

Trasformazione degli Organismi Vegetali



Trasformazione di Organismi Vegetali

- La trasformazione di un organismo vegetale offre l'opportunità di introdurre geni sia omologhi che eterologhi. Queste cellule vengono, quindi, rigenerate producendo piante transgeniche che contengono ed esprimono la nuova informazione genetica.

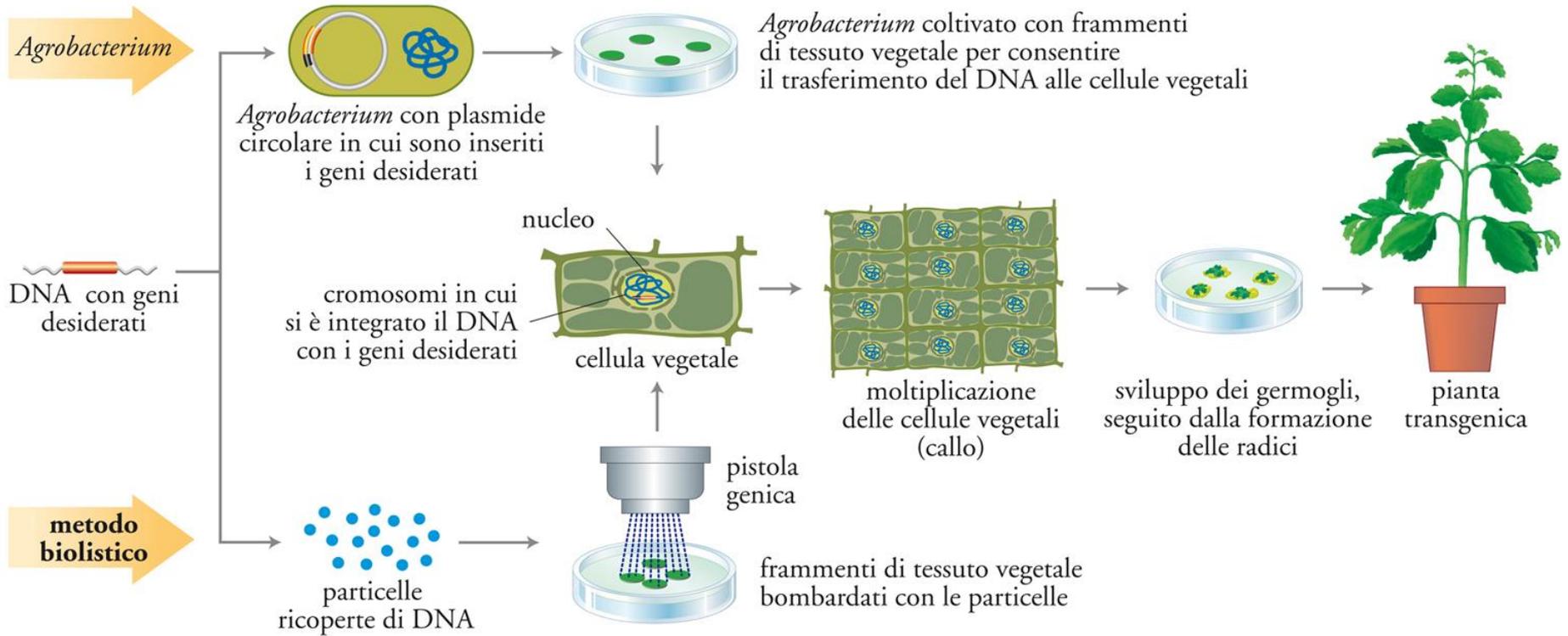
- La maggior parte delle piante transgeniche viene generata usando due metodi generali che sono:

- * **La trasformazione mediata da Agrobacterium**

(metodo indiretto)

- * **La trasformazione diretta con DNA**

(tecniche biolistiche, elettroporazione, permeabilizzazione di protoplasti mediata da PEG)



Agrobacterium tumefaciens
bacterium



Restriction
cleavage
site

T-DNA

Ti
plasmid

1 The plasmid is removed from the bacterium, and the T-DNA is cut by a restriction enzyme.

2 Foreign DNA is cut by the same enzyme.

3 The foreign DNA is inserted into the T-DNA of the plasmid.

4 The plasmid is reinserted into a bacterium.

5 The bacterium is used to insert the T-DNA carrying the foreign gene into the chromosome of a plant cell.

6 The plant cells are grown in culture.

7 A plant is generated from a cell clone. All of its cells carry the foreign gene and may express it as a new trait.



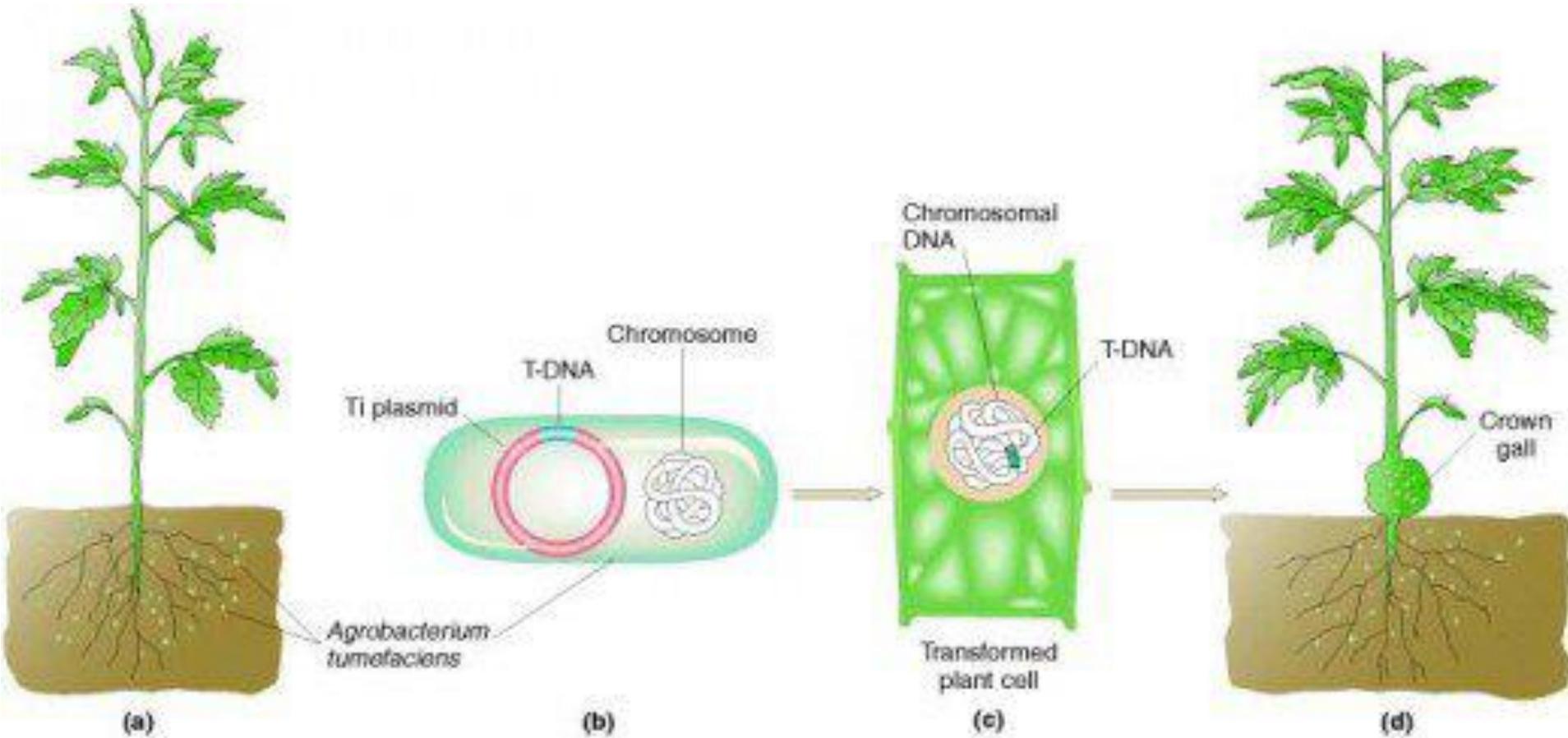
Inserted T-DNA
carrying foreign gene



Agrobacterium

- ✓ batterio Gram-negativo del suolo in grado di infettare numerose piante dicotiledoni inducendo, in corrispondenza di una lesione, caratteristiche alterazioni tumorali
- ✓ La virulenza di questi batteri è associata alla presenza di grossi **plasmidi**
- ✓ un frammento di **DNA batterico (T-DNA)** viene trasferito dal batterio alla cellula vegetale e si integra **STABILMENTE** nel genoma della pianta, inducendo nelle piante infettate le caratteristiche modificazioni morfologiche e differenziative.

Agrobacterium in natura.....



Il trasferimento del T-DNA

- Il contatto cellulare è mediato dall' interazione di proteine batteriche di adesione superficiale con specifici recettori della cellula vegetale. Le proteine di *Agrobacterium* implicate nell'ancoraggio alla cellula vegetale sono codificate dai geni **chv**, mentre i recettori vegetali sono proteine **vitronectina-like**.
- Il sistema di percezione-trasduzione del segnale utilizzato da *Agrobacterium* è del tipo **a due componenti** in cui una his chinasi recettoriale, dopo aver percepito un segnale specifico, si autofosforila e trasferisce un residuo fosfato ad un secondo componente indipendente attivandone le proprietà di attivatore trascrizionale. Nel caso di *Agrobacterium* il **recettore** è rappresentato da **VirA**, mentre il **trasduttore** è **VirG**. In seguito alla sua attivazione, VirG attiva tutti i geni **vir** legandosi a specifiche **Vir box** presenti sui loro promotori.

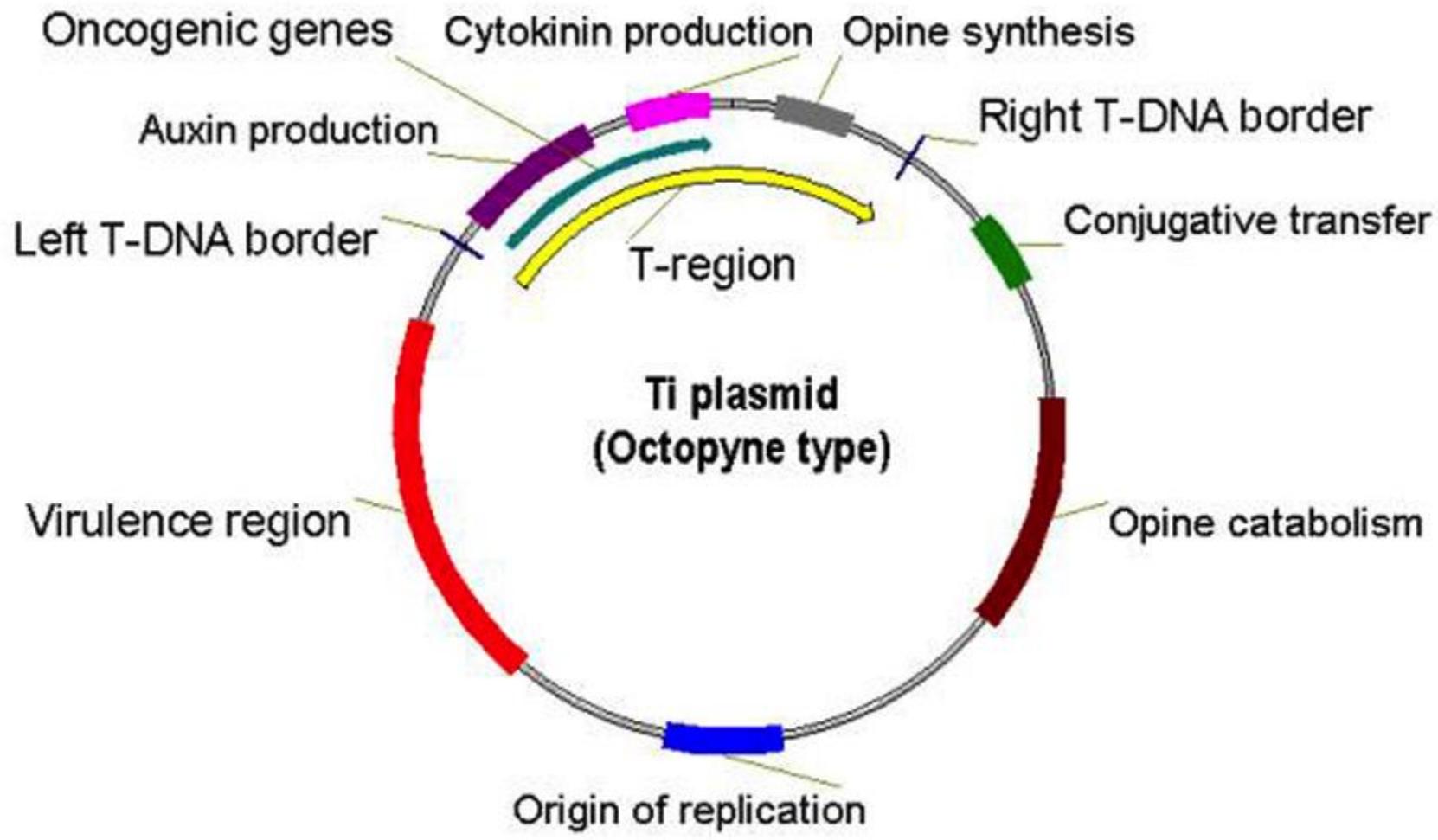
- I geni *vir* portano alla produzione di una copia a singolo filamento del T-DNA, T-strand, complementare al filamento codificante del T-DNA. Il T-strand a singolo filamento viene exciso, ed il T-DNA ds è ricostituito ad opera del sistema di riparo della cellula batterica.
- Il T-strand ssDNA viene ricoperto da **ss-binding proteins** che lo proteggono dall'attacco di proteasi e gli conferiscono una forma bastoncellare che ne facilita l'ingresso nella cellula vegetale utilizzando un pilus formato dall'assemblaggio di proteine codificate dal batterio.
- L'intero processo di attraversamento del canale richiede energia fornita da attività ATPasica batterica.
- La traslocazione del complesso T-strand-proteine al nucleo è mediato sia da **VirD2** che da **VirE2**, proteine batteriche che presentano il **Nuclear Localization Signals (NLS)**. Dopo aver raggiunto la membrana nucleare vegetale il complesso T-strand-proteine entra nel nucleo e il T-strand si integra **casualmente e stabilmente nel genoma vegetale**.

La sindrome crown gall

Il T-DNA integrato nelle cellule vegetali presenta tre classi di geni:

- geni che codificano per l'ormone vegetale **auxina**
- il gene che codifica per l'ormone vegetale **citochinina**
- geni che sintetizzano degli zuccheri coniugati ad aminoacidi detti **opine**

I fitormoni **aux** e **ck** sono sintetizzati utilizzando vie metaboliche di origine batterica. Queste attività enzimatiche permettono la proliferazione delle cellule trasformate. Le cellule trasformate sintetizzano anche le **opine**, che gli Agrobatteri utilizzano come fonte di energia, e queste tre classi di geni costituiscono un sistema che favorisce selettivamente la crescita di *A.tumefaciens*.



Dai plasmidi Ti ai Vettori Binari

- I plasmidi Ti non sono adatti ad essere usati come vettori di trasferimento, perché:

- sono troppo grandi
- non hanno siti di restrizione adatti per i clonaggi molecolari
- inducono tumori vegetali

- L'analisi molecolare dei plasmidi Ti ha dimostrato che, **mentre RB ed LB sono essenziali per il trasferimento del T-DNA, il T-DNA stesso non lo è.**

- E' stato dimostrato sperimentalmente che **qualunque sequenza di DNA inclusa tra le border repeats (LB e RB) viene trasferita nelle cellule vegetali dall'apparato di trasferimento di Agrobacterium**

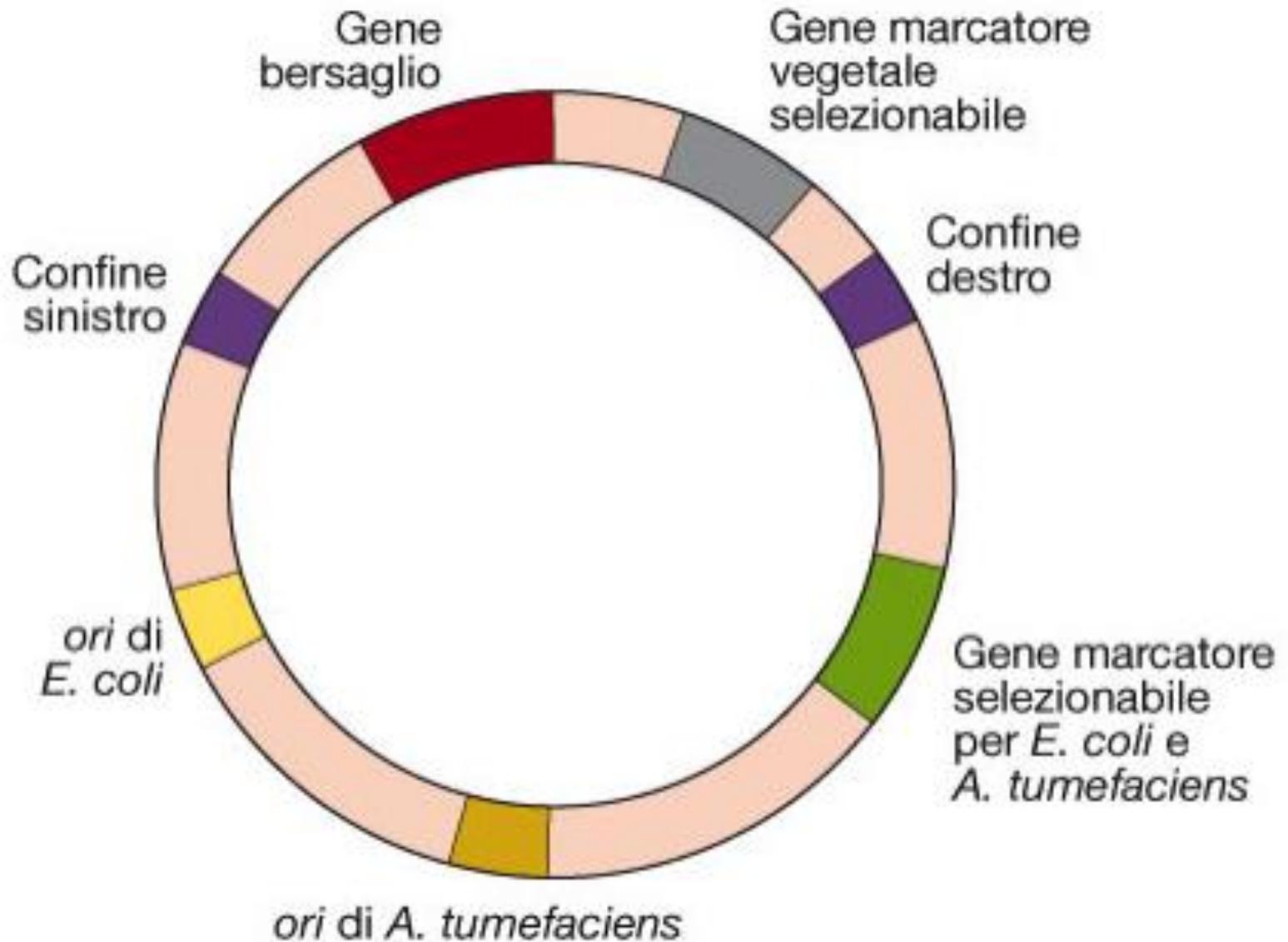
Dai plasmidi Ti ai Vettori Binari

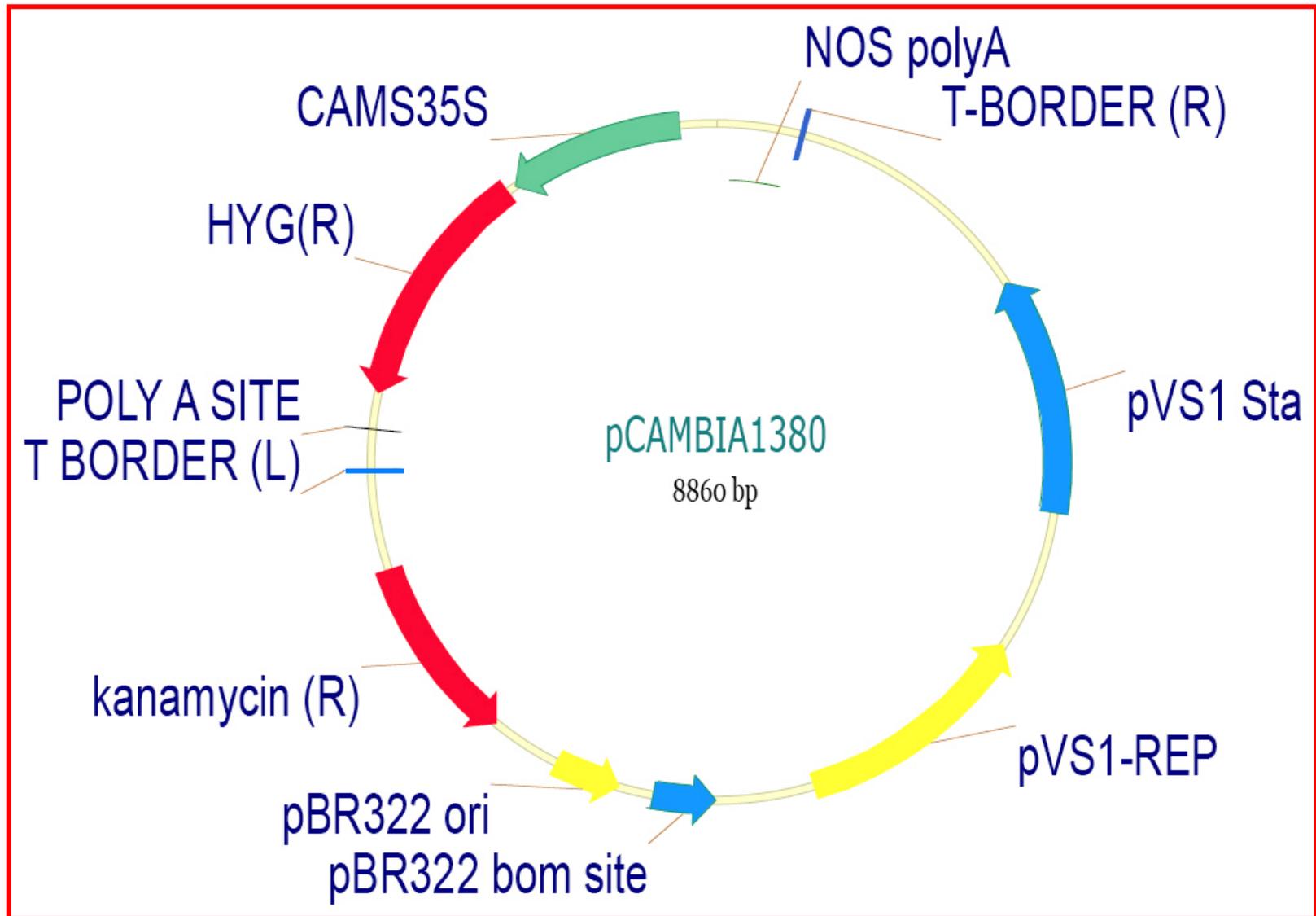
- Il sistema di trasformazione utilizza due vettori separati:

Un plasmide Ti "disarmato", i.e. contenente i **geni vir, che agiscono in trans**, ma delecto della regione del T-DNA;

Un vettore binario contenente: l'origine di replicazione, il gene per la resistenza alla kanamicina (nptII), un MCS contenente il gene per la β -galattosidasi, ed i due **border repeats** (RB e LB). Al loro interno, inoltre, si trovano un polylinker ed un gene marcatore (resistenza antibiotici/erbicidi) **sotto controllo di un promotore vegetale.**

Vettore Binario





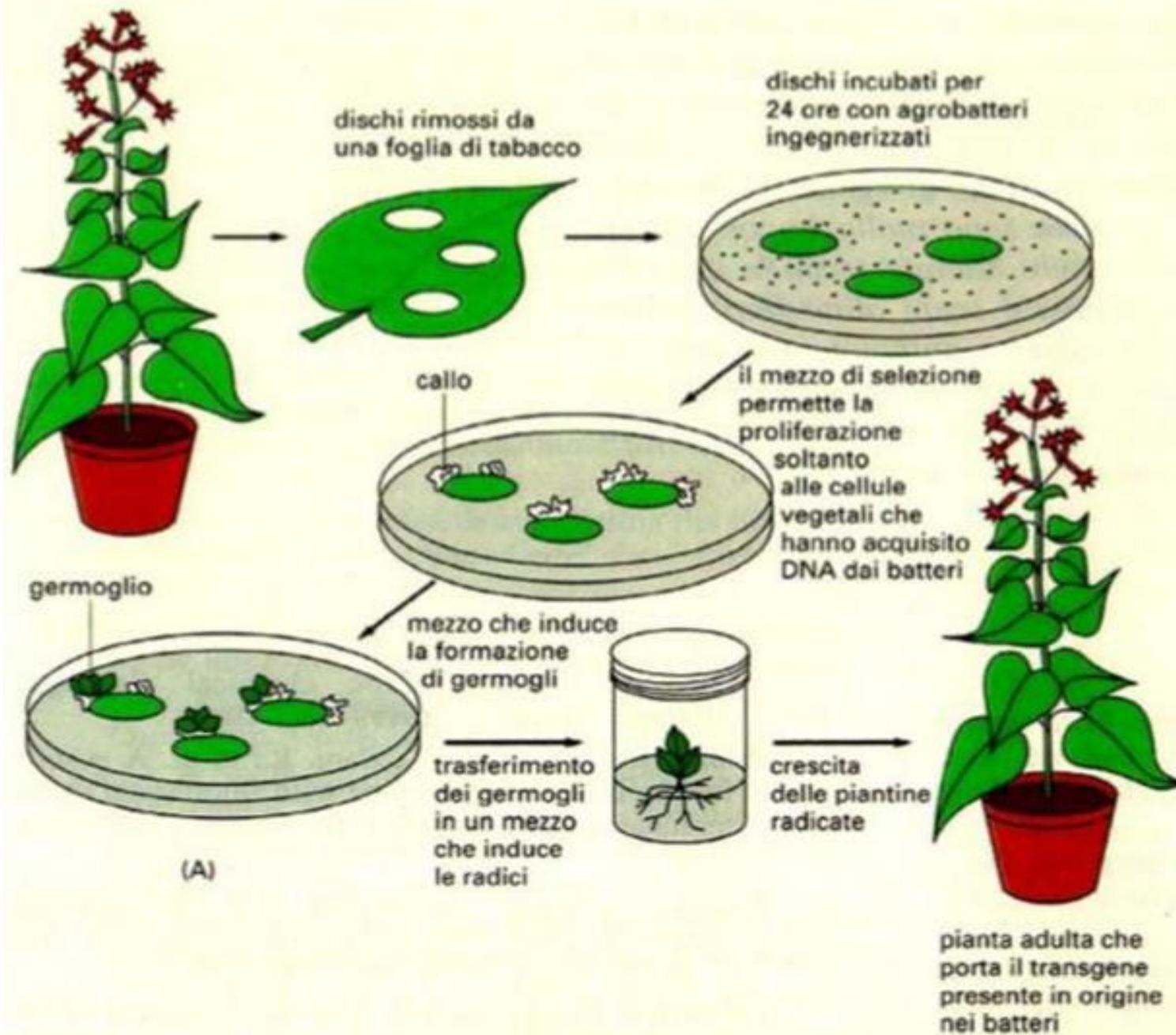
Trasformazione di Piante

Quindi per trasformare le piante con YFG.....

- Si clona YFG in un vettore binario e si traforma *E. coli*
- Dopo controlli, si trasforma *Agrobacterium* con il plasmide ricombinante
- Con l'*Agrobacterium* ricombinante si trasformano le piante

N.B.

- *Agrobacterium* si trasforma mediante elettroporazione
- Le colonie ricombinanti di *Agrobacterium* vengono selezionate per antibiotico-resistenza e controllate mediante PCR su colonia
- Il ceppo di *Agrobacterium* che utilizziamo porta il vettore Ti disarmato (mantenuto sotto resistenza)



Protoplast Transformation

Protoplasts are plant cells that have been stripped of their cell walls through the action of pectinases and cellulases.

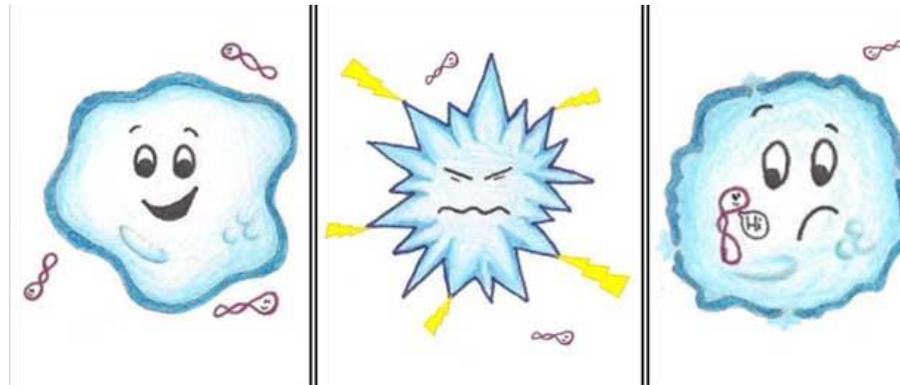
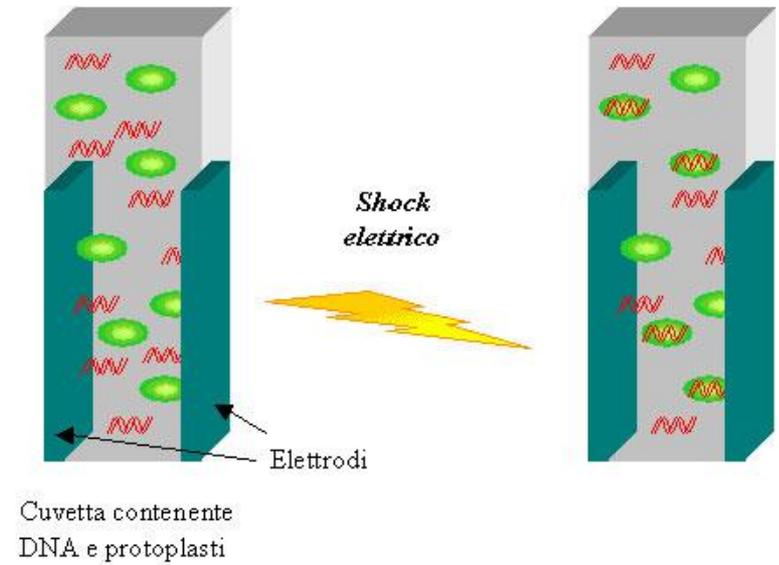
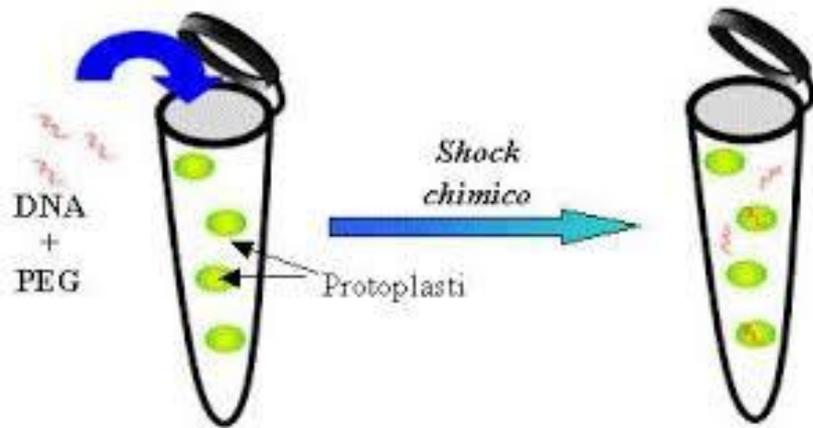
Direct delivery of DNA to wall-less plant cells using **electroporation or PEG**.

It is necessary to obtain a vector containing the exogenous DNA of interest and a selection gene. **DNA can be transiently expressed or stably integrated into the genome (depending on the vector)**. It is possible to achieve **over 70% transformation frequency**.

The major difficulty with this technique is the **regeneration of plants from the transformed protoplasts**.

As an alternative to electroporation, **polyethylene glycol (PEG) associated with calcium and magnesium at an alkaline pH** can be used to promote the binding of exogenous DNA to protoplasts. In this method, DNA adheres to the cell surface and is absorbed by endocytosis.

Trasformazione di protoplasti



L'elettroporazione

- E' possibile trasformare specie monocotiledoni con *Agrobacterium* ma l'efficienza è molto bassa, dunque, nonostante l'interesse agronomica di queste specie, l'uso di *Agrobacterium* non è consigliabile.

Un modo più efficace consiste nell'introduzione diretta del DNA usando metodi fisico-chimici

- Il metodo più efficace è **l'elettroporazione di protoplasti**. Un'alta concentrazione di DNA viene mescolata a una sospensione di protoplasti e sottoposta ad un intenso campo elettrico dell'ordine di 250-500 V/cm.

- **Efficienza di trasformazione: 0,1-1% x protoplasti di riso e di mais**

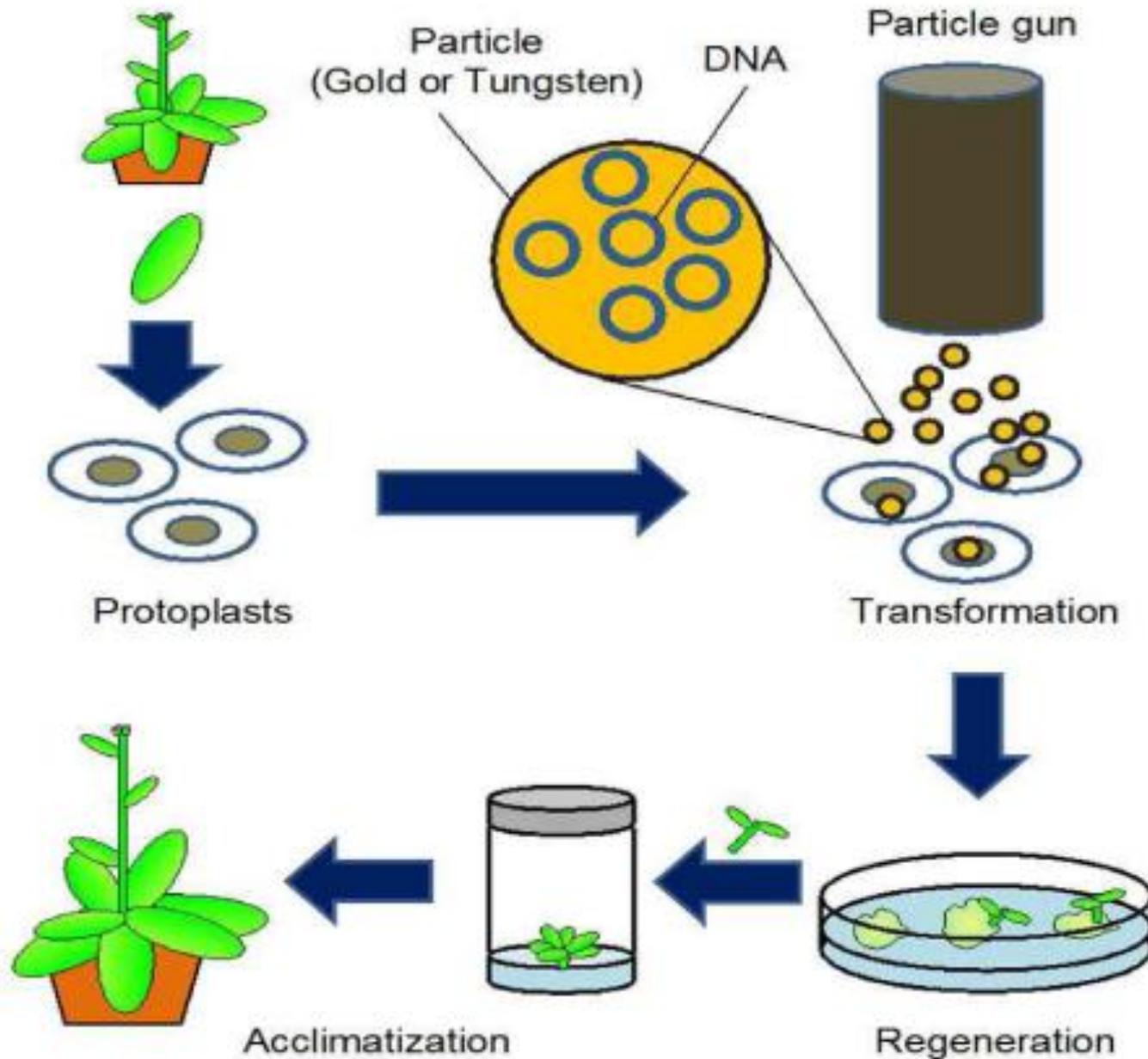
Advantages

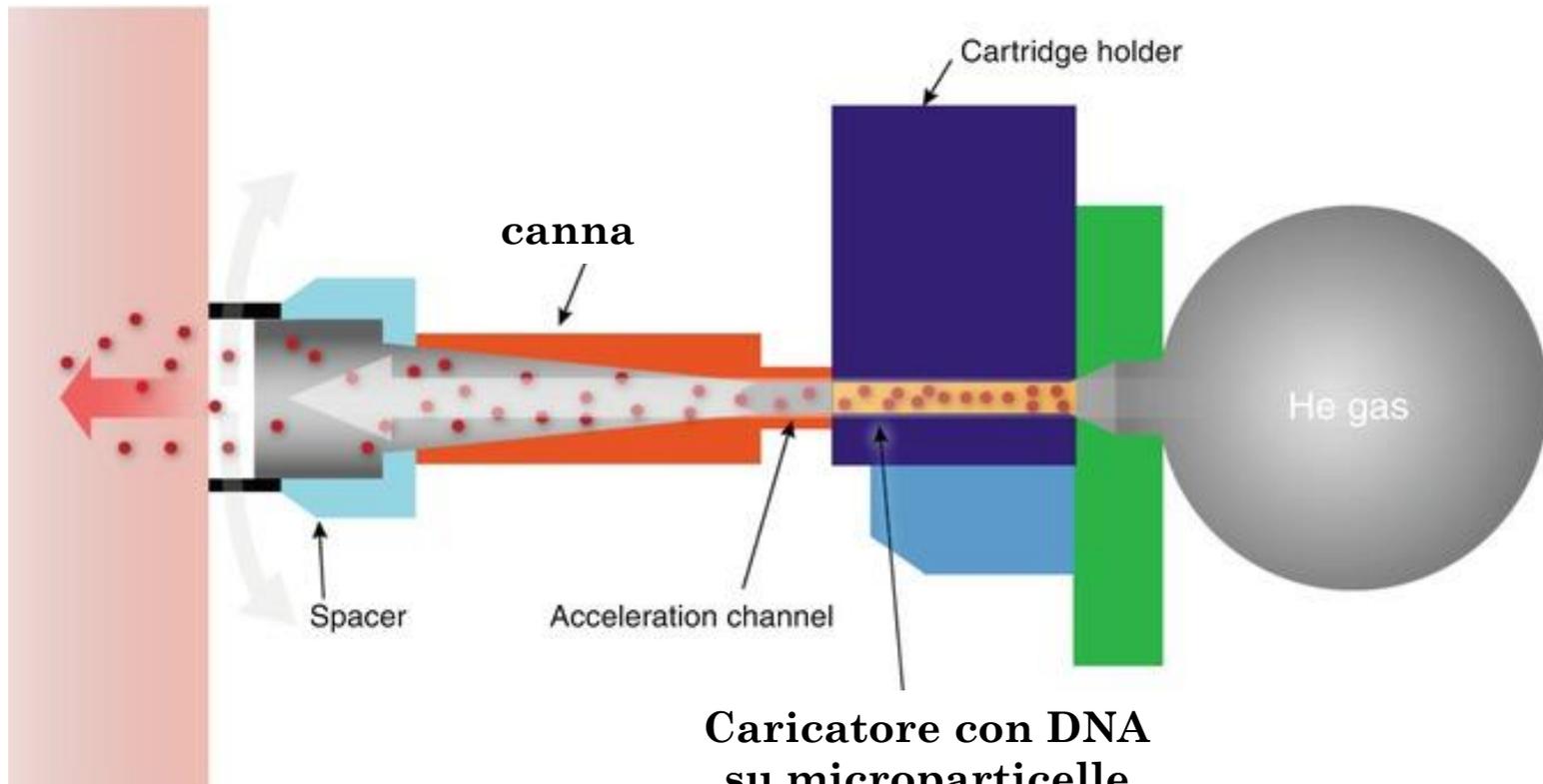
- **Delivery of multiple plasmids with high levels of co-transformation**
- **No binary vector required**
- **High frequency transformation**
- **Most plant species are amenable to protoplast isolation and transformation**

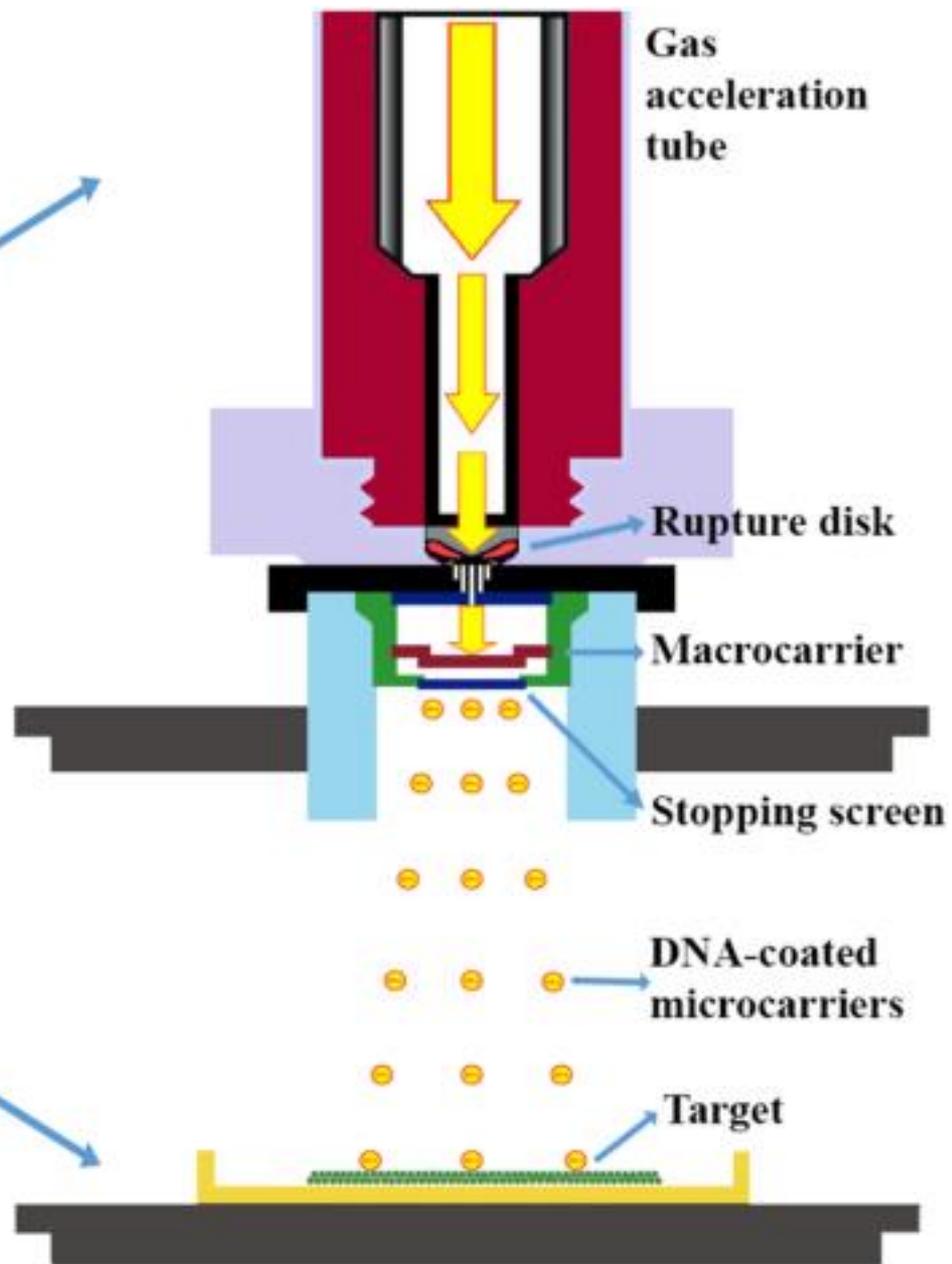
Disadvantages

- **Limited plant species that are amenable to regeneration from protoplasts**
- **The technique is time-consuming and labor-intensive**

Particle Gun Delivery Biolistic Method







Arabidopsis thaliana
eletta pianta modello su 250000 piante

Perché Arabidopsis???

- “generation time” molto breve: un ciclo vitale in 5/6 settimane
- taglia piccola
- genoma nucleare piccolo, distribuito su 5 cromosomi
- produzione di un gran numero di “eredi”
- poco DNA ripetuto
- facilmente trasformabile ad alta efficienza

I sistemi modello

Puya raimondii è un pessimo sistema modello: Fiorisce ogni 100 anni e raggiunge i 10 metri di altezza. Non si conosce nulla della sua genetica e del suo genoma



Arabidopsis thaliana è un buon sistema modello: fiorisce dopo 1 mese, raggiunge i 30-50 centimetri di altezza e cresce bene in laboratorio.

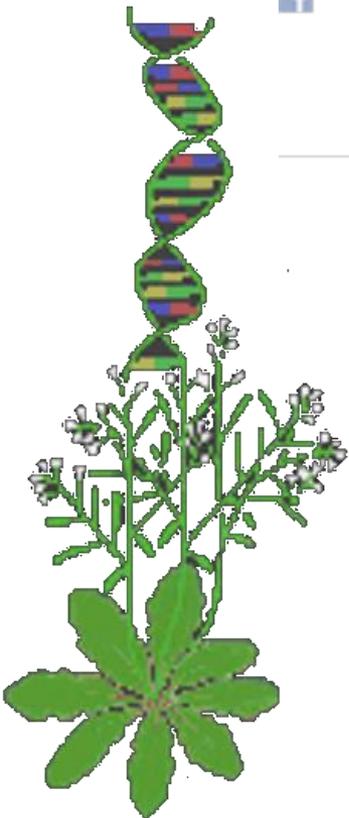
In planta *Agrobacterium*-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration.

Bechtold N¹, Pelletier G.

Author information

PMID: 9664431

[Indexed for MEDLINE]



- **Infiltrazione sotto vuoto di piante a fiore di *Arabidopsis* con una sospensione di *Agrobacterium* trasformato con un vettore binario**
- **Efficienza di trasformazione variabile da 200/1000 trasformanti/pianta, dipendente da diversi fattori:**
 - **Stadio di sviluppo della pianta**
 - **Concentrazione dell'*Agrobacterium* (OD>.8)**
 - **Tempo di incubazione sotto vuoto (=20 min.)**
 - **Vettore binario utilizzato**





Come avviene la trasformazione???

- I trasformanti sono emizigoti per l'evento di inserzione (per il T-DNA)
- Ogni trasformante è frutto di un evento indipendente
- La trasformazione riguarda sia i tessuti vegetativi che quelli riproduttivi
- Qual è l'organo/i riproduttivo/i che viene trasformato? L'ovulo

