

# MICROPROPAGAZIONE

- La micropropagazione è una tecnica applicata ai vegetali che, partendo da una pianta madre, permette di ottenere un elevato numero di cloni identici alla pianta di partenza (propagazione clonale).
- Coltura di meristemi: dalla pianta madre vengono espianati tessuti vegetali totipotenti, i meristemi, che poi vengono messi a contatto con un opportuno mezzo di coltura, costituito da sali minerali, zuccheri, vitamine, ormoni ed un agente gelificante, l'agar. Questi tessuti, riposti in seguito in contenitori sterili, danno origine a germogli: in una prima fase i germogli accrescono le loro dimensioni, poi vengono posti in contenitori separati e divisi in parti più piccole per aumentare il numero di piantine ottenibili; infine, in una terza fase; si induce la formazione di radici, introducendo nel mezzo di coltura opportuni ormoni. Procedendo in questo modo, si otterranno piantine geneticamente identiche alla pianta madre in tempi relativamente brevi.

# MICROPROPAGAZIONE

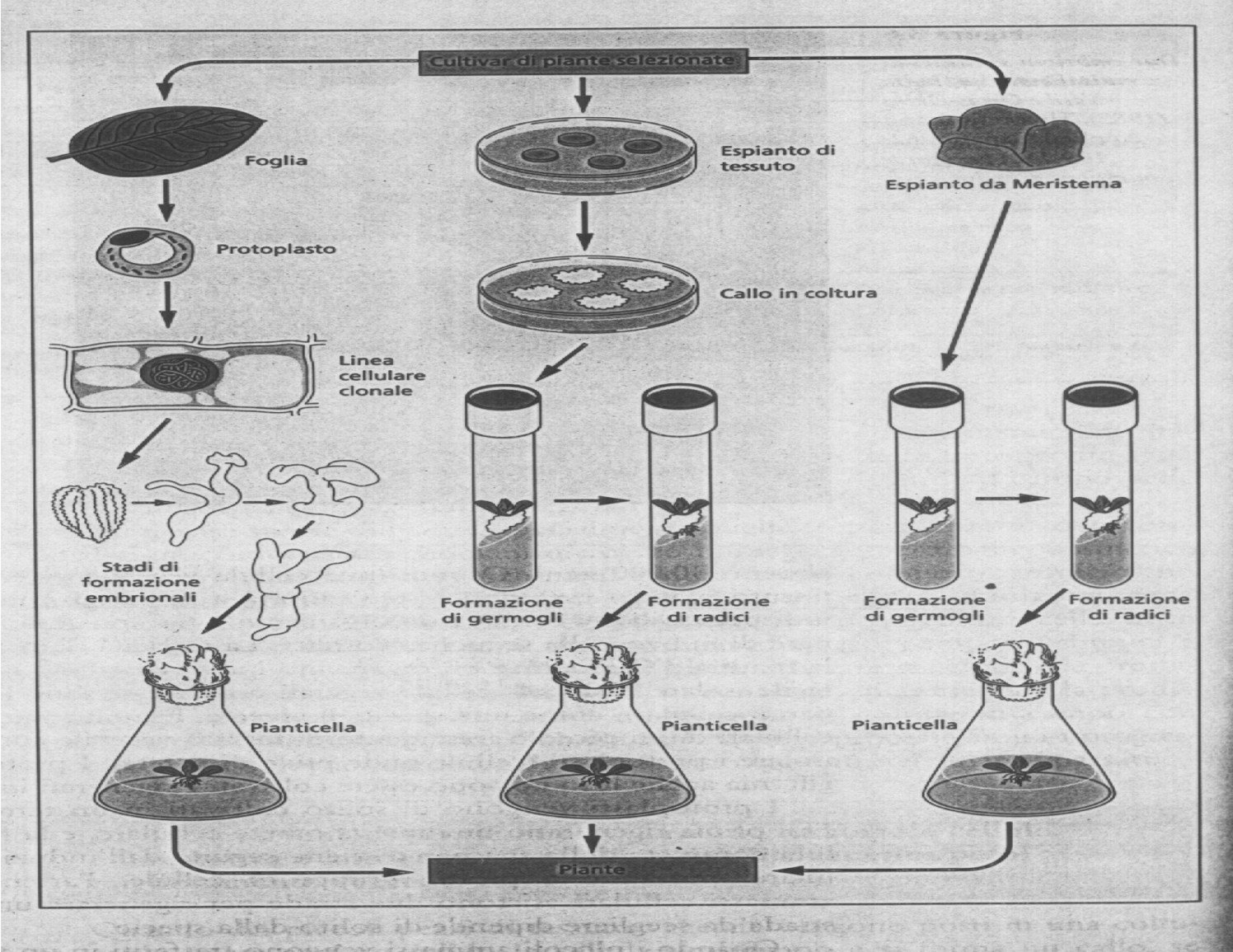




FIG. 15. Preparazione di piante aploidi (con corredo cromosomico di numero  $n$ ) da antere isolate da piante diploidi ( $2n$ ). Se l'antera è isolata da una pianta euploide con corredo cromosomico  $4n$  o  $6n$  si otterranno rispettivamente piante con corredo  $2n$  o  $3n$ .

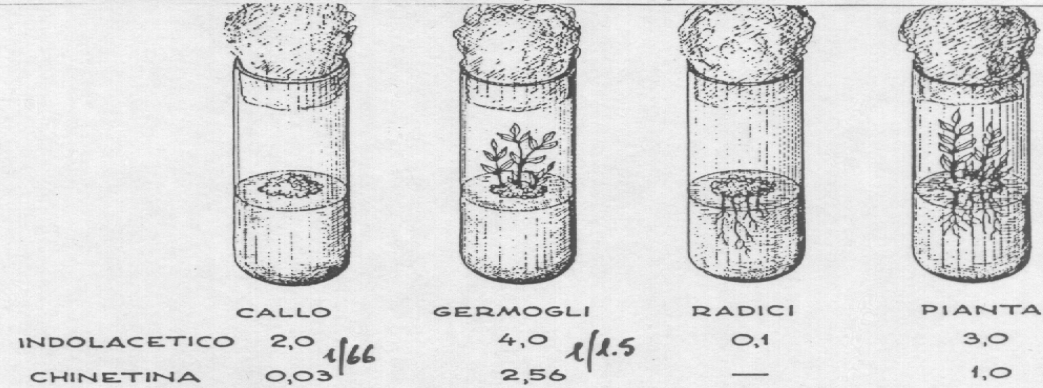


FIG. 15. Morfogenesi in calli di tabacco. Variando le concentrazioni degli ormoni nel terreno di coltura descritto in Tabella 1 è possibile ottenere la crescita delle cellule come callo indifferenziato, oppure la differenziazione di foglie, di radici o della intera pianta. Le concentrazioni descritte in figura sono quelle più usate nel caso di cellule di tabacco, tuttavia è possibile che diversi rapporti ormonali siano necessari col variare delle condizioni di coltura (composizione del terreno, illuminazione, temperatura). Le richieste ormonali differiscono inoltre fortemente per organismi diversi. Ad esempio, cellule di riso coltivate sullo stesso terreno necessitano solamente di auxina per uno sviluppo indifferenziato. La omissione dell'ormone dal terreno determina lo sviluppo di piantine completamente differenziate.

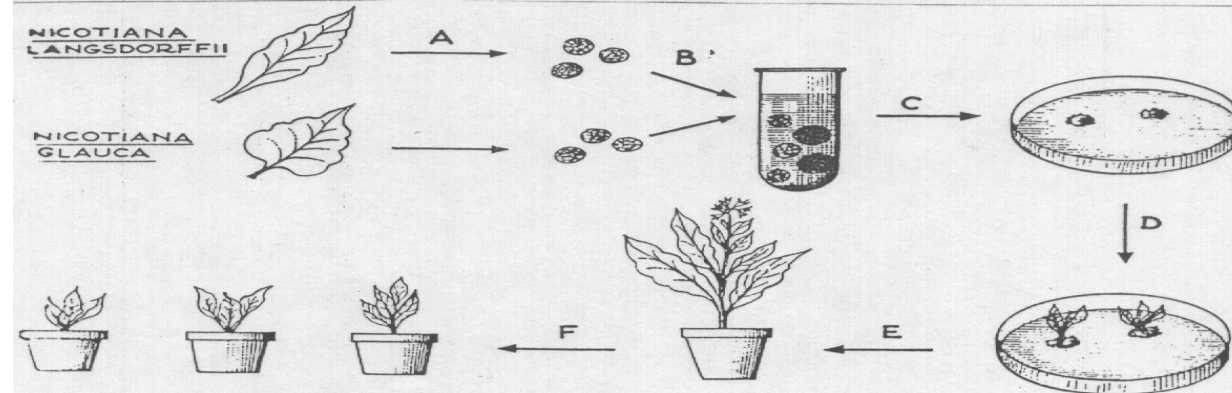
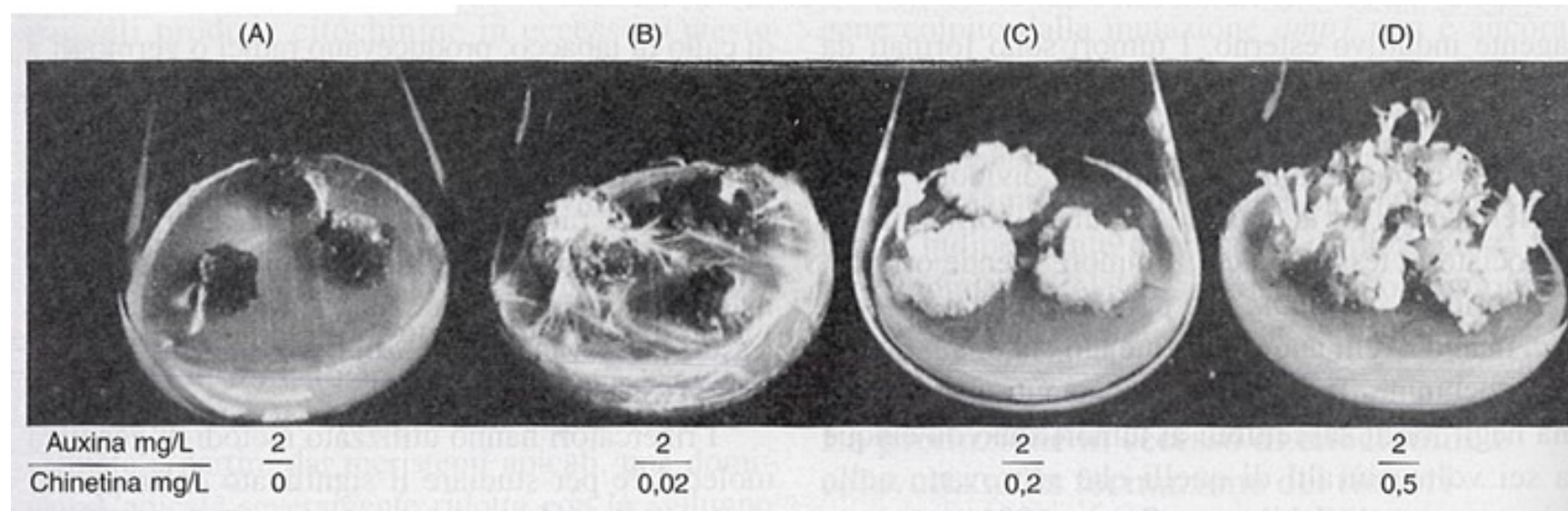
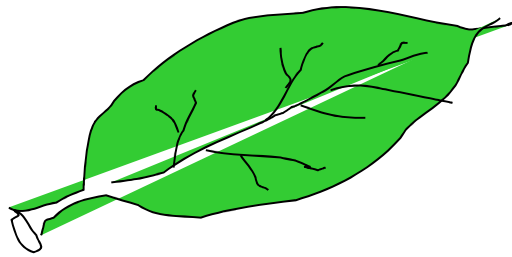


FIG. 18. Preparazione di una pianta ibrida mediante la fusione di cellule somatiche. Protoplasti sono preparati (A) da foglie di due specie diverse di tabacco (*Nicotiana langsdorffii* e *Nicotiana glauca*) con la procedura descritta in fig. 6, mescolati (B) in presenza di  $\text{NaNO}_3$ , e, successivamente, trasferiti (C) in un opportuno terreno di coltura solido. Quest'ultimo, scelto in modo da non permettere la proliferazione delle due specie parentali di protoplasti, permette, al contrario, la crescita di calli da protoplasti ibridi. Le piantine che si differenziano da tali calli (D) sono trasferite in terra (E). È possibile, come nell'esperimento de-



**Effetto del rapporto auxina/citochinina in calli di tabacco coltivati *in vitro***

# Un metodo per coltivare in vitro tessuti vegetali



Foglia sterilizzata

**Coltura di calli**

Espianto fogliare su terreno  
a bassa concentrazione  
di fitormoni



Formazione di callo



Callo

Auxina/citochinina



Induzione di germogli

Auxina/Citochinina

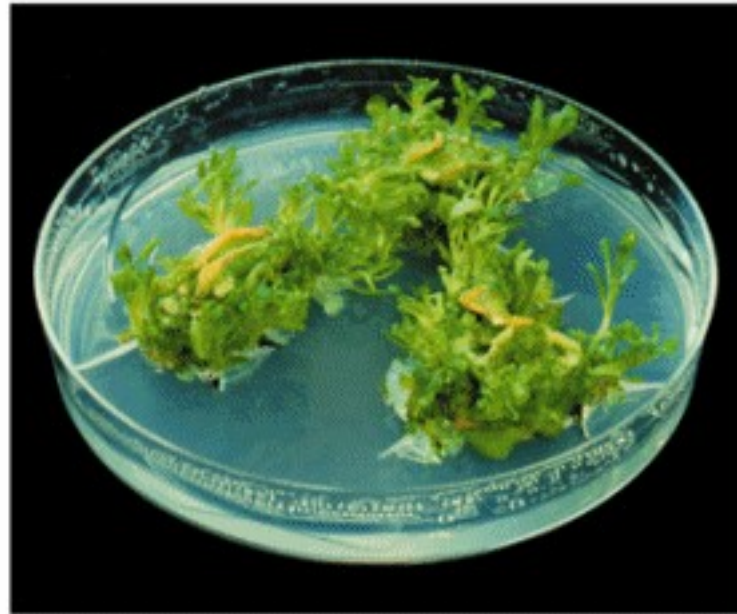


Induzione di radici

Auxina/Citochinina

# Rigenerazione

(A)



# Rigenerazione di piante da colture cellulari



# EMBRIOGENESI SOMATICA

- L'embriogenesi somatica è una tecnica applicata ai vegetali il cui scopo è quello di formare singoli embrioni di piante a partire da cellule somatiche. La tecnica prevede le seguenti fasi:
  1. da alberi selezionati vengono prelevate cellule somatiche;
  2. queste cellule poi vengono clonate in laboratorio al fine di ottenere embrioni;
  3. una parte degli embrioni ottenuti viene congelata e conservata, l'altra viene fatta sviluppare in serra. Le pianticelle, risultato dello sviluppo, vengono immerse in pieno campo;
- 4. dopo un periodo di circa cinque anni vengono scongelati gli embrioni gemelli di quelli che hanno dato maggiori risultati in campo e con questi si procede al rimboschimento.



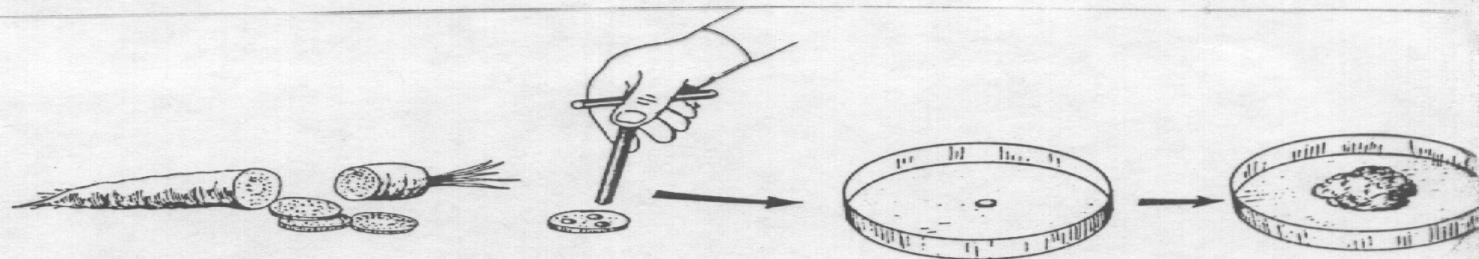


FIG. 4. Preparazione di espianti dal tubero di carota allo scopo di iniziare colture di cellule indifferenziate su terreni solidi. Opportune tecniche di sterilizzazione e di manipolazione del materiale permettono di evitare la contemporanea proliferazione di microrganismi contaminanti.

# PROTOPLASTI

- I protoplasti sono cellule vegetali private della parete cellulare.
- Possono essere ottenuti tramite coltivazione in vitro. Da una pianta viene espantato un frammento di tessuto che poi viene trattato enzimaticamente: in questo modo la parete cellulare si elimina e si ottengono i protoplasti che possono essere utilizzati per rigenerare una nuova pianta o per produrre sostanze di impiego commerciale (ne è un esempio la *Skikonina* che viene usato come additivo in cosmetica e come terapeutico per bruciature e ferite).
- Inoltre i protoplasti di piante geneticamente vicine possono essere fusi per ottenere ibridi.

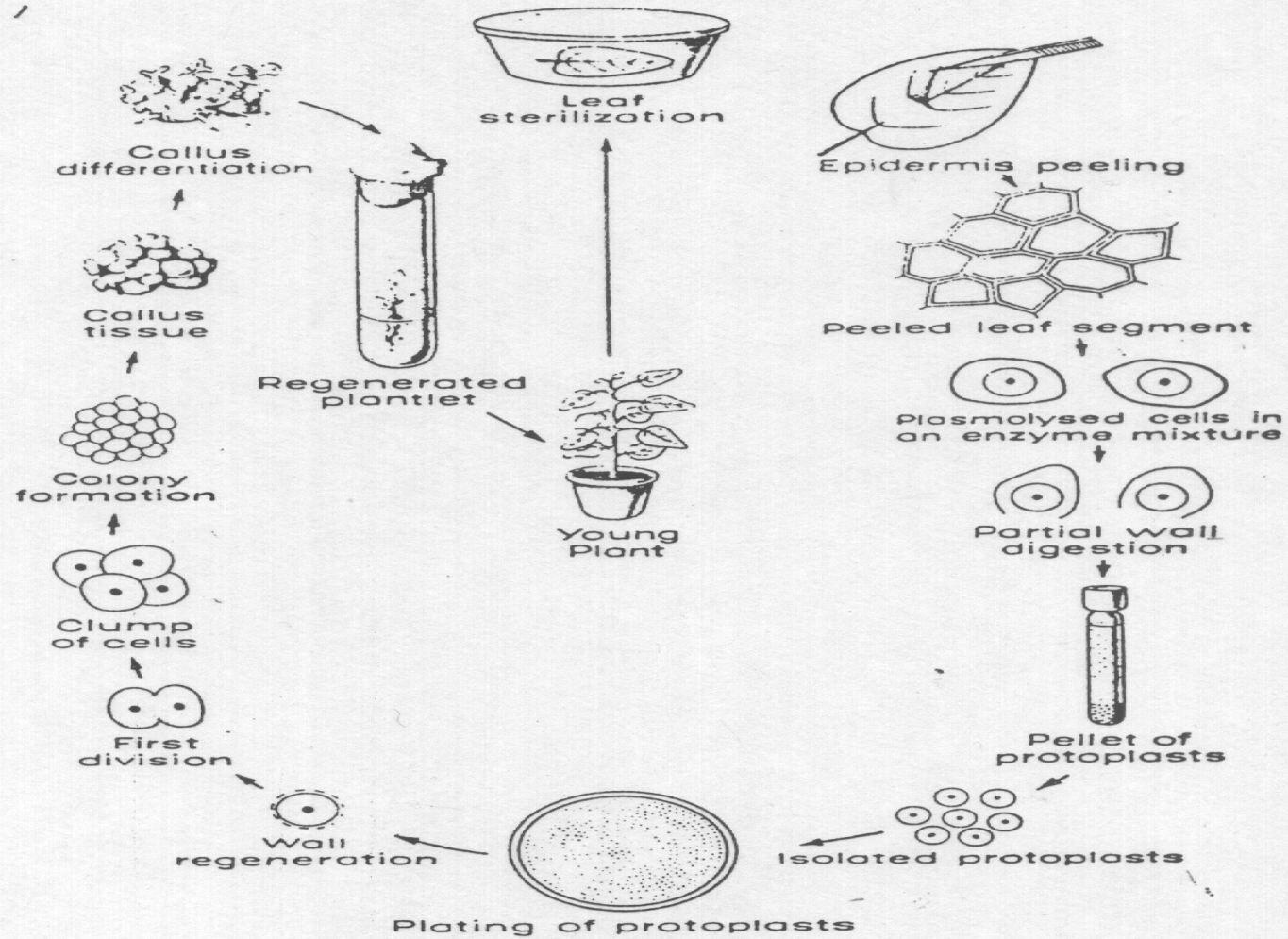
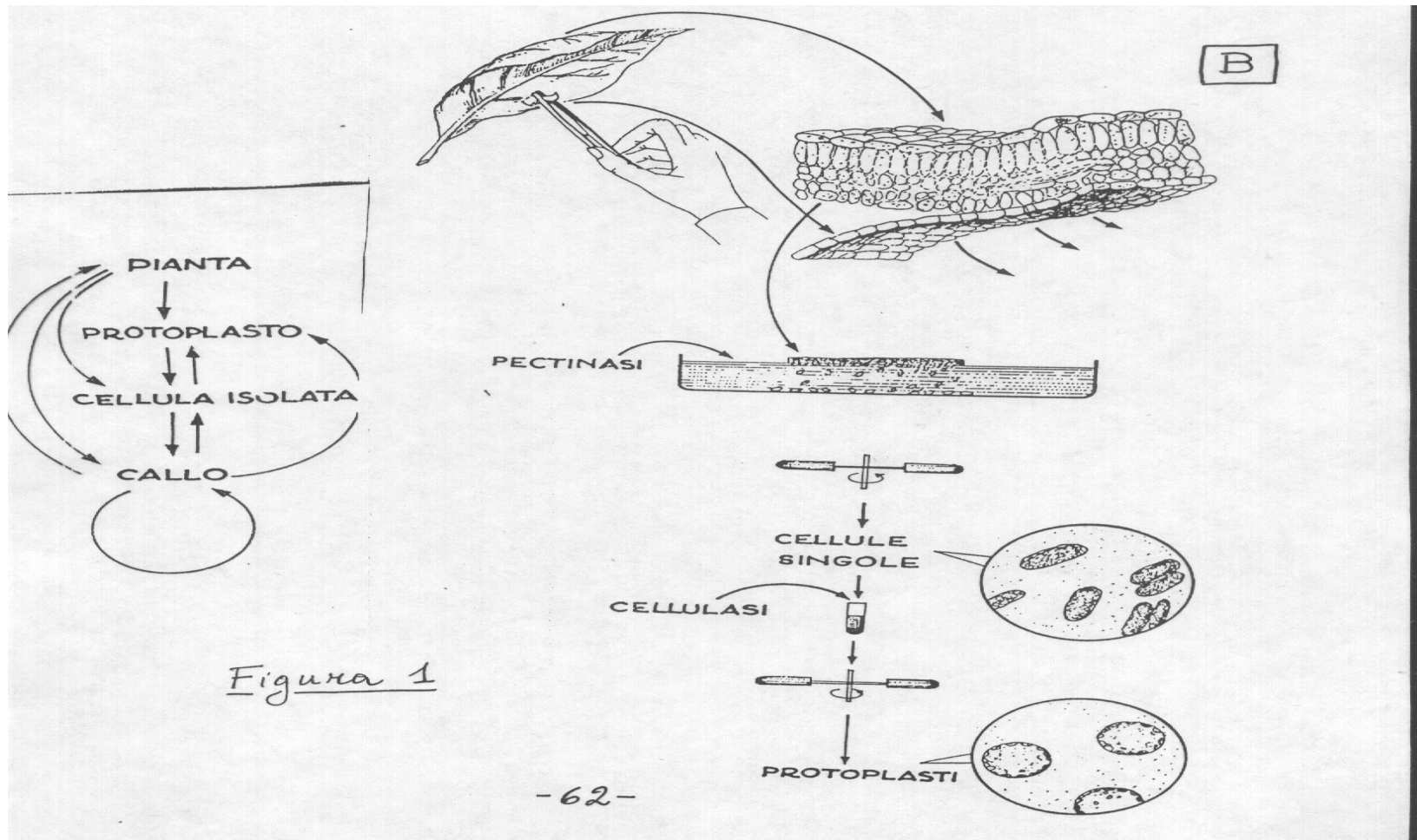
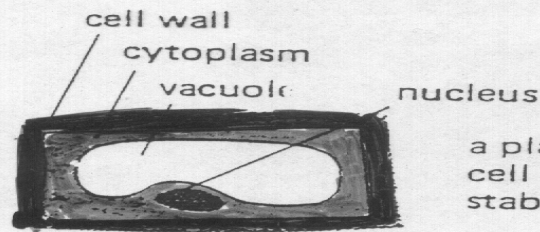


Fig.5. Schematic sequence for the isolation, culture and regeneration of plants from leaf protoplasts. (After BAJAJ, 1974 a)

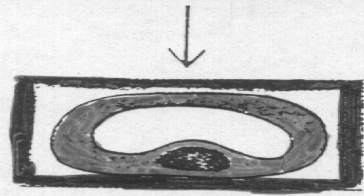
# Preparazione di cellule singole e protoplasti dal mesofillo della foglia di tabacco.

- Giovani foglie, opportunamente sterilizzate con ipoclorito di sodio, vengono private della epidermide inferiore in modo da permettere l'ingresso di pectinasi e cellulasi negli spazi intercellulari.
- Le cellule e i protoplasti che si liberano possono essere isolati mediante centrifugazione frazionata

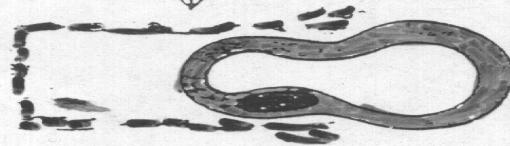




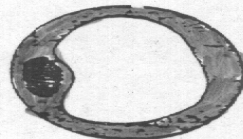
a plant cell with a rigid cell wall is osmotically stable even in water



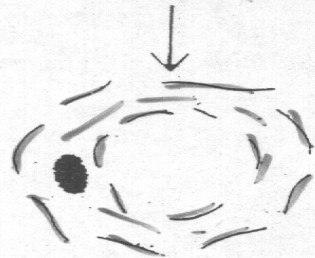
when placed in a sugar solution that is isotonic or hypertonic relative to the cytoplasm, the protoplast shrinks away from the cell wall (a process called plasmolysis)



the addition of degrading enzymes dissolves the wall and releases the protoplast



the spherical protoplast is stable in the sugar solution



if the protoplast is placed back in a solution equivalent to the plant's extracellular fluid it rapidly swells and bursts

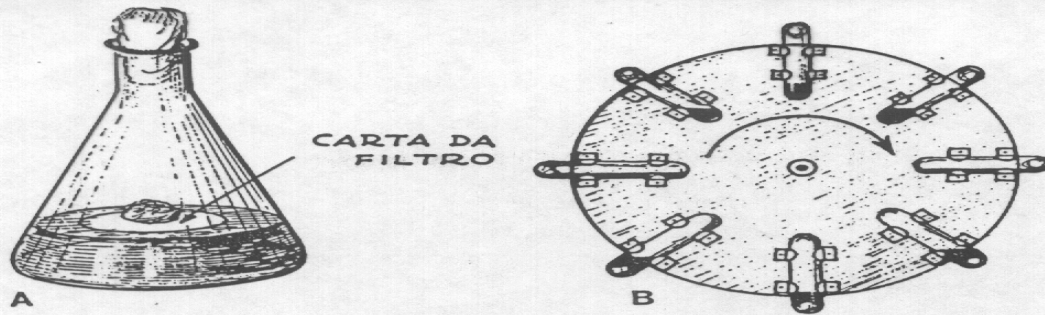
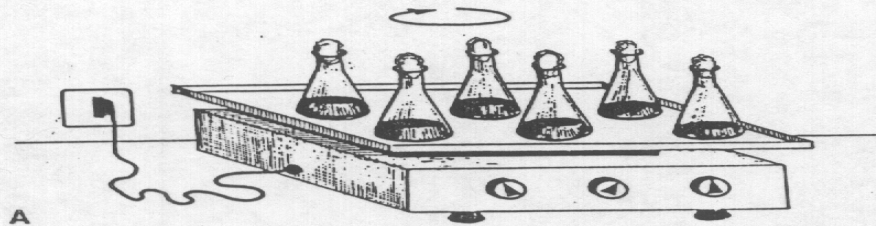
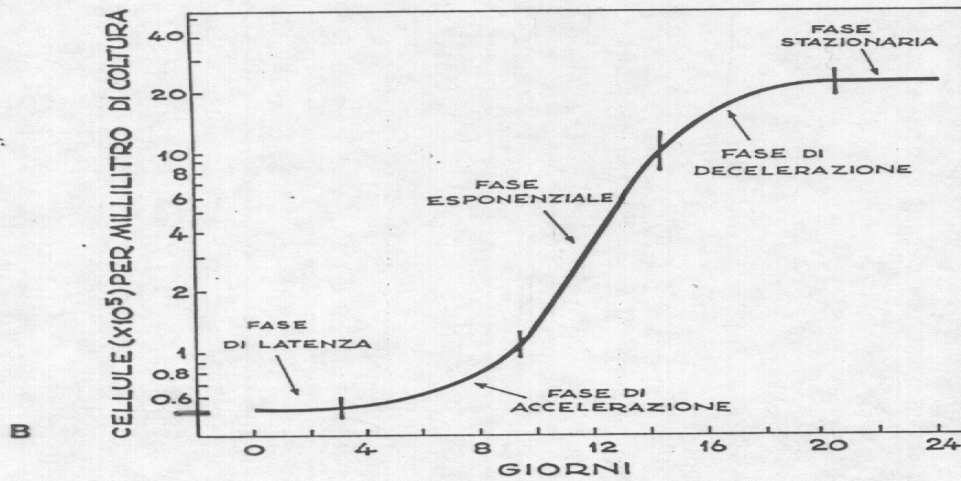


FIG. 7. (A) Coltura in terreno liquido stazionario. Il callo è appoggiato su di un filtro di cellulosa galleggiante sul terreno liquido. (B) Coltura ad immersione periodica. Il callo aderisce al fondo di un tamburo posto su di un tamburo in lenta rotazione. In tal modo esso viene periodicamente sommerso dal terreno di coltura liquido.



A



B

FIG. 8. (A) Colture di cellule in terreno liquido tenute in sospensione su di un apposito agitatore rotativo. Seguendo nel tempo l'aumento del numero cellulare, si ottengono curve di crescita simili a quella riportata in (B) per una coltura di cellule di acero. Il significato delle differenti fasi in cui è divisa la curva è descritto nel testo. Lo stato delle cellule durante la fase esponenziale di crescita è visibile nelle fotografie al microscopio di fig. 9.

Terreni di coltura per cellule di:

| Composto   | Nicotiana<br>tabacum <sup>1</sup> | Acer<br>pseudoplatanus <sup>2</sup> | Calli aploidi<br>da polline di<br>Nicotiana tabacum <sup>3</sup> |
|--|-----------------------------------|-------------------------------------|--|
| KCl  | —                                 | 750                                 | —  |
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>                      | 1650                              | —                                   | 720  |
| KNO <sub>3</sub>                                     | 1900                              | —                                   | 950  |
| NaNO <sub>3</sub>                                    | —                                 | 600                                 | —  |
| CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O                | 440                               | 75                                  | 220  |
| MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O                | 370                               | 250                                 | 185  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                      | 170                               | —                                   | 68   |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O | —                                 | 130                                 | —  |
| Na <sub>2</sub> · EDTA                               | 37,3                              | —                                   | 37,3   |
| FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O                | 27,8                              | —                                   | 27,8   |
| FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O                | —                                 | 1                                   | —  |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                       | 6,2                               | 1                                   | 10   |
| MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O                | 22,3                              | 0,1                                 | 25   |
| ZnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O                | 8,6                               | 0,8                                 | 8  |
| KJ   | 0,83                              | 0,01                                | —  |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O | 0,25                              | —                                   | 0,25   |
| CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O                | 0,025                             | 0,03                                | 0,025  |
| CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O                | 0,025                             | —                                   | —  |
| Saccarosio   | 30.000                            | 20.000                              | 20.000   |
| Acido Indolacetico                                   | 2,5                               | 1                                   | 0,1  |
| Chinetina  | 0,2                               | 0,25                                | —  |
| Tiamina · HCl  | 0,4                               | 1,0                                 | 0,5  |
| Mio-Inositolo  | 100                               | 100                                 | 100  |
| Acido pantotenico                                    | —                                 | 2,5                                 | —  |
| Acido nicotinico                                     | —                                 | —                                   | 5  |
| Piridossina · HCl                                    | —                                 | —                                   | 0,5  |
| Acido folico   | —                                 | —                                   | 0,5  |
| Biotina  | —                                 | —                                   | 0,05   |
| Glicina  | —                                 | —                                   | 2  |
| Colina cloruro                                       | —                                 | 0,5                                 | —  |
| Cisteina · HCl                                       | —                                 | 10                                  | —  |
| Urea   | —                                 | 200                                 | —  |
| pH corretto a:                                       | 5,6                               | 5,2                                 | 5,5  |

Per terreni solidificati si aggiunge lo 0,8-1,0% di agar.

Le soluzioni vengono sterilizzate in autoclave allo scopo di eliminare eventuali contaminazioni microbiche.

<sup>1</sup> Linsmayer E. M. e Skoog F.: *Physiol. Plant.*, 18, 100, 1965.

<sup>2</sup> Stewart G. R. e Street H. E.: *J. Exp. Bot.*, 20, 556, 1969.

<sup>3</sup> Nitsch J. P., and Nitsch C.: *Nature*, 163, 85, 1969.

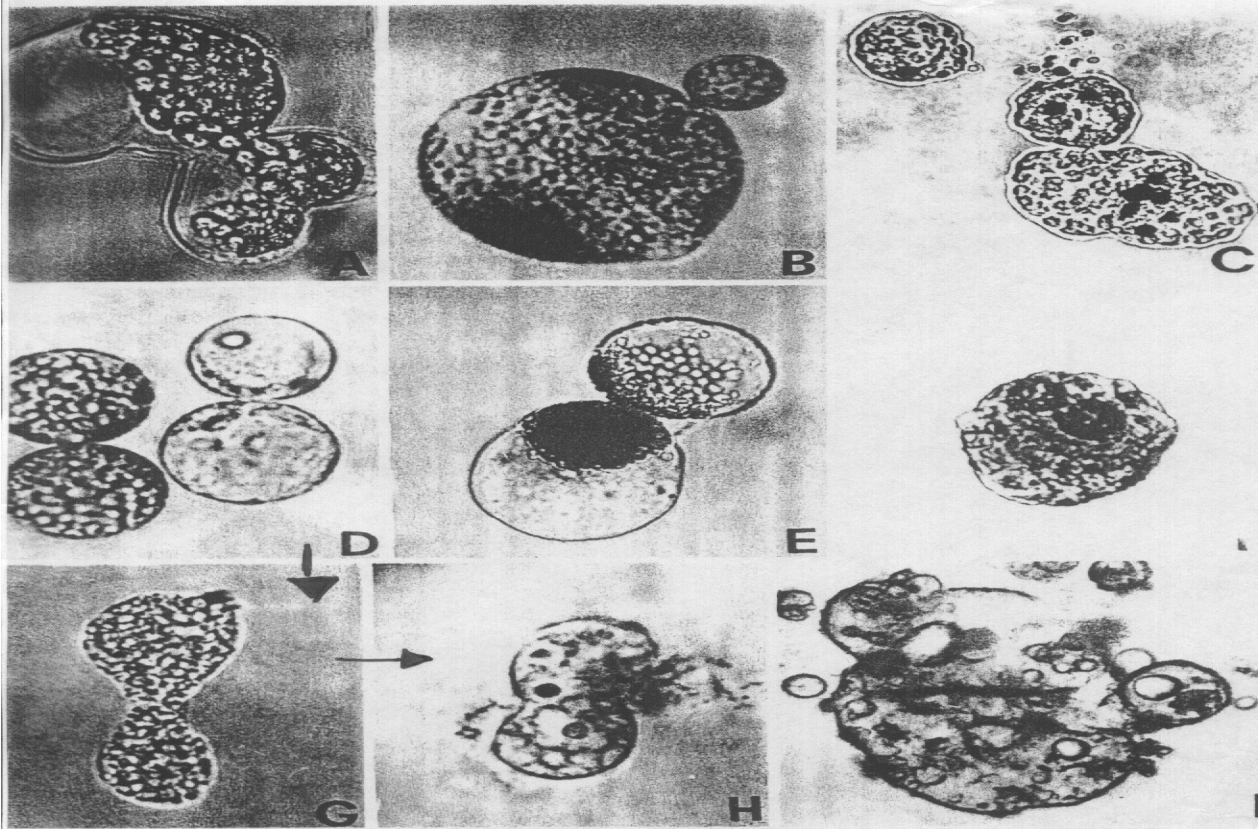


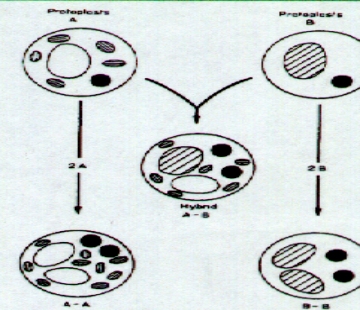
Fig. 7A-I. Fusion of protoplasts. (A) Two plasmolyzed mesophyll cells of haploid *Nicotiana glauca* cv. White Burley in an enzyme mixture of macerozyme (0.5%) and cellulase (2%) in mannitol (13%). Note the expansion of plasmodesmata and the movement of protoplast from one cell to another, which will eventually form a spontaneous fused protoplast. (B) An extremely large mesophyll protoplast formed as a result of fusion of a number of protoplasts: note the small size of the normal protoplast in the same figure. (C) A uni-, bi-, and multinucleate protoplast of haploid tobacco. (D) A mixture of tobacco mesophyll and wheat cell protoplasts showing adhesion after sodium nitrate treatment. (E) An early stage in ring fusion event. (F) A binucleate protoplast formed as a result of fusion. (G) Two pollen protoplasts in the process of fusion after treatment with sodium nitrate. (H) A dumb-bell shaped structure obtained by fusion of two pollen protoplasts; note the clearly visible nuclei. (I) A giant protoplast formed as a result of fusion of large number of pollen protoplasts during enzyme incubation. (After BAJAJ and DAVEY, 1974)



## Fusione spontanea

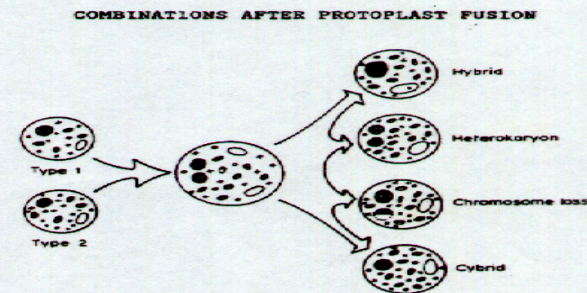
## Fusione stimolata

- PEG
- $Ca^{2+}$
- pH elevato
- meccanicamente
- corrente elettrica



## Modificazioni cariotipiche

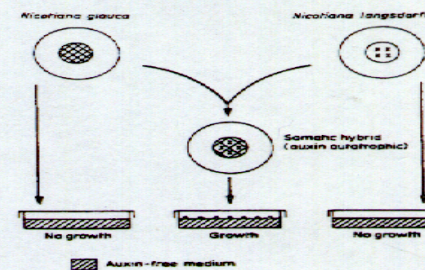
vero ibrido  
eterocarion  
aneuploidia  
cibrido



## Selezione

- visiva
- sonde fluorescenti
- selezione nutrizionale (complementazione)
- sensibilità alla luce
- sensibilità agli antibiotici

## NUTRITIONAL SELECTION OF FUSION PRODUCTS



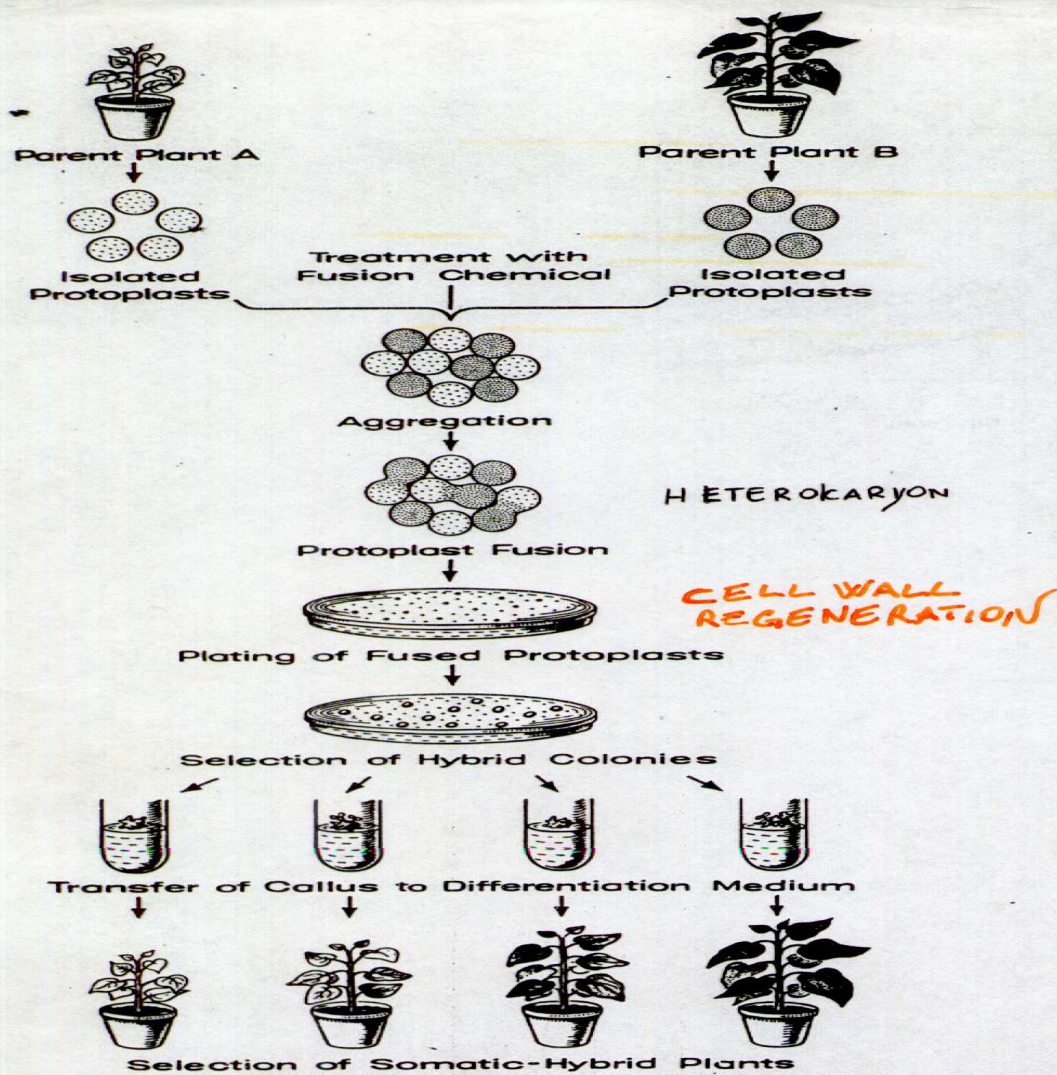
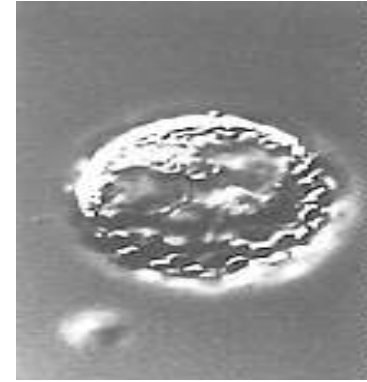
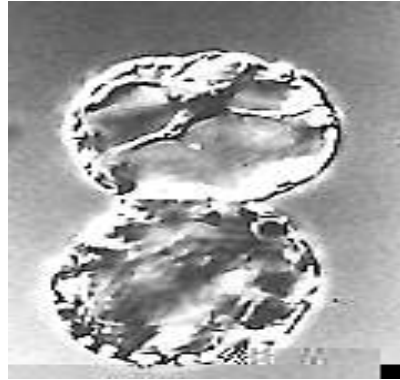
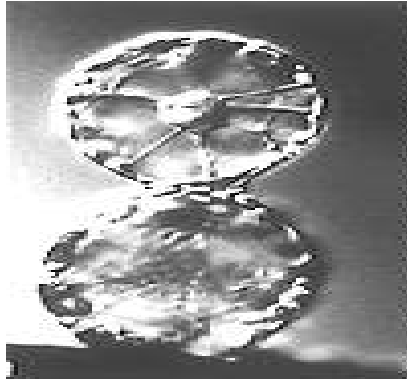
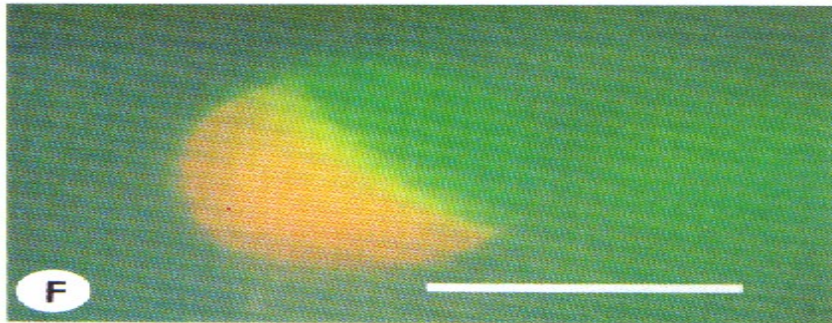
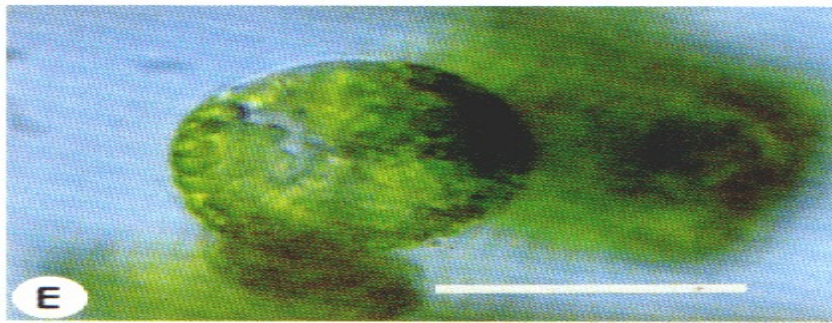
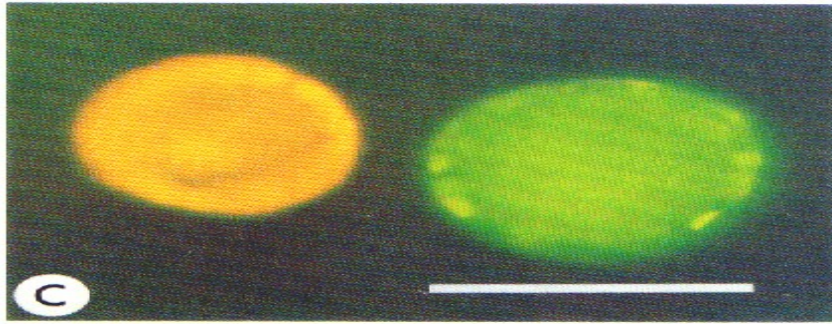
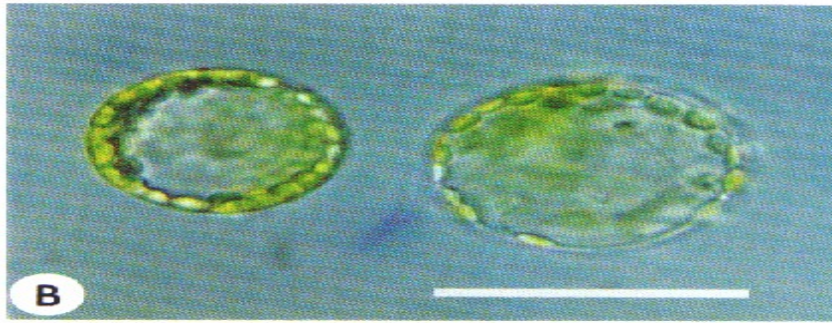
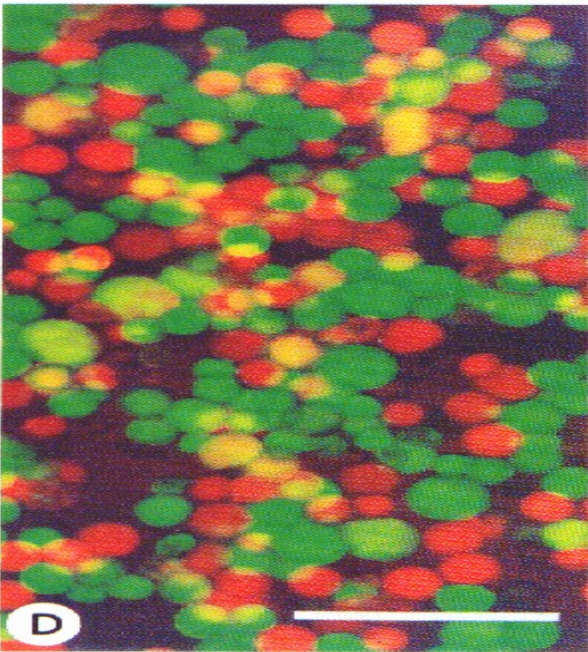
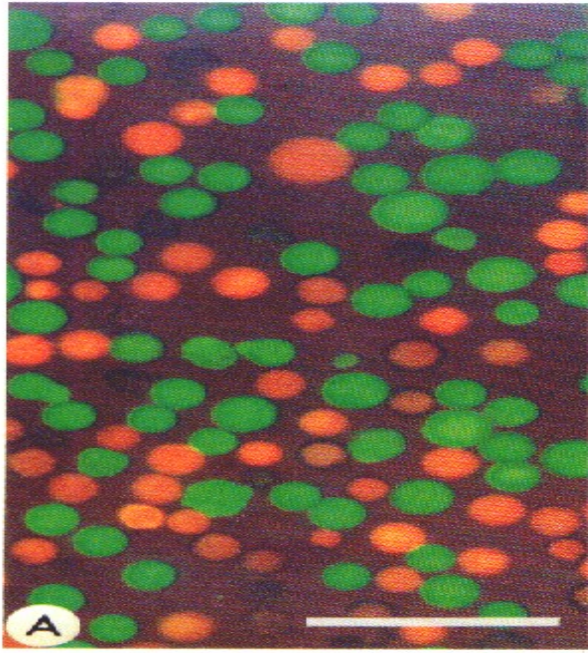


Fig. 8. Diagrammatic illustration for the fusion of protoplasts from two different plant species (here shown with dark and light color leaves), and later plating and selection of hybrid colonies, and the regeneration of "Somatic-Hybrids"

*Trasferimento di caratteri poligenici.*



- Due protoplasti, anche appartenenti a specie o generi diversi, possono essere fusi, per dare origine ad un ibrido somatico, utilizzando metodi diversi. I più usati sono il trattamento con il PEG (Glicole polietilenico) e l'elettrofusione. Questi trattamenti determinano un progressivo avvicinamento dei protoplasti le cui membrane cellulari vengono a contatto e quindi si fondono.



VARIATIONE SOMACLONALE: variazione che si riscontra dopo rigenerazione da colture di tessuto. Risulta da variazioni genetiche spontanee già presenti negli espianti originali o da variazioni indotte durante il processo di messa in coltura e subcoltivazione.

PRODUCTION OF SECONDARY METABOLITES

269

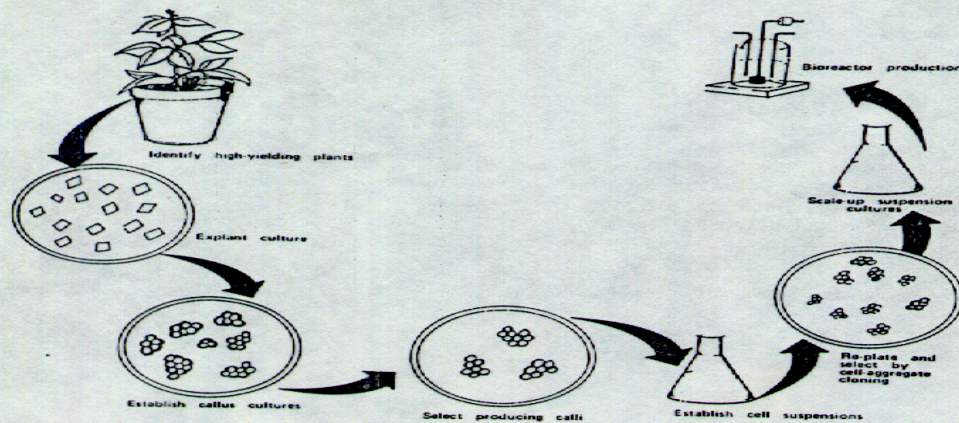
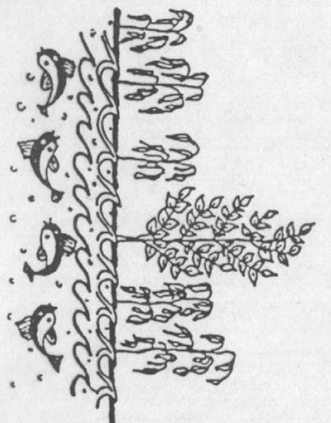
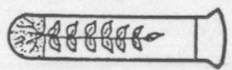


Figure 1. Induction and selection of high-producing cell lines.



H<sub>2</sub>O + NaCl



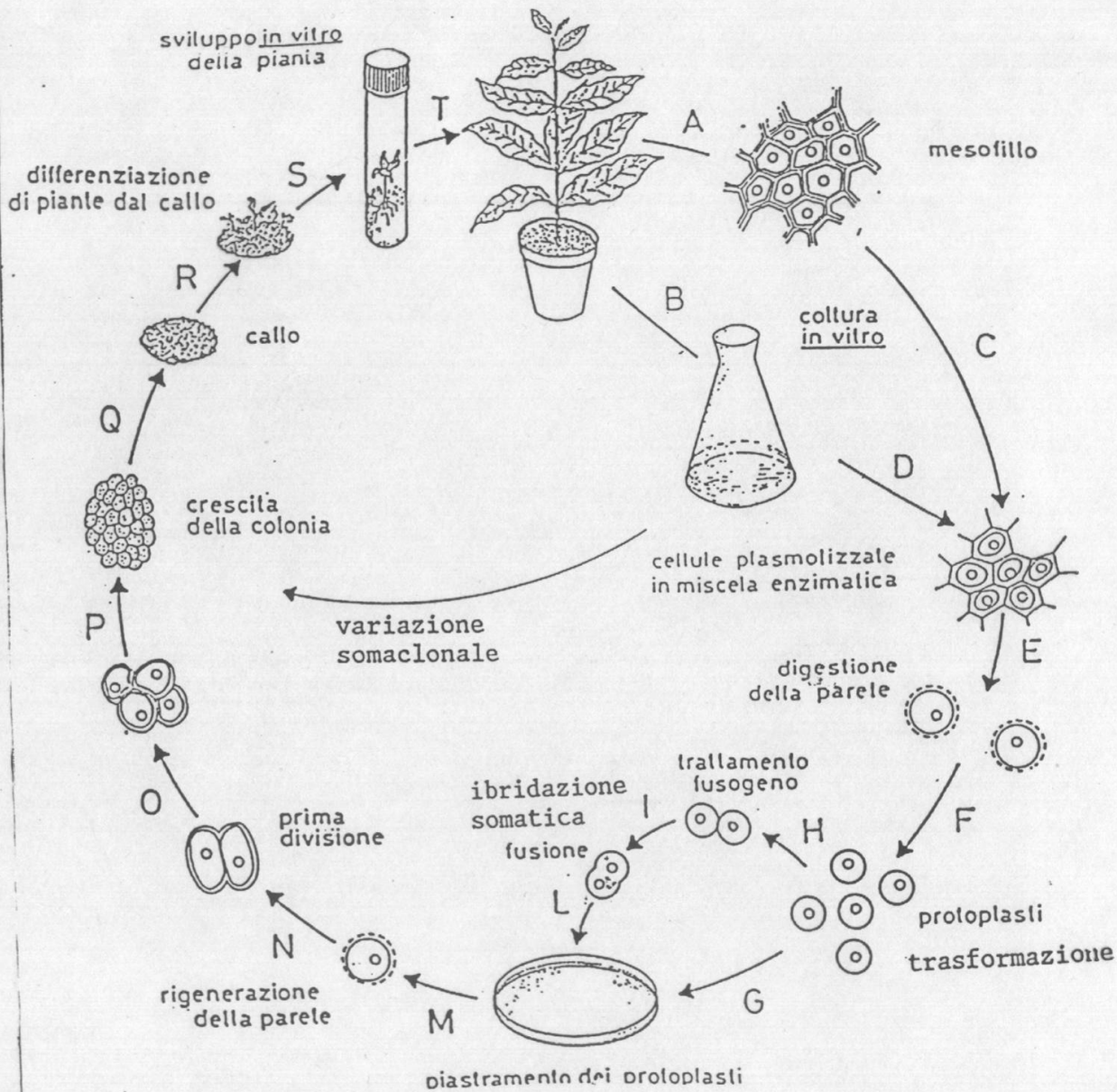
CALLUS INDUCTION



CALLUS CULTIVATION

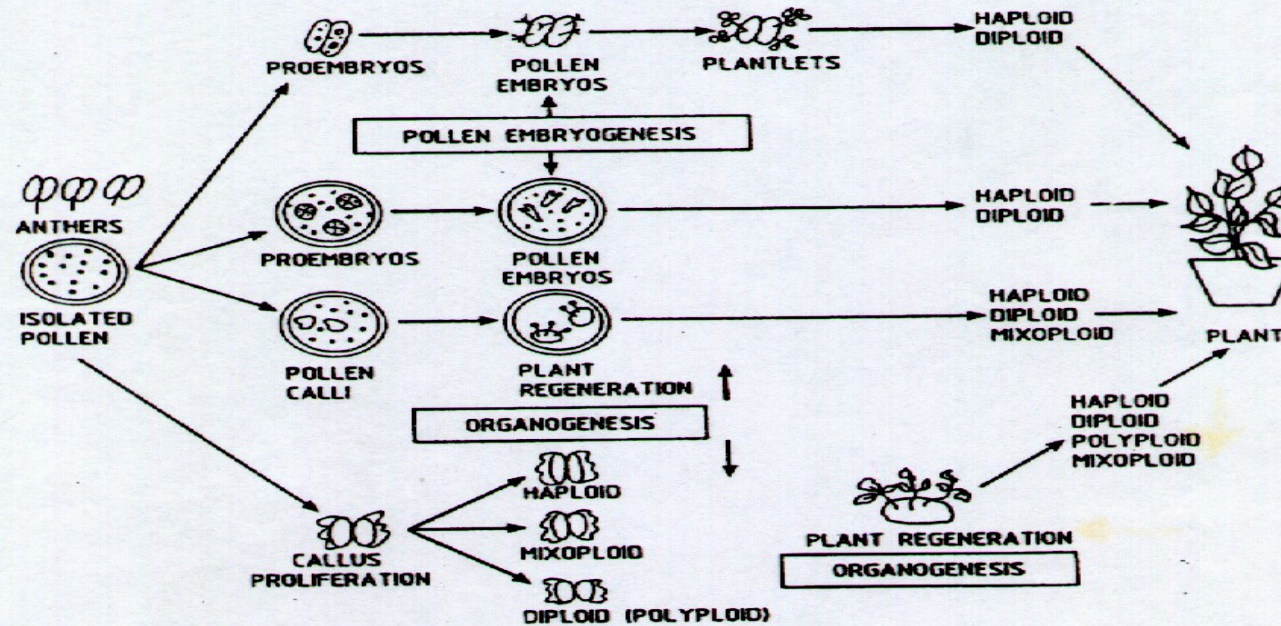


REGENERATION



- **embriogenesi pollinica** (direttamente dalle microspore)
- **organogenesi** (da calli derivati da microspore)

**IN VITRO ANDROGENESIS IN ANTHOR AND POLLEN CULTURES**



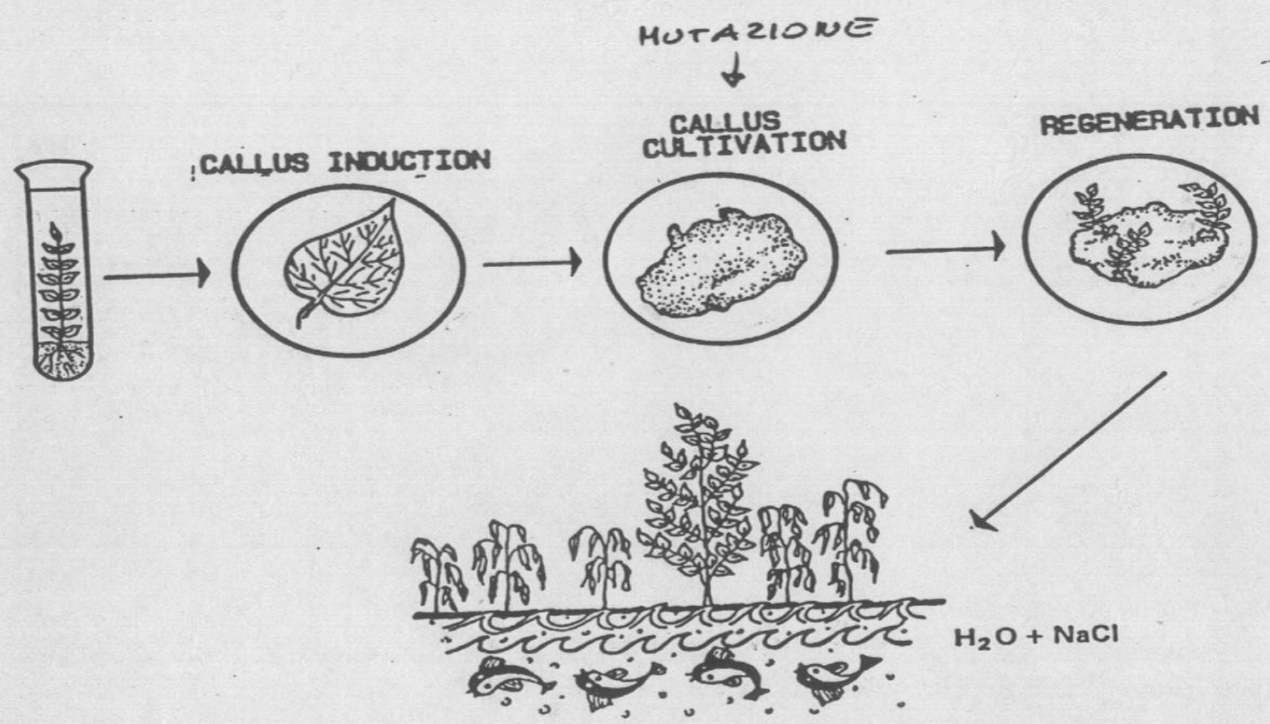
**variazioni gametoclonali:** variazioni ereditarie. (cereali alta frequenza di albini)

**accelerazione dei tempi di breeding:** colchicina  $\Rightarrow$  doppi aploidi (altrimenti arrivano a fioritura, ma sono sterili)

**mutazioni recessive:** facilmente identificabili

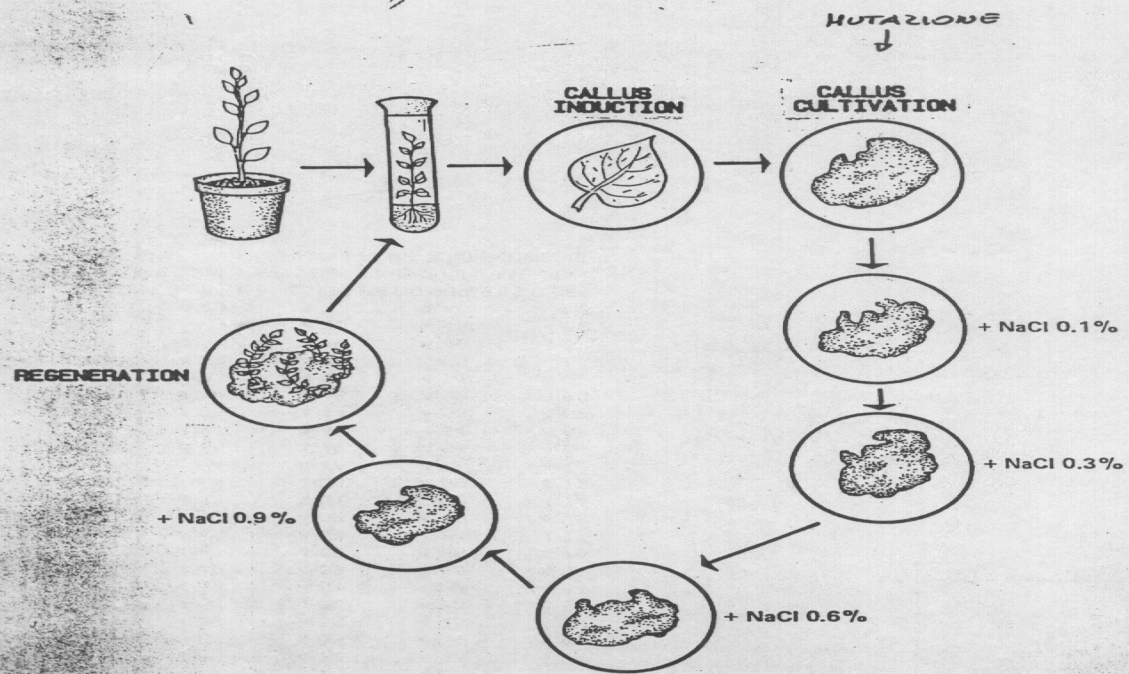
**interesse dei floricultori:** sono piccoli, a fioritura prolungata

Figure 10



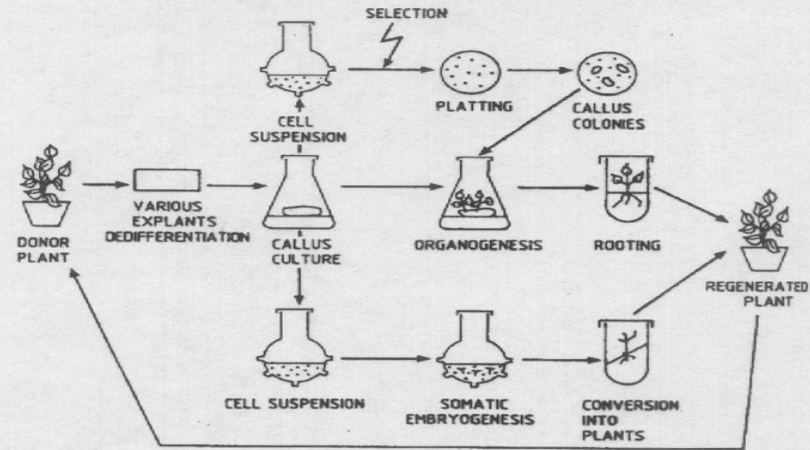
In vitro selection: screening for NaCl tolerant somaclones induced by an in vitro passage without selective agent in the medium





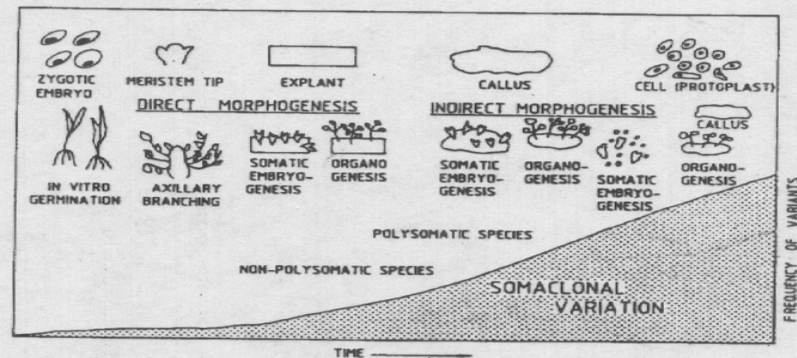
In vitro selection: step-wise selection for NaCl tolerance on solid medium

IN VITRO MANIPULATION AND PLANT REGENERATION



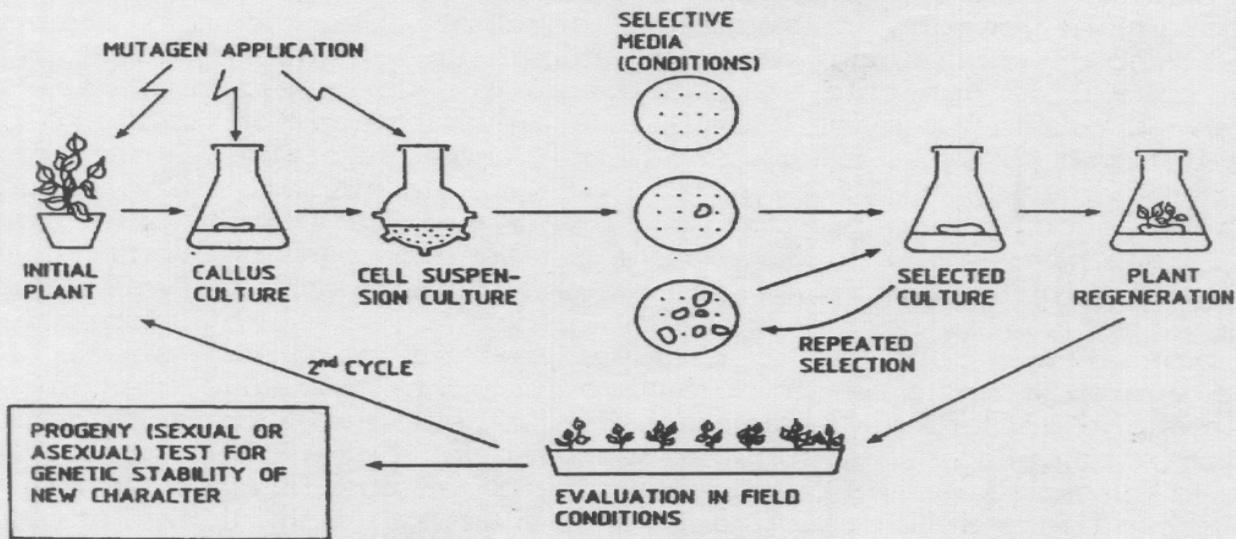
**variazioni somaclonali: epigenetiche o genetiche**

**variazioni epigenetiche: modificazioni di componenti cellulari diverse dal DNA. Non ereditabili (trasmissione per un limitato numero di generazioni). ADATTABILITA'**



la variazione è già presente nel tessuto vegetale  
 è indotta dall'azione mutagena di mezzi di coltura  
 è la risposta del genoma vegetale alle condizioni di coltura (stress)

## MUTANT SELECTION IN THE IN VITRO SYSTEM



**Il carattere selezionato deve essere:**

- conservato dopo la rigenerazione
- trasmissibile

**Caratteri di interesse agronomico**

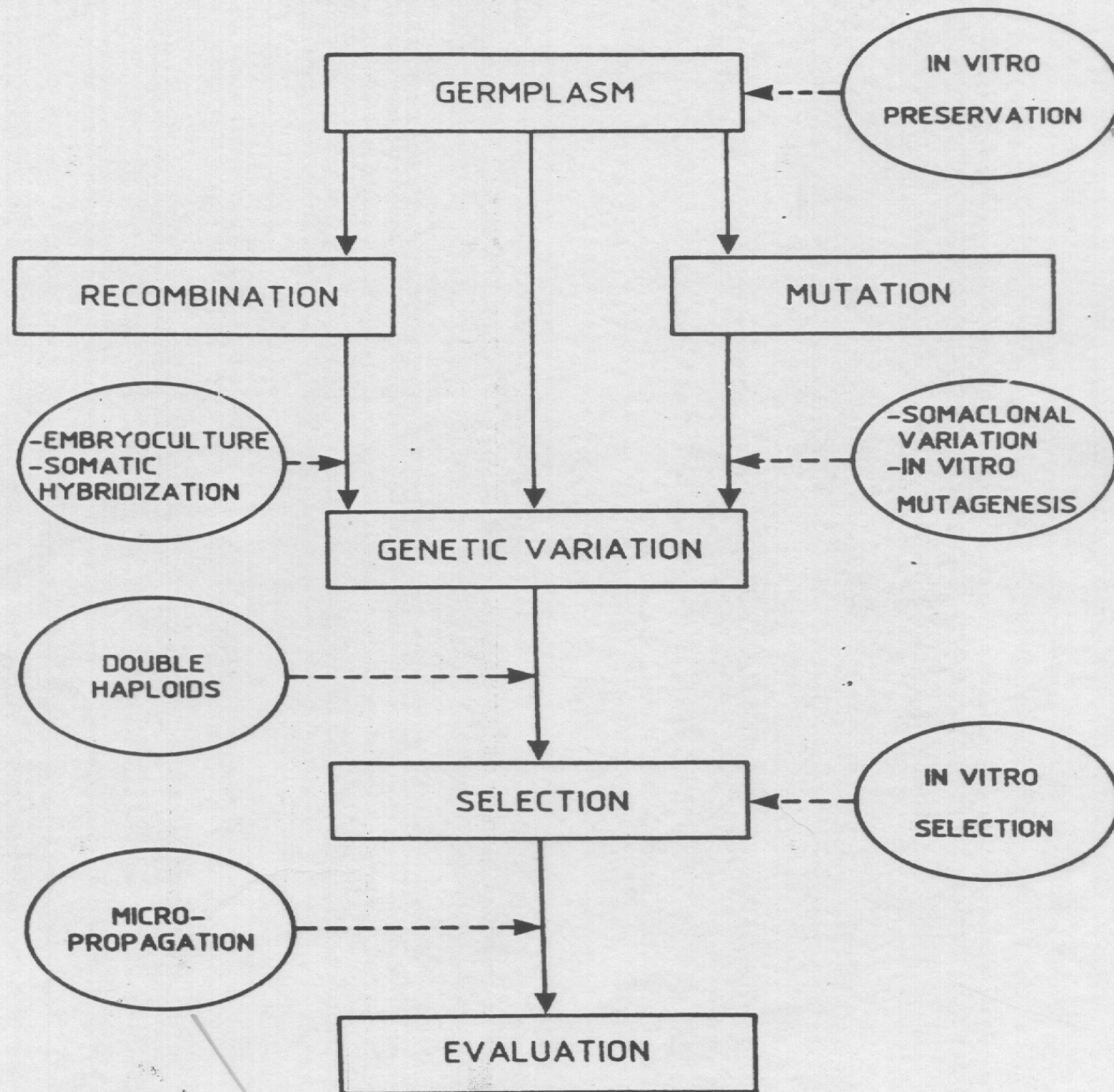
- resistenza agli erbicidi
- resistenza alle malattie (mais, tabacco, patata, erba medica)
- contenuto nutrizionale
- tolleranza alla elevata salinità
- tolleranza al freddo
- tolleranza ai metalli pesanti



**Figure 24.30**

Callus cultures established from plants can be optimized to produce high concentrations of a wide variety of natural products. In some of the examples shown, metabolite pigments give the calli distinctive colors.

XVII. SCHEMATIC REPRESENTATION SUMMARIZING THE APPLICATION OF IN VITRO TECHNIQUES IN DIFFERENT STAGES OF THE PLANT BREEDING SYSTEM

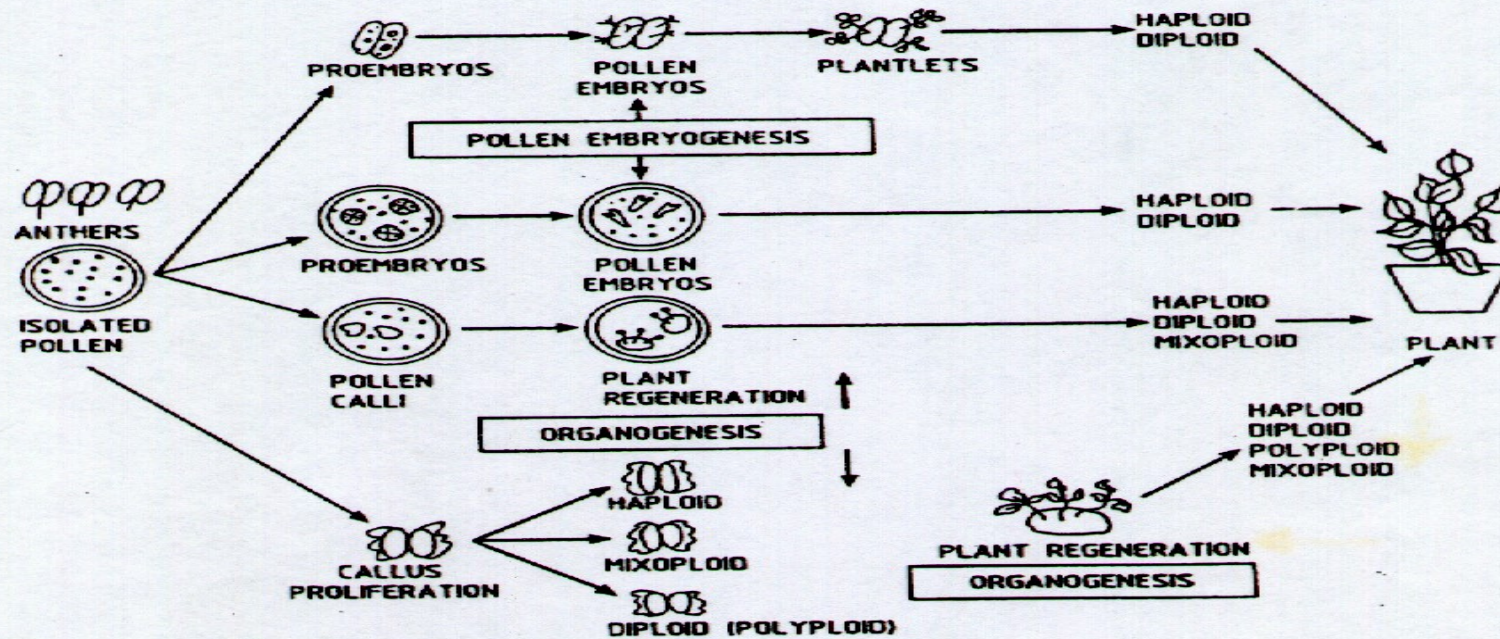


## L'induzione di piante aploidi

- Lo sviluppo dei metodi di coltura *in vitro* di antere e di ovari ha consentito di ottenere piante aploidi che si originano da microspore o megaspore e che, per effetto delle condizioni di coltura, deviano dal normale processo di sviluppo.
- Le piante aploidi presentano nelle cellule meristematiche un numero di cromosomi dimezzato rispetto a quello presente nello sporofito. Hanno cioè il numero di cromosomi proprio delle cellule gametiche.
- La comparsa di piante aploidi è un evento abbastanza raro in natura ed è spesso conseguenza di fenomeni di partenogenesi. Lo stesso fenomeno può essere indotto sperimentalmente mediante shock termici, radiazioni ionizzanti o mediante ibridazione tra specie tra loro distanti.

- **embriogenesi pollinica** (direttamente dalle microspore)
- **organogenesi** (da calli derivati da microspore)

**IN VITRO ANDROGENESIS IN ANTHER AND POLLEN CULTURES**



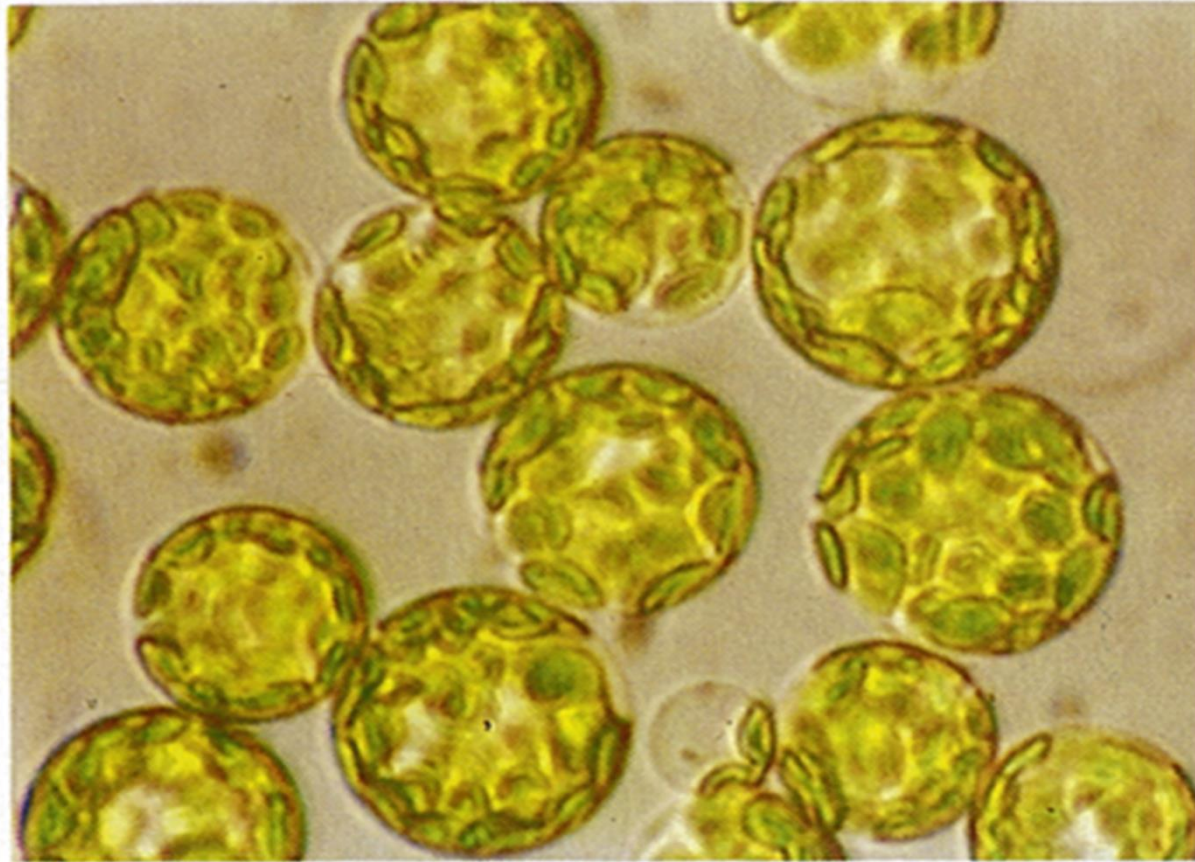
**variazioni gametoclonali:** variazioni ereditarie. (cereali alta frequenza di albini)

**accelerazione dei tempi di breeding:** colchicina  $\Rightarrow$  doppi aploidi (altrimenti arrivano a fioritura, ma sono sterili)

**mutazioni recessive:** facilmente identificabili

**interesse dei floricultori:** sono piccoli, a fioritura prolungata

## Protoplasti



Fusione di protoplasti come mezzo per produrre ibridi somatici e per trasferire geni esogeni nelle piante



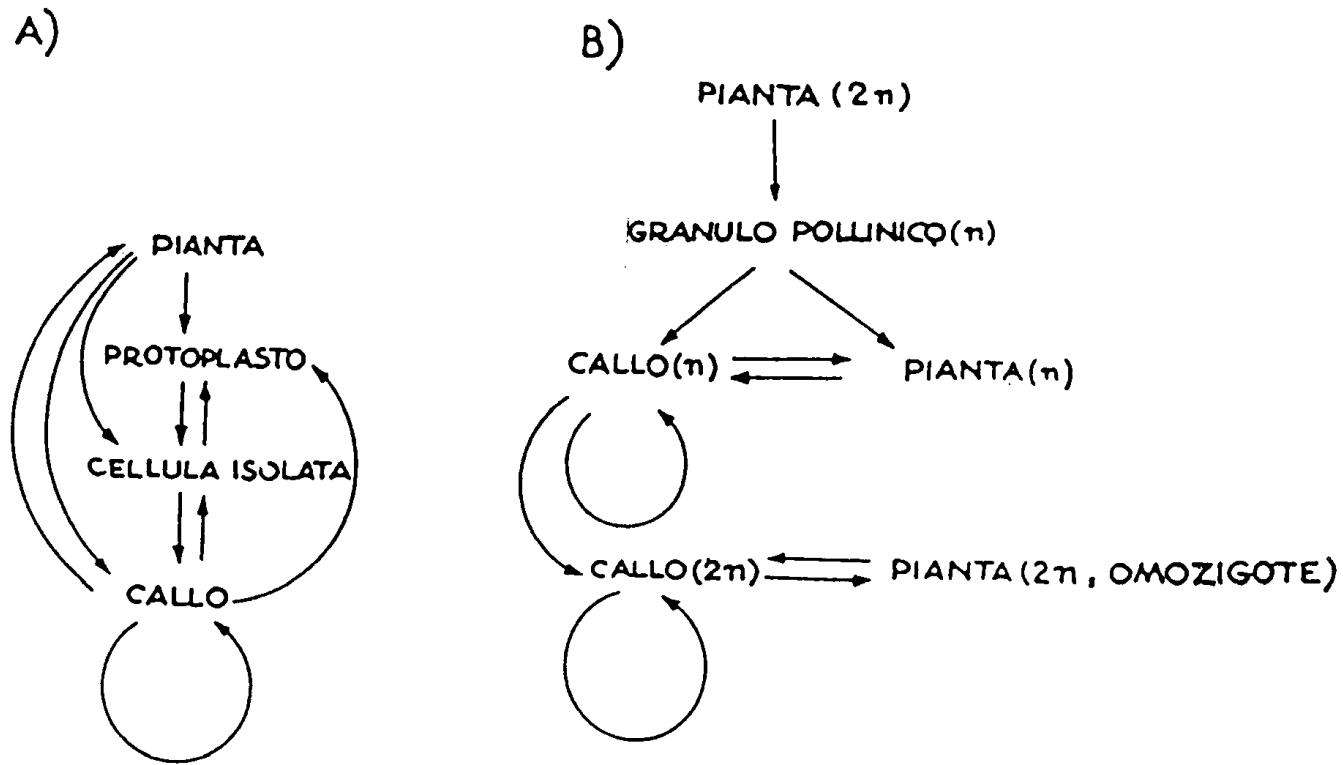


Fig.20 . - Manipolazioni di materiale vegetale rese possibili dalle attuali tecniche di coltura *in vitro* (A) e mediante la produzione di piante aploidi da granuli pollinici (B)

# TRASFORMAZIONE di ORGANISMI VEGETALI

- Dal primo trasferimento di geni eterologhi in piante di tabacco, descritto indipendentemente da tre gruppi nel 1984, i metodi di trasformazione di cellule vegetali si sono perfezionati e sono diventati affidabili.
- Ad oggi risultano trasformate con successo più di 120 specie vegetali diverse e numerose piante transgeniche o derivati di piante transgeniche sono oggi regolarmente commercializzate.
- Nonostante una diffusa ostilità di larghi strati dell'opinione pubblica riguardo alle piante transgeniche, è un dato di fatto che le piante transgeniche si stanno diffondendo rapidamente: basti pensare che negli USA le coltivazioni di mais transgenico stanno per soppiantare quelle di mais tradizionale.

# La **totipotenza** delle cellule è alla base della possibilità di ottenere piante transgeniche

- Nelle piante cellule di qualunque tessuto possono rigenerare una pianta intera
- *in vitro* variando il rapporto di auxina e citochinina, due ormoni vegetali che regolano proliferazione e differenziamento, si ottengono
  - CALLI
  - GERMOGLI
  - RADICI

- In teoria la trasformazione vegetale offre l'opportunità di introdurre geni di qualunque origine nelle cellule vegetali. 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***

\* **La trasformazione diretta con DNA**

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

# Procedure di trasformazione vegetale

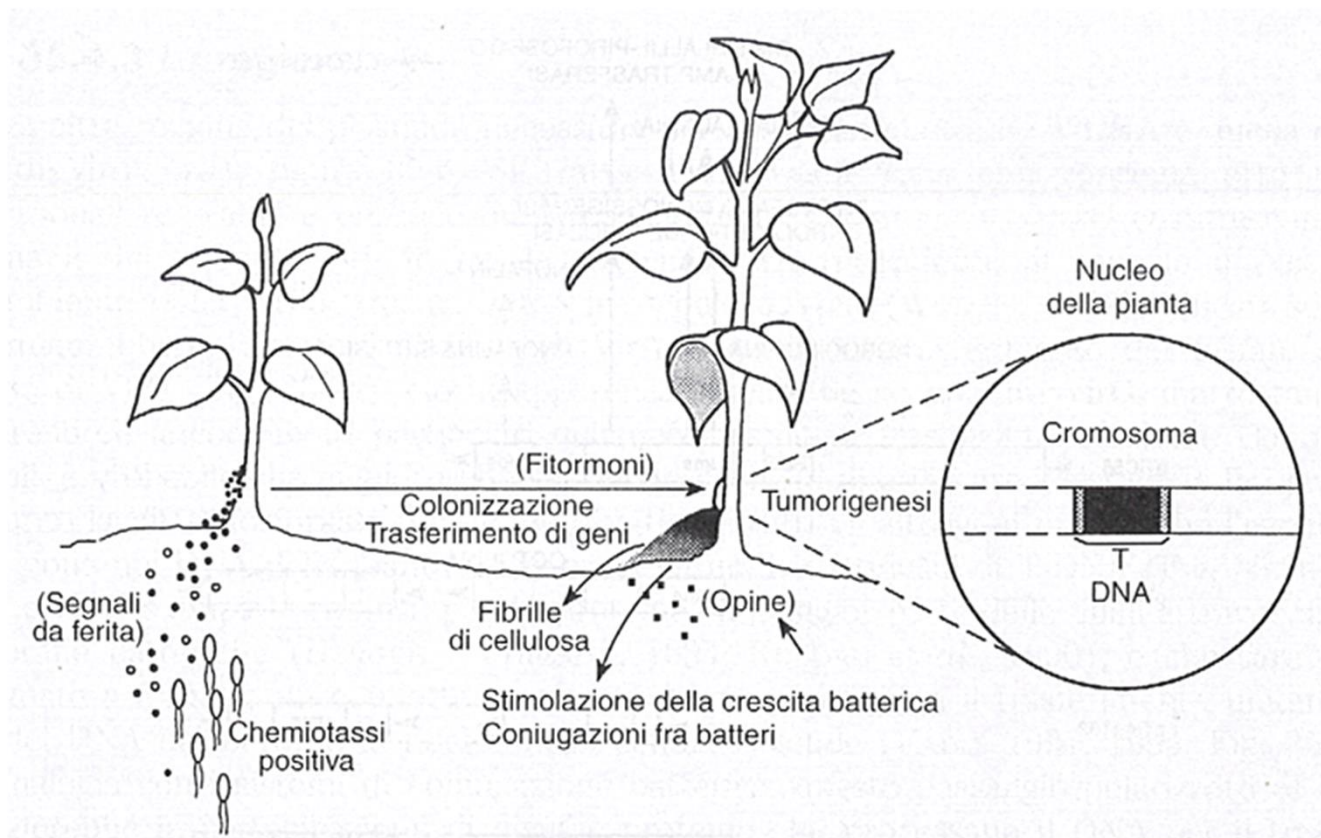
Mediate da *Agrobacterium*

- *A. tumefaciens*
- *A. rhizogenes*

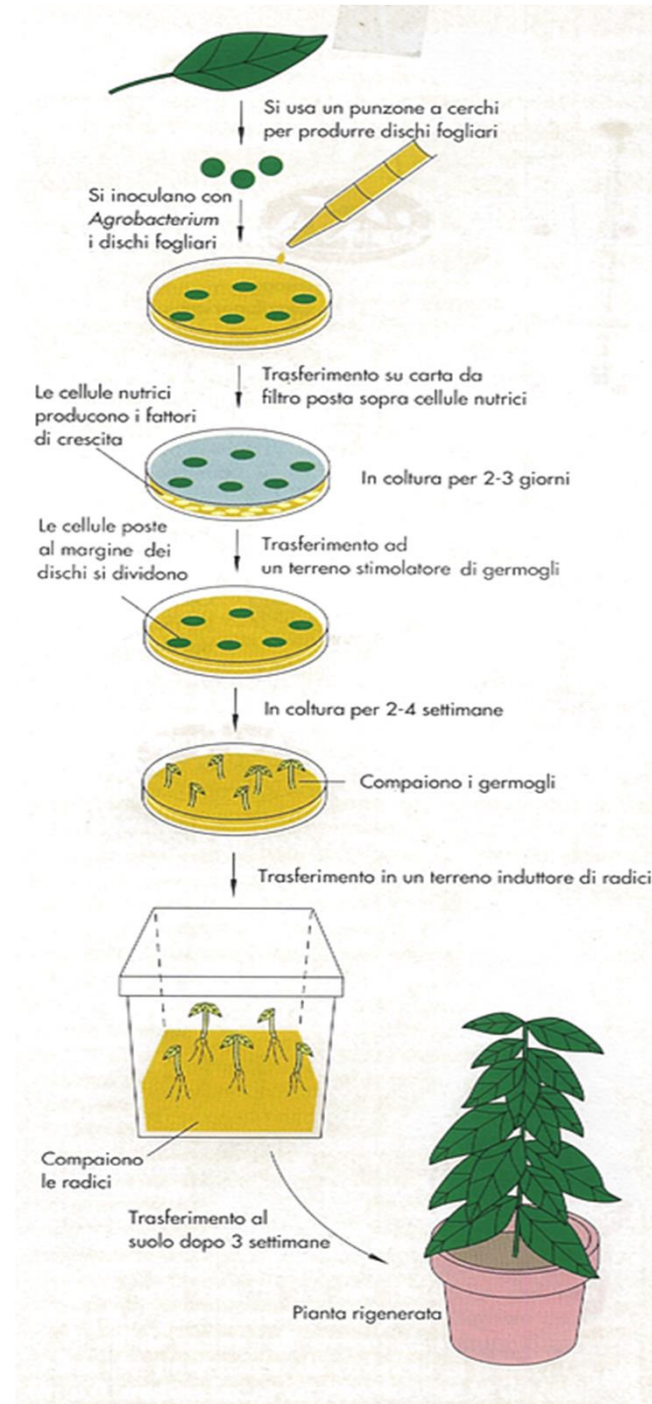
Tramite assorbimento di DNA

- Elettroporazione
- Mediata da PEG
- Particle gun

# La trasformazione genica delle piante mediata da *Agrobacterium* è un processo che avviene in natura



# Trasformazione di espianti fogliari con Agrobacterium e rigenerazione delle piante

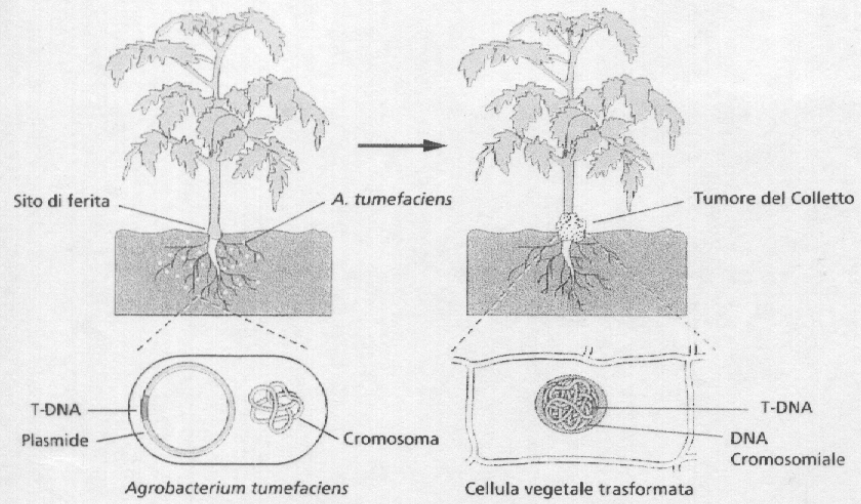


## La trasformazione mediata da *Agrobacterium*

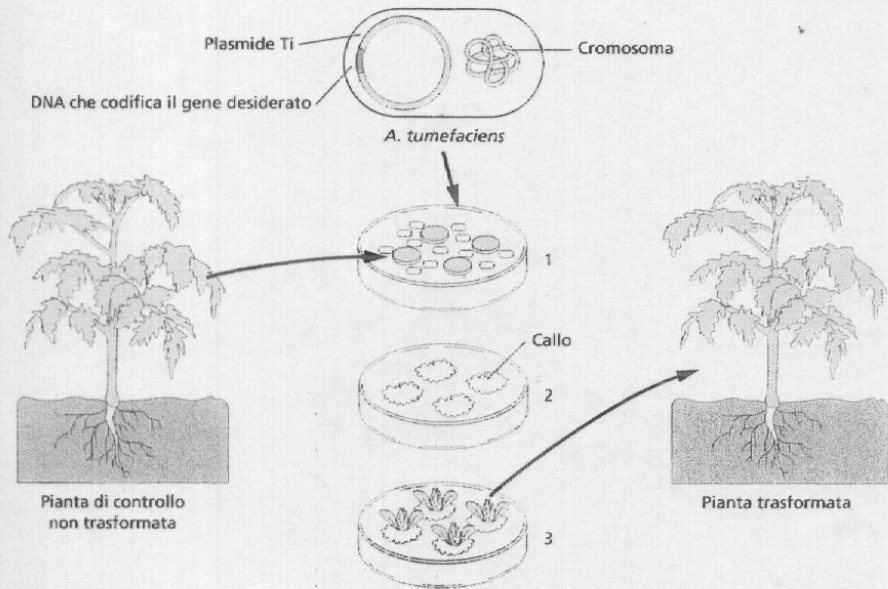
Galla del colletto







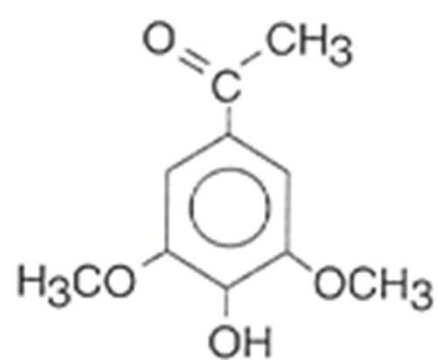
(a) Malattia del Tumore del Colletto



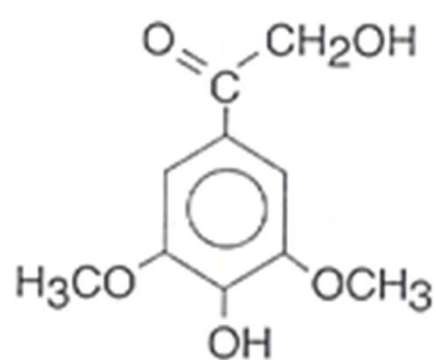
(b) Trasformazione in laboratorio

FORMAZIONE di CALLO e  
RIGENERAZIONE DOPO TRASFORMAZIONE  
con *Agrobacterium Tumefaciens*





acetosiringone



$\alpha$ -idrossiacetosiringone

**Fig. 12.6.** Formule strutturali delle molecole che inducono i geni vir.

lenza (fig. 12.5). Per questo loro ruolo essenziale sono definite come sequenze cis-attivanti. Nel tessuto tumorale i geni portati dal T-DNA sono responsabili dell'oncogenicità (geni *onc*) e della sintesi delle auxine e delle citochinine. Nel T-DNA sono anche compresi i geni che controllano la sintesi delle opine.

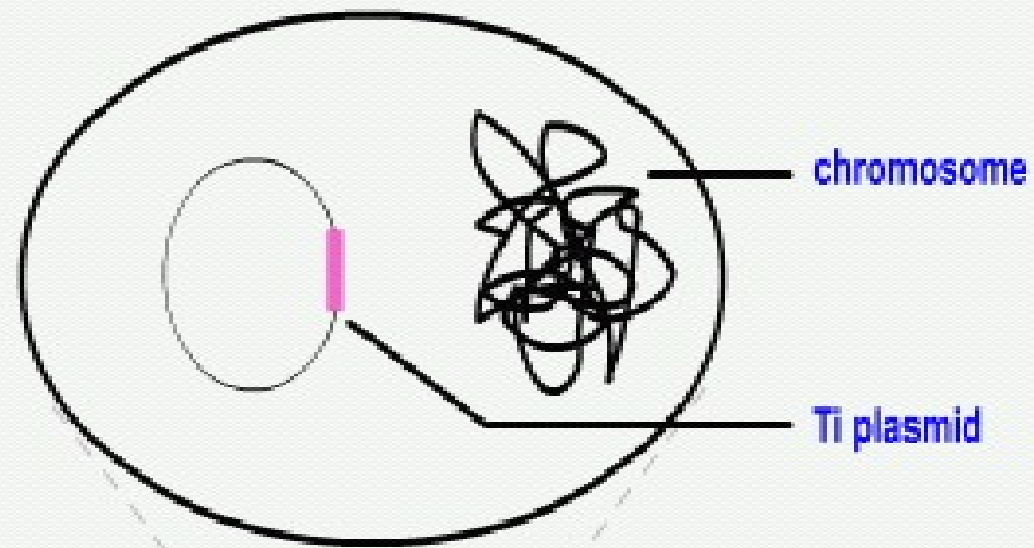
# *Agrobacterium tumefaciens*

- batterio Gram-negativo del suolo che è in grado di infettare numerose piante dicotiledoni, inducendo, in corrispondenza di una lesione, caratteristiche alterazioni morfologiche e differenziate, tumorali, come:

- “crown gall” o galla del colletto

- La virulenza di questi ceppi è associata alla presenza di un grosso plasmide, chiamato:

- Ti (“Tumor inducing”) - *A. tumefaciens*



*Agrobacterium cell*



# La sindrome crown gall

L'analisi molecolare del T-DNA integrato nelle cellule vegetali ha rivelato sempre la presenza di almeno tre

classi di geni:

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

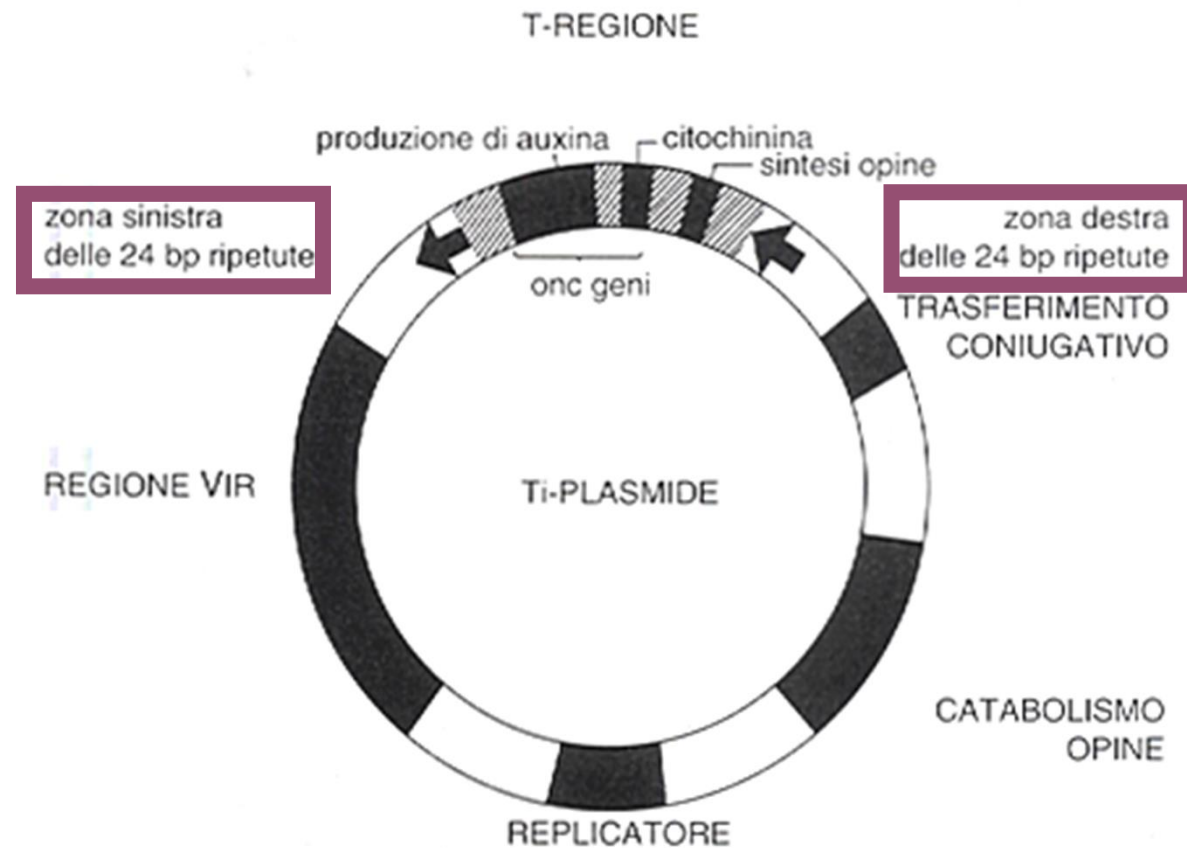
I fitormoni **auxina** e **citochinina** sono sintetizzati utilizzando vie metaboliche di origine batterica. L'aux è sintetizzata dai geni **IaaM** e **IaaH** che codificano per la triptofano mono-ossigenasi e per la 3-indol acetamide idrolasi, mentre la CK è sintetizzata dal gene **ipt** che codifica per la isopentenil-transferasi. La presenza di queste attività enzimatiche permette la proliferazione delle cellule trasformate (e la proprietà delle cellule in coltura di crescere in vitro senza ormoni). Le cellule trasformate sintetizzano anche le **opine**, che solo gli Agrobatteri utilizzano come fonte di energia, e la produzione di queste tre classi di geni costituisce un sistema integrato che favorisce selettivamente la crescita di *A.tumefaciens*.

- Ceppi avirulenti non possegono il plasmide Ti; tuttavia se questo plasmide viene trasferito nei ceppi avirulenti per coniugazione o trasformazione, questi ceppi diventano virulenti.

- La formazione del tumore è dovuta alla trasformazione della cellula vegetale:

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.

# Mappa del plasmide Ti di *Agrobacterium tumefaciens*



**Fig. 12.4.** Rappresentazione delle diverse aree che costituiscono il plasmide Ti. (Modificato da L. S. Melchers e P. J. J. Hooykaas, 1987).





## Il meccanismo del trasferimento del T-DNA

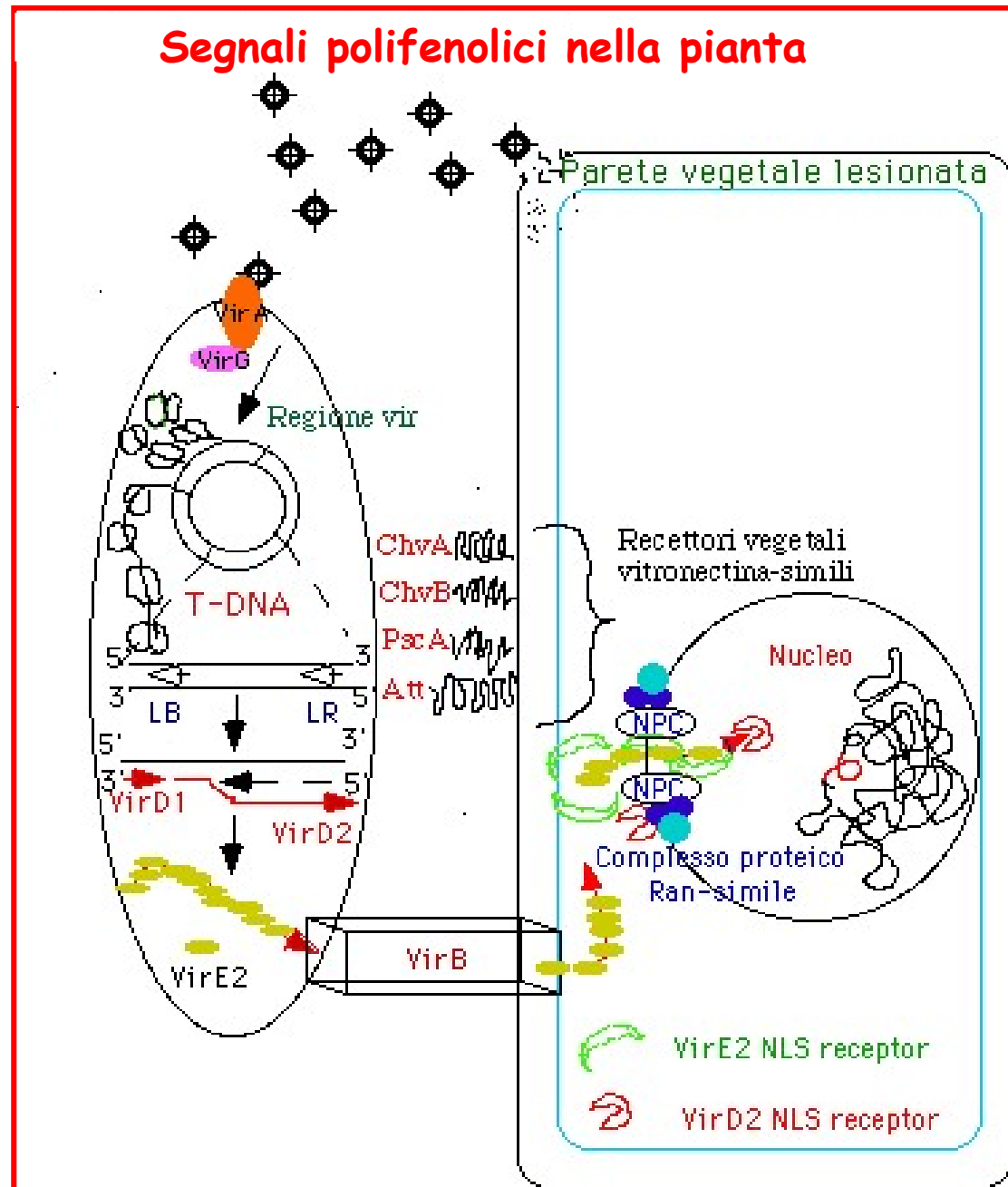
- La prima fase è costituita da un contatto cellulare mediato dalla interazione di proteine batteriche di adesione superficiale con specifici recettori della cellula vegetale. Le proteine di *Agrobacterium* implicate nell'ancoraggio alla cellula vegetale sono i prodotti genici di un insieme di geni complessivamente chiamati **chv**, mentre i recettori vegetali sembrano proteine simili alla vitronectina.

- Il sistema di percezione-trasduzione del segnale utilizzato da *Agrobacterium* appartiene alla classe di regolatori batterici a due componenti in cui una istidina 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 all'attivazione di **VirG** questi attiva tutti i geni **vir** legandosi a specifiche **Vir box** presenti sui loro promotori.

- L'induzione dei geni *vir* induce la formazione di una copia a singolo filamento del T-DNA, T-strand. Il T-strand, complementare al filamento codificante del T-DNA, si forma ad opera di due endonucleasi specifiche rispettivamente per LB e RB: **VirD1** e **VirD2**. Le due endonucleasi rimangono attaccate all'estremità 5' del filamento. In seguito alla ricostituzione del filamento complementare del T-DNA, ad opera del sistema di riparo della cellula batterica, si excide un filamento a singola elica del T-DNA con la proteina **VirD2** attaccata all'estremità 5' che le conferisce una polarità distinta.

- Il T-strand viene immediatamente ricoperta da **ss-binding proteins** codificate da **VirE** che proteggono il T-strand dall'attacco di proteasi e gli conferiscono una forma bastoncellare che ne facilita la fuoriuscita dalla cellula batterica e l'ingresso in quella vegetale utilizzando un canale e un pilus formati dall'assemblaggio di numerose proteine codificate dal locus **VirB**. L'intero processo di attraversamento del canale richiede energia probabilmente fornita dall'**attività ATPasica** di **VirB4** e/o **VirB11**

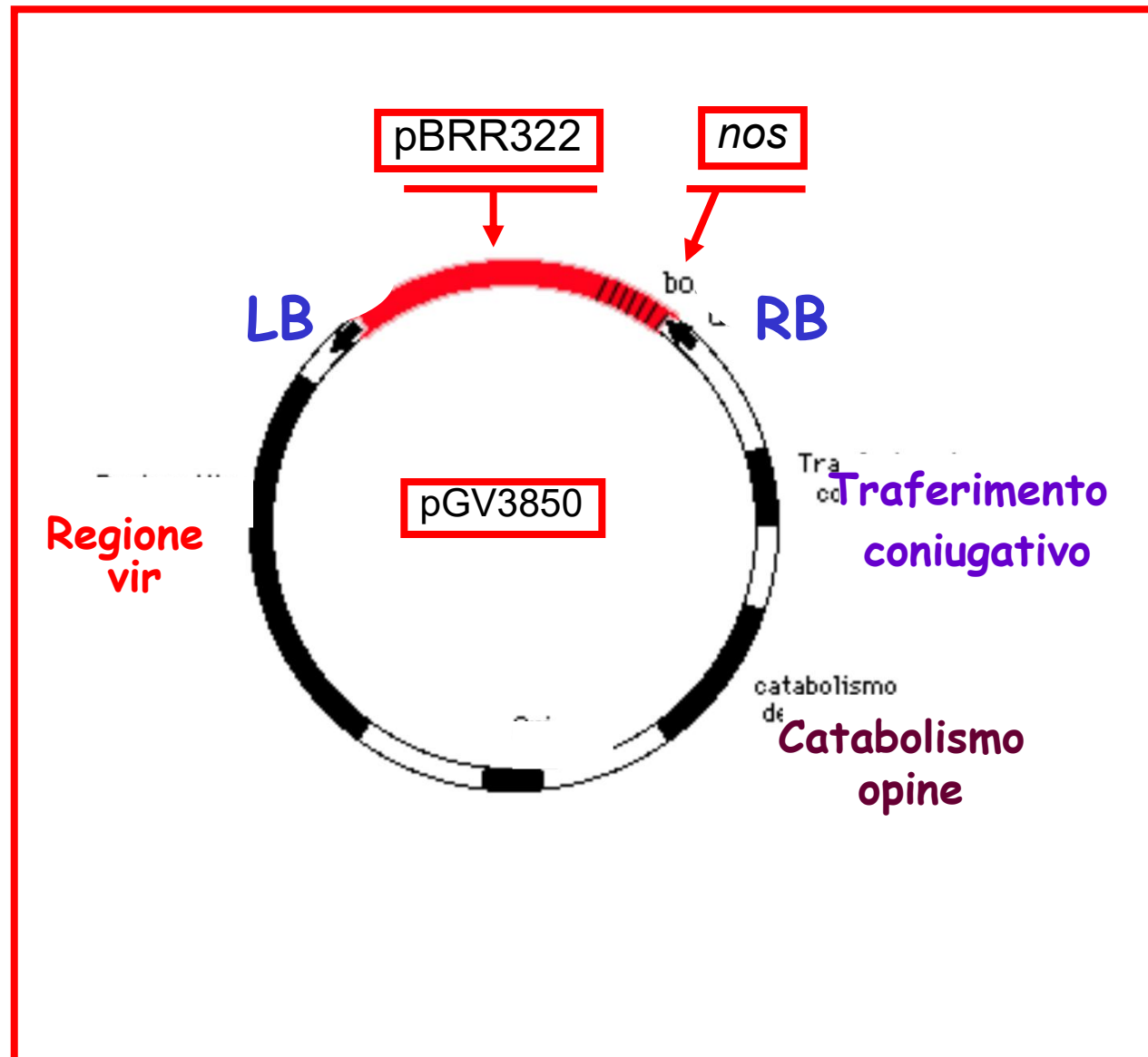
• La traslocazione del complesso-T al nucleo sembra essere mediato sia da **VirD2** che da **VirE2**. Entrambe le proteine, infatti, presentano **Nuclear Localization Signals (NLS)** funzionali. Dopo aver raggiunto la membrana nucleare, il complesso-T entra nel nucleo e, una volta dentro il nucleo, il T-strand si integra casualmente nel genoma vegetale con un meccanismo in gran parte sconosciuto, che sicuramente coinvolge numerose proteine vegetali e, forse, **VirD2 e VirE2**.



## Dai plasmidi Ti vengono derivati vettori di trasferimento in cellule vegetali

- I plasmidi Ti e Ri 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 non rigenerabili come piante fertili.
- L'analisi molecolare dei plasmidi Ti ha dimostrato che, mentre RB e LB sono essenziali per il trasferimento del T-DNA, paradossalmente 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

## Un vettore Ti disarmato (non oncogenico)



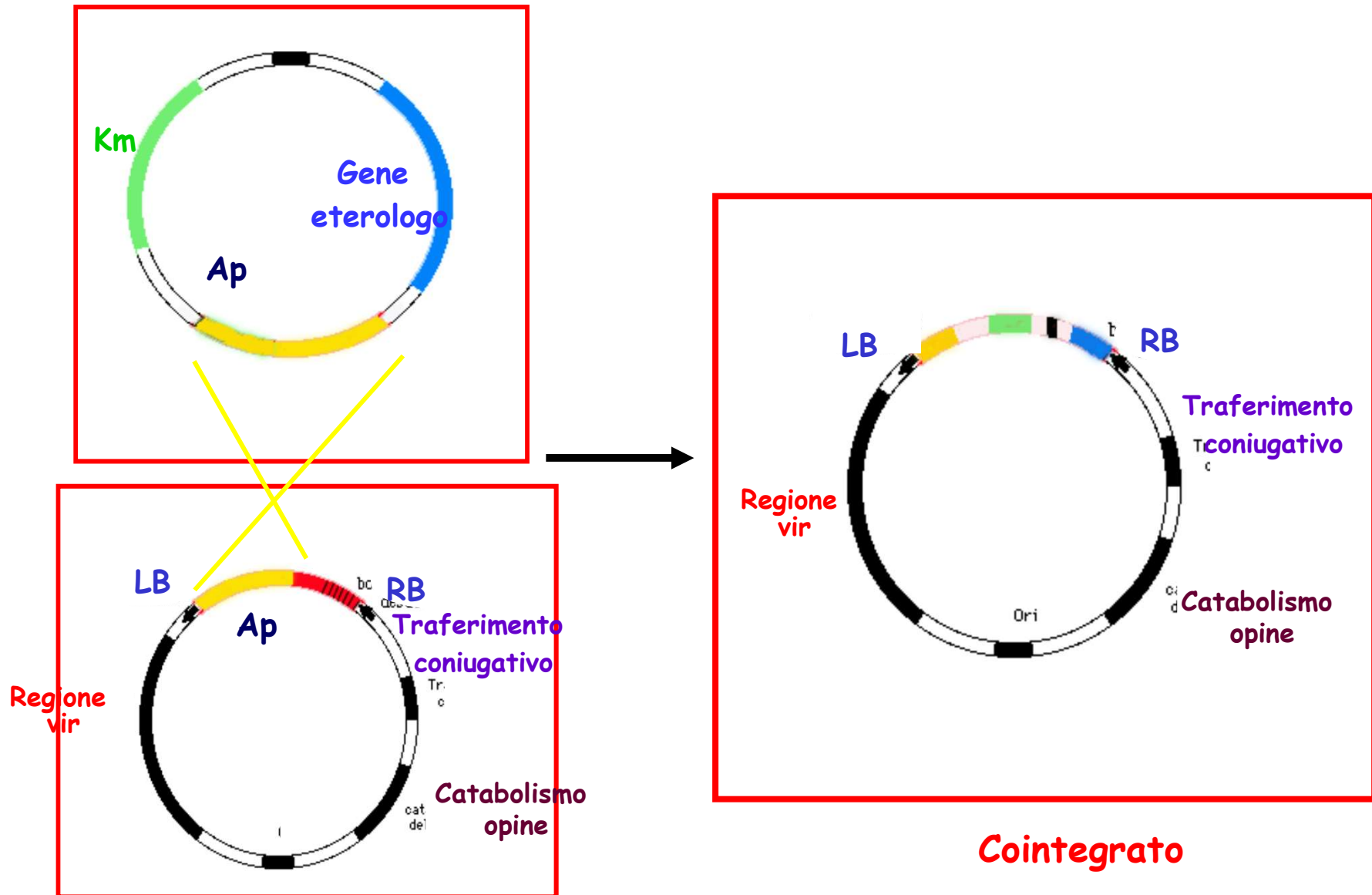
# Utilizzo dei vettori disarmati: produzione di T-DNA ricombinante attraverso la formazione di un cointegrato

- I primi plasmidi Ti disarmati non poterono essere usati direttamente come vettori perchè, sebbene non virulenti, condividevano con i plasmidi Ti originari le grandi dimensioni e l'assenza di siti di restrizione unici adeguati.

- Tuttavia questi plasmidi sono stati utilizzati come vettori di trasferimento vegetale di prima generazione sfruttando la ricombinazione omologa tra sequenze in comune con plasmidi di clonaggio e selezionando per eventi di cointegrazione.

- I geni da trasferire nelle cellule vegetali venivano clonati in normali vettori di clonaggio, per esempio PBR322. Si procedeva quindi al trasferimento in *Agrobacterium* del vettore disarmato e del vettore di clonaggio. Questo trasferimento viene di solito effettuato per coniugazione utilizzando un terzo ceppo di E.coli contenente un plasmide helper capace di complementare in trans pBR322 in *Agrobacterium*.

# Trasferimento genico per ricombinazione omologa e cointegrazione





# I vettori binari

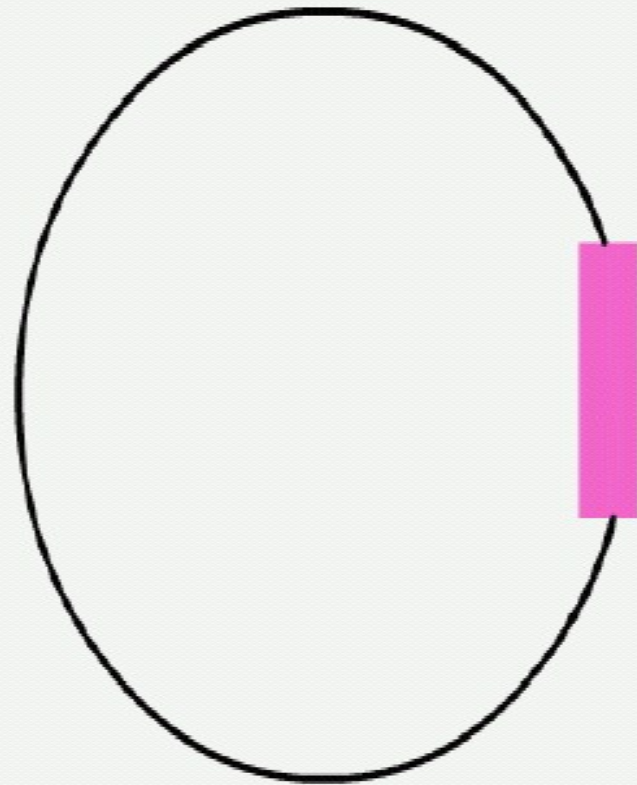
- I vettori binari sfruttando la capacità dei geni **vir** di agire *in trans* utilizzano due vettori separati uno contenente solo i geni **vir**, generalmente residente in un *Agrobacterium tumefaciens* "disarmato", e un altro contenente essenzialmente i due **border repeats**, un polilinker e un marker di selezione.

- Uno dei vettori binari più diffusi rimane pBin19 un plasmide di circa 11 Kb costruito da Michael Bevan che per primo ha sfruttato questa strategia. Questo vettore deriva dal plasmide a largo spettro d'ospite pRK252, del quale sono state mantenute le origini di replicazione e coniugazione. A pRK252 sono state aggiunte il gene per la resistenza alla kanamicina e un polilinker derivato da M13 contenente il frammento alfa di complementarietà alla beta-galattosidasi (per permettere la selezione bianco-blu). Infine è stata aggiunta una sequenza di DNA contenente i due border repeats al cui interno, oltre al polilinker è stato posizionato un ulteriore gene di resistenza alla kanamicina. Poiché ogni regione inclusa tra le sequenze borders è destinata ad essere trasferita e ad esprimersi in una cellula vegetale, il gene NPTII (il gene neomicina fosfo-transferasi che conferisce resistenza alla kanamicina) è stato posto sotto il controllo del promotore della nopalina sintetasi.

# Evoluzione dei vettori di trasferimento vegetale

Le principali modifiche consistono in:

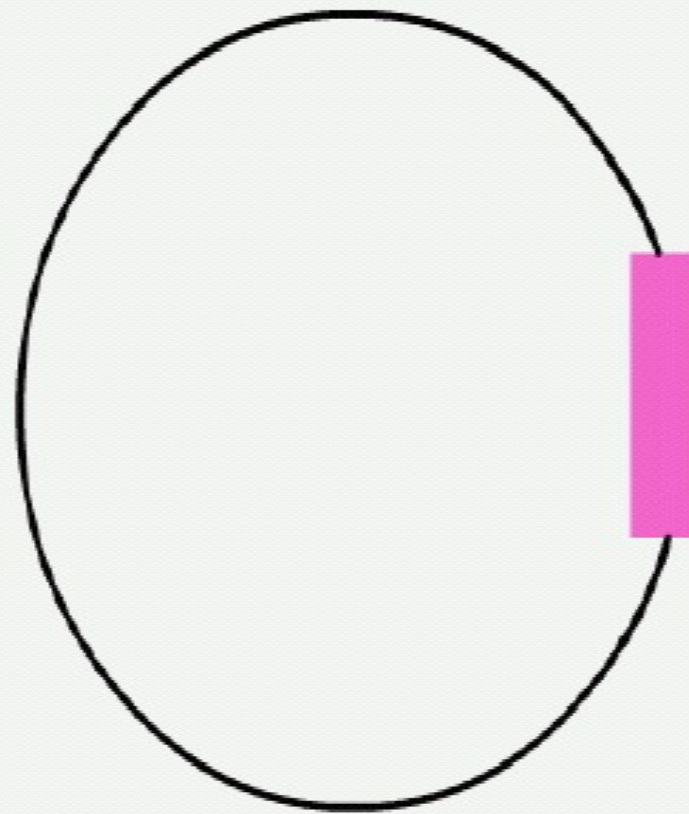
- Origini di replicazione a più alto numero di copie
- Repliconi più stabili
- Dimensioni più piccole
- Polilinker più grandi e maggior numero di siti unici per enzimi di restrizione
- Maggior numero di possibili marcatori di selezione
- Possibilità di utilizzare diversi geni reporter (GUS, GFP, YFP, Luc)
- Vettori completamente sequenziati



Ti plasmid of *Agrobacterium*



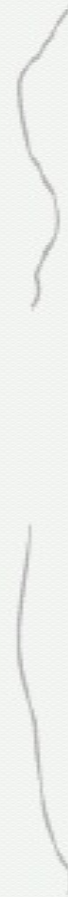
Gene(i) di interesse

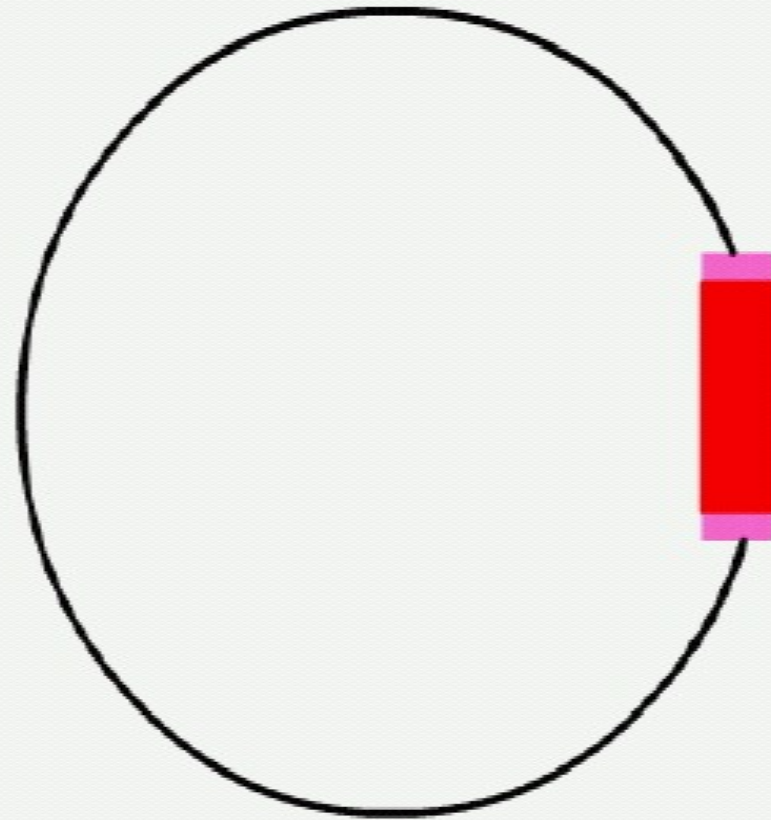


Ti plasmid of *Agrobacterium*



gene for pest-resistance

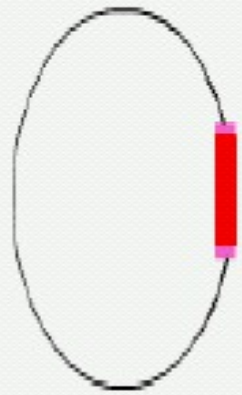




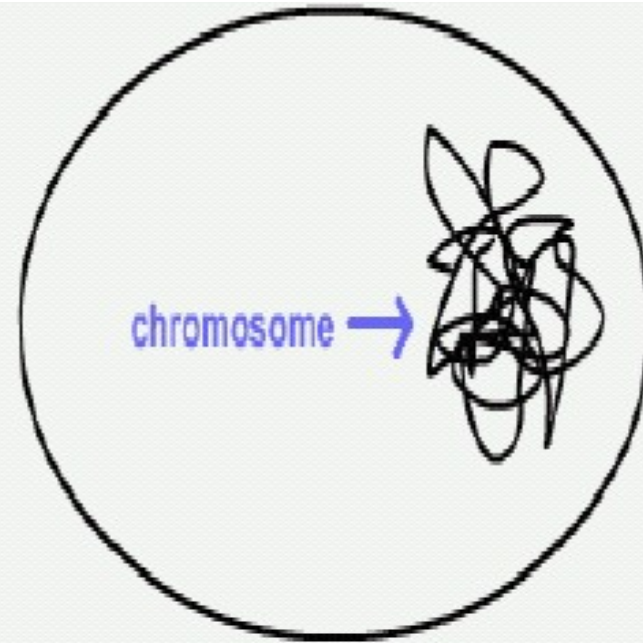
Ti plasmid of *Agrobacterium*





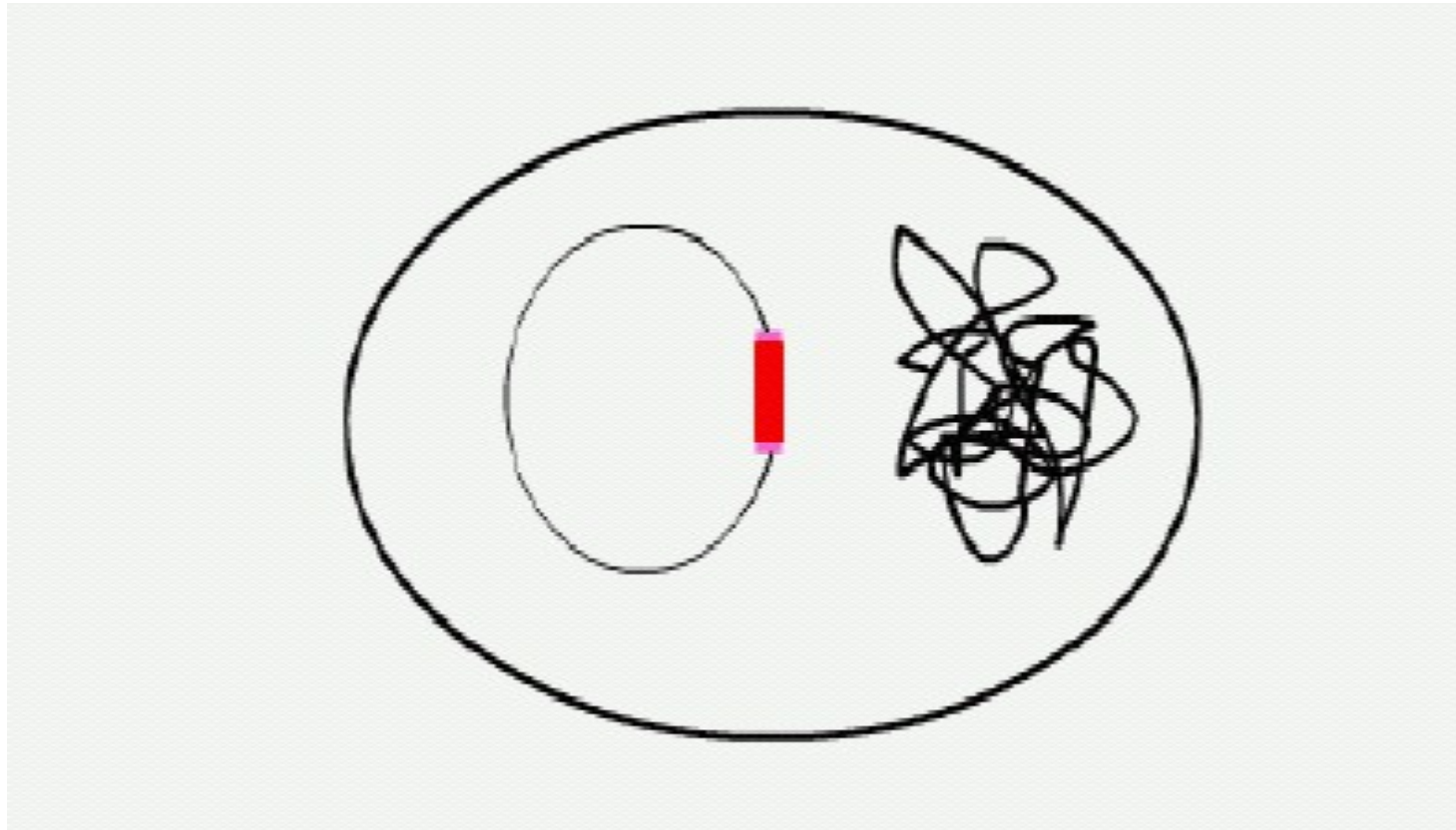


*Ti plasmid of Agrobacterium*

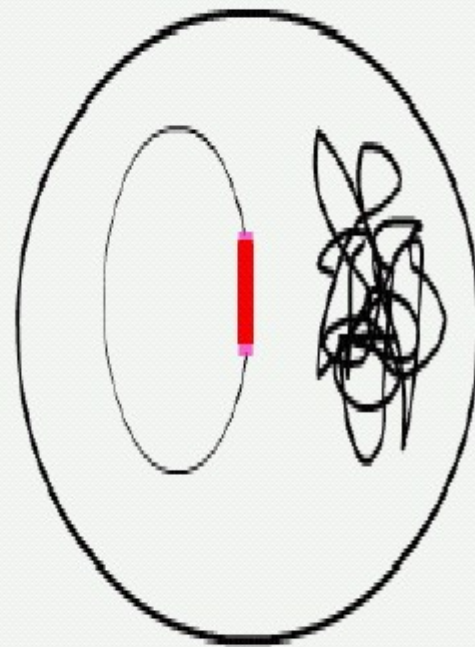


*Agrobacterium*

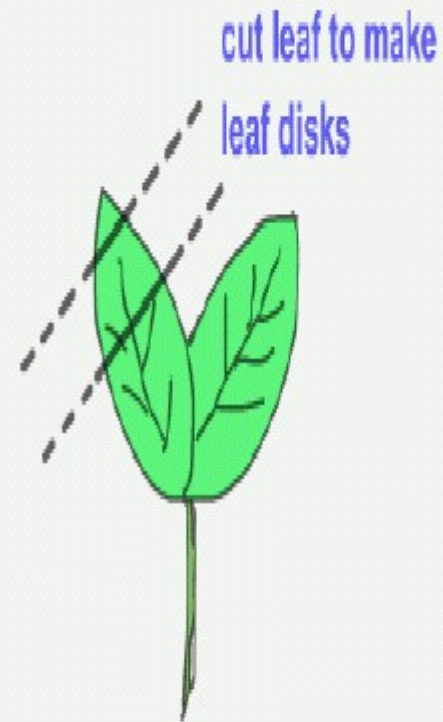
# Agrobacterium trasformato







*engineered Agrobacterium*



cut leaf to make  
leaf disks

# Transformation of plants using Agrobacterium



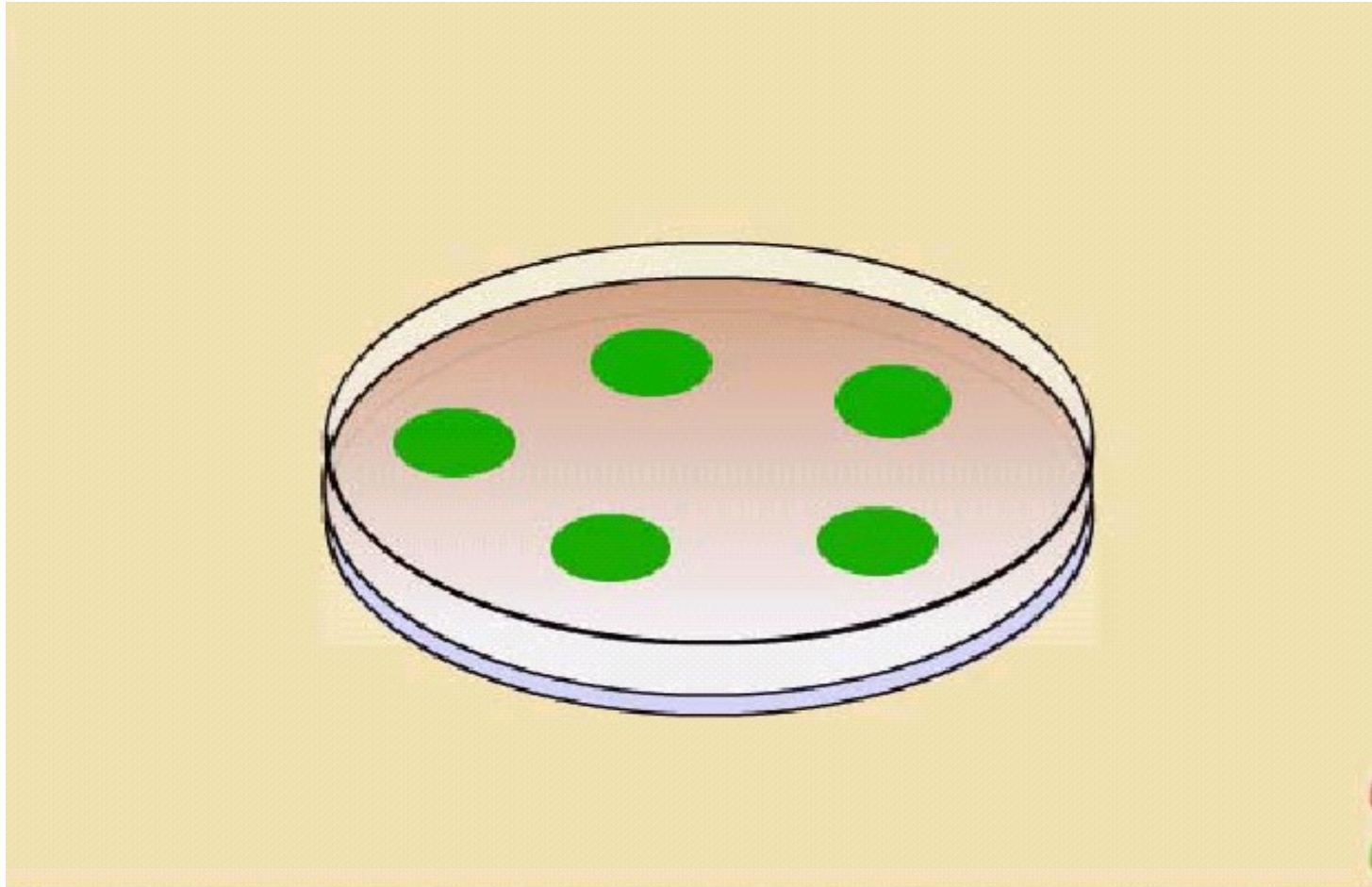
PAUSE

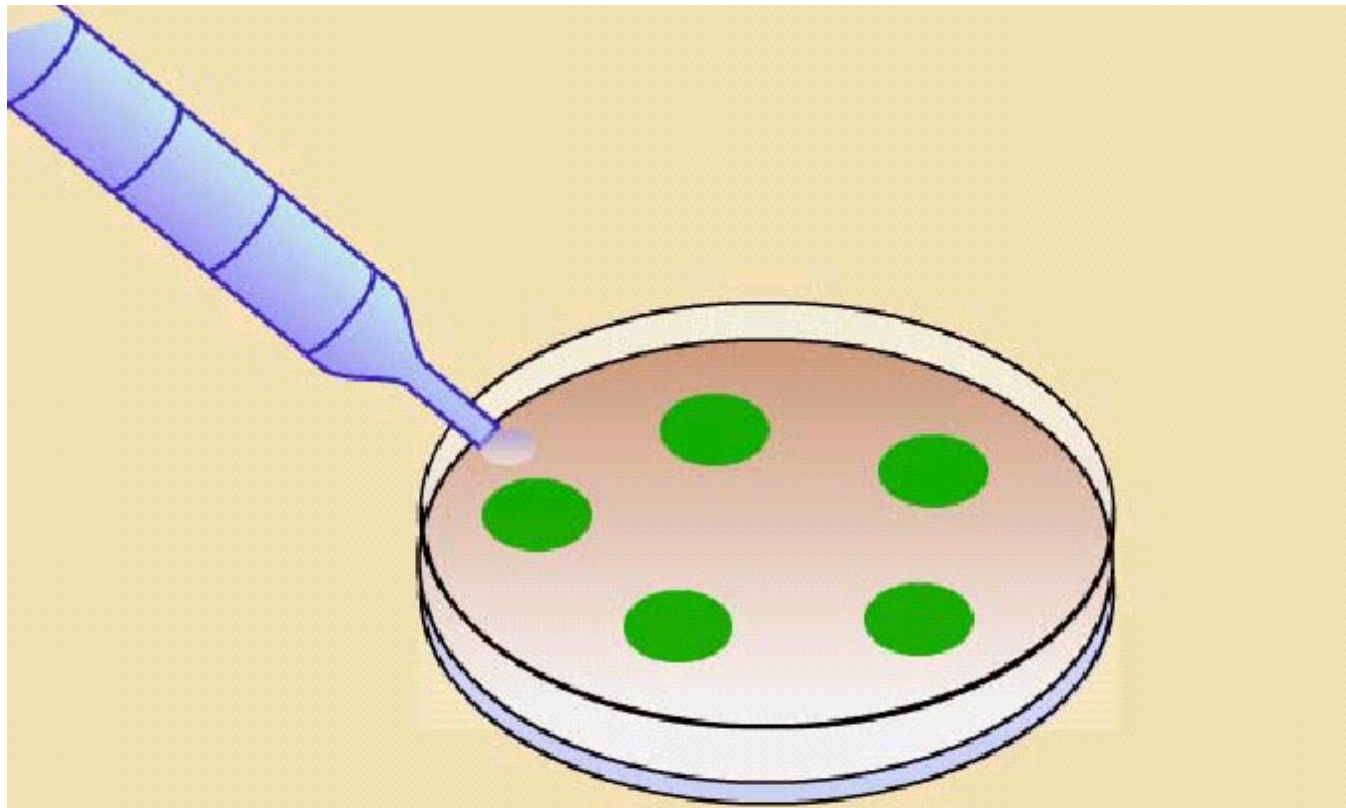
PLAY

Leaf disks are used for transformation.

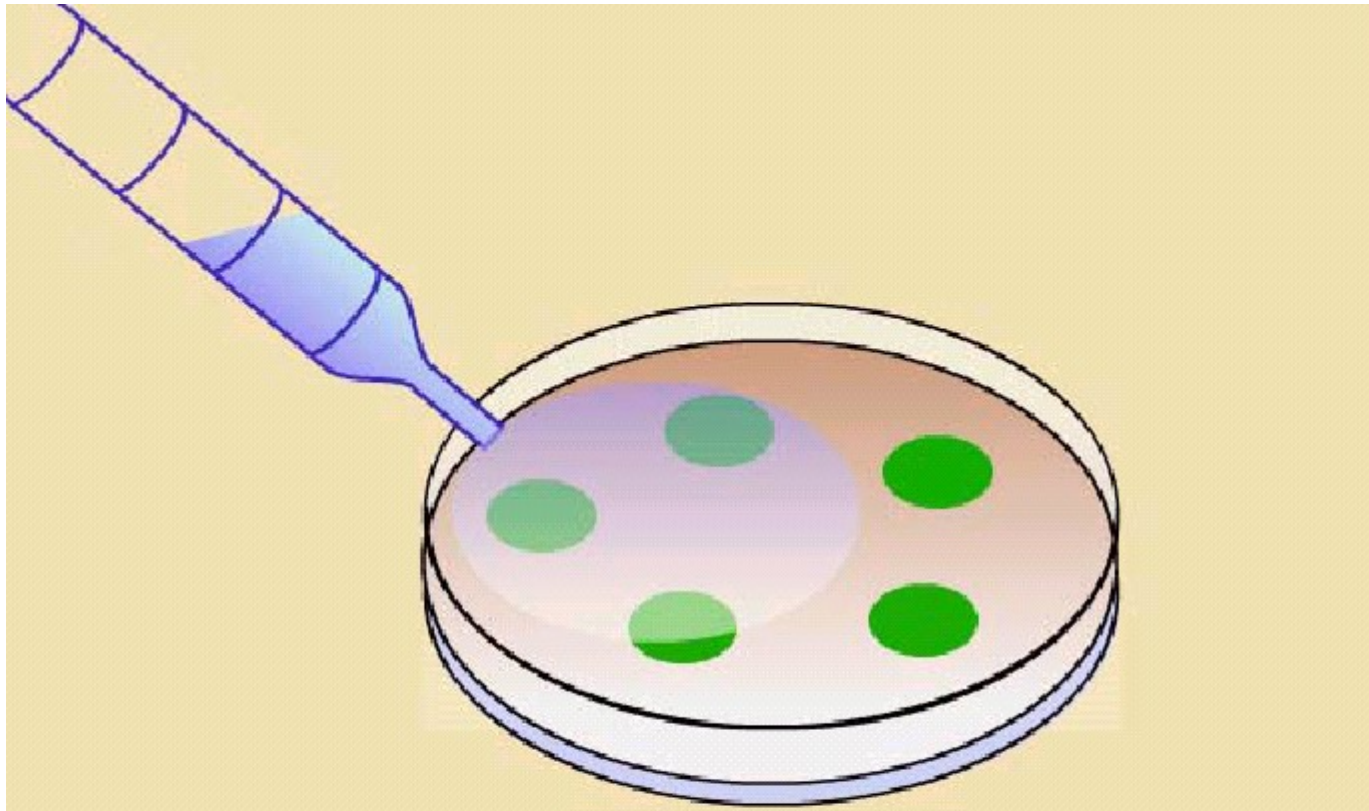


**Cut small disks from the leaf.**

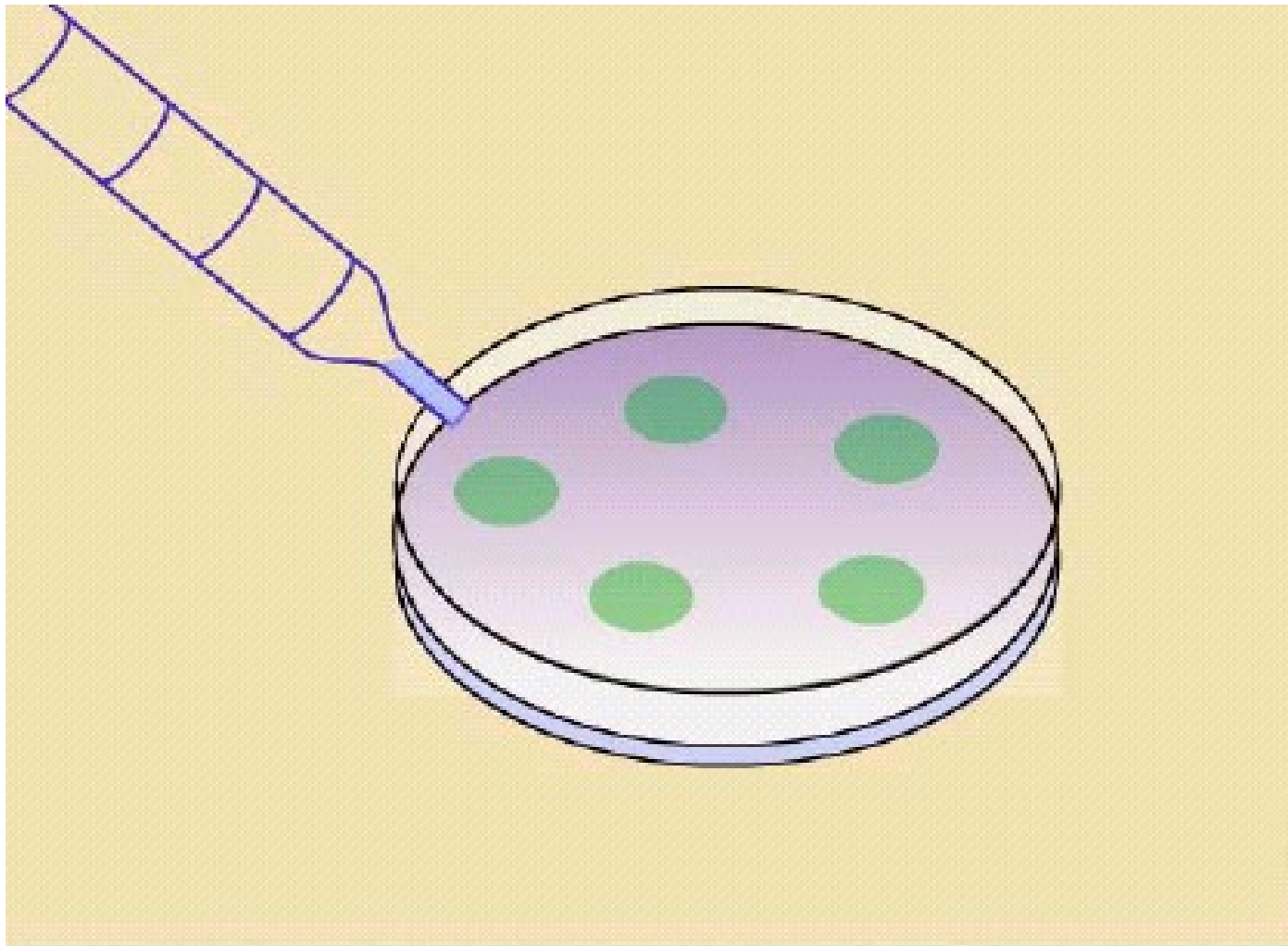




**Inoculate leaf disks with Agrobacterium.**

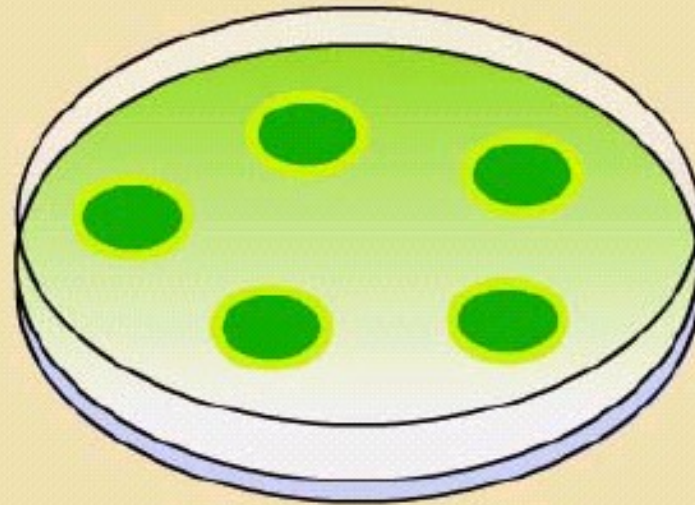


**Inoculate leaf disks with Agrobacterium.**



**Inoculate leaf disks with Agrobacterium.**

**2-3 Days**



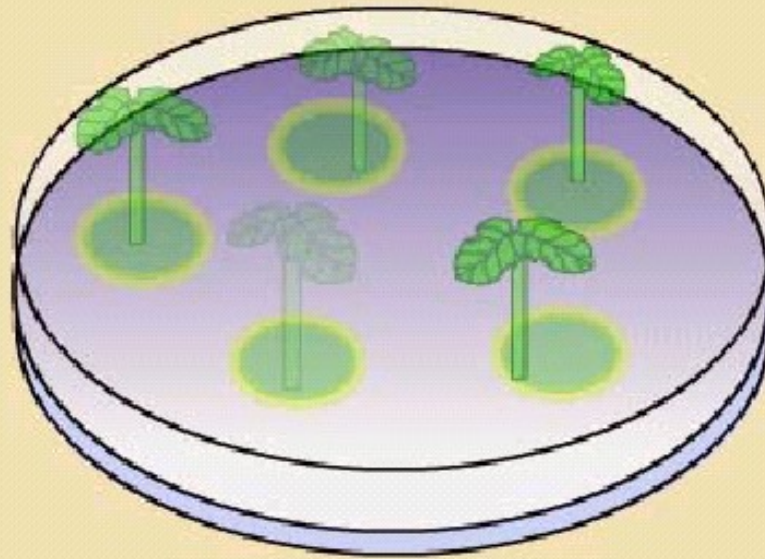
PAUSE

PLAY

**On this medium only transformed cells grow.**

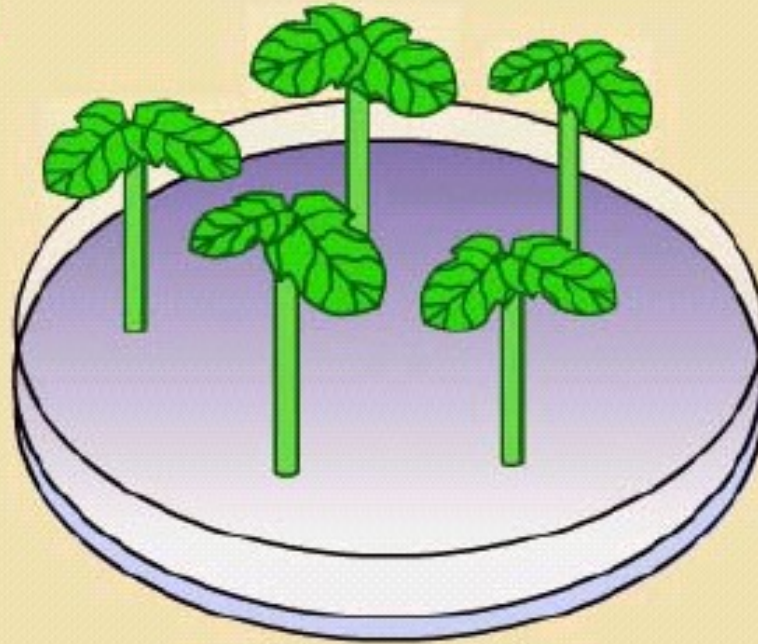


**2-4 Weeks**

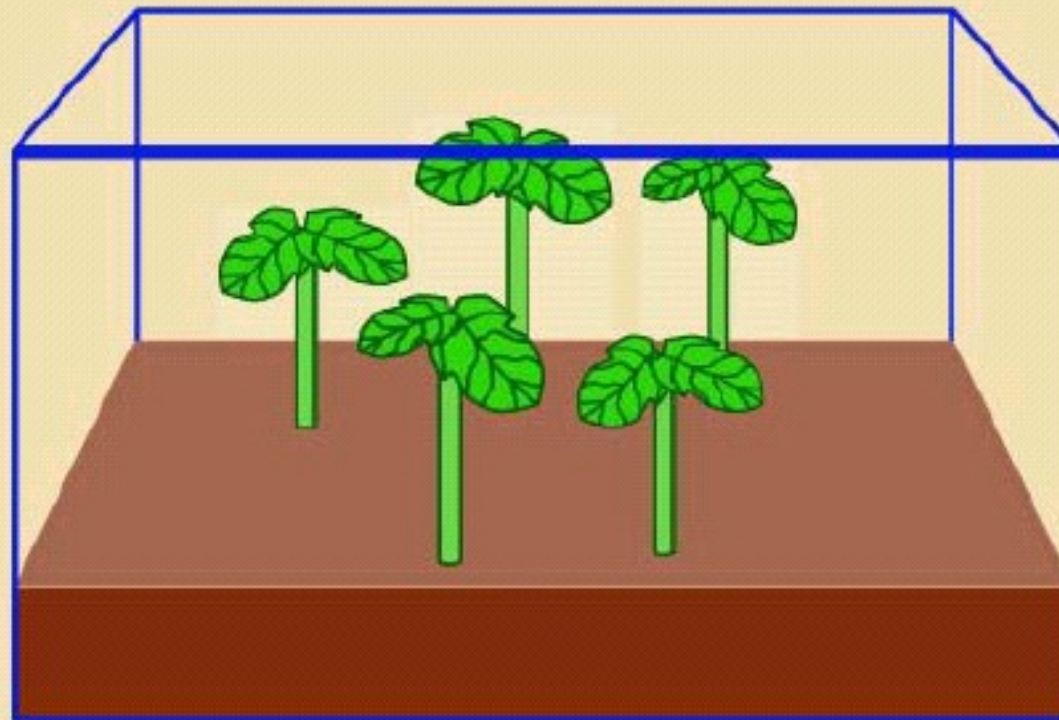


**Transfer cells to a shoot-inducing medium.**

**2-4 Weeks**



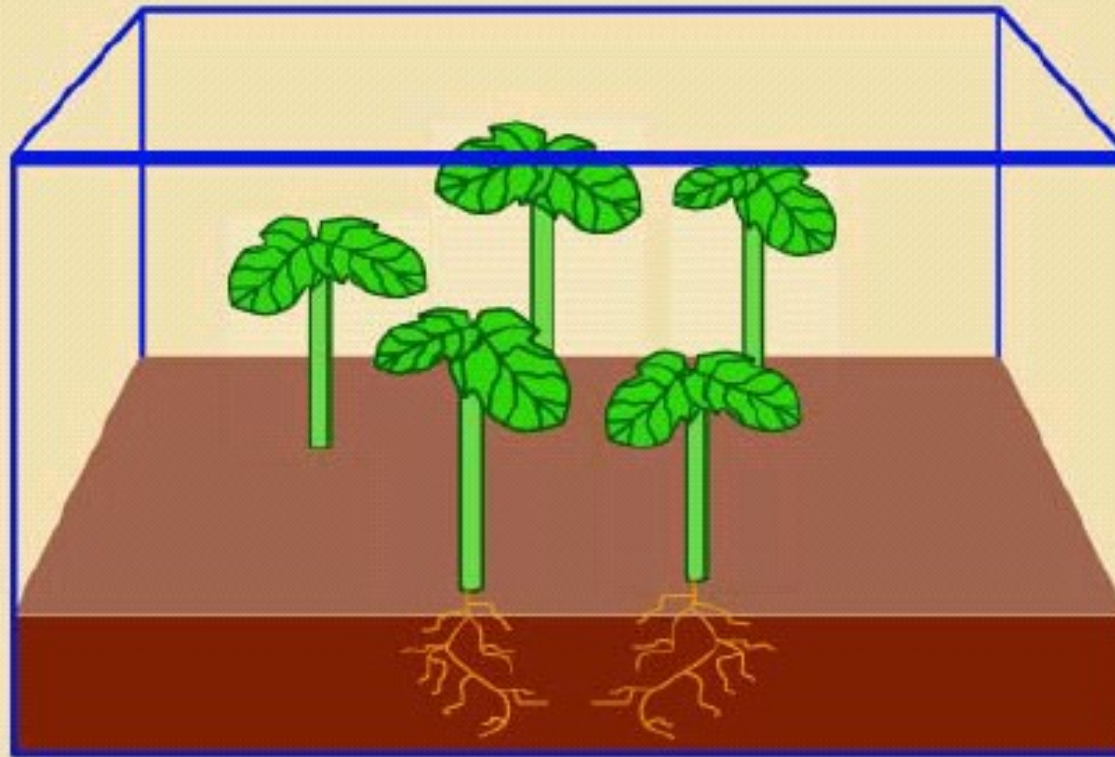
**Transfer cells to a shoot-inducing medium.**



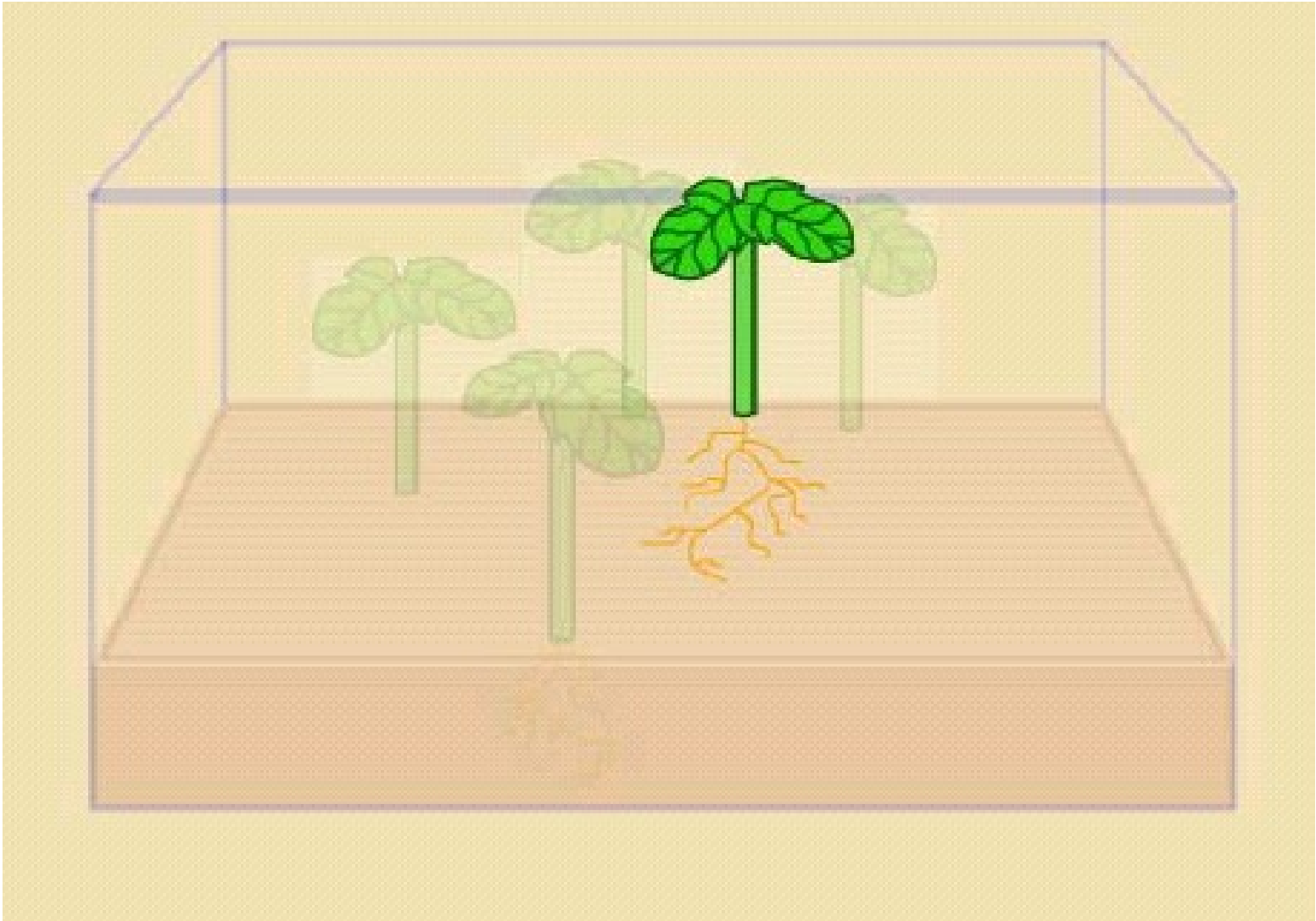
PAUSE

PLAY

**Transfer shoots to a root-inducing medium.**



**Transfer shoots to a root-inducing medium.**

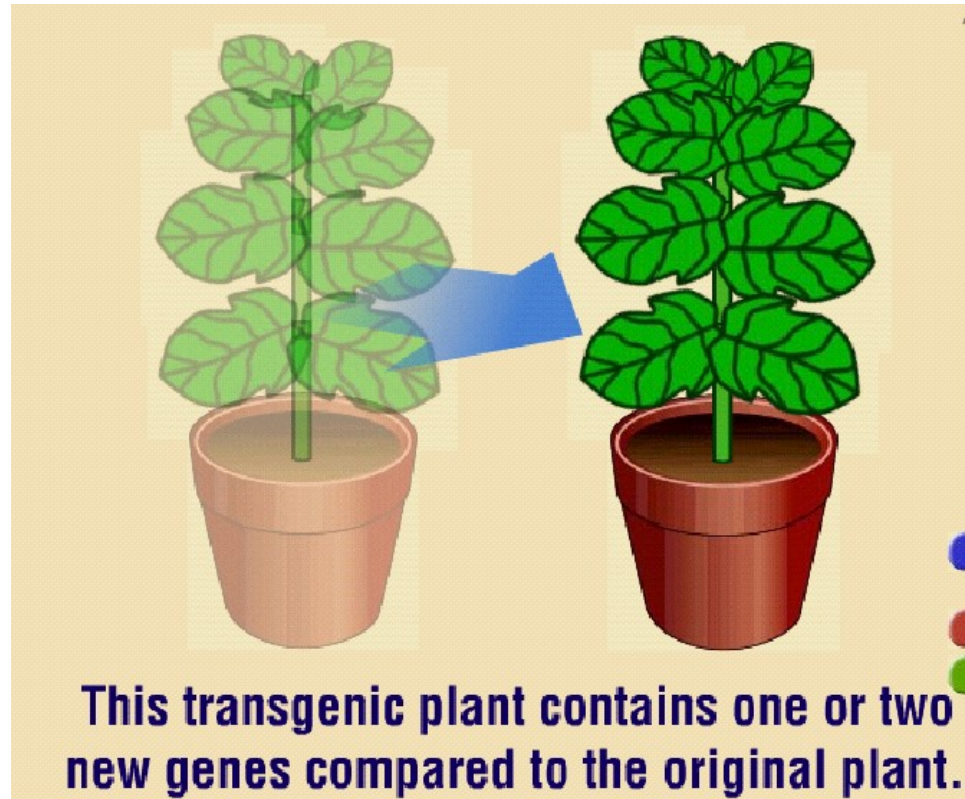




PAUS

PLAY

After three weeks, transfer rooted plants to soil.



# Trasformazione con *Agrobacterium*: Tipi di Vettori

## Vettori Binari:

Il T-DNA e la regione vir risiedono in plasmidi separati all'interno dello stesso ceppo di *Agrobacterium*.

La regione del T-DNA è limitata al LB e RB.

## Vettori co-integrati:

Derivano dalla ricombinazione tra un piccolo vettore plasmidico (es: di *E. coli*) che porta i geni marcatore e d'interesse e un plasmide Ti disarmato.

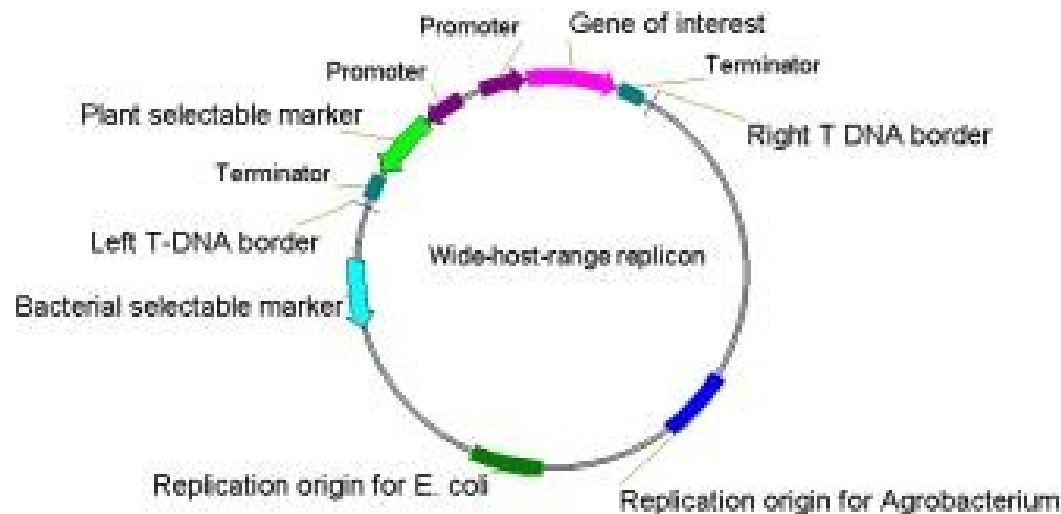
La ricombinazione avviene attraverso una regione omologa presente in entrambi i plasmidi.



# Trasformazione con *Agrobacterium*: Vettori Binari

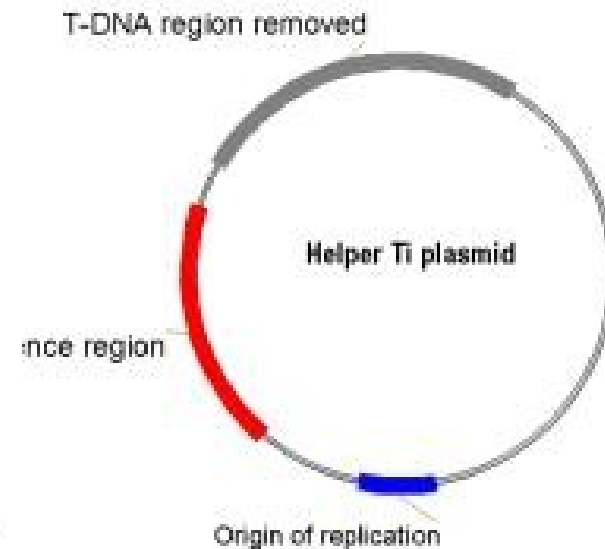
## A) piccolo plasmide ad ampio spettro d'ospite:

- DNA di interesse al posto del T-DNA
- LB e RB
- Marcatori per la selezione e mantenimento in *E. coli* e *A. tumefaciens*
- Marcatore di selezione per le piante



## B) Plasmide Ti helper

- Privo del T-DNA
- Contiene i geni Vir



## Trasformazione con Agrobacterium: Vettori Binari

In generale la procedura di trasformazione è la seguente:

- Inserimento del gene di interesse nel plasmide piccolo
- Trasferimento di questo in agrobacterium contenente il plasmide Ti helper
- Co-coltivazione del tessuto o cellule vegetali con Agrobacterium, per consentire il trasferimento del T-DNA
- Selezione delle cellule trasformate

# Trasformazione con *Agrobacterium*: Vettori Binari

## Possibili svantaggi:

Possibile instabilità del plasmide ad ampio spettro d'ospite, dovuto alla contemporanea presenza delle origini di replicazione per *E. coli* e *A. tumefaciens*

## Rispetto ai vettori co-integrati presenta diversi vantaggi:

- Non richiede ricombinazione tra le molecole implicate
- Utilizza vettori di dimensioni piccole molto più efficienti dei grandi plasmidi Ti disarmati nel trasferimento da *E. coli* ad *A. tumefaciens*

# Trasformazione con *Agrobacterium*: Vettori co-integrati

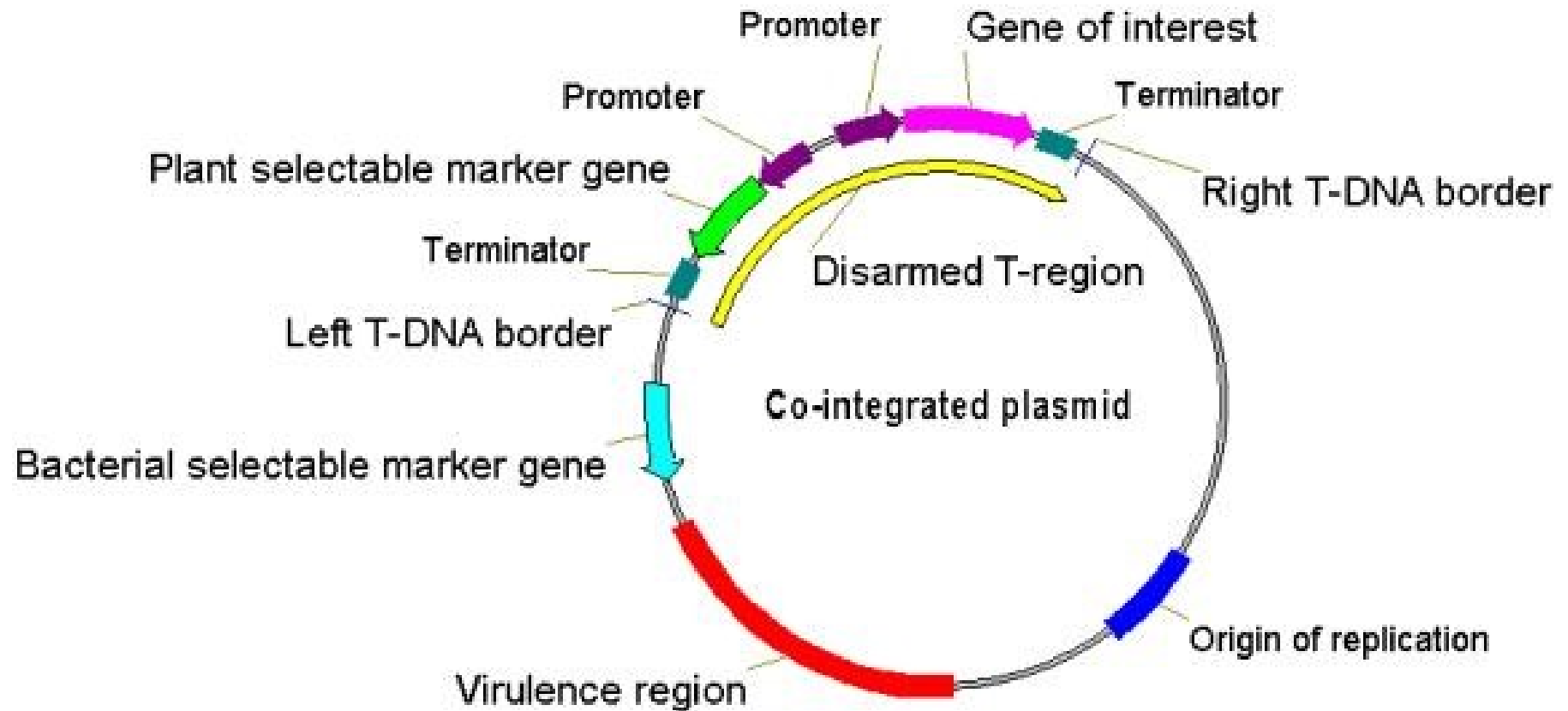
Questi vettori derivano dalla combinazioni di 3 vettori:

- Plasmide Ti disarmato. Il T-DNA è sostituito da DNA esogeno

- Vettore intermedio. Sono plasmidi basati sul pBR322 e contenenti il T-DNA. Vengono utilizzati per superare i problemi derivanti dalle grandi dimensioni del plasmide Ti e dalla mancanza di siti di restrizione. Vengono replicati in *E. coli* e trasferiti ad *A. tumefaciens* mediante coniugazione. Non si possono replicare in *A. tumefaciens* e trasportano segmenti di DNA omologo al Ti disarmato per consentire la ricombinazione e formare una struttura di T-DNA co-integrata.

- Vettore helper. Sono plasmidi mantenuti in *E. coli* e che contengono i geni di trasferimento (*tra*) e mobilitazione (*mob*) che consentono il trasferimento dei vettori intermedi in *A. tumefaciens*.


# Trasformazione con *Agrobacterium*: Vettori co-integrati




# Trasformazione con *Agrobacterium*: Vettori co-integrati

## Possibili svantaggi:

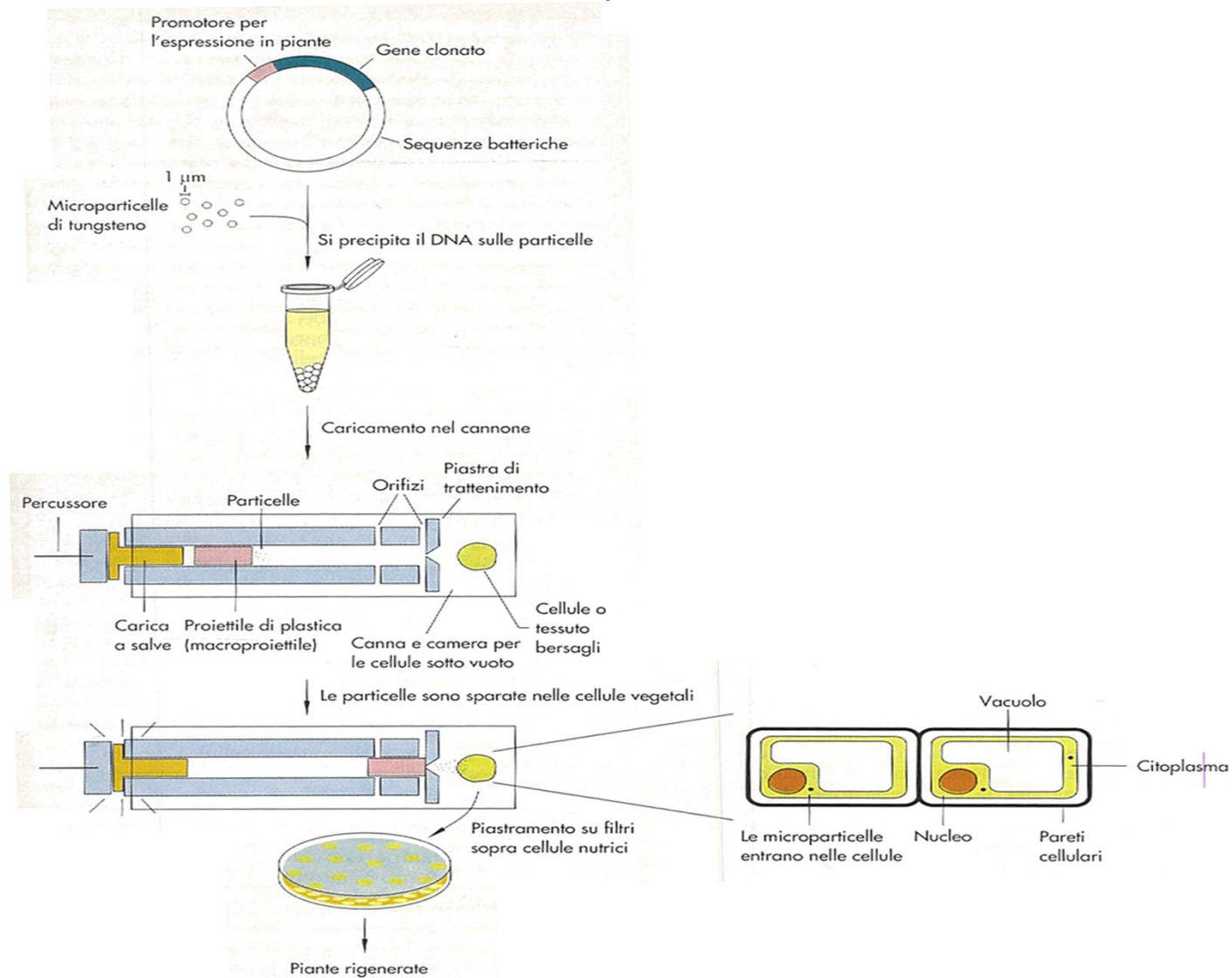
- Richiede estese regioni di omologia tra il Ti e il plasmide di *E.coli*
- 
- Trasferimento genico meno efficiente rispetto ai vettori binari

A stylized illustration of a gene gun, showing a grey cylindrical body with a brown barrel extending to the right. The barrel is positioned as if firing a projectile into a yellow rectangular box.

**DNA  
Transfer  
with a  
Gene Gun**

A horizontal row of 15 blue triangles pointing downwards, located at the bottom of the yellow box.

# "Particle gun" nella trasformazione delle piante





# Metodi alternativi di trasferimento genico vegetale: elettroporazione

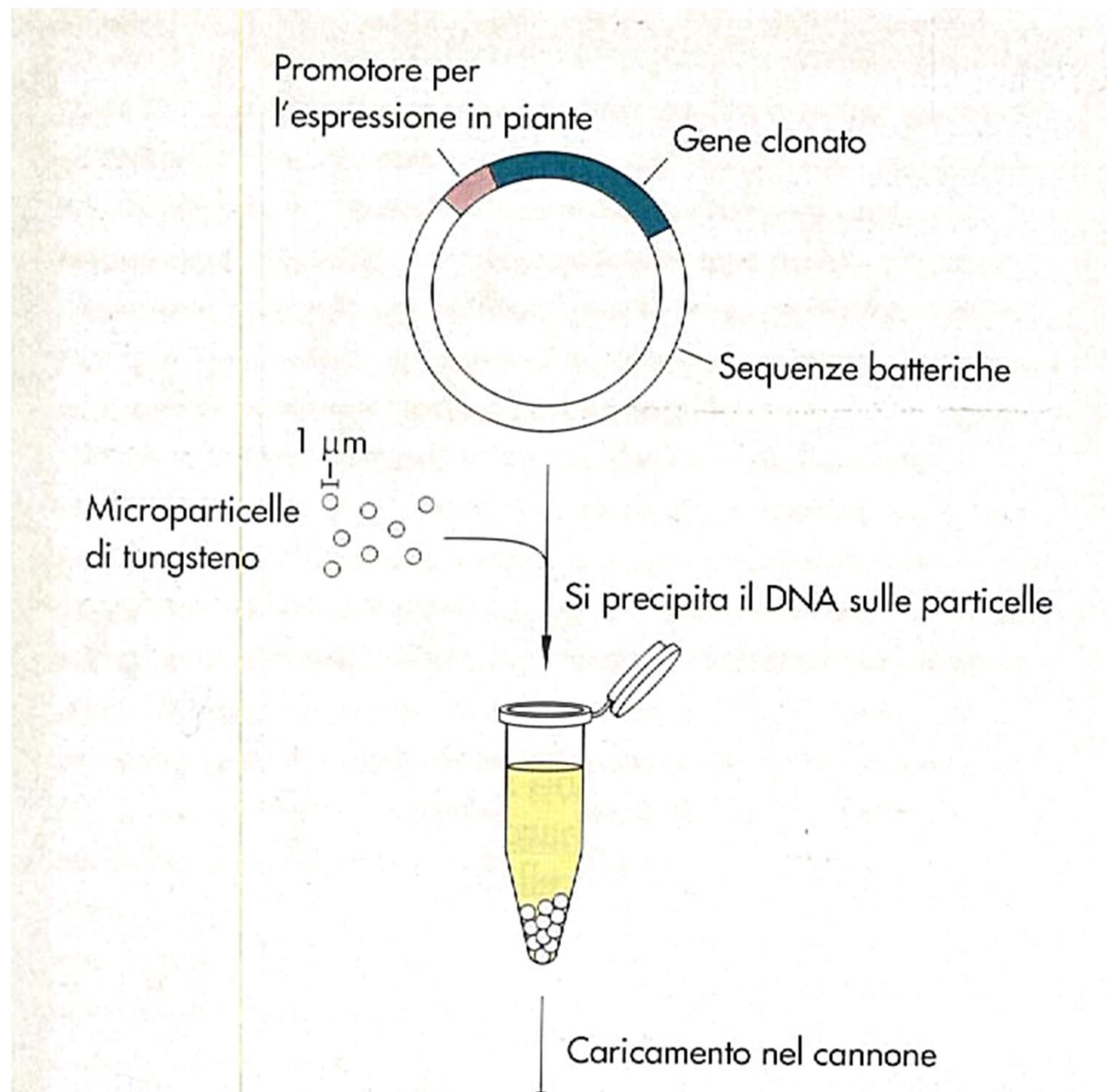
- E' possibile trasformare specie monocotiledoni con *Agrobacterium* ma, in generale l'efficienza è molto bassa, dunque, nonostante l'interesse agronomica di molte specie monocotiledoni, l'uso di *Agrobacterium* non è consigliabile.

- Un metodo possibile, ma poco efficiente, consiste nell'ottenere protoplasti per poi trattarli sostanzialmente come cellule di mammifero trattandole, per esempio, con  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ .

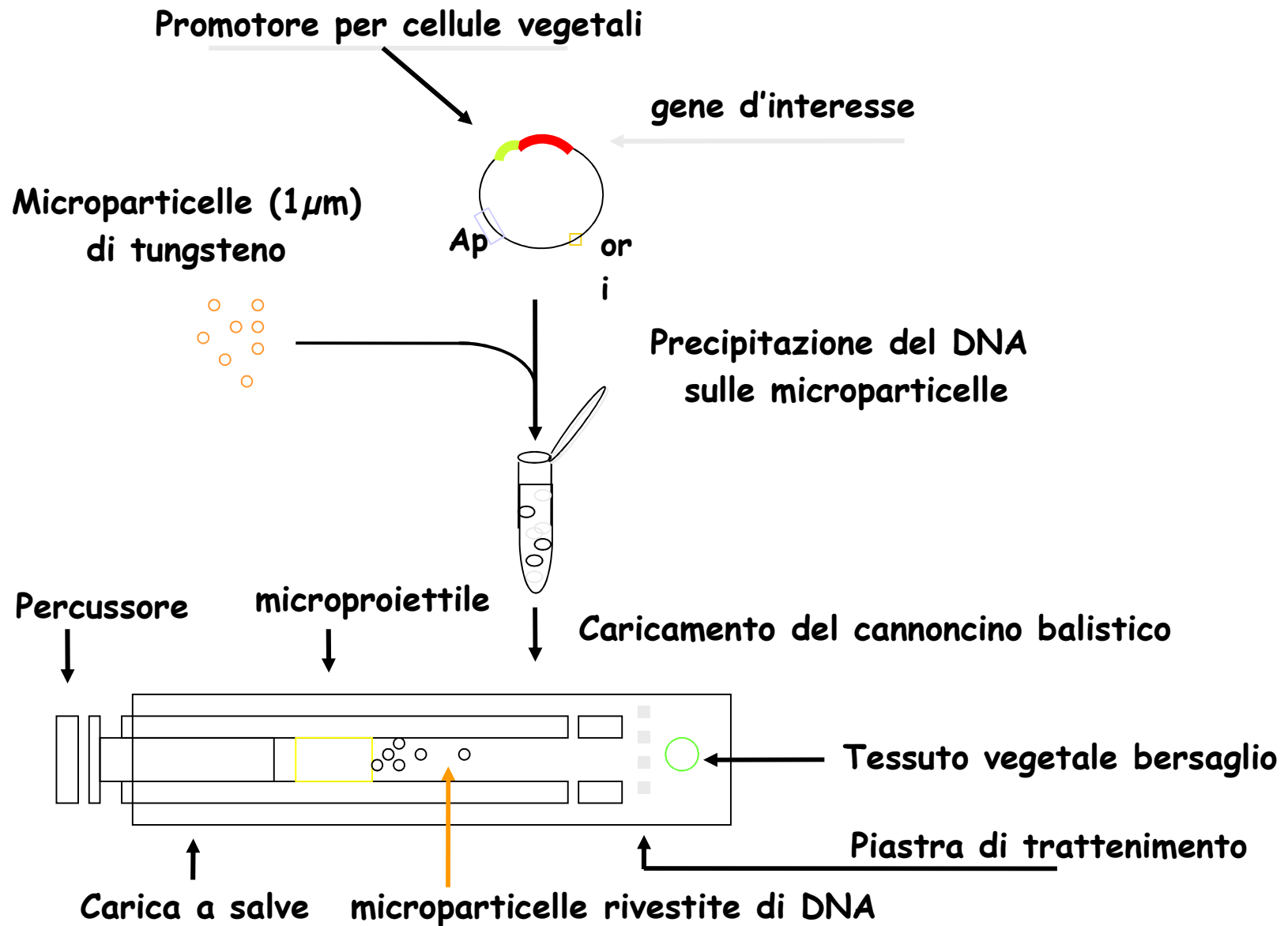
Un modo per superare questo ostacolo consiste nell'introduzione diretta del DNA nelle cellule vegetali usando metodi fisico-chimici, piuttosto che biologici.

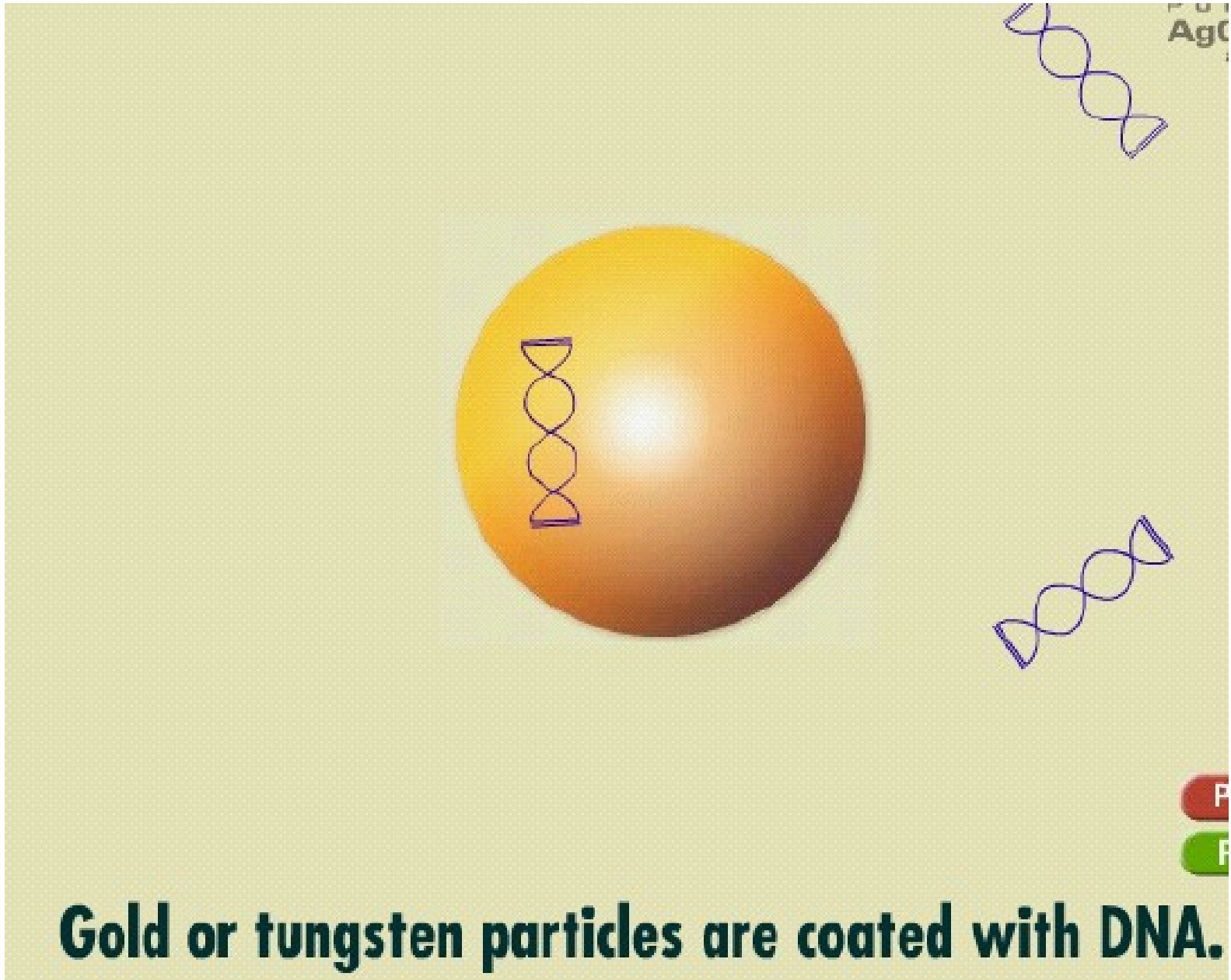
- Il metodo più efficace è l'elettroporazione a partire da protoplasti. Un' alta concentrazione di DNA plasmidico contenente il gene di interesse viene mescolata a una sospensione di protoplasti e sottoposti per pochi secondi ad un intenso campo elettrico dell'ordine di 250-500 V/cm.

- Efficienze di trasformazione tra lo 0,1 e l'1% x protoplasti di riso e di mais

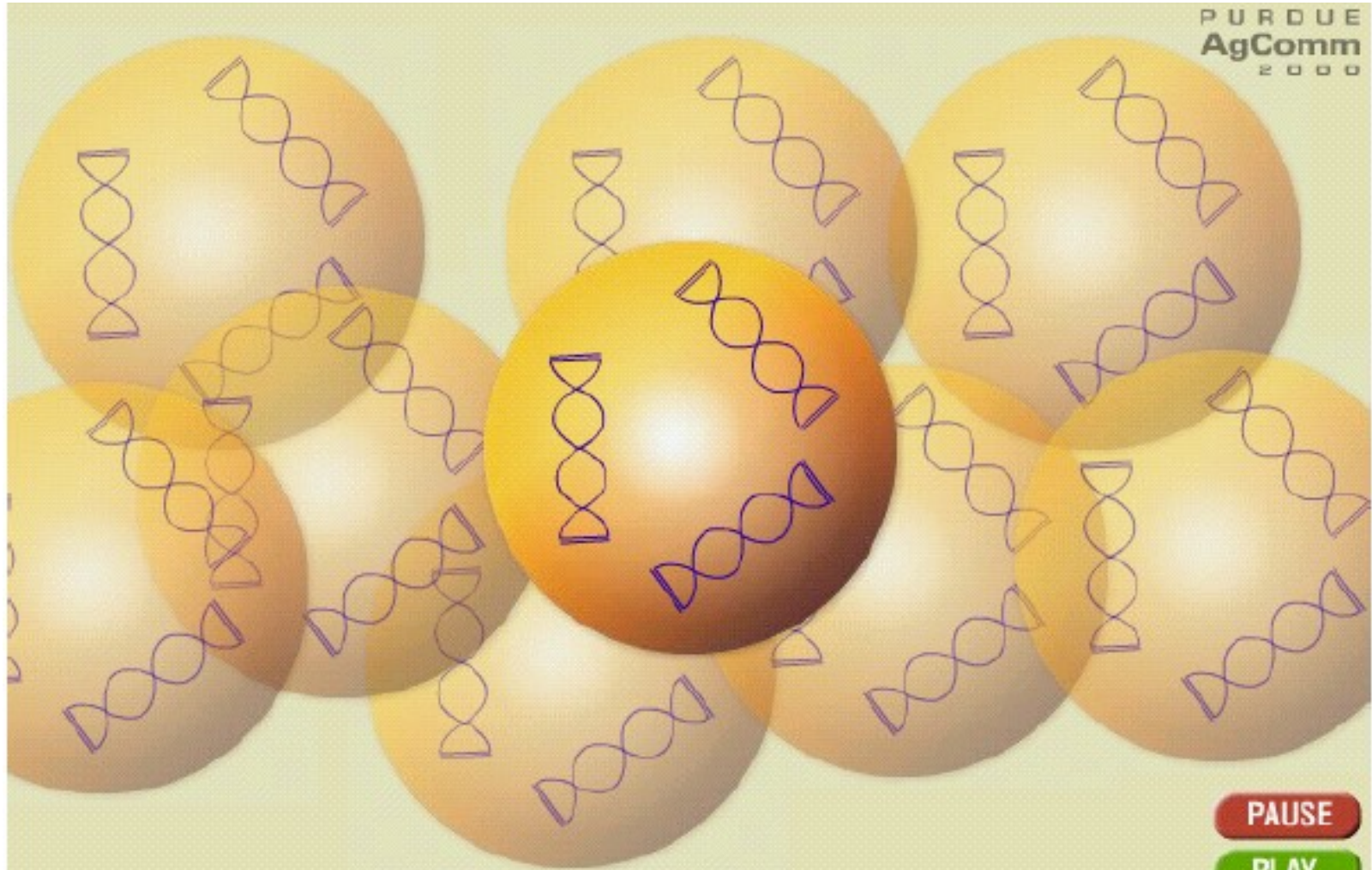


# Metodi alternativi di trasferimento genico vegetale: cannoncino balistico





**Gold or tungsten particles are coated with DNA.**



PAUSE

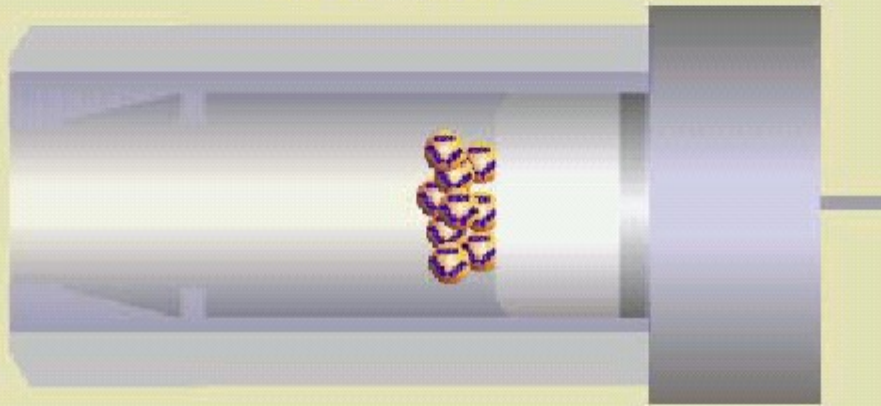
PLAY

**Gold or tungsten particles are coated with DNA.**



**The DNA-coated particles are placed  
on the end of a plastic bullet.**

## GENE GUN



PAUSE

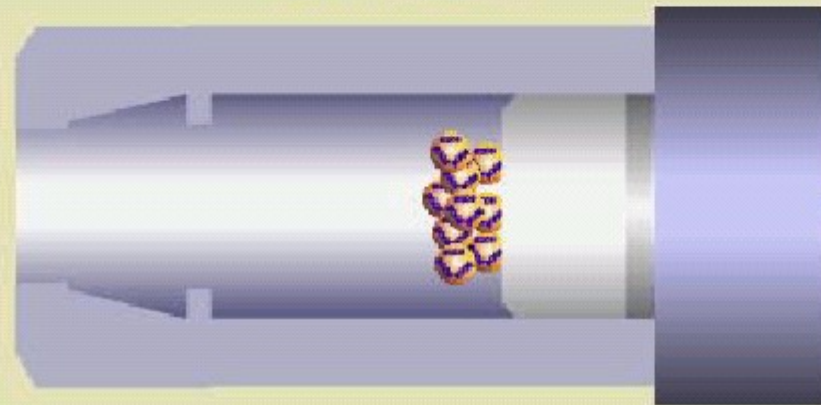
PLAY

**The plastic bullet is placed in the gene gun.**

**TARGET  
PLANT TISSUE**



**GENE GUN**

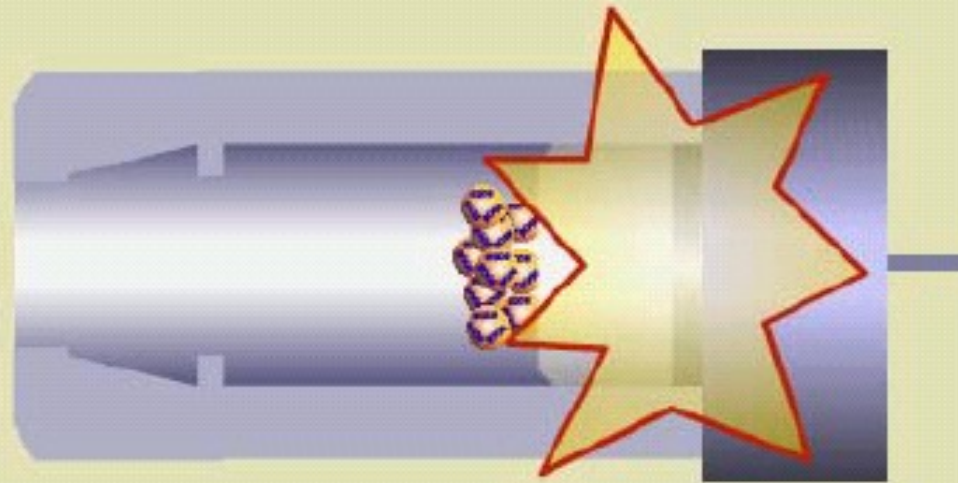


**The target tissue is placed at the end of the barrel. Any plant tissue may be used.**

**PAUSE**

**PLAY**

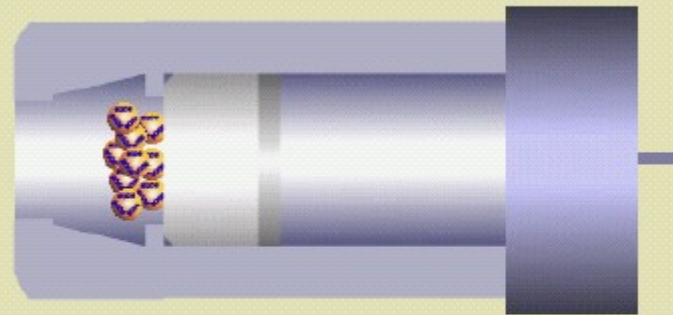




**An explosive charge propels the particle  
bullet forward.**

PAUSE

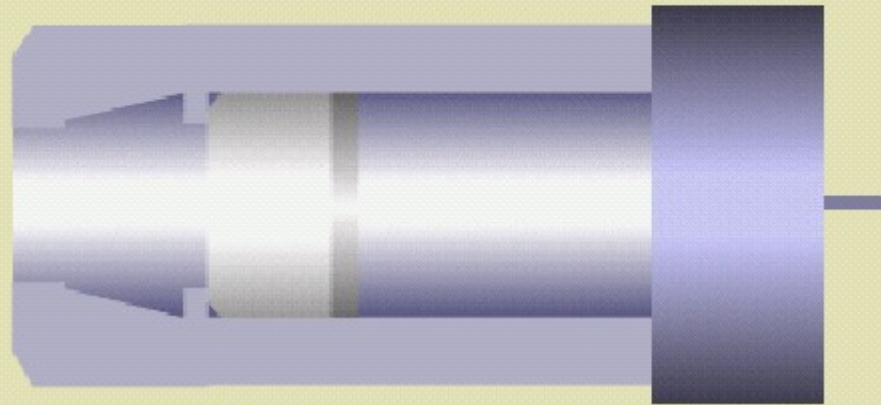
PLAY



PAUSE

PLAY

**The plastic bullet impacts the end of the barrel.**

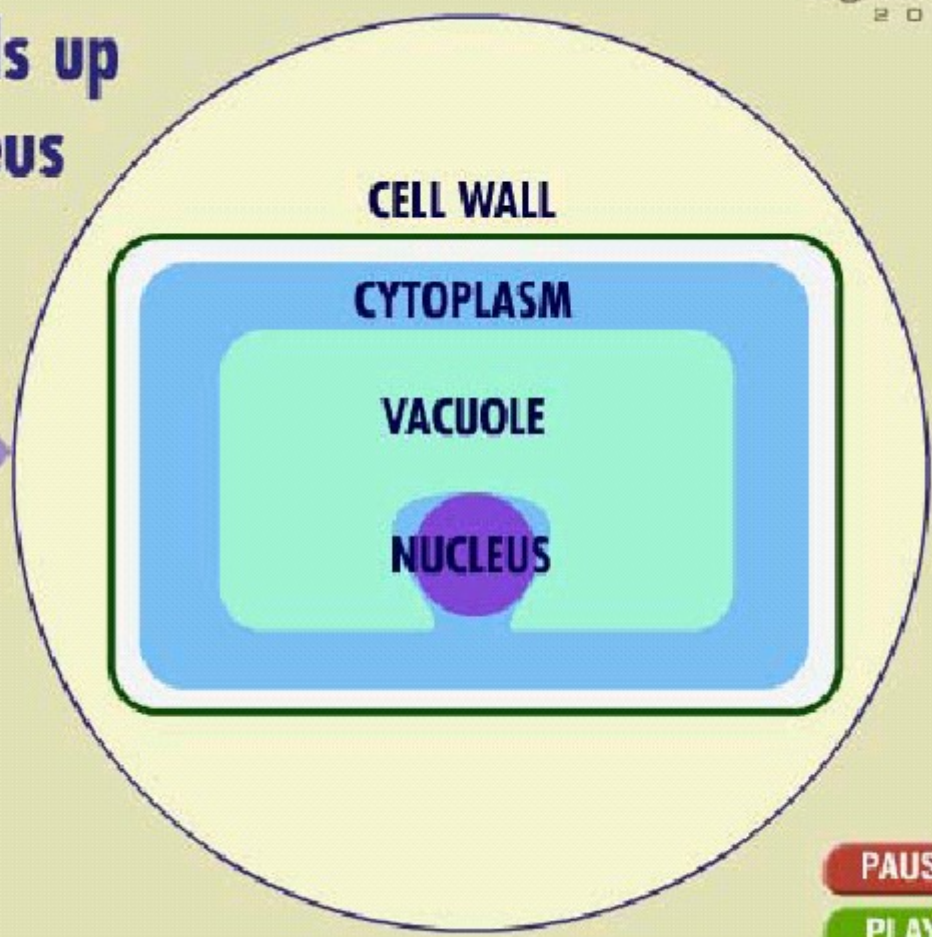
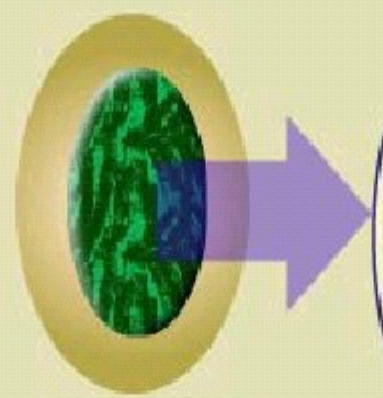


**The DNA-coated particles are released and strike the target tissue.**

PAUSE

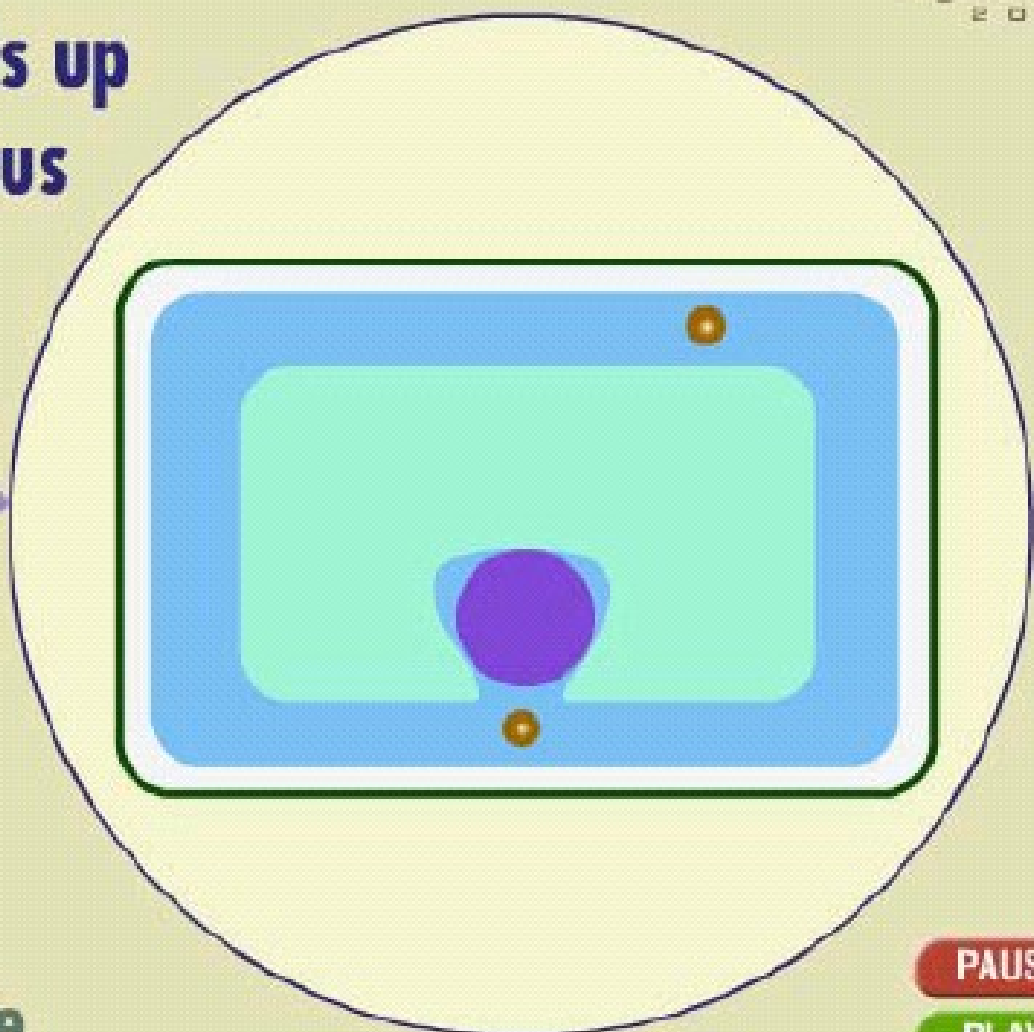
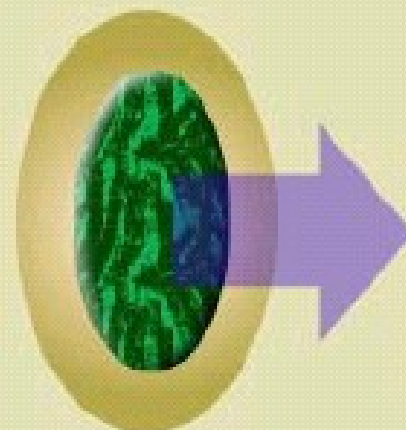
PLAY

# How the DNA ends up in the Cell Nucleus



PAUSE  
PLAY

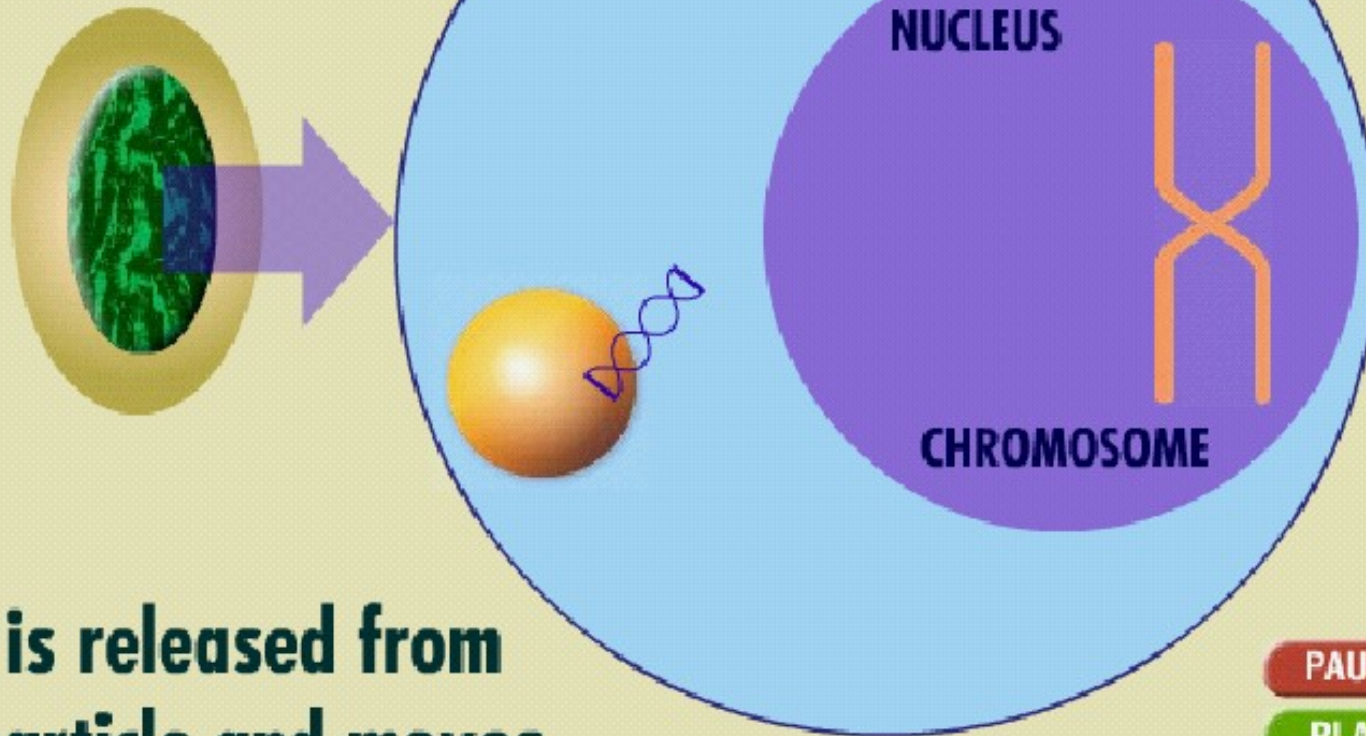
# How the DNA ends up in the Cell Nucleus



Particles enter the cytoplasm of some cells in the target tissue.

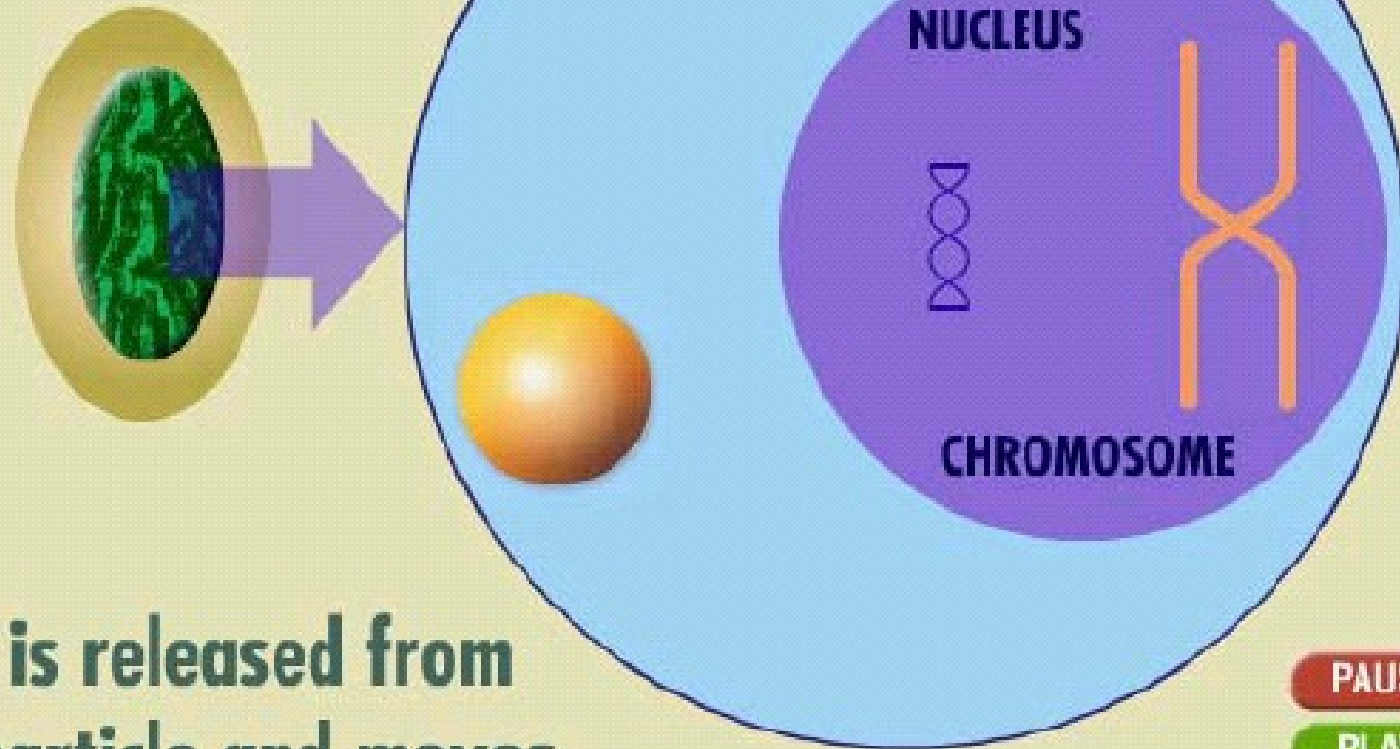
PAUSE  
PLAY

## How the DNA ends up in the Cell Nucleus



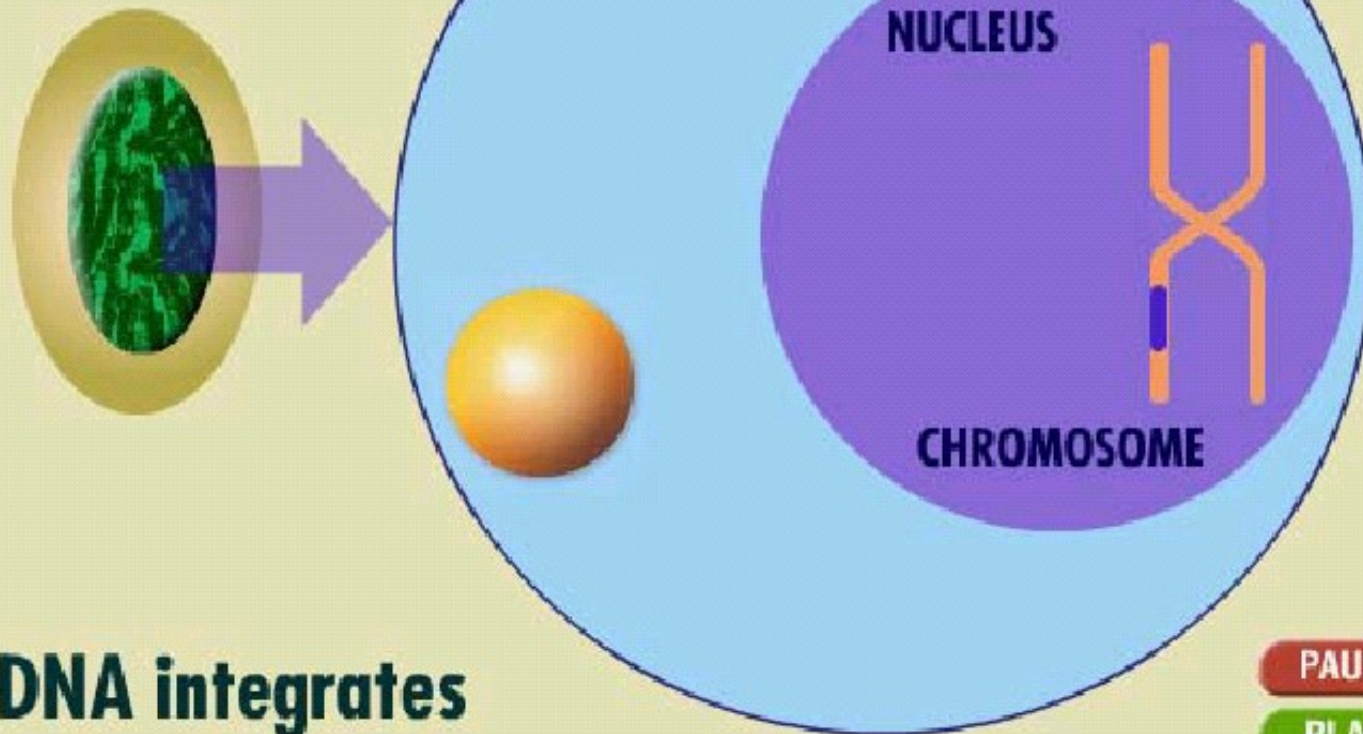
**DNA is released from the particle and moves to the nucleus.**

## How the DNA ends up in the Cell Nucleus



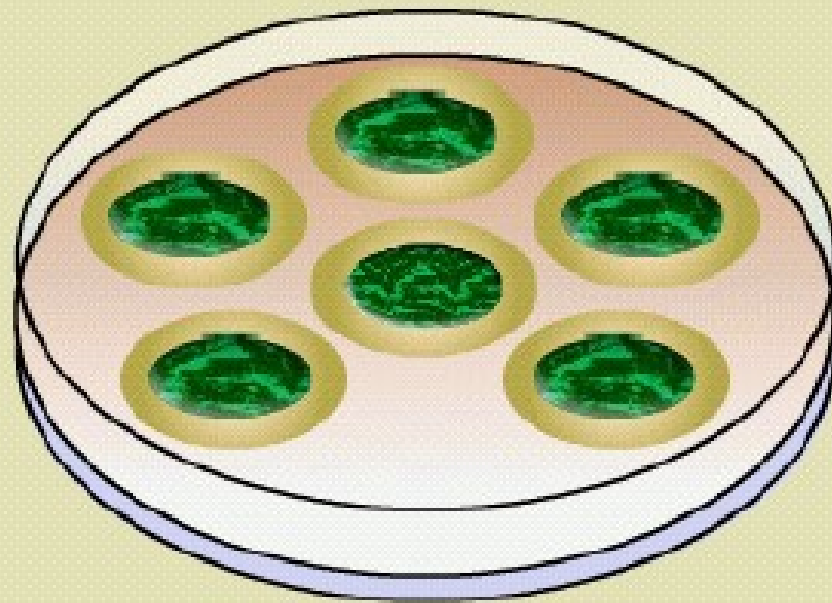
DNA is released from the particle and moves to the nucleus.

## How the DNA ends up in the Cell Nucleus

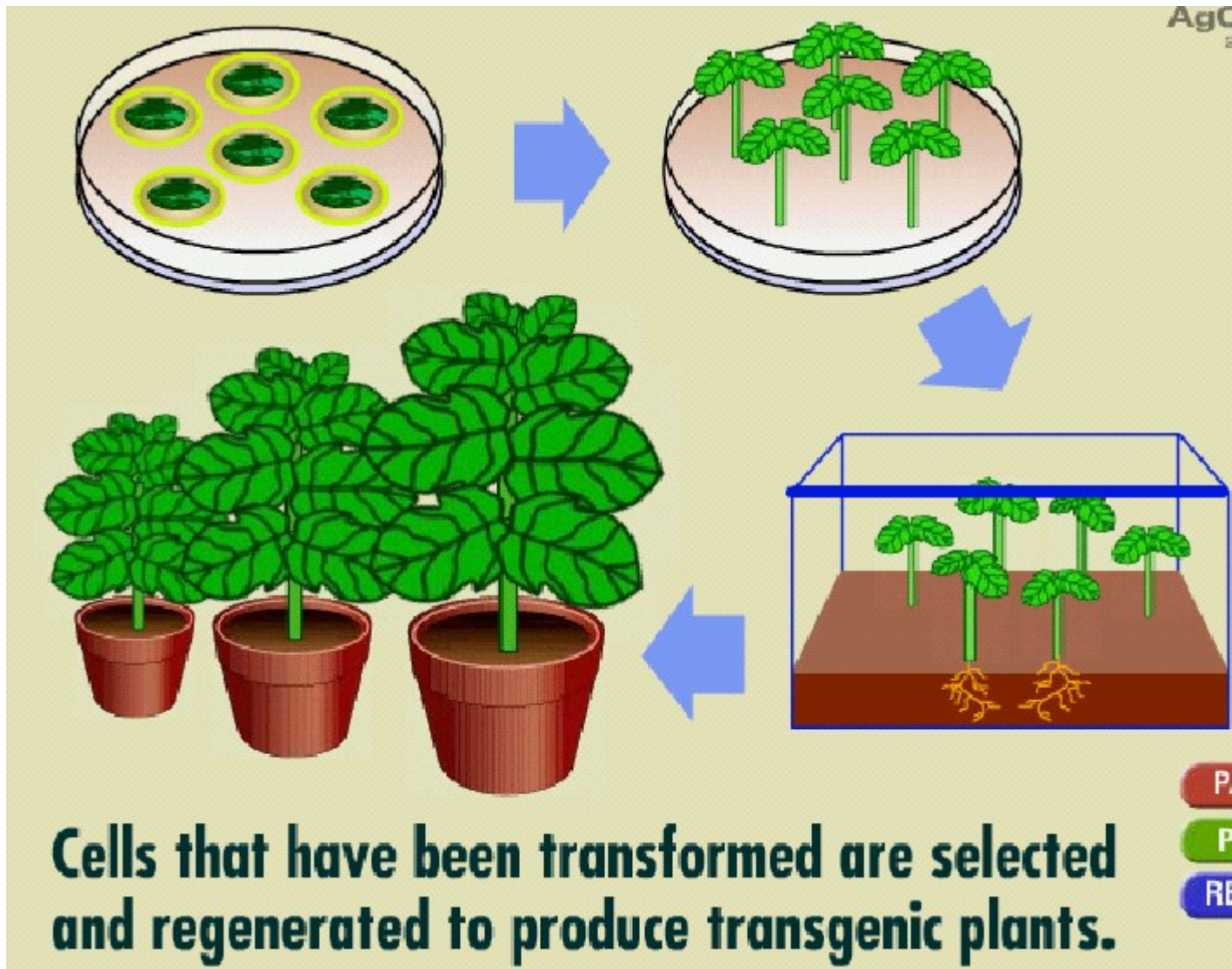


**This DNA integrates  
into a chromosome.**

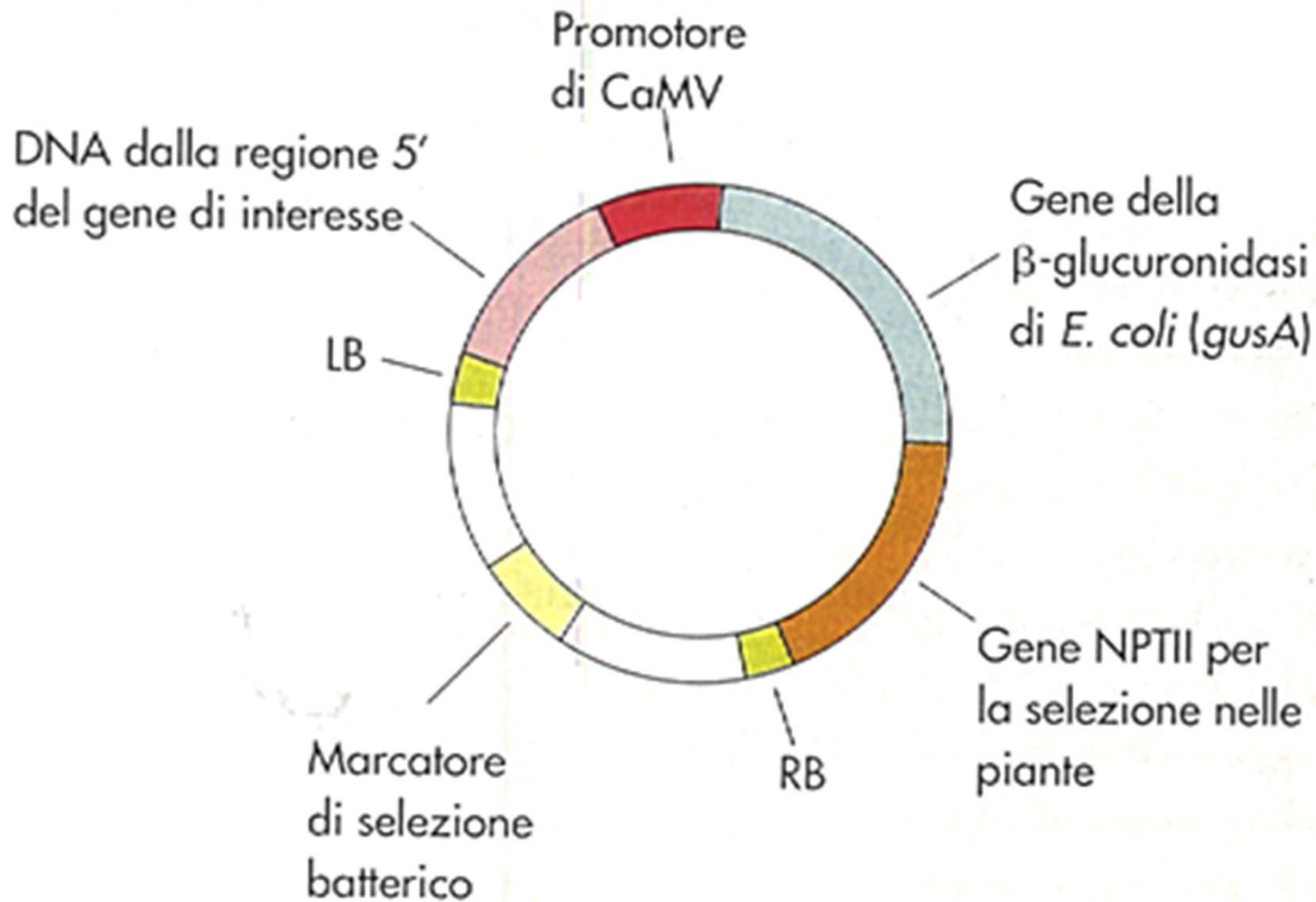




**After bombardment the plant tissue is placed on a growth medium in a petri dish.**



## Analisi dell'espressione genica mediante l'uso di geni reporter



# Le piante sono sensibili a fattori ambientali

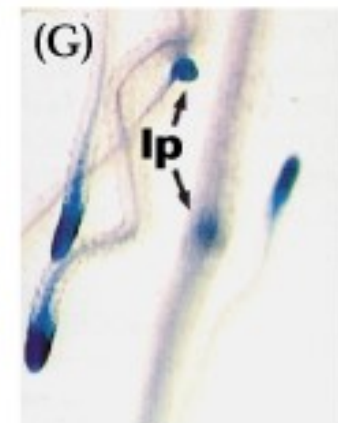
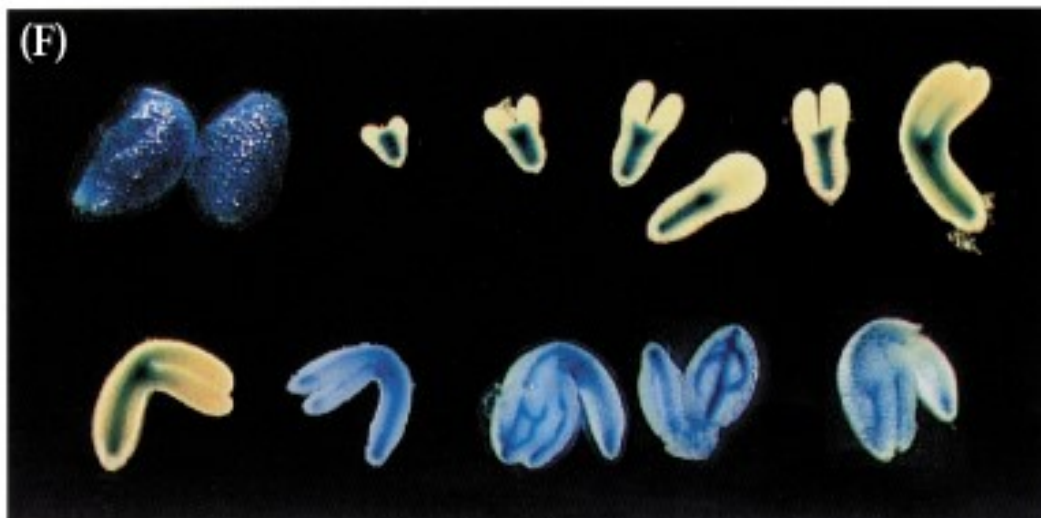
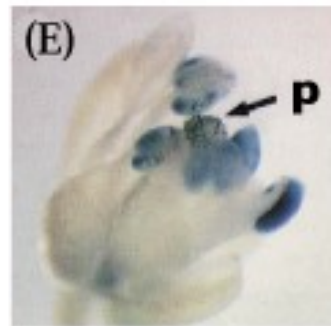
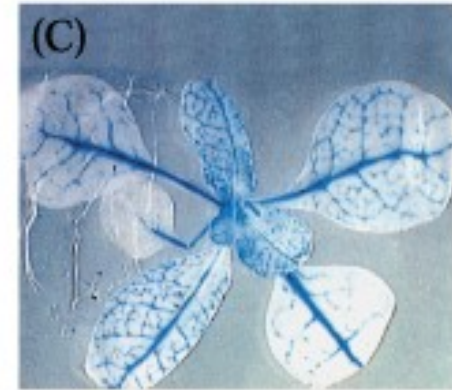
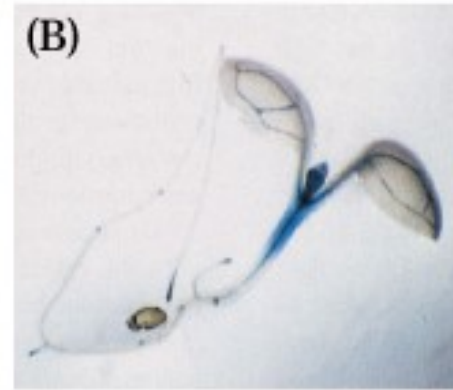
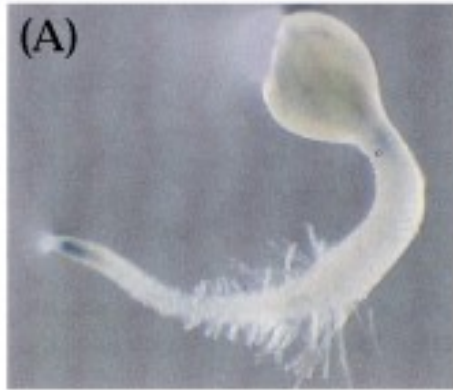
Questi fattori inducono cambiamenti dell'espressione genica (analisi quantitativa e tissutale)

- Geni reporter per analizzare il controllo dell'espressione genica

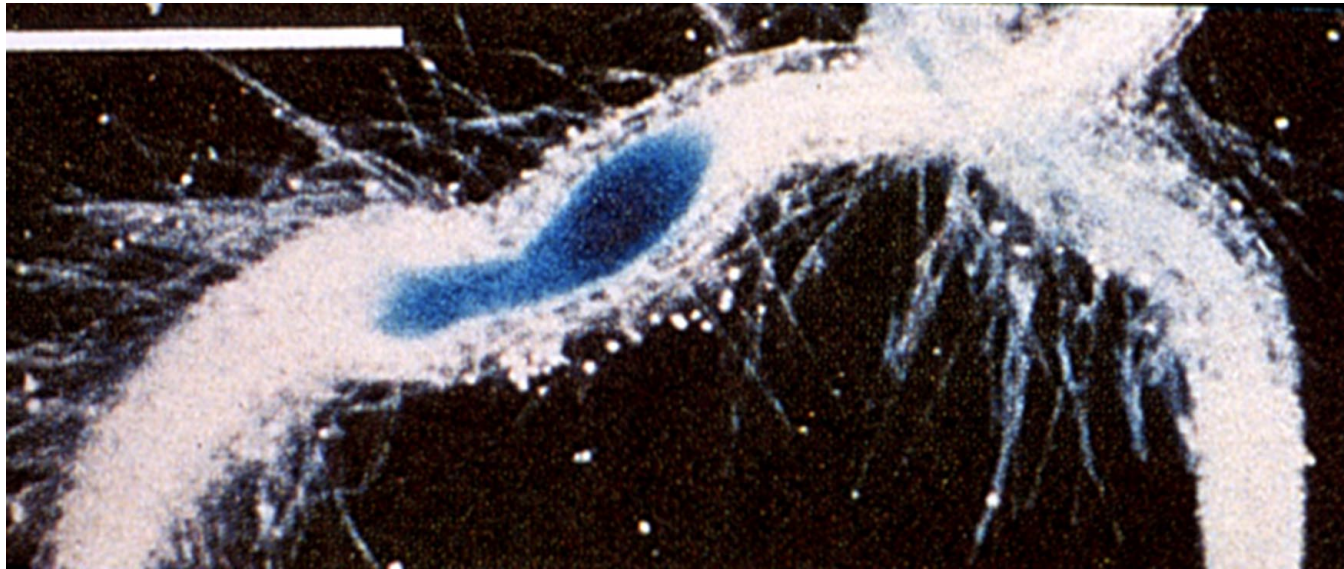


- Gene di E.coli per la  $\beta$ -glucuronidasi (GUS)

La presenza di GUS può essere controllata con un saggio enzimatico a livello tissutale

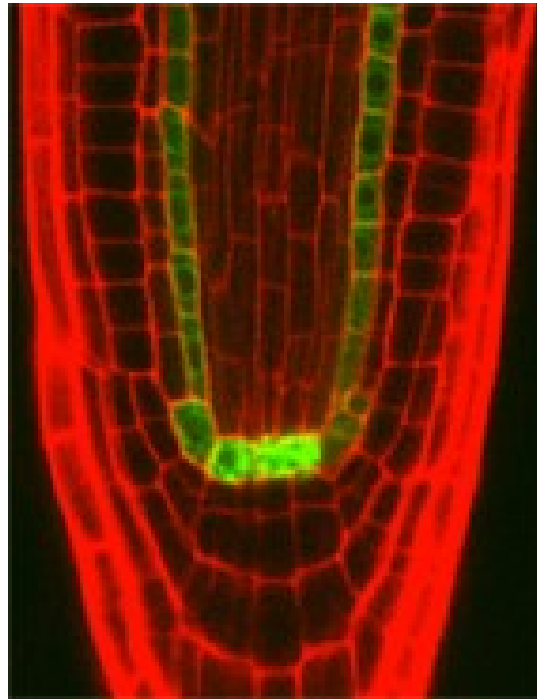


Espressione di un gene reporter quando la pianta è attaccata da nematodi

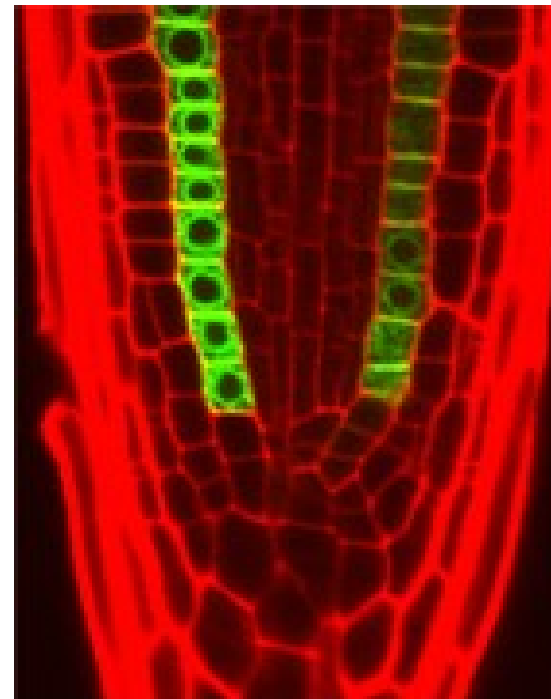


Proteina verde fluorescente ("Green fluorescent protein" o GFP

clonata da una medusa

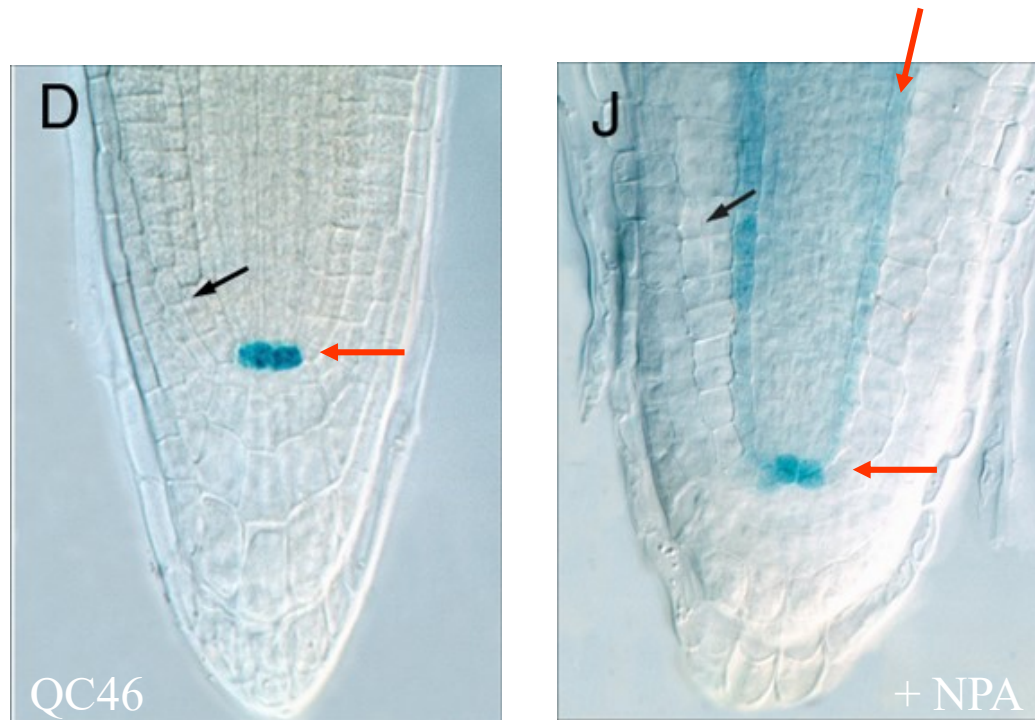


wt / pSCR::GFP



*scr-1* / pSCR::GFP

## Beta-glucuronidasi batterica (*GUS*)







# Trasformazione stabile e trasformazione transiente

**STABILE NUCLEARE:** il transgene si inserisce nel genoma, viene replicato come gene endogeno, trascritto ed espresso come un gene di pianta, e trasmesso alla progenie

**STABILE PLASTIDICA** (la vedremo più avanti)

**TRANSIENTE** : prevede la veicolazione del transgene all'interno della cellula vegetale ma non prevede obbligatoriamente la sua inserzione nel genoma. Non richiede che il transgene venga trasferito alla progenie

## ESPRESSIONE TRANSIENTE

1. prevede la veicolazione del transgene nel nucleo della cellula vegetale ma non prevede obbligatoriamente la sua inserzione nel genoma.
2. Non richiede che il transgene venga trasferito alla progenie

# ESPRESSIONE TRANSIENTE

1. Più veloce di quella stabile
2. Può dare maggiore espressione del transgene
3. Può causare stress ai tessuti

# ESPRESSIONE TRANSIENTE - metodi

1. Espressione in protoplasti (elettroporazione, PEG...)
2. Cannoncino biolistico
3. Microiniezione (poco usata)
4. Espressione mediata da virus
5. Espressione mediata da *Agrobacterium* (agroinfiltration)

## *Agrobacterium* mediated transient expression

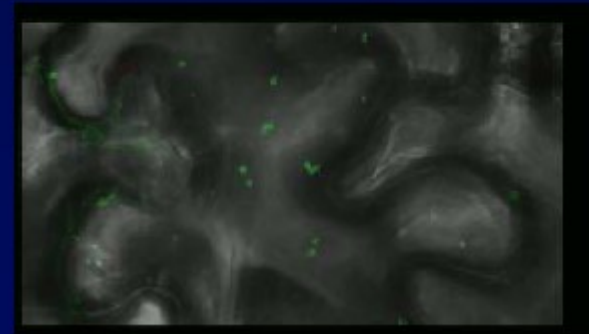
*Agrobacterium tumefaciens*  
preculture  
(28°C)



Bacterial pellet is  
resuspended in  
infiltration medium :  
MES  
glucose  
Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>  
acetosyringone



2-4 days  
(24°C)



Laser scanning confocal microscopy

PREPARAZIONE E TRASFEZIONE  
DI PROTOPLASTI DI  
ARABIDOPSIS

# Critical aspects of isolation

- Remove cell walls without damage to protoplasts
- Stabilize with osmoticum

## Osmoticum

- ❖ **Mannitol generally used for isolation**
- ❖ **Inert**
- ❖ **0.6M - 0.7M**
- ❖ **Sucrose, glucose used as osmoticum for culture**
  - ◆ **Concentration reduced over time**
  - ◆ **Gradual return to normal osmolarity**



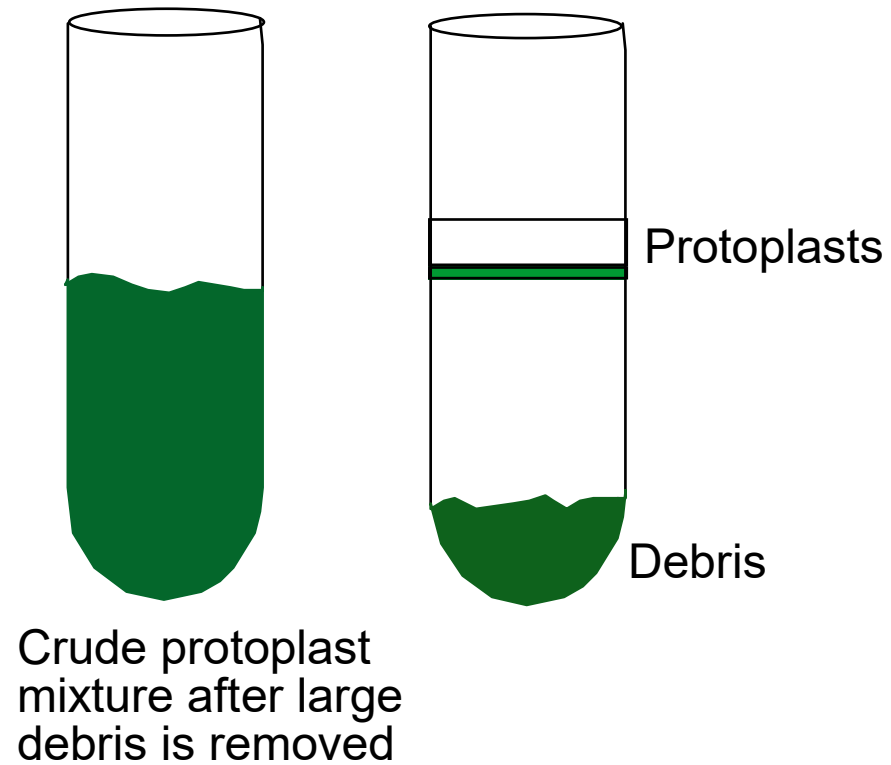
Next step: enzymatic digestion

- Digest middle lamella - pectinase
- Digest cell wall - cellulase, hemicellulase
- Purity of enzymes critical

# Purification of Protoplasts

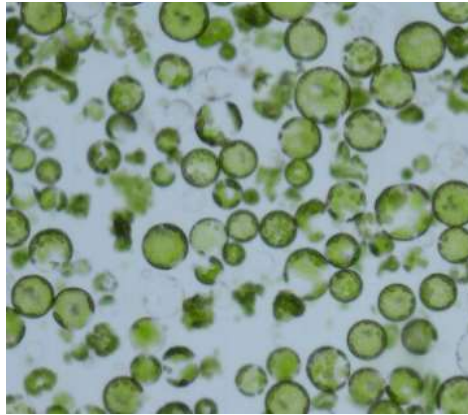
- Filtration through nylon and/or metal screens
- Sizes range from 40 - 100  $\mu\text{m}$  diameter holes
- Glass wool also used for variable sized protoplasts
- Flotation using sucrose gradient

# Purification of Protoplasts: Flotation using sucrose gradient

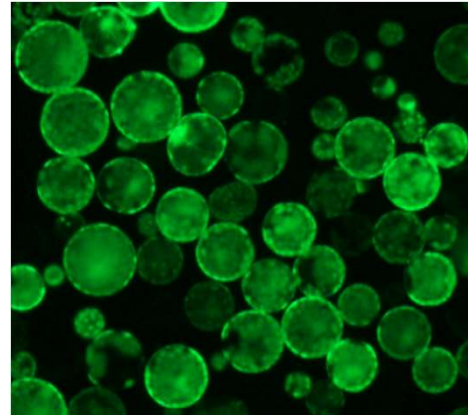


After isolation, protoplasts need to be tested for their **vitality**

Fluorescein diacetate is permeable to plasma membrane and can be hydrolyzed into a fluorescent compound by plant cell esterases.



Bright field



Fluoresceina DiAcetato (FDA)

Only **viable cell** become fluorescent after FDA staining

## Transformation of protoplasts

- Restricted to specific cell types amenable to protoplast isolation, and may differ to parent tissue
- Large amounts of material can be produced for biochemical analysis
- Relatively fast way of testing new constructs (24hr)
- Constructs are smaller (~3-5kb) and easier to manipulate than larger binary vectors (~13-15kb)
- Varying levels of expression (multiple copies of plasmid in each protoplast)

**Now mostly used for transient expression, but you can also regenerate stable transgenic plants**

Luciferase (LUC) and  $\beta$ -glucuronidase (GUS) and Green Fluorescent Protein (GFP) are routinely used as **reporters of gene expression**

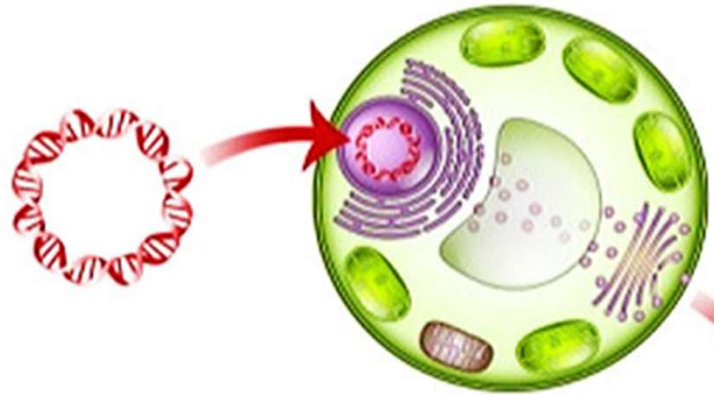


The promoter of the gene of interest is fused with a reporter gene, that allows **quantitative analysis of gene expression**.

**TABLE 1** | List of useful reporter constructs for transient expression in *Arabidopsis* mesophyll protoplast assays.

| Name                | <i>Arabidopsis</i> Biological Resource |                     | Promoter of interest (POI)   | Use                      | References |
|---------------------|--|---------------------|------------------------------|--------------------------|------------|
|                     | GenBank locus                          | Center stock number |                              |                          |            |
| pHBT-sGFP(S65T)-NOS | EF090408                               | CD3-911             | 35S derivative               | Transfection control     | 19         |
| pRD29A-LUC-NOS      | EF090409                               | CD3-912             | At5g52310                    | Abscisic acid response   | 5,13       |
| pAtGH3-LUC-NOS      | EF090410                               | CD3-913             | At2g23710                    | Auxin response           | 5,13       |
| pWRKY29-LUC-NOS     | EF090411                               | CD3-914             | At4g23550                    | Bacterial flg22 response | 15         |
| pGST6-LUC-NOS       | EF090412                               | CD3-915             | At2g47730                    | General stress response  | 5          |
| pHSP18.2-LUC-NOS    | EF090413                               | CD3-916             | At5g59720                    | Heat response            | 13         |
| pARR6-LUC-NOS       | EF090414                               | CD3-917             | At5g62920                    | Cytokinin response       | 13         |
| pGCC1-LUC-NOS       | EF090415                               | CD3-918             | 8xGCC box synthetic promoter | Ethylene response        | 12         |
| pFRK1-LUC-NOS       | EF090416                               | CD3-919             | At2g19190                    | Bacterial flg22 response | 16         |

Isolated protoplast can be transfected with **DNA** or **RNA** using **DNA-PEG (polyethylene glycole)–calcium transfection (1 h for 20 samples)**



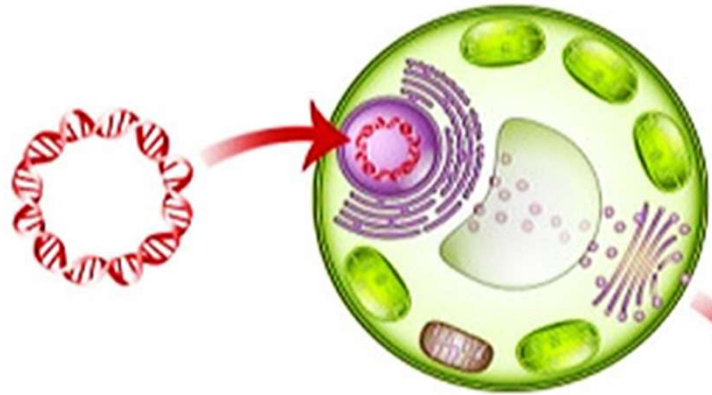
**DIRECT TRANSFORMATION**

# Polyethylene glycol (PEG) mediated transfection

- ✓ Plant protoplast can be transformed with naked DNA by treatment with PEG in the presence of divalent cations e. g., Calcium.
- ✓ PEG and divalent cations destabilize the plasma membrane of the plant protoplast and rendered it permeable to naked DNA.
- ✓ DNA enters the nucleus and may integrate into the host genome.



## DNA-PEG (polyethylene glycole)–calcium transfection (1 h for 20 samples)



The **DNA** (20-40  $\mu\text{g}$  of plasmidic DNA of 5–10 kb in size) is added to the protoplast ( $2 \times 10^4$  protoplasts) in presence of **PEG solution** (20–40% (wt/vol) PEG4000 in ddH<sub>2</sub>O containing 0.2 M mannitol and 100 mM CaCl<sub>2</sub>)

The protoplasts are incubated at room temperature (20–25 C) for the desired period of time (2-24h)

REPORTER ASSAY- Several assays can be carried out using option A (**LUC assay**), B (**GUS assay**) or C (**GFP assay**).

# Advantages and limitations of mesophyll protoplast transient expression systems

## ADVANTAGES

Active and **homogeneous populations** of **differentiated cells**, are amenable for synchronous pharmacological and biochemical treatments

Easier **following** of **gene products** tagged with an epitope and GFP in transiently transformed plant cells

**High transformation efficiency** allows co-transfection with **multiple plasmids** expressing different constructs

Studies in protoplast systems can provide a basis for whole plant analysis of **tissue-** or **cell type-specific pathways** in knockout mutants and transgenic plants

The experiments do not require sterile techniques

## LIMITATIONS

The protoplast isolation requires training, lots of patience, creativity and determination. Establishment of new physiological assays is empirical and can be time-consuming

Cell walls, plasmodesmata, and cell-cell interactions are lost or interrupted

It is presently not possible to isolate active protoplasts from each plant cell type

Polyethylene glycol (PEG) mediated transfection of protoplasts for generating stably transformed plants:

**Disadvantage and advantages:**

- Regeneration of fertile plants from protoplasts is problematic for some species.
- The DNA used for transformation is also susceptible to degradation and rearrangement.
- Despite the limitations, the technique have the advantages and protoplast can isolated and transformed in number of plants species.

## Protoplast transformation

- The disadvantages of protoplast transformation are:
  - regeneration can be problematic.
  - transient expression level is low
  - viability of protoplasts are strongly reduced after transformation procedures were performed

## *In vitro* regeneration

- The requirement of *in vitro* regeneration for protoplast transformation may lead to somaclonal changes, which can be rather problematic.

# Electroporation

- It can be used to deliver DNA into plant cells and protoplasts.
- The genes of interest require plant regulatory sequence.
- Plant materials is incubated in a buffer solution containing DNA and subjected to high-voltage electric pulse.
- The DNA then migrates through high-voltage-induced pores in the plasma membrane and integrates into the genome.
- It can be used to transform all the major cereals particularly rice, wheat, maize.
- **Advantages and disadvantages:**
- Both intact cells and tissue can be transformed.
- The efficiency of transformation depends upon the plant materials, electroporation and tissue treatment conditions used for transformation.
- ~40 to 50% incubated cells receive DNA
- ~50% of the transformed cells can survive

## Microinjection

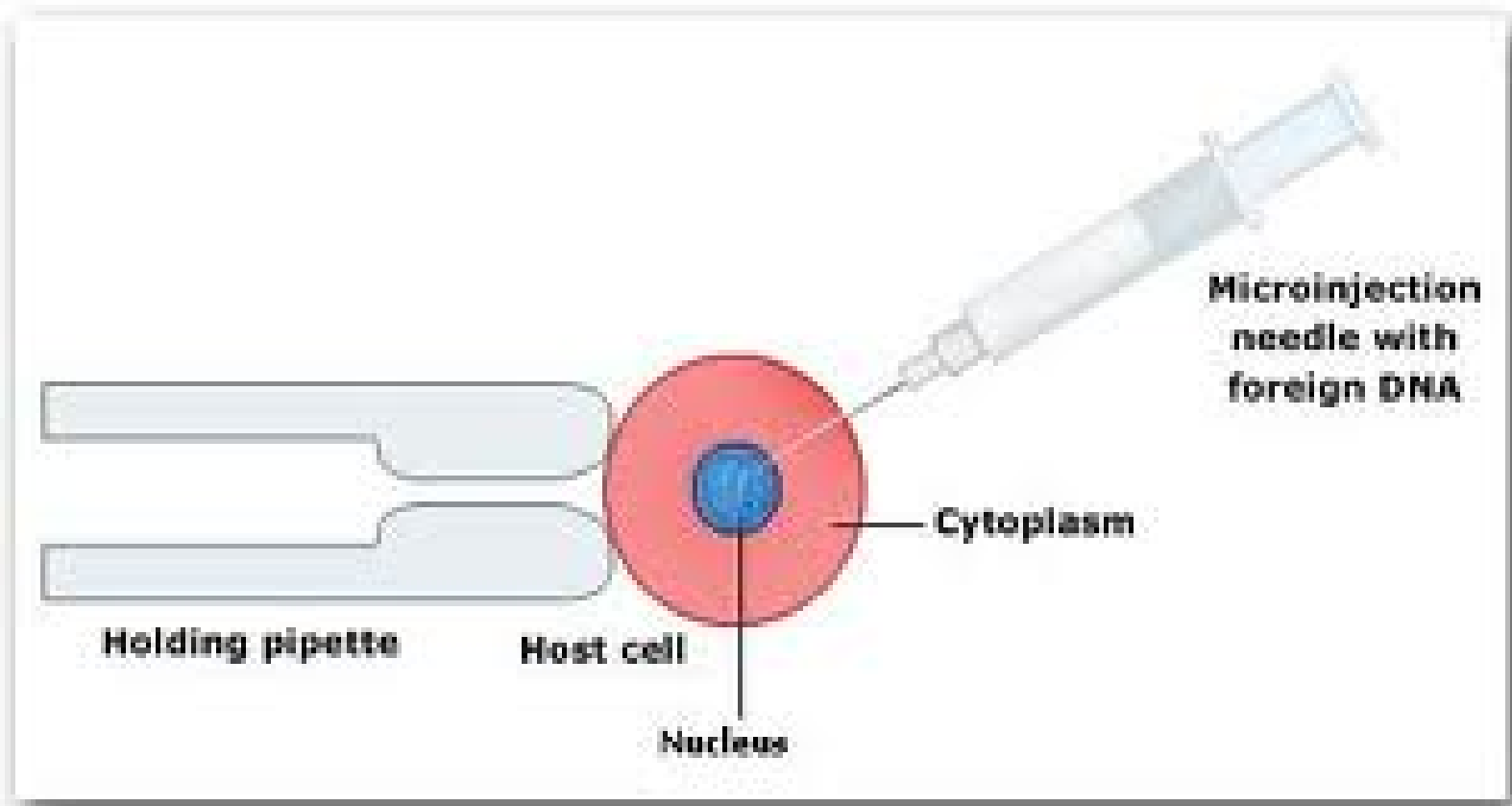
Glass pipette introduces material into target cell

- Microinjection into specific cell types / organelles (no good for 'bucket' science)
- Technically demanding and can cause stress (to operator and plant!)
- Used in whole tissues and cell culture
- Microinject DNA, fluorochromes, protein, antibodies.
- Constructs are smaller (~3-5kb) and easier to manipulate than larger binary vectors (~13-15kb)
- Rapid detection

# Microinjection

- Microinjection techniques for plant protoplasts utilize a holding pipette for immobilizing the protoplast while an injection pipette is utilized to inject the macromolecule.
- In order to manipulate the protoplasts without damage, the protoplasts are cultured for from about 1 to 5 days before the injection is performed to allow for partial regeneration of the cell wall.
- It was found that injection through the partially regenerated cell wall could still be accomplished and particular compartments of the cell could be targeted.
- The methods are particularly useful for transformation of plant protoplasts with exogenous genes.





- **Microinjection**

- Uses fine glass needles to inject the foreign DNA directly into the host cell
- Developed to inject DNA into protoplasts, cultured embryonic cell suspensions and multicellular structures
- Time consuming

# **ESPRESSIONE TRANSIENTE MEDIATA DA VIRUS**

# Viral Genome Structure and Function

- Plant viral genomes very small in comparison to genomes of other microbes
  - only about 3,500 - 20,000 nucleotides (versus  $10^7$  to  $10^9$  nucleotides for most other microbes)
- Genomes contain coding information for proteins required for virus multiplication
  - genome encodes from ~3-15 distinct proteins (many only encode ~4 -8)
  - (more details see later)
- Genomes contain regulatory sequences
  - promoters for RNA replication, translation signals, genome encapsidation signals

# Proteins commonly encoded by plant viruses

- **Nucleic acid polymerase**
  - either an RNA-dependent RNA polymerase for making RNA copies of genome (see slide on replication of RNA genome) or
  - DNA-dependent DNA polymerase
  - RNA-dependent DNA polymerase
- **Helicase**
  - Unwinds double-stranded RNA intermediate during viral RNA replication
- **Movement protein**
  - Assists in cell-to-cell movement of virus (see slide on virus movement strategies)
- **Capsid protein**
  - Protects viral genome from host nucleases
  - Assists in vector transmission

## (Proteins commonly encoded by plant viruses-cont.)

- **Protease**
  - Cleaves viral proteins into smaller functional protein units
- **Transmission protein**
  - Helps virus attach to vector for transmission to other plants
- **Suppressor of gene silencing**
  - Suppresses host defense response (more later)

# Stages of Plant Virus Multiplication Cycle

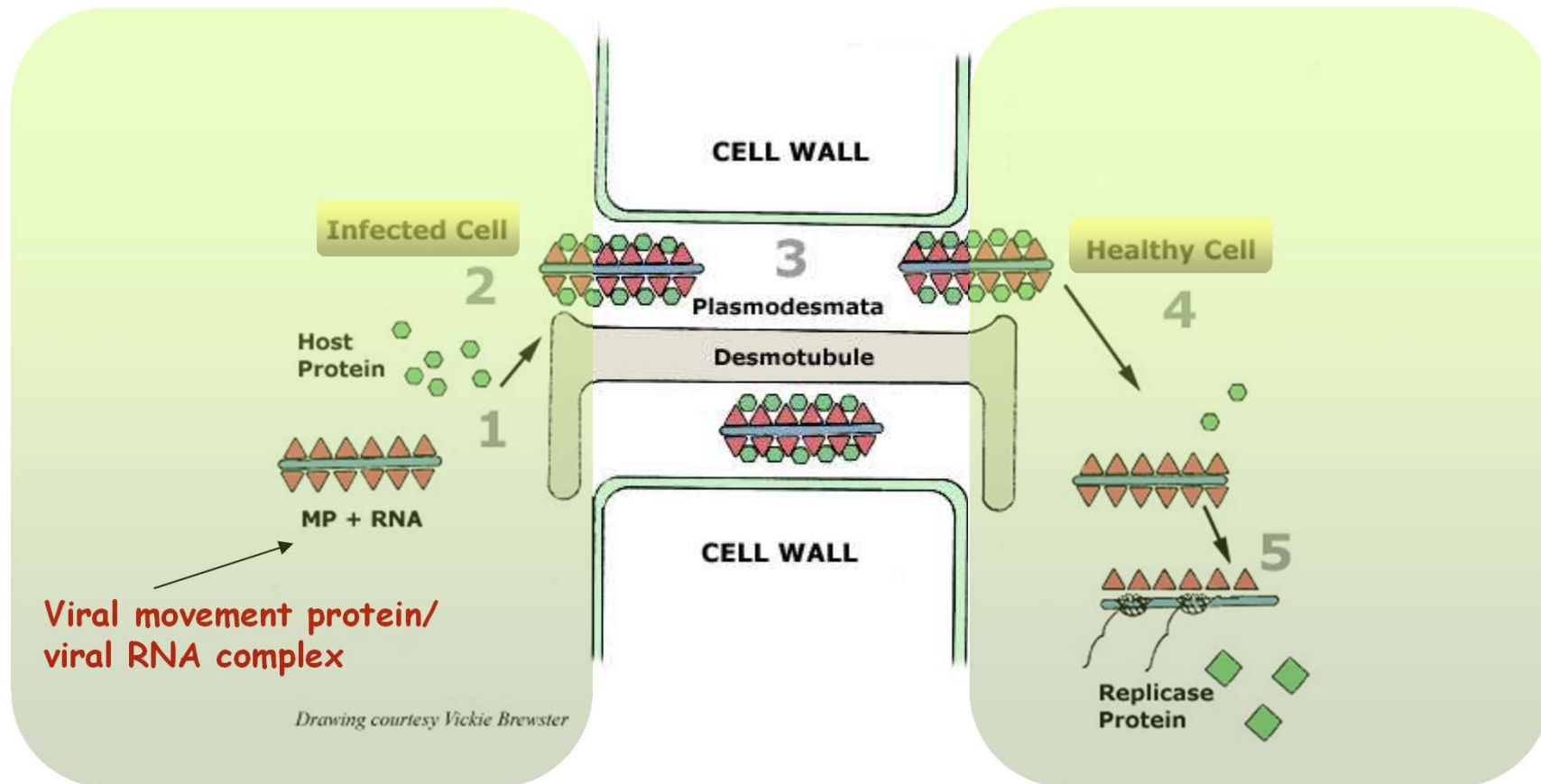
- **Entry** (virus gets into plant cell)
- **Uncoating** (releases viral RNA)
- **RNA translation** (to synthesize components of replicase)
- **RNA replication** (makes new viral RNA)
- **More RNA translation** (makes more protein)
- **Virus particle assembly** (new viral RNA + new coat protein assemble to make new virus particles)
- **Spread:**
  - Cell-to-cell movement of viral RNA or assembled virus particles
  - Movement of virus to other plant parts (leaves, stems, etc.)
- **Transmission to a new host** (occurs via specific vectors like aphids, nematodes or fungi)

# Virus Movement

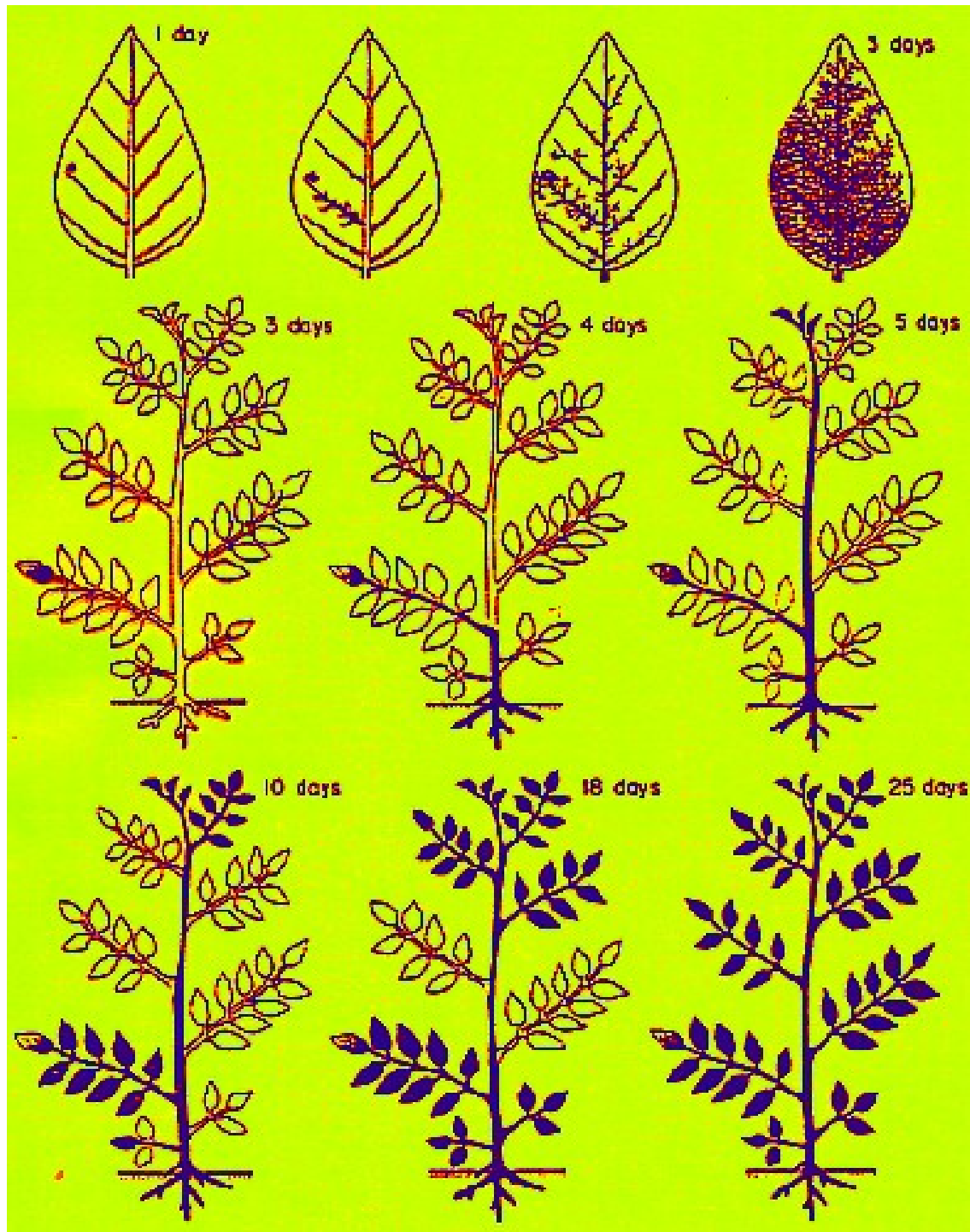
- **Cell-to-cell movement (slow):**
  - through plasmodesmata
  - 1 mm/day (8-10 cells)
- **Long distance movement (rapid):**
  - through phloem to growing regions of leaves



# Cell-to-Cell Movement of TMV



1. Movement protein (MP) binds to the viral RNA
2. Host proteins may also be in the MP-complex
3. The MP-complex then moves from cell-to-cell through the plasmodesmata (junctions between plant cells)
4. When the complex enters new cell, viral RNA is released.
5. Viral RNA is then translated on host ribosomes and cycle repeats



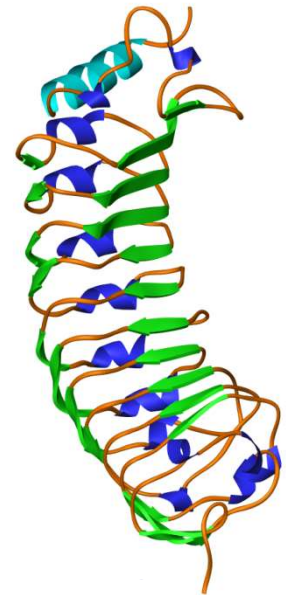
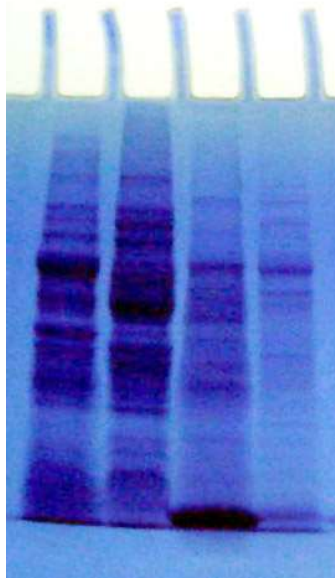
## Long distance movement

- usually requires virus particles
- Virus particles move in phloem
- requires ability of virus to overcome host defenses
- note direction of movement beginning from inoculated leaf

Per l'espressione di proteine eterologhe si infettano piante di *Nicotiana benthamiana* di circa 6 settimane con il DNA del vettore virale pPVX 201 contenente il gene di interesse (Baulcombe *et al.*, 1995). Due foglie di ogni pianta vengono inoculate strofinando la superficie di ciascuna foglia con 20 microg di DNA in 20 ml di una miscela di inoculazione: glicina 25 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 9,2 15 mM, bentonite 0,5% e celite 0,5%. Dopo circa due settimane dall'inoculo vengono prelevate dalle piante le foglie che mostrano i sintomi dell'infezione virale.



Transient expression using a viral vector  
Protein purification and analysis



r

**A**

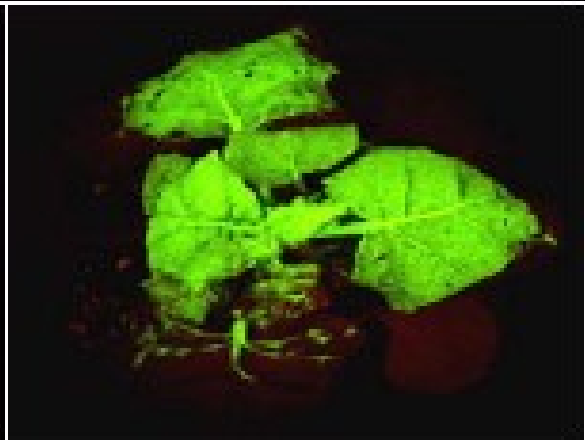


**B**



**A) *N. benthamiana* (mock)**

**B) PVX-infected *N. benthamiana***



**UV Light**

## Features of Viral Expression

- **Speed** Production cycle is 2-3 weeks duration (indoors)
  - No plant breeding required
- **Copy Number** Tens of thousands of copies of transcript per cell
  - Chloroplast transformation: 10,000 cpy/cell
  - Nuclear transformation: 1-2 cpy/cell
- **Purification** Product can accumulate in plant cell compartments, or on the vector itself
  - More flexible extraction/purification options

## Features of Viral Expression

- **Speed** Production cycle is 2-3 weeks duration (indoors)
  - No plant breeding required
- **Copy Number** Tens of thousands of copies of transcript per cell
  - Chloroplast transformation: 10,000 cpy/cell
  - Nuclear transformation: 1-2 cpy/cell
- **Purification** Product can accumulate in plant cell compartments, or on the vector itself
  - More flexible extraction/purification options



## Features of Viral Expression (continued)

- **Containment** TMV viral vectors are not transmissible by
  - Pollen
  - Seed
  - Insect/arthropod vectors

Viral vectors are not persistent in soil

Host plants used are *Nicotiana* species

- Not food or feed crops
- Environmental, food/feed contamination are not issues

# Molecular characterization of transgenic plants (starting from T1 plants!!)

- **Semiquantitative RT-PCR**- Simplest and fastest method.
- **Western Blot (if you have an antibody)**- Confirms presence of the **PROTEIN** produced from the inserted transgene of interest.
- **Biochemical assays**, with enzymes or inhibitors
- **qRT-PCR**- Provides a relative expression level for the gene of interest— (more expensive)
  
- **Southern Blot**- Confirms insertion of the tDNA into the genomic **DNA** of the target organism, as well as **provides insertion copy number.**