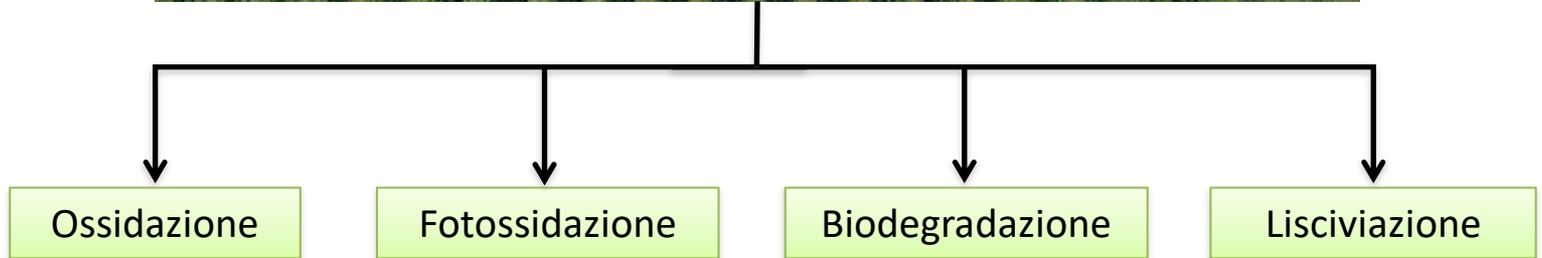


NANOTECNOLOGIE IN AGRICOLTURA



Metodi tradizionali: i pesticidi



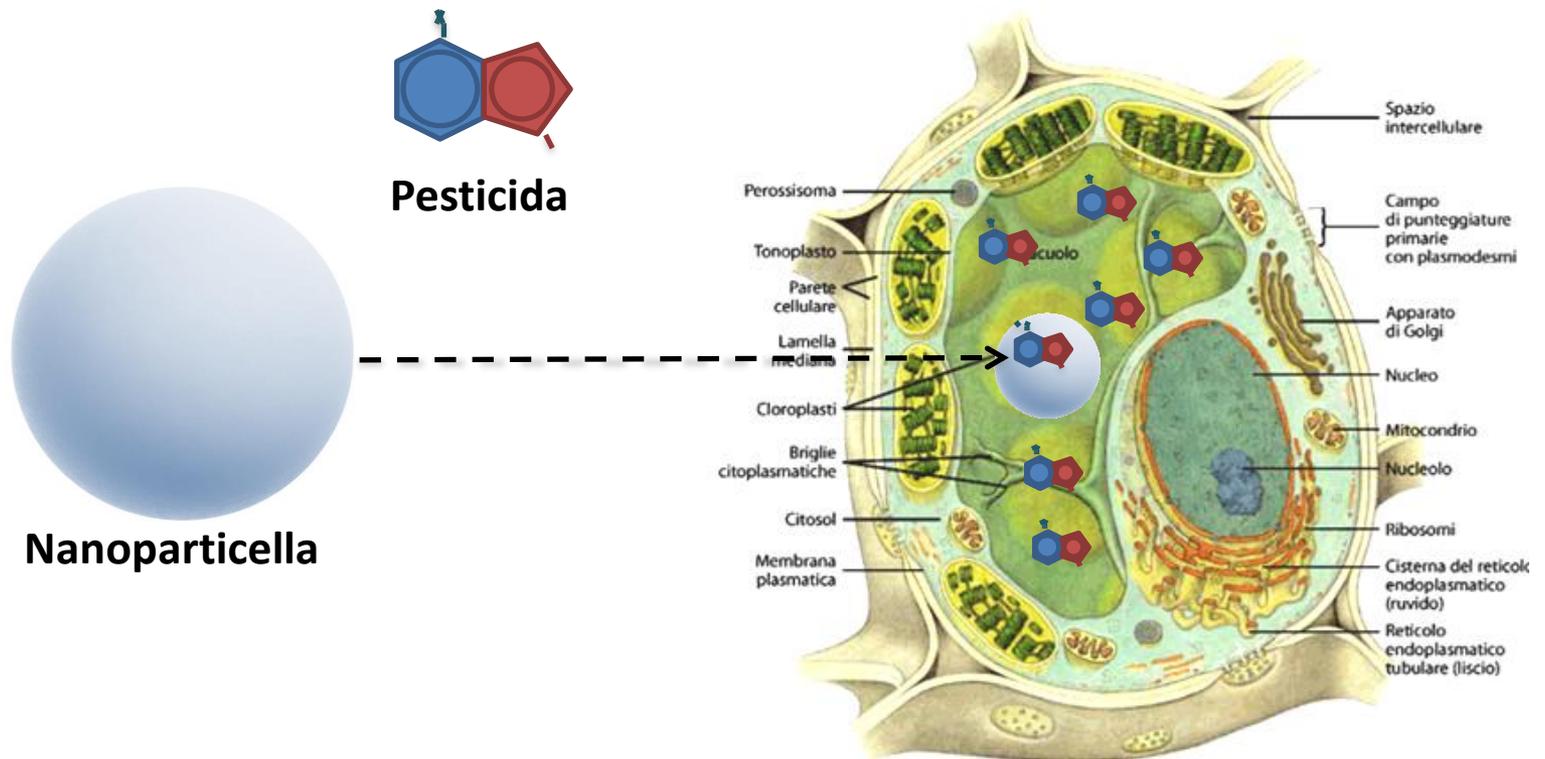
Inquinamento acqua



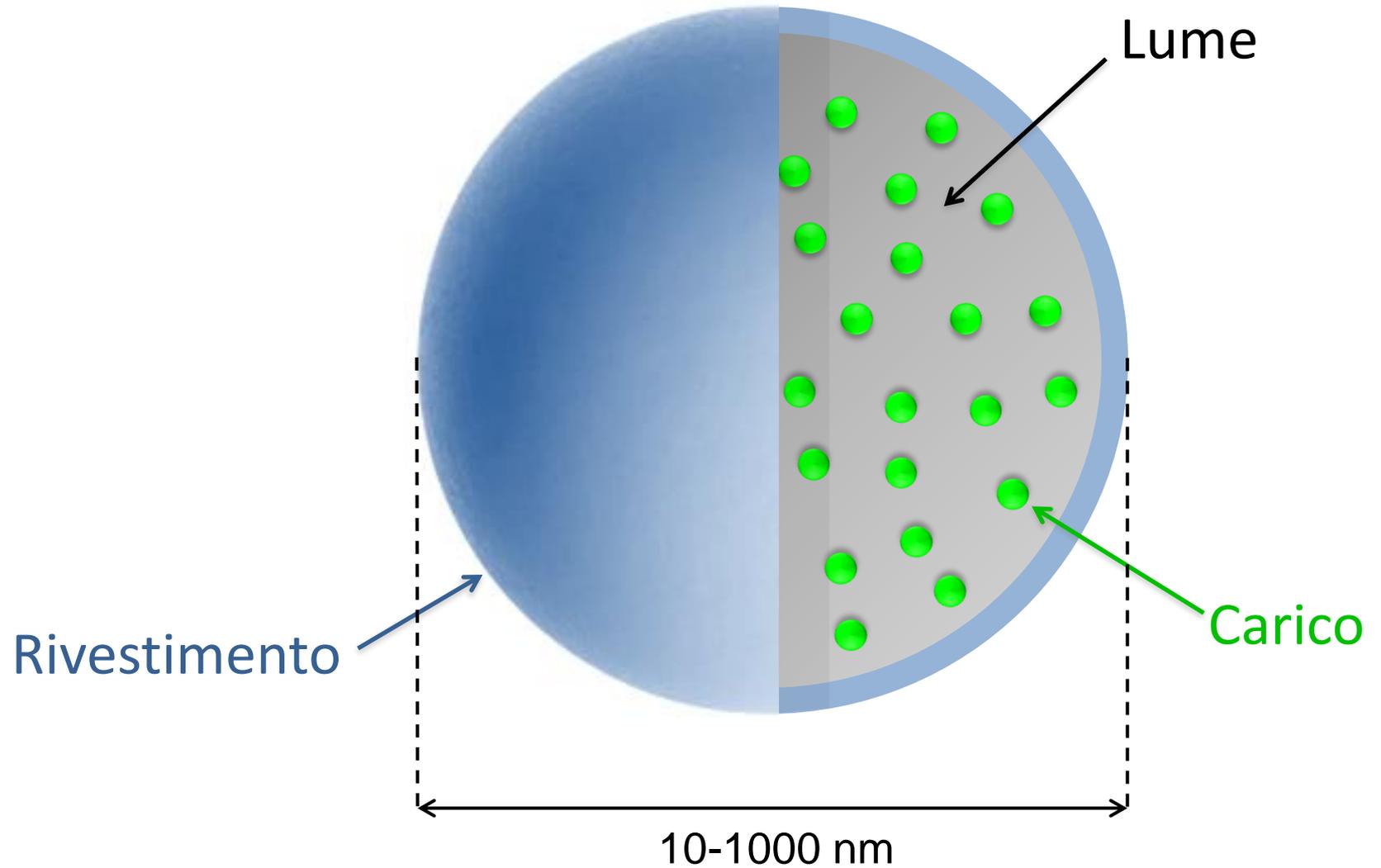
Inquinamento suolo

Nanobiotechnologia

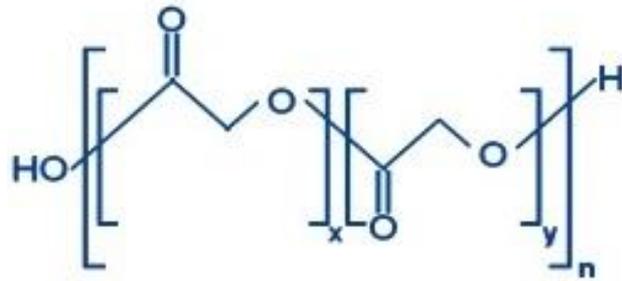
Somministrazione di pesticidi attraverso **nanovettori**



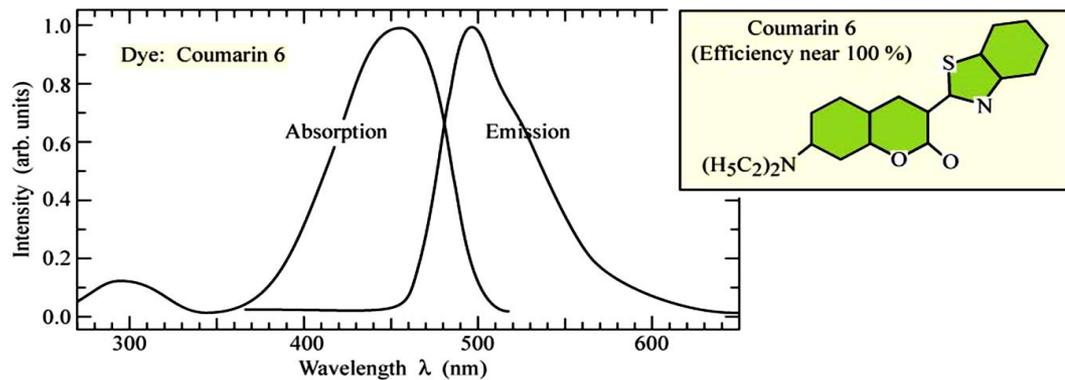
Nanocapsule polimeriche



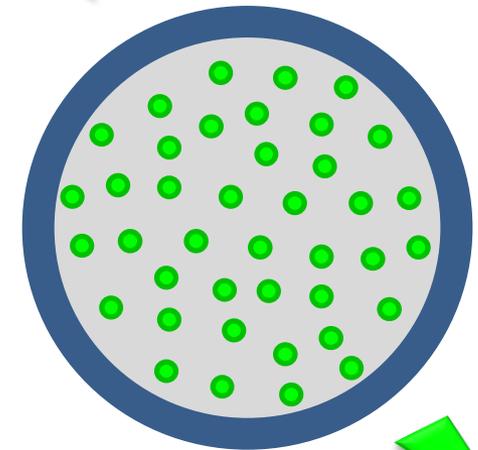
Nanocapsule polimeriche



PLGA: Acido poli(lattico-co-glicolico)



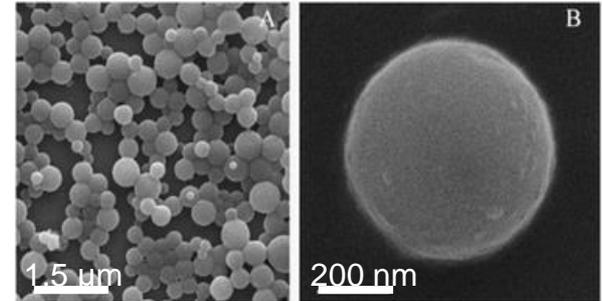
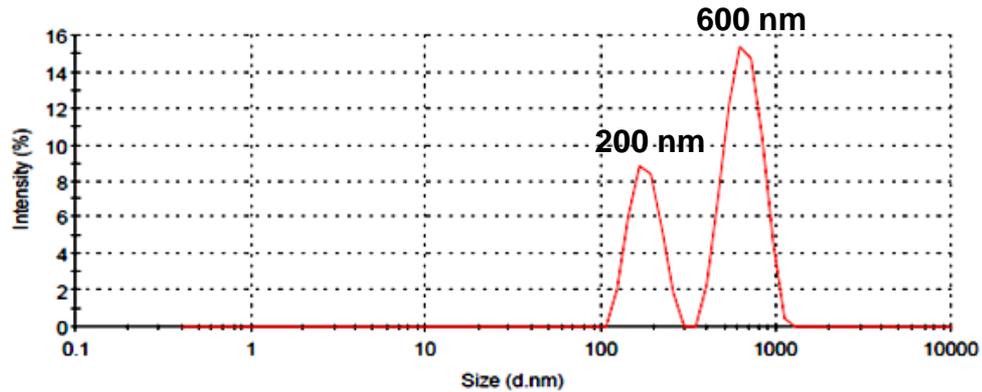
460 nm



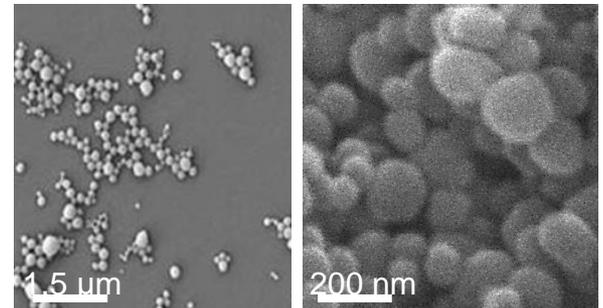
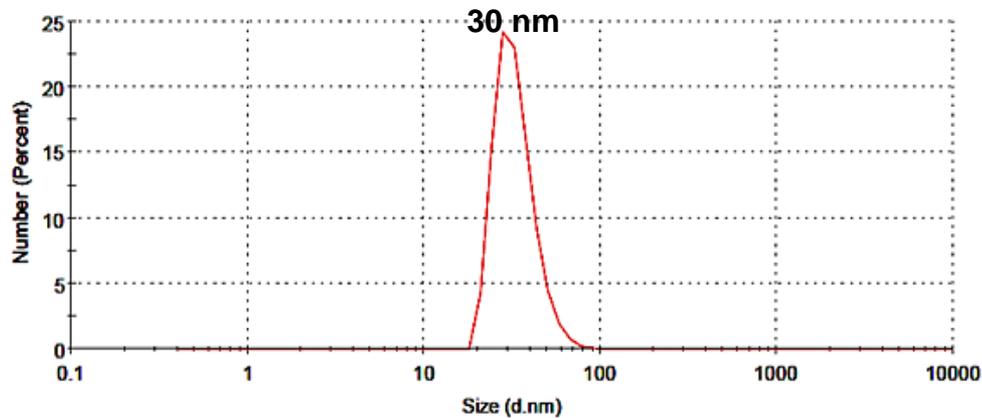
500 nm

Dimensioni

Metodo osmotico



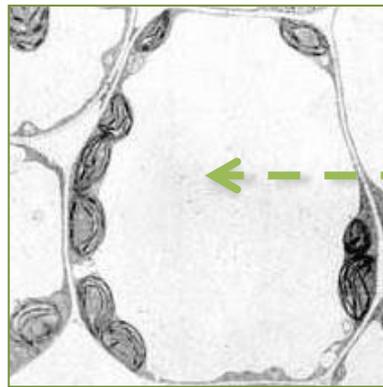
Metodo microfluidico



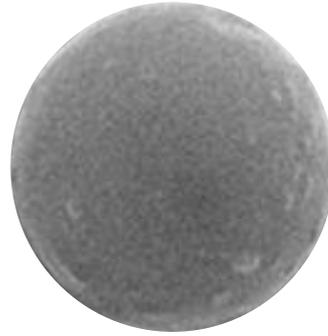
Misura del potenziale Z: carica superficiale **negativa**

PLGA NPs in sistemi vegetali e fungini

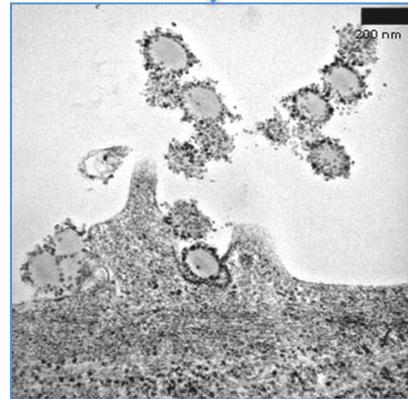
Le PLGA NPs sono in grado di attraversare la **parete** e la **membrana** cellulare?



Cellula vegetale

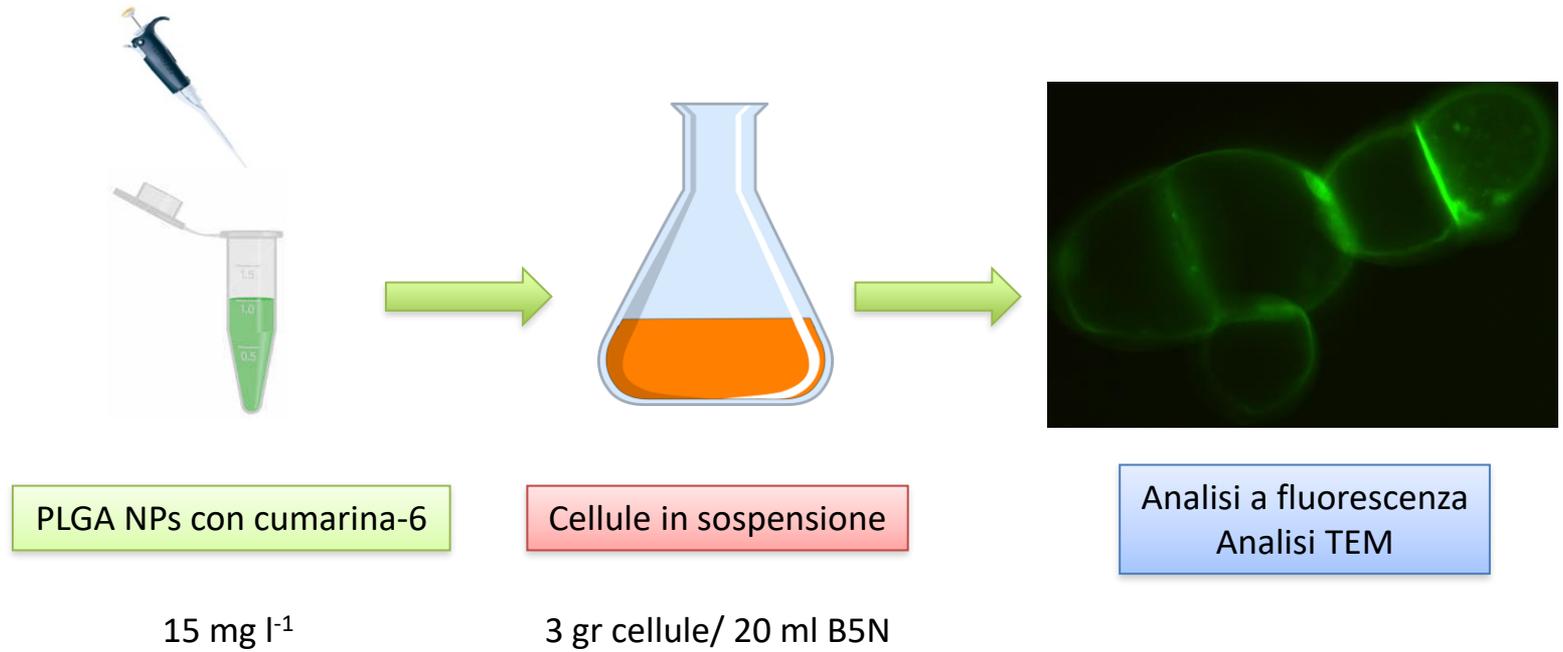


Cellula fungina



Cellula animale

PLGA NPs in *Vitis vinifera*

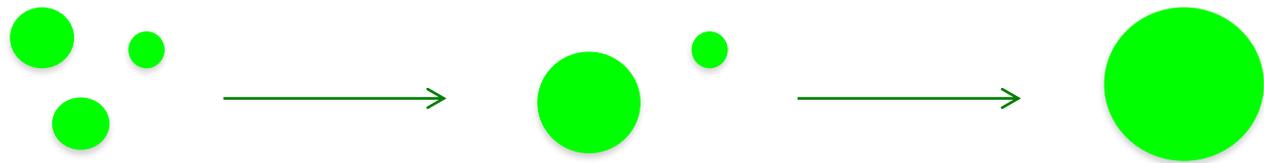
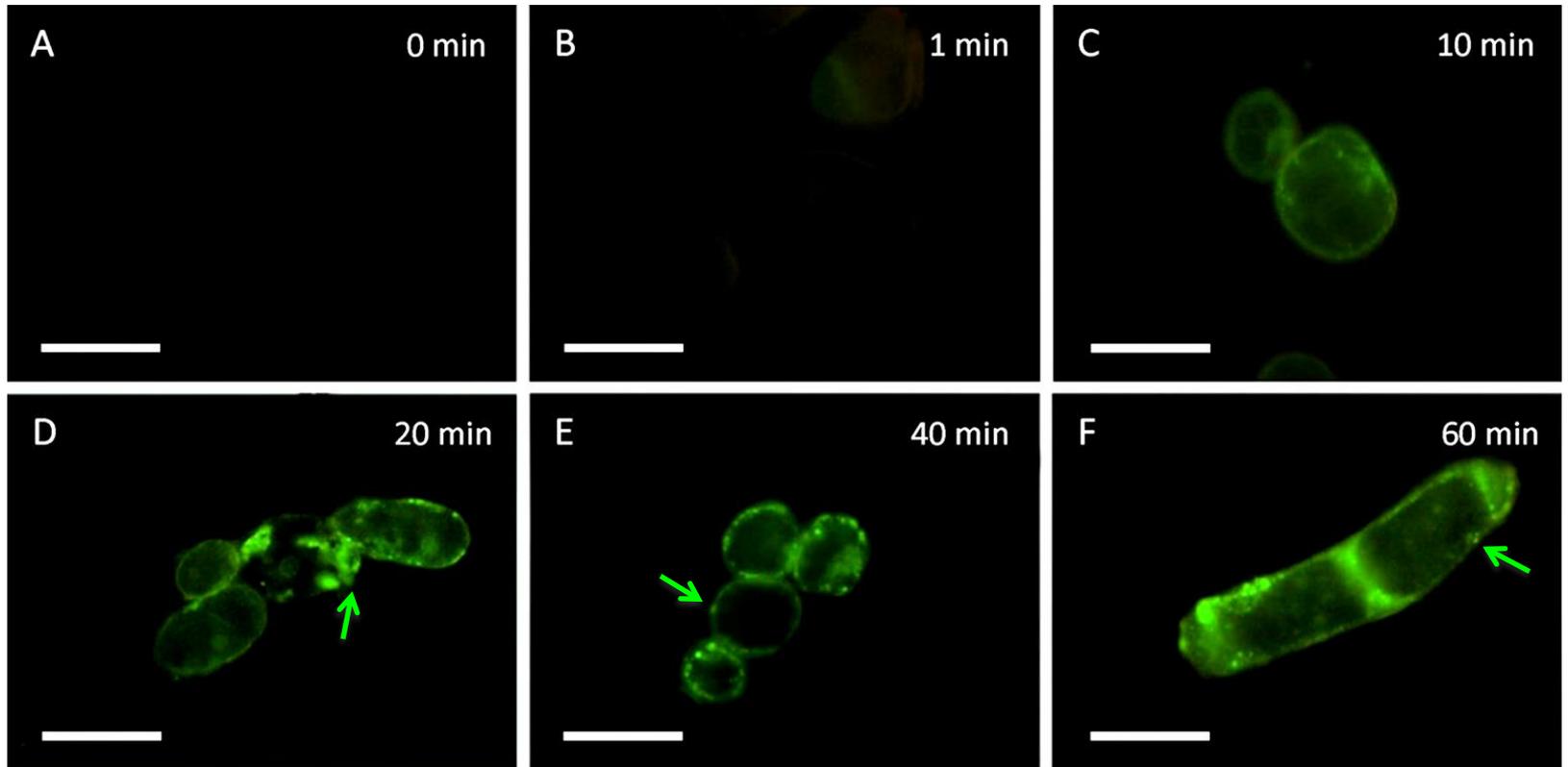


Localizzazione subcellulare

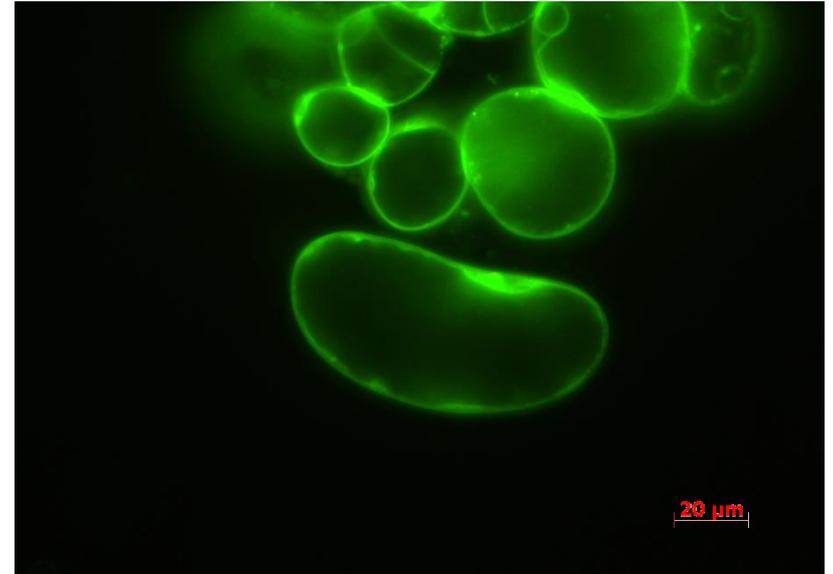
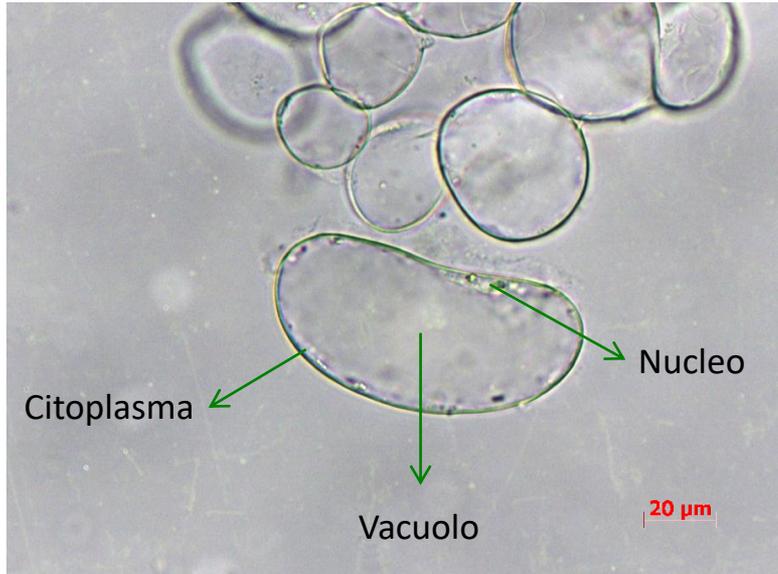
Meccanismo d'internalizzazione

Uptake cellulare

Uptake cellulare



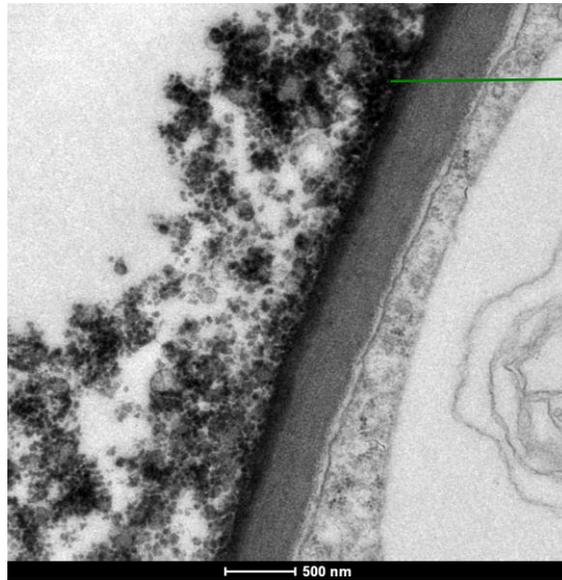
Localizzazione subcellulare



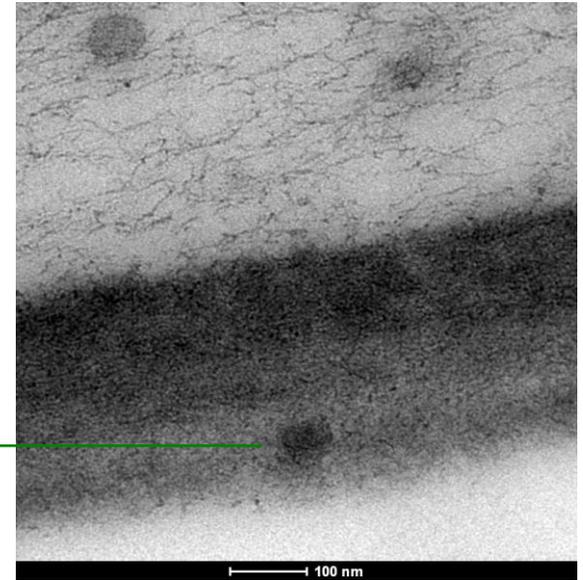
Siti d'accumulo delle PLGA NPs:

CITOPLASMA NUCLEO

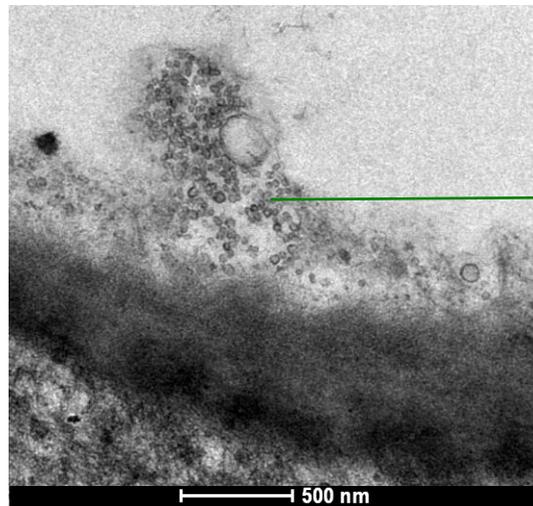
Localizzazione subcellulare



PLGA NPs adese
alla parete



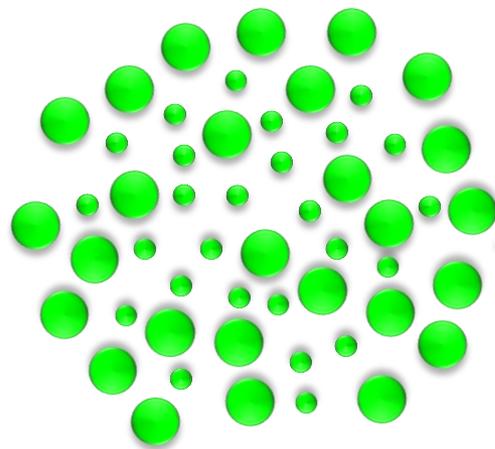
PLGA NP attraversa
la parete



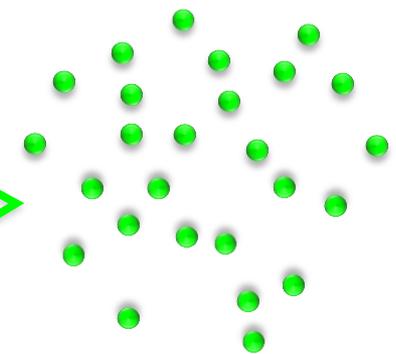
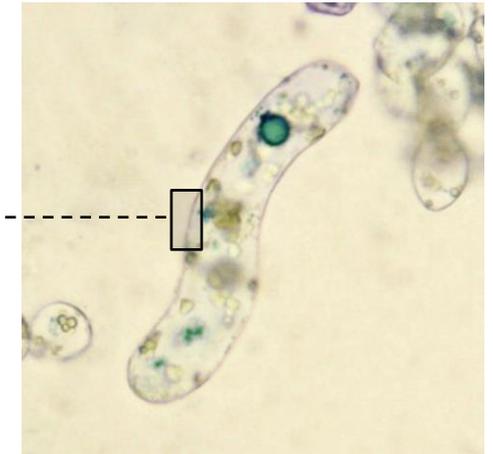
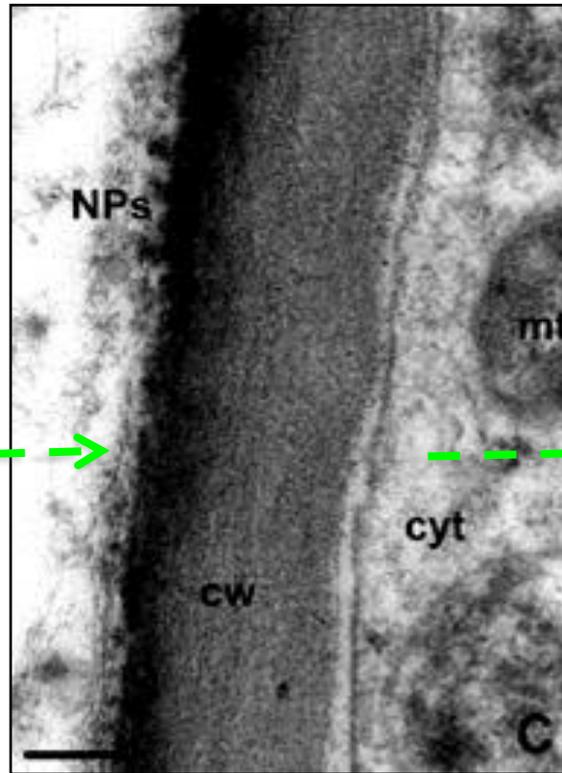
Accumulo di PLGA
NPs al livello
citoplasmatico

Uptake cellulare

Parete cellulare:
selezione dimensione
dipendente

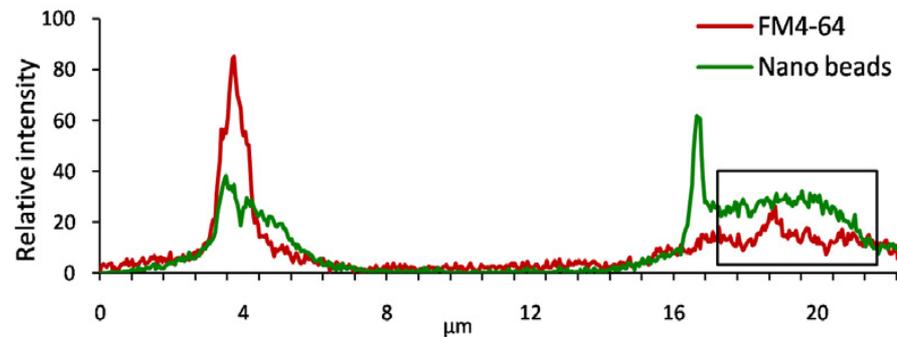
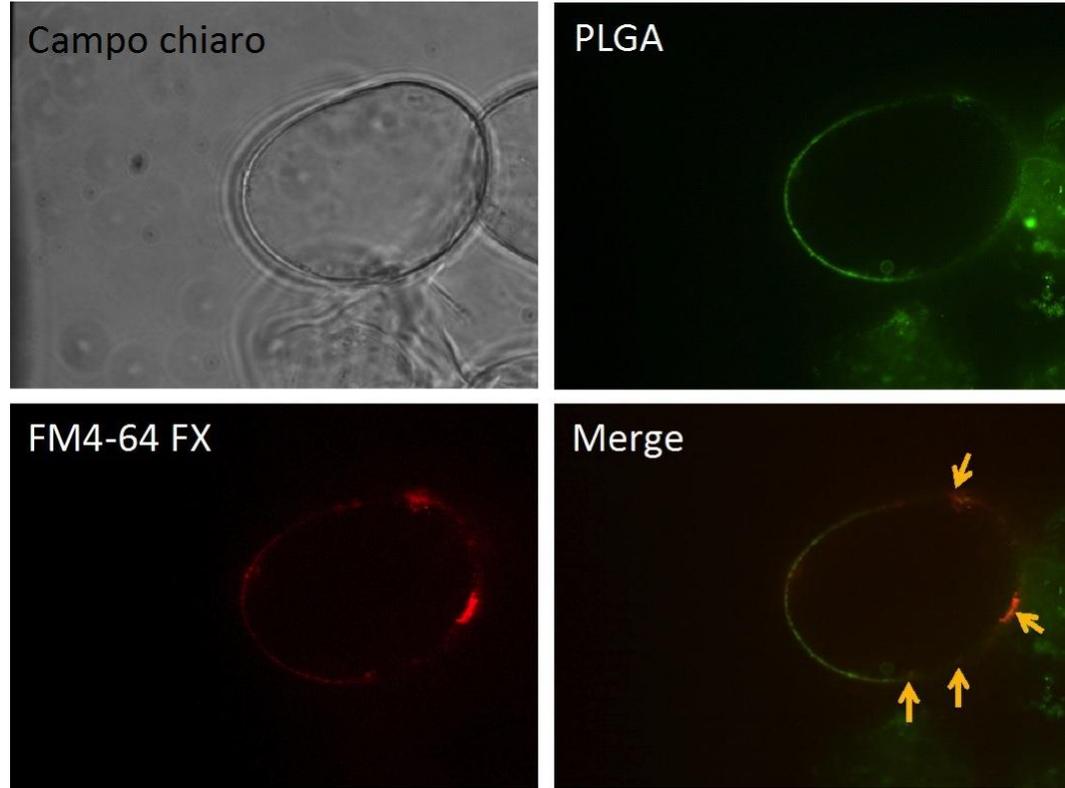


600-30 nm



≤ 50 nm

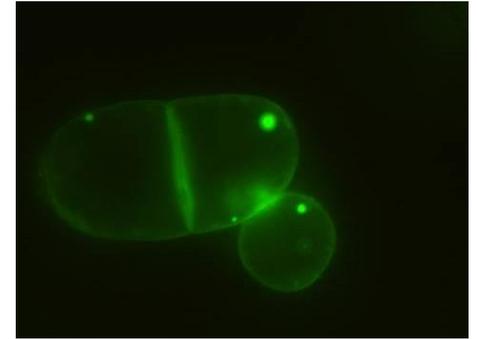
Meccanismo d'internalizzazione



Meccanismo d'internalizzazione

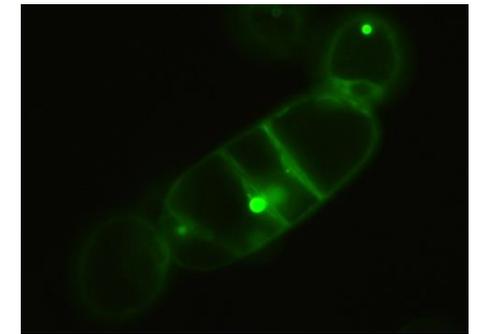
Ikarugamicina
10 μ M
>30 min

Bandmann *et al.* 2012
FEBS Letters 586:3626-3632



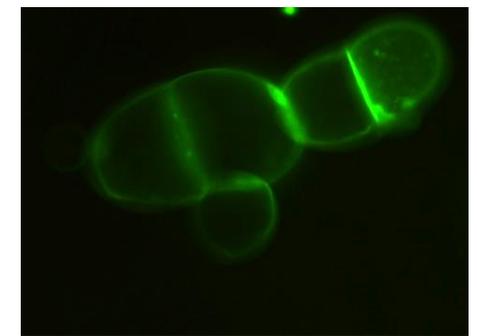
Wortmannina
30 μ M
>30 min

Anieto & Robinson 2005
Protoplasma 226:3-11

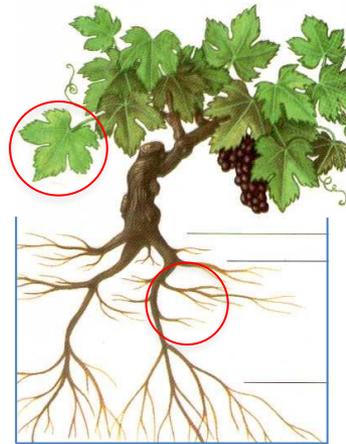


Acido salicilico
10 μ M
>30 min

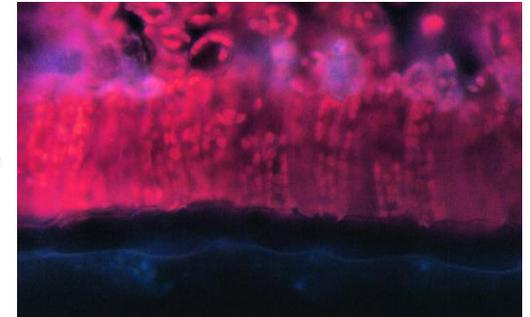
Du *et al.* 2013 PNAS
110:7946-7951



PLGA NPs in piante di *Vitis vinifera*



V. vinifera in vitro



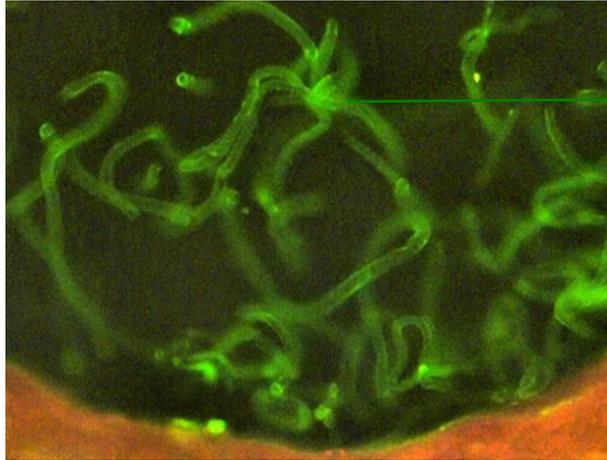
Analisi a fluorescenza



Assorbimento fogliare

Incubazione con 2.5 mg l^{-1} PLGA NPs

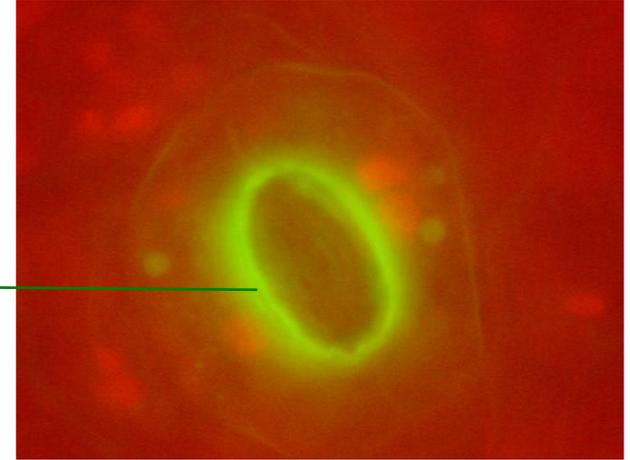
1-5 min



Segnale intenso:
tricomi non
ghiandolari

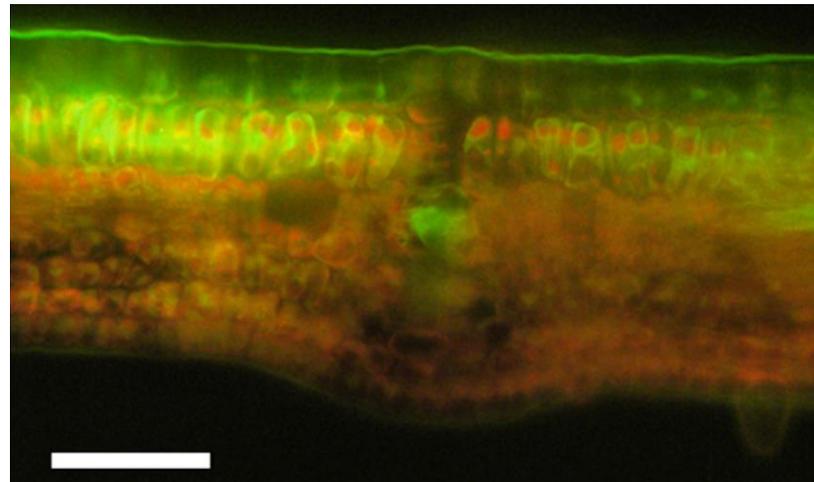
Segnale intenso:
pareti ventrali
stomi

5-15 min



1-2 ore

Parenchima
palizzata

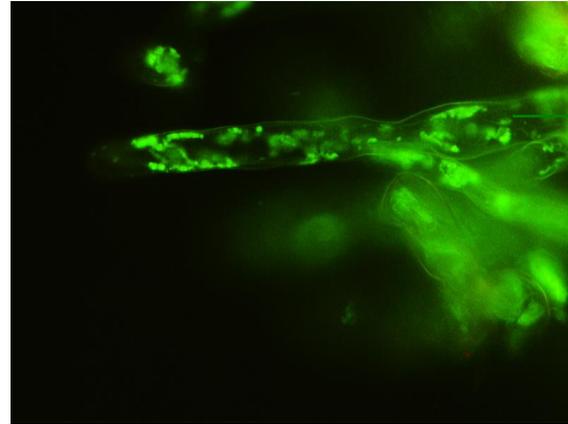


Camera
sottostomatica

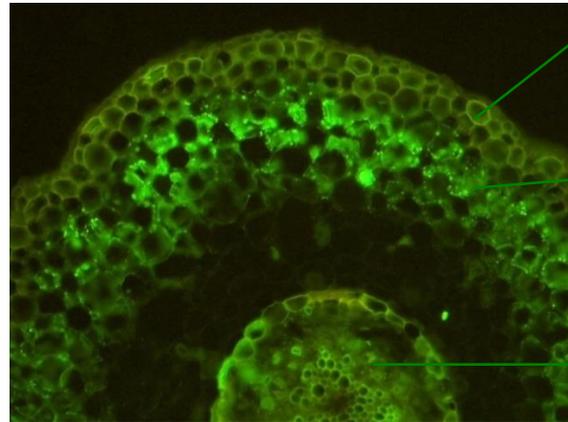
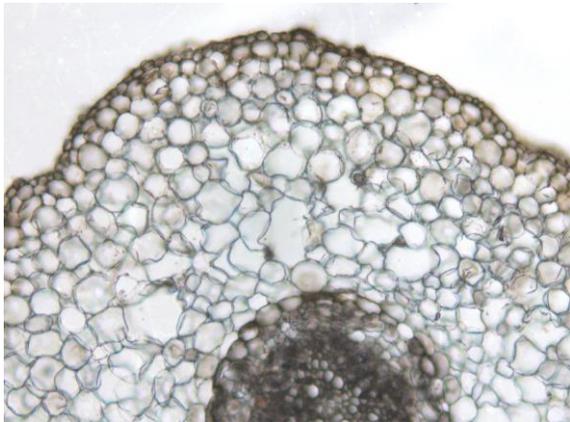
Assorbimento radicale

Incubazione con 2.5 mg l^{-1} PLGA NPs

Osservazione a 1-3 ore

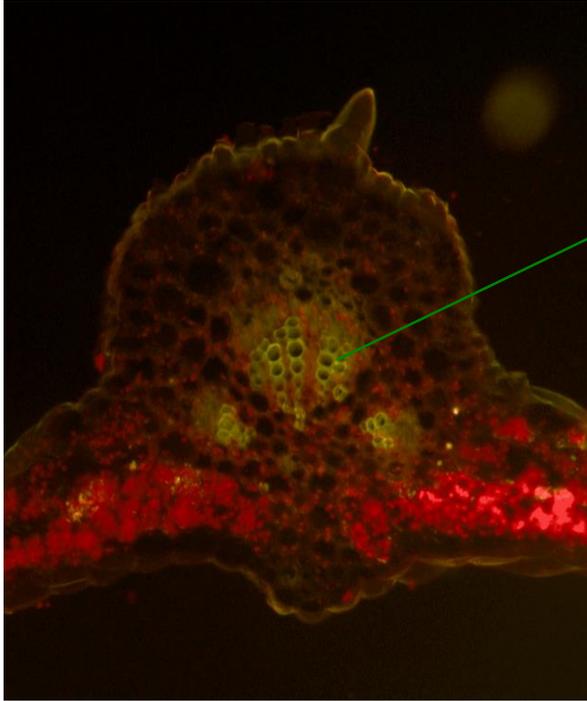


Osservazione a 48 ore

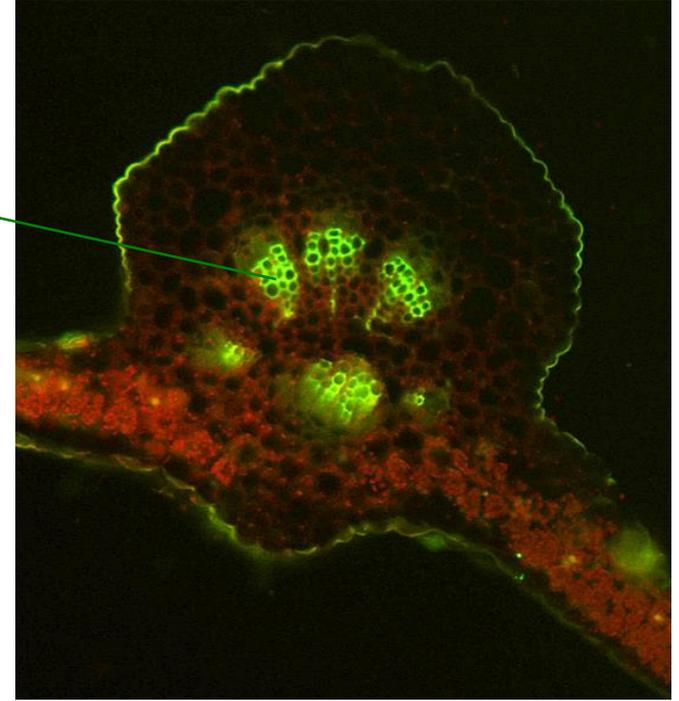


Trasporto

Controllo



Osservazione a 48 ore



Xilema

RADICE

xilema

FOGLIA



PLGA NPs in funghi fitopatogeni



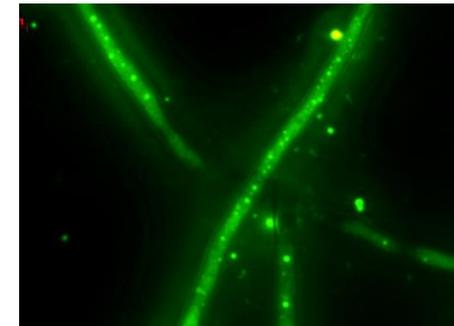
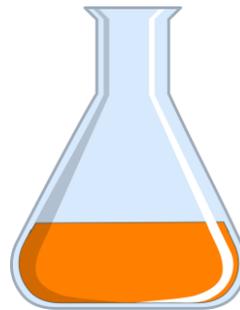
Botrytis cinerea



Aspergillus niger



Aspergillus carbonarius



Sospensione fungina

Analisi a fluorescenza

Botrytis cinerea

Fungo necrotrofico appartenente agli Ascomiceti che colpisce molte specie di piante. Responsabile delle malattie da muffa grigia. Capacità di sopravvivere per lunghi periodi sotto forma di conidi e/o piccole masse miceliche indurite chiamate sclerozi. È un patogeno con un'ampia gamma di ospiti, che colpisce molte colture importanti, soprattutto in pre e post raccolta di frutta e verdura. Si stima che *B. cinerea* causi ogni anno perdite di produzione tra i 10 e i 100 miliardi di dollari in tutto il mondo.

Circa l'8% del mercato globale dei fungicidi è utilizzato per controllare questo patogeno.

FLUOPYRAM

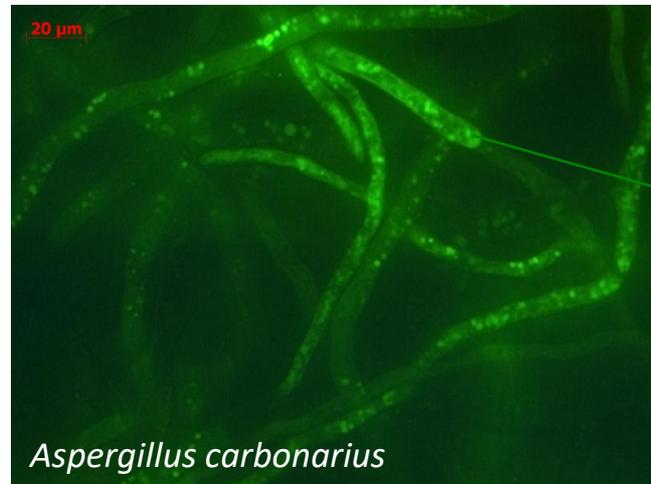
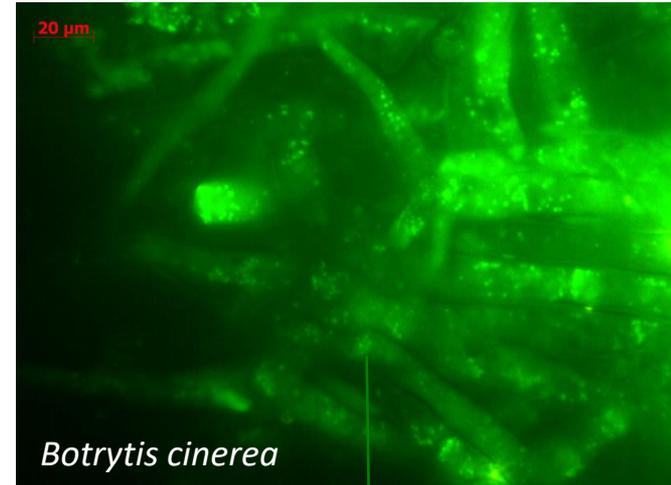
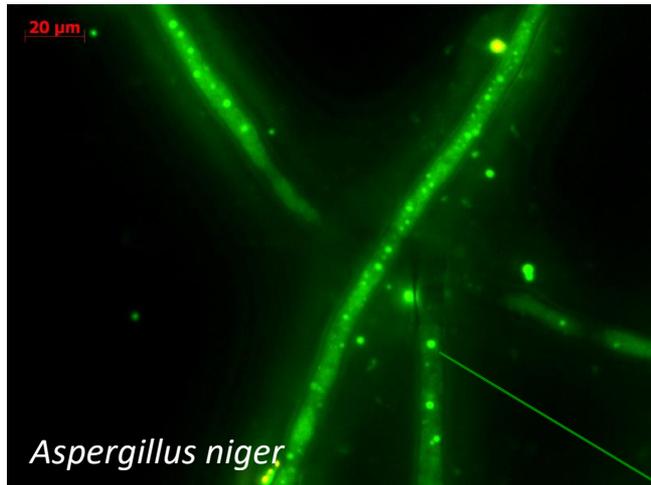
Composto fenolico antimicrobico naturale derivato dal resveratrolo. Inibisce la crescita di diversi funghi fitopatogeni Più efficace del resveratrolo nell'inibire la germinazione dei conidi. Danneggia la membrana plasmatica e gli organelli fungini, deforma le ife e i conidiofori. Composto fungicida e nematocida di sintesi comunemente usato in agricoltura contro *B. cinerea*. Inibitore della succinato deidrogenasi (SDHI) Approvato negli Stati Uniti e nell'Unione Europea per l'uso come ingrediente attivo nei pesticidi.

PTEROSTILBENE

Composto fenolico antimicrobico naturale derivato dal resveratrolo. Inibisce la crescita di diversi funghi fitopatogeni. Più efficace del resveratrolo nell'inibire la germinazione dei conidi. Danneggia la membrana plasmatica e gli organelli fungini, deforma le ife e i conidiofori.

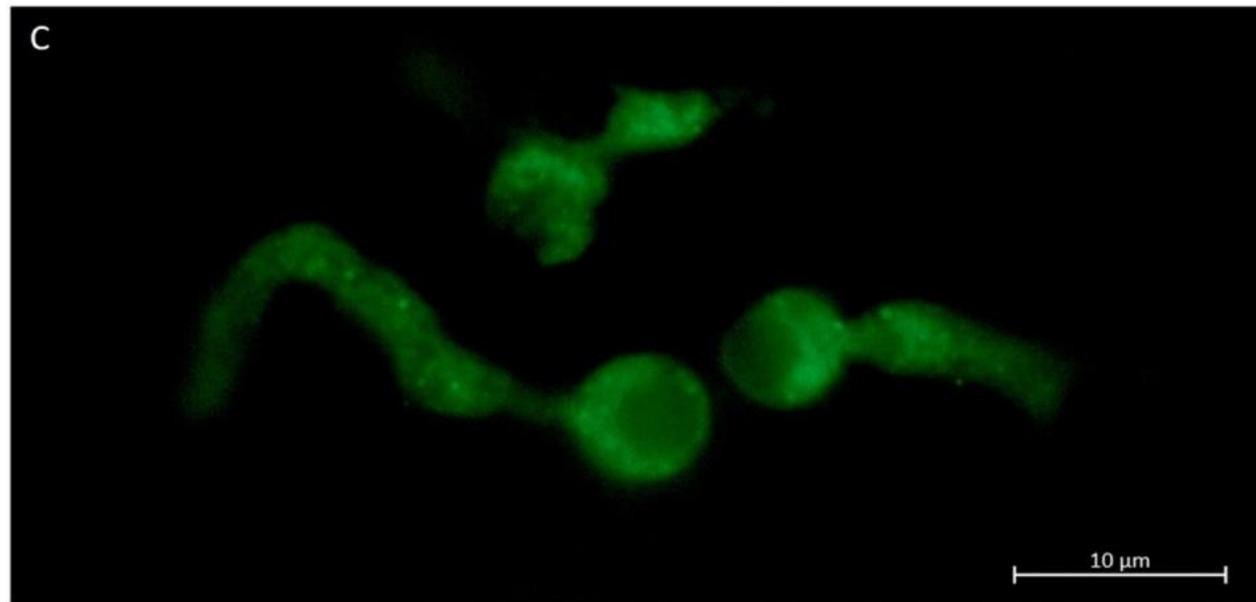
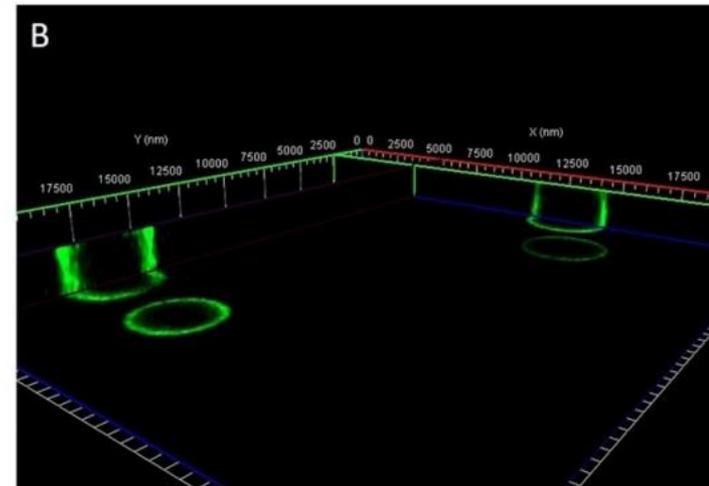
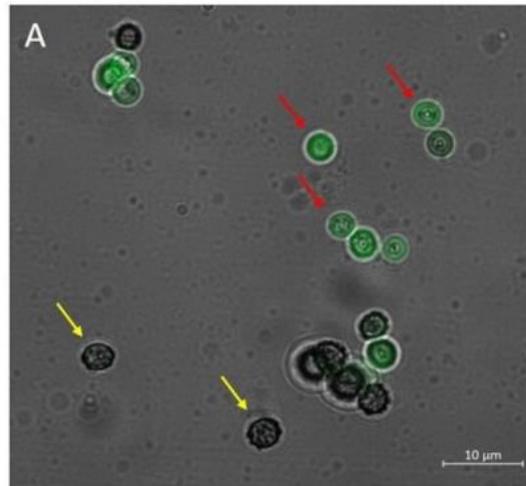
Uptake in cellule fungine

Incubazione con 15 mg l⁻¹ PLGA NPs

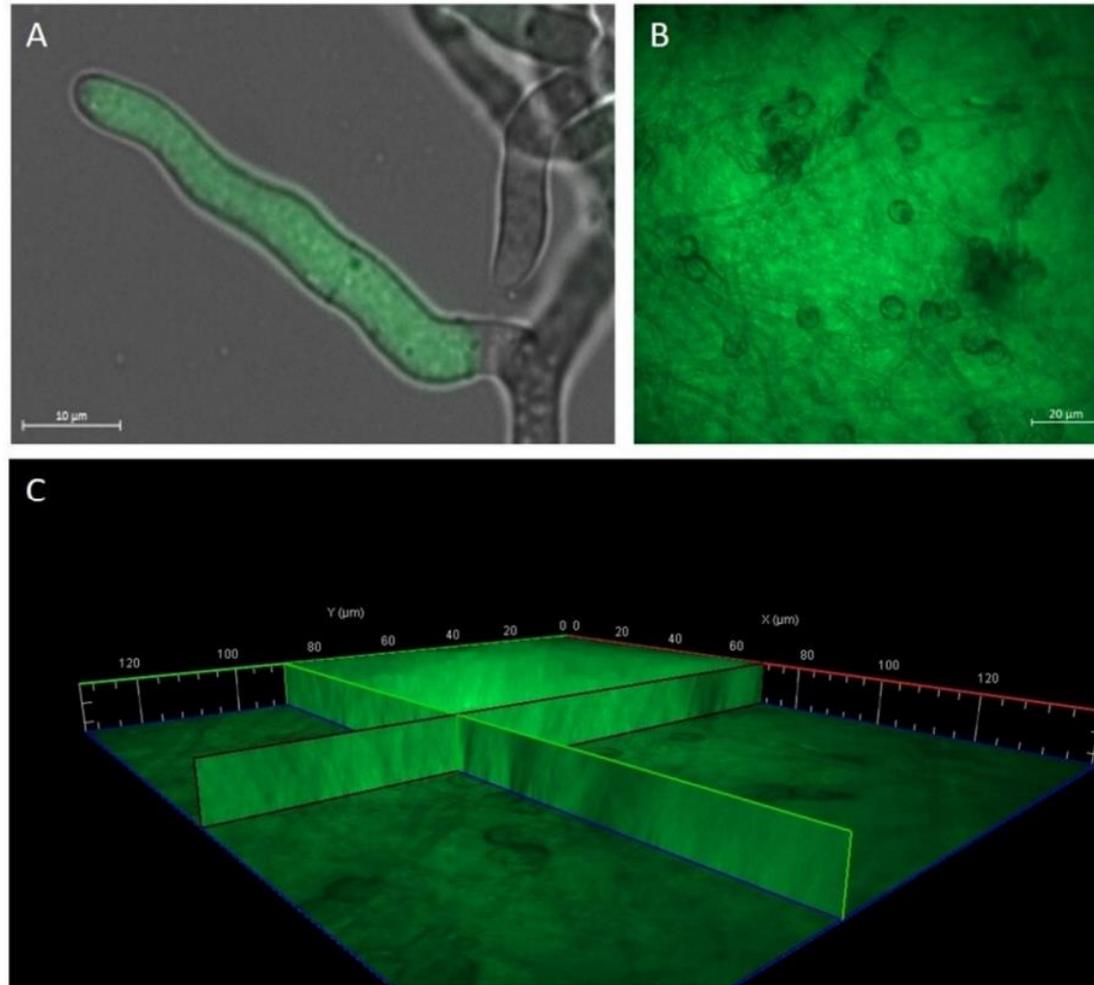


Osservazione a 1-5 minuti:
Segnale intenso in corpi sferici
di aspetto vescicolare

I conidi di *A. brasiliensis* sono stati trattati con 0,1 mg/ml di NPs e osservati al microscopio aphotome dopo 10 e 60 minuti dalla somministrazione. NPs di PLGA di 50 nm interagiscono con i conidi di *A. brasiliensis* in base alla loro morfologia. In un primo stadio di sviluppo dei conidi (freccia gialla) l'envelope protettivo non permette l'interazione con le NPs. In uno stadio di sviluppo successivo, (freccia rossa), quando l'envelope si rompe, le NPs interagiscono con i conidi, come si osserva dalla fluorescenza lungo la capsula dei conidi.

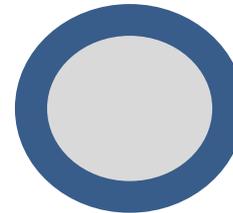


stesso trattamento è stato effettuato sul micelio e sul biofilm di *A. brasiliensis*, e le osservazioni al microscopio sono state condotte dopo 60 minuti dalla somministrazione delle NPs. L'immagine merge campo chiaro fluorescenza mostra chiaramente la localizzazione delle PLGA-NPs caricate con cumarina 6, all'interno dell'ifa fungina. Inoltre le NPs riescono a diffondere attraverso la matrice extracellulare polisaccaridica del biofilm, come si osserva nell'immagine B. Dalla ricostruzione 3d all'Apotome il segnale fluorescente è stato rilevato lungo tutto lo spessore della matrice del biofilm.

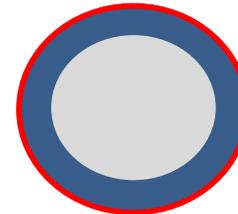


Ruolo della carica superficiale

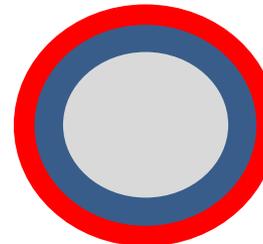
Guscio in PLGA: carica superficiale NEGATIVA



Guscio in PLGA e sottile strato di chitosano: carica superficiale NEUTRA



Guscio in PLGA e spesso strato di chitosano: carica superficiale POSITIVA



Conclusioni

- PLGA NPs attraversano la parete e la membrana delle cellule vegetali (*Vitis vinifera*) e fungine (*Botrytis cinerea*; *Aspergillus* spp.) in relazione alla carica superficiale delle particelle
- PLGA NPs non attraversano il tonoplasto, accumulandosi al livello citoplasmatico ma non vacuolare, suggerendo come meccanismo d'internalizzazione le vie di endocitosi
- PLGA NPs sono potenzialmente in grado di attraversare i tessuti di plantule di *V. vinifera*

