

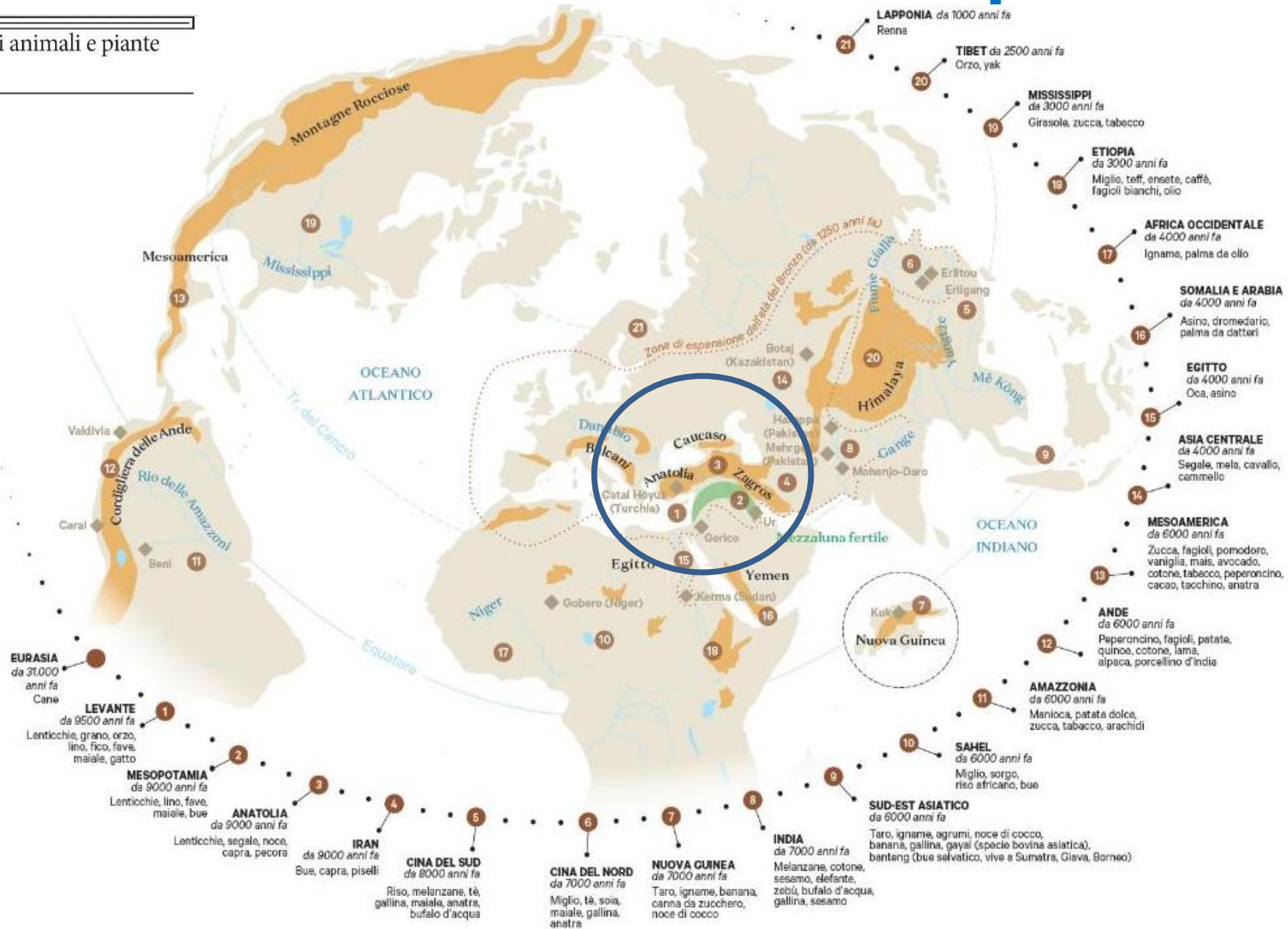
A glowing blue DNA double helix structure is shown against a dark background. The helix is composed of two strands connected by rungs, all emitting a bright blue light. The structure is slightly out of focus, giving it a sense of depth and movement.

# INGEGNERIA GENETICA NELLE PIANTE

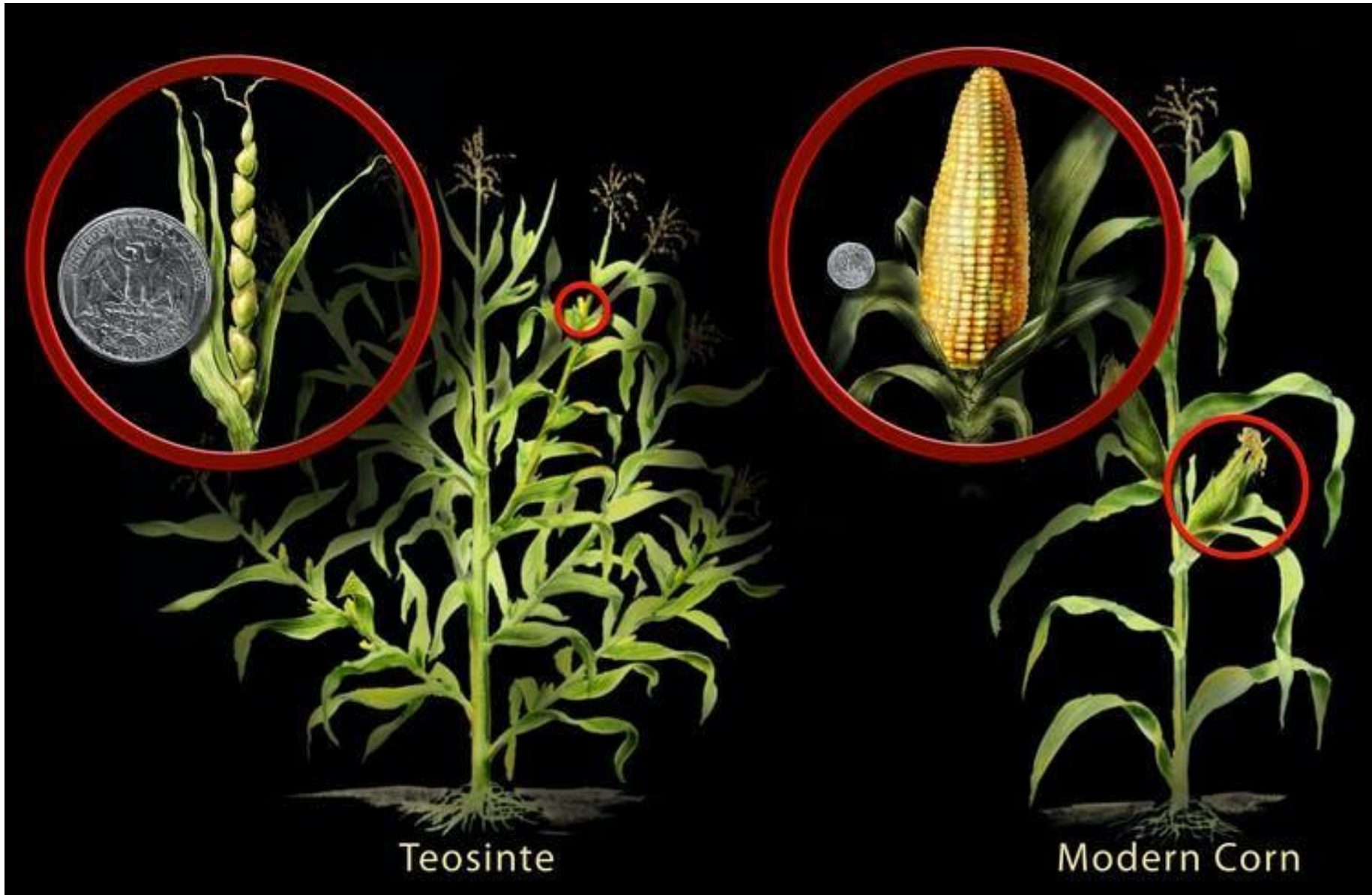
# Addomesticamento delle piante

ATLANTICO  
STORICO  
MONDIALE  
L'ippocampo

L'addomesticamento di animali e piante  
(dal 30.000 a.C.)



# Addomesticamento delle piante





# Plant breeding

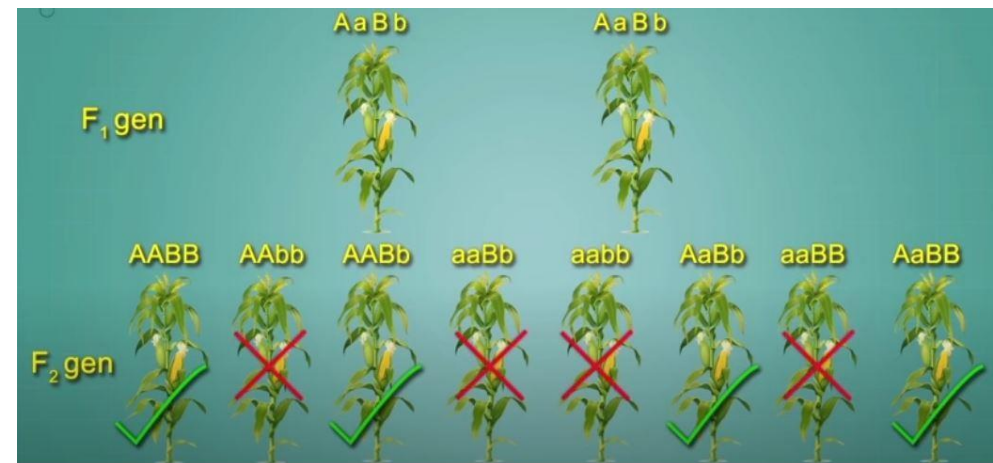
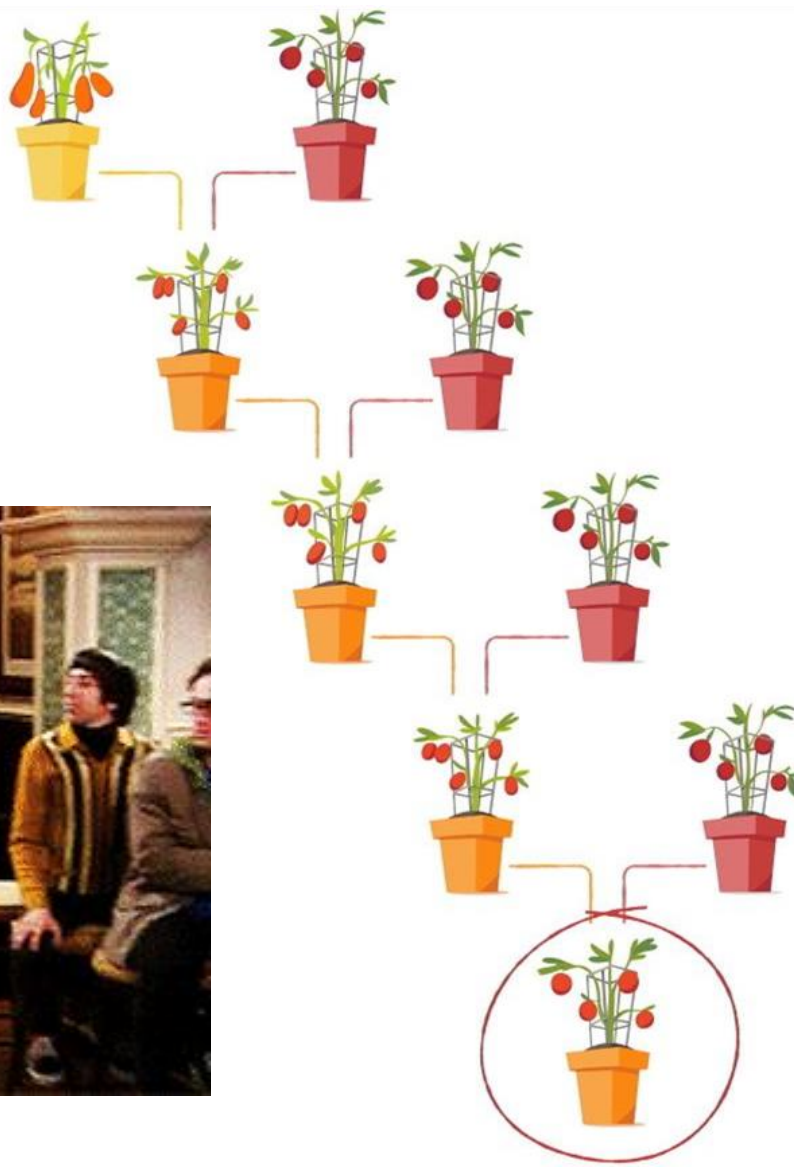


**L'incrocio avviene in maniera controllata impedendo l'autoimpollinazione e favorendo un'impollinazione tra piante selezionate.**



# Plant breeding

## Tradizionale



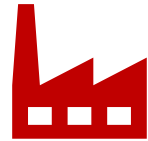
# Organismi Geneticamente Modificati

WHO (World Health Organization):

“Organisms (i.e. plants, animals or microorganisms) in which the genetic material (DNA) has been altered in a way that does not occur naturally by mating and/or natural recombination”

- **1973** – Herbert Boyer e Stanley Cohen hanno prodotto il primo OGM → *E. coli* materiale genetico da *Staphylococcus aureus*
- **1974** – primi studi e produzione di topi transgenici
- **1983** – Herrera-Estrella e colleghi, Fraley e colleghi (Monsanto) e Bevan e colleghi prime cellule vegetali geneticamente modificate sfruttando *Agrobacterium tumefaciens*

# Organismi Geneticamente Modificati



INDUSTRIA

In campo agronomico  
In campo farmaceutico



RICERCA

Analisi di modelli transgenici, per indagare il ruolo di singoli geni e le loro interazioni con altri geni



# Piante Geneticamente Modificate (PGM)

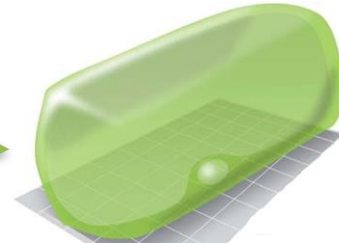
Come ottenerle?

- ingegneria genetica
- coltura *in vitro* di cellule e tessuti

Trasformazione  
cellula somatica

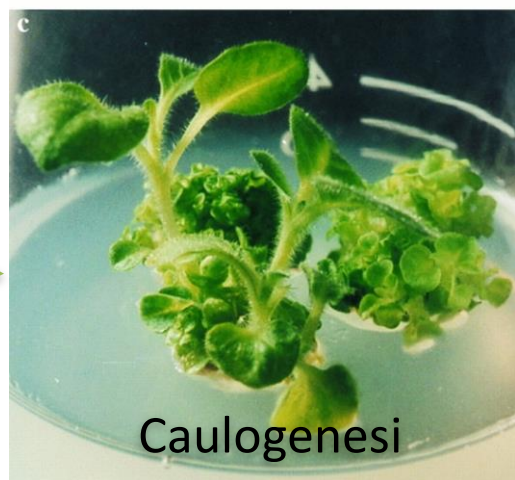
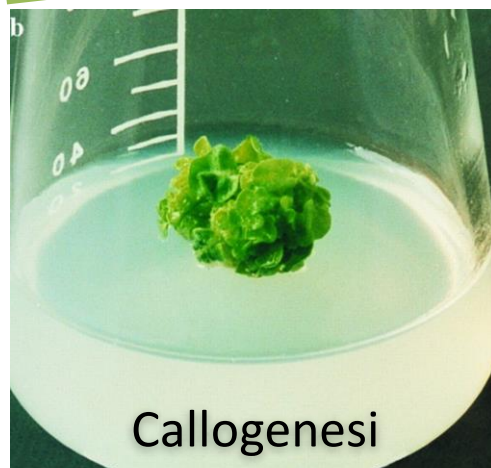


Preparazione  
del costrutto



Totipotenza

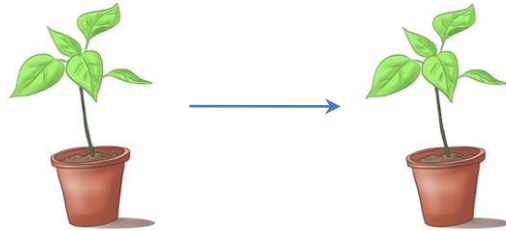
Rigenerazione *in vitro*



# Piante Geneticamente Modificate (PGM)

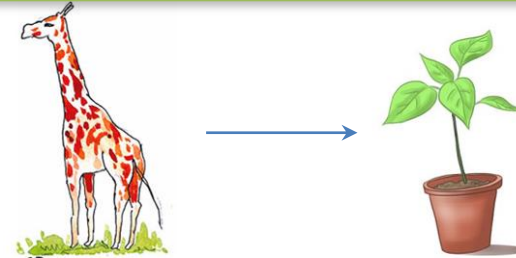
***Cis-gene***

Il gene inserito proviene dalla **stessa specie** o da **specie affini**



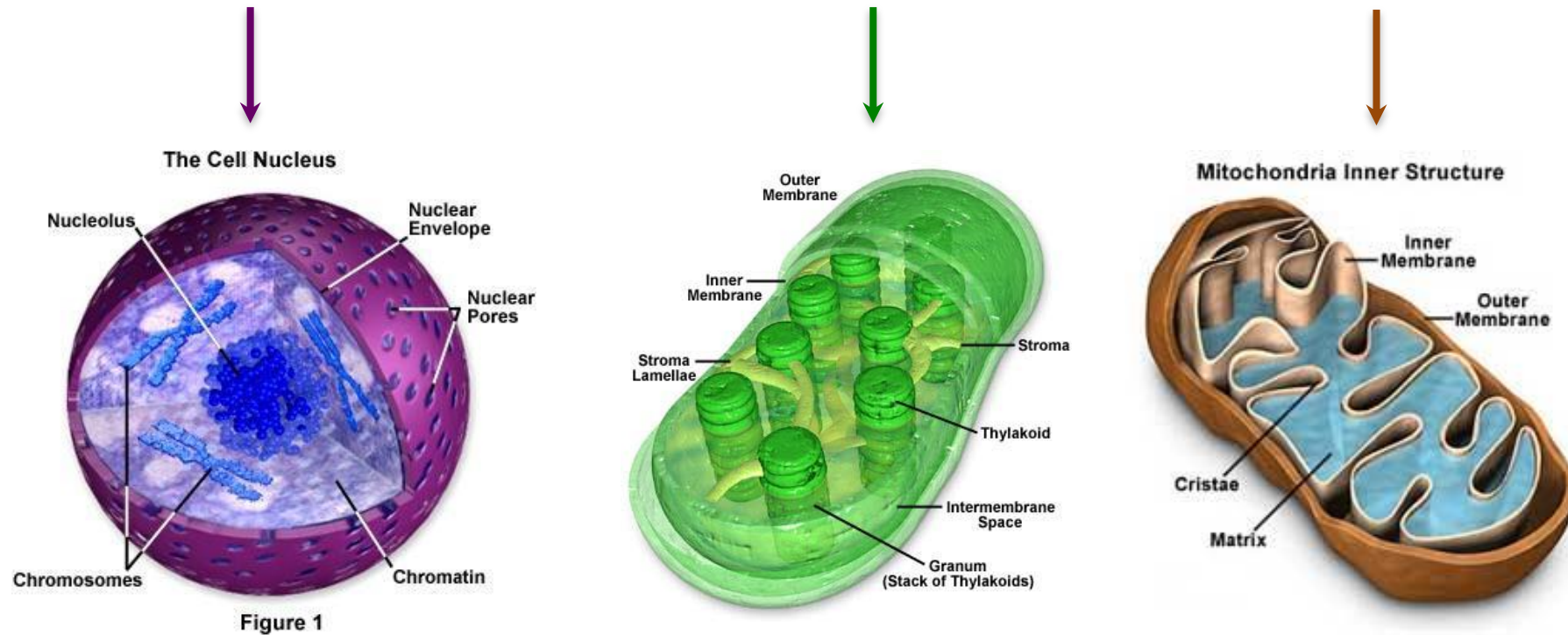
***Trans-gene***

Il gene inserito proviene da **specie filogeneticamente lontane**



La distinzione tra **cis-** e **trans-gene** è recente e volta a rendere più accettabile all'**opinione pubblica**, e al **legislatore**, la produzione di nuove varietà biotecnologiche ... **MA NON HA SENSO BIOLOGICO VISTA L'UNIVERSALITÀ DEL CODICE GENETICO!**

Tutti e tre i genomi della cellula vegetale possono essere trasformati...



...tuttavia, nella quasi totalità dei casi il gene viene inserito nel genoma nucleare!

La trasformazione della cellula vegetale può essere sia stabile che transiente

**Trasformazione stabile**

**Piante GM**

Il transgene si integra nel genoma ospite e:

- È **espresso** come un gene endogeno
- È **repilcato** in mitosi
- È **ereditato** dalle piante figlie

**Trasformazione transiente**

**Singole cellule trasformate**

Il gene è **introdotto nelle cellule** ma **non inserito nel genoma**

- È **espresso**
- **Non è replicato** per mitosi
- **Non è ereditato** dalle piante figlie

L'inserzione del transgene nel genoma nucleare avviene mediante ricombinazione illegittima

Impossibilità di prevedere il sito di inserzione del transgene

Diversi livelli di trascrizione a seconda della regione del genoma in cui il transgene si è inserito

Necessità di ottenere numerose piante GM per selezionare quella con i livelli di trascrizione desiderati

# Metodi di trasformazione



Chimico-fisici

Uso di:

- scariche elettriche
- trattamenti chimici
- nanoproiettili

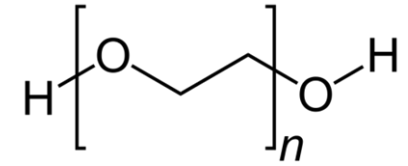


Biologici

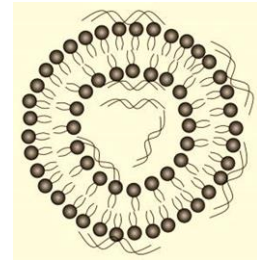
Uso di:

- batteri
- virus

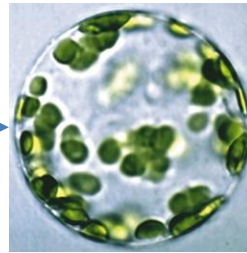
# 1 Trasformazione di protoplasti mediata da polietilenglicole (PEG)



Il PEG induce la **fusione** di vescicole di membrana plasmatica



DNA in liposomi

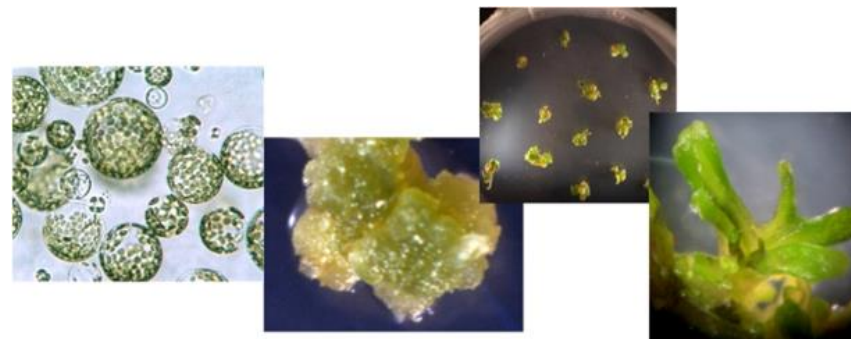


Protoplasto

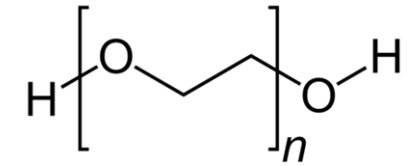


DNA nudo

Dai **protoplasti trasformati** è possibile **rigenerare una pianta GM**



# Trasformazione di protoplasti mediata da polietilenglicole (PEG)



I maggiori limiti sono:

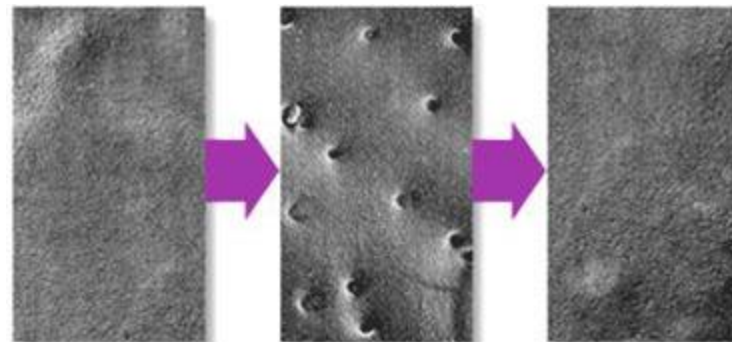
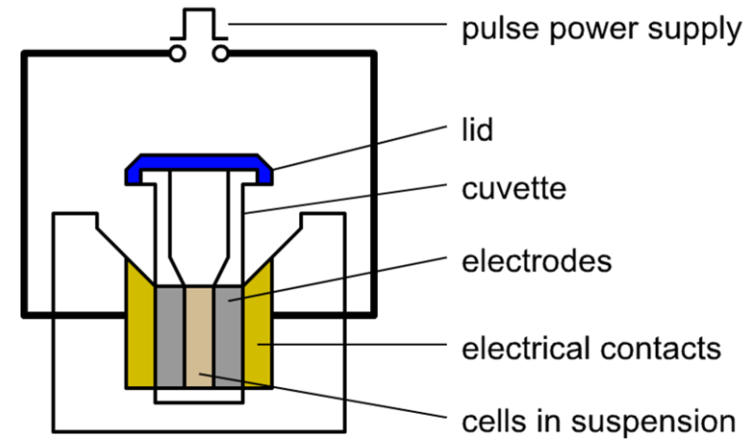
- **Bassa efficienza di trasformazione**
- **Necessità di rigenerare la pianta da singoli protoplasti**

Usata principalmente per la **trasformazione transiente di protoplasti**



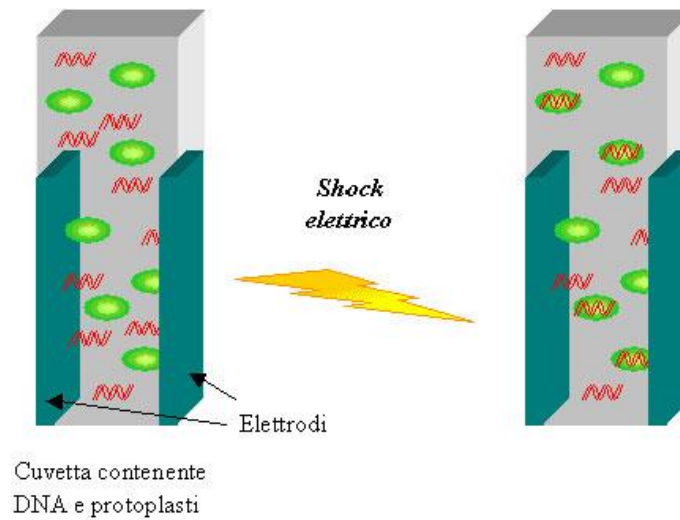
# 2 Elettroporazione

Scariche elettriche brevi e di alta intensità **permeabilizzano reversibilmente la membrana plasmatica**, causando la **formazione transiente di pori**

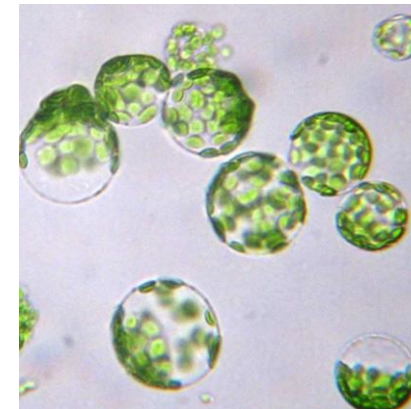


# Elettroporazione

Il **DNA** presente nella miscela di elettroporazione può entrare nella cellula

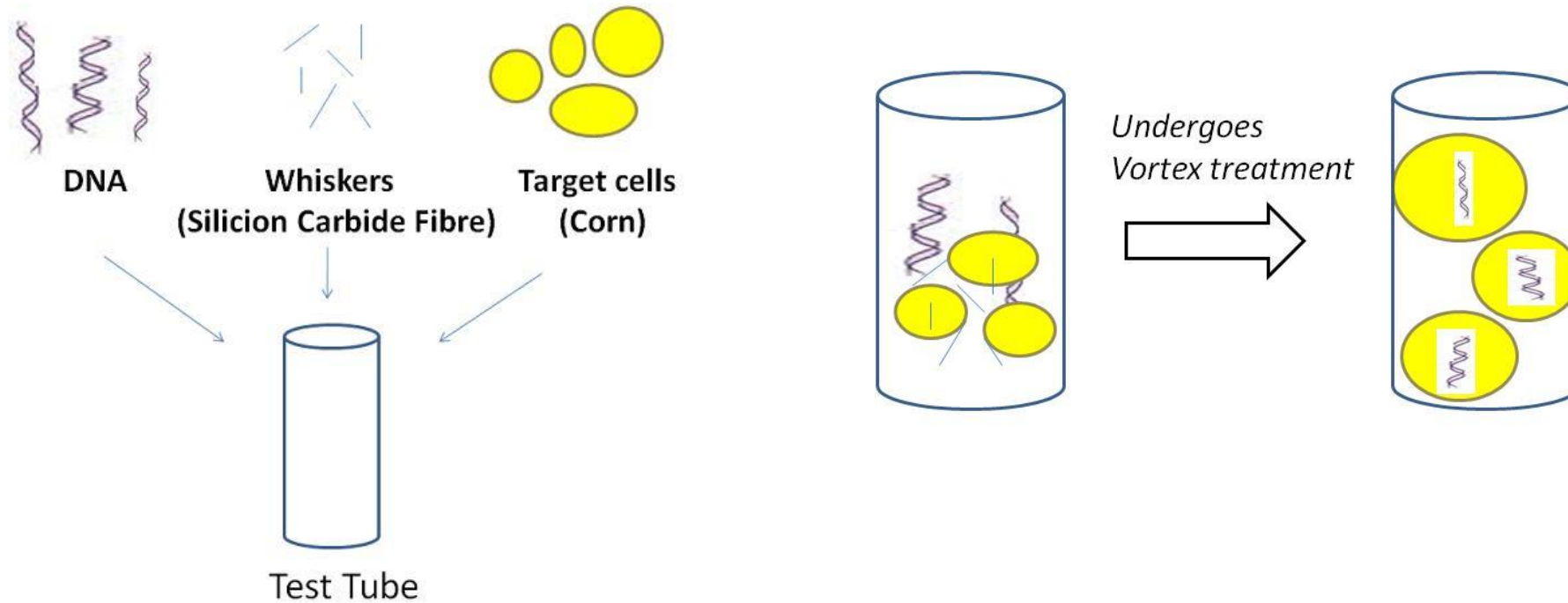


La parete riduce la frequenza di trasformazione, per cui è usata soprattutto per la trasformazione transiente di protoplasti



# 3 Fibre di carburo di silicio

Vigorosa agitazione di colture cellulari in presenza di fibre di carburo di silicio



# Fibre di carburo di silicio

Tecnica, usata con successo soprattutto con **monocotiledoni**

Semplice da attuare, consente di ottenere **alte rese di trasformazione**

Pone il problema della **tossicità del carburo di silicio**



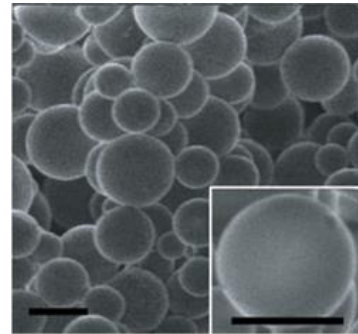
# 4

## Tecnica biolistica

*Gene gun* = Cannone genico



**Biolistica = biologia + balistica**

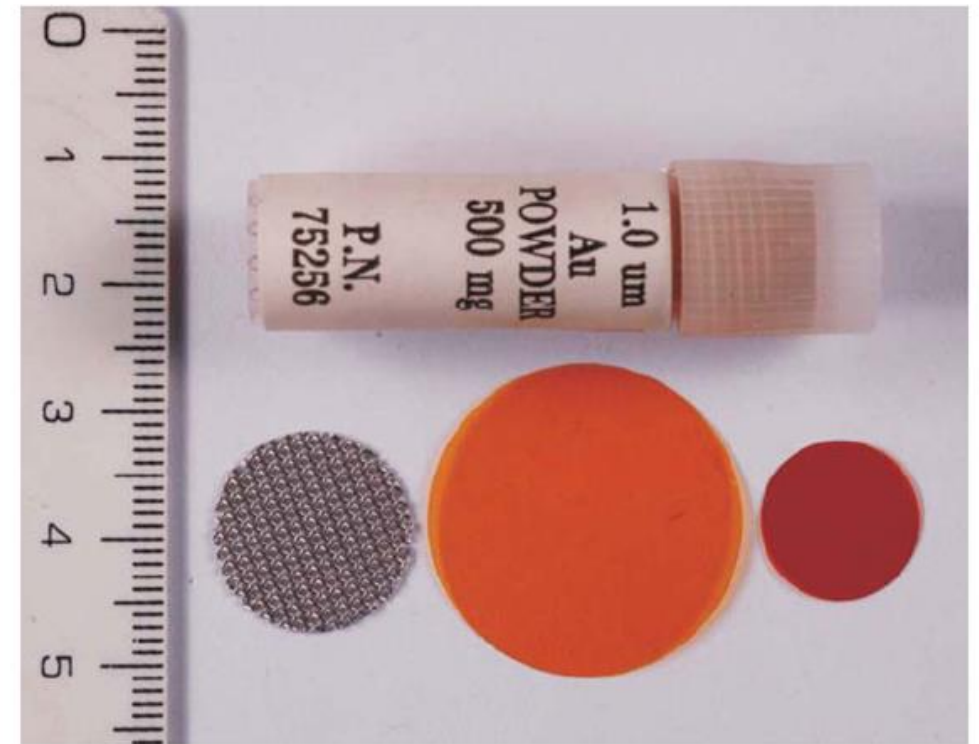
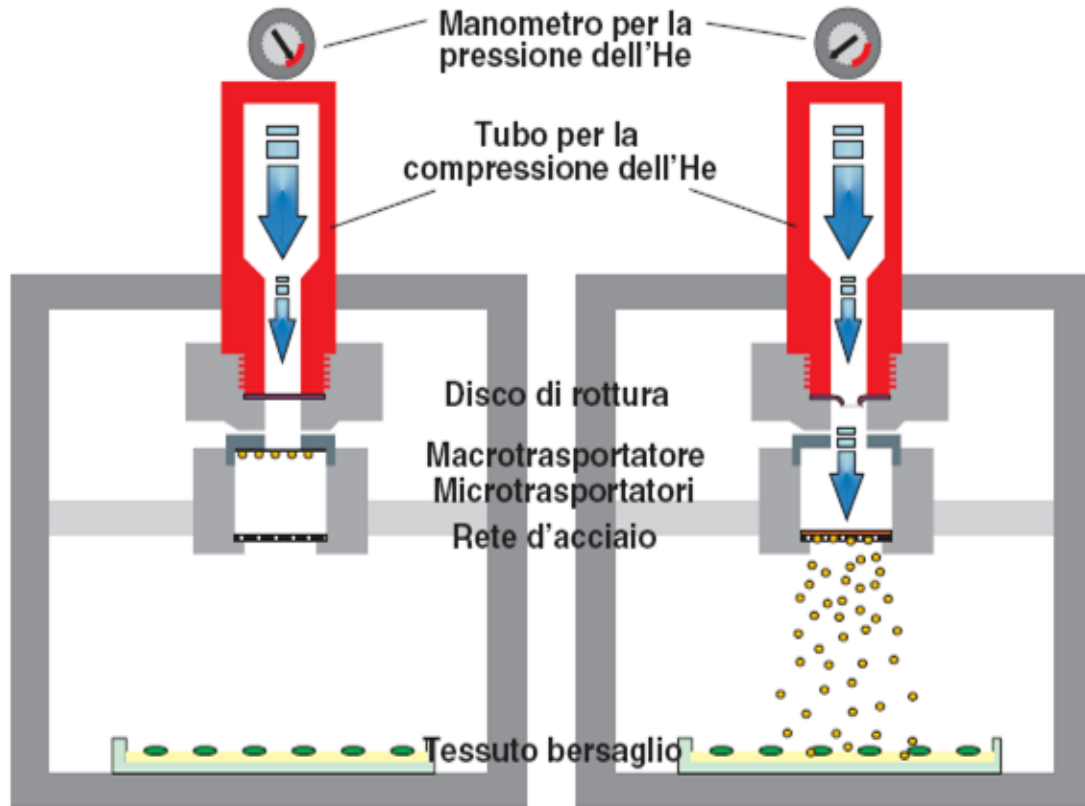


Micoproiettili di oro-tungsteno

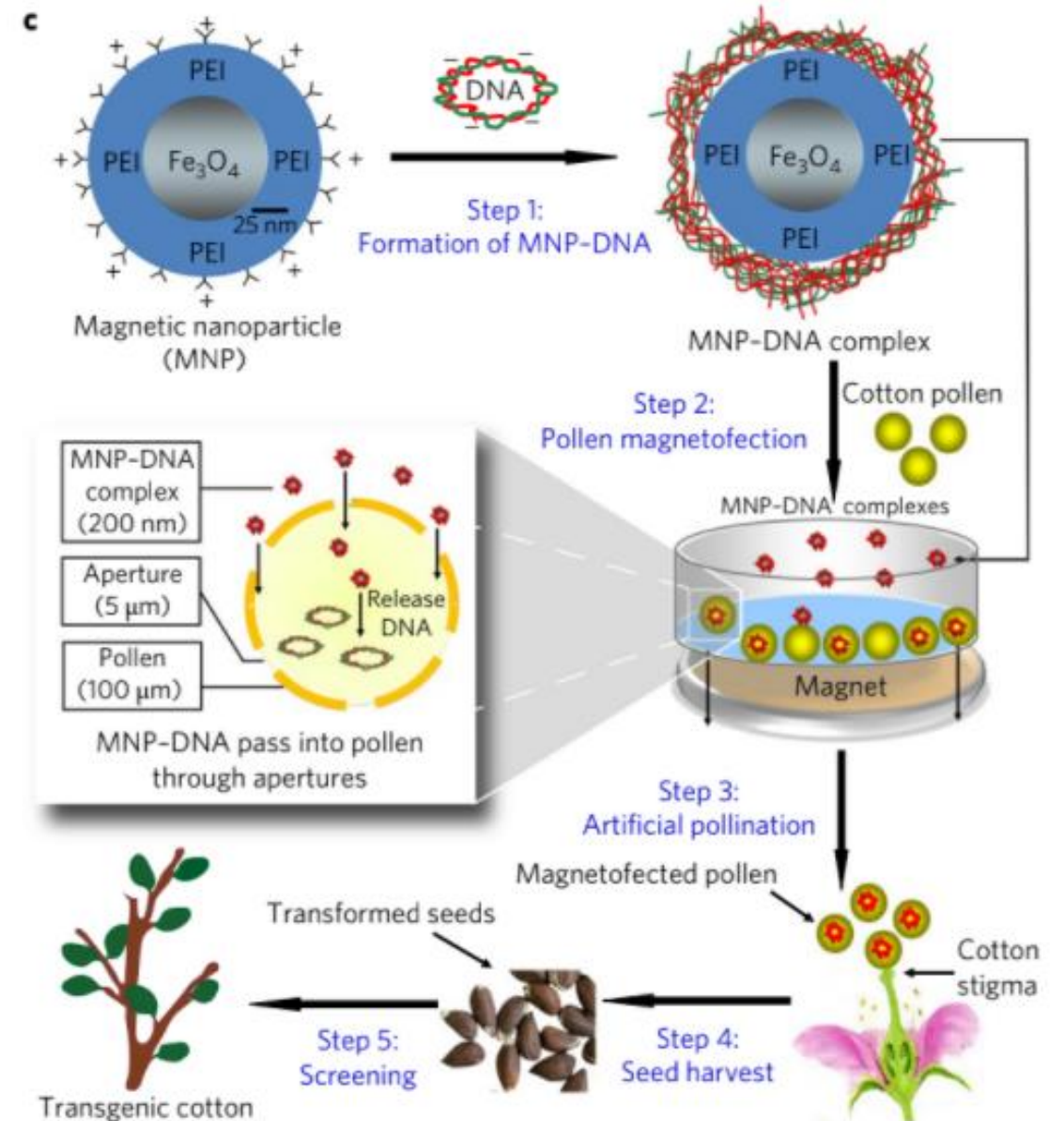
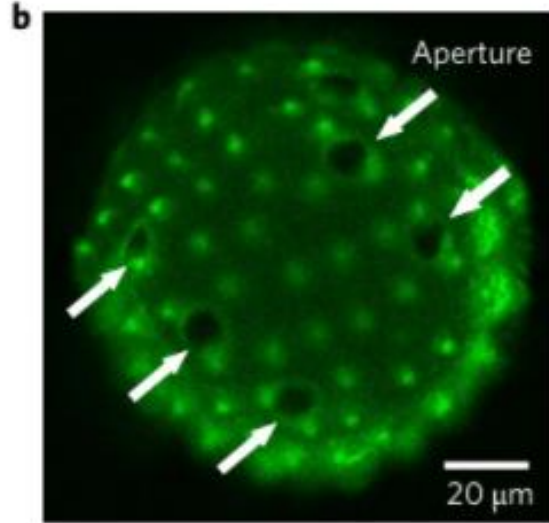
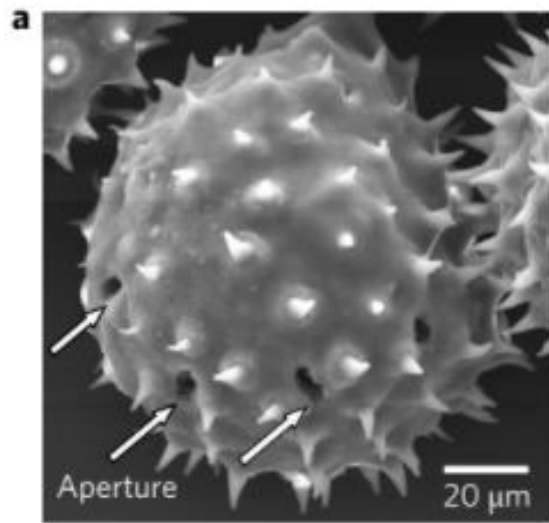


# Tecnica biolistica

*Gene gun* = Cannone genico



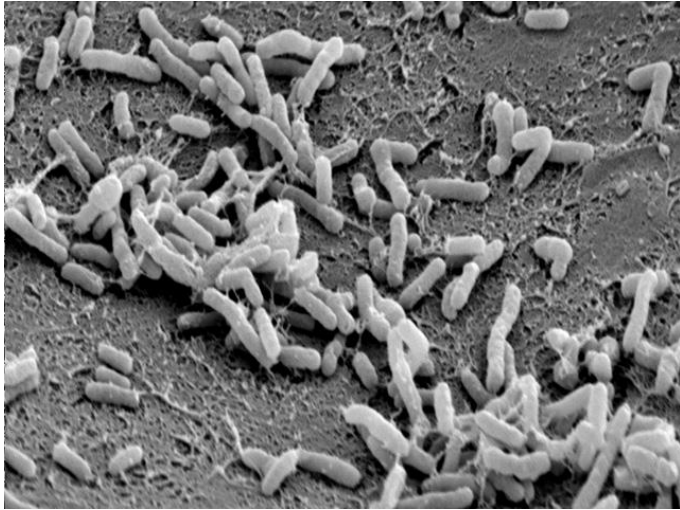
# Pollen magnetofection



# 6

## *Agrobacterium tumefaciens*

un ingegnere genetico naturale



- **Gram-negativo** affine a *Rhizobium* (famiglia Rhizobiaceae)
- Fitopatogeno delle **dicotiledoni**
- Causa il **tumore del colletto**
- È in grado di **trasferire** alla cellula vegetale alcuni dei suoi **geni** che vengono **integrati nel genoma vegetale** e inducono la formazione della massa tumorale detta **galla**, **habitat ideale** per la **proliferazione del batterio**

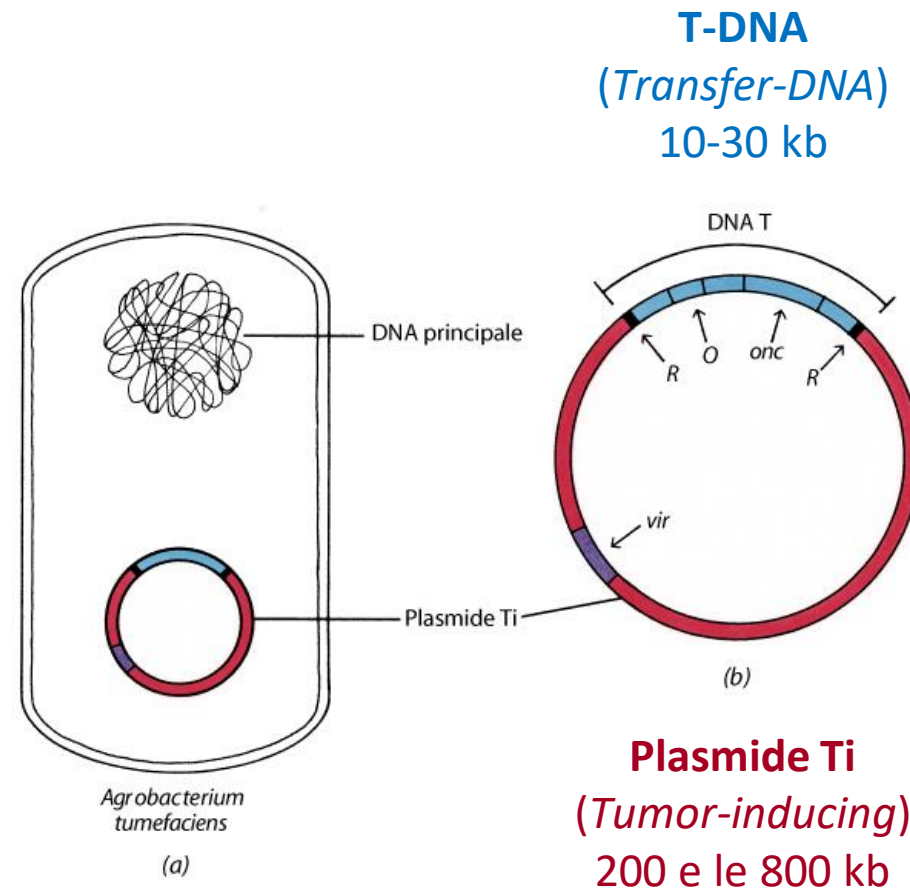


# *Agrobacterium tumefaciens*

un ingegnere genetico naturale



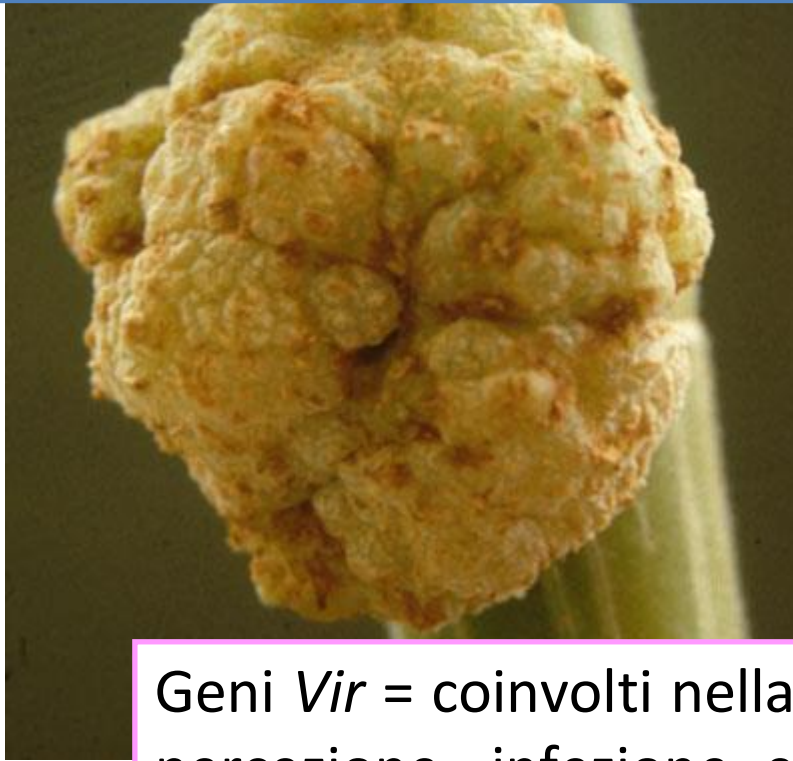
Tumore del colletto (galla)



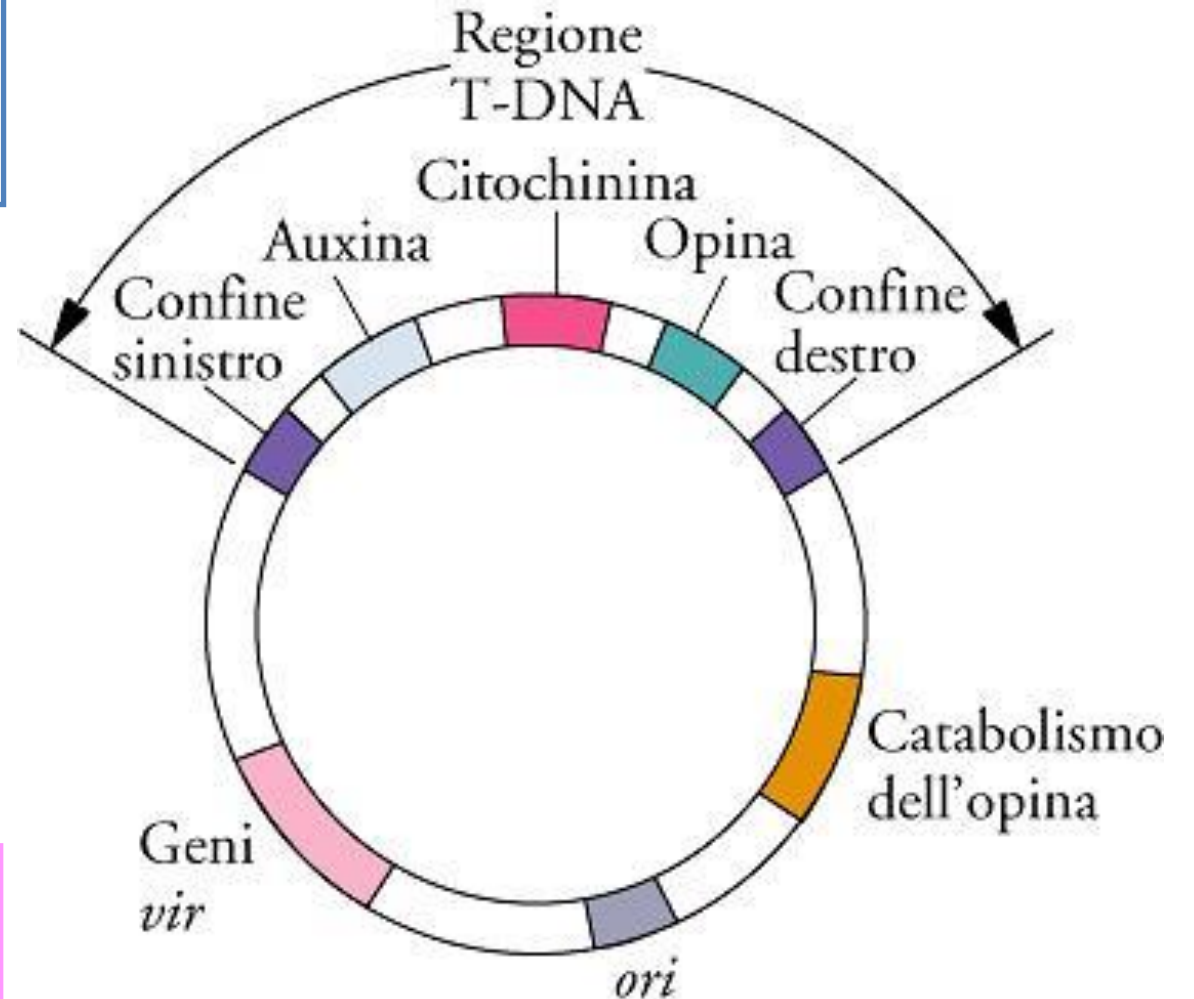
# *Agrobacterium tumefaciens*

un ingegnere genetico naturale

Regioni terminali (25 bp) = Lb a Rb  
Opine = biosintesi aminoacidi  
Auxine e Citochine = oncogeni



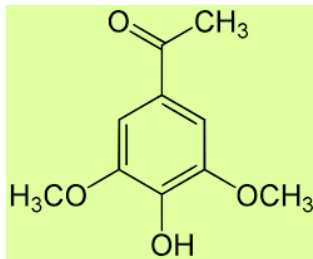
Geni *Vir* = coinvolti nella percezione, infezione e integrazione del T-DNA



# *Agrobacterium tumefaciens*

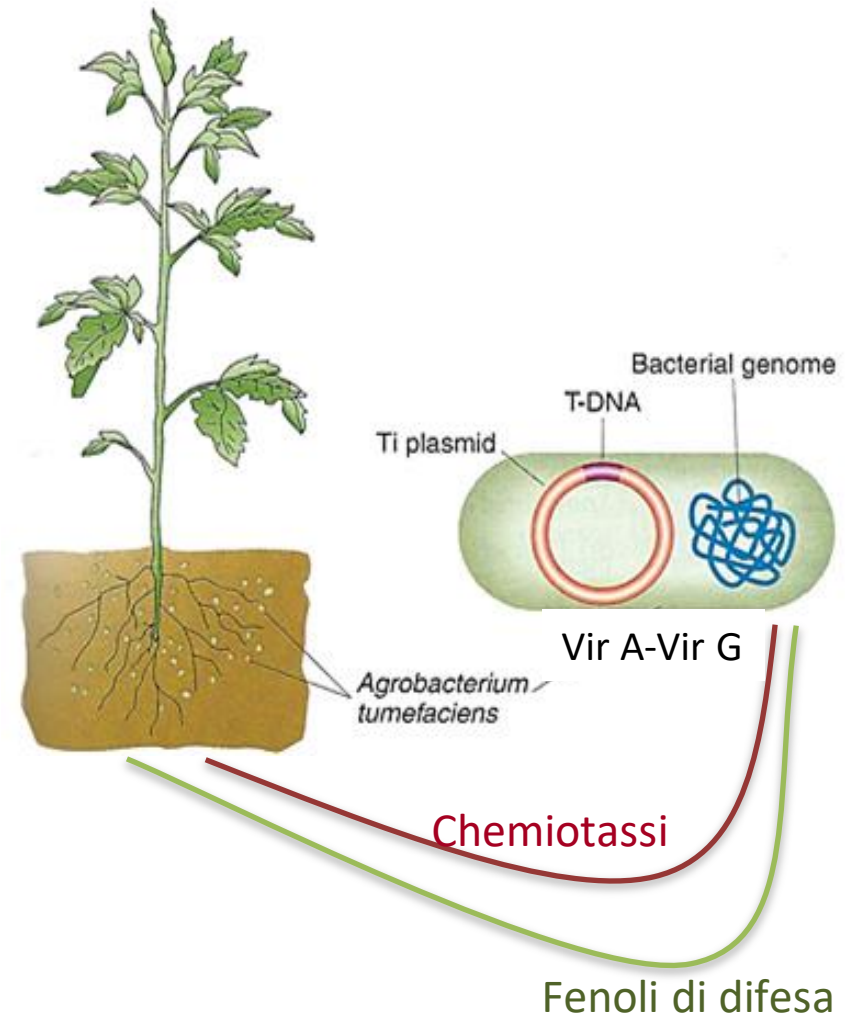
## Infezione in natura

Quando una pianta subisce una **ferita** le cellule rilasciano **composti fenolici di difesa** che diffondono nel suolo



Acetosiringone

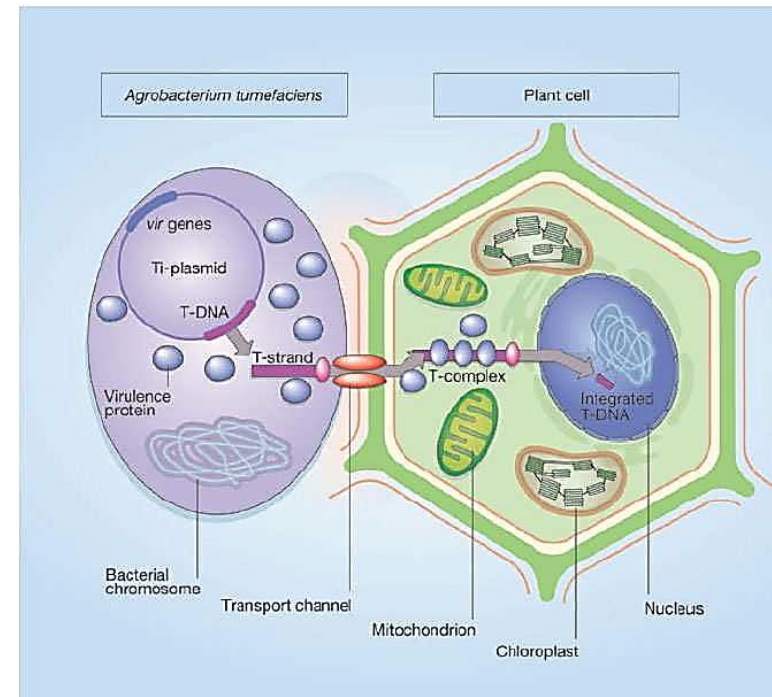
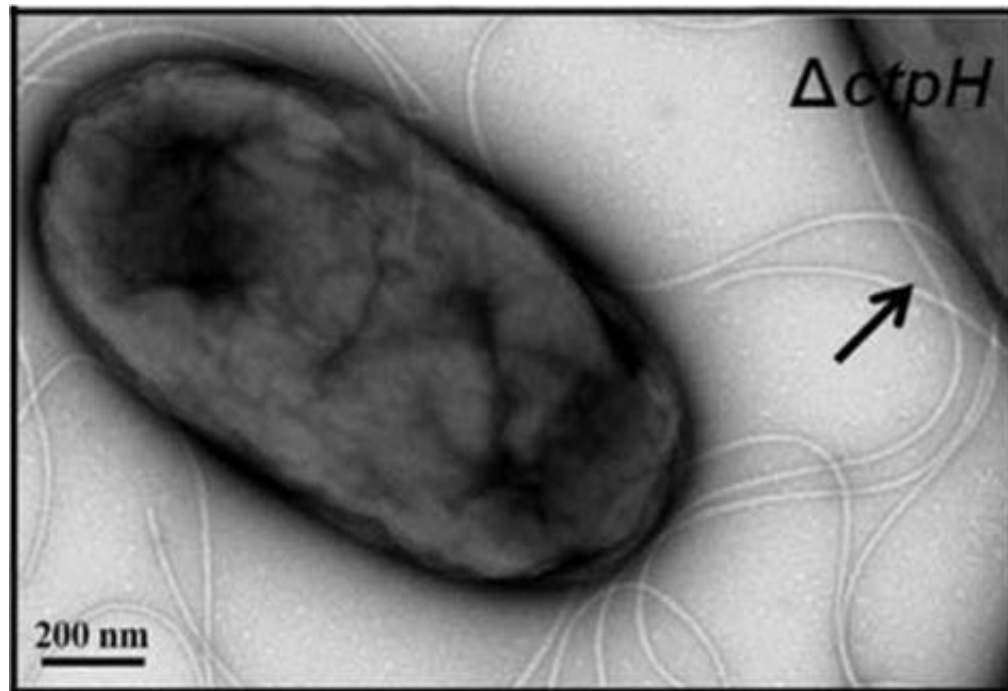
Alcuni di questi fenoli sono percepiti dagli agrobatteri che si muovono verso la fonte di emissione della sostanza (**chemiotassi**)



# *Agrobacterium tumefaciens*

## Infezione in natura

Quando l'agrobatterio è a contatto con la cellula vegetale emette un **pilo di infezione** e trasferisce il T-DNA con un meccanismo simile alla coniugazione

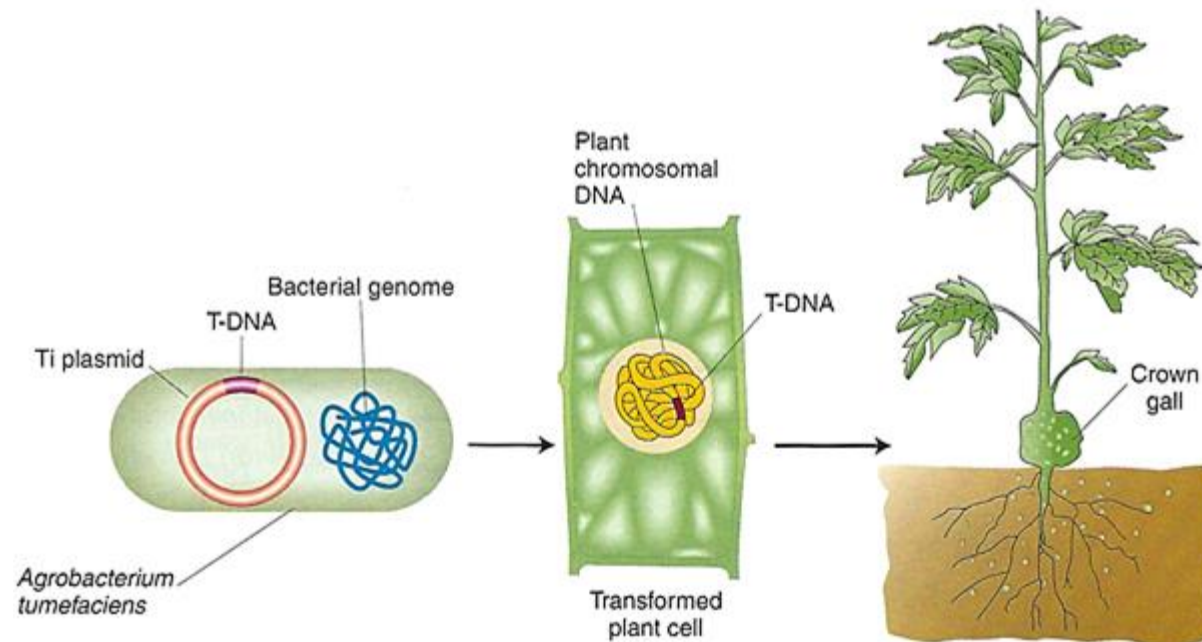


# *Agrobacterium tumefaciens*

## Infezione in natura

Nel nucleo il T-DNA si integra nel genoma nucleare e i suoi geni vengono espressi come se fossero geni endogeni

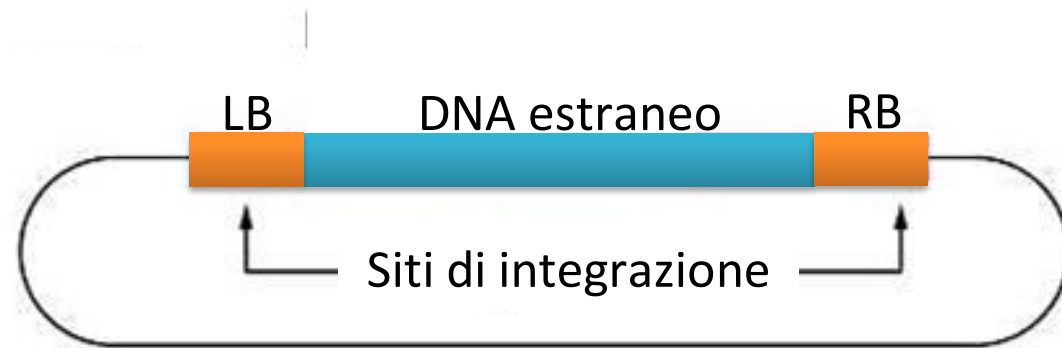
Viene indotta la **formazione della galla** (oncogeni) e la **biosintesi di aminoacidi** (opine) utilizzabili solo dal batterio



# *Agrobacterium tumefaciens*

Trasformazione genetica delle piante

Mentre **Rb** e **Lb** sono **essenziali** per il **trasferimento del T-DNA**, paradossalmente **il T-DNA stesso non lo è**

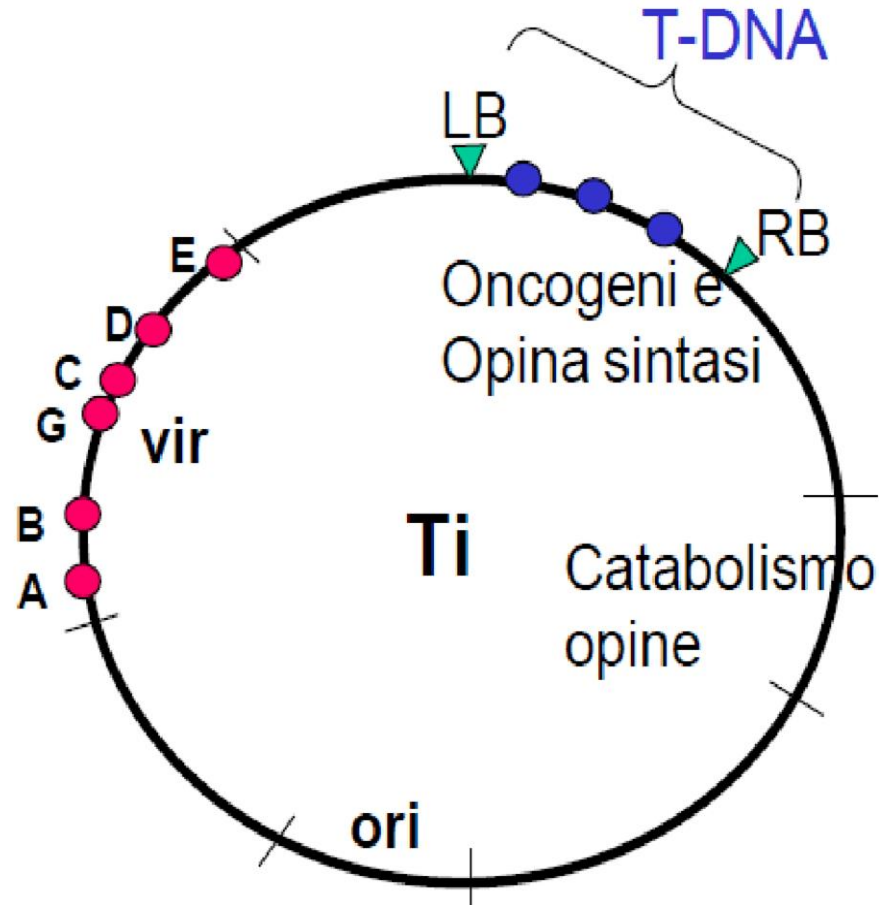


Qualunque **sequenza di DNA inclusa tra i bordi Lb e Rb** viene trasferita nelle cellule vegetali dall'apparato di trasferimento di *Agrobacterium*

# *Agrobacterium tumefaciens*

## Infezione in natura

La capacità di **infettare** la cellula vegetale, di **trasferire il T-DNA** e di **integrarlo nel genoma nucleare** è legata all'espressione dei **geni Vir**



# *Agrobacterium tumefaciens*

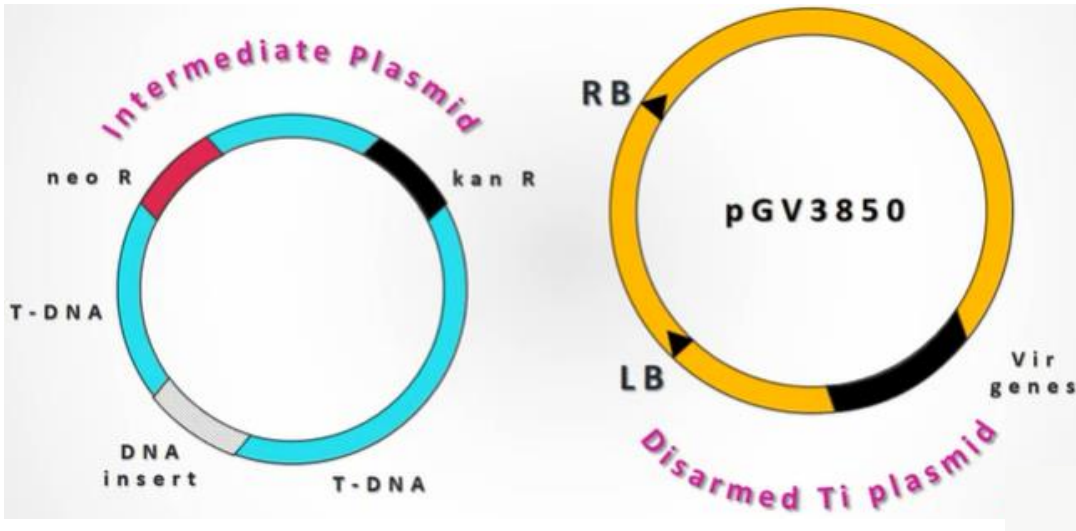
## Trasformazione genetica delle piante

- **Auxine/Citochine** prodotte dal T-DNA impediscono corretta rigenerazione della pianta
- **Produzione di opine** non è utile per la pianta (dannosa?)
- **Plasmidi Ti** sono molto **grandi** (200-800Kb)
- **Gene** di interesse

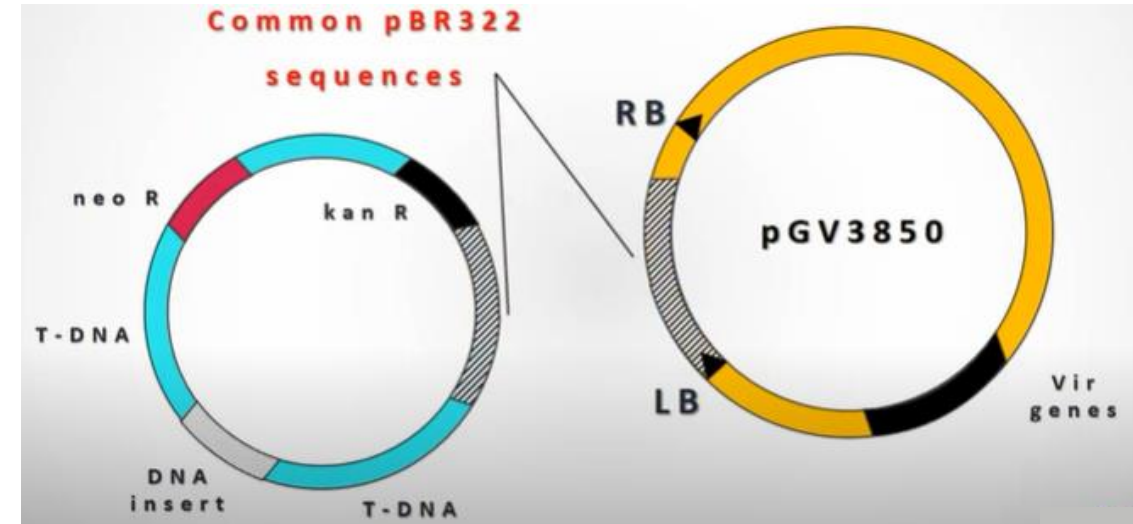


# *Agrobacterium tumefaciens*

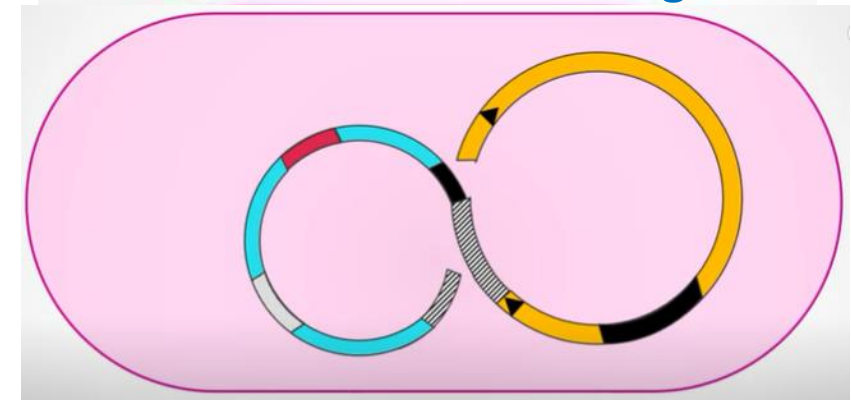
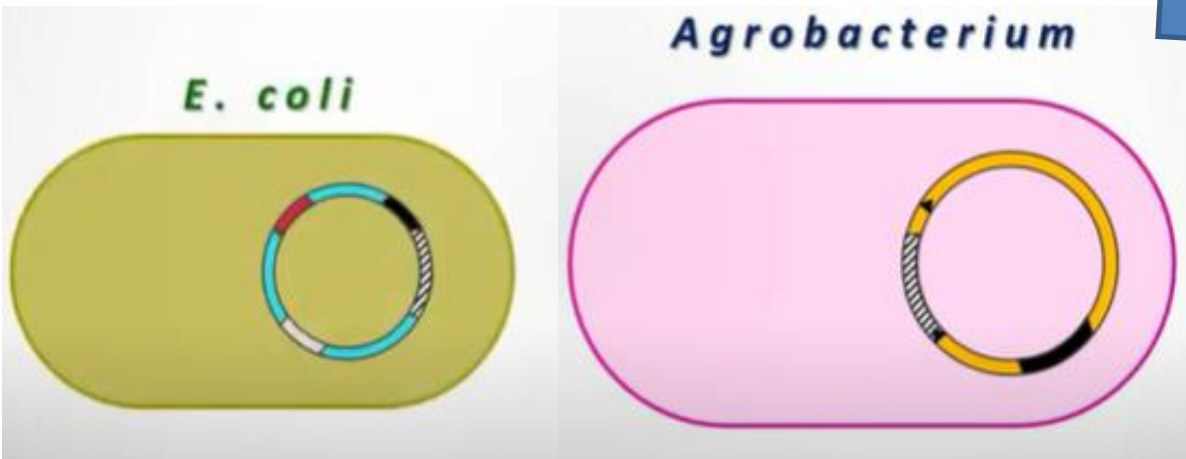
## Sistema del vettore co-integrato



No oncogeni



*Agrobacterium*  
Ricombinazione omologa



# *Agrobacterium tumefaciens*

Sistema del vettore binario:

**DNA da trasferire e geni *vir* possono trovarsi su plasmidi differenti**

Vettore  
binario

- Sono mantenuti i bordi Lb ed Rb
- Vengono rimossi:
  1. i geni *vir*
  2. gli oncogeni (auxine, citochinine)
  3. i geni per le opine
- tra i bordi L ed R vengono inseriti:
  1. il DNA da integrare nel genoma
  2. un marcatore (es. resistenza a kanamicina)

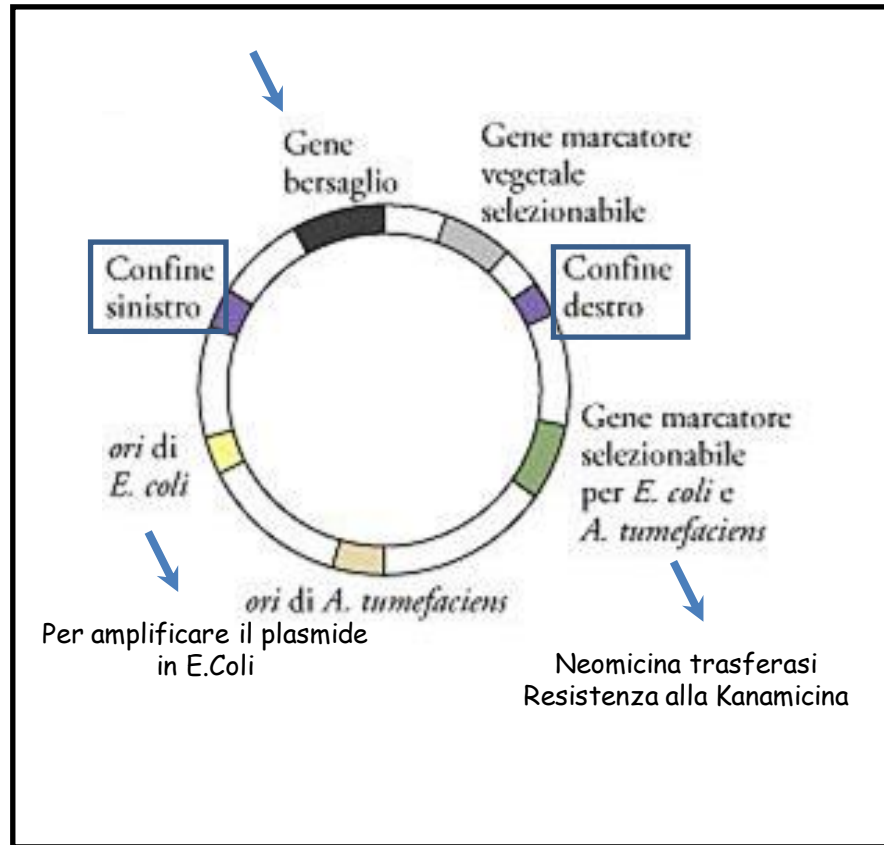
Plasmide helper

- È inserito un altro plasmide, che contiene i geni *vir* ma non il T-DNA

# *Agrobacterium tumefaciens*

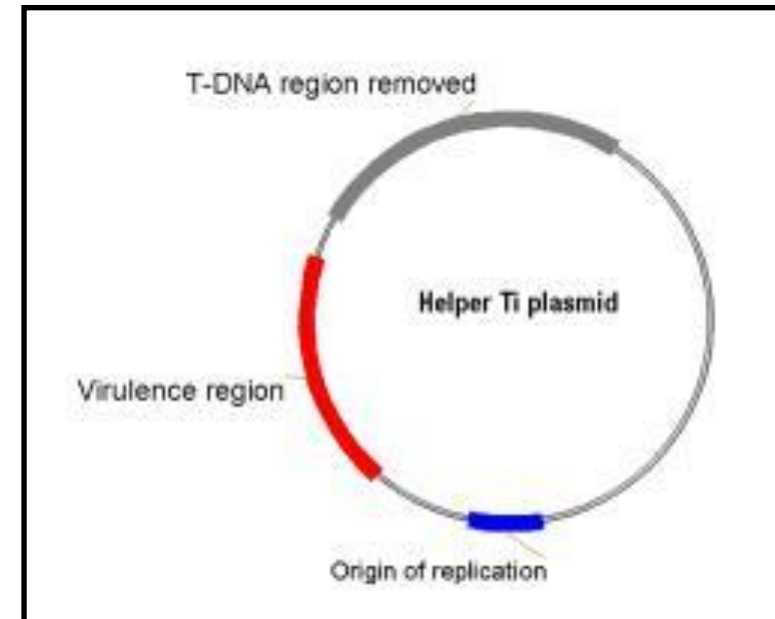
## Sistema del vettore binario

### 1) VETTORE BINARIO



**No geni VIR**

### 2) PLASMIDE HELPER (disarmato)

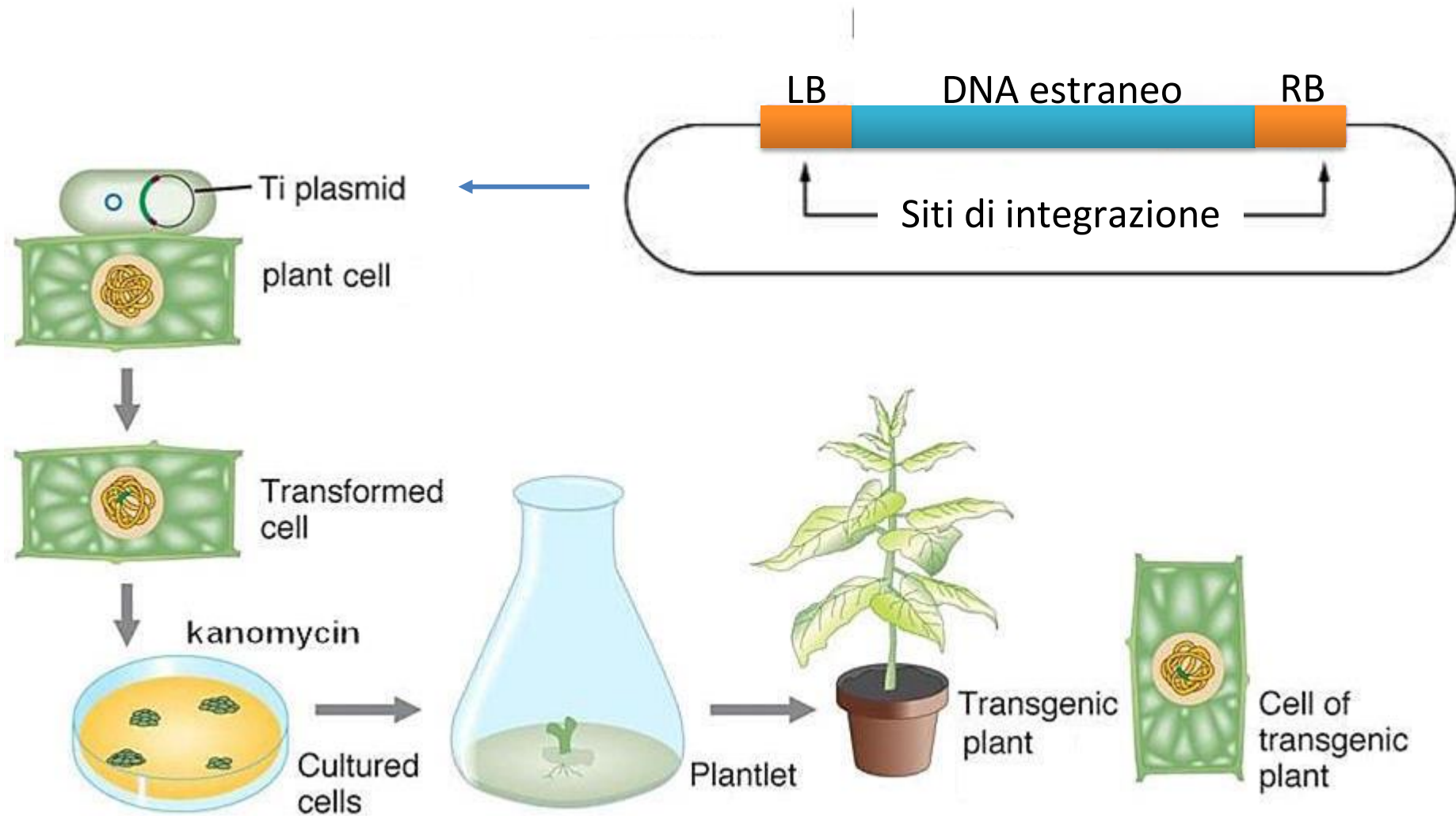


**geni VIR**

Aiuta il trasferimento del T-DNA del VETTORE BINARIO

# *Agrobacterium tumefaciens*

## Trasformazione genetica delle piante

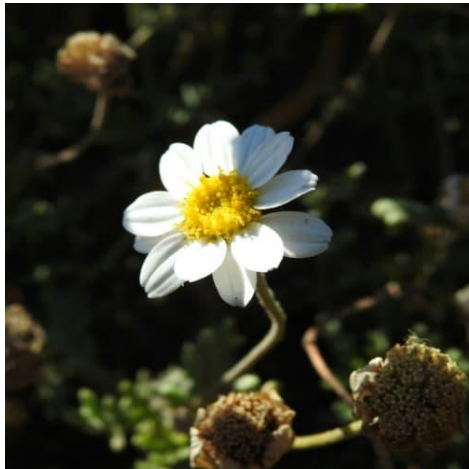


# *Agrobacterium tumefaciens*

per produzione  
di PIANTE TRANSGENICHE



DICOTILEDONI



~~MONOCOTILEDONI~~



Alcuni protocolli elaborati hanno permesso  
l'utilizzo di *A. tumefaciens* anche in mais e riso