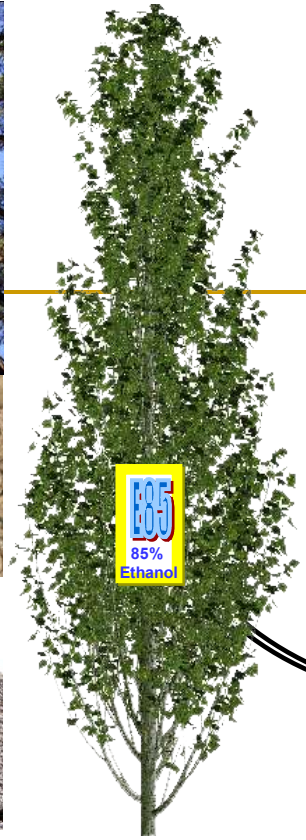
Alberi e foreste per una società sostenibile e delle biorisorse

Giuseppe Scarascia Mugnozza e Antoine Harfouche
(Dipartimento per la innovazione nei sistemi biologici, agroalimentari e forestali (DIBAF), Università della Tuscia)

Giuseppe Scarascia Mugnozza
(Dipartimento di Agronomia, Foreste e Territorio, Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura (CRA))



Foreste e Biotecnologie
Roma, 22 Giugno 2011

Biotecnologie forestali: stato, tendenze e potenziali applicazioni

- La seconda parte della presentazione esplora il potenziale delle biotecnologie applicate agli alberi e ai sistemi forestali per la produzione di bio-risorse e la mitigazione ambientale

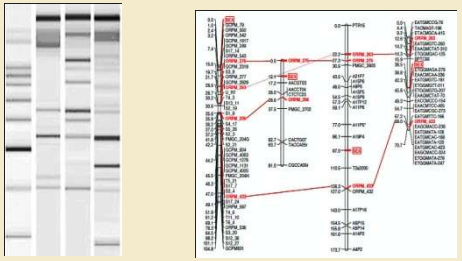
Le biotecnologie forestali sono riconducibili a quattro aree principali:

1. Riproduzione vegetativa

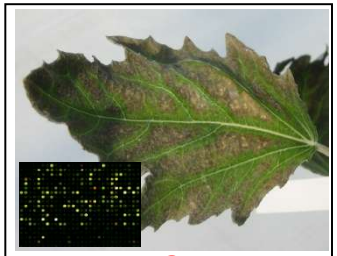
Talee
Pinus taeda, NC, USA, S. McKeand

Innesto
Pinus taeda, NC, USA, S. McKeand

Embriogenesi somatica
Picea abies, Swee Tree, Svezia



2. *Breeding* assistito dall'uso di marcatori molecolari

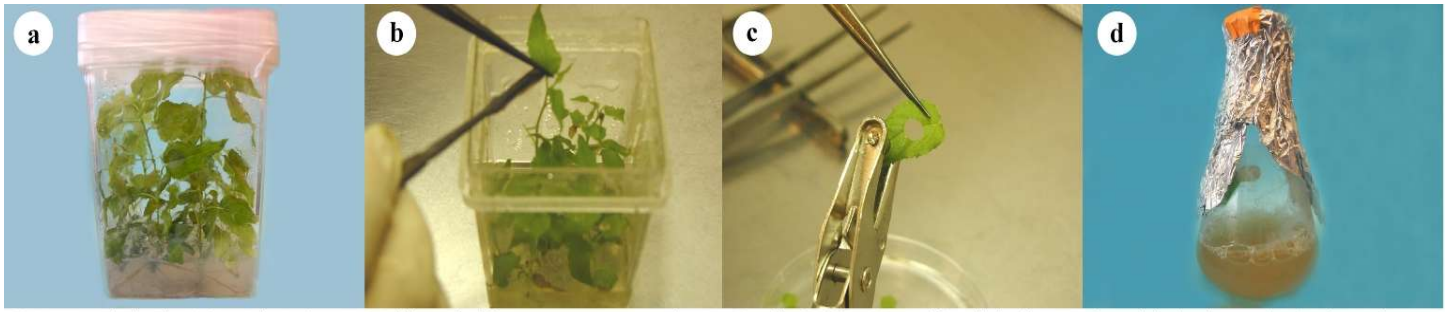


3. Omics

4. Ingegneria genetica

***Breeding* tradizionale**
Pinus taeda, NC, USA, S. McKeand — *Populus spp.*, Viterbo, Italia, M. Sabati

Trasformazione / rigenerazione

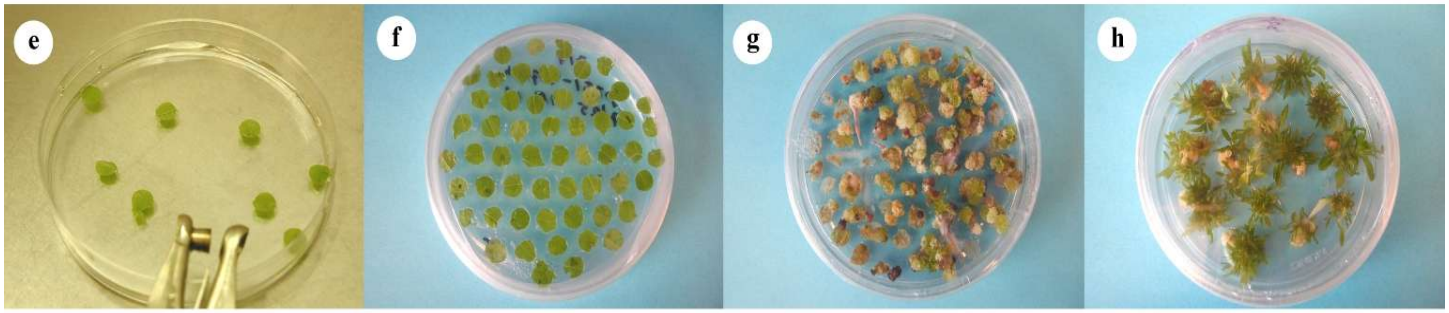


Non-transgenic plant in a Magenta box. Source of explants for co-cultivation.

Excising a leaf from an *in vitro*-grown plant. Done in a laminar flow hood.

Punching leaf discs. Done with sterile implements in a laminar flow hood.

Overnight (stationary-phase) culture of *Agrobacterium tumefaciens*.

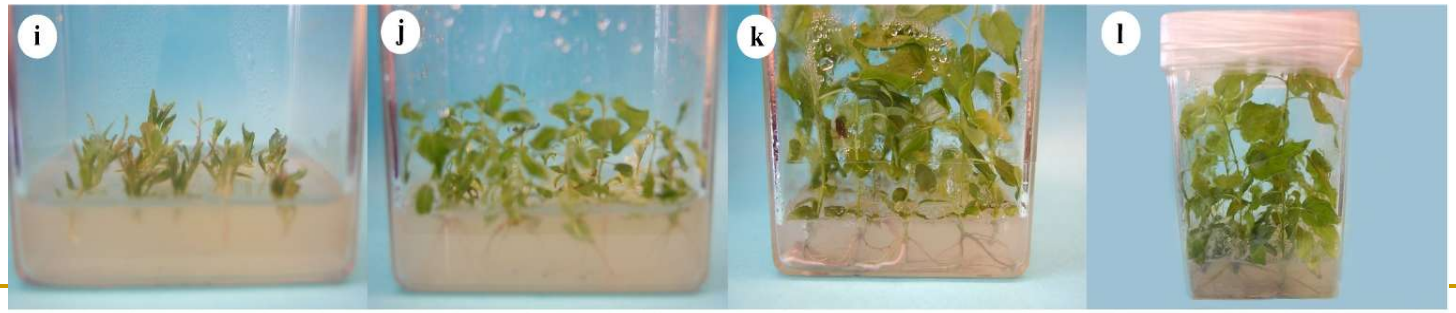


Leaf discs floated on *Agrobacterium tumefaciens* suspension.

Leaf discs aligned on callus-induction media (CIM) after co-cultivation. Photo taken 2 days after plating. Note bacterial growth (white) on margins of discs.

Callus production on leaf disc explants. Green sectors represent cells that survived exposure to the selection agent.

Shoots induced on leaf disc explants. Done in the presence of a selection agent.



Excised shoots inserted into root-induction media (RIM).

Roots beginning to form on excised shoots. Done in the presence of a selection agent.

Extensive root production on excised shoots.

Fully regenerated transgenic plants growing in a Magenta box.

Courtesy of R. Meilan, Purdue University, USA

L'ingegneria genetica è uno strumento prezioso per il *breeding* degli alberi forestali

- Le specie forestali presentano dei problemi:
  - il lungo tempo di generazione, che rende molto difficoltoso l'ottenimento delle segregazioni
  - le grandi dimensioni del genoma
  - un'eterozigosi alta che rende il *breeding* lento e impreciso
- La cisgenesi può essere di grande aiuto
  - Con la cisgenesi si trasferiscono geni ottenibili solo da specie sessualmente compatibili con la specie da modificare e includendo regioni del promotore e terminatore. Si tratta di una copia completa del DNA di un gene naturale
- La cisgenesi è un altro metodo in cui gli ingegneri genetici e "breeders" possono lavorare insieme per migliorare geneticamente gli alberi forestali

Paesi attivi nella ricerca e nello sviluppo degli alberi biotech

Belgio
Francia
Germania
Svezia
Norvegia
Finlandia
Spagna
Gran Bretagna
Polonia

Cina
Giapone
India
Indonesia
Australia
Nuova Zelanda

Sud Africa

Cile
Brasile

Nuova Zelanda

Prova di campo di alberi modificati geneticamente

Table 1. Permits for field trials with transgenic trees in the USA, 1985-present[a]

Genetically engineered tree	Traits introduced into trees	Number of permits for field trials		Number of institutions	
		Issued	Pending	Public	Private
Poplar	Insect and bacterial resistance; herbicide tolerance; altered branching; bud dormancy; wood development; floral development; flowering time; gibberellin; lignin content and composition; light response; female and male sterility; improved digestibility; phytoremediation	26	1	16	11
Eucalyptus	Altered lignin biosynthesis; growth rate; sterility; cold tolerance	7			7
Pine	Altered growth rate	3	1		4
White spruce	Insect resistance	1		1	
American chestnut	Fungal resistance; herbicide tolerance	1	1	2	
American elm	Disease resistance	1	1	2	
Walnut	Herbicide tolerance; flowering control	5		5	
Sweetgum	Fungal, viral and insect resistance	3		1	2
Papaya	Viral resistance; delayed fruit softening	5		5	
Total		52	4	32	24

[a]Data are taken from the USDA-APHIS' Biotechnology Regulatory Services website (http://www.aphis.usda.gov/brs/status/relday.html), and are current as of September 15, 2010.

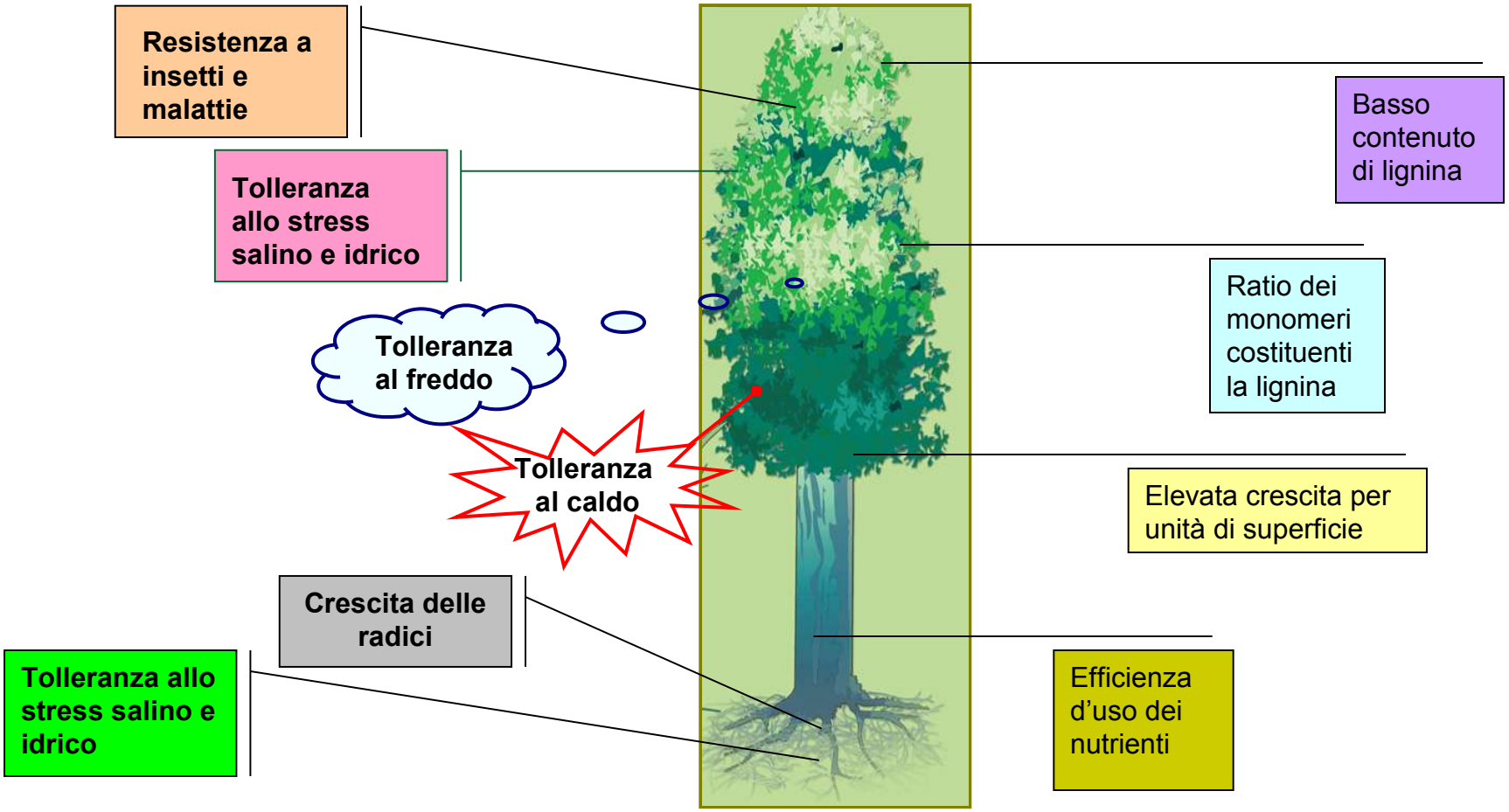
Table 2. Number of field trials with transgenic trees in Europe, 1991-present[a]

Genetically engineered tree	Country	Traits introduced into trees	Number of field trials	Number of institutions	
				Public	Private
Poplar	Belgium	Altered wood composition	1	1	
	France	Altered wood properties; sterility; lignin modification; herbicide tolerance	12	11	1
	Germany	Phytoremediation; herbicide tolerance; canopy form	5	5	
	Sweden	Faster growth; insect resistance	2	2	
	Norway	Growth	1	1	
	Spain	Faster growth	1	1	
	United Kingdom	Altered lignin biosynthesis	2		2
	Poland	Growth	1	1	
Eucalyptus	Spain	Marker system evaluation	1		1
	United Kingdom	Gene stability evaluation	1		1
Norway spruce, Scots pine and silver birch	Finland	Fungal and insect resistance; sterility	5	5	
Total			32	27	5

[a]Data are taken from the website of the EC Joint Research Centre (http://gmoinfo.jrc.ec.europa.eu), and are current as of September 15, 2010.

Harfouche, A., Meilan, R., and Altman, A. 2011. Tree genetic engineering and its application to sustainable forestry and biomass production. *Trends in biotechnology*, 29(1):9-17

Rilevanza delle biotecnologie nel miglioramento genetico delle colture dedicate alla bioenergia



La papaya delle Hawaii: Un esempio di coltura salvata dalle biotecnologie

Alberi di papaya severamente danneggiato dal ringspot virus

Papaya transgenico resistente ai virus per i quali non esistono soluzioni efficaci convenzionali

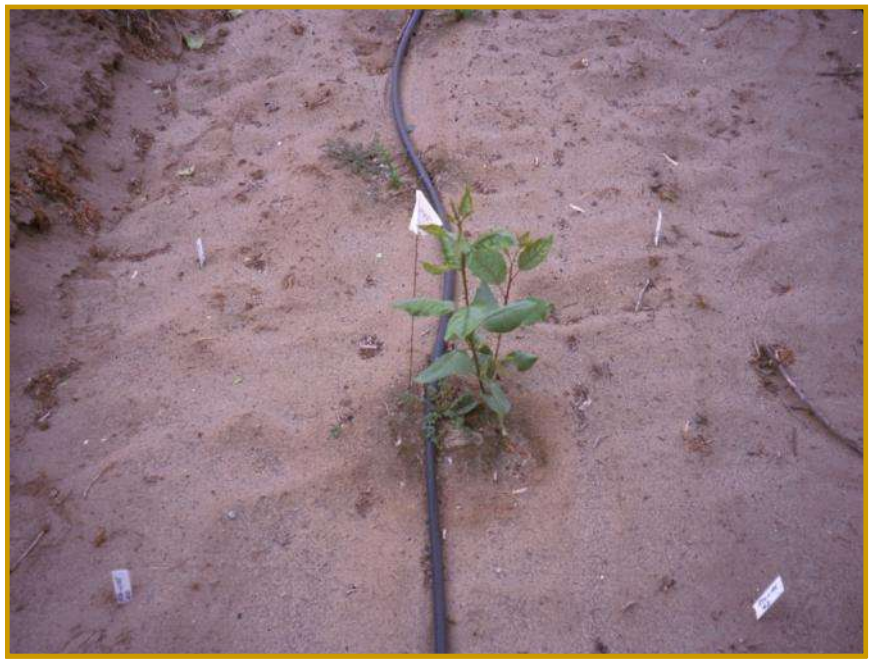
Source: S. Ferreira & D. Gonsalves

L'ingegneria genetica gioca un ruolo importante nella domesticazione degli alberi forestali complementando il *breeding* tradizionale

- Molti anni impegnati in selezione ed allevamento
- Imprevisti (suscettibilità ai patogeni)
- Molto tempo perso e fatiche investite

Il pioppo transgenico tollerante all'erbicida ha un costo inferiore ed é più efficace nel controllo delle erbe infestanti

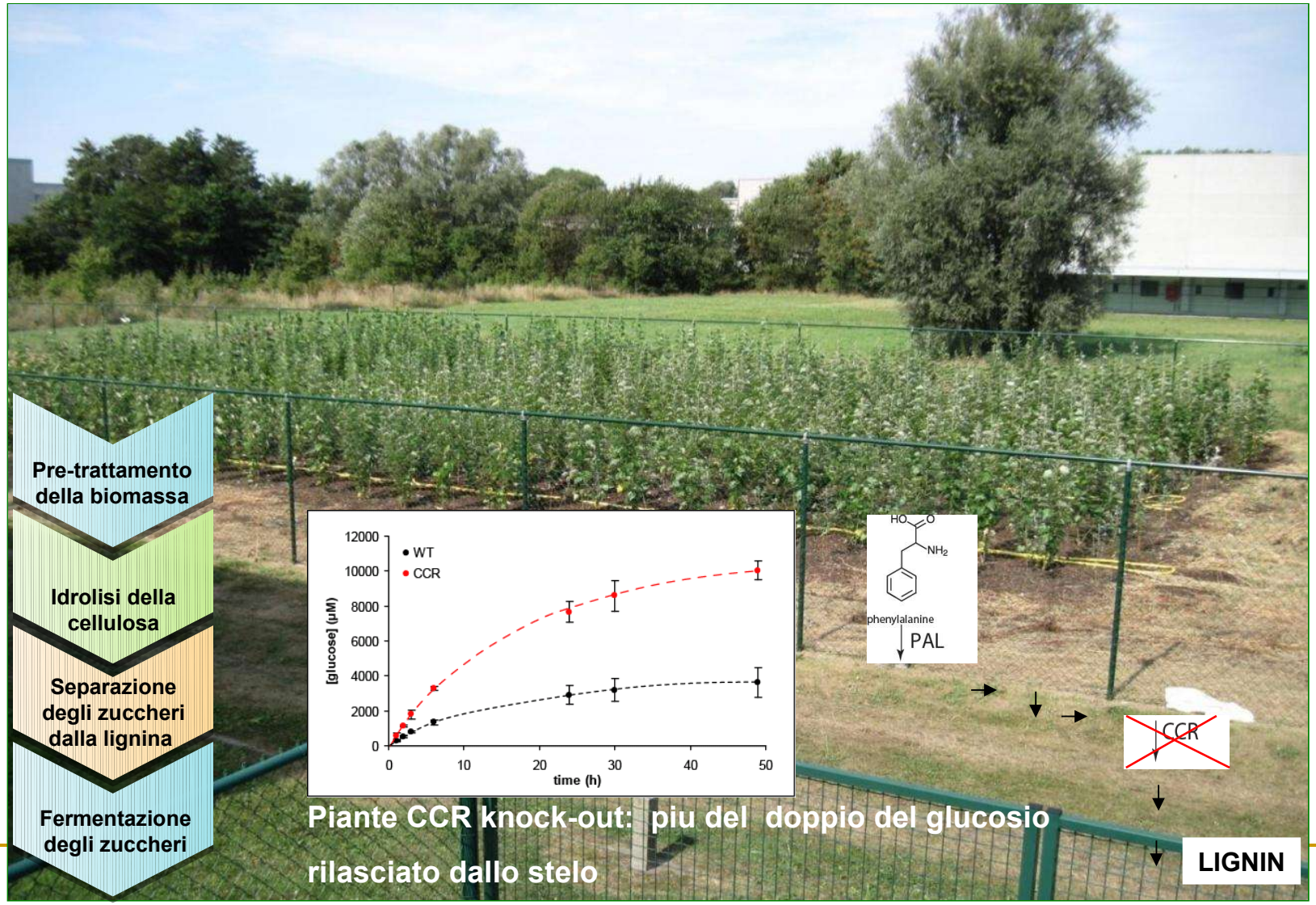
Pratiche agricole standard



Roundup

Courtesy of R. Meilan, Purdue University, USA

Pioppo transgenico con bassa lignina e conseguente aumento dell'efficienza di saccarificazione



Piante CCR knock-out: piu del doppio del glucosio rilasciato dallo stelo

Courtesy of W. Boerjan, U of Ghent, VIB, Belgio

La biotecnologia per specie forestali di difficile e lenta radicazione

Transgenico
Populus tremula* x *P. alba
senza IAA

Non-transgenico
Populus tremula* x *P. alba
con IAA

Harfouche, A., Meilan, R., and Altman, A. 2011. Tree genetic engineering and its application to sustainable forestry and biomass production. *Trends in biotechnology,*
29(1):9-17

Biotecnologie per l'ambiente: alberi forestali biotech per la fitodepurazione

Una applicazione è l'utilizzo delle piante forestali biotech per risanare i terreni da inquinamento dovuto a TCE

TCE (TriCloroEtilene o Trielina):
è una sostanza organoalogenata
è un ottimo solvente per molti composti organici
è un sospetto cancerogeno

In Italia, è stata riconosciuta da tempo una sorgente di contaminazione legata alle aziende chimiche che hanno determinato la presenza di TCE

Prova di campo con i pioppi transgenici con il gene *cytochrome P450 2E1, un enzima chiave per metabolizzare una varieta di sostanze alogenate*

***CYP2E1* è stato studiato ed utilizzato per produrre piante transgeniche al fine di valutare il loro ruolo come biodepuratori**

- Le piante trasgeniche *CYP2E1* metabolizzano più TCE rispetto al controllo
- C'è un maggiore assorbimento di TCE nei suoli dove sono allevati alberi transgenici

Source: Doty et al. unpublished

Resistenza agli insetti nel piopppo *Bt* in Cina

<u>Quasi 500 ettari coltivati in circa 8 province con pioppi transgenici *Bt* resistenti agli insetti:</u>

- Pioppo bianco (*Populus alba)* già allevato ai fini commerciali

- Pioppo nero *(Populus nigra)*
- Pioppo euroamericano
- *P. deltoides*
- *P. tomentosa*

pronti per il mercato

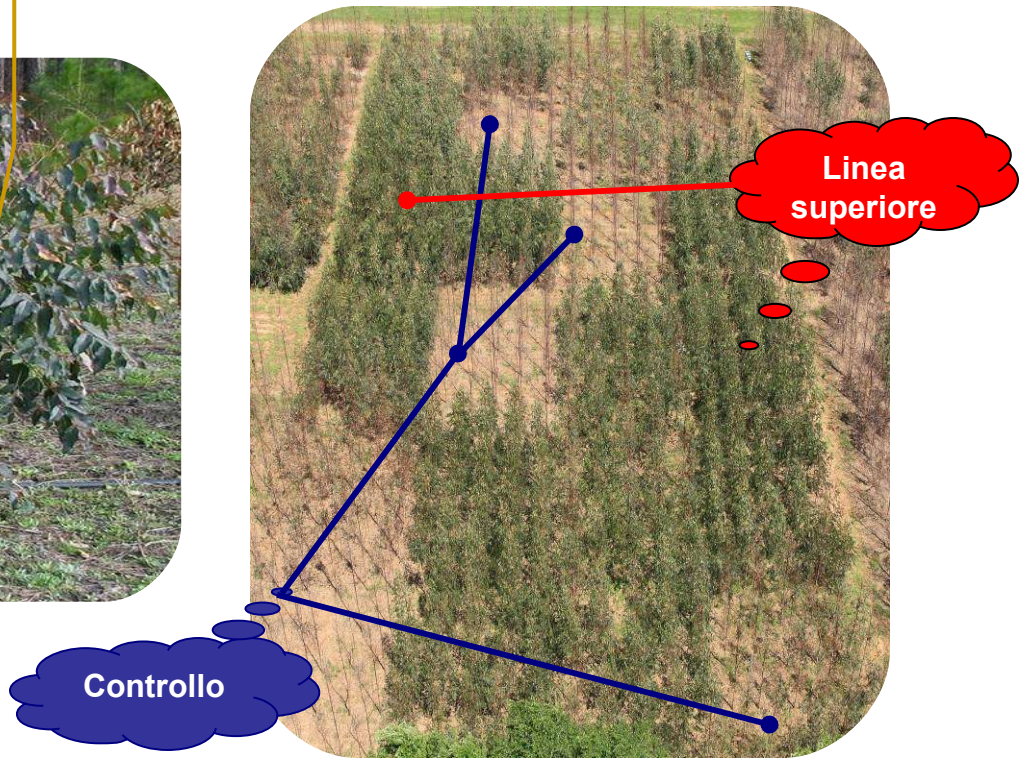
<u>Benefici economici:</u>
Nei pioppi transgenici nei primi 6 anni non ci sono stati trattamenti con insetticidi mentre per i pioppi non transgenici si sono effetuati 2-3 trattamenti

Courtesy of M.z. Lu, Beijing, China

Eucalipto transgenico tollerante al freddo in USA

Controllo

Linea superiore

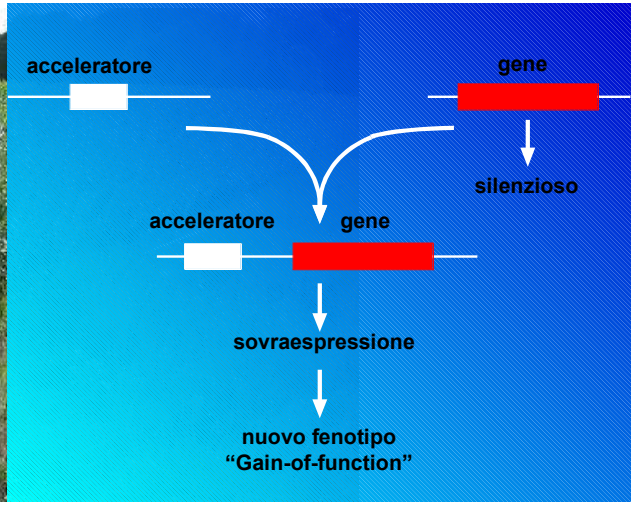


Risultati del campo indicano la tolleranza al congelamento per ~ - 8 ° - 9 °C

Source: ArborGen, USA

Interventi di ingegneria genetica per isolare e definire la funzione di geni "novel" usando come specie modello il *Populus trichocarpa*

Strategia basata su "activation-tagging gene discovery"



Foglie grandi

Accrescimento orientato verso Sud

Apertura precoce della gemma

Ritardo senescensa

Esempi di mutanti osservati:

2 paia di piante per evento

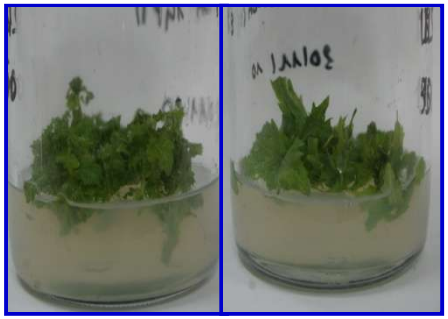
Strauss et al. Tree Genetics and Genomes (in press)

Addomesticare il pioppo usando l'ingegneria genetica per migliorare il suo utilizzo come coltura bioenergetica

- **Perché il pioppo?**
  - **Il pioppo é considerato una pianta ideale per la produzione di biomassa lignocellulosica**
    - Gli attuali genotipi di pioppo sono in grado di produrre circa 24 ton di biomassa/ha/anno ; ~264.98 litri di etanolo/ton
    - L'etanolo prodotto ha un rendimento superiore del 24% per ettaro rispetto ad alla maggior parte delle altre colture, come il *panico verga* (J.Tuskan, 2006)
  - **Genotipi adattati a crescere attraverso ampi range geografici**
  - **Contiene azotofissatori endofiti (Doty *et al.* 2005)**

Una piantaggione di pioppo ibridio fertirrigato nel'Oregan USA (source: J. Eaton, GWR)

- **Problemi da risolvere?**
  - **Ha bisogno di molta acqua per crescere**
    - Una piantagione di 2 anni : 2.7 million l/anno/ha (source: J. Eaton, GWR USA)
  - **Non è molto efficiente nell'utilizzo dell'acqua**
    - Specie riparie
  - **È modetaramente sensibile alla salinità**
    - Le attese previste relative alla crescita ed alla produzione diminuiscono del 50% a ECe 4.2-9.5 dS/m (source: A. Blaylock, University of Wyoming)



Progetto: il miglioramento genetico del pioppo alla tolleranza alla salinità e all'efficienza nell'uso dell'acqua

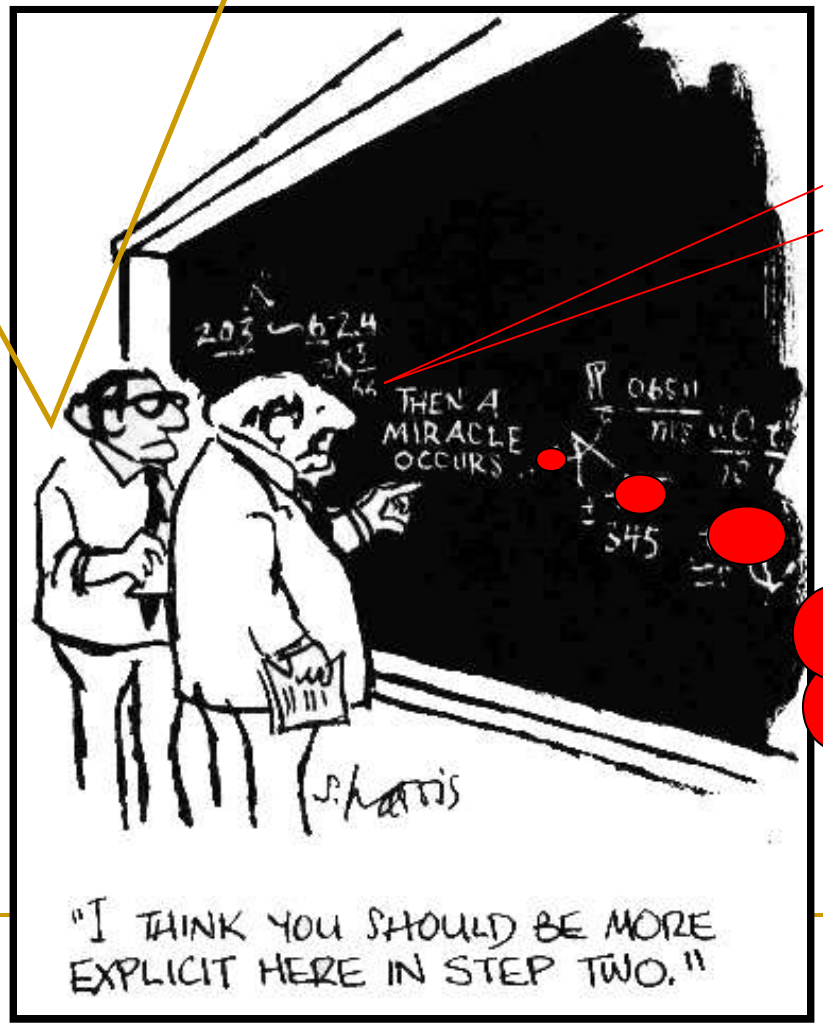
A. Harfouche, E. Kuzminsky, M. Sabatti, G. Scarascia Mugnozza (UNITUS, CRA) e I. Beritognolo (CNR)

Rientro dei cervelli, **Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca**

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA Tuscia

CRA
CONSIGLIO PER LA RICERCA E LA SPERIMENTAZIONE IN AGRICOLTURA

Cosa serve per realizzare il potenziale delle biotecnologie nel miglioramento genetico degli alberi forestali?



Io penso che tu dovresti essere più esplicito qui nel secondo punto

Alla fine occorre un miracolo!