

# 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.

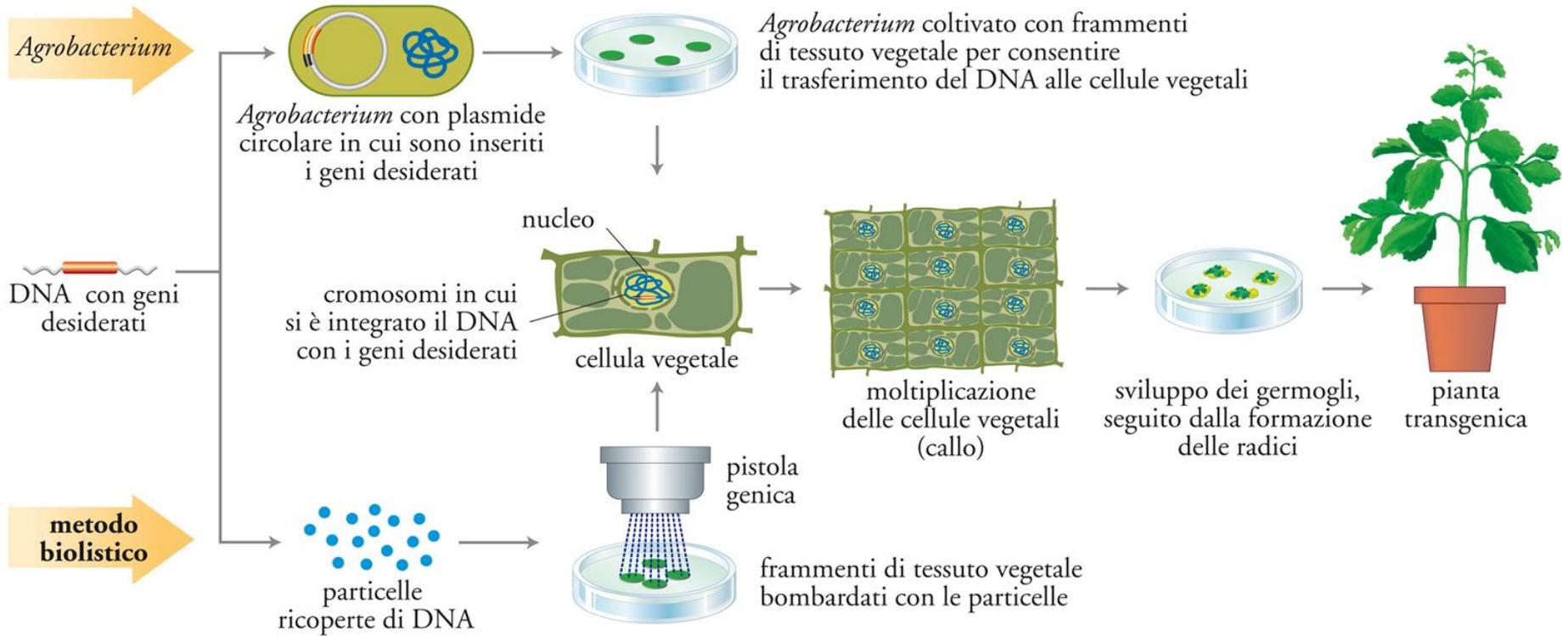
- La maggior parte delle piante transgeniche viene generata usando due metodi generali che sono:

- \* **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.

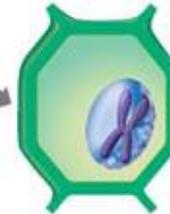
**4** The plasmid is reinserted into a bacterium.

**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.

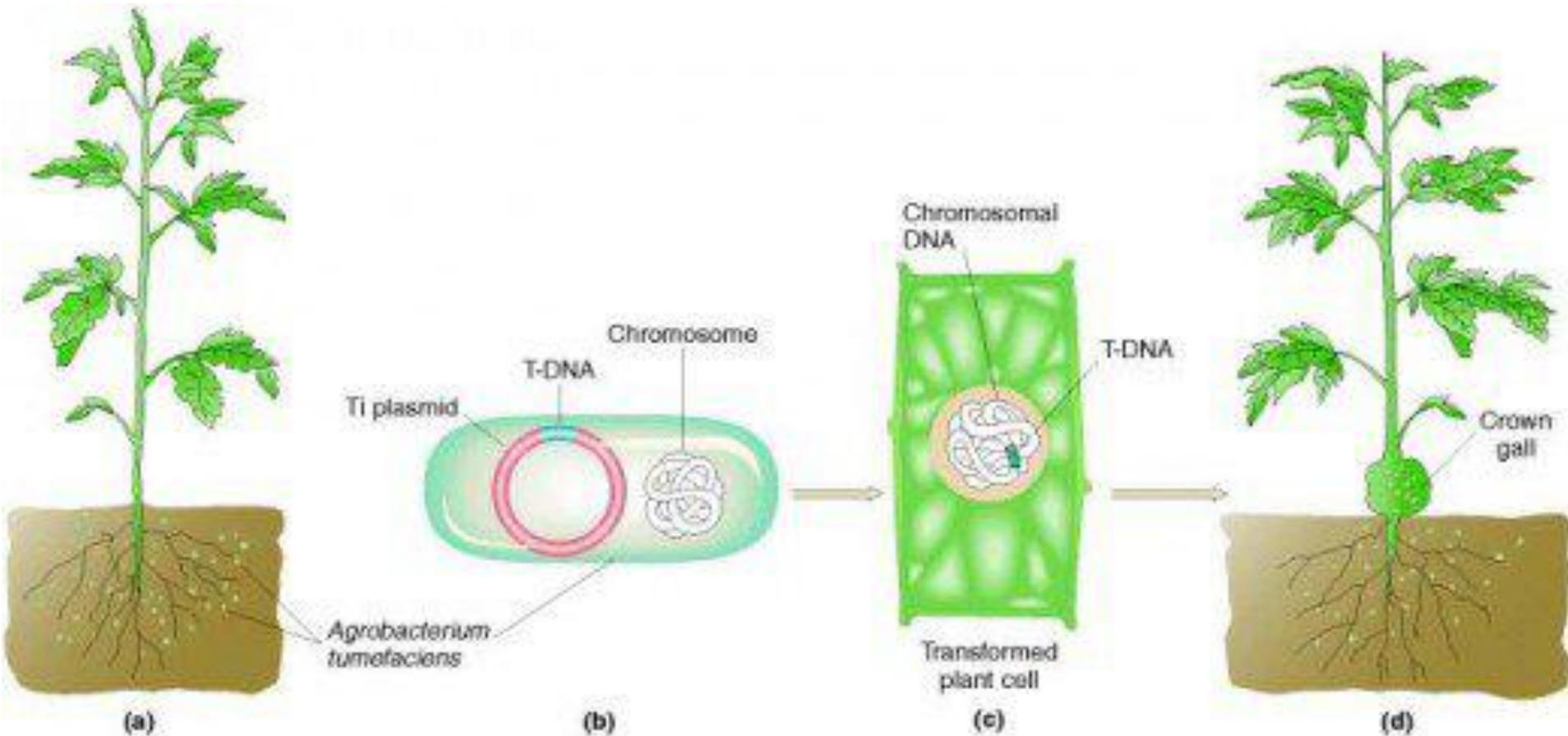
Inserted T-DNA  
carrying foreign gene



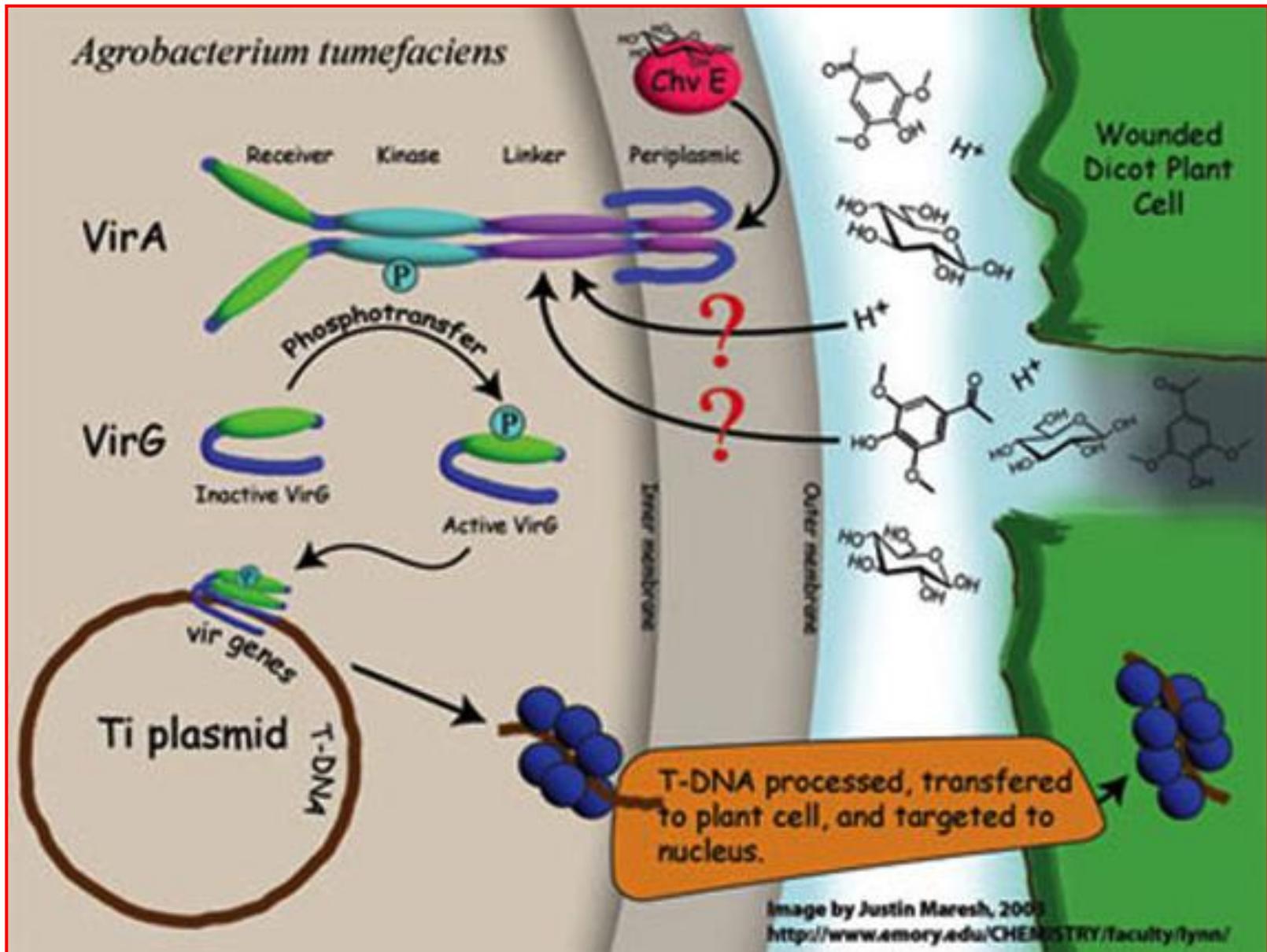
## *Agrobacterium*

- ✓ 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.....



# 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.

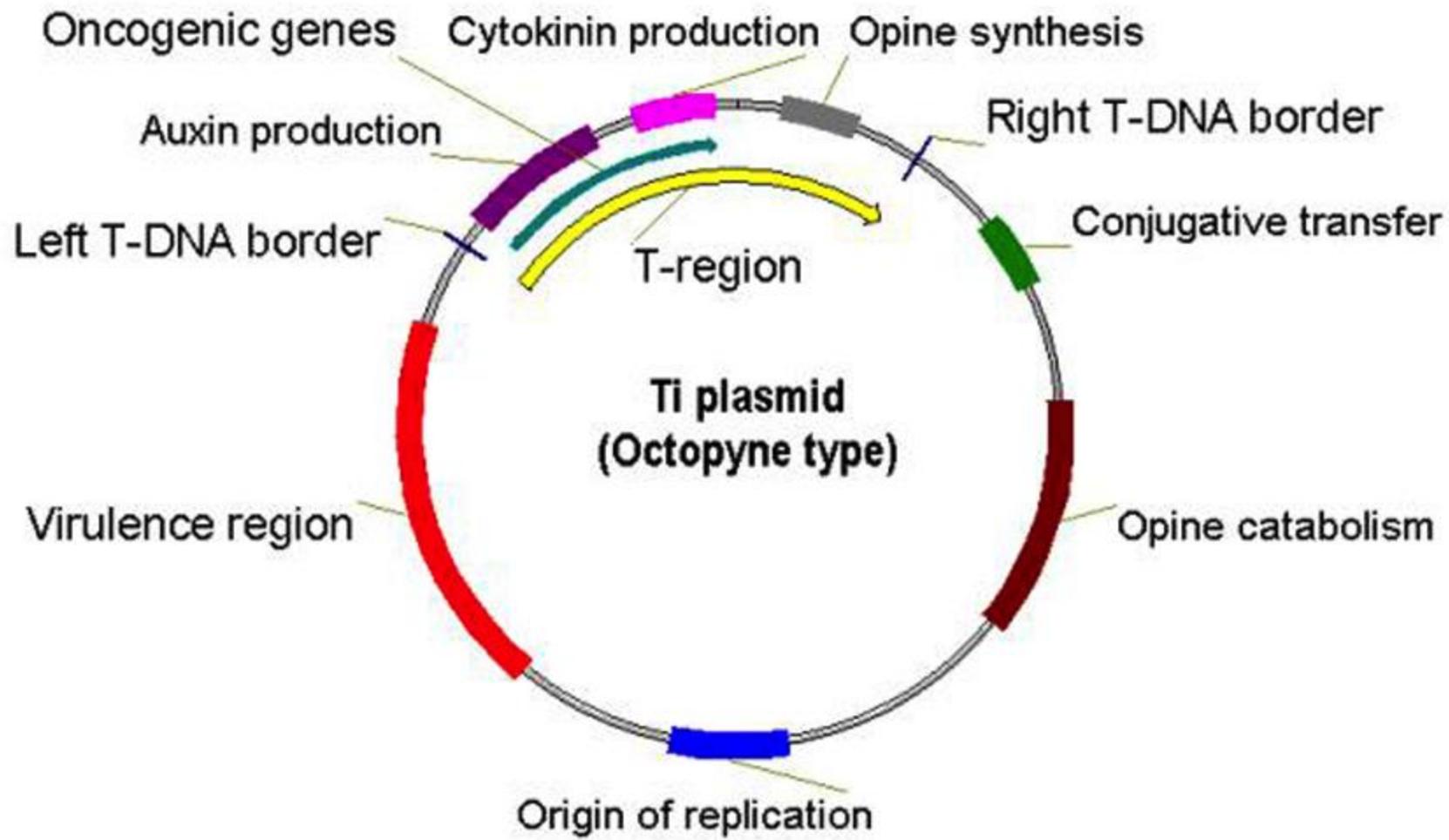
- I geni *vir* portano alla produzione di una copia a singolo filamento del T-DNA, T-strand, complementare al filamento codificante del T-DNA. Il T-strand a singolo filamento viene exciso, ed il T-DNA ds è ricostituito ad opera del sistema di riparo della cellula batterica.
- Il T-strand ssDNA viene 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**

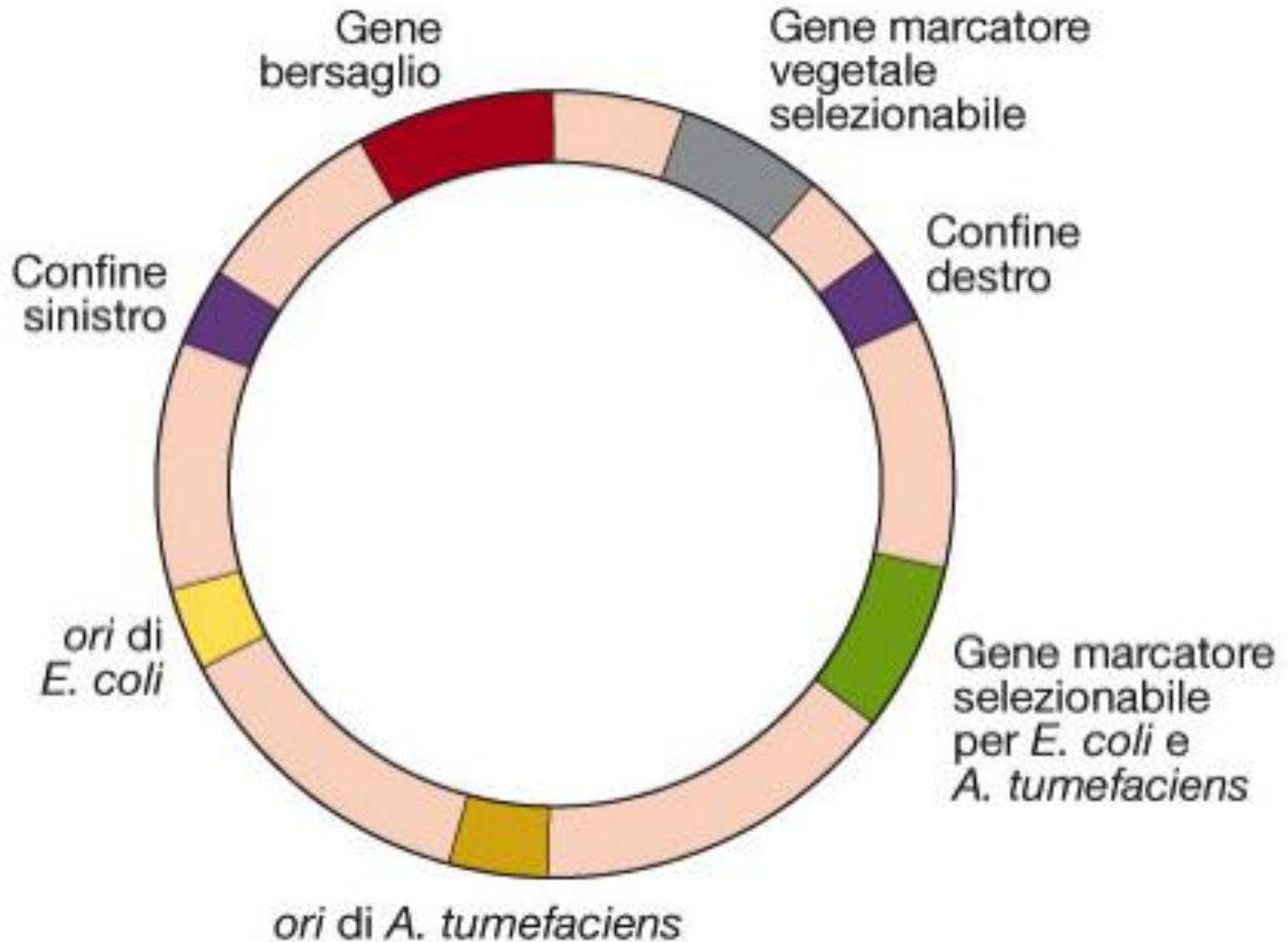
# Dai plasmidi Ti ai Vettori Binari

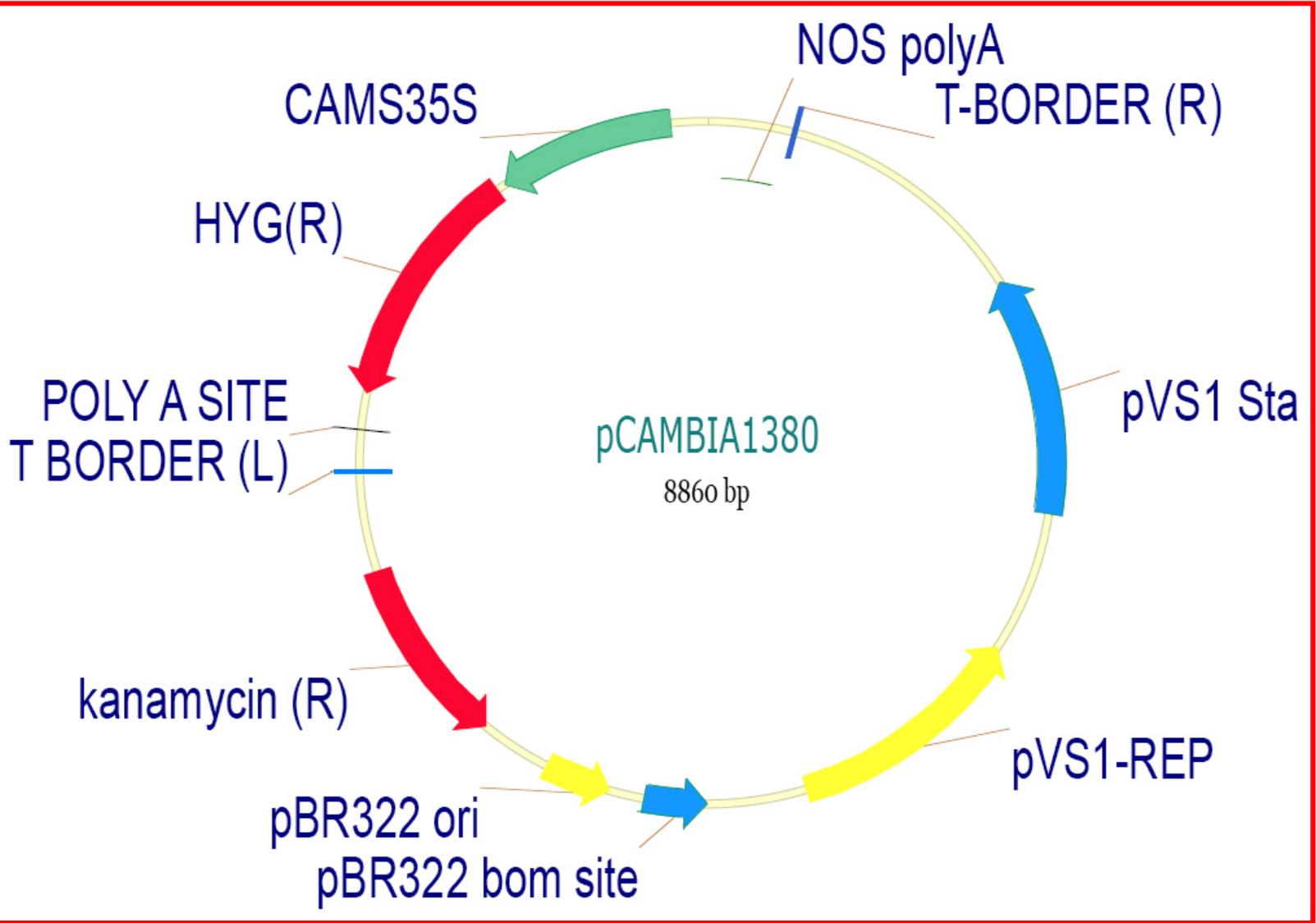
- Il sistema di trasformazione utilizza due vettori separati:

**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  $\beta$ -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





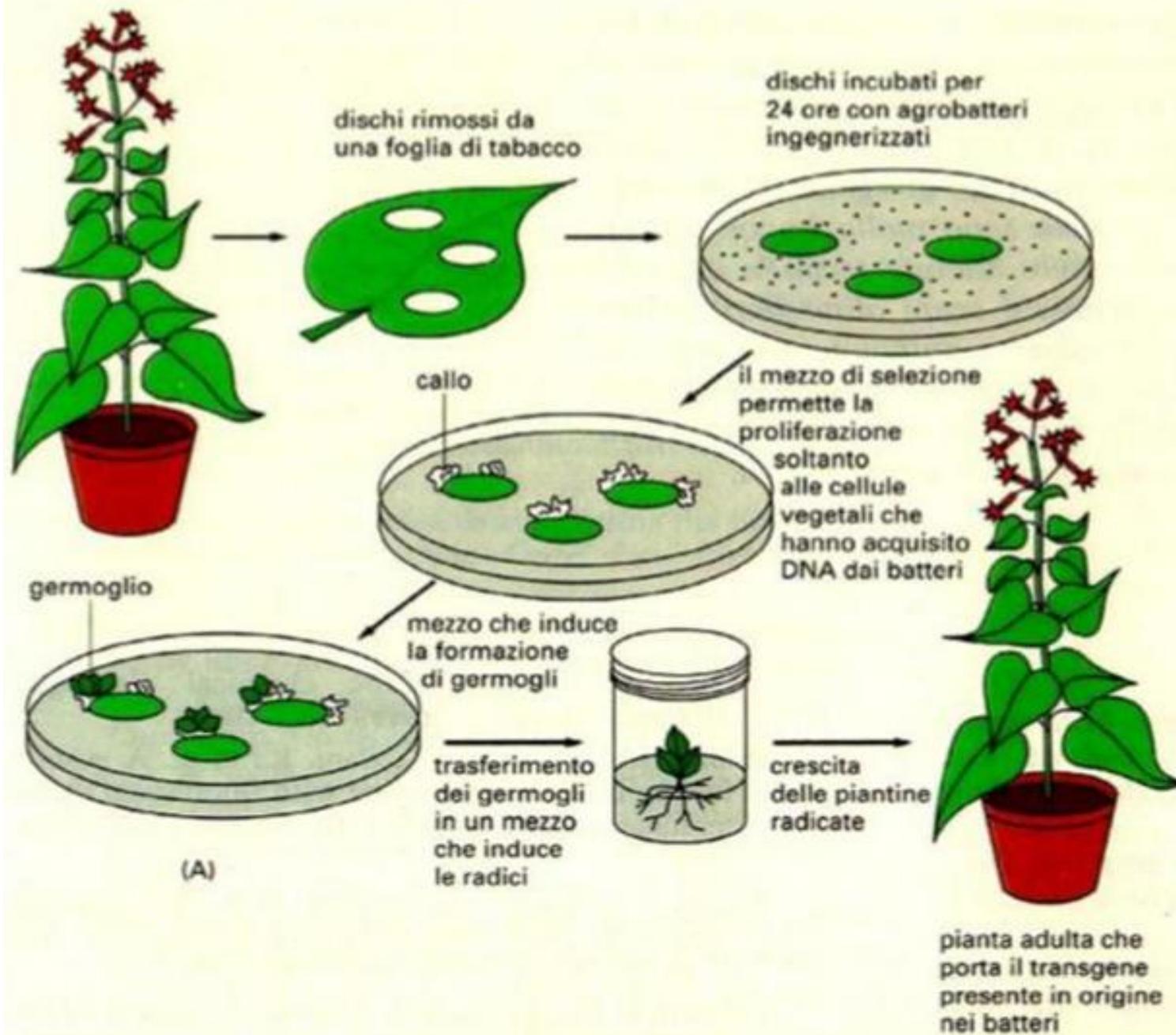
# Trasformazione di Piante

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.

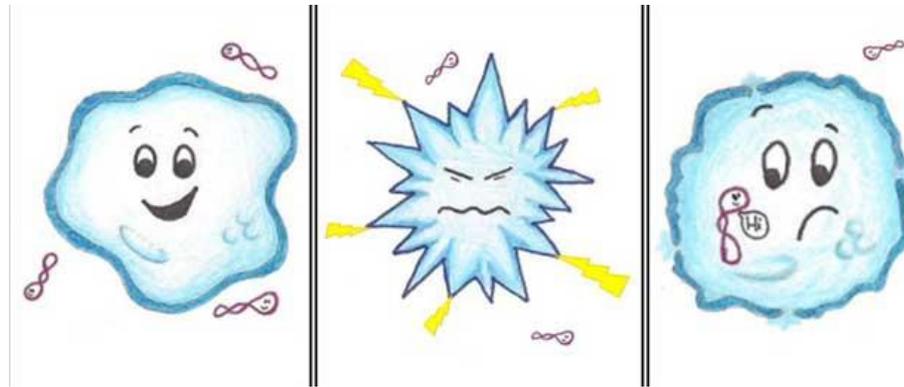
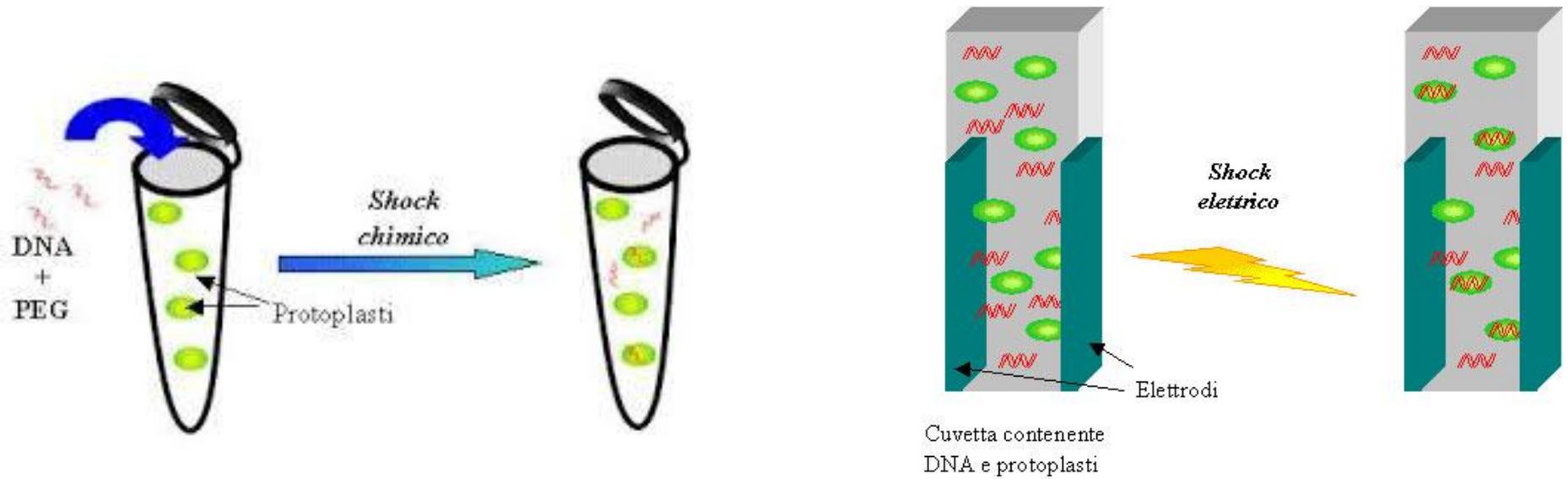
Direct delivery of DNA to wall-less plant cells using **electroporation or PEG**.

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**

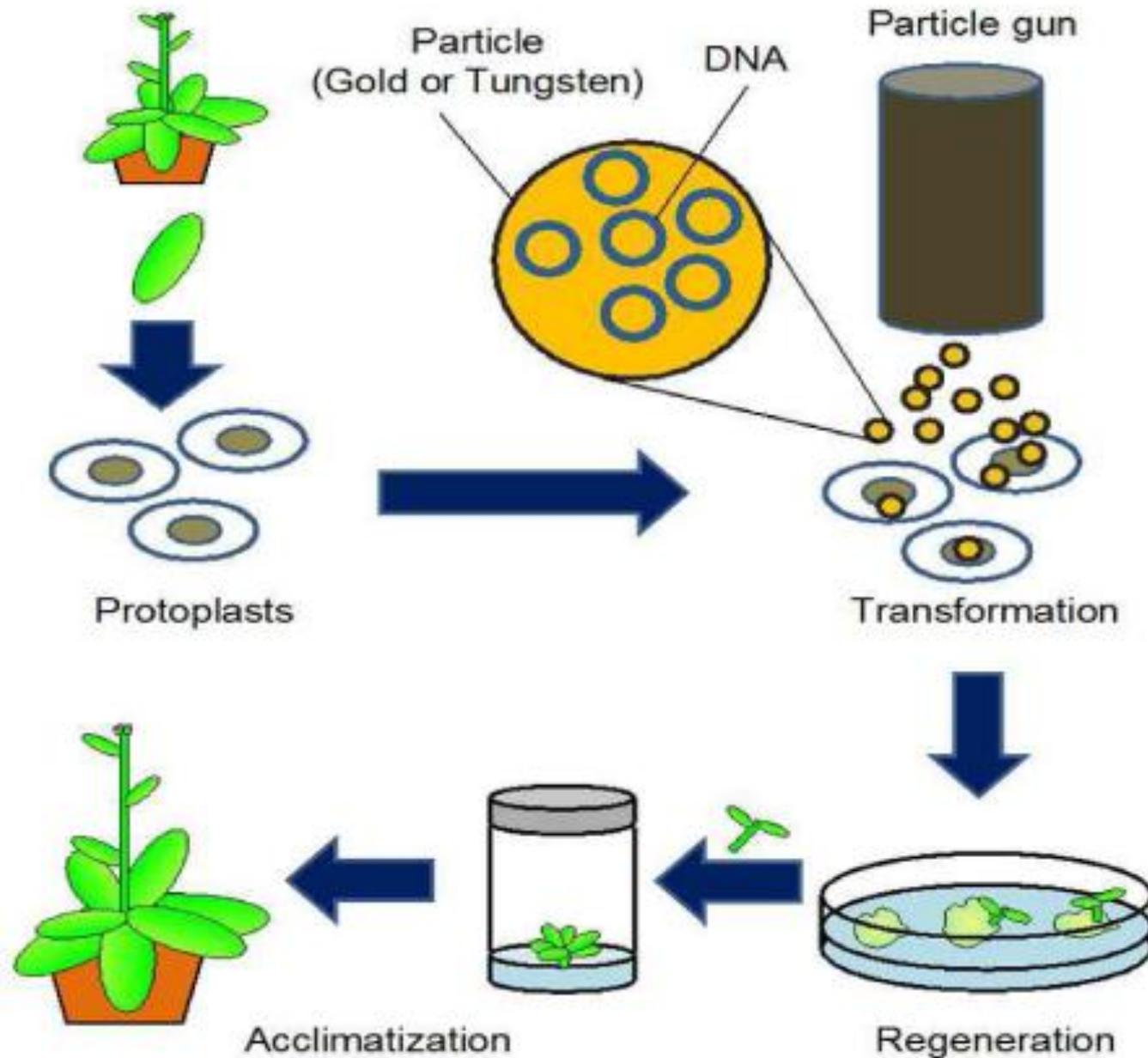
## **Advantages**

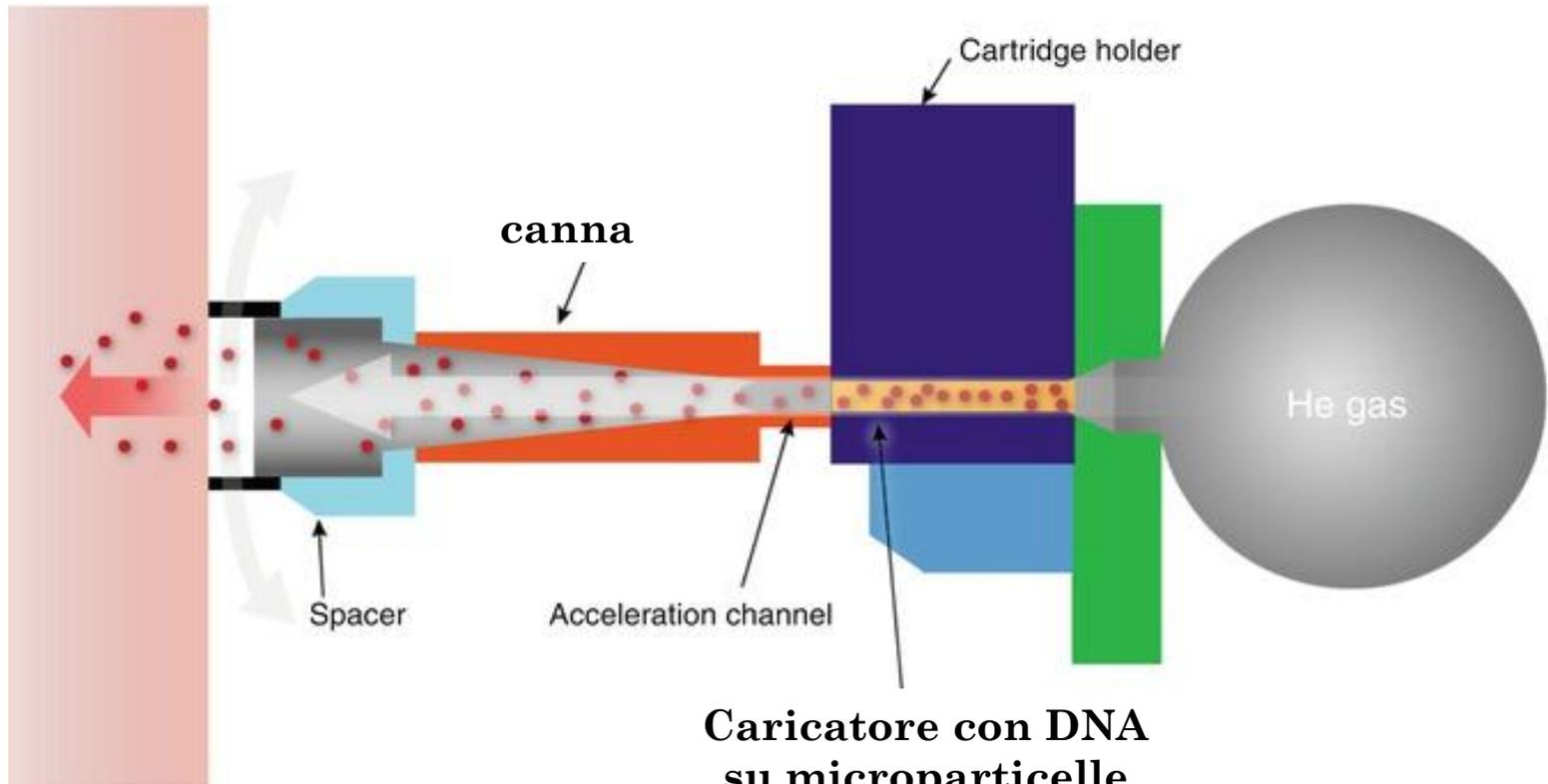
- **Delivery of multiple plasmids with high levels of co-transformation**
- **No binary vector required**
- **High frequency transformation**
- **Most plant species are amenable to protoplast isolation and transformation**

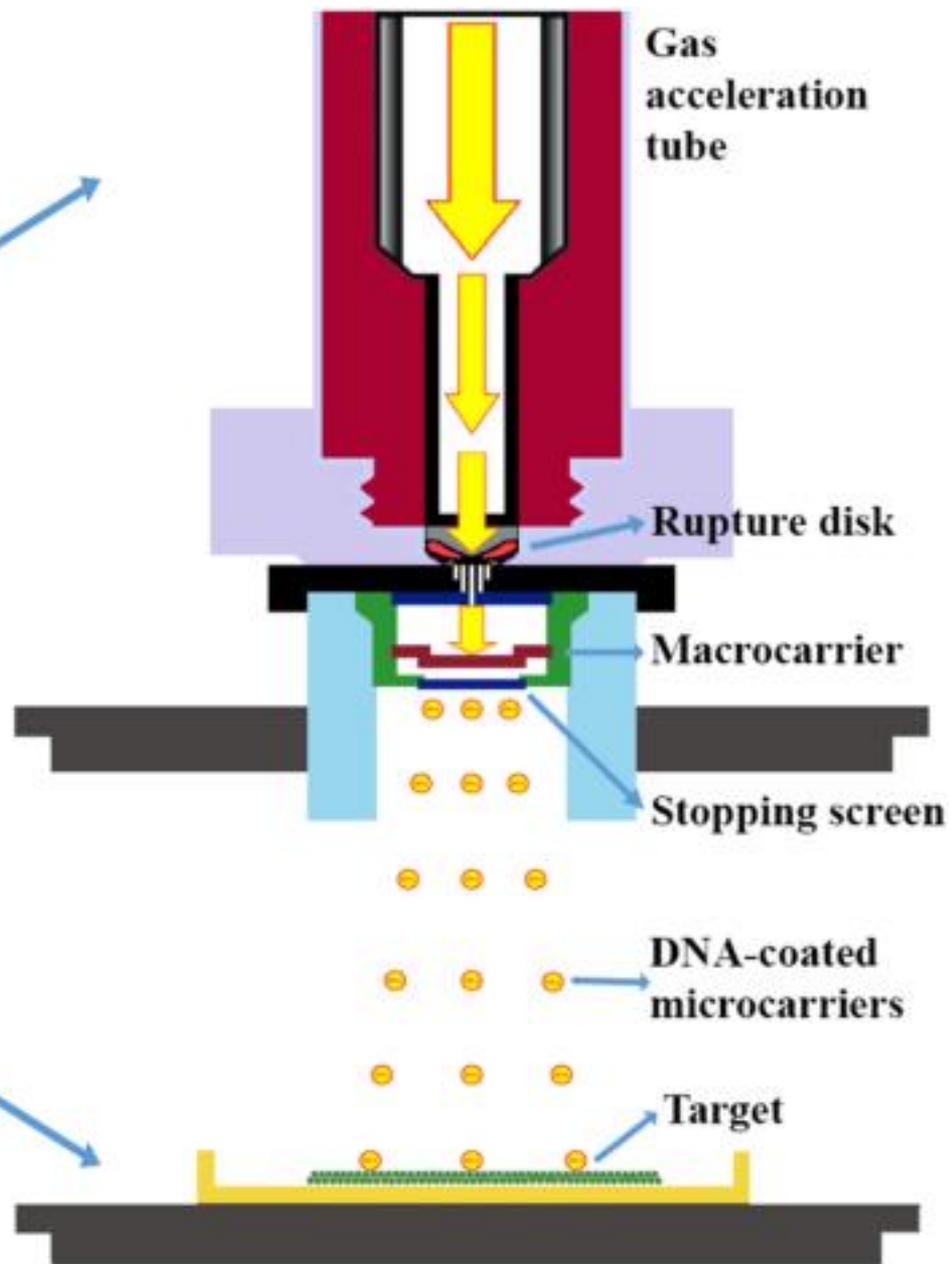
## **Disadvantages**

- **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 diploide, 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.

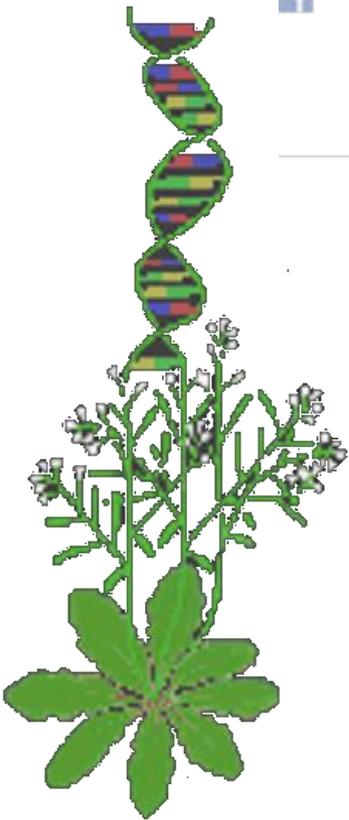
# **In planta *Agrobacterium*-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration.**

Bechtold N<sup>1</sup>, Pelletier G.

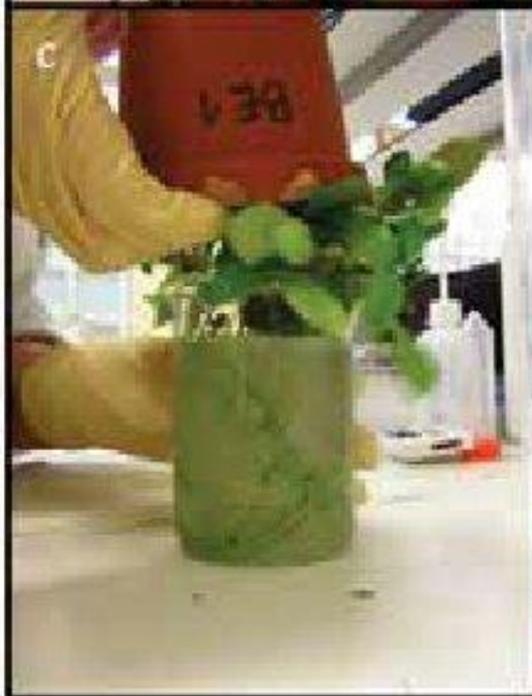
## **Author information**

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

