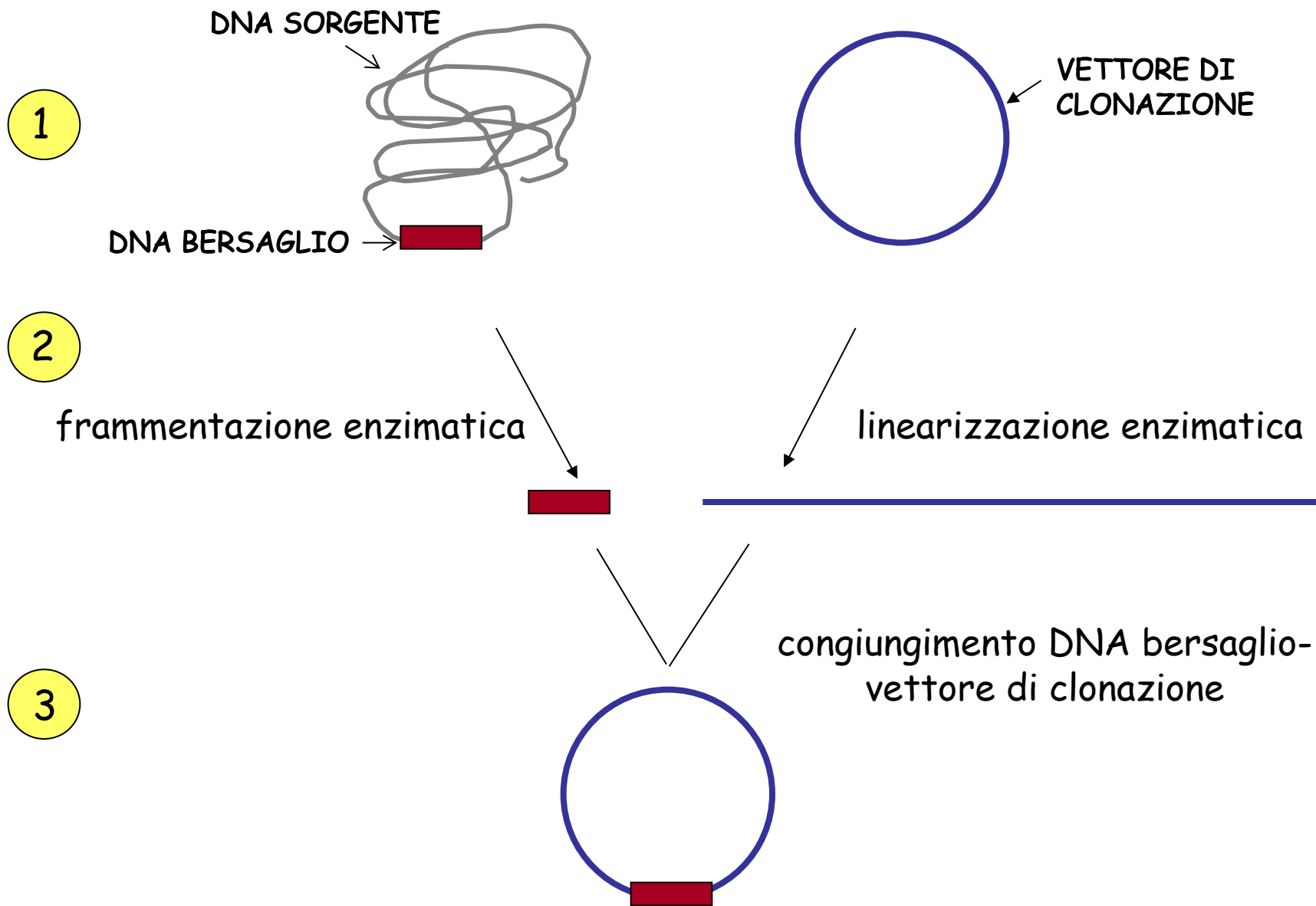


La trasformazione genetica delle piante

La tecnologia per trasformare il genoma delle specie vegetali è resa possibile (a) dall'impiego dell'ingegneria genetica e (b) dalla disponibilità di protocolli di rigenerazione «in vitro» delle piante.

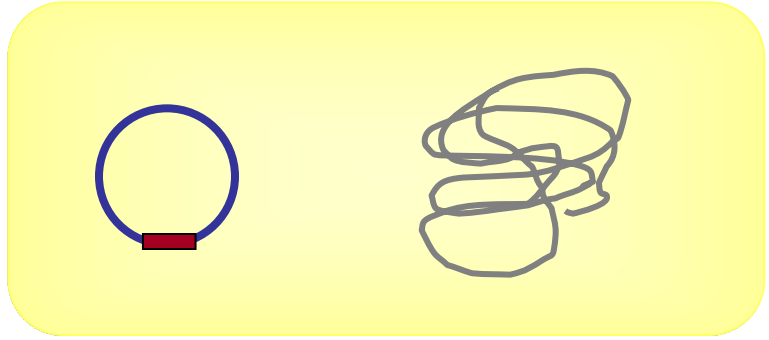
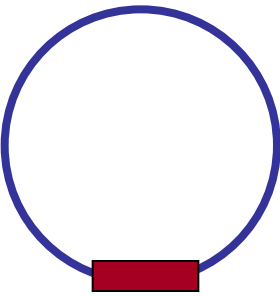
**(a) LA TECNOLOGIA del
DNA RICOMBINANTE o
CLONAGGIO GENICO**

Rappresentazione schematica del clonaggio (I)

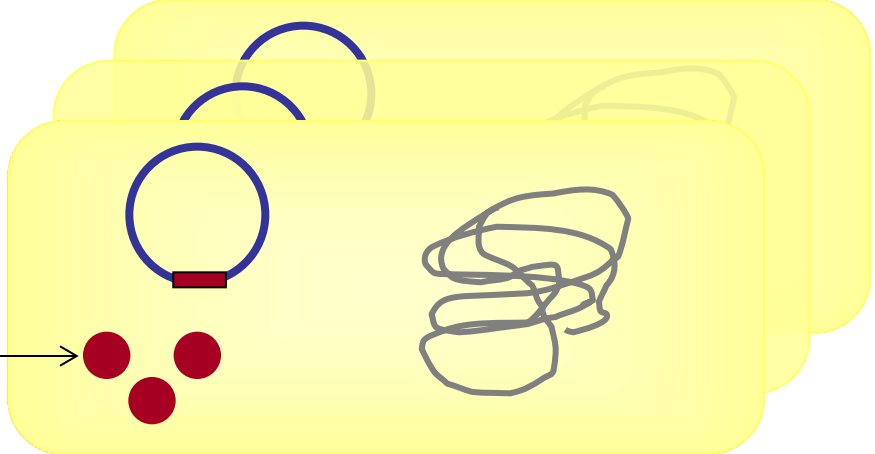
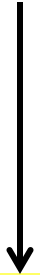


introduzione del DNA nella
cellula ospite (trasformazione) e
isolamento delle cellule con il
gene clonato

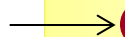
cellula ospite



Produzione della
proteina
dal gene clonato

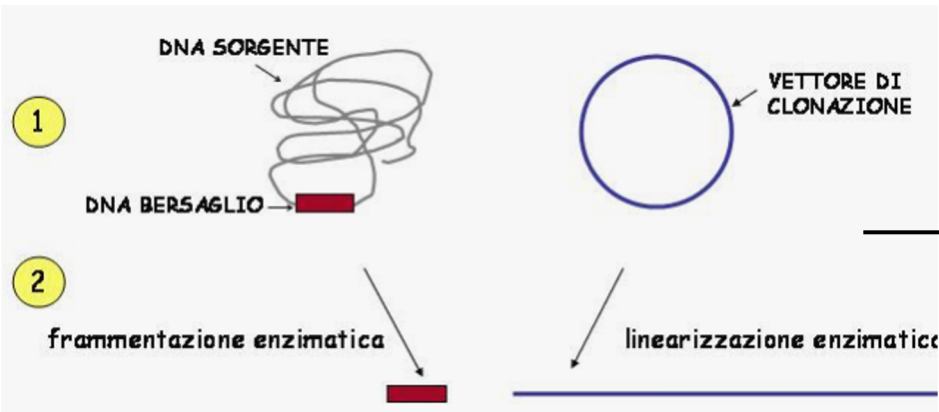


proteina codificata
dal gene clonato



tutto ciò è possibile... grazie alla scoperta delle endonucleasi di restrizione

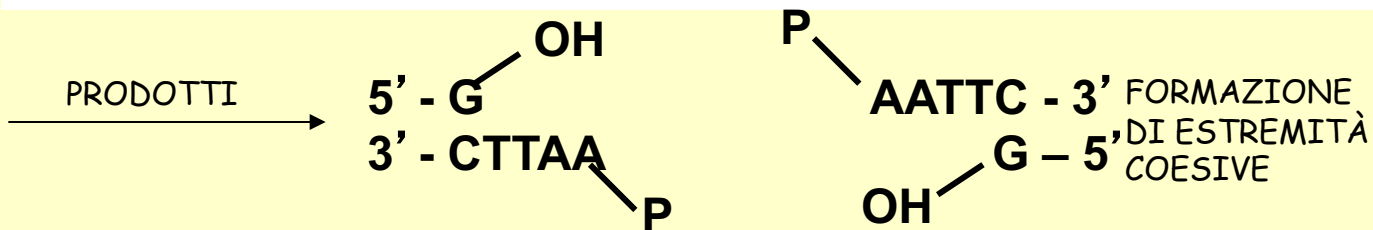
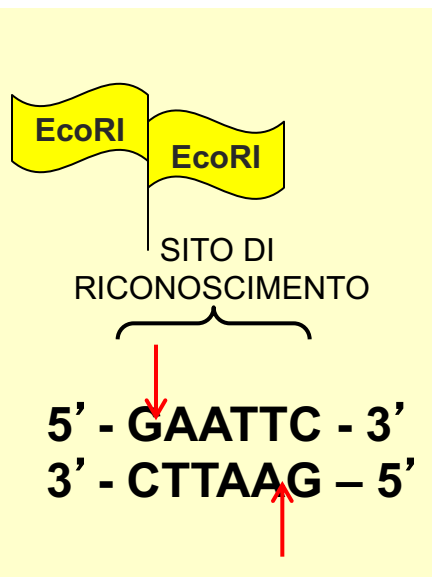
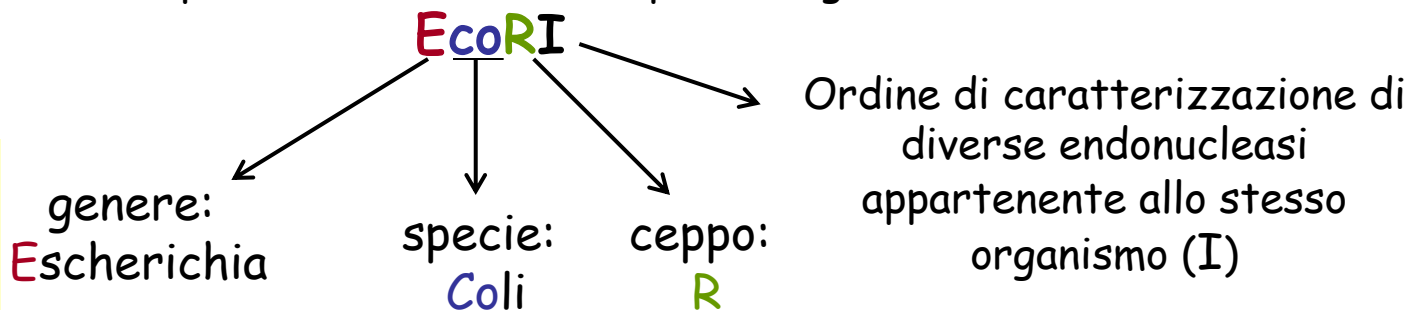
Le Endonucleasi di Restrizione (I)



Enzimi batterici: endonucleasi di TIPO II:

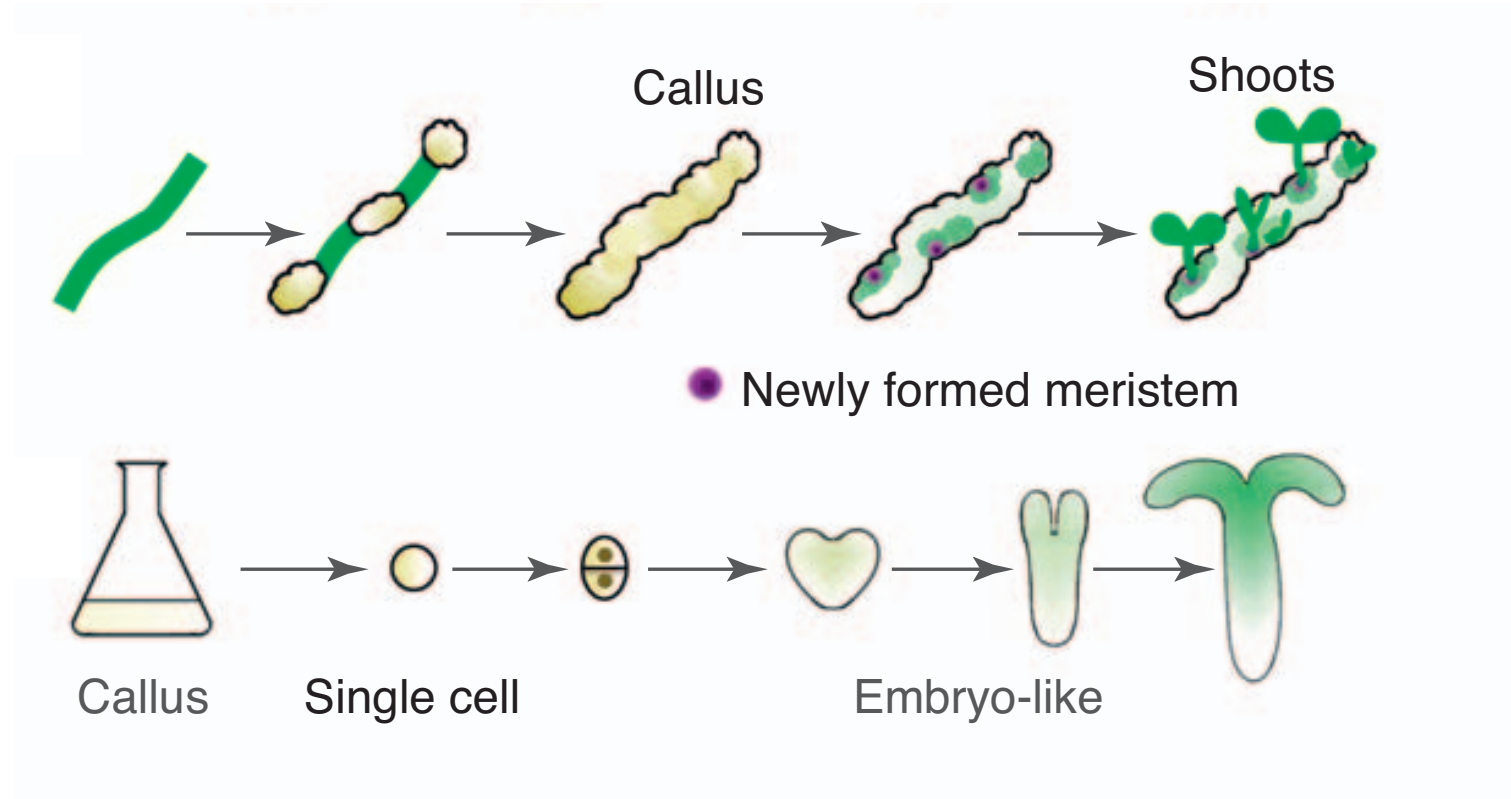
- Riconoscono e tagliano corte sequenze di DNA (4-8bp);
- le sequenze riconosciute sono palindromiche, cioè risultano uguali se lette su ogni filamento nella stessa direzione
- il taglio produce estremità piatte o coesive

Esempio di una delle prime endonucleasi di tipo II meglio caratterizzate:



(b) Gli espianti vegetali, che contengono cellule meristematiche, sono in grado di rigenerare nuove plantule quando coltivati “in vitro”

Espianti di tessuti vegetali possono essere coltivati «in vitro» per indurre le cellule meristematiche a rigenerare nuovi germogli



La rigenerazione in vitro

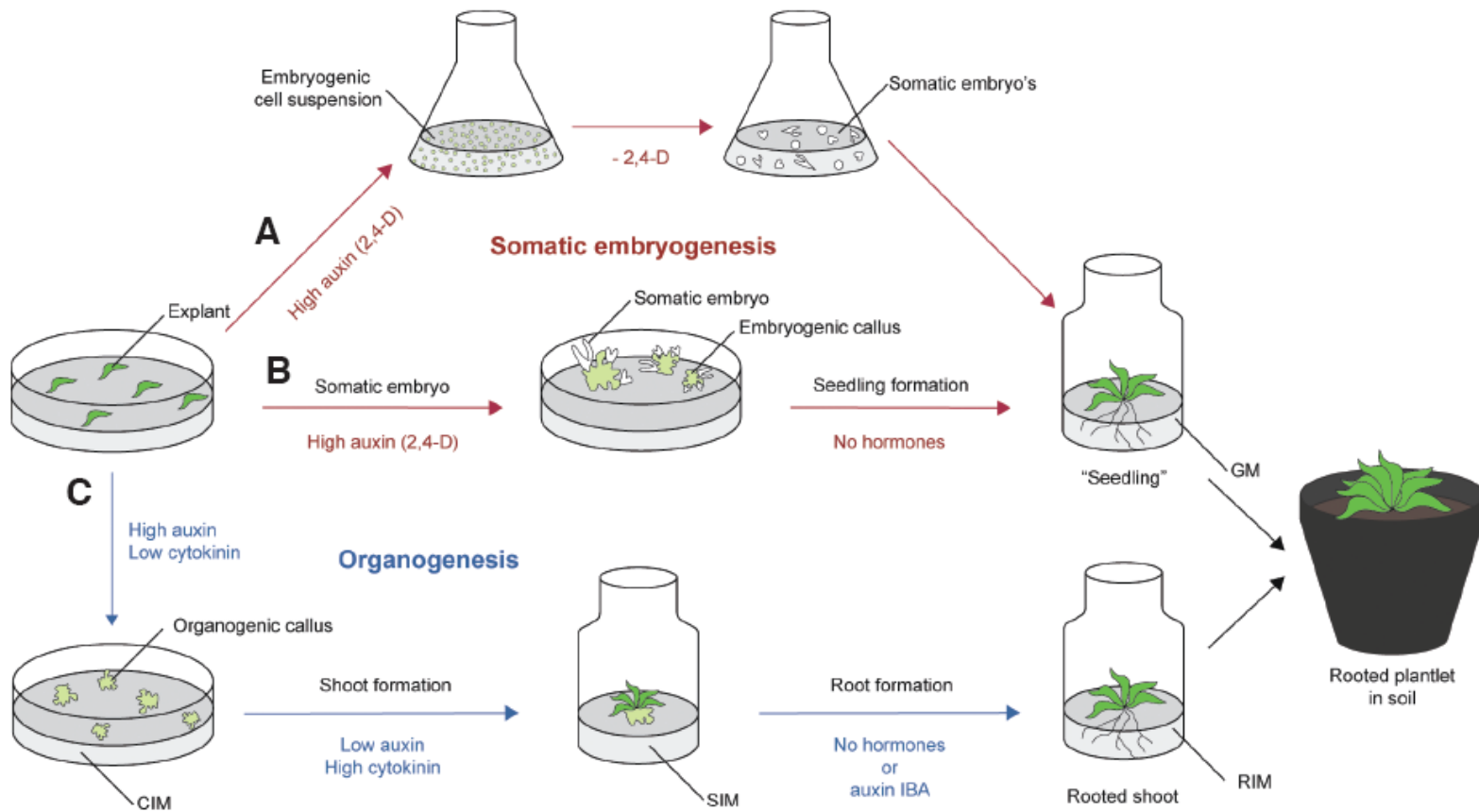
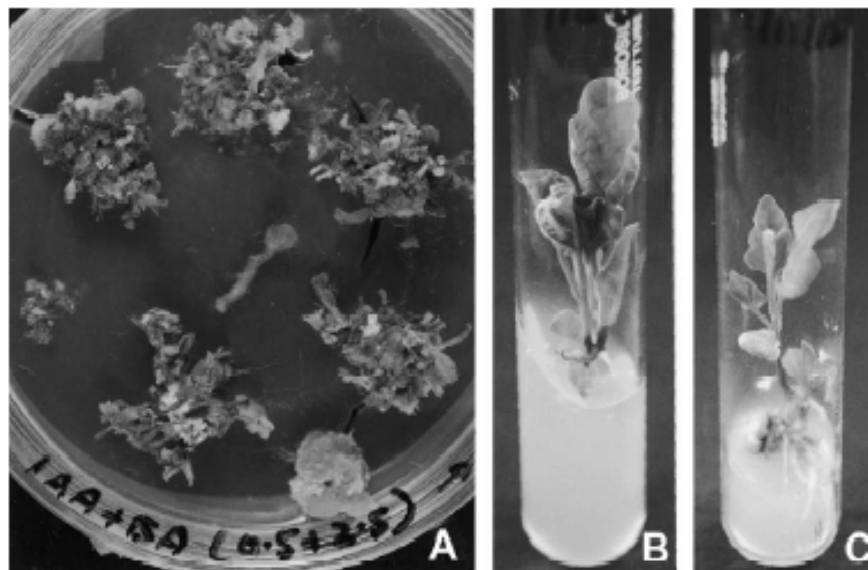
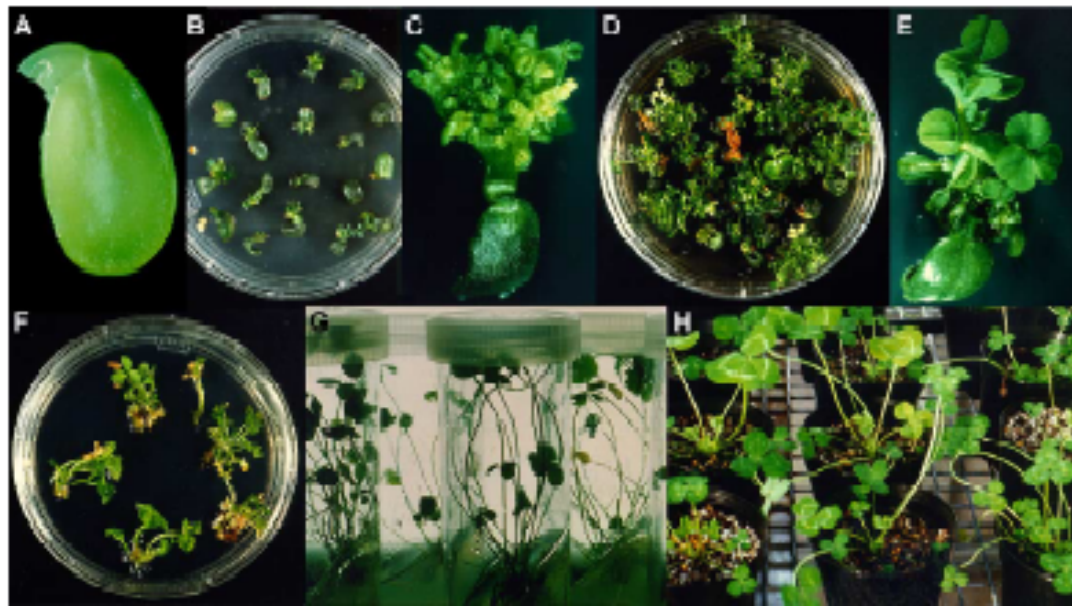
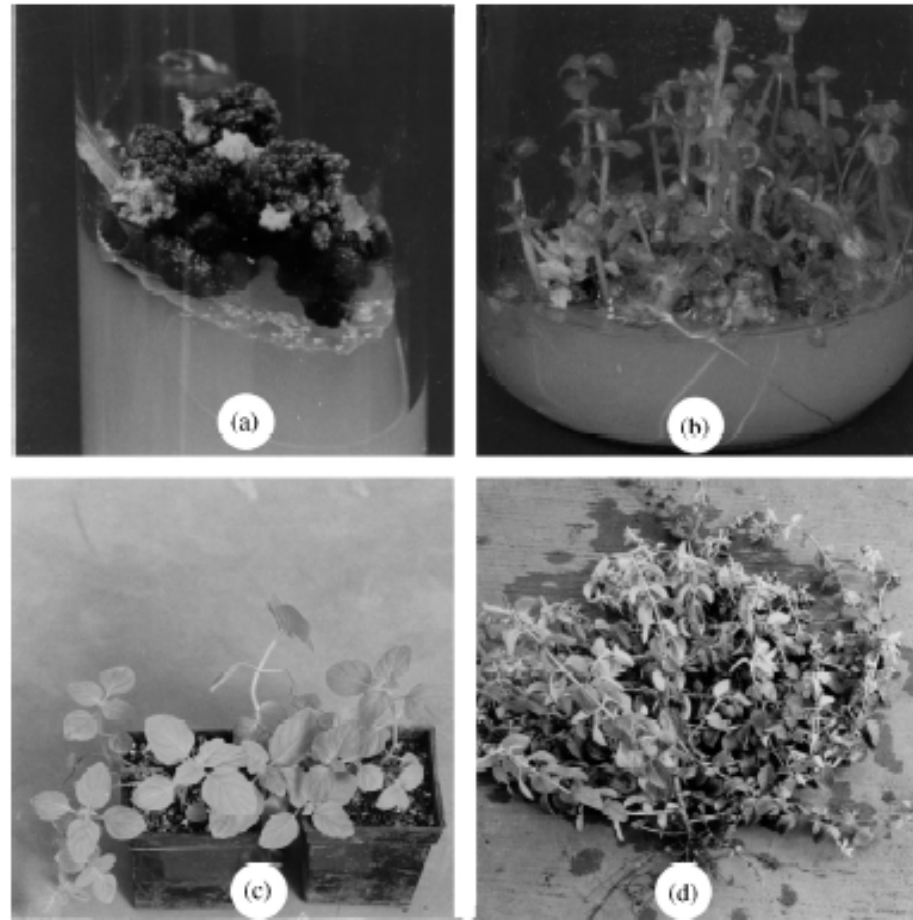
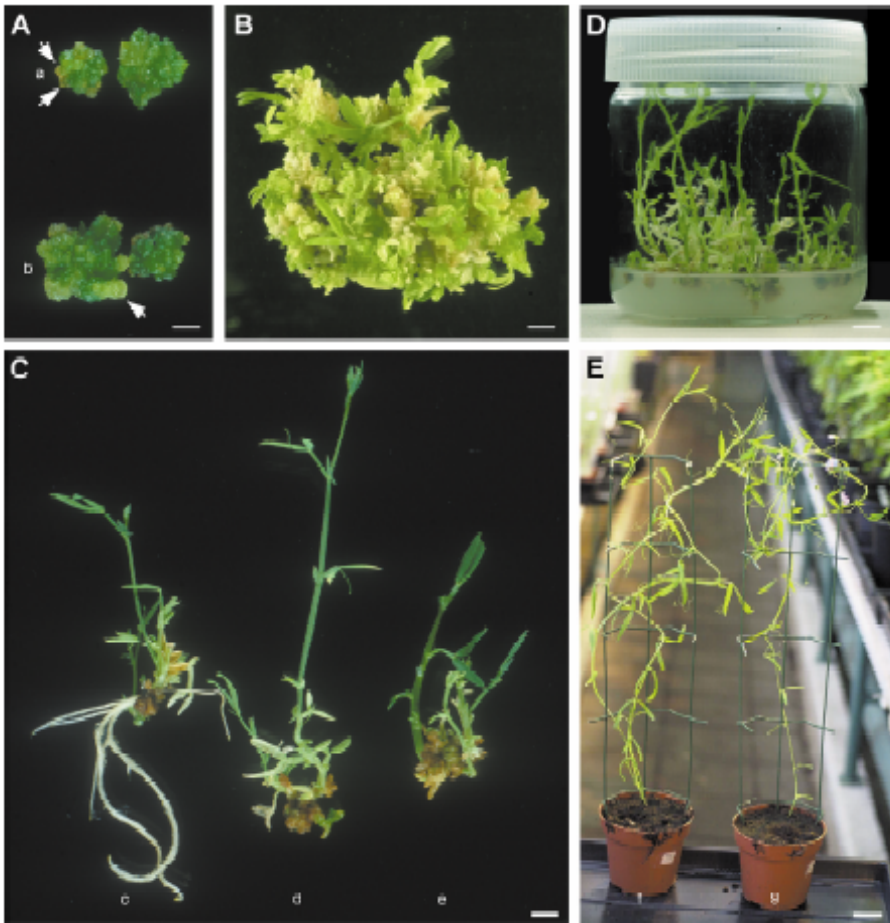


Fig. 1. Somatic embryogenesis versus shoot regeneration. (A) Somatic embryogenesis through embryogenic cell suspension cultures. (B) Somatic embryogenesis through embryogenic callus cultures. (C) Shoot regeneration through organogenesis.

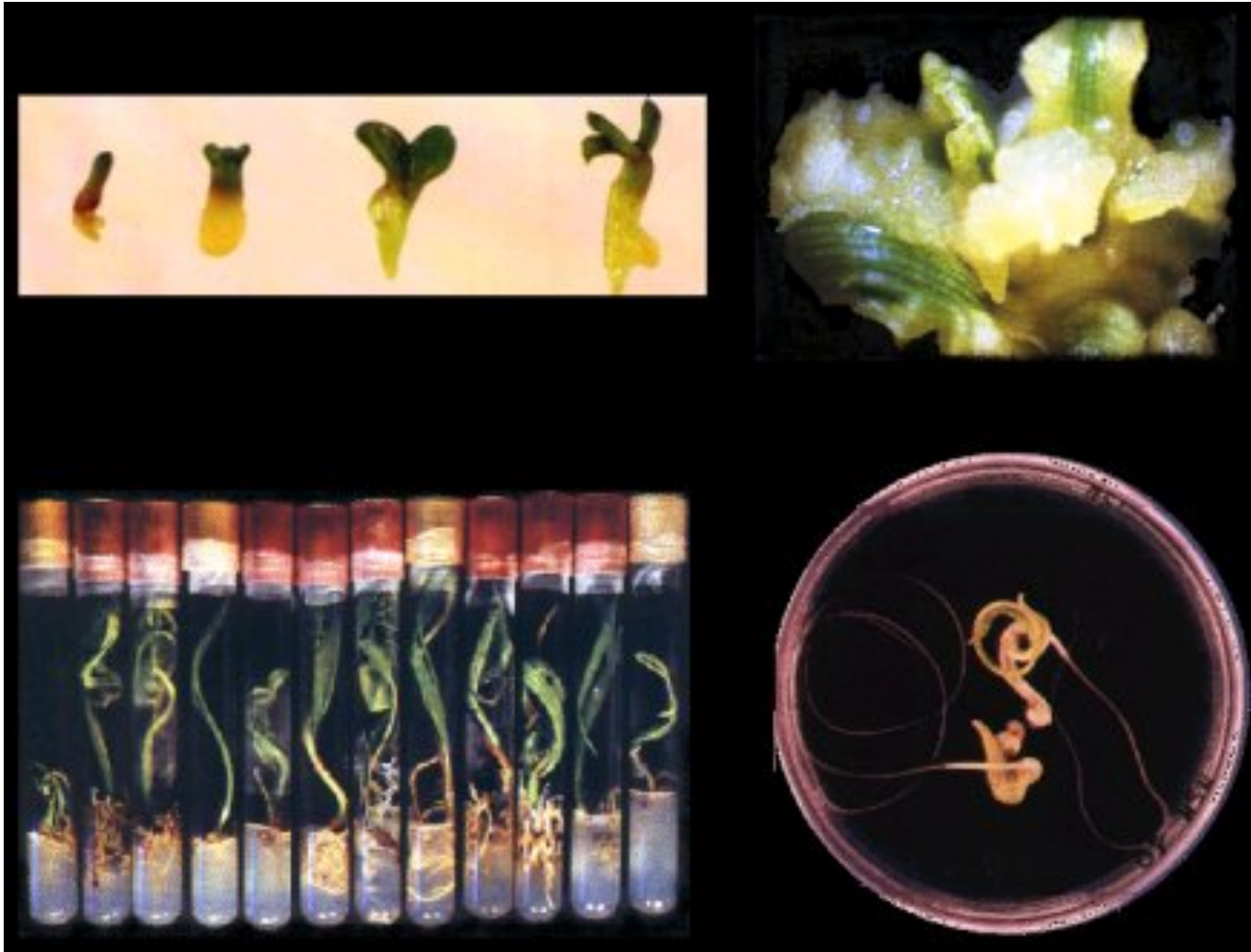
Rigenerazione per organogenesi diretta



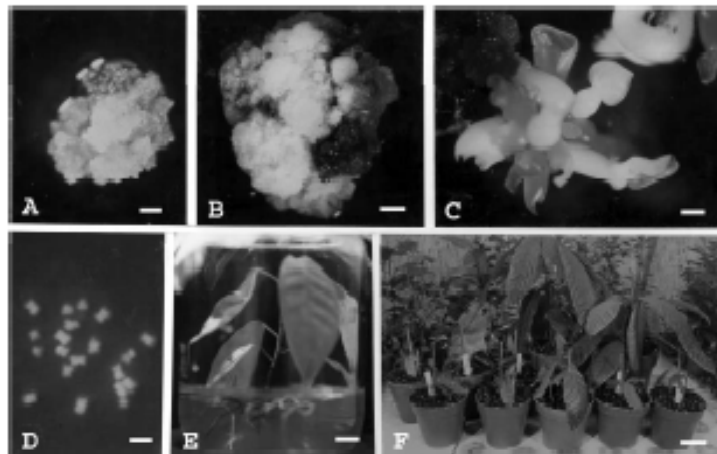
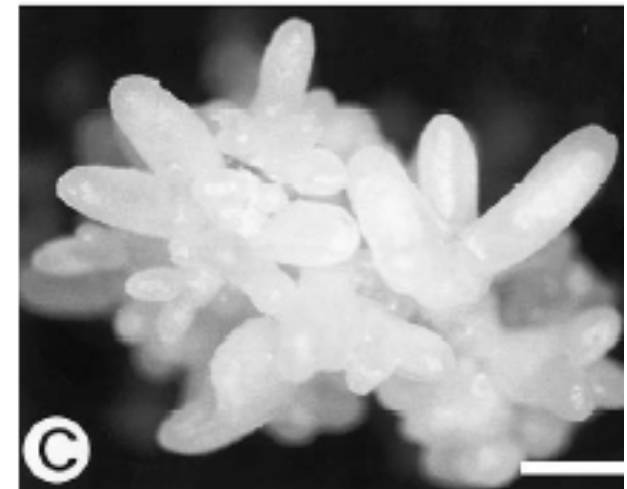
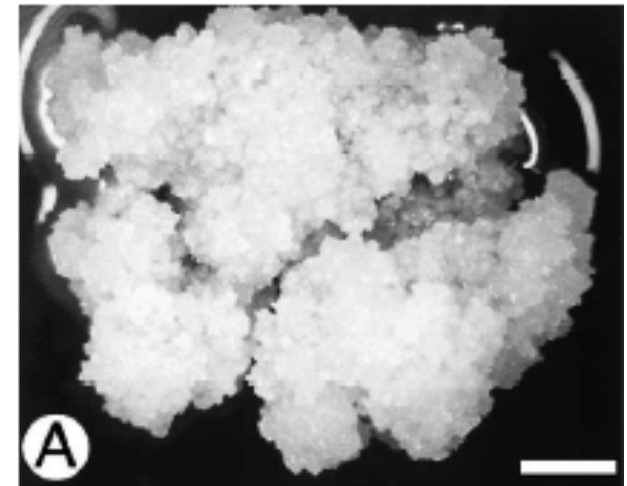
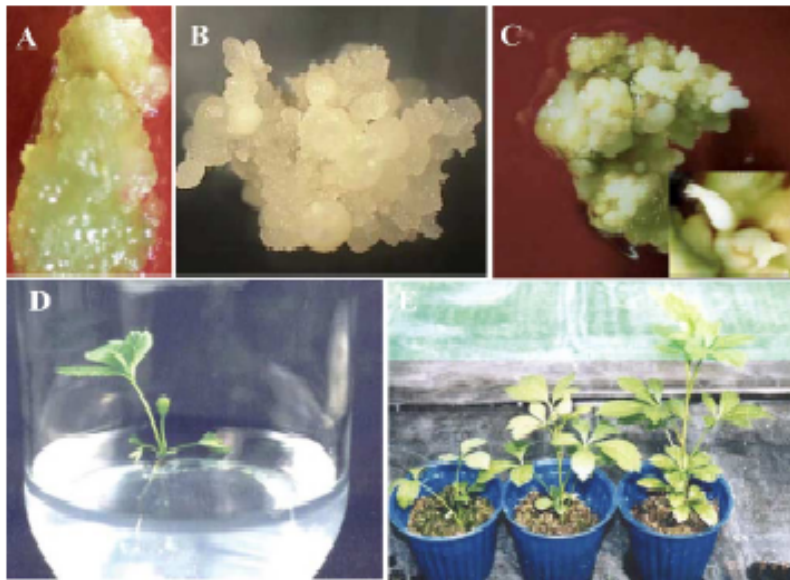
Organogenesi indiretta



Embriogenesi somatica



L'embriogenesi somatica



La trasformazione genetica delle piante

Trasformazione genetica

- **Trasformazione transiente** : il gene esogeno di interesse viene trasferito all'interno di cellule e tessuti ma non è richiesta l'integrazione nel genoma.
- **Trasformazione stabile**: il gene esogeno viene trasferito nelle cellule allo scopo di farlo integrare nel genoma ed essere trasferito alla generazione successiva.

Sistemi di trasformazione

Trasformazione di cellule intatte o tessuti

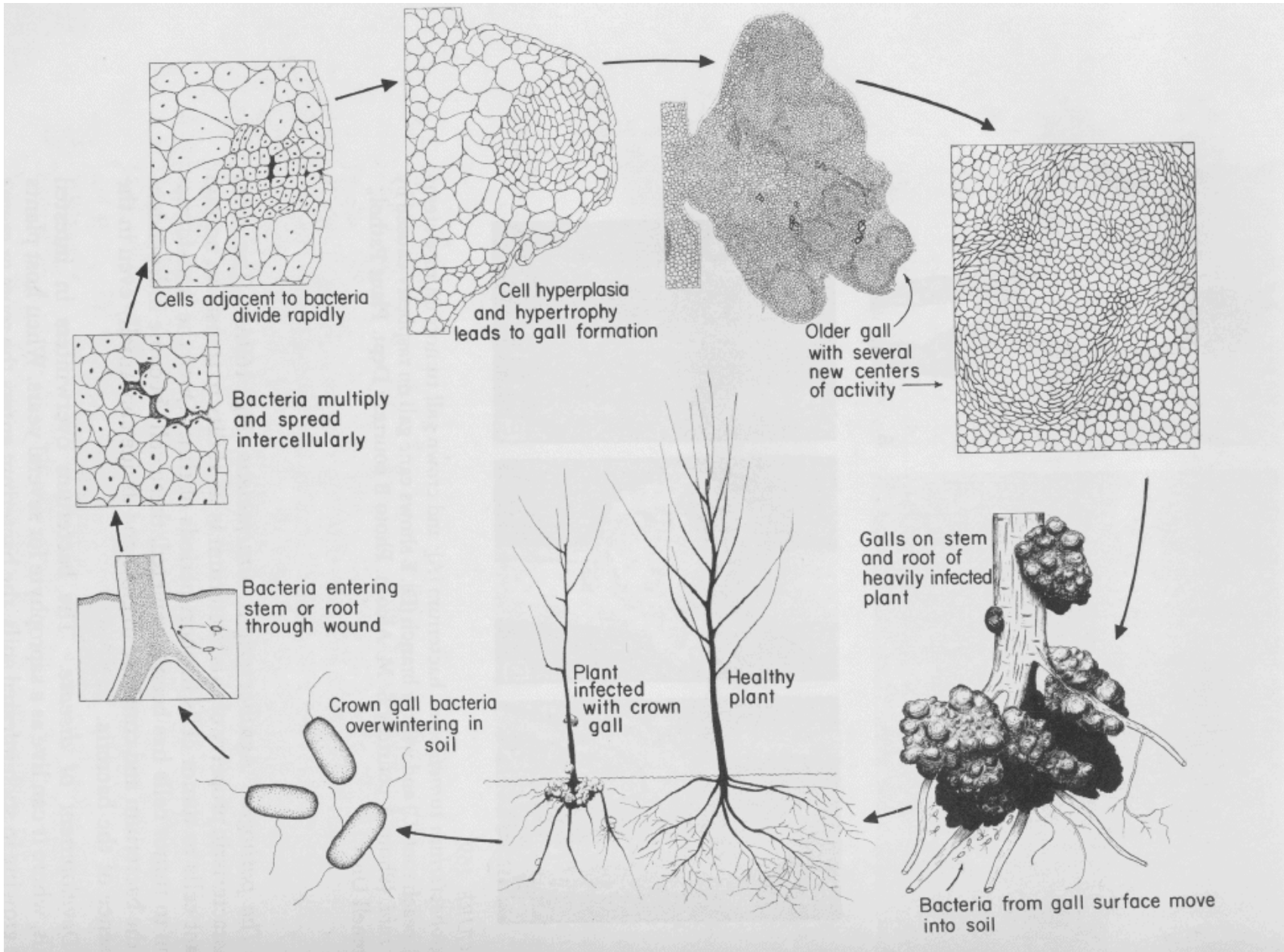
1. **Infezione** con *Agrobacterium tumefaciens*
2. **Biolistica**: bombardamento di cellule vegetali con microproiettili d'oro o tungsteno rivestiti di DNA (particle gun, gene gun)

Trasformazione di protoplasti:

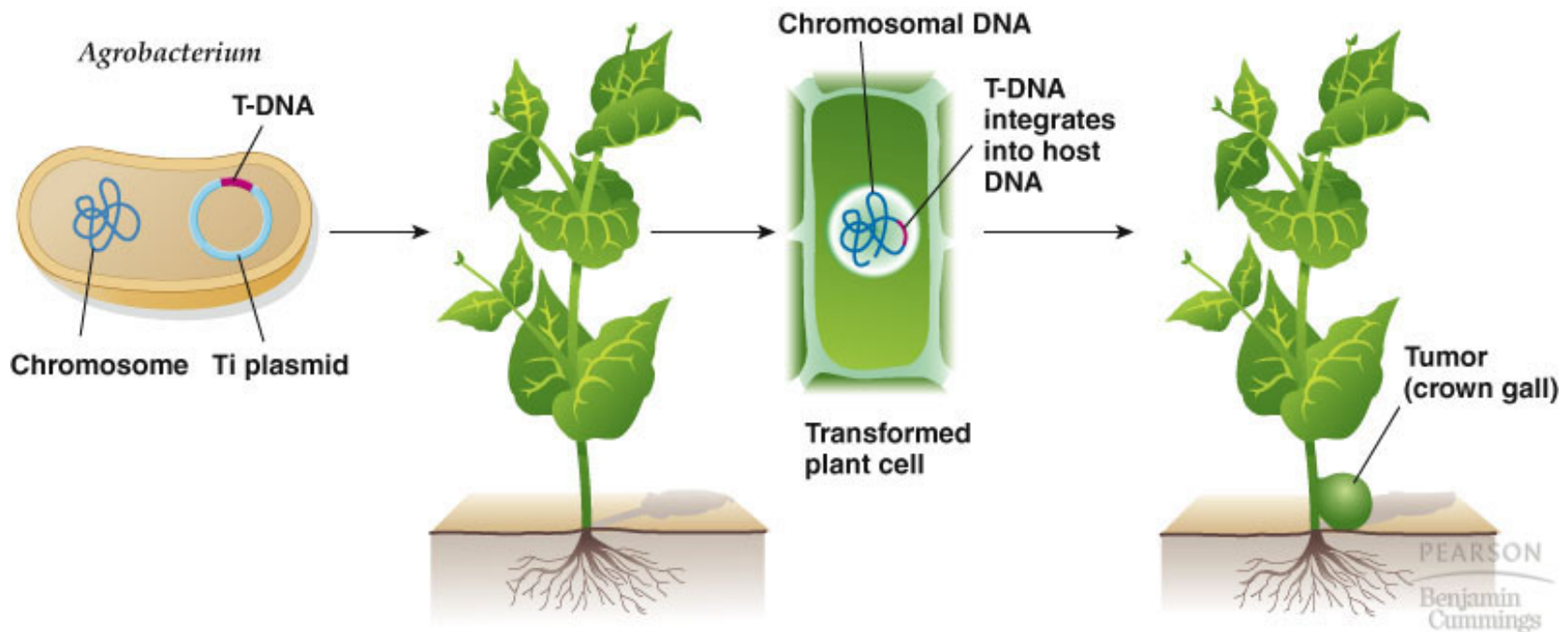
- elettroporazione o trattamento con PEG (usata soprattutto per saggi transienti)

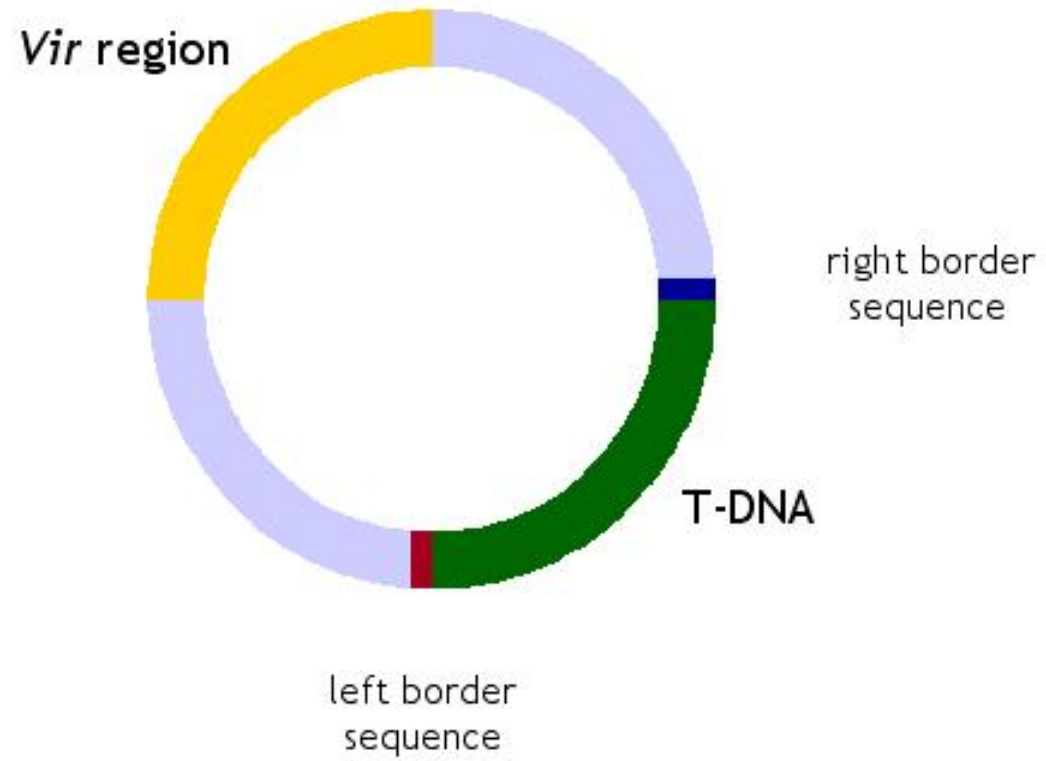


**Il tumore o galla del colletto provocato da
*Agrobacterium tumefaciens***



La trasformazione genetica delle piante da parte di *A. tumefaciens*

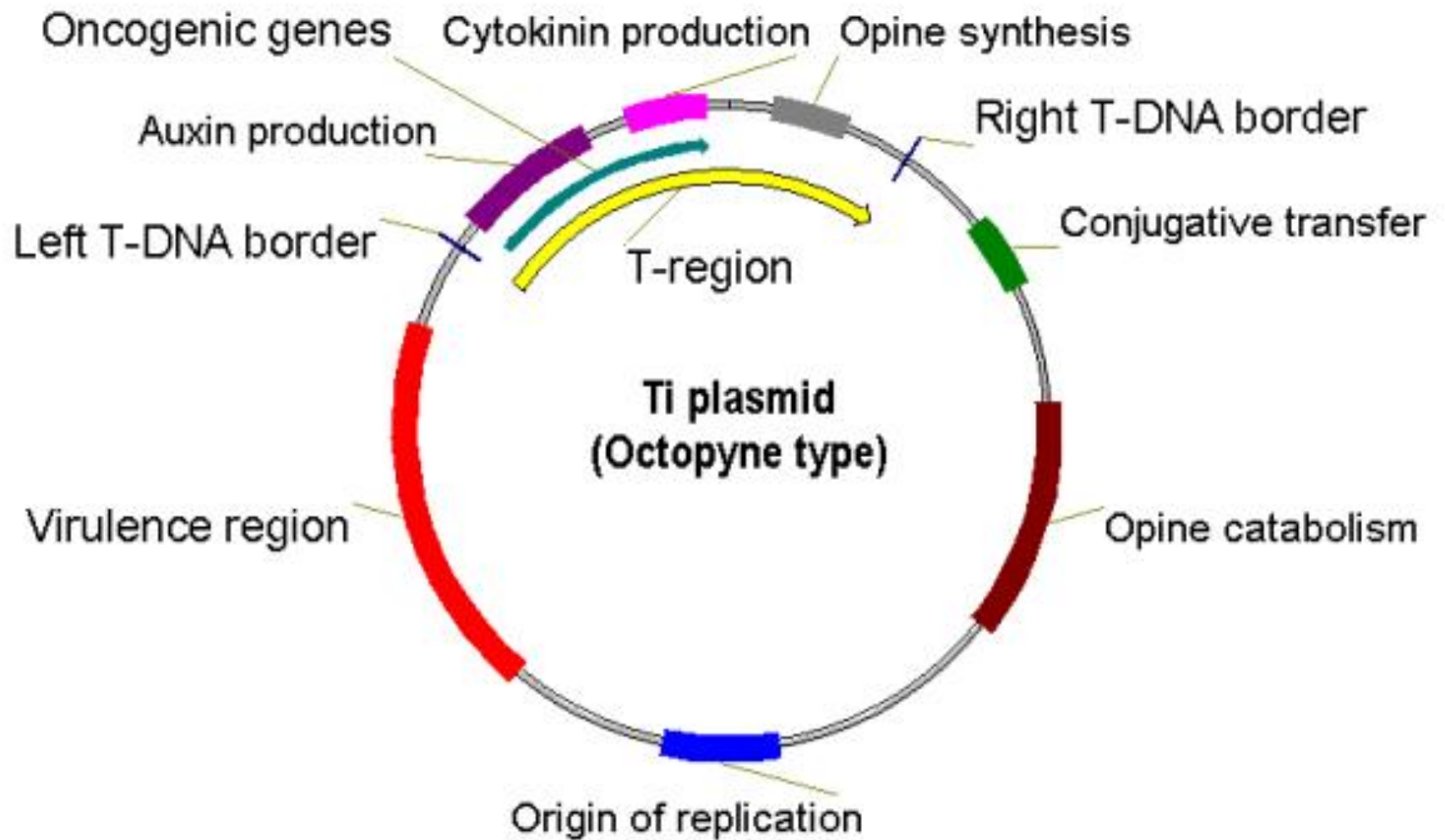




I geni del T-DNA

- *iaaM* e *iaaH* (*tms1*= triptofano-2-monossigenasi e *tms2*=indol-3-acetammide-idrolasi) codificano enzimi per la sintesi di auxine;
- *tmr* o *ipt* per la sintesi delle citochinine;
- geni per la sintesi delle opine, prodotti di condensazione inusuali tra un chetoacido e un aminoacido o tra uno zucchero e un aminoacido (arginina e acido piruvico=octopina; arginina e aldeide alfachetoglutarica=nopalina)

Ti Plasmid

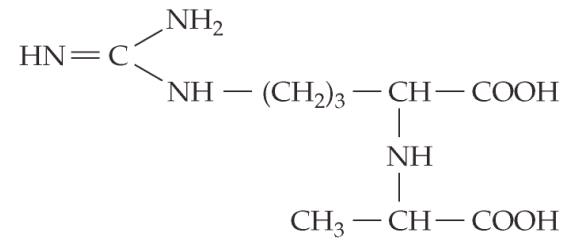


Le sequenze nucleotidiche del confine destro e sinistro del plasmide Ti plasmid sono ripetizioni dirette imperfette.

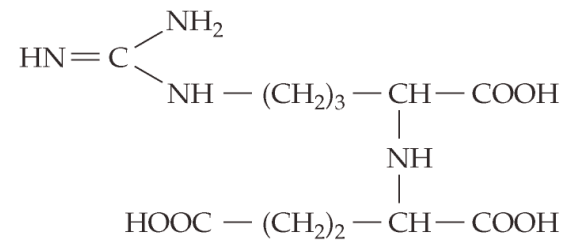
Right 5'-TGNCAGGATATATNNNNNNGTNANN-3'

Left 5'-TGGCAGGATATATNNNNNTGTAAAN-3'

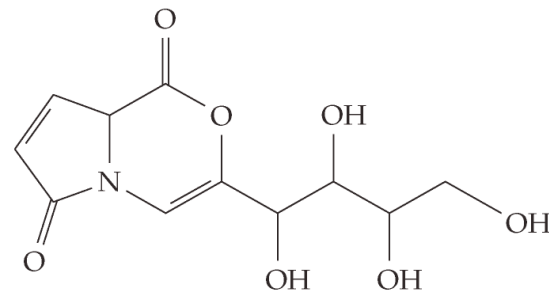
La struttura chimica delle opine prodotte dalle piante



Octopine



Nopaline



Agropine

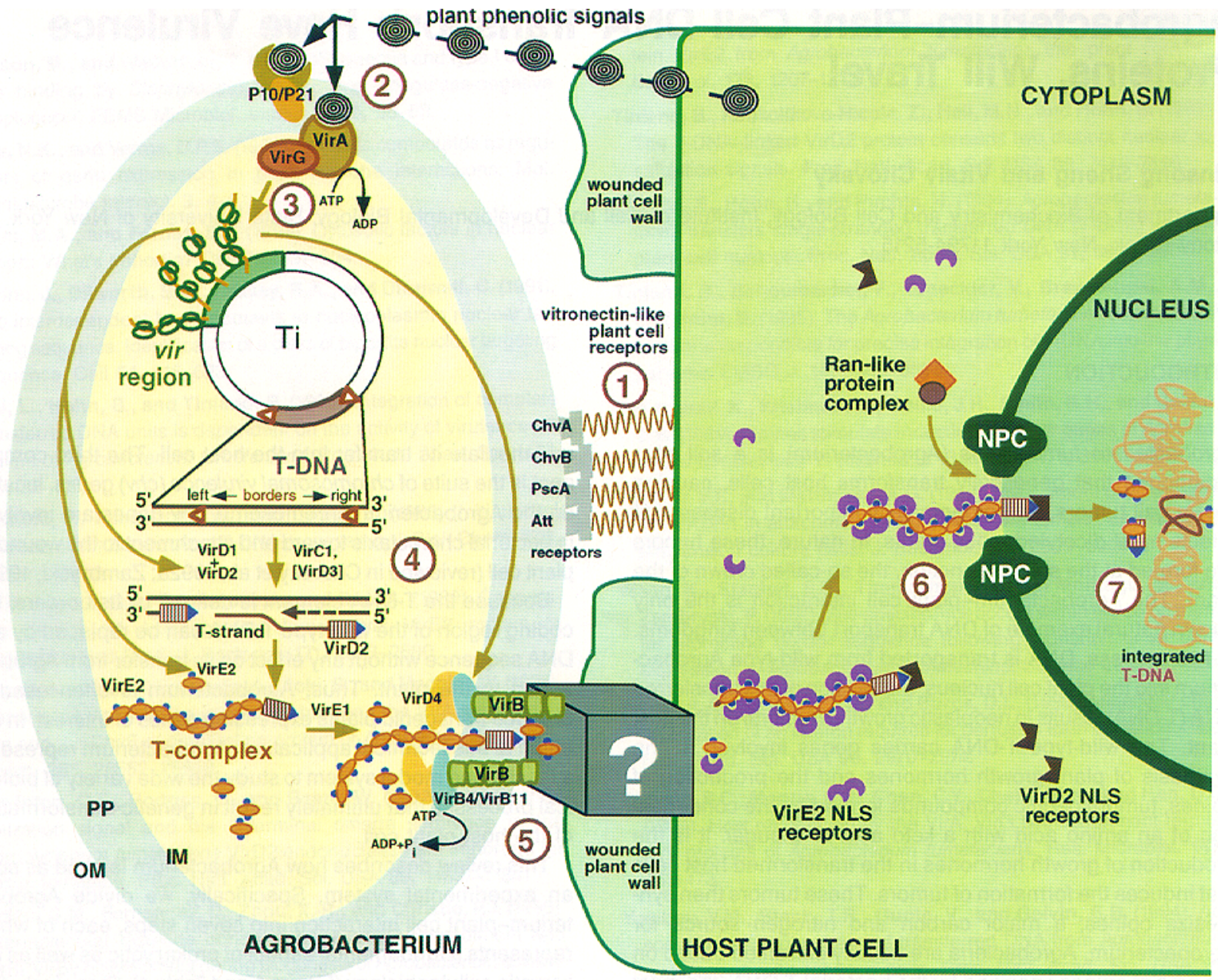


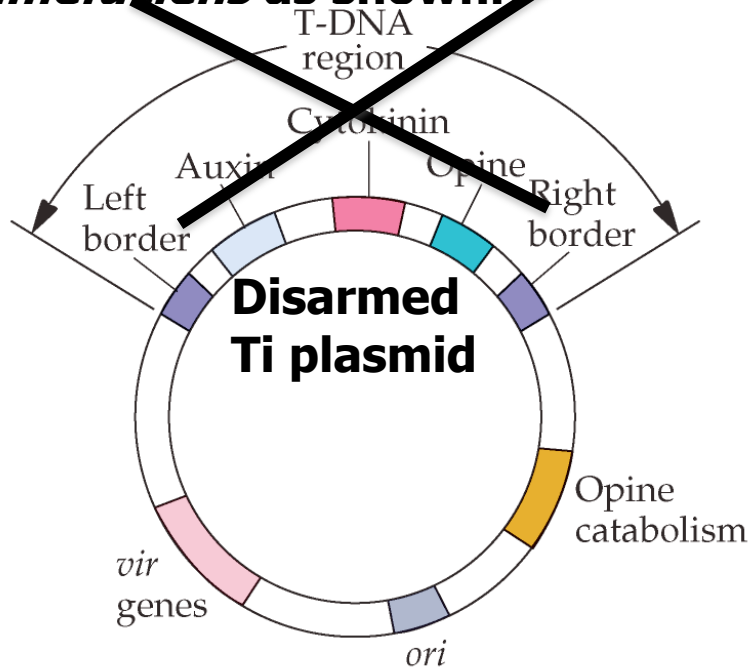
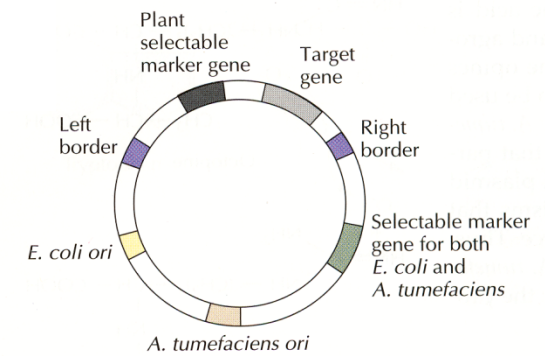
Figure 1. Agrobacterium-Plant Cell Interactions.

Clone YFG (your favorite gene) or the target gene in the small T-DNA

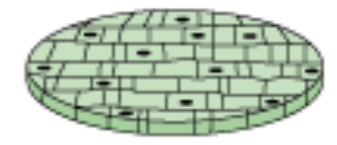
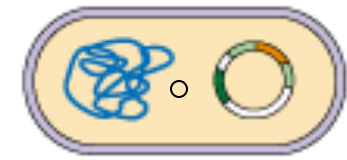
plasmid in *E. coli*, isolate the plasmid

and use it to transform the disarmed

A. tumefaciens as shown.

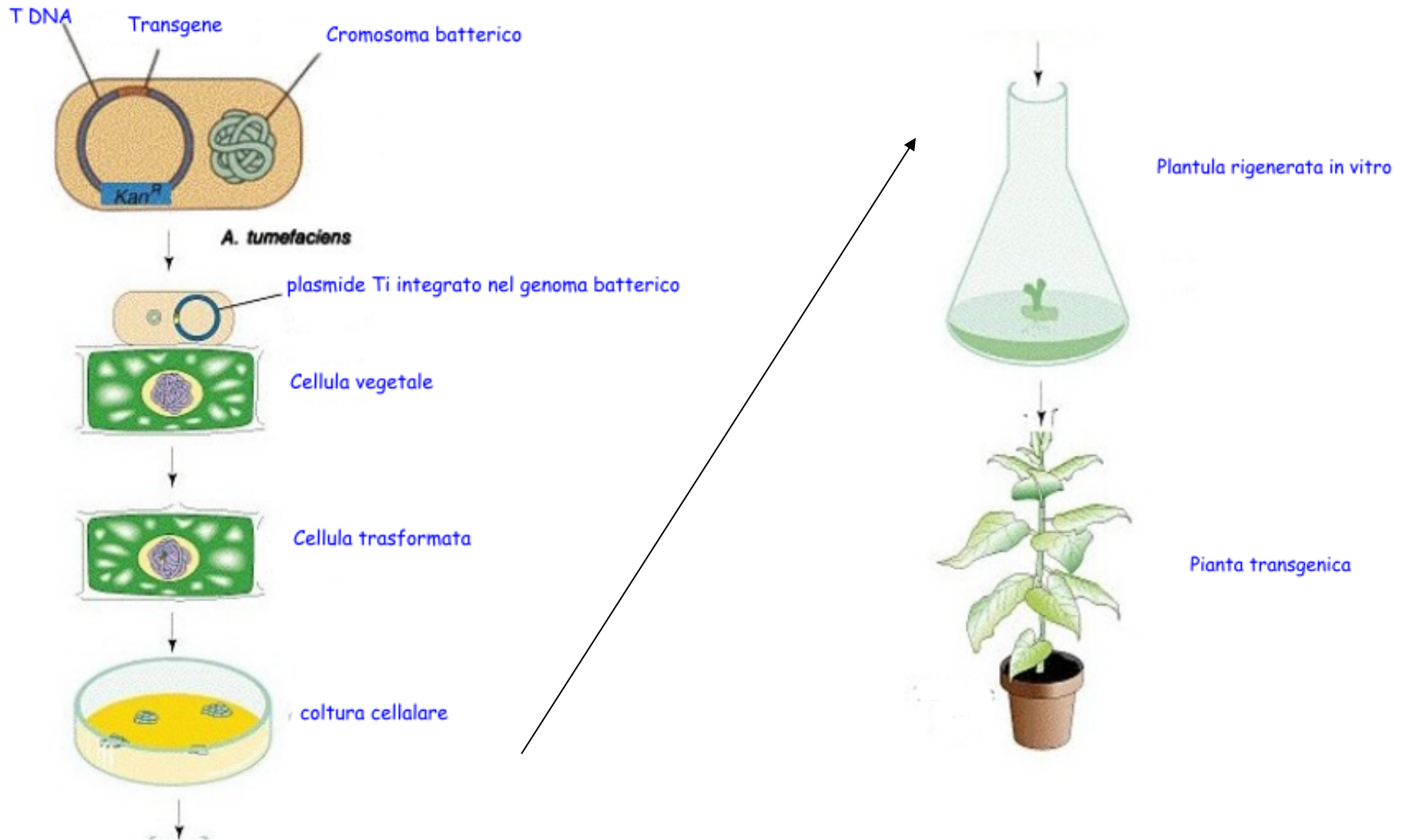


Introduce into *Agrobacterium tumefaciens* (disarmed)

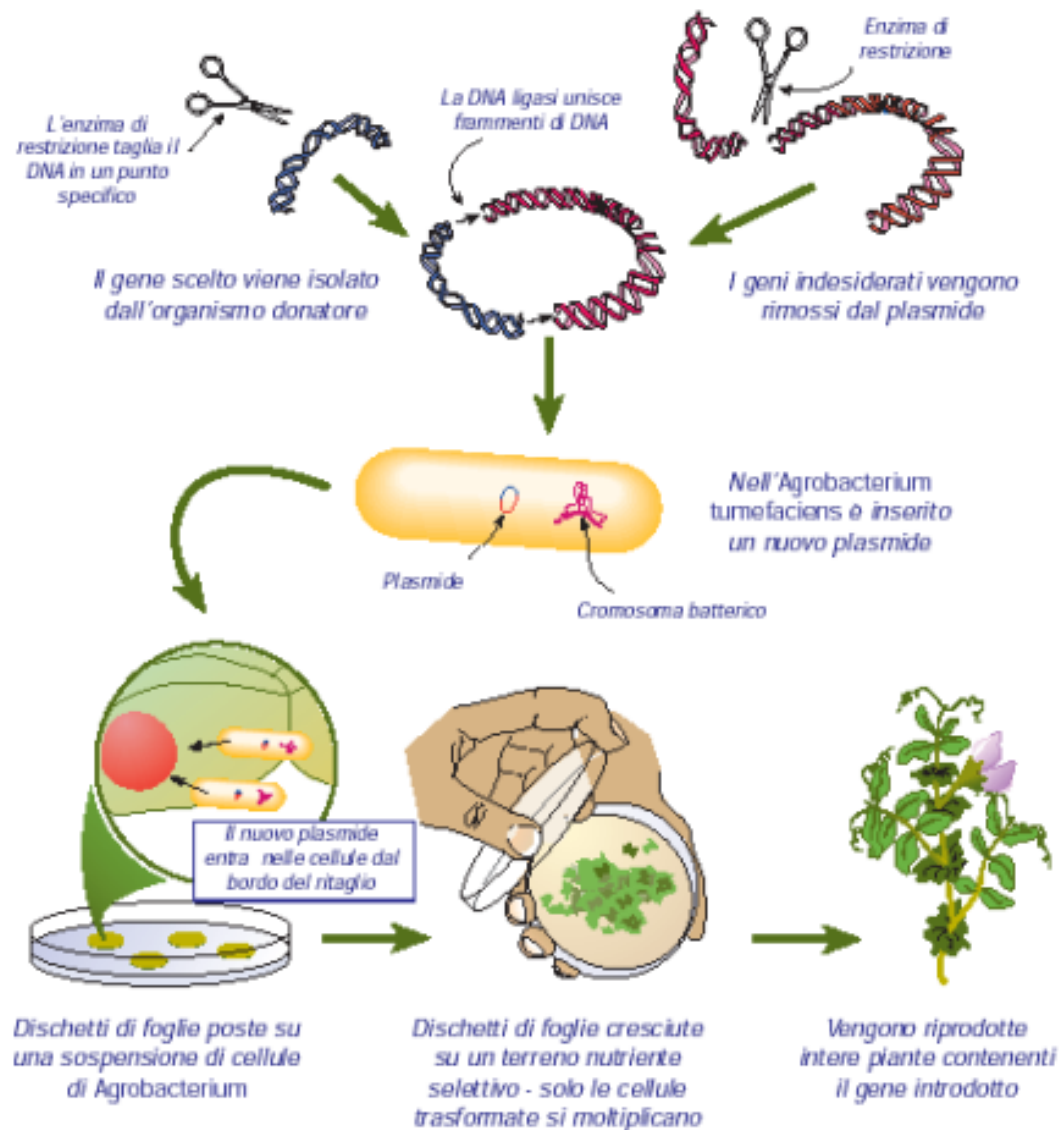


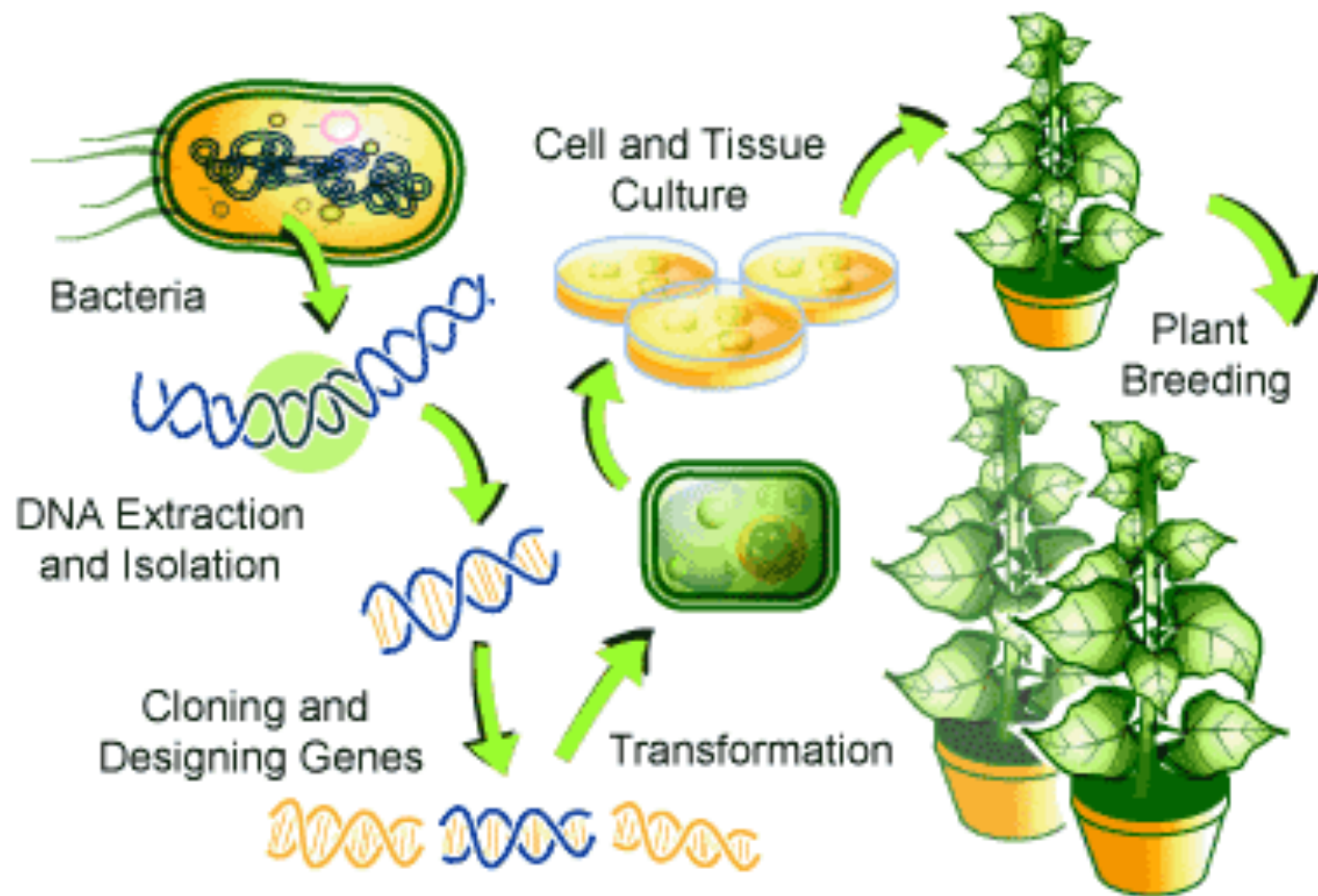
Plant genetic engineering with the binary Ti plasmid system

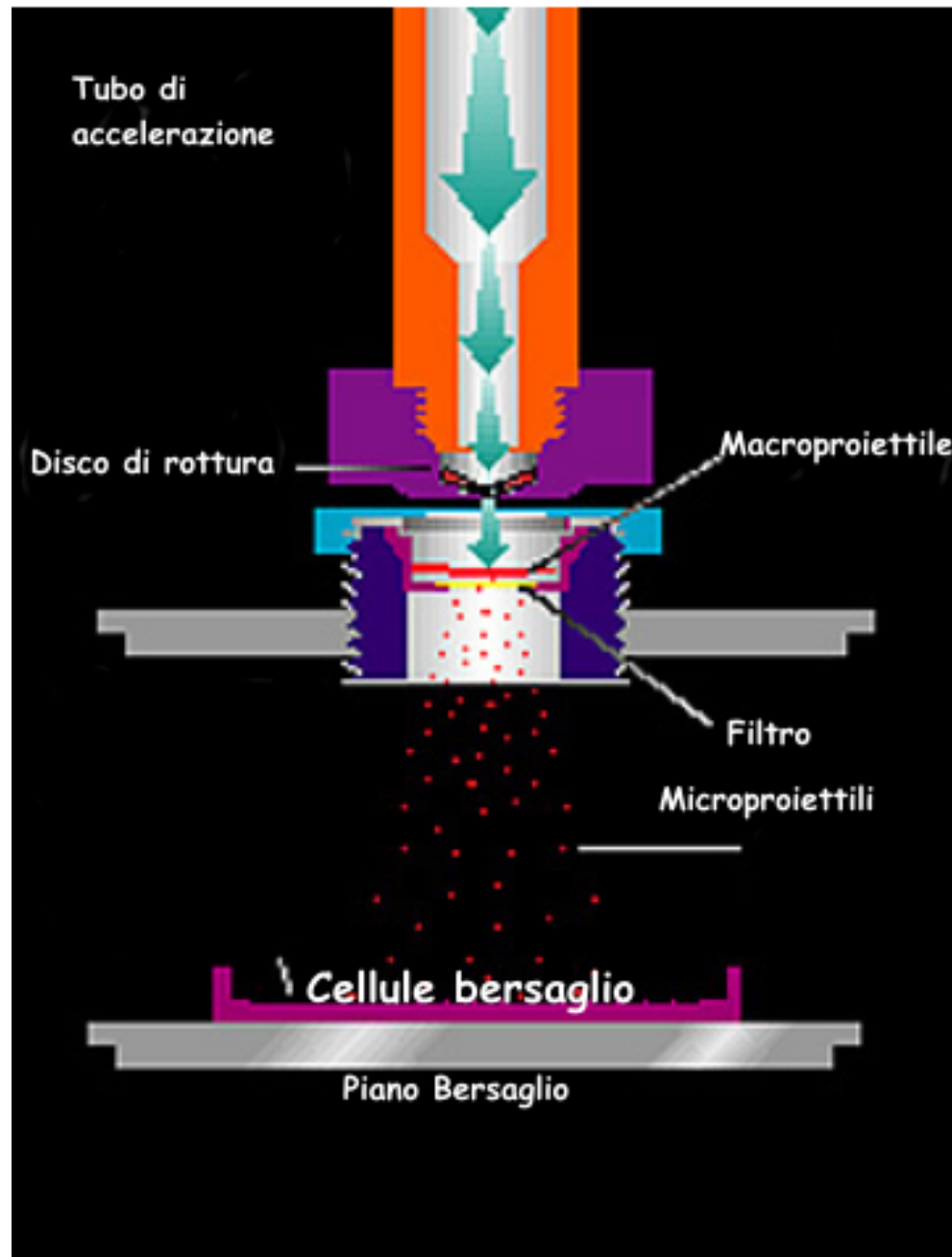
La trasformazione e la rigenerazione *in vitro*

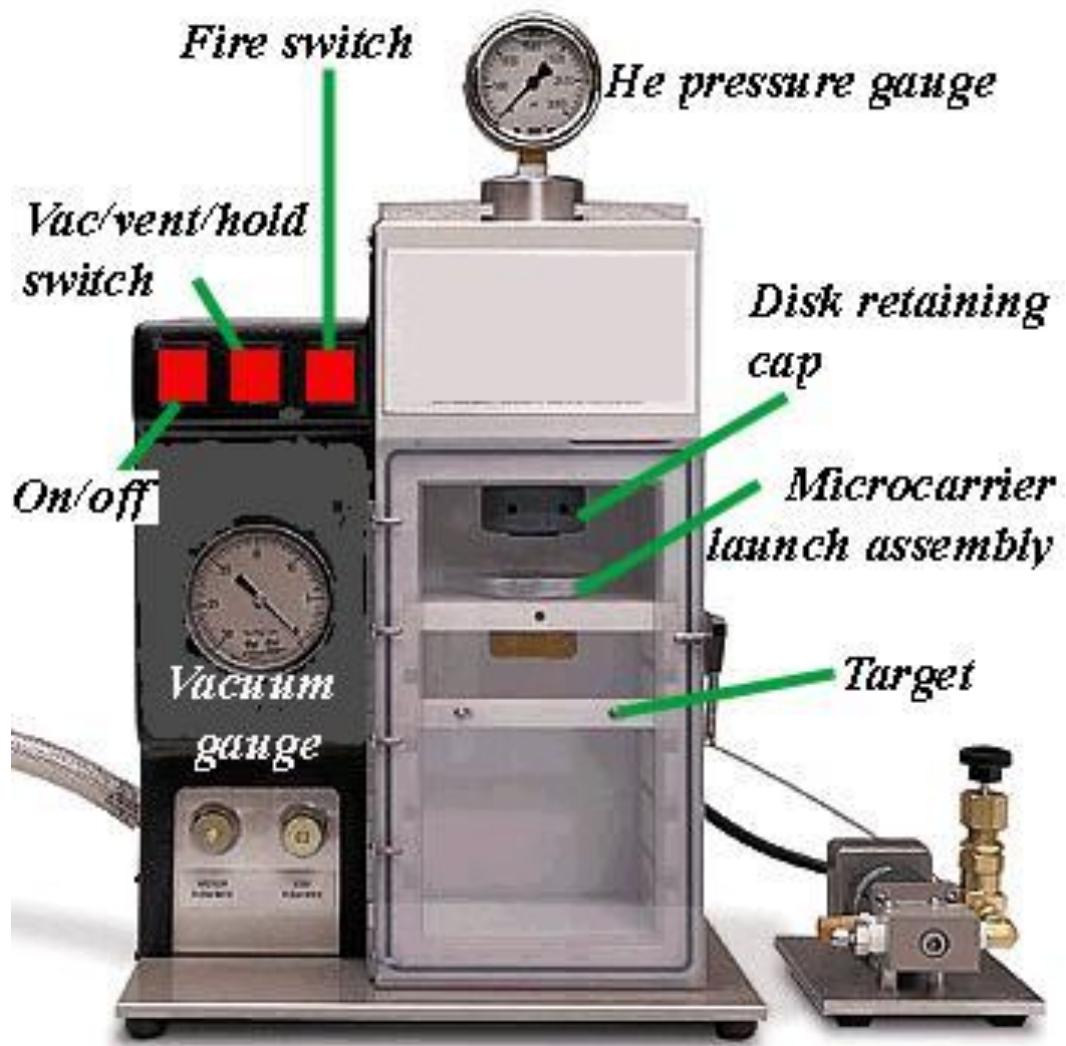


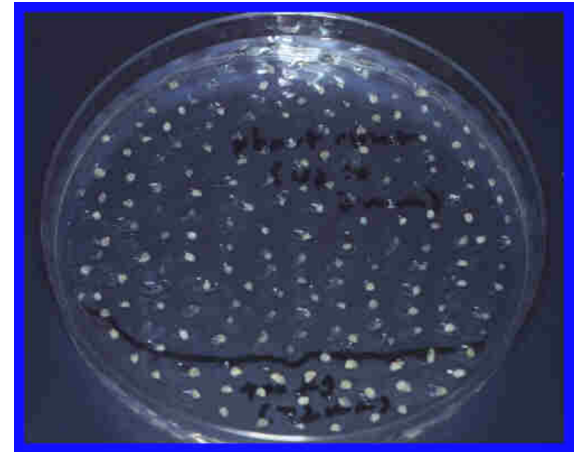
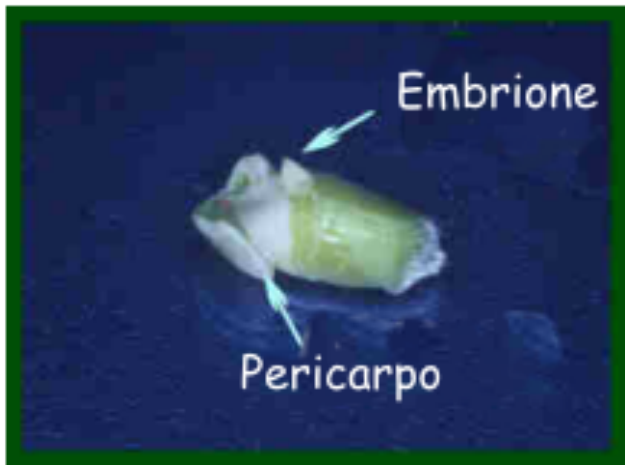
Dal transgene alla pianta transgenica











AGROBACTERIUM TUMEFACIENS - MEDIATED TRANSFORMATION OF RICE

