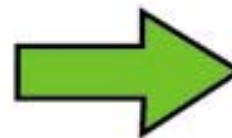


MIGLIORAMENTO GENETICO TRADIZIONALE



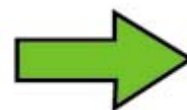
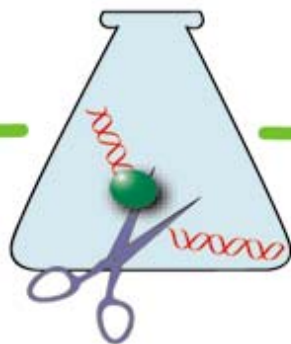
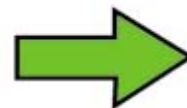
X





X

Incrocio
classico



Ingegneria
genetica

OGM

ORGANISMI GENETICAMENTE MODIFICATI

PGM

PIANTA GENETICAMENTE MODIFICATA

PIANTA TRANSGENICA

UNA PIANTA NELLA QUALE, MEDIANTE INGEGNERIA GENETICA, SONO STATE INTRODOTTE UNA O PIÙ COPIE DI UN GENE PROVENIENTE DA UN ORGANISMO DIVERSO O ULTERIORI COPIE DI UN GENE GIÀ PRESENTE IN QUELLA SPECIE

Come si può trasformare una pianta?

pre-requisiti essenziali per la trasformazione della pianta

- efficiente metodo di trasferimento del DNA
- disponibilità di tessuti/cellule competenti per la rigenerazione
- adatti sistemi di selezione

metodi di trasferimento del DNA

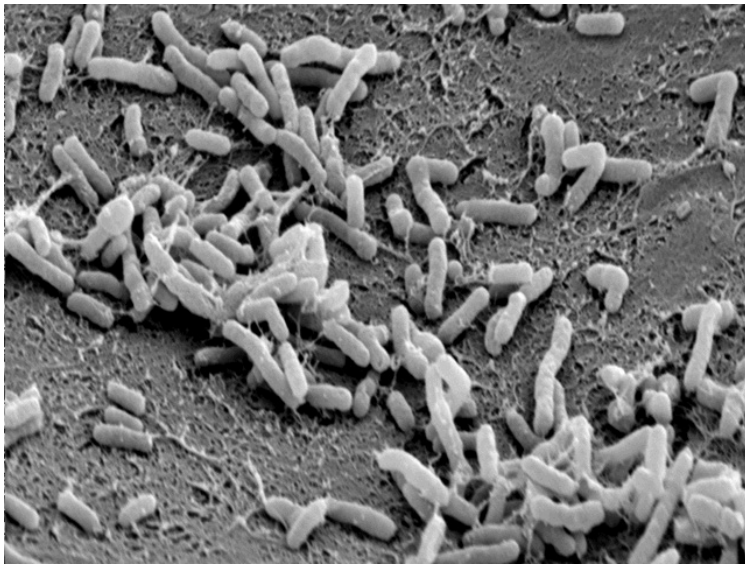
```
graph TD; A[metodi di trasferimento del DNA] --> B[Agrobacterium tumefaciens]; A --> C[Trasferimento diretto del DNA]; C --> D[- sistema biolistico]; C --> E[- trasformazione protoplasti]; C --> F[- microiniezione];
```

*Agrobacterium
tumefaciens*

*Agrobacterium
rhizogenes*

Trasferimento
diretto del DNA

- sistema biolistico
- trasformazione protoplasti
- microiniezione



Agrobacterium

batterio del suolo Gram-negativo

infetta numerosi generi di piante
(*Brassica*, *Lilium*,
Lycopersicon, *Nicotiana*)

Agrobacterium tumefaciens

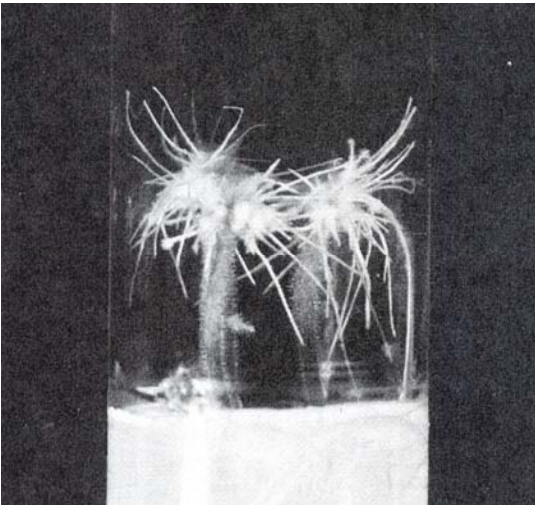
induce la formazione di tumori

galla del colletto →

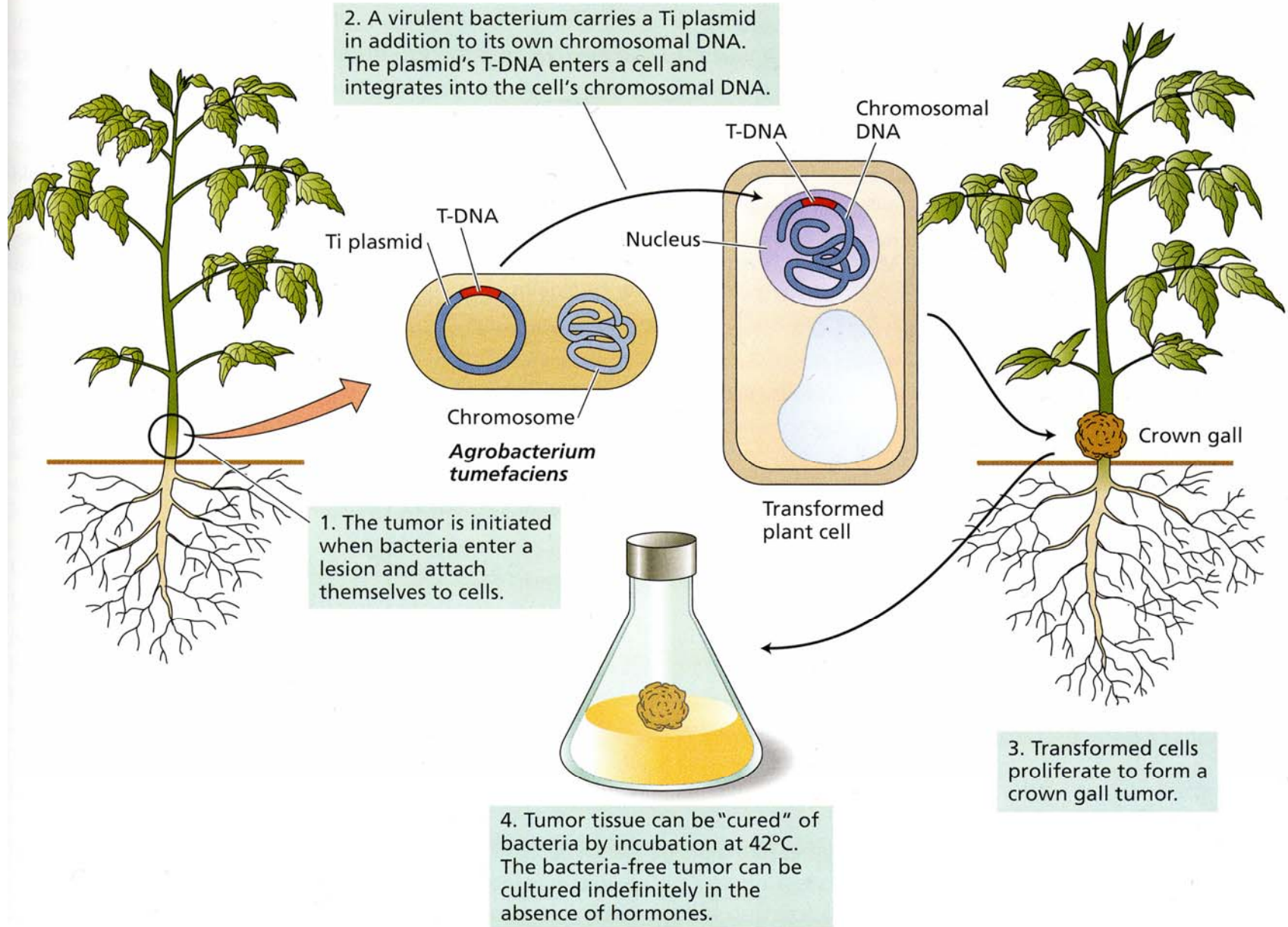


Agrobacterium rhizogenes

← induce la formazione di radici
avventizie nel sito di infezione



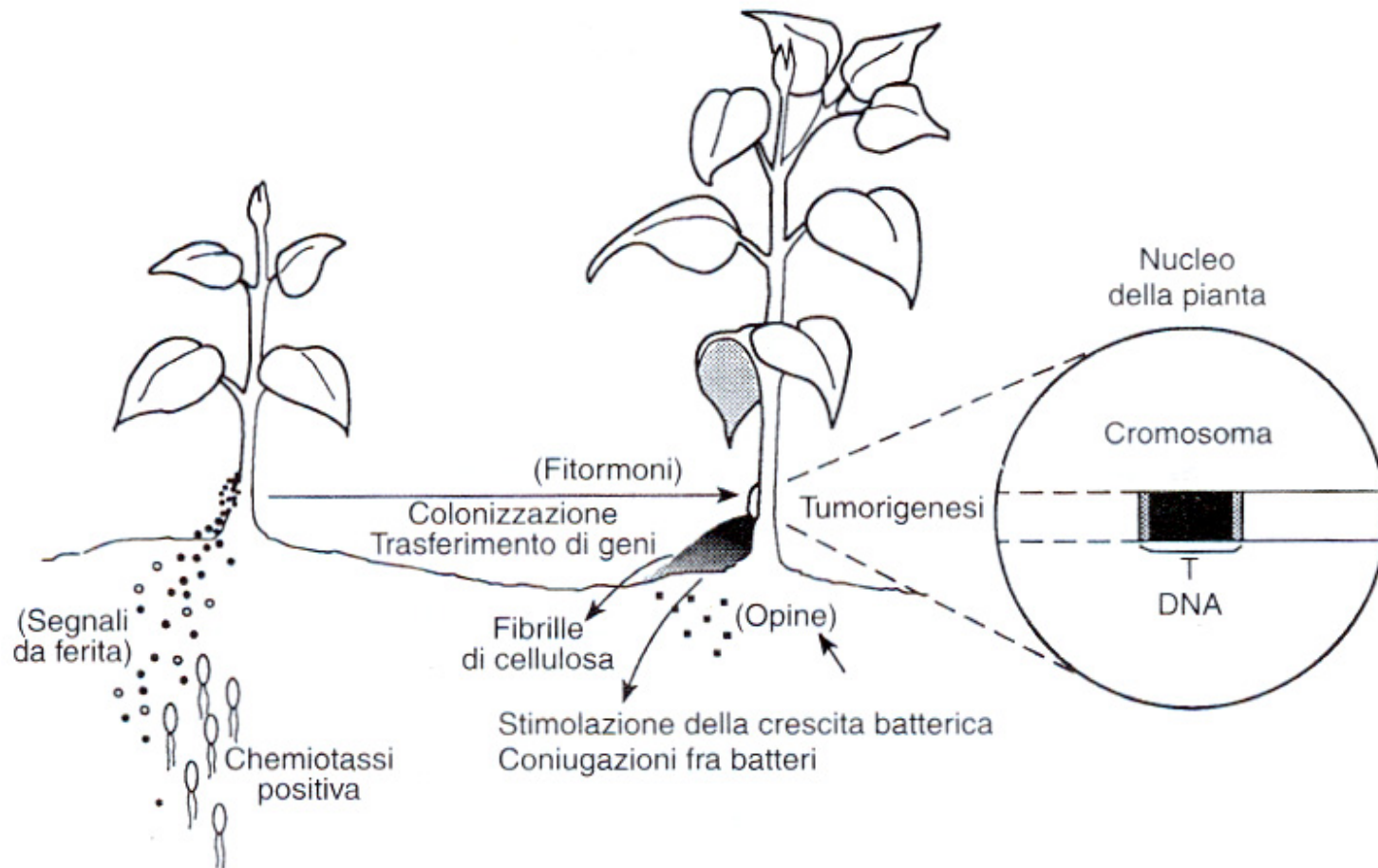
- 1853 Primo report scritto sulla malattia della galla del colletto
- 1907 *A. tumefaciens* identificato come agente causale della galla del colletto
- 1947 Tessuto tumorale può proliferare in coltura in terreno privo di ormoni. Si pensa che le cellule tumorali siano trasformate da un "principio che induce tumore" (TIP) derivante da *Agrobacterium*
- 1956 Composti azotati inusuali sono identificati esclusivamente nel tessuto tumorale (opine)
- 1974 La virulenza di ceppi di *Agrobacterium* dipende dalla presenza di un plasmide di grandi dimensioni: plasmide Ti (Tumor inducing). TIP è probabilmente una componente di questo plasmide
- 1977 Il T-DNA è presente nel genoma delle cellule tumorali (T-DNA = TIP)
- 1983 Prima pianta trasformata con un gene ricombinante utilizzando *Agrobacterium tumefaciens*
- 1984 La presenza di oncogeni nel T-DNA determina il fenotipo tumorale
- 1985 Identificazione del sistema a due componenti VirA/VirG per la percezione e trasduzione del segnale indotto da *Agrobacterium*
- 1986- Ulteriori progressi nella comprensione del meccanismo di trasferimento presente ed integrazione del T-DNA



Agrobacterium infetta il tessuto vegetale in presenza di ferite.
Composti fenolici (**Acetosiringone**) rilasciati dalla ferita sono necessari per indurre l'infezione.

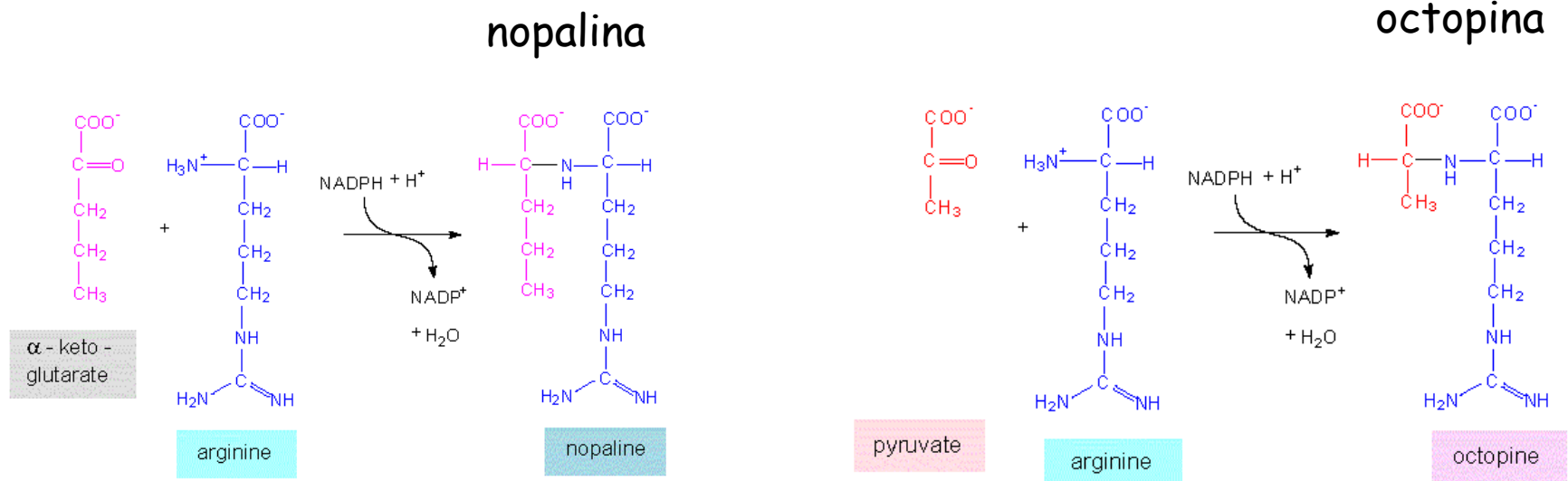
Il fenotipo tumorale è una conseguenza della trasformazione delle cellule della pianta.

Agrobacterium è in grado di trasferire DNA nelle cellule vegetali



Plasmide Ti (Tumor inducing) contiene una regione di DNA (**T-DNA**) che viene trasferita e integrata stabilmente nel genoma vegetale.

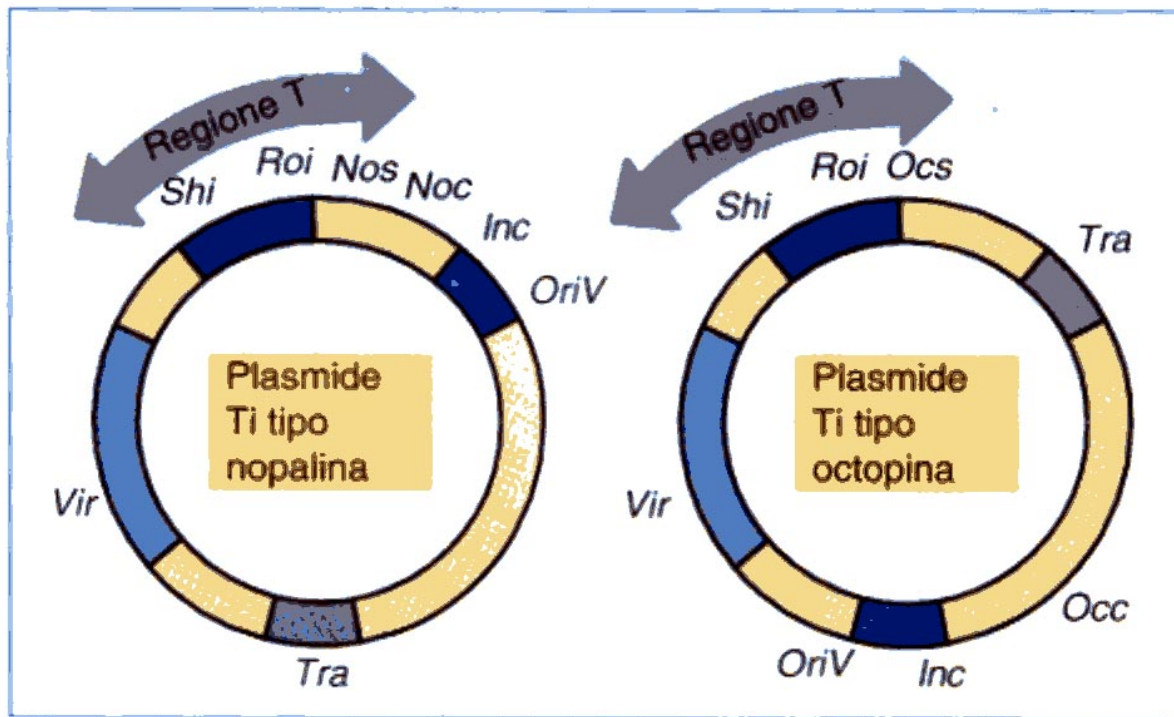
Il T-DNA contiene geni che codificano per enzimi responsabili della sintesi di opine, amminoacidi utilizzati dal batterio come fonte di nutrimento.



esistono 20 diverse opine, ma ogni ceppo di *Agrobacterium* ne produce solo un tipo

L'uptake e il catabolismo delle opine dipendono dal plasmide Ti

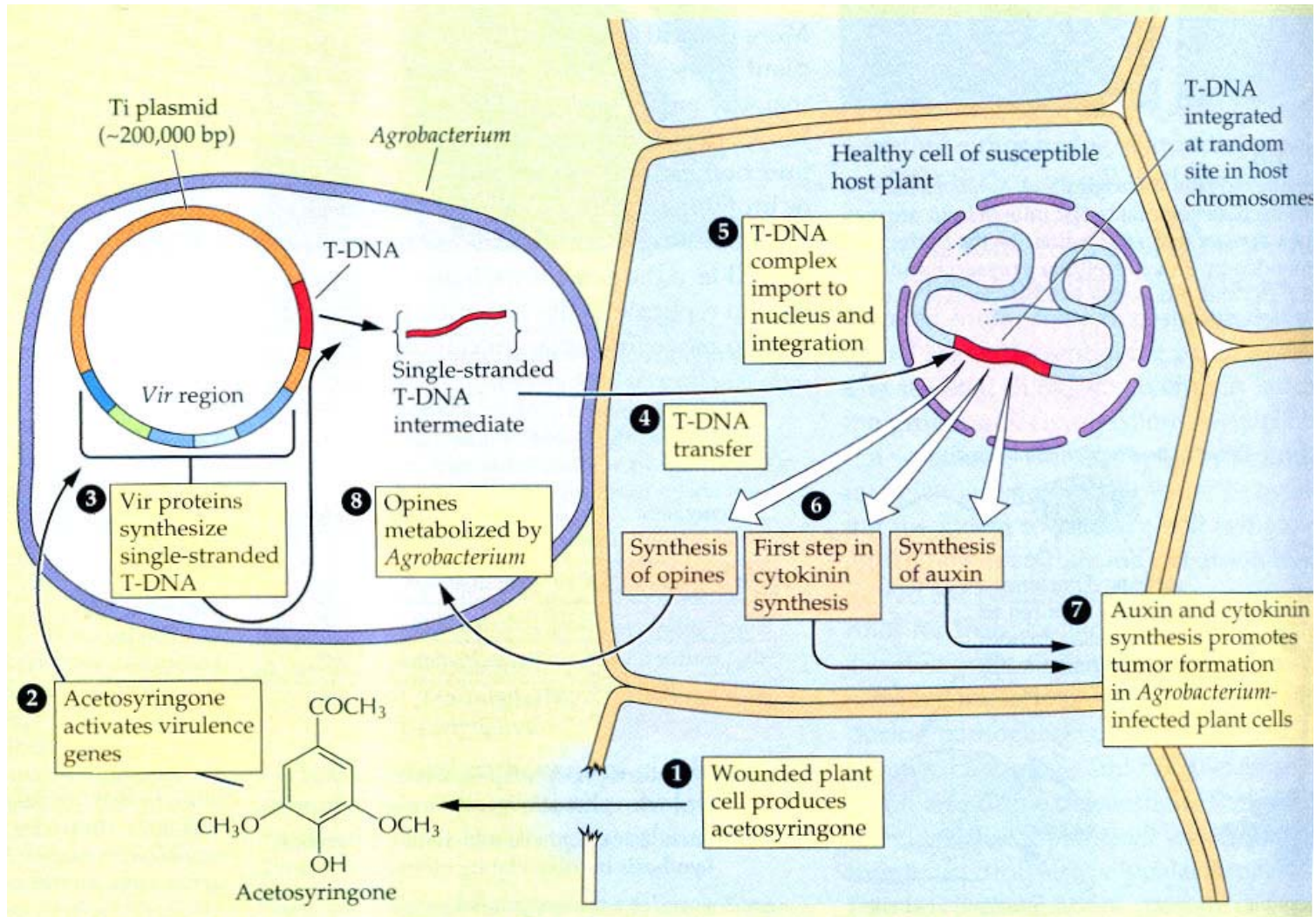
I ceppi di *Agrobacterium* sono classificati sulla base del tipo di opine prodotte



Locus

Funzione

<i>Vir</i>	Trasferimento DNA
<i>Shi</i>	Induzione dei coleottili (<u>S</u> hoot <u>i</u> nducing)
<i>Roi</i>	Induzione delle radici (<u>R</u> oot <u>i</u> nducing)
<i>Nos</i>	Sintesi della nopalina (Nopalina sintasi)
<i>Noc</i>	Catabolismo della nopalina
<i>Ocs</i>	Sintesi della octopina
<i>Occ</i>	Catabolismo della octopina
<i>Tra</i>	Trasferimento di geni batterici
<i>Inc</i>	Geni di incompatibilità
<i>OriV</i>	Origine di replicazione



1 ferita → produzione acetosiringone

2 acetosiringone → adescante chemiotattico
attivatore trascrizione geni *Vir*

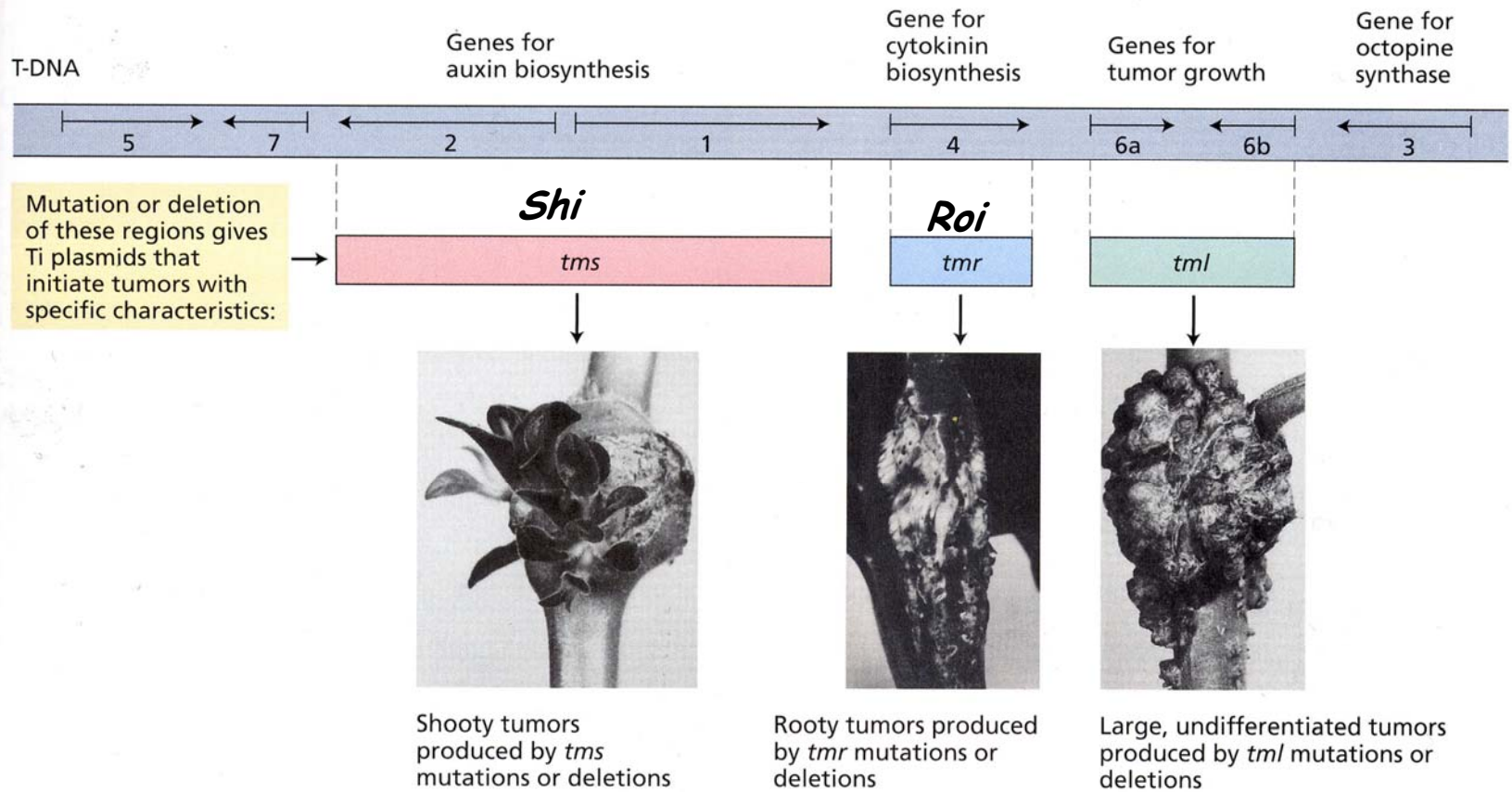
3 proteine *Vir* → produzione T-DNA
e suo targeting

4 trasferimento T-DNA

5 integrazione T-DNA

6 produzione ormoni e opine

7 formazione tumore



Gene 1 IAAM

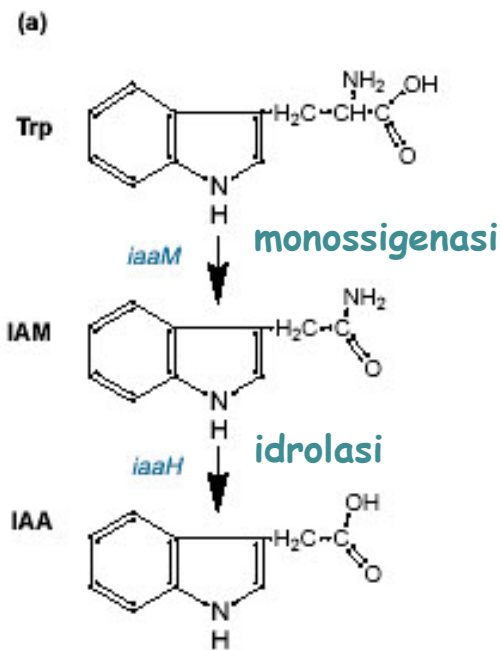
Gene 2 IAAH

biosintesi auxina

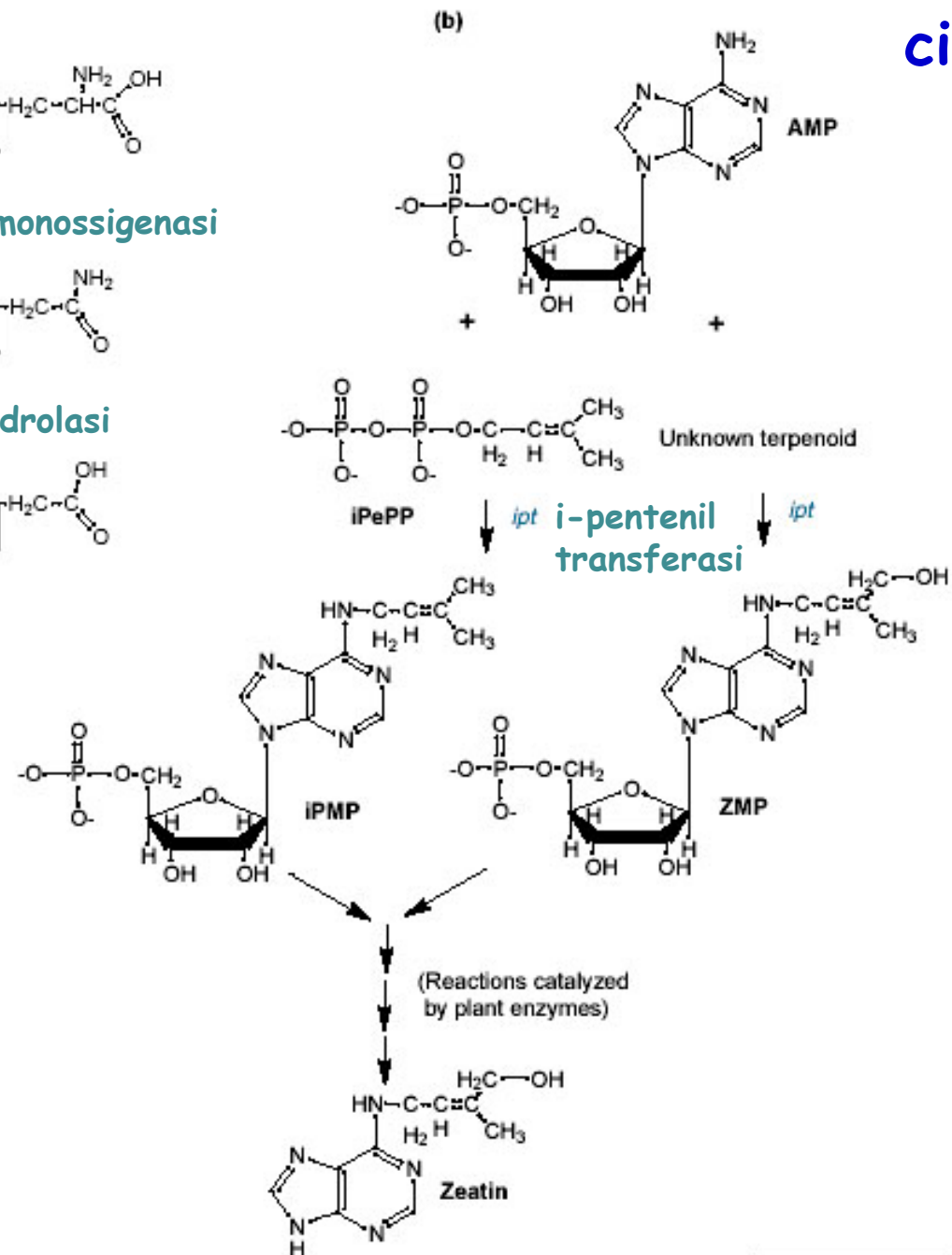
Gene 4 ipt

biosintesi citochinine

auxina

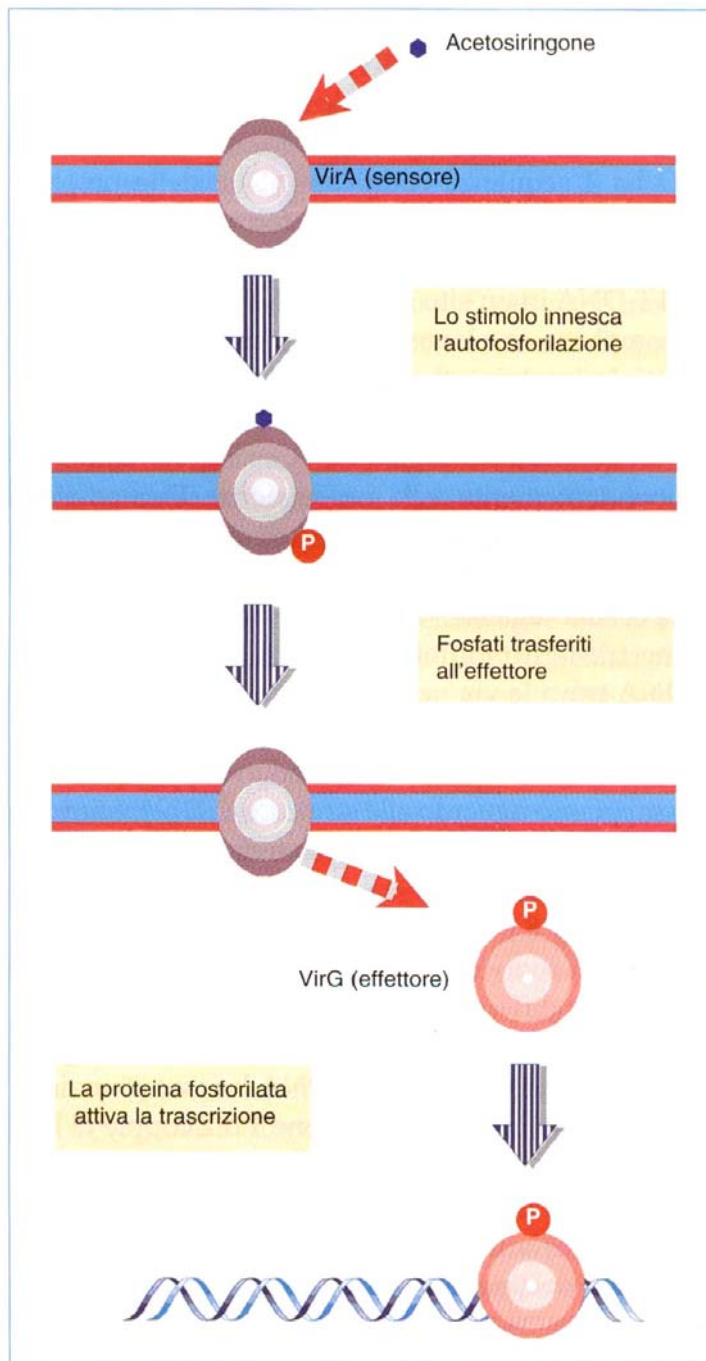


cytocholine



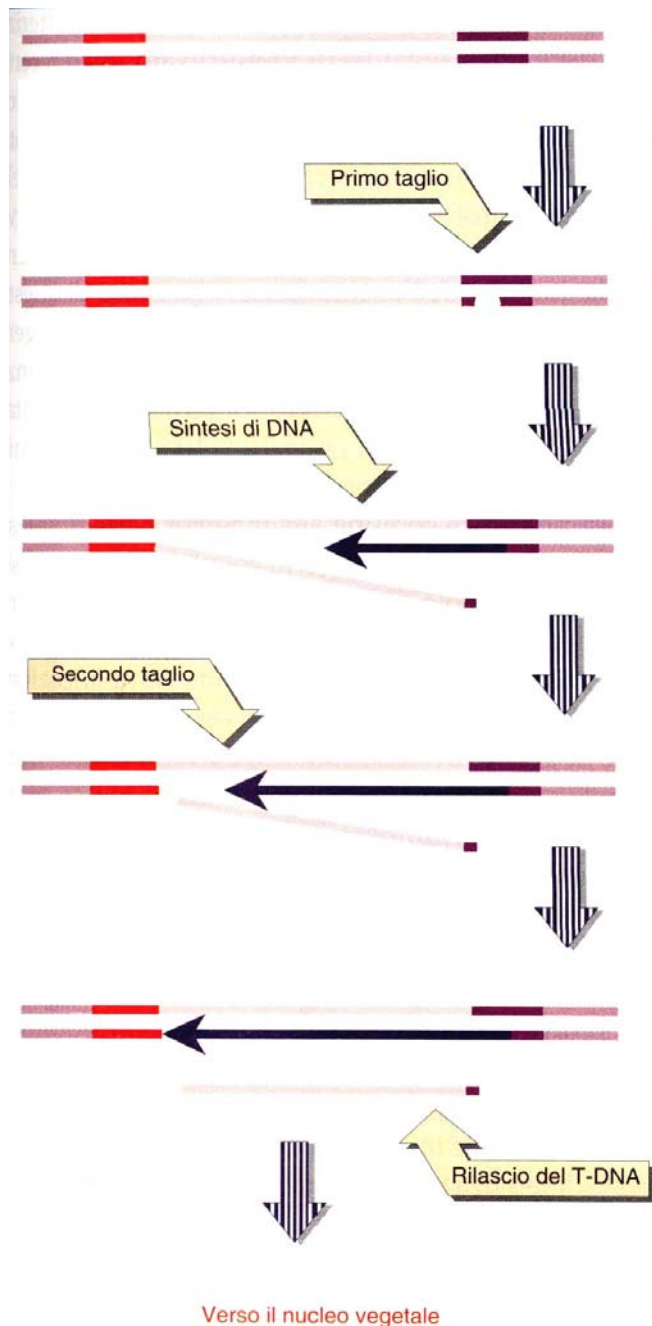
Ruolo dei geni *vir*

						
Locus	<i>virA</i>	<i>virB</i>	<i>virG</i>	<i>virC</i>	<i>virD</i>	<i>virE</i>
Lunghezza	2 kb	9,5 kb	1 kb	2 kb	4,5 kb	2 kb
Proteine	VirA	VirB1-3	VirG	VirC1-2	VirD1,D2	VirE2
Costitutivo	basso		basso			
Indotto		alto	alto	alto	alto	alto
Localizzazione	memb.	memb.	citop.	citop.	citop.	cit/mem
Funzione	recettore per acetil-siringone 		induce la trascrizione degli altri geni <i>vir</i> 			
						
		proteine che legano ATP		lega il DNA overdrive	endonucleasi; taglia il T-DNA	proteina che lega ssDNA



sistema a due componenti
VirA / VirG

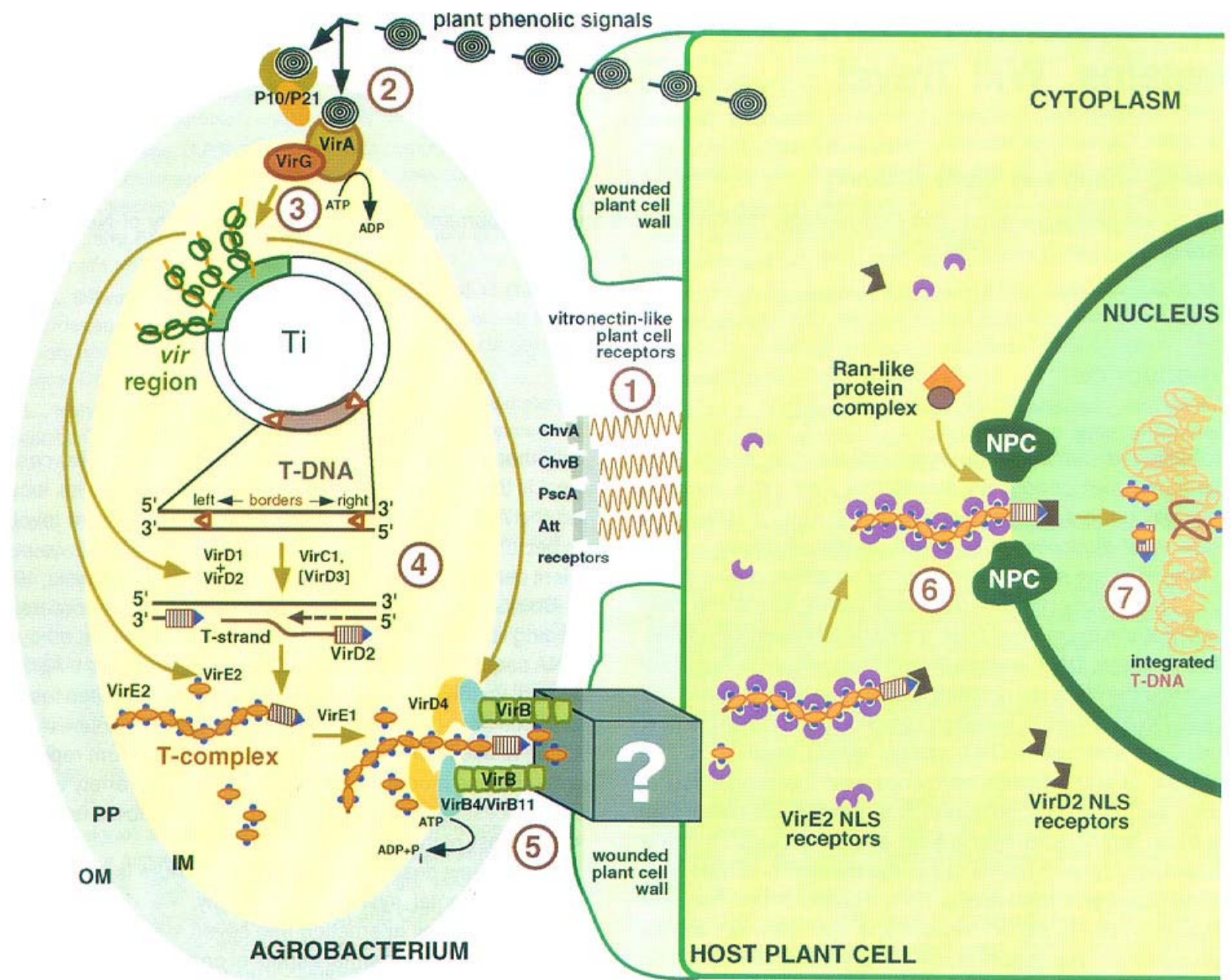
→ attiva la trascrizione degli
altri geni *vir*



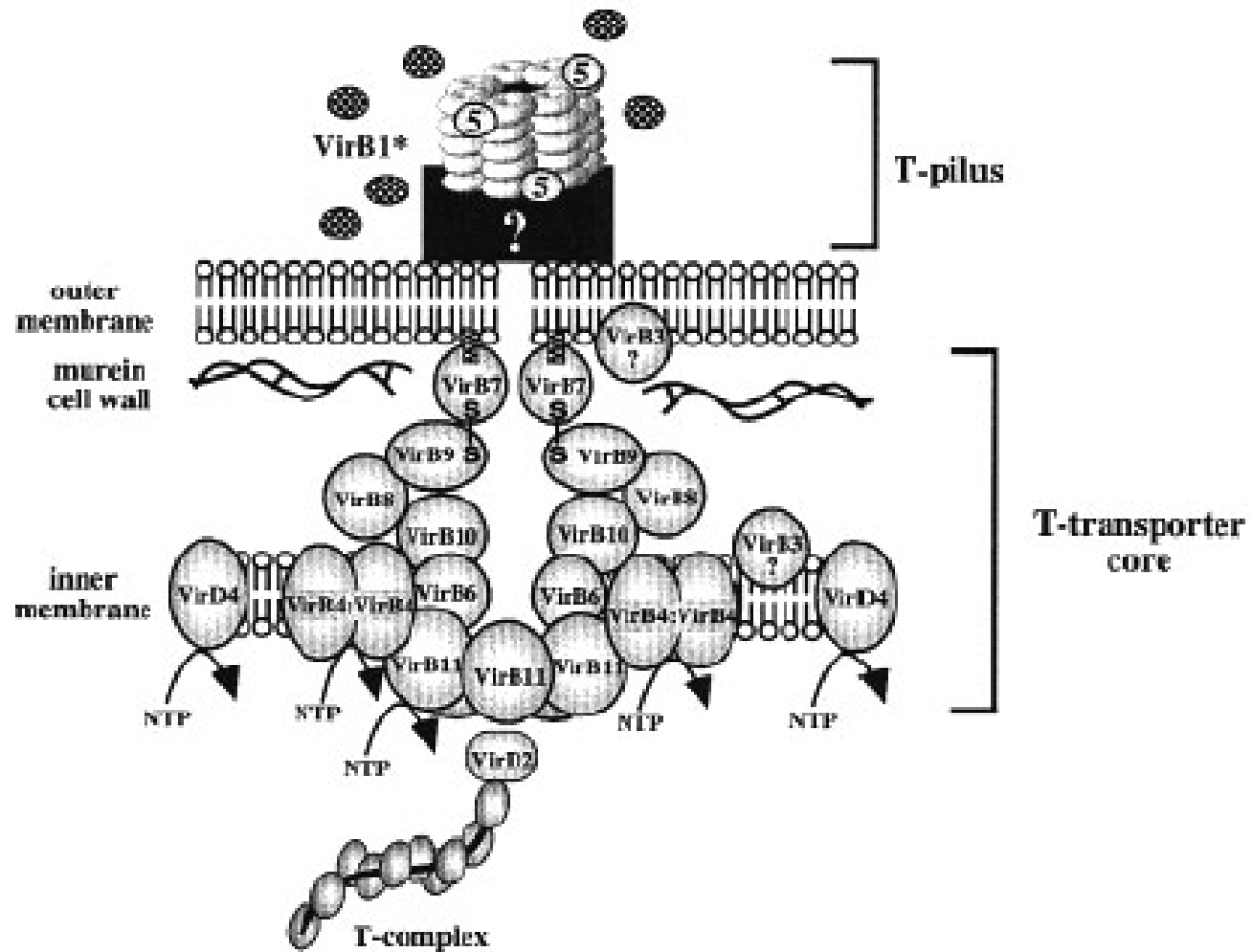
Il T-DNA è rilasciato a singolo filamento (T-strand)

VirD1 riconosce le estremità del T-DNA e promuove il legame di VirD2 all'estremità sinistra del T-DNA

E' probabile che entrambe siano necessarie per l'idrolisi del legame fosfodiesterico



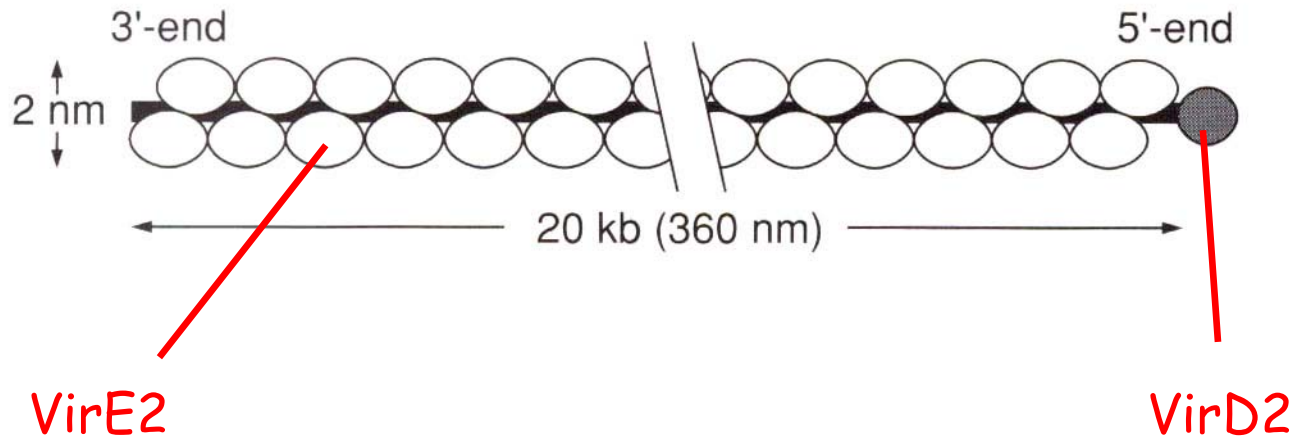
trasferimento dalla cellula batterica a quella vegetale



Intervengono 11 proteine codificate dall'operone *virB* e *VirD4*

T-complex

Il T-DNA è trasferito come **singolo filamento** (ssDNA)
La formazione del complesso protegge il ssT-DNA da
attività esonucleasiche 3' e 5' ed endonucleasiche



il legame di VirE2 è cooperativo

~ 600 molecole di VirE2 (PM 60.5 kDa) sono richieste per ricoprire un filamento di 20 kb

VirD2 forma un legame fosfotirosina con l'estremità 5' del T-DNA

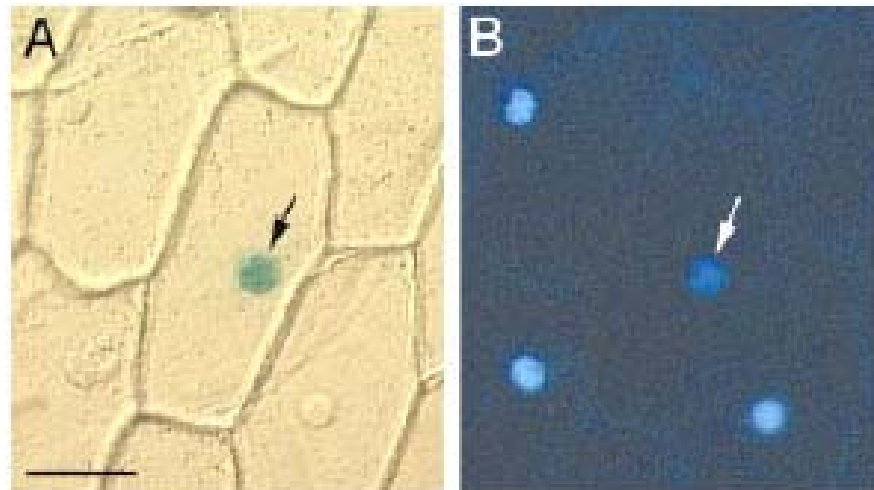
Nel nucleo entrano solo molecole inferiori a 40-60 kDa a meno che non abbiano **NLS** (nuclear localization signal)

VirD2 possiede una sequenza NLS

VirE2 possiede 2 sequenze NLS

studi di immunolocalizzazione e di fusione con una proteina reporter (GUS) hanno mostrato che entrambe entrano nel nucleo

VirE2::GUS



colorazione
con DAPI
(nucleo)

Integrazione del T-DNA nel genoma vegetale

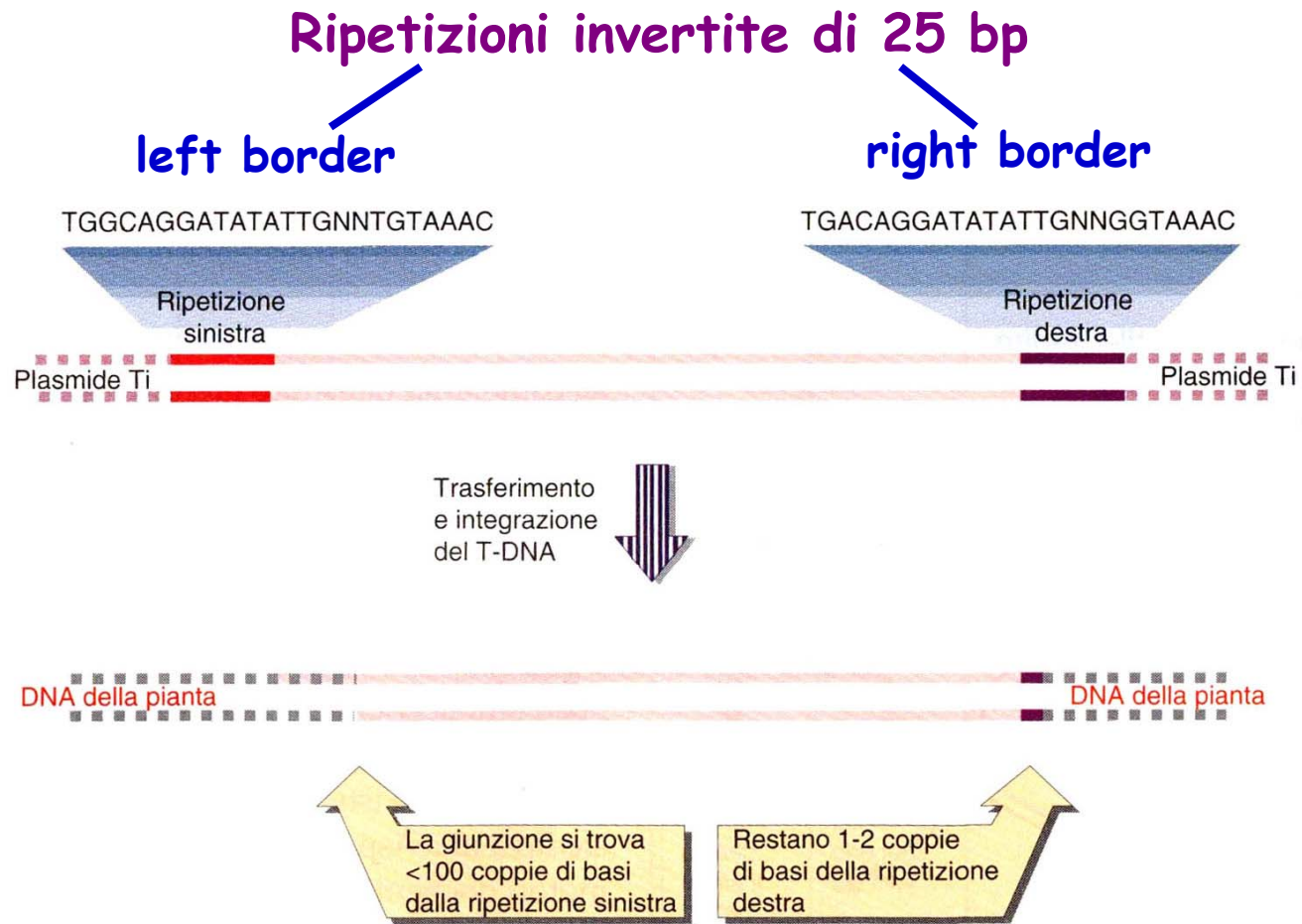
I siti di interazione sono casuali, ma generalmente nelle regioni con **attiva trascrizione**

In *Arabidopsis* è stata osservata un'inserzione ogni 10 cM

A livello genico si distribuisce sia nelle zone codificanti che nelle zone non codificanti



Fig. 3. The positions of T-DNA insertions obtained from various T-DNA-tagged *Arabidopsis* genes (K. Feldmann, unpublished). The insertions (vertical bars) are evenly distributed along the generalised gene shown. The open rectangles correspond to exons, which are numbered starting from the exon including the ATG 'start' codon.



L'integrazione al 5' del filamento T è estremamente precisa (penultimo nucleotide legato a VirD2)

probabile ruolo di VirD2 nel mediare la precisione dell'integrazione

Al 3' meno precisa, si possono avere delezioni nel T-DNA fino a 100 bp

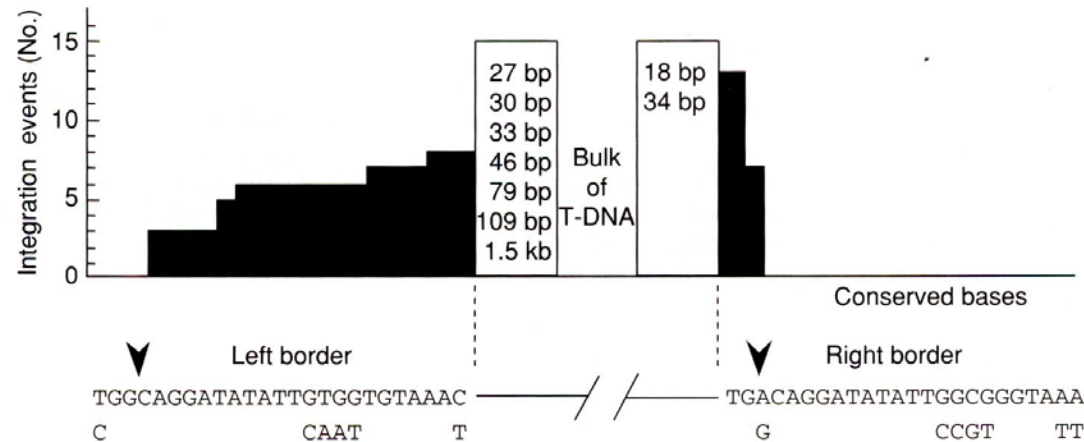
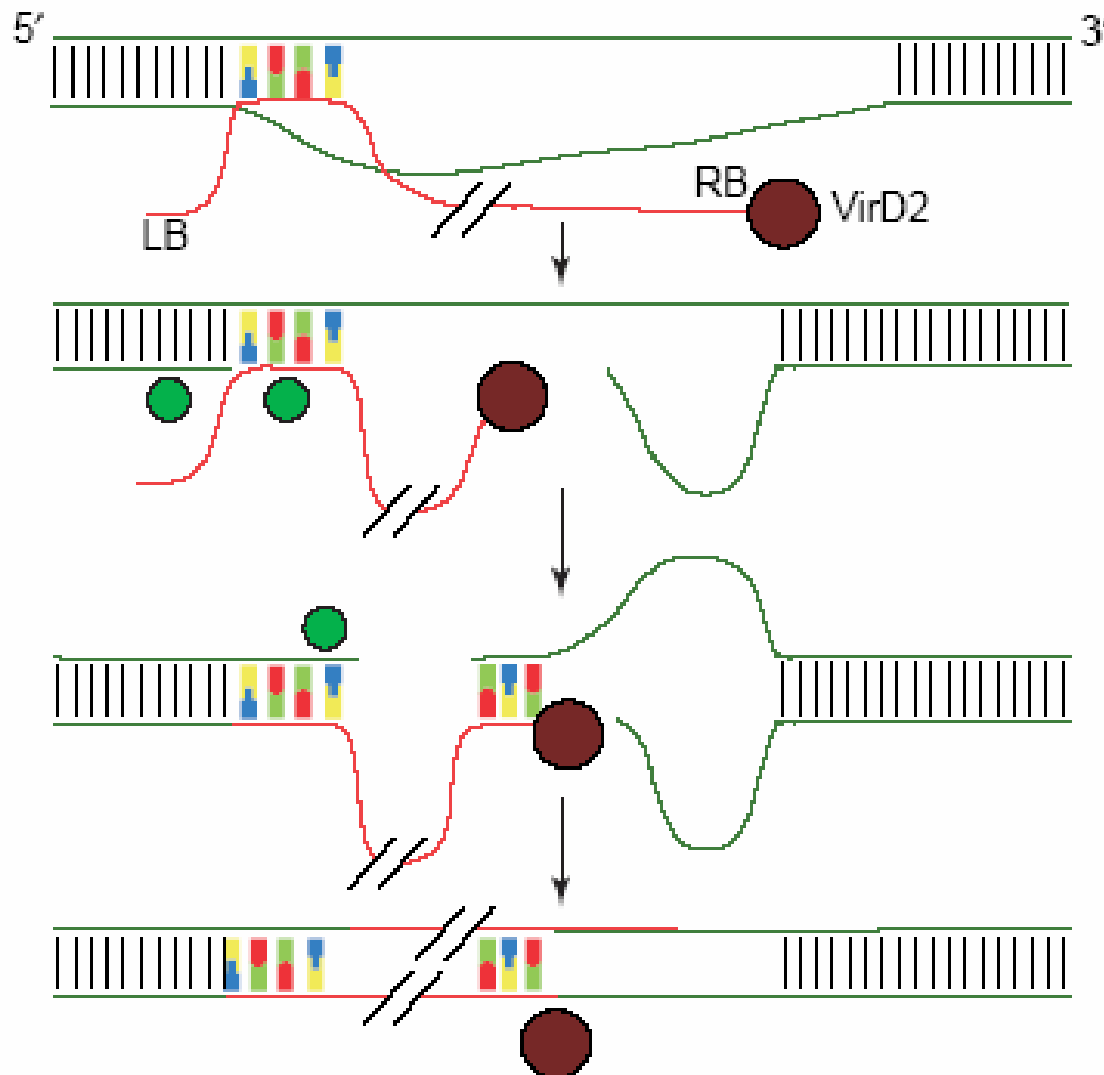


Fig. 4. T-DNA integration into plant DNA. The figure shows the results of an analysis of 15 independent integration events into the genomes of either *Arabidopsis thaliana* or tobacco (*Nicotiana tabacum*). The central part of the figure represents the T-DNA, with the nucleotide sequences of its left and right borders detailed (the sequences shown are for nopaline strains; bases deviating from it in octopine strains are shown below the main sequence). Arrows indicate the positions of T-DNA nicking (which takes place in the complementary strand); the region between the two nicking sites is transferred to the plant cell. The upper part of the figure shows the extent to which the border regions of the T-DNA were conserved in each case where T-DNA became integrated in the plant genome. Each filled 'step' represents the number of integration events, measuring from the horizontal axis for the outermost steps, or from the top of the last step for inner steps (vertical axis) that conserved bases of the T-DNA border to the extent shown (horizontal axis). The horizontal length of the steps corresponds exactly to the central part of the figure, in terms of both length (i.e. showing the number of bases conserved) and position (e.g. steps above the left border refer directly to the left border). The integration events where the whole border was lost, up to a position within the bulk of the T-DNA, are indicated in the open boxes by the size of their deletions (measured from the nicking site). Note that each integration event involves both the left and the right border. The integration of the 'left-hand' end of the T-DNA involves a short region of homology with the plant DNA preinsertion site (>5 bp), whereas the integration of the 'right-hand' end involves a region of microhomology (>1 bp). Reproduced, with permission, from Ref. 20; data from Refs 25 and 26.

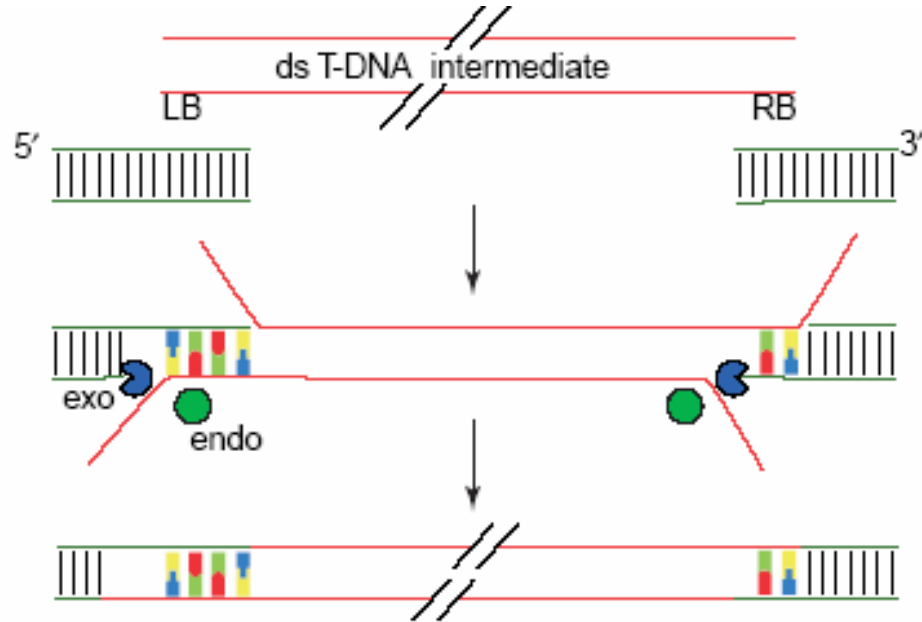
L'integrazione del T-DNA avviene secondo un meccanismo di **RICOMBINAZIONE NON OMOLOGA**
(ricombinazione illegittima)

- al **3'** (estremità sinistra del T-DNA) è richiesta un'omologia di pochi nucleotidi (**<5**)
- al **5'** (estremità destra del T-DNA) l'omologia con il DNA vegetale può essere ristretta ad **un solo nucleotide**

microhomology-dependent model

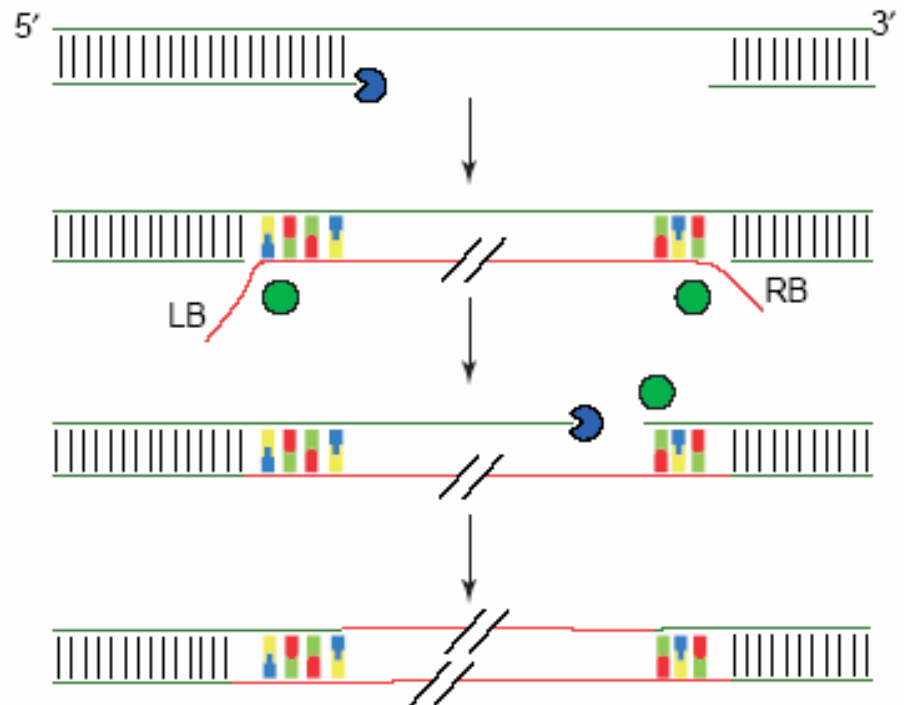


ruolo attivo di VirD2 (ligasi?)



double-strand break (DBS)
repair model

single-strand-gap (SSG)
repair model



Nel processo di integrazione del T-DNA sono coinvolte anche proteine vegetali

Studi in lievito hanno mostrato un ruolo fondamentale di proteine coinvolte nei meccanismi di riparazione del DNA

Il mutante di *Arabidopsis AtKU80* è resistente all'infezione di *Agrobacterium*

AtKU80 è coinvolta nei meccanismi DSB repair