

INDICE

CAPITOLO 1

Cosa sono le biotecnologie applicate alle piante medicinali: dal tasso del Pacifico (<i>Taxus brevifolia</i> Nutt. – <i>Taxaceae</i>) 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 (<i>malonato</i>)	26
2.4 Biosintesi dei composti fenolici	30
2.5 Via dell'acetato (<i>mevalonato</i>)	31
2.6 Vie biogenetiche complesse (<i>alcaloidi</i>)	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** Auxine 40
 - 3.1.2** Citochine 43
 - 3.1.3** Gibberelline 46
 - 3.1.4** Etilene 47
 - 3.1.5** Acido abscissico 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 *in vitro* di cellule e tessuti 57

- 4.1** Colture su substrato solido o semisolido (colture di calli) 59
 - 4.1.1** L'espanto 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 *hairy-roots* 74
 - 4.3.2** Colture di embrioni (*Embriogenesi somatica*) 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 (*cDNA*) 91
 - 5.1.4** Librerie di cDNA 93
 - 5.1.5** Reazione a catena della polimerasi (*Polimerase Chain Reaction PCR*) 93
 - 5.1.6** I *Microarrays* 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 *Agrobacterium tumefaciens* 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

