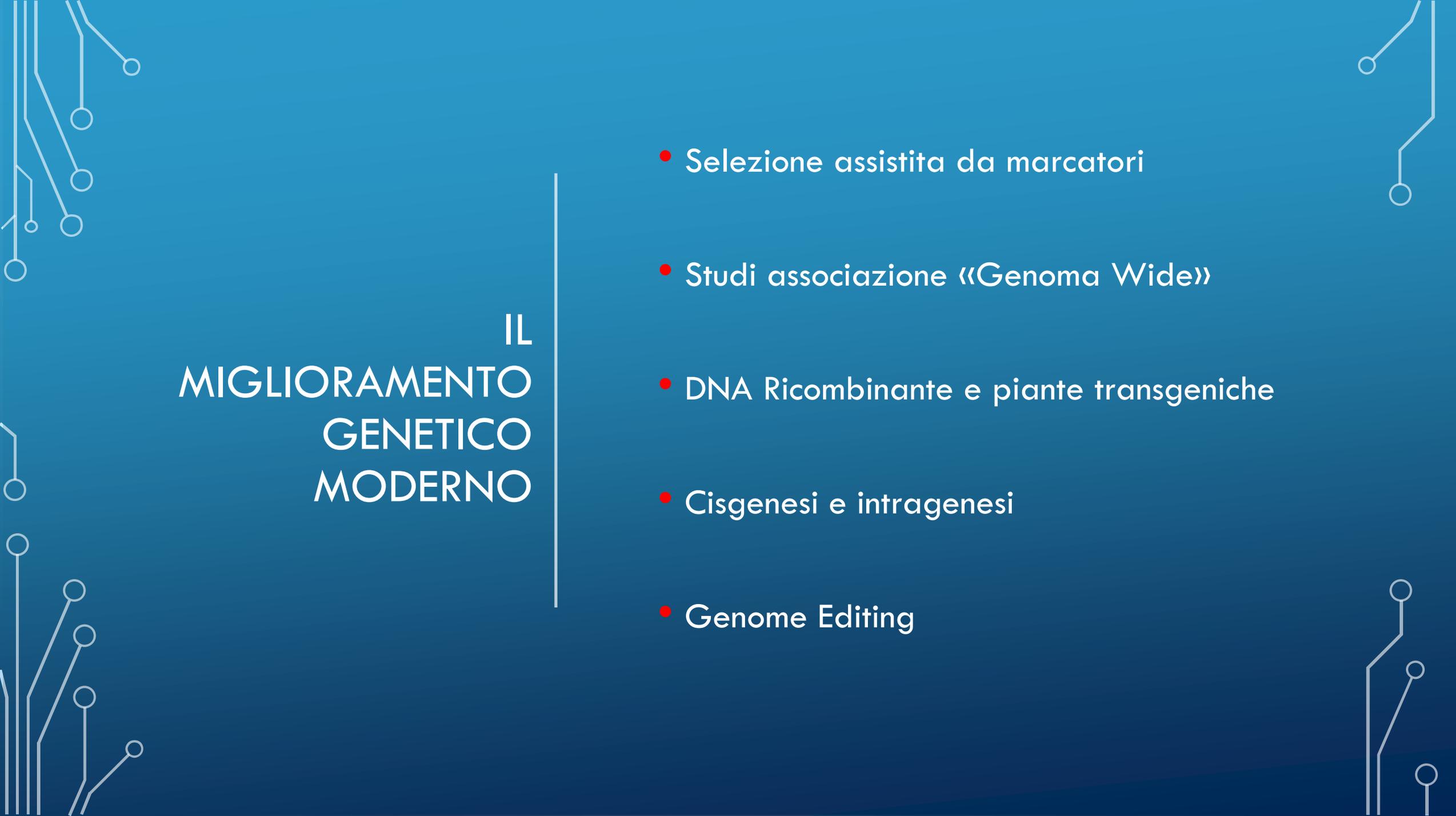
Che cosa hanno in comune?



**Preciso riconoscimento e taglio specifiche sequenze di DNA
(DNA targeting)**

La cellula è in grado di “riparare” il taglio distruggendo la sequenza originale o sostituendola con una nuova copia del gene





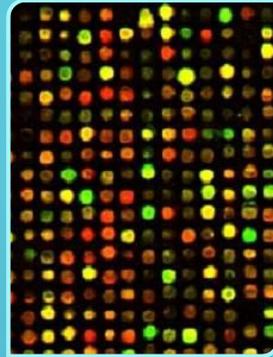
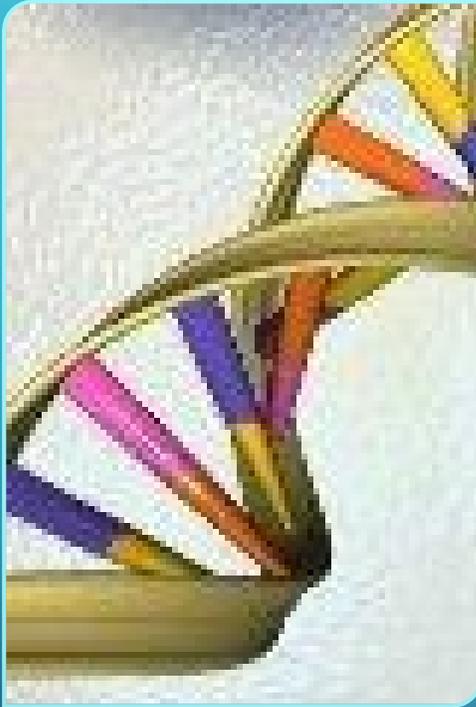
IL MIGLIORAMENTO GENETICO MODERNO

- Selezione assistita da marcatori
- Studi associazione «Genoma Wide»
- DNA Ricombinante e piante transgeniche
- Cisgenesi e intragenesi
- Genome Editing

I breeders attuali usano metodi molecolari integrati con gli studi di pieno campo



SELEZIONE ASSISTITA CON MARCATORI (MAS)



- **La MAS viene utilizzata in molti programmi di selezione**
- **Riduce i tempi per costituire nuove varietà migliorate**
- **Va integrata con metodiche tradizionali**
- **Le strategie genomiche aumentano l'efficacia della selezione e richiedono estese conoscenze molecolari e fisiologiche**

SELEZIONE ASSISTITA PER TOLLERANZA A FUSARIOSI IN FRUMENTO DURO



S S S S S **R** S S S S S S S S S S S **R** S



Piante che portano l'allele di
resistenza alla fusariosi

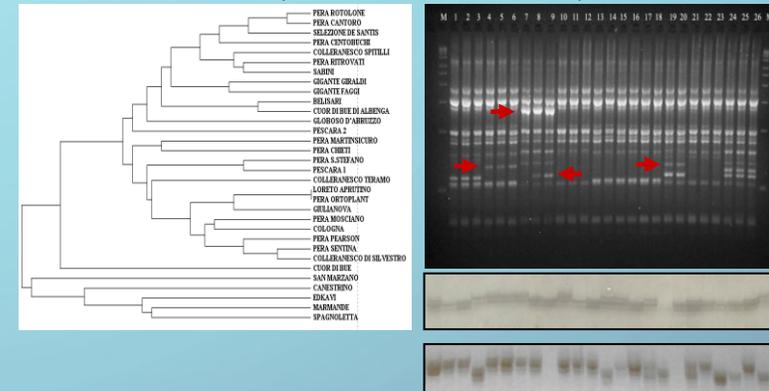
Breeding tradizionale e mediante le biotecnologie

Sviluppo di ibridi F1 e linee di melone resistenti alle razze 0, 1, e 1,2 di FOM
Inoculazioni artificiali *in vivo*



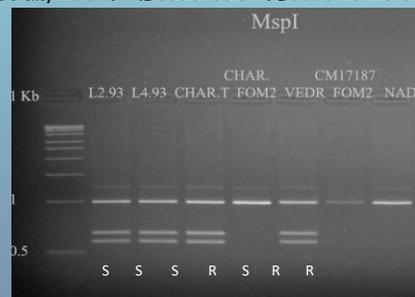
Caratterizzazione morfologica e molecolare di melone, pomodoro e peperone, per la valutazione della diversità genetica e per il recupero varietale.

Sestili *et al.*, 2011. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, doi:10.1017/S1479262111000335
Mazzucato *et al.*, 2010. *Scientia Horticulturae*, 125: 55-62



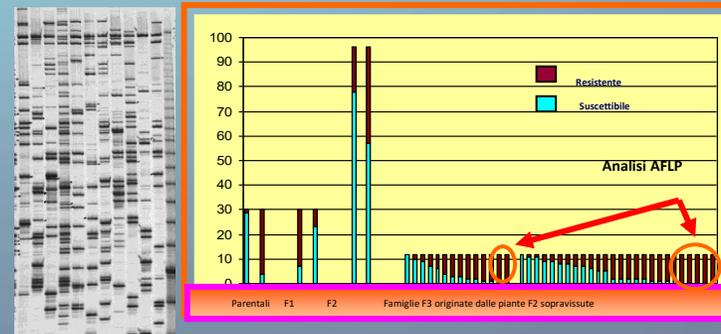
Impiego di marcatori molecolari associati alla resistenza alla razza 1 di FOM

Sestili *et al.*, 2002. XLVI SIGA. Giardini Naxos 18-21 settembre Sez. 4.49
Sestili *et al.*, 2004. XLVIII SIGA. Lecce 15-18 settembre p.182



Ereditabilità della resistenza al FOM:
Analisi AFLP su popolazioni F2 (R x S)

Sestili *et al.*, 2005. XLIX SIGA. Potenza, 12-15 settembre



IL MIGLIORAMENTO GENETICO OGGI

- E' possibile identificare i geni responsabili per i caratteri di interesse agronomico
 - Lo sviluppo tecnologico e scientifico stanno accelerando il processo
- Selezione assistita da marcatori
 - Sfrutta la variabilità esistente
 - Ricerca di mutazioni rare possibile
- Modificazioni mirate dei geni
 - Crea nuova variabilità
 - Mutagenesi chimica seguita da ricerca dei mutanti desiderati
 - Mutagenesi in planta mirata a produrre le mutazioni desiderate
 - Approccio transgenico o cisgenico