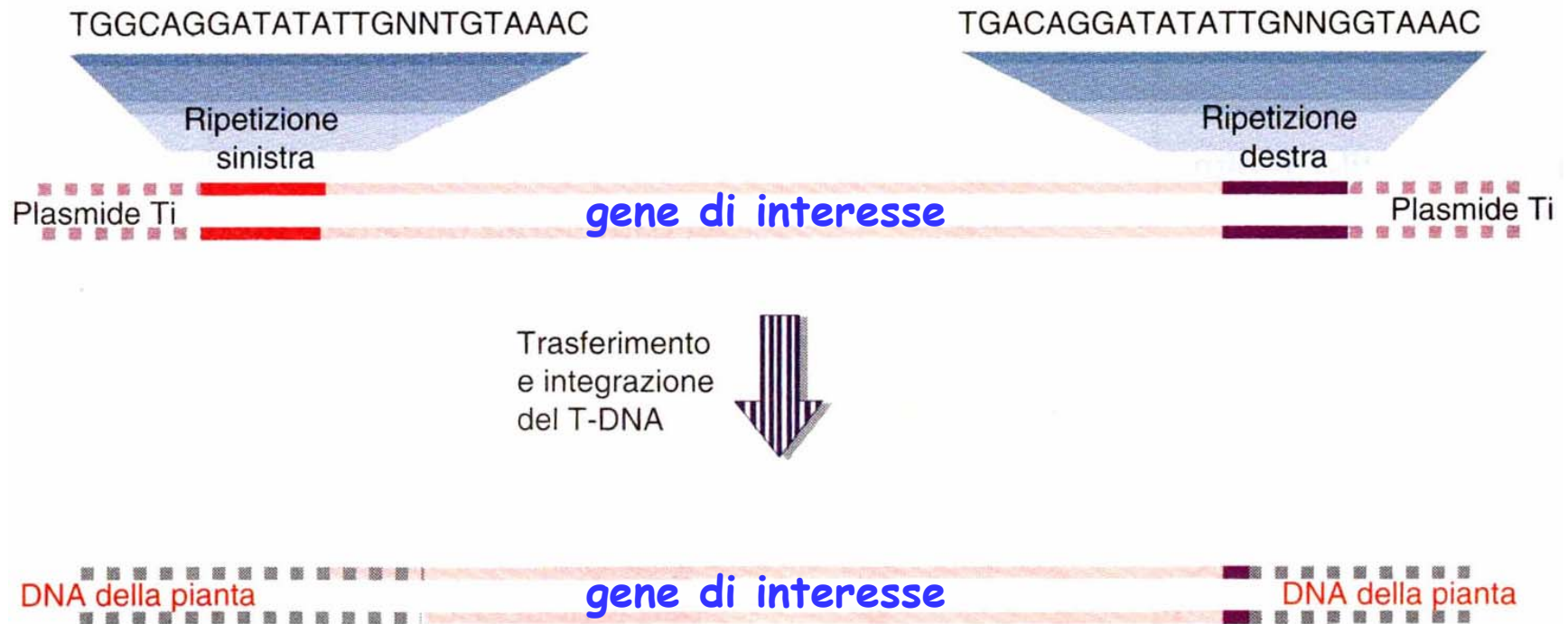


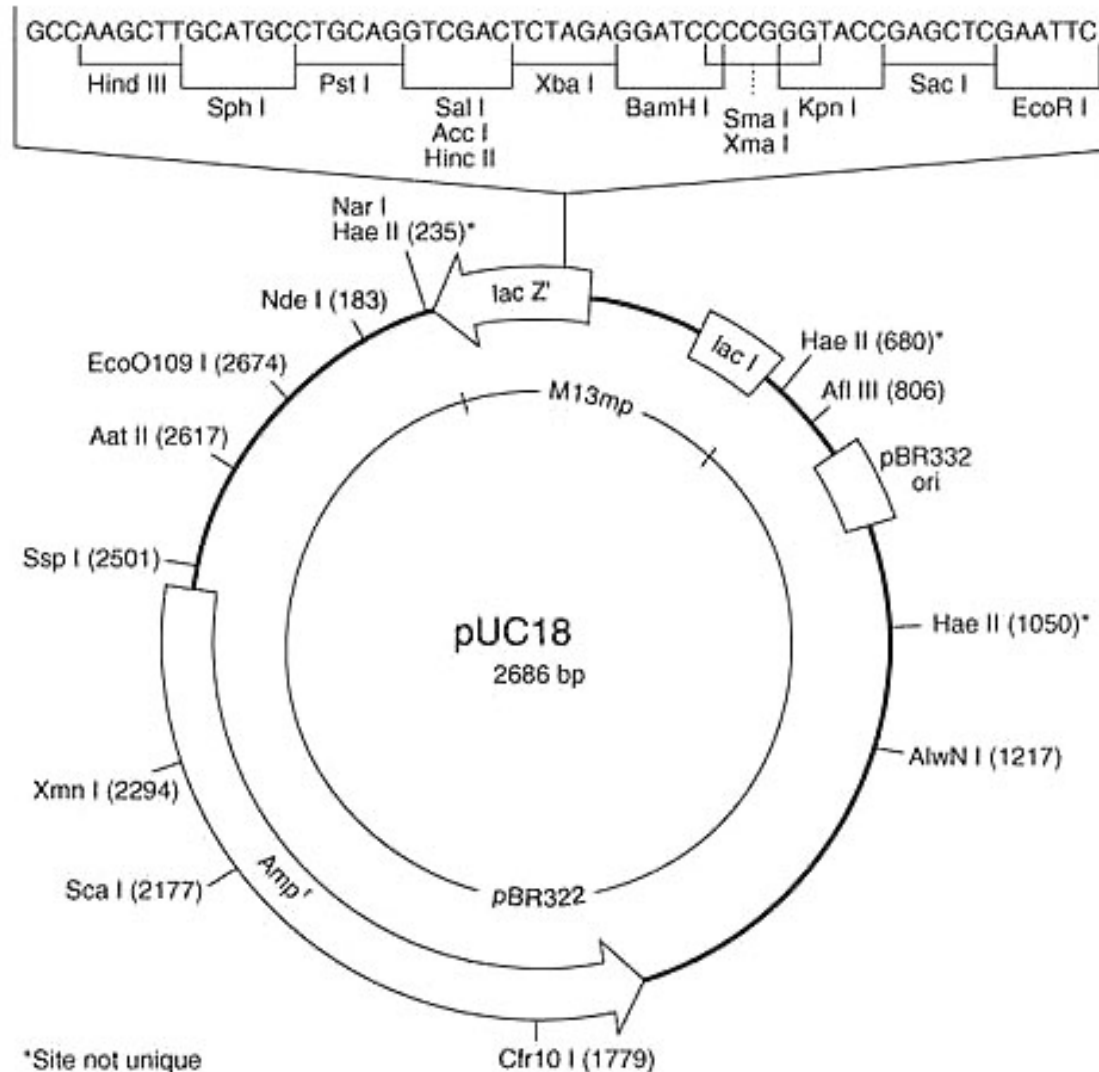
**COME GENERARE UNA PIANTA TRANSGENICA
UTILIZZANDO AGROBACTERIUM TUMEFACIENS**

Agrobacterium è in grado di trasferire nel genoma vegetale qualsiasi sequenza si trovi delimitata dai **right** e **left borders**



Il gene di interesse è in genere mantenuto in vettori di clonaggio in *E. coli*

mcs →
multi cloning site



Il gene deve quindi essere trasferito nel plasmide Ti di *Agrobacterium tumefaciens*

Limitazioni per l'uso di plasmidi Ti naturali

- la sovrapproduzione di auxina e citochinina (fenotipo tumorale) non permette la rigenerazione della pianta
- i geni per la biosintesi delle opine non sono necessari
- difficoltà nel manipolare plasmidi di dimensioni molto grandi come il plasmide Ti (200 kbp)
- non hanno un'origine di replicazione per *E. coli*

Come si risolve il problema?

```
graph TD; A[Come si risolve il problema?] --> B[sistema vettore binario]; A --> C[sistema vettore cointegrativo];
```

**sistema
vettore binario**

**sistema
vettore cointegrativo**

sistema vettore binario

Principio di base: DNA da trasferire e geni vir possono trovarsi su plasmidi differenti

- DUE PLASMIDI

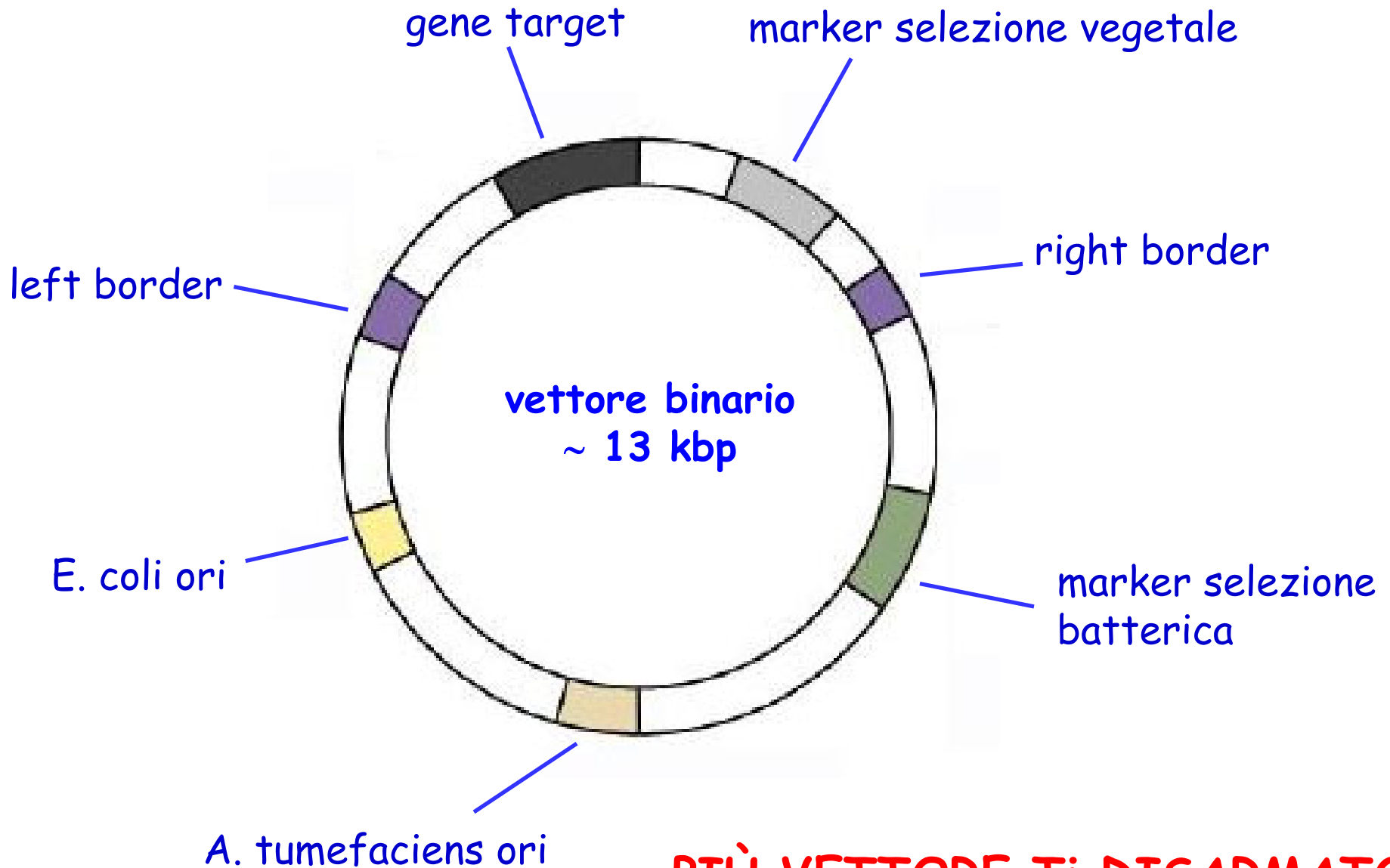
- vettore binario

- ✦ contiene E. coli e A. tumefaciens ori
 - ✦ marker di selezione batterico
 - ✦ marker di selezione vegetale
 - ✦ right/left borders del T-DNA
 - ✦ gene di interesse
 - ✦ non contiene i geni vir

- plasmide Ti "disarmato"

- ✦ non contiene il T-DNA
 - ✦ contiene i geni vir

VETTORE BINARIO



PIÙ VETTORE TI DISARMATO

plasmide Ti "disarmato"

vettore binario

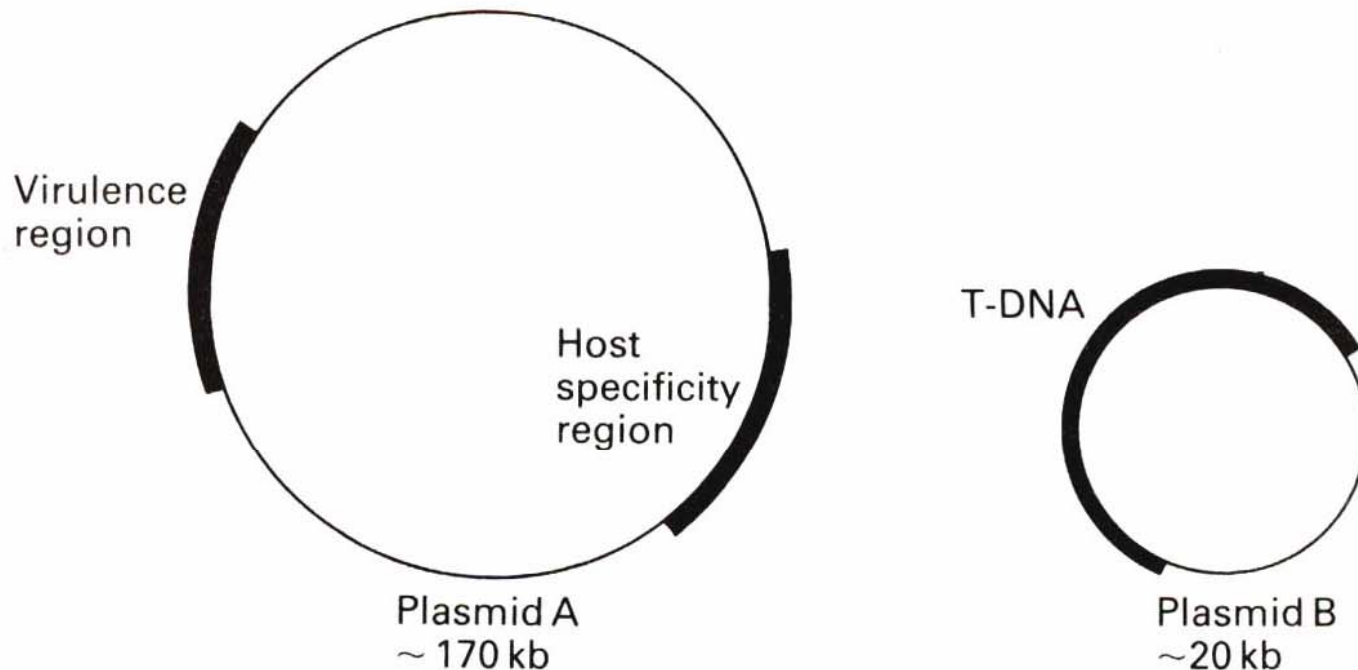


Figure 7.11 The binary vector strategy. Plasmids A and B complement each other when present together in the same *Agrobacterium tumefaciens* cell. The T-DNA carried by plasmid B is transferred to the plant chromosomal DNA by proteins coded by genes carried by plasmid A.

sistema vettore cointegrativo

Principio di base: due plasmidi
ricombinano per dar luogo al
plasmide Ti

- DUE PLASMIDI

- vettore cointegrativo

- ✦ contiene E. coli ori (non A. tumefaciens ori)
- ✦ marker di selezione batterico
- ✦ marker di selezione vegetale
- ✦ right border del T-DNA
- ✦ gene target
- ✦ DNA omologo al plasmide Ti

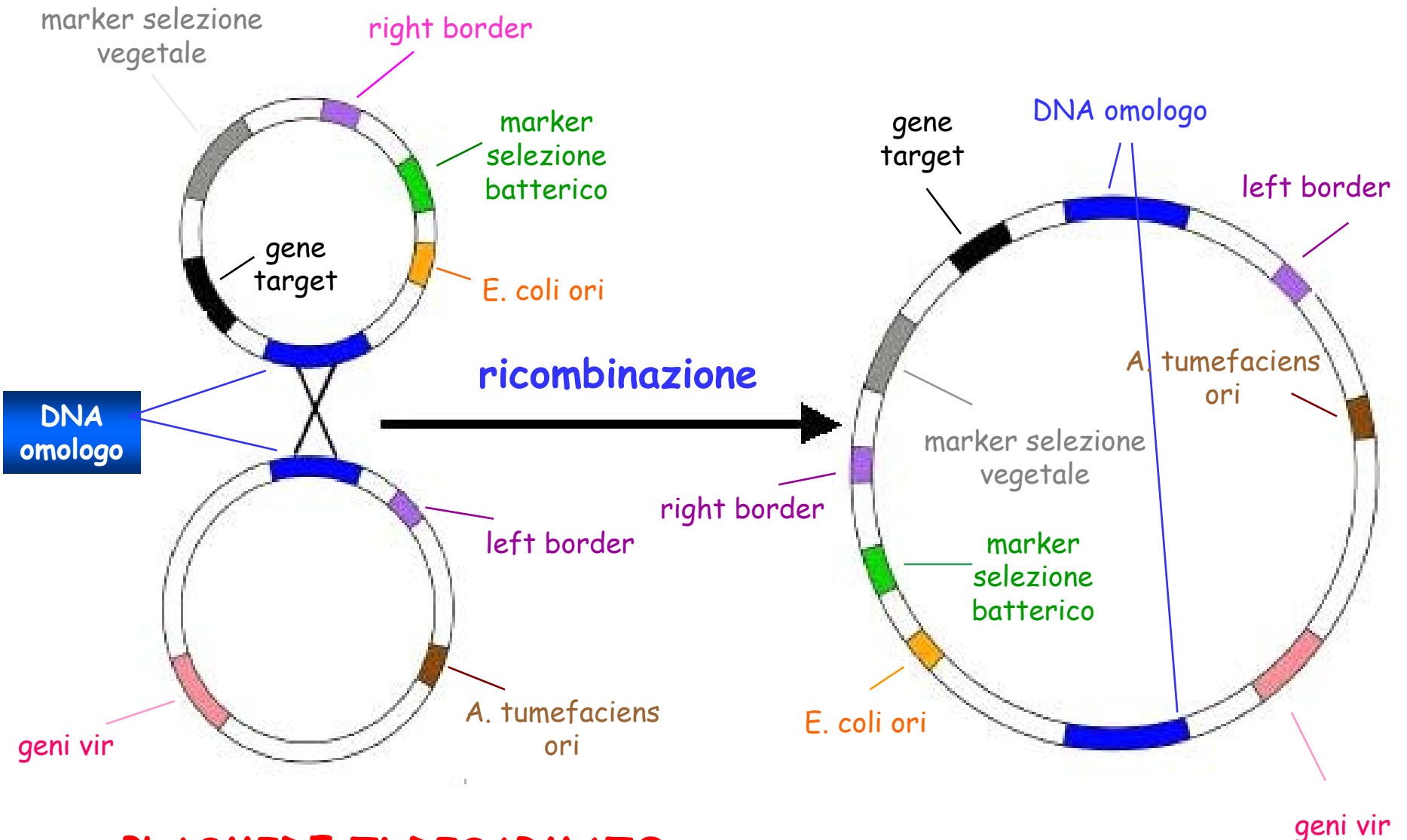
- plasmide Ti "disarmato"

- ✦ non contiene T-DNA
- ✦ contiene i geni vir

cointegrazione

VETTORE COINTEGRATIVO

PLASMIDE TI RICOMBINANTE

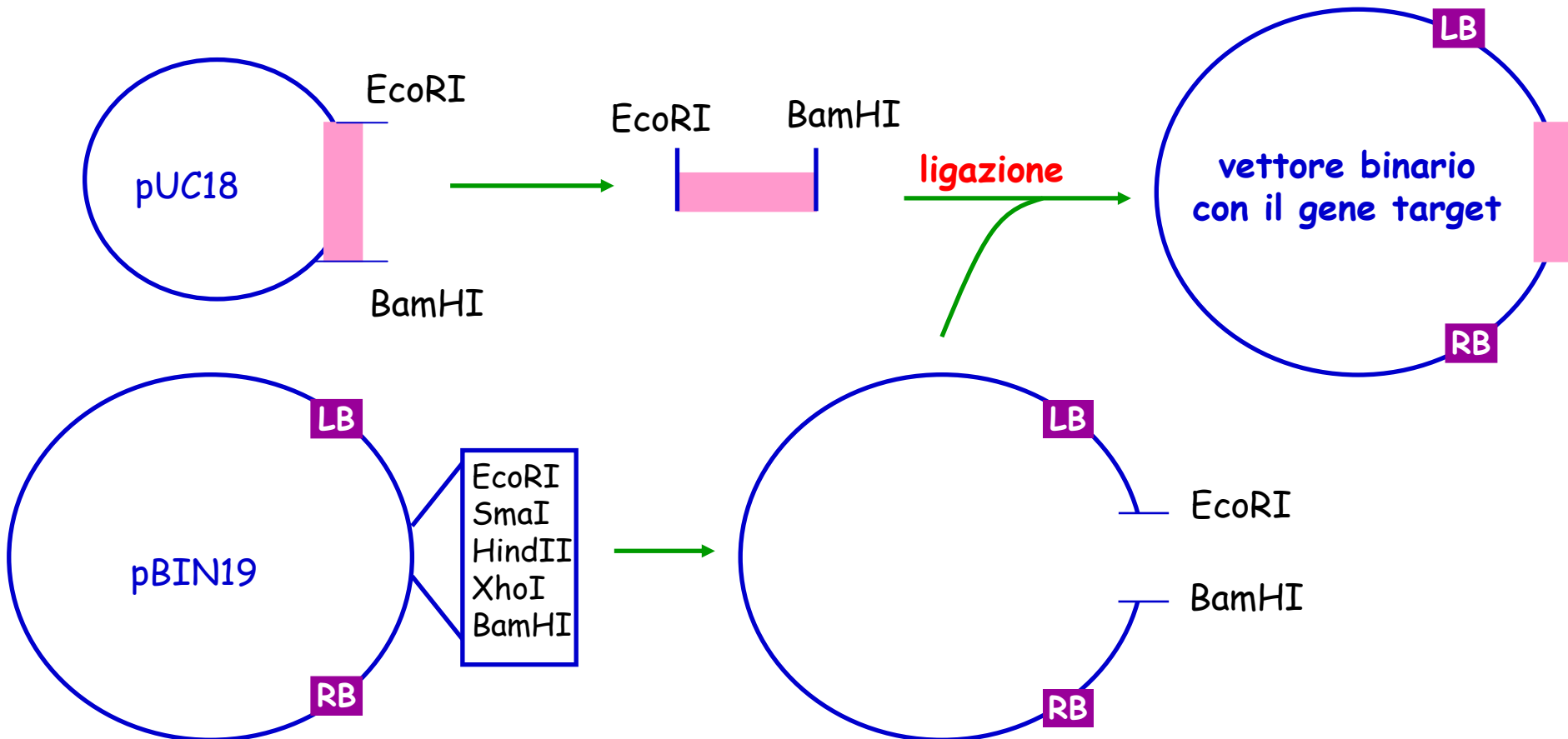


PLASMIDE TI DISARMATO

PLASMIDI TI RICOMBINANTI

- Sistema del vettore binario
 - Due plasmidi
 - geni vir su uno
 - T-DNA sull'altro
- Sistema del vettore cointegrativo
 - Inizialmente due plasmidi
 - Ricombinazione per ottenere un unico plasmide
 - geni vir e T-DNA sullo stesso plasmide

Dal plasmide di clonaggio in *E. coli* si recupera il gene target (cDNA) mediante digestione con opportuni enzimi di restrizione e si inserisce nel **vettore binario** o nel **vettore di cointegrazione**



vettori binari

Vector ^a	Size (kb)	Unique restriction sites in T-DNA	LacZ	Bacterial selection on	Selectable marker at	Replication origin	
						<i>Agrobacterium</i>	<i>E. coli</i>
pBIN19	11 777	9	Yes	Kanamycin	RB	pRK2	pRK2
pC22	17 500	2	No	Ampicillin, streptomycin and spectinomycin	RB	pRi	ColE1
pGA482	13 200	7	No	Tetracycline	RB	pRK2	ColE1
pPCV001	9200	6	No	Ampicillin	RB	pRK2	ColE1
pCGN1547	14 440	5	Yes	Gentamicin	LB	pRi	ColE1
pJJ1881	25 700	4	No	Tetracycline	LB	pRK2	pRK2
pPZP111	8909	9	Yes	Chloramphenicol	LB	pVS1	ColE1
pGreen0029	4632	18	Yes	Kanamycin	LB	pSa	pUC

Il vettore binario o il vettore cointegrato contenenti il gene target devono essere inseriti nel ceppo di *Agrobacterium* "disarmato"

CONIUGAZIONE



TRIPARENTAL MATING

ELETTROPORAZIONE

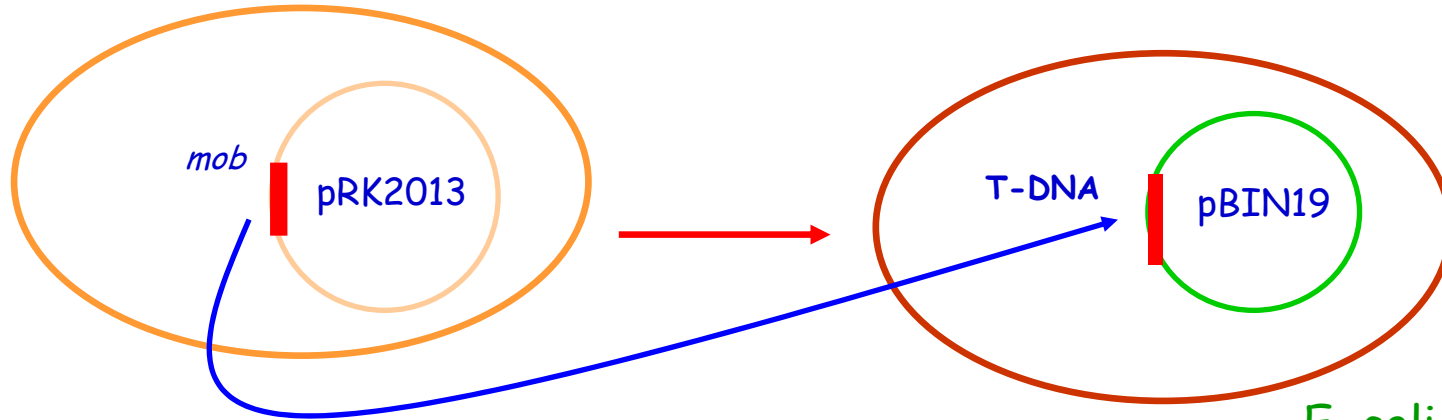


CONIUGAZIONE

TRIPARENTAL MATING

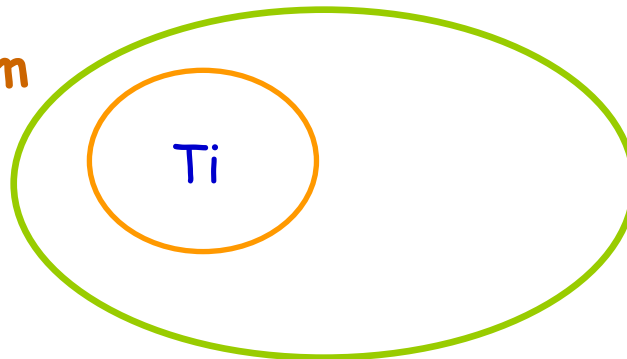
E. coli con plasmide helper

si utilizza un plasmide helper capace di mobilizzare se stesso e altri plasmidi



E. coli con
plasmide binario
o cointegrato

Agrobacterium

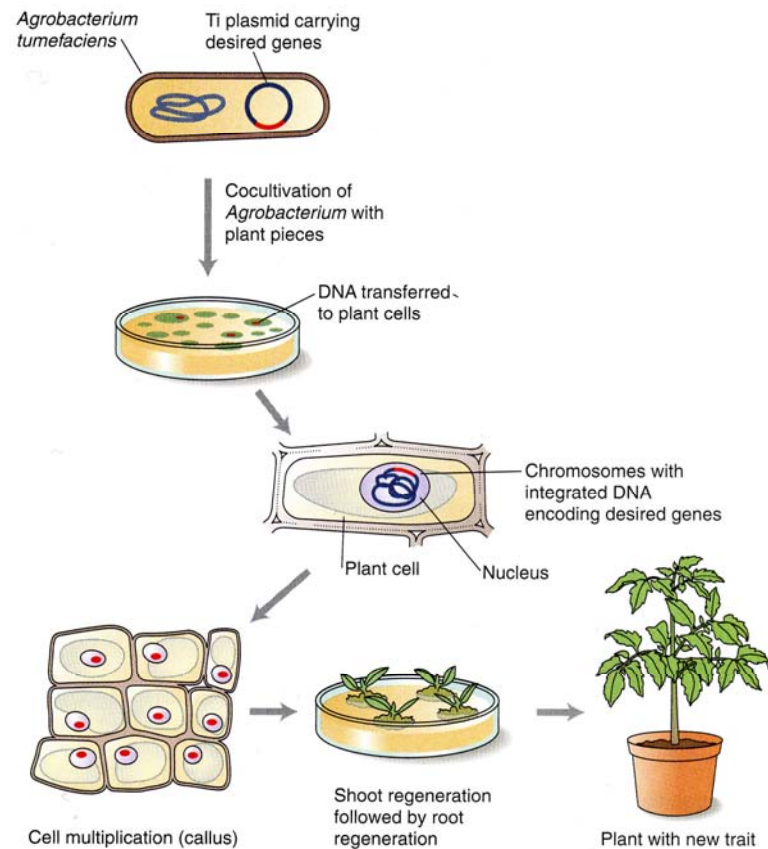


**Che cosa si utilizza per l'infezione con
Agrobacterium?**

Per la trasformazione con *Agrobacterium* si utilizzano **piccoli espianti di tessuti**

foglie fusto radici gemme cotiledoni

da cui verrà **rigenerata l'intera pianta**



Trasformazione mediata dall' *Agrobacterium*

- Vantaggi
 - Molto efficace
 - Espressione stabile
 - Basso numero di copie inserite (1÷5)
- Svantaggi
 - Un limitato numero di specie sono infettabili
(no leguminose e monocotiledoni)
 - Richiede colture cellulari per la rigenerazione

Utilizzo di SUPERBINARY VECTOR e CEPPI IPERVIRULENTI

super binary vector: vettori binari
contenenti *virC*, *virB*, *virG*

TABLE 3 Recent Advances in *Agrobacterium* Gene Transfer Technology for the Transformation of Cereals

Plant	<i>Agrobacterium</i> strain	Vector name	Strain/vector properties	Target tissue
Rice	EHA101 LBA4404	pIG121 pTOK233	Normal strain LBA4404 containing superbinary vector pTOK233 performed better than hypervirulent strain EHA101 containing the same superbinary vector	Immature embryos, callus, suspension cells
Maize	LBA4404	pTOK233	Superbinary vector	Immature embryos
Barley	AGL1	pDM805	Hypervirulent strain	Immature embryo explants
Wheat	C58 (ABI)	pMON18365	Binary vector	Immature embryos, embryogenic callus

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*

**Trasferimento
diretto del DNA**

- sistema biolistico
- trasformazione protoplasti
- microiniezione

elettroporazione protoplasti

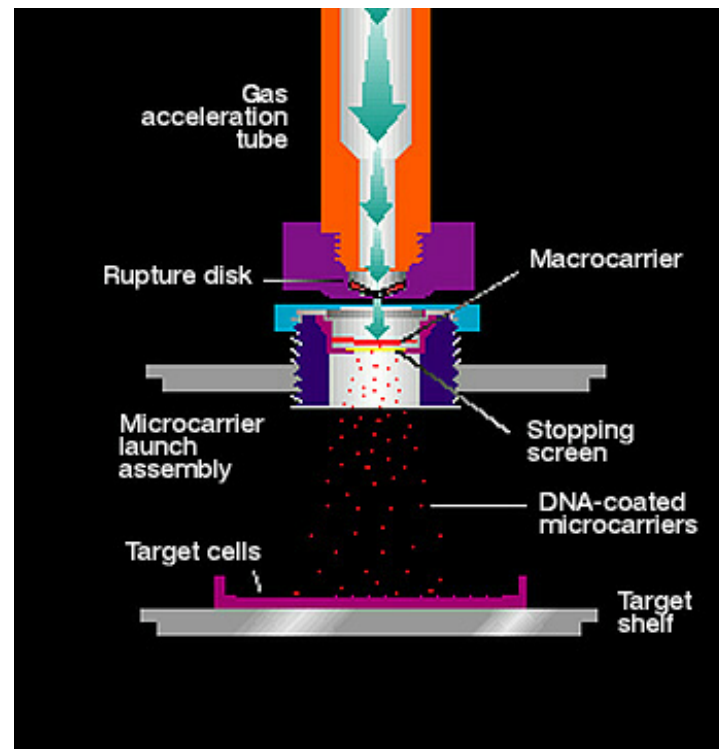


microiniezione
(funziona bene negli animali
poco nelle piante)

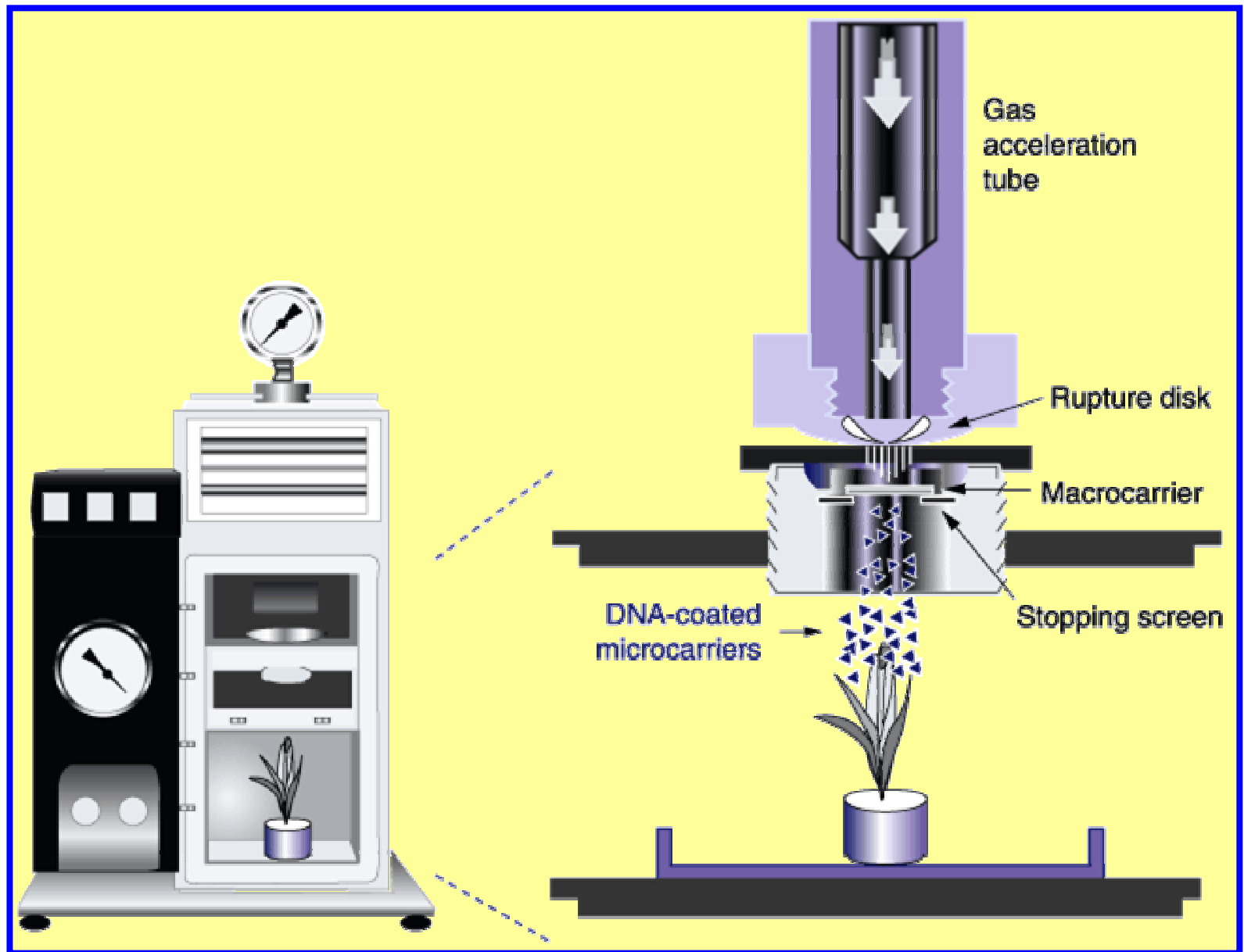
SISTEMA BIOLISTICO PARTICLE GUN

1987 Sanford e colleghi

particelle di oro o tungsteno ricoperte di DNA vengono accelerate e
"sparate" sul tessuto
penetrando rilasciano il DNA che viene integrato nel genoma vegetale



prima si usava
polvere da
sparo per
l'accelerazione
oggi He



EdgeCARD Hood
CALIBERED BIOPHARM, INC.

Gene Gun

DNA Being Coated
With Gold

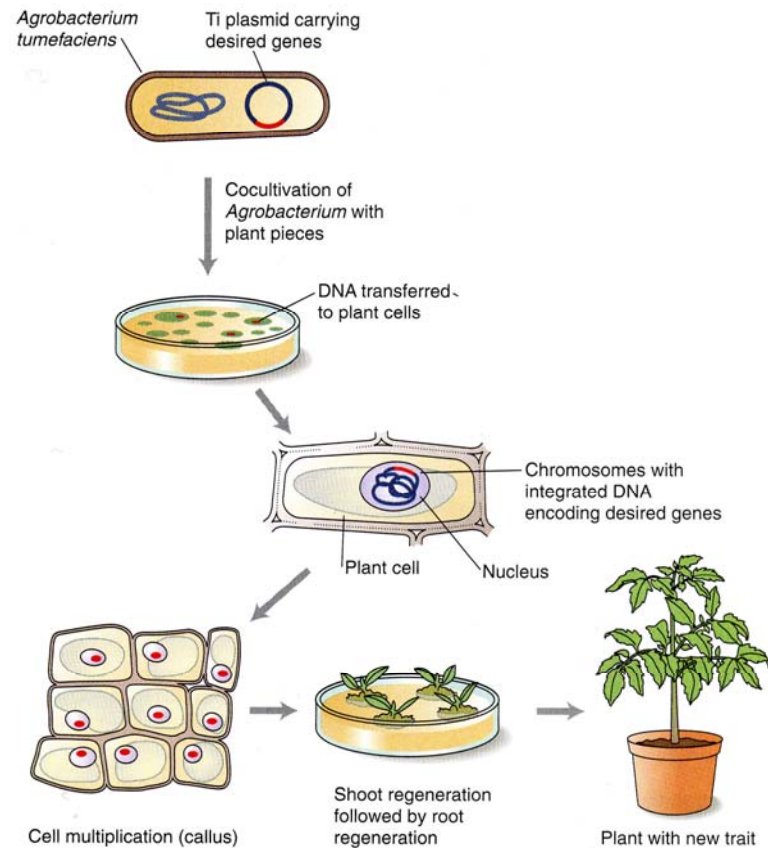


Helios "gene gun"



Anche per la trasformazione con il sistema biolistico si utilizzano
espianti di tessuti

foglie fusto radici gemme cotiledoni
da cui verrà **rigenerata l'intera pianta**



Trasformazione con metodo biolistico

- **Vantaggi**

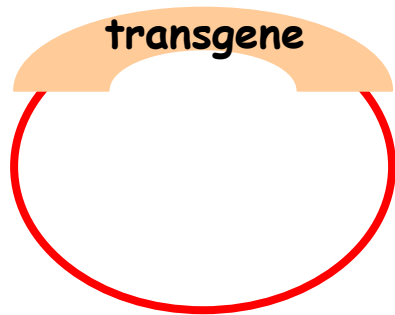
- Abbastanza efficiente
- Utilizzabile con qualsiasi specie
(trasformazione governata da parametri fisici e non biologici)
- Possibilità di inserire più geni

- **Svantaggi**

- Integrazione del plasmide
- Eventi di ricombinazione e riarrangiamenti del DNA esogeno (copie multiple, concatenameri, frammentazioni del transgene)
- Richiede colture cellulari per la rigenerazione

"Trasformazione pulita"

SCOPO: evitare che, utilizzando il sistema biolistico, oltre al gene di interesse, nel genoma vegetale, si integrino anche sequenze di DNA non desiderate



DNA plasmidico

utilizzo della cassetta senza il plasmide

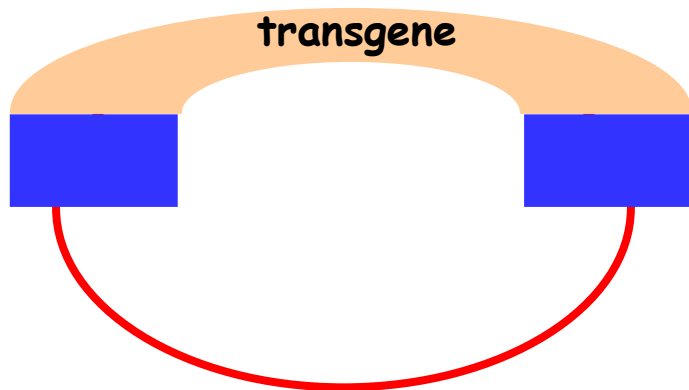


cassetta

svantaggio: il DNA linearizzato si degrada molto facilmente -
bassissima resa

"Trasformazione pulita"

Geni killer



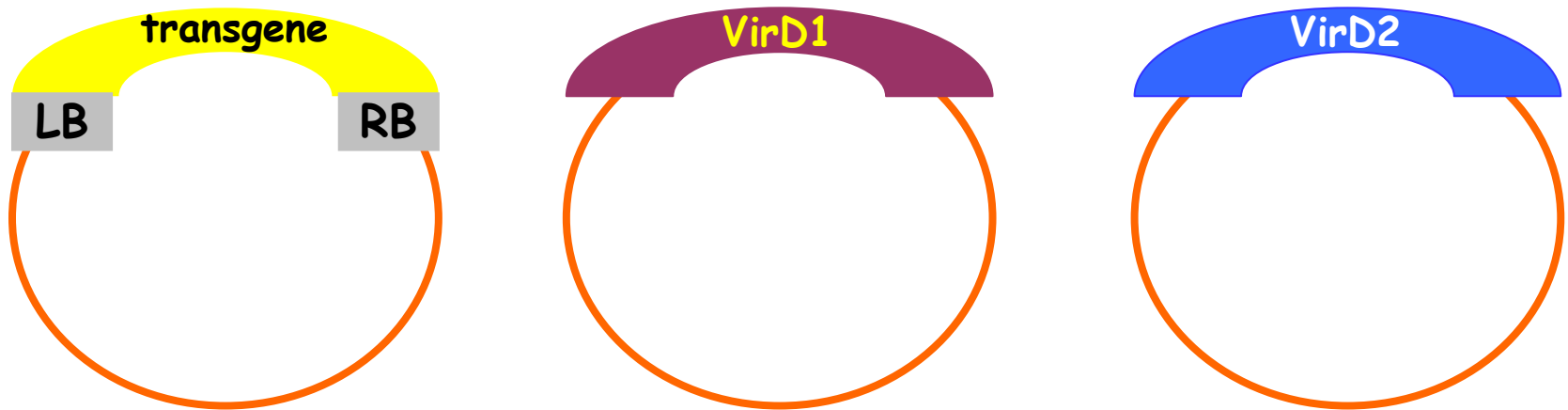
gene killer
conferisce fenotipo
letale alle piante
trasformate

sopravvivono solo le piante nelle
quali si è integrato
esclusivamente il transgene

"Trasformazione pulita"

Tecnica della trasformazione "agrolistica"

Introduzione di tre plasmidi con metodo biolistico



VirD1 e VirD2 riconoscono le sequenze RB e LB ed excidono il transgene dal plasmide

Spesso la limitazione maggiore alla trasformazione delle piante non è la metodica di trasferimento del DNA, quanto la **rigenerazione** della pianta

