

INDICE

CAPITOLO 1

Cosa sono le biotecnologie applicate alle piante medicinali: dal tasso del Pacifico (*Taxus brevifolia* Nutt. – *Taxaceae*) al Taxolo come introduzione paradigmatica alla disciplina 1

- 1.1** Perché le biotecnologie, dagli usi tradizionali delle piante medicinali agli approcci moderni 1
- 1.2** Il Taxolo: un composto modello 4
 - 1.2.1** La specie vegetale 6
 - 1.2.2** La molecola 8
 - 1.2.3** La produzione biotecnologica 9
 - 1.2.4** Le tecniche estrattive e analitiche 11
- 1.3** Alcune definizioni 13

CAPITOLO 2

I metaboliti secondari e le vie biogenetiche 17

- 2.1** Filogenesi dei metaboliti secondari 18
- 2.2** La via dell'acido shikimico 22
- 2.3** La via dell'acetato (*malonato*) 26
- 2.4** Biosintesi dei composti fenolici 30
- 2.5** Via dell'acetato (*mevalonato*) 31
- 2.6** Vie biogenetiche complesse (*alcaloidi*) 34
- 2.7** Tessuti secretori e strutture di accumulo 36





CAPITOLO 3

Risposte al condizionamento ambientale dei vegetali	39
3.1 Gli ormoni	39
3.1.1 <i>Auxine</i>	40
3.1.2 <i>Citochinine</i>	43
3.1.3 <i>Gibberelline</i>	46
3.1.4 <i>Etilene</i>	47
3.1.5 <i>Acido abscissico</i>	49
3.2 Meccanismi di risposta all'ambiente biotico	50
3.2.1 Composti allelochimici e allelopatia	52
3.2.2 Meccanismi di risposta all'ambiente abiotico	54

CAPITOLO 4

Colture <i>in vitro</i> di cellule e tessuti	57
4.1 Colture su substrato solido o semisolido (colture di calli)	59
4.1.1 L'espianto	59
4.1.2 Allestimento della coltura	62
4.1.3 Il terreno di coltura	64
4.1.4 Evoluzione temporale della coltura	67
4.2 Colture liquide in sospensione	69
4.2.1 Curva di crescita e studio della vitalità cellulare	71
4.2.2 Colture di protoplasti	73
4.3 Colture di organi	73
4.3.1 Colture di radici e di <i>hairy-roots</i>	74
4.3.2 Colture di embrioni (<i>Embriogenesi somatica</i>)	77
4.3.3 Colture di germogli e micropropagazione	78
4.4 Colture idroponiche e aeroponiche	81

CAPITOLO 5

Ingegneria genetica nelle piante medicinali	85
5.1 Strumenti genomici e biochimici utilizzati per il clonaggio del DNA	86
5.1.1 Vettori di clonaggio	87
5.1.2 Enzimi di restrizione	89
5.1.3 DNA copia (<i>cDNA</i>)	91
5.1.4 Librerie di cDNA	93
5.1.5 Reazione a catena della polimerasi (<i>Polimerase Chain Reaction PCR</i>)	93
5.1.6 I <i>Microarrays</i> e la proteomica	95
5.1.7 Identificazione della colonia che contiene il gene da clonare	96
5.2 Gli strumenti biologici di trasformazione genica nei vegetali	97
5.2.1 Vettori di clonaggio derivanti dai plasmidi di <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	97



5.2.2	Vettori binari e cointegrativi	100
5.2.3	Vettori derivanti da <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	102
5.2.4	Tecniche di trasformazione mediante protoplasti	103
5.2.5	Trasformazione con plasmidi	104
5.2.6	La trasduzione mediante virus	105
5.3	Gli strumenti chimici e fisici di trasformazione genica dei vegetali	105
5.3.1	Elettroporazione	106
5.3.2	Microiniezione	106
5.3.3	Biolistica	106
5.4	Lo studio del controllo dell'espressione genica (<i>Molecular Elucidation</i>)	108
5.4.1	Il controllo dei fattori di trascrizione	108
5.4.2	La clonazione dei geni associati alla sintesi dei metaboliti secondari e lo studio della loro espressione	109
5.4.3	Indirizzo delle proteine all'appropriato comparto subcellulare e controllo dei promotori	110
5.4.4	Sovra-espressione, sotto-espressione e inibizione da RNA	112
5.5	Clonaggio e produzione di proteine di mammifero (<i>Plant Molecular Farming</i>)	113
5.5.1	Alcuni esempi di successo	115

CAPITOLO 6

Ingegneria genetica delle principali classi di metaboliti secondari	121
6.1 Alcaloidi monoterpene indolici	121
6.2 Alcaloidi tropanici e nicotinici	125
6.3 Alcaloidi isochinolinici	129
6.4 Diterpenoidi (<i>Taxolo</i>)	133
6.5 Sesquiterpeni	135

CAPITOLO 7

I processi estrattivi e la caratterizzazione molecolare	139
7.1 Processi estrattivi. Estrazione liquido-liquido	139
7.1.1 Estrazione solido-liquido	142
7.1.2 Estrazione solido-liquido con fluidi supercritici	145
7.2 Estrazione liquido-liquido	148
7.2.1 Estrazione liquido-liquido per spostamento	151
7.3 Estrazione e separazione per distillazione	152
7.3.1 Liquidi completamente miscibili e distillazione semplice	153
7.3.2 Liquidi completamente miscibili e ri-distillazione	157
7.3.3 Liquidi immiscibili e distillazione in corrente di vapore d'acqua	159
7.4 Isolamento e caratterizzazione molecolare	161





7.4.1	Le tecniche cromatografiche	162
7.4.2	Classificazione delle tecniche cromatografiche in base allo stato fisico della fase mobile e del letto cromatografico	165
7.4.3	Cromatografia planare (<i>Thin Layer Chromatography, TLC</i>)	166
7.4.4	Cromatografia liquida su colonna	167
7.4.5	Gascromatografia	170

CAPITOLO 8

Dal laboratorio alla produzione	173
8.1 Tipologie di bioreattori	174
8.1.1 Bioreattore ad agitazione meccanica (<i>Stirred Tank Reactors</i>)	175
8.1.2 Bioreattori pneumatici (<i>Airlift Reactors</i>)	176
8.1.3 Bioreattori a letto fisso o a letto fluidizzato	177
8.1.4 Bioreattori per colture in larga scala di <i>hairy roots</i>	179
8.2 Le variabili che influenzano la produttività di sistemi biotecnologici	181
8.2.1 L'espianto	181
8.2.2 Terreno di coltura	182
8.2.3 Gli zuccheri	183
8.2.4 I nitrati	183
8.2.5 I fosfati	184
8.2.6 Precursori biosintetici dei principi attivi	184
8.2.7 La luce	184
8.2.8 Il pH	185
8.2.9 La temperatura	186
8.2.10 L'areazione	186
8.2.11 L'elicitazione	186
8.2.12 L'immobilizzazione	187

CAPITOLO 9

Esempi applicativi delle tecniche biotecnologiche descritte compendiate	191
9.1 <i>Atropa belladonna</i>	191
9.2 <i>Cannabis sativa</i>	193
9.3 <i>Papaver somniferum</i>	196
9.4 <i>Digitalis purpurea</i>	199
9.5 <i>Catarantus roseus</i>	201
9.6 <i>Podophyllum peltatum</i>	206
9.7 <i>Camptotheca acuminata</i>	211
9.8 Ancora sul Taxolo	214
9.9 <i>Artemisia annua</i>	216
INDICE ANALITICO	227

