

# CORSO DI BIOTECNOLOGIE CELLULARI VEGETALI E MICROBICHE



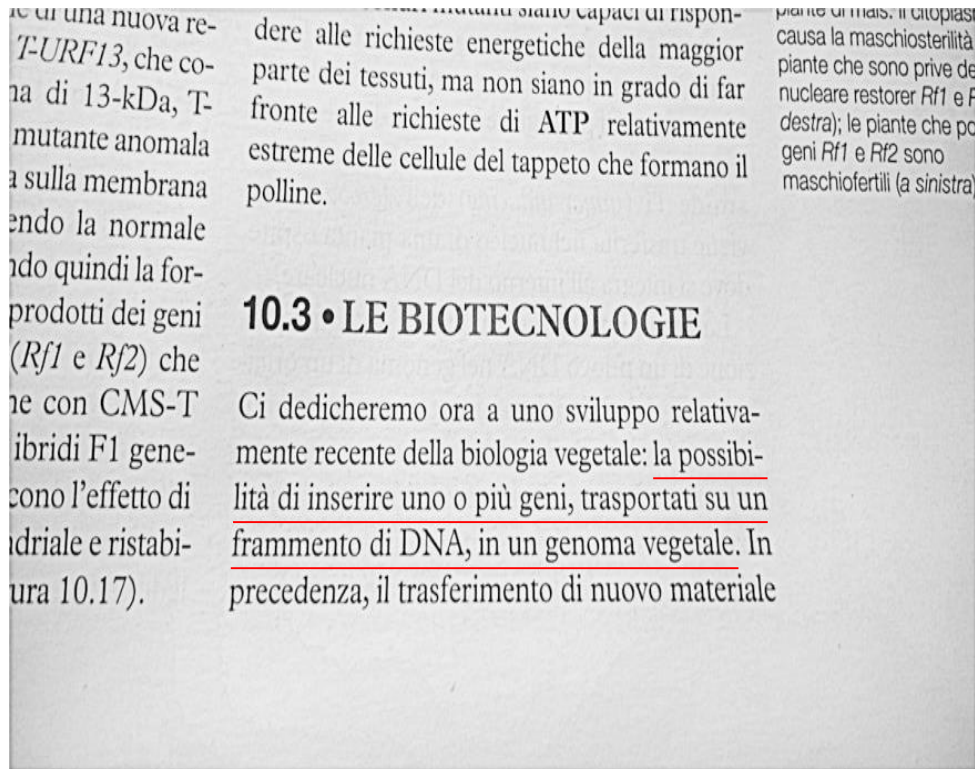
# PROGRAMMA DEL CORSO

- **MODULO VEGETALE.** Concetto di totipotenza delle cellule vegetali. Parallelismi e differenze tra cellule staminali vegetali e animali. Concetto di clone cellulare e ottenimento di piante clonate. Variazione somaclonale. Variazioni genetiche ed epigenetiche derivate dalla coltura in vitro. Isolamento, sterilizzazione ed inoculo di espianti. Terreni di coltura: ruolo dei macro e microelementi, delle vitamine, degli zuccheri, dei regolatori di crescita e del pH. Fattori fisici: luce e temperatura. Colture cellulari in mezzo semisolido, liquido e in bioreattore. Test di vitalità cellulare. Tecniche per valutare la crescita cellulare. La cellula vegetale come biofabbrica di composti bioattivi di interesse farmacologico, agroalimentare e cosmetico. Tecniche per aumentare la produttività: selezione di linee cellulari, elicitazione, biotrasformazione ed ingegneria metabolica. Ottenimento e coltura di protoplasti. Fusione di protoplasti ed ottenimento di piante ibride. Rigenerazione di organi sia per la produzione di composti bioattivi che per la propagazione di piante di interesse economico: agroalimentare e ornamentale. Embriogenesi somatica e induzione di piante aploidi. Produzione di semi sintetici. Tecniche di conservazione del germoplasma vegetale per la salvaguardia delle piante a rischio di estinzione.

- **MODULO MICROBICO.** Generalità sulle fermentazioni e sui prodotti delle biotecnologie microbiche. Caratteristiche dei microrganismi di interesse biotecnologico. Terreni di coltura, materie prime, fermentatori. Le cellule microbiche per la produzione di biomasse, di proteine, di metaboliti. Aspetti attuali delle fermentazioni classiche. Ingegneria metabolica. Produzione di metaboliti secondari. Produzione di enzimi e proteine eterologhe. Antibiotici. Caratteristiche dei ceppi industriali e loro miglioramento. Tecniche di mutagenesi-selezione e mutagenesi-screening. Miglioramento con tecniche di ingegneria genetica e cenni di ingegneria metabolica. Problematiche della conservazione dei ceppi industriali. I più importanti prodotti di fermentazione: metaboliti primari e secondari; bioetanolo; acido lattico; amminoacidi; insetticidi microbici. Produzione di proteine ricombinanti e loro problematiche: scelta dell'ospite, vettori, stabilità plasmidica e numero di copie, secrezione. Principali esempi.
- **TESTI CONSIGLIATI: Modulo 1)** Biologia Cellulare e Biotecnologie Vegetali di Gabriella Pasqua et al. Ed. PICCIN; **Modulo 2)** Biotecnologie Microbiche di Donadio-Marino Ed. CEA. Saranno forniti dal docente anche materiale delle lezioni ed articoli scientifici di approfondimento.

# Biotecnologie

## cosa sono?



Biotecnologie =  
Ingegneria genetica

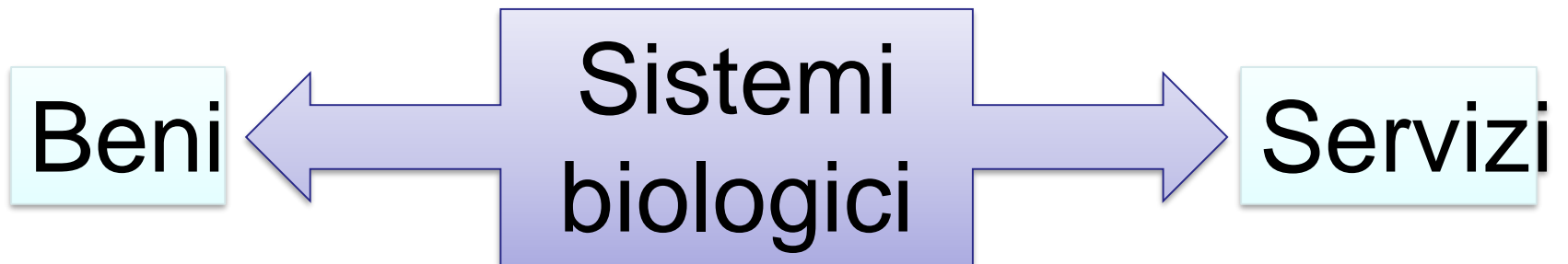


*Errato!*

# Biotecnologie

cosa sono?

Le tecniche che permettono lo **sfruttamento di sistemi biologici** al fine di produrre **beni e servizi**

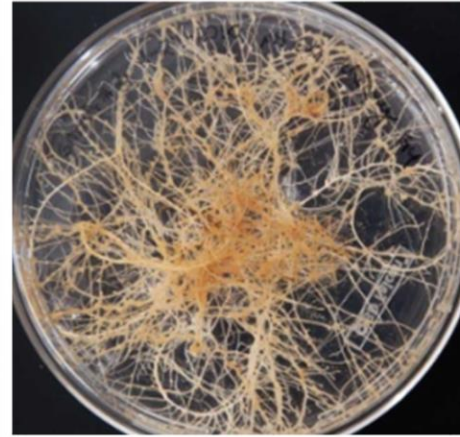


# ... sistemi biologici?

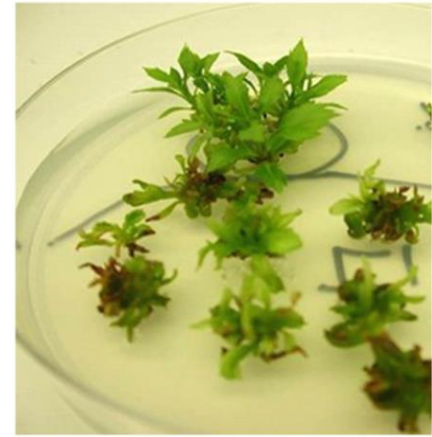
Piantine rigenerate *in vitro*



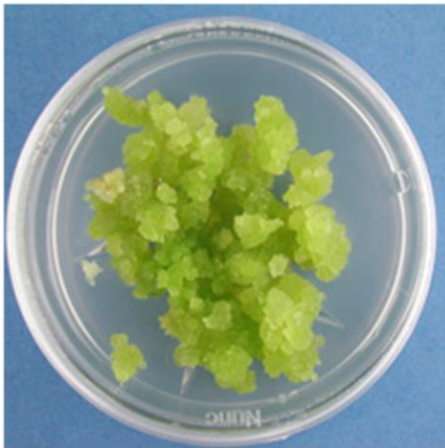
Coltura di radici



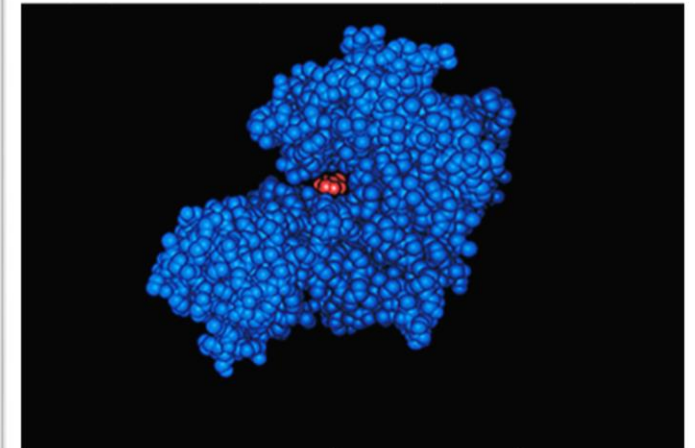
Coltura di germogli



Colture cellulari in mezzo solido e liquido

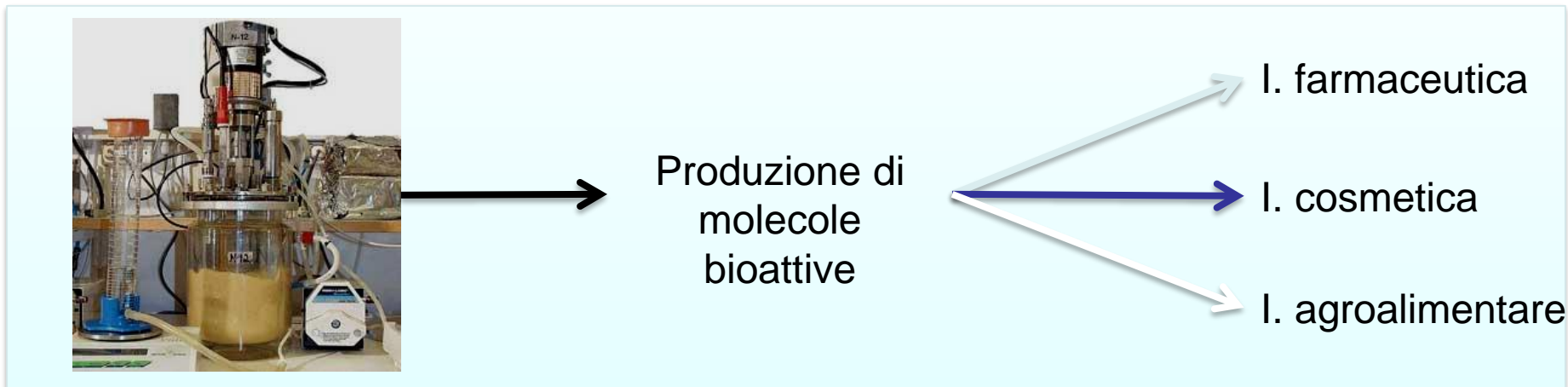
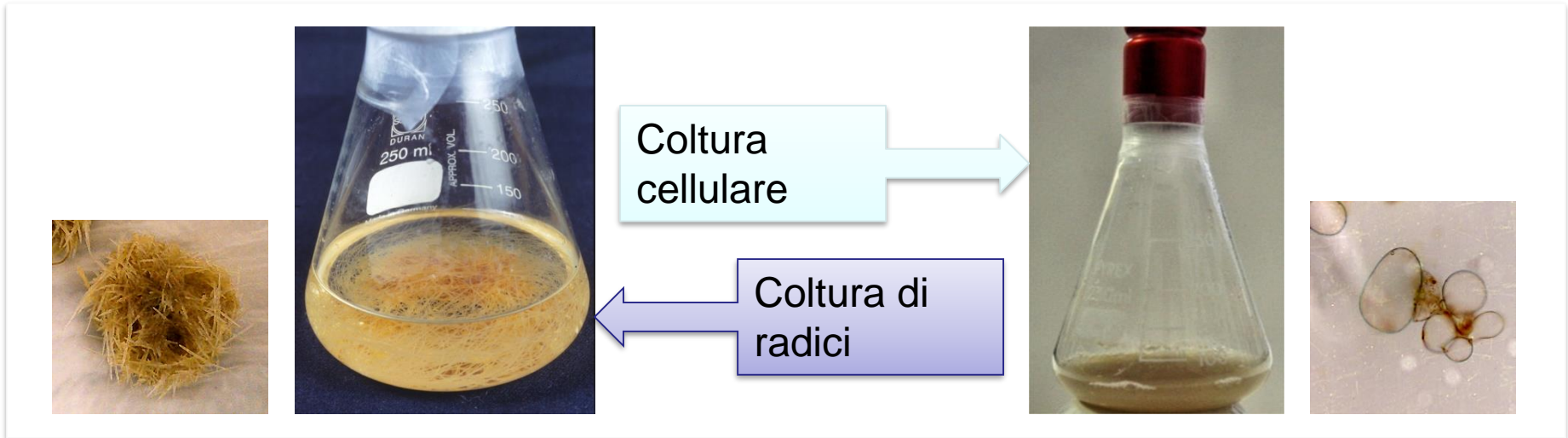


Proteina enzimatica



# Coltura *in vitro*

produzione di composti bioattivi



# Biotecnologie microbiche

antiche, ma sempre attuali!





# Antiche

... sì, ma quanto?

**4.000 a.C.** → In **Cina** si utilizzano batteri per la produzione di **yogurt** e **formaggio**



**6.000 a.C.** → In **Egitto** si utilizzano i lieviti per la produzione di **vino**, **birra** e **pane**

# L'uomo utilizza le biotecnologie da migliaia di anni...

## MESOLITICO

Economia basata su caccia e raccolta



## NEOLITICO

Economia basata su coltivazione e allevamento



**CACCIATORE/RACCOGLITORE → ALLEVATORE/COLTIVATORE**

**Domesticazione  
10.000-11.000 a.f.**

# Domesticazione

Modificazione degli organismi da selvatici a domestici

Conseguenze  
sull'uomo

Commercio

Struttura sociale

Scrittura

Conseguenze  
sulle specie domesticate

Perdita/acquisizione di  
caratteri  
Simbiosi mutualistica  
obbligata

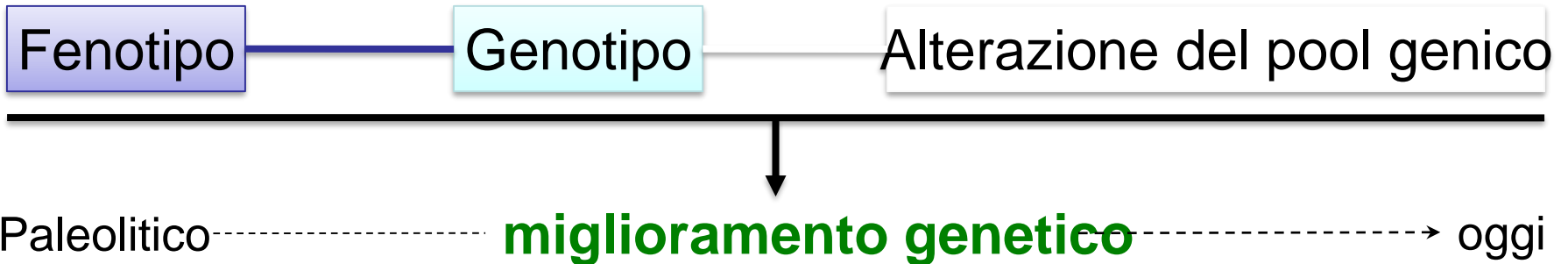
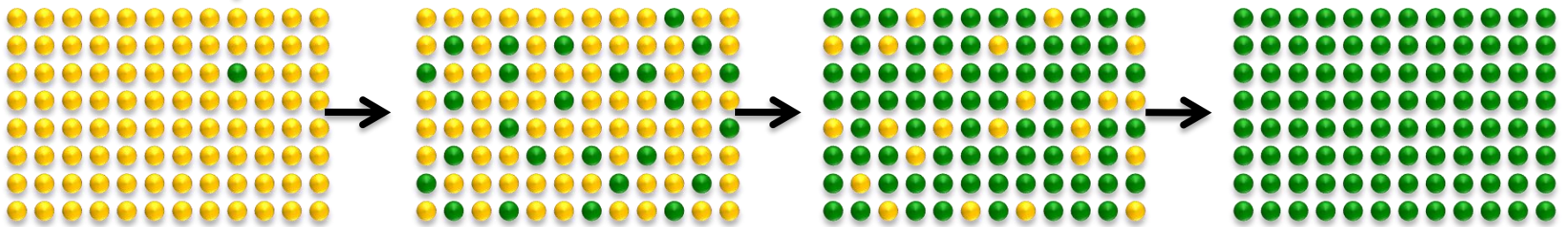


# Domesticazione

Selezione artificiale

Selezione degli  
individui con caratteri  
desiderabili

Moltiplicazione



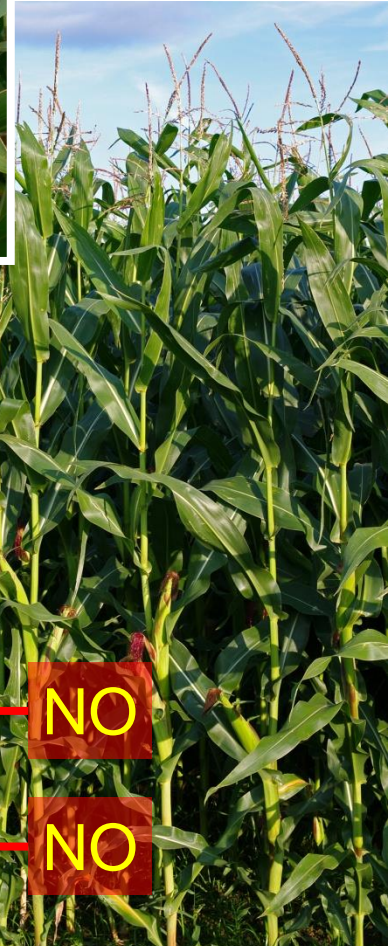
# Domesticazione

## selezione dei mutanti

Teosinte



Mais



Messico centrale



9000 a.f.

SI

Dispersione semi

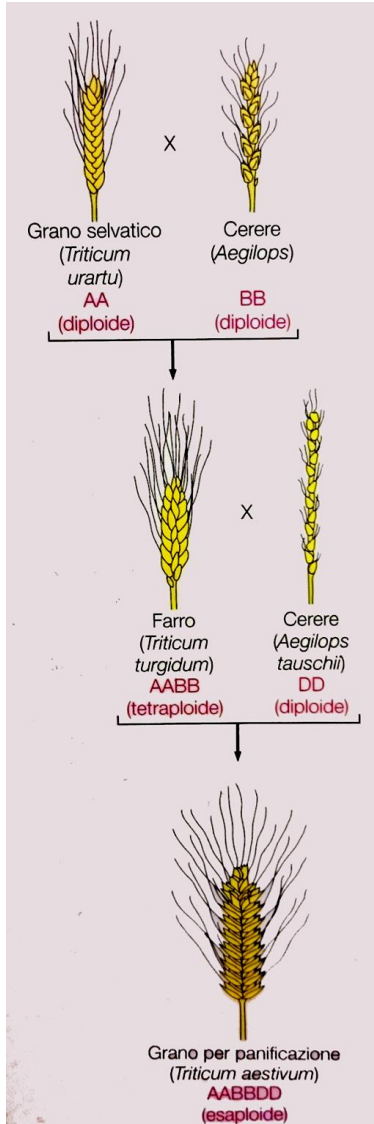
NO

SI

Dormienza semi

NO

# Domesticazione ibridazione



# Biotecnologie tradizionali e moderne

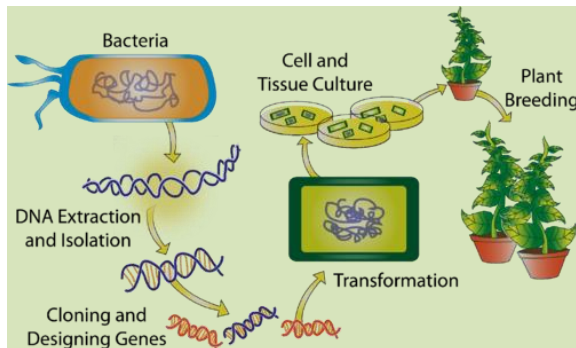
## Biotecnologie convenzionali (o tradizionali)

(produzione di vino, birra, pane, distillati, formaggio, etc.)



## Biotecnologie avanzate (o moderne)

(utilizzano tecniche di ingegneria genetica e biologia molecolare per la selezione di nuovi organismi e l'ottenimento di nuovi prodotti)




# Tecnologia del DNA ricombinante

il superamento delle barriere riproduttive

Ingegneria genetica = tecnologia del DNA ricombinante



Tecniche che permettono di isolare, clonare e inserire geni in un ospite eterologo



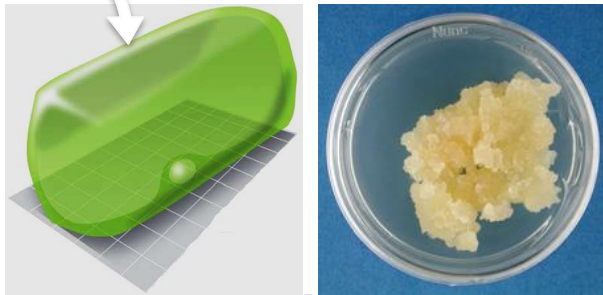
- Possibilità di trasferire materiale genetico tra specie incapaci di ibridarsi
- Maggiore precisione nel trasferimento genico



# Ingegneria genetica

## i vantaggi della **totipotenza**

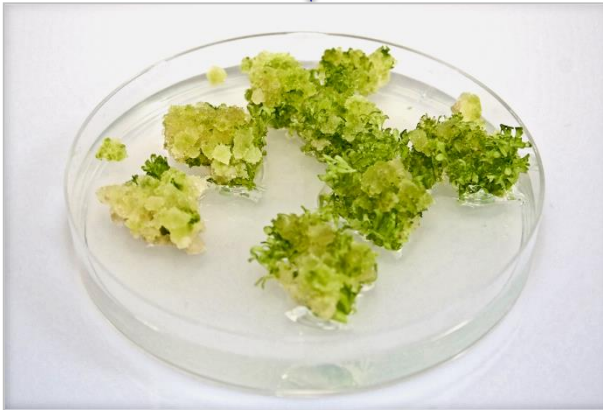
Transgene



Cellula

Callo

Caulogenesi (*Citochinine*)



Germogli

Rizogenesi (*Auxine*)



Acclimatazione



Plantule

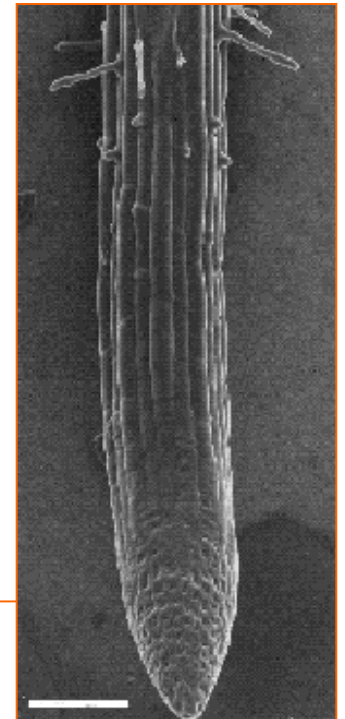
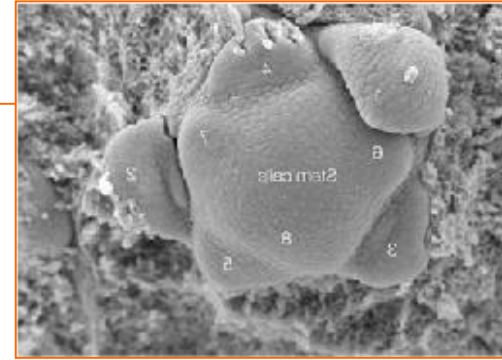
Accrescimento indeterminato  
e determinato

Differenza morfologica stadio  
giovanile e adulto nelle piante

Organizzazione modulare nelle  
piante non modulare nei  
vertebrati

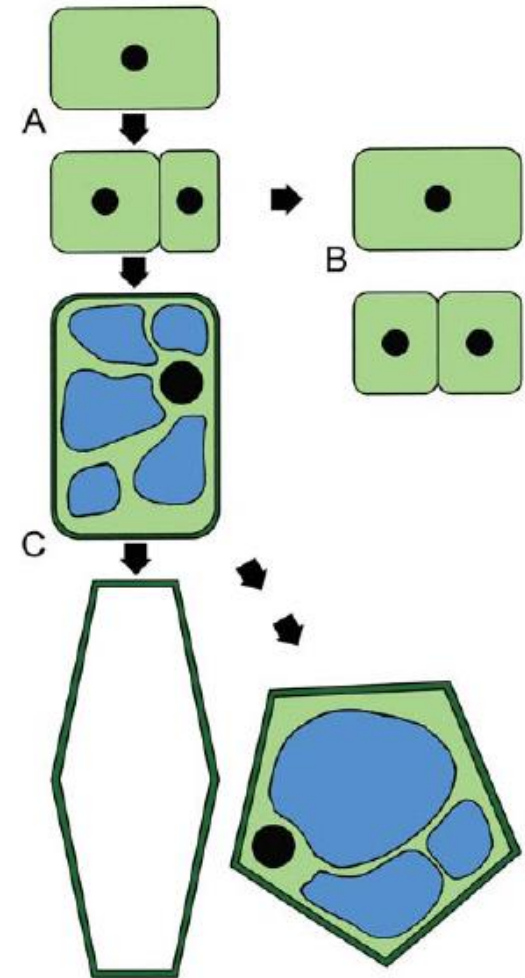


Una differenza fondamentale tra piante e animali è che nelle piante la formazione degli organi non avviene esclusivamente nell'embrione ma continua post-embriionalmente da regioni specializzate chiamate **meristemi**, dai quali origina tutta la struttura adulta della pianta, foglie fiori, fusto, e radici.



**Cellula staminale.** Cellula che si duplica continuamente producendo cellule figlie identiche a se stessa ma in grado di produrre anche cellule figlie con proprietà diverse.

**Automantenimento.** Cicli di divisione che generano a ripetizione almeno una cellule figlia equivalente alla cellula d'origine, con la capacità latente di poter differenziare. E' la proprietà che definisce le cellule staminali.



**Figura 8.2**

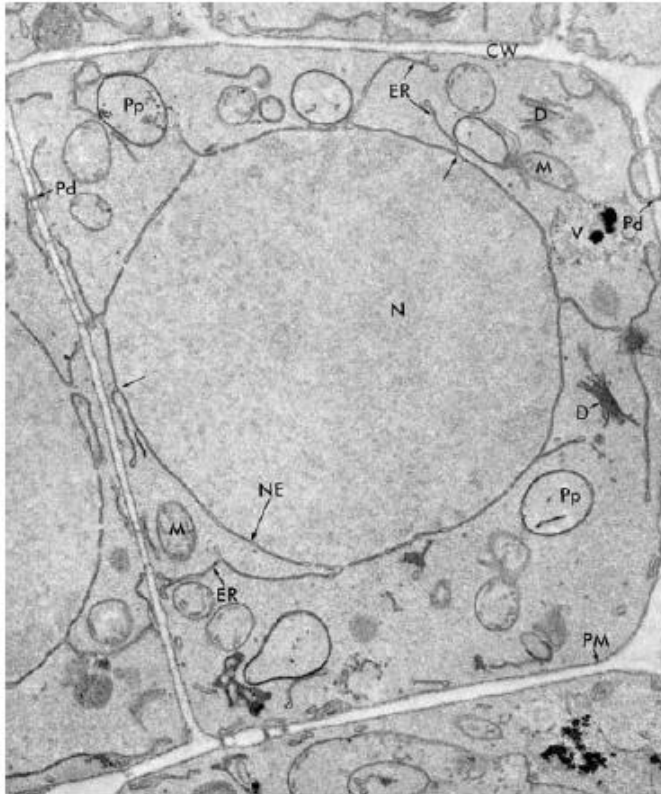
Da una cellula madre (A), per divisione mitotica, possono formarsi due cellule ineguali con un diverso destino: la più piccola (B) rimane meristematica e dopo l'accrescimento può ulteriormente dividersi, l'altra (C), più grande, dopo l'accrescimento per distensione e differenziamento, diventa una cellula adulta. Il differenziamento può portare alla morte della cellula che mantiene solo la parete, come avviene nelle cellule xilematiche e sclerenchimatiche, oppure, le cellule rimangono vive a maturità, come nel caso delle cellule parenchimatiche.

- **Totipotenza.** Autosufficienza nel formare un organismo intero, caratteristica dello ZIGOTE e di una cellula MERISTEMATICA delle piante non dimostrata in altri tipi cellulari dei vertebrati.

- **Multipotenza.** Linee cellulari in grado di specializzarsi unicamente in alcuni tipi di cellule. Nelle piante i meristemi secondari (cambio subero-fellodermico e cambio cribrovascolare)

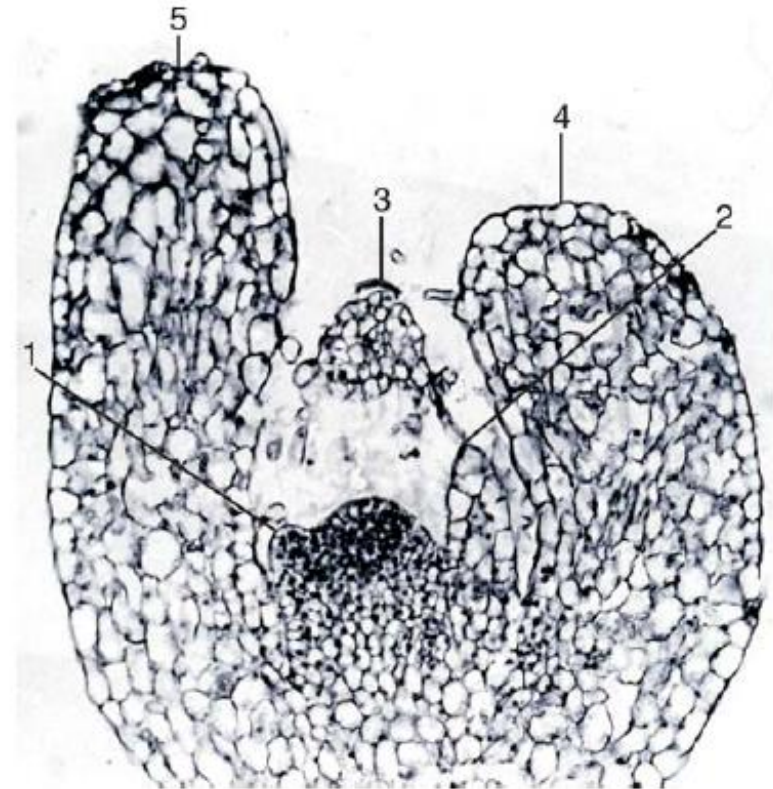
- **Unipotenza** capacità di generare solamente un tipo di cellula specializzata. Nelle piante cellule madri degli stomi, cellule dei peli radicali (effetto posizione). *In vitro* citodifferenziazione in cellule xilematiche

# I MERISTEMI



**Figura 8.1**

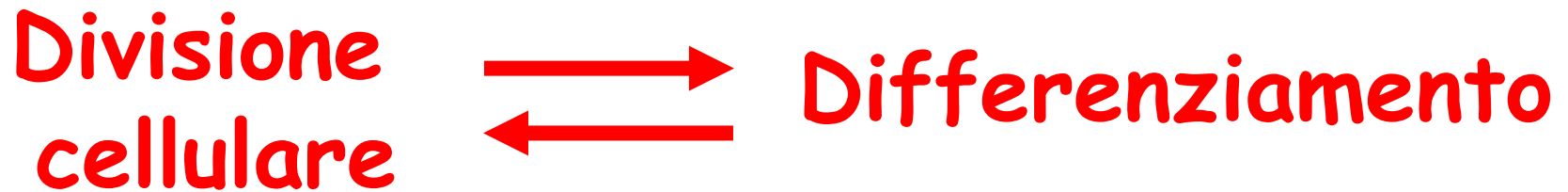
Immagine al microscopio elettronico di una cellula del meristema apicale. N nucleo, NE involucro nucleare, ER reticolo endoplasmatico, M mitocondri, Pp proplastidi, D dittiosomi, CW parete cellulare, Pd plasmodesmi, PM membrana plasmatica, V vacuolo (da Ledbetter e Porter).



**Figura 10.24**

Apice caulinare di tabacco (*Nicotiana tabacum*) in cui è possibile osservare una serie di primordi fogliari a diverso stadio di sviluppo, numerati a partire dal più giovane (osservazione di G. Pasqua e M. M. Altamura).

Ambedue i meristemi caulinare e radicale, e le cellule cambiali, contengono un gruppo di "cellule staminali" che si dividono in modo simmetrico o asimmetrico generando una cellula figlia che andrà in contro a differenziamento e una cellula che rimane staminale. L'instaurarsi di un equilibrio dinamico tra divisione cellulare e differenziamento è alla base del mantenimento della attività di un meristema.



# **Le principali “nicchie” staminali di un vegetale**

**Meristema della gemma apicale**

**Meristema dell'apice radicale**

**Meristema del fusto, o cambio**

**Meristema ascellare**

**Non solo le cellule meristematiche possono essere totipotenti ma possono diventarlo anche le cellule parenchimatiche, se opportunamente stimolate da regolatori di crescita e nutrienti**



# 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)

# TAPPE PER OTTENERE UNA COLTURA DI CELLULE VEGETALI



# Colture cellulari

Principali parametri chimico-fisici dell'ambiente colturale:

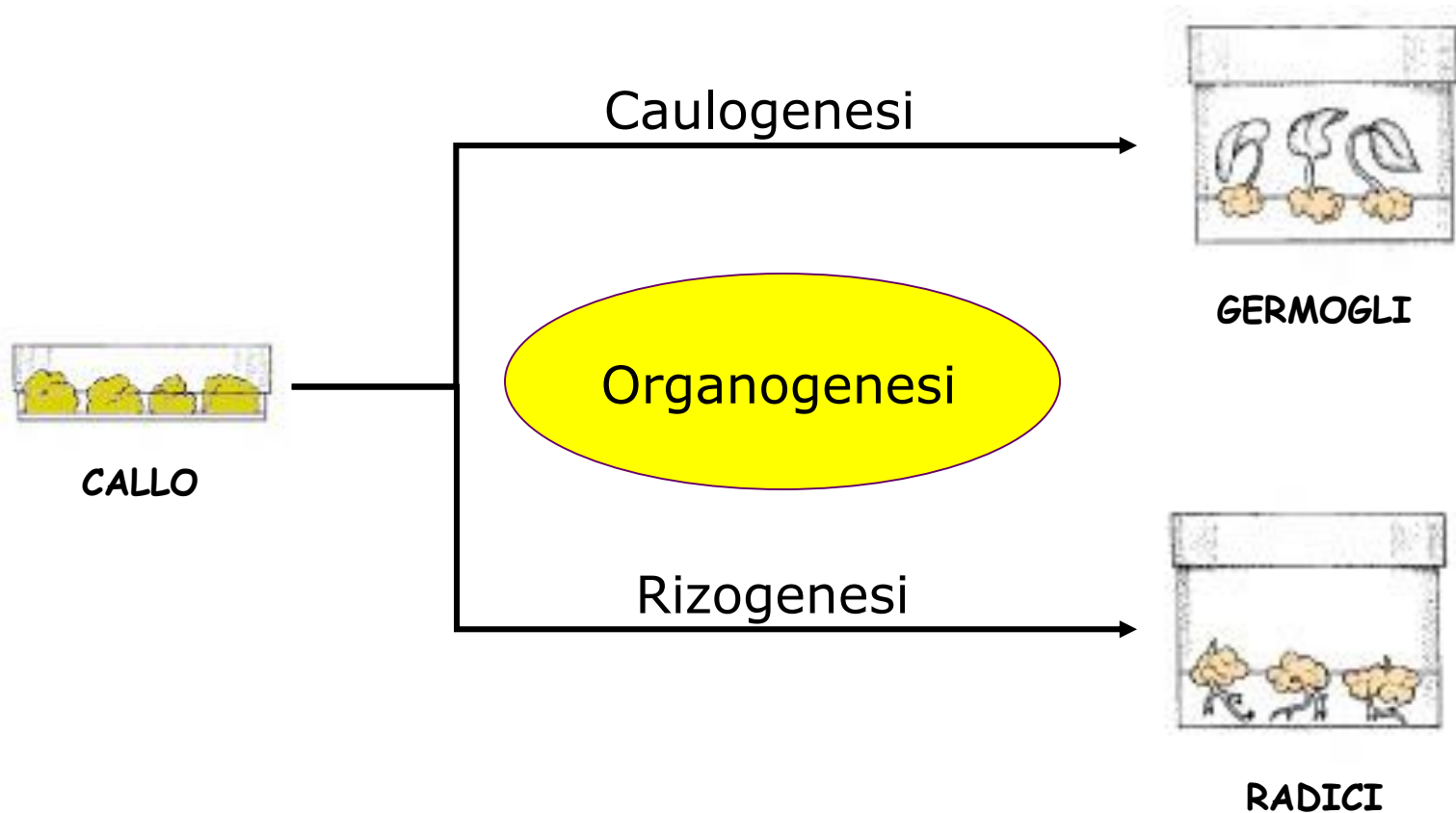


Cellule vegetali allevate in mezzo liquido

- **Luce** (composizione spettrale, intensità e fotoperiodo)
- **Temperatura**
- **Composizione chimica del mezzo** (nutrienti minerali, carboidrati, vitamine, regolatori di crescita)
- **Densità della popolazione cellulare** (numero di cellule per unità di volume)

# Organogenesi

Variando la concentrazione di ormoni, quali auxine e citochinine, si ottengono processi di organogenesi diversi

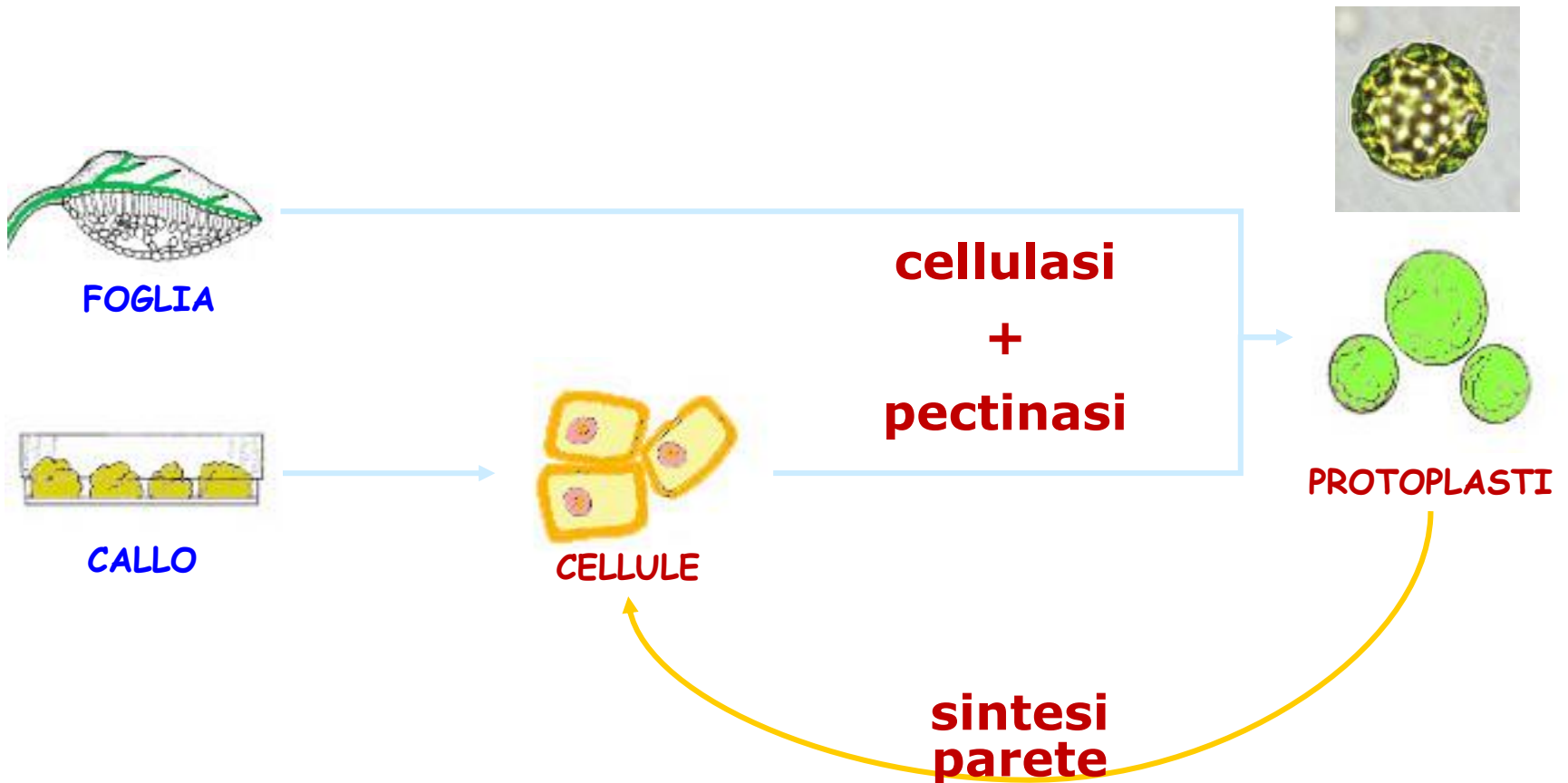


Components	Murashige-Skoog (1962)	White (1963)	Gamborg (1968)	Nitsch (1951)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-	-	134	-
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	720	500	250
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	-	200	-	-
KCl	-	65	-	1,500
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	-	150	25
$\text{KNO}_3$	1,900	80	3,000	2,000
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	-	300	-	-
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1,650	-	-	-
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	-	16.5	150	250
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170	-	-	-
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8	-	27.8	-
$\text{Na}_2\text{EDTA}$	37.3	-	37.3	-
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3	7	10 (1 $\text{H}_2\text{O}$ )	3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6	3	2	0.5
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	-	0.025	0.025
$\text{H}_2\text{SO}_4$	-	-	-	0.5
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	-	2.5	-	-
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	-	0.025	-
$\text{FeC}_6\text{O}_5\text{H}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	-	-	-	10
KI	0.83	0.75	0.75	0.5
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6.2	1.5	3	0.5
$\text{Na}_2\text{M}_0\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25	-	0.25	0.25

Components	Murashige-Skoog (1962)	White (1963)	Gamborg (1968)	Nitsch (1951)
Sucrose	30,000	20,000	20,000	50,000
Glucose	-	-	-	or 36,000
Myo-Inositol	100	-	100	-
Nicotinic Acid	0.5	0.5	1.0	-
Pyridoxine HCl	0.5	0.1	1.0	-
Thiamine HCl	0.1-1	0.1	10	1
Ca-Pantothenate	-	1	-	-
Biotin	-	-	-	-
Glycine	2	3	-	-
Cysteine HCl	-	1	-	10

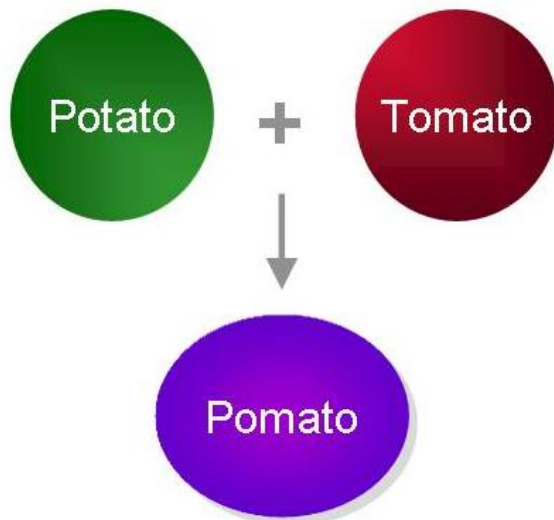
# Colture di protoplasti

Mediante digestione enzimatica è possibile ottenere protoplasti da cellule in coltura o da tessuti vegetali (in genere foglie)

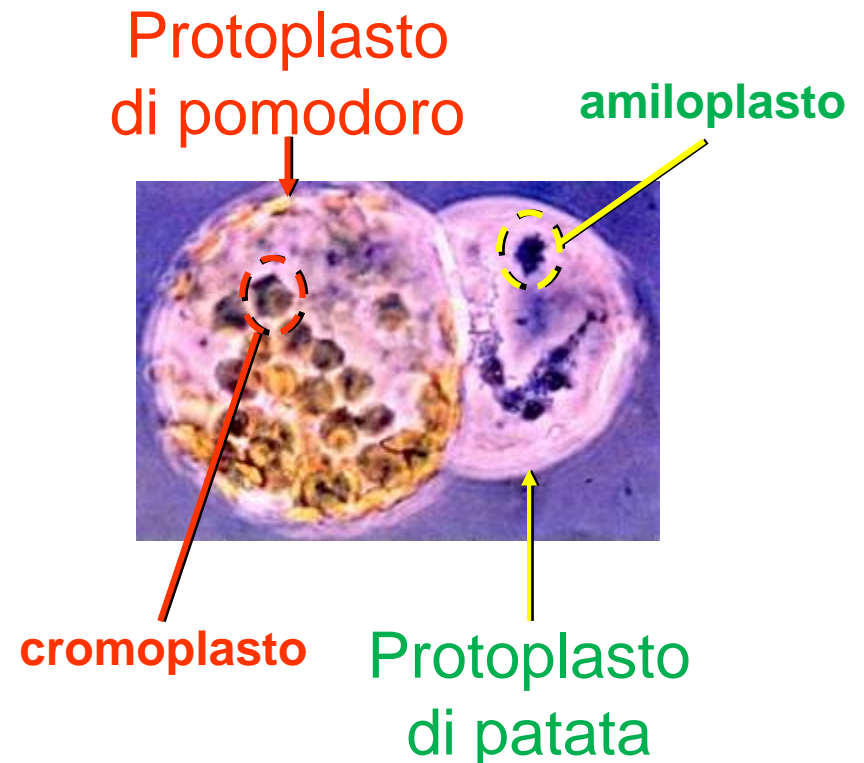


# Colture di protoplasti

I protoplasti di diverse specie possono essere indotti a fondersi. Il prodotto della fusione (ibrido somatico) sommerà in sé le caratteristiche genetiche delle cellule originali.

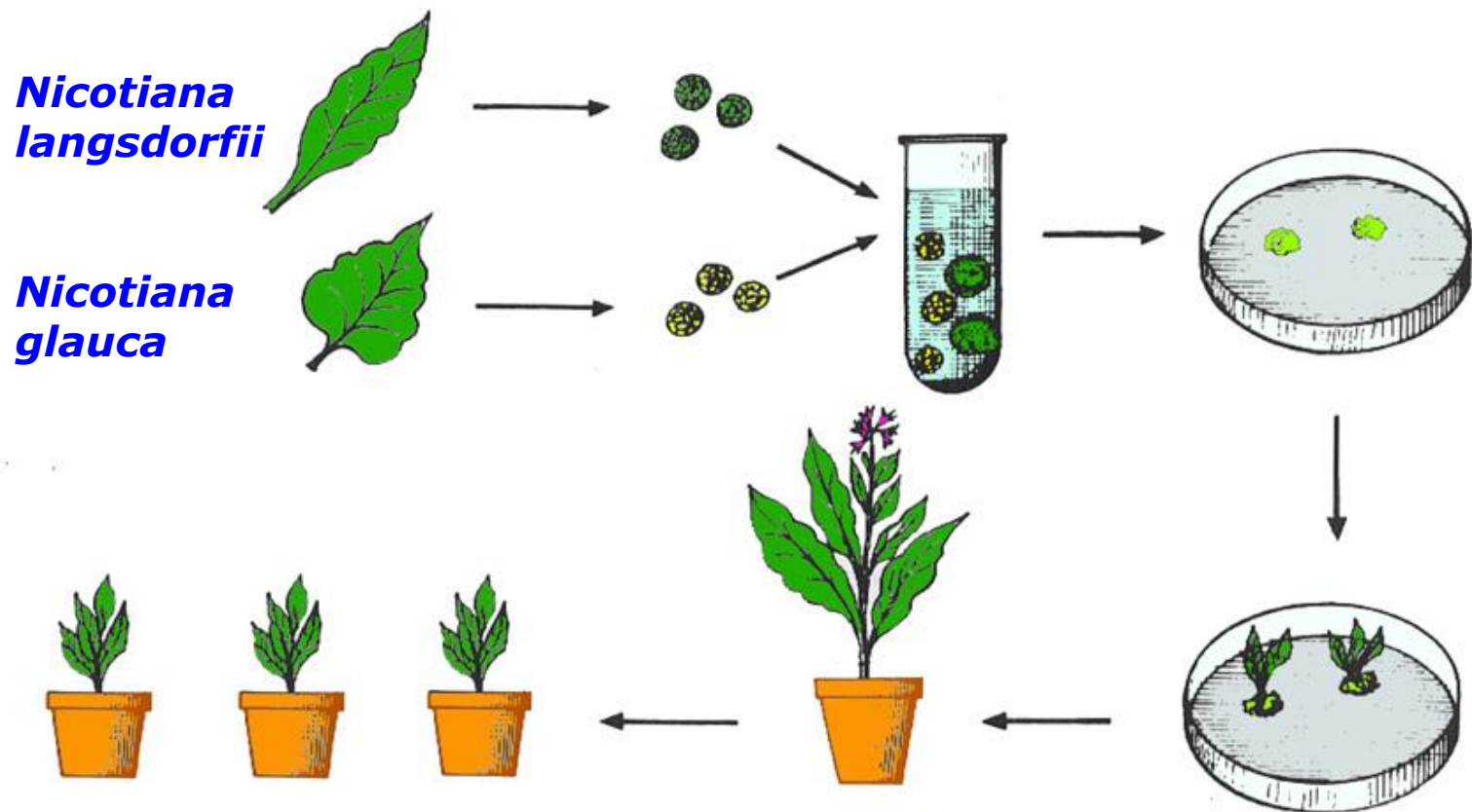


**Ibrido somatico di due generi appartenenti alla famiglia delle Solanaceae**



# Colture di protoplasti

Dai protoplasti ibridi possono essere rigenerate intere piante.



Ibrido somatico di due specie appartenenti allo stesso genere (*Nicotiana*)



# Propagazione clonale

Gli individui ottenuti mediante *propagazione clonale* sono *identici geneticamente*

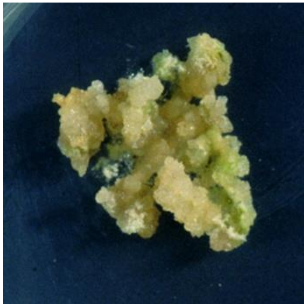
**La propagazione clonale mediante coltura di tessuti può essere effettuata seguendo tre metodologie:**

- 1. Rigenerazione da callo o da protoplasti**
- 2. Embriogenesi somatica**
- 3. Moltiplicazione di germogli**

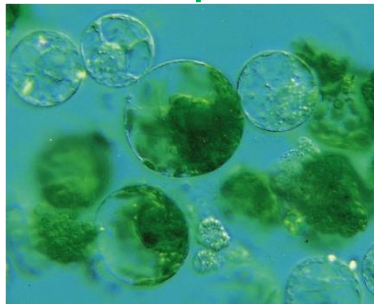
# Propagazione clonale:

*rigenerazione da callo o da protoplasti*

Callo



Protoplasti



Plantula



Caulogenesi (*Citochinine*)



Germogli

Rizogenesi  
(*Auxine*)

La plantula rigenerata può essere messa a dimora se il sistema vascolare delle radici è connesso con quello del germoglio

# Propagazione clonale:

*moltiplicazione di germogli*



Trattamento  
con  
citochine



- Separazione dei germogli
- Radicazione



Messa a  
dimora

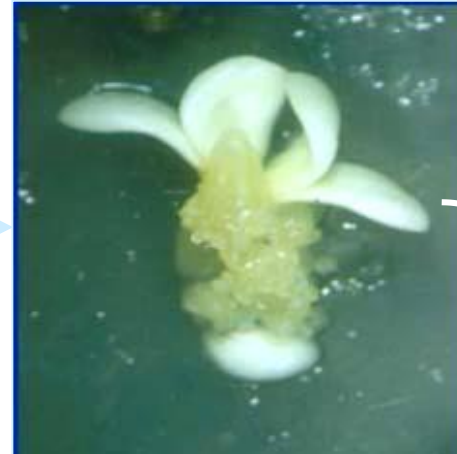


# Propagazione clonale:

## *Embriogenesi somatica*



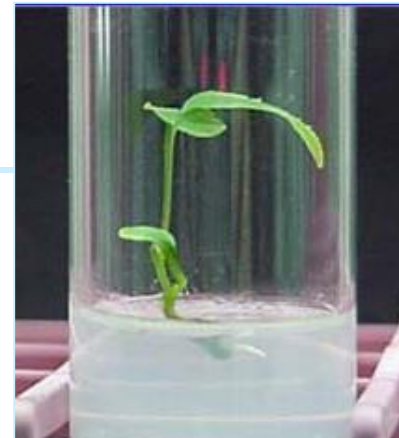
Callo



Embione somatico



Pianta



Plantula

# Colture cellulari

