

**SELEZIONE DELLE PIANTE
TRASFORMATE E PROGETTAZIONE
DI UN COSTRUTTO TRANSGENICO**

SELEZIONE DELLE PIANTE TRASFORMATE

nel costrutto si inserisce un gene marcatore
per la selezione

- Resistenza ad un antibiotico
- Resistenza ad un erbicida

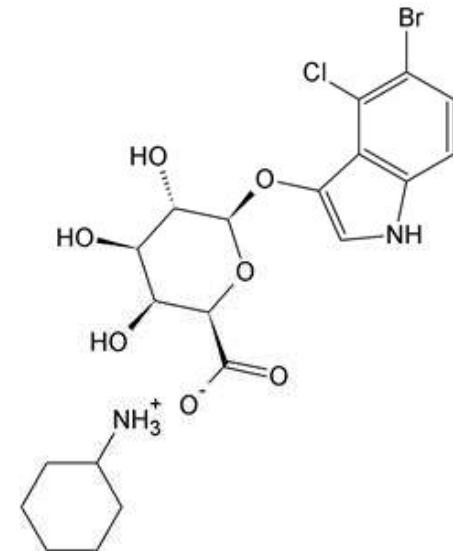
gene (prodotto)	sorgente	fenotipo
<i>nptII</i> (neomicina fosfotransferasi)	E. coli	resistenza antibiotici aminoglicosidici (neomicina, kanamicina)
<i>hpt</i> (igromicina fosfotransferasi)	Klebsiella	resistenza antibiotico igromicina
<i>aad</i> (aminoglicoside acetiltransferasi)	Shigella flexneri	resistenza alla streptomina, spectomicina e sulfonammidi
<i>dhfr</i> (diidrofolato reduttasi)	Topo	resistenza al metotrexato
<i>epsps</i> (5-enolpiruvil shikimato 3-fosfato sintasi)	Petunia hybrida	resistenza all'erbicida glifosato (Round-up)
<i>bar</i> (fosfoinotricina acetiltransferasi)	Streptomyces hygroscopicus	resistenza alla fosfoinotricina (PPT), componente degli erbicidi: glufosinato, Basta, bialophos

GENI REPORTER

Permettono di "vedere" l'espressione di un gene

- ***gus***
 β -glucuronidasi

Catalizza l'idrolisi dei glucuronidi determinando la formazione di una colorazione blu



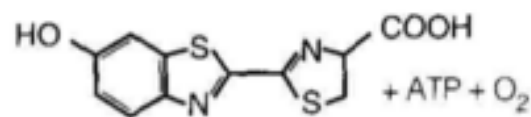
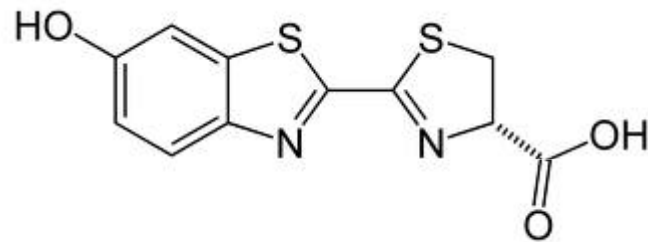
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl b-D-glucuronide
cyclohexylamine salt (X-Gluc)

GENI REPORTER

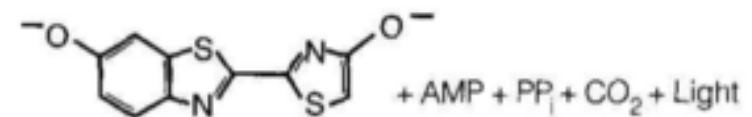
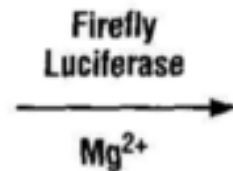
- *luc*
luciferasi



Emissione di
luce in
presenza di
luciferina



Beetle Luciferin



Oxyluciferin

GENI REPORTER

- regolatori
biosintesi
antocianine

Aumento della pigmentazione



Pelargonium
(Ceranum)



Rosa
(Rose)



Delphinium
(Larkspur)

- GFP
green fluorescent
protein
(medusa *Aequorea victoria*)

Emissione di fluorescenza
intrinseca alla luce blu-UV

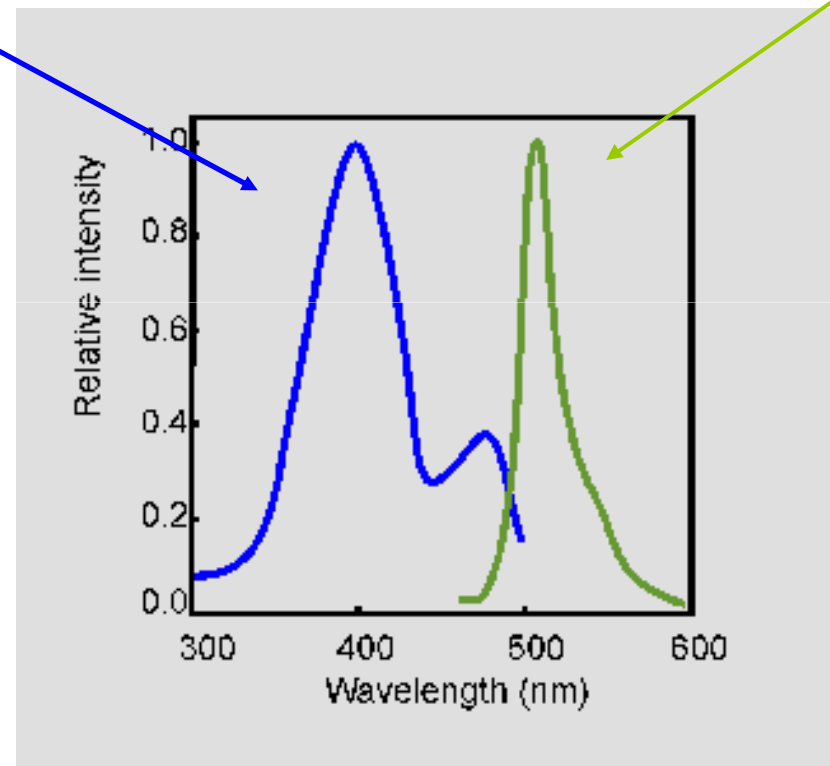
Vantaggi: non richiede substrati,
sensibile, uso sulla pianta vitale



GFP

spettro di eccitazione

spettro di emissione

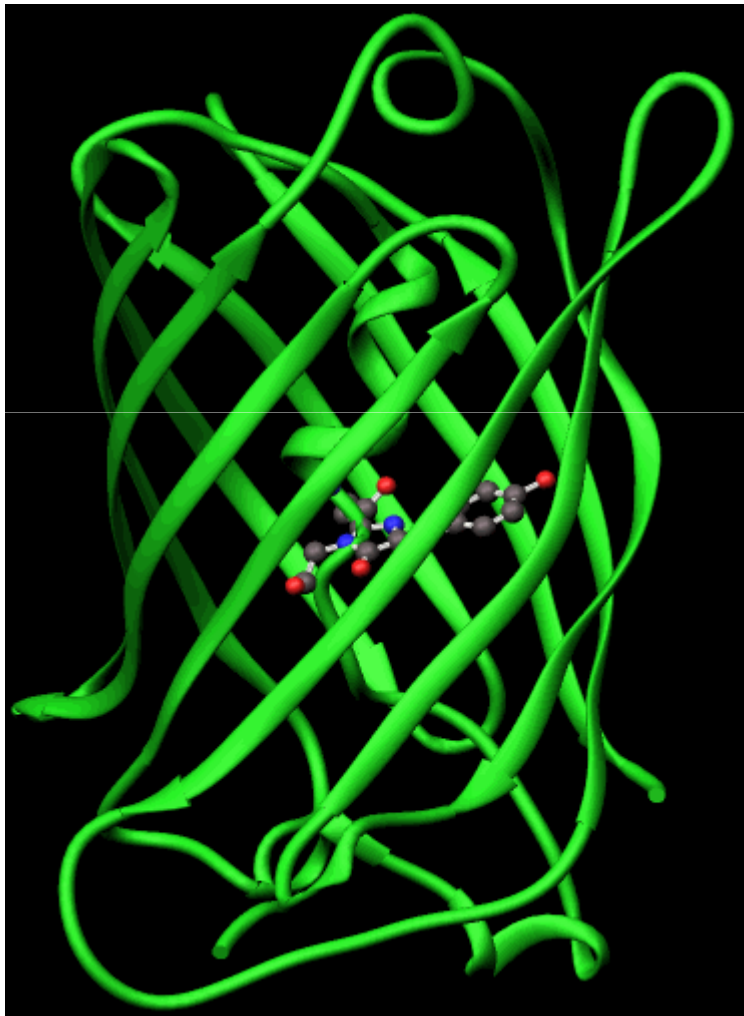


massimo 395 nm
470 nm

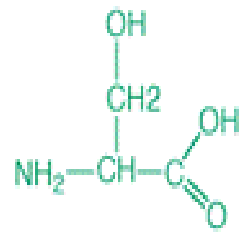
massimo 509 nm
spalla 540 nm

GFP

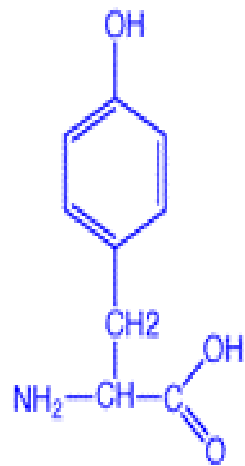
perché la GFP è fluorescente?



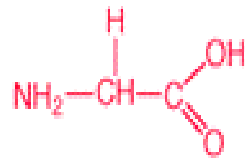
GFP



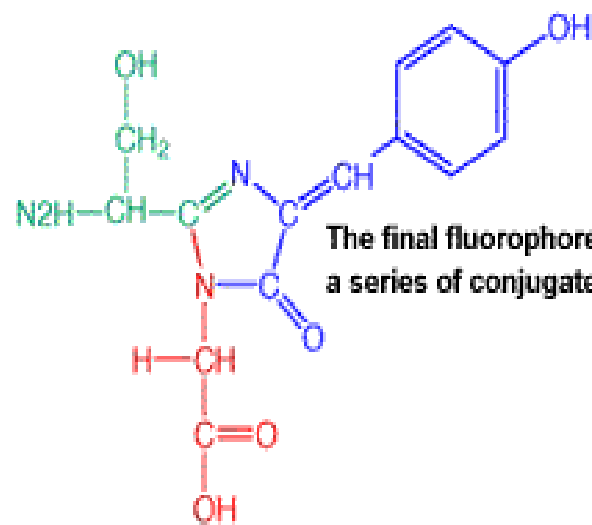
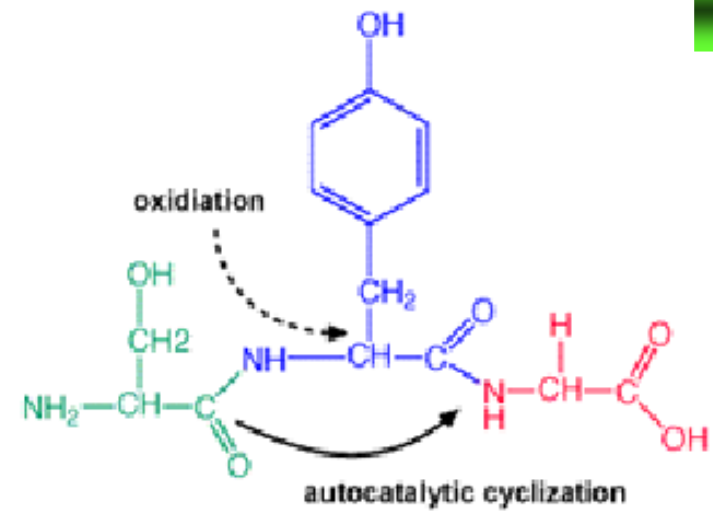
Ser 65



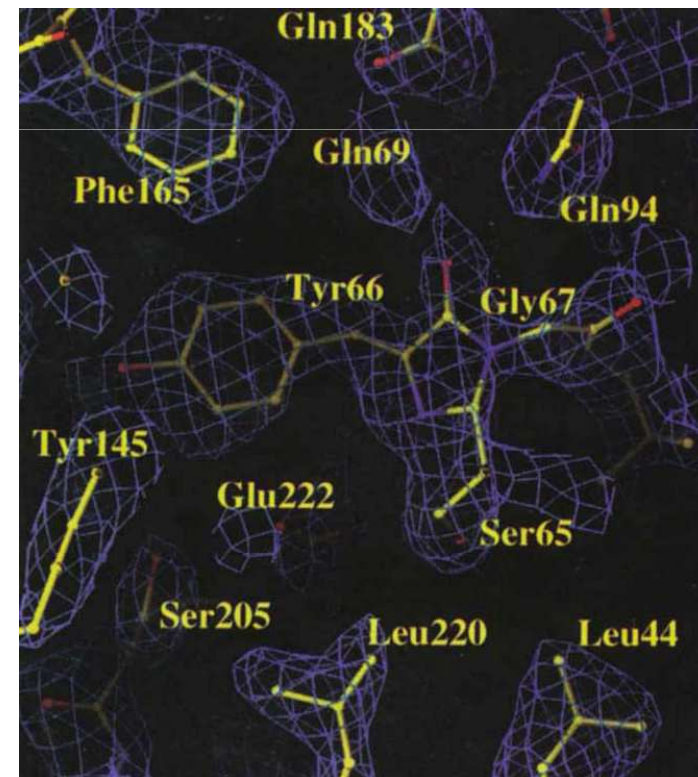
Tyr 66

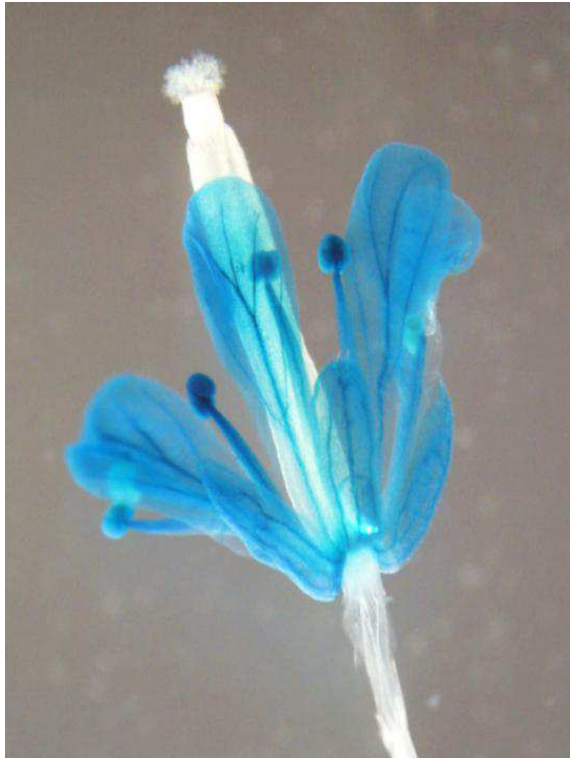


Gly 67

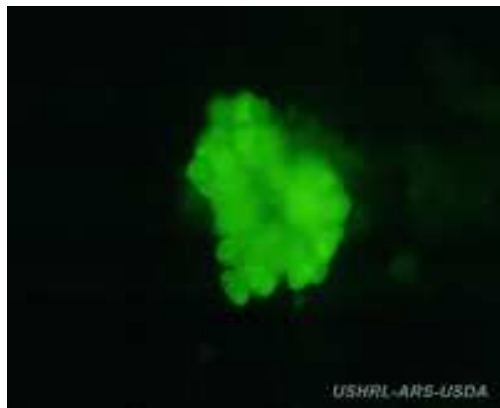
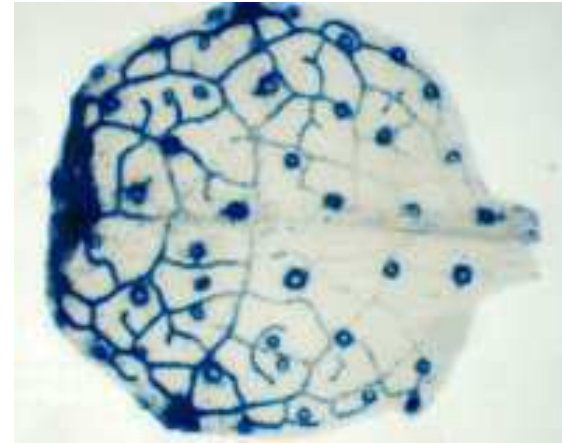


The final fluorophore contains a series of conjugated double bonds

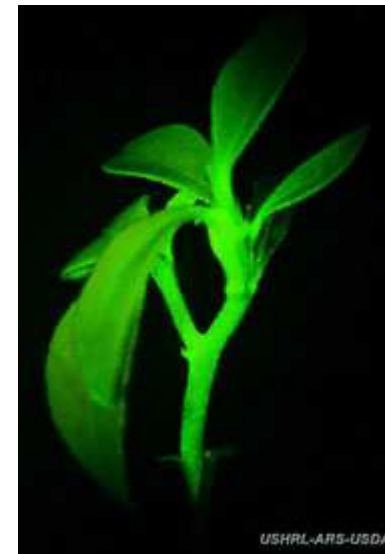




GUS



GFP



USHRL-ARS-USDA

**COME SI PROGETTA UN COSTRUTTO
TRANSGENICO?**

LB

RB

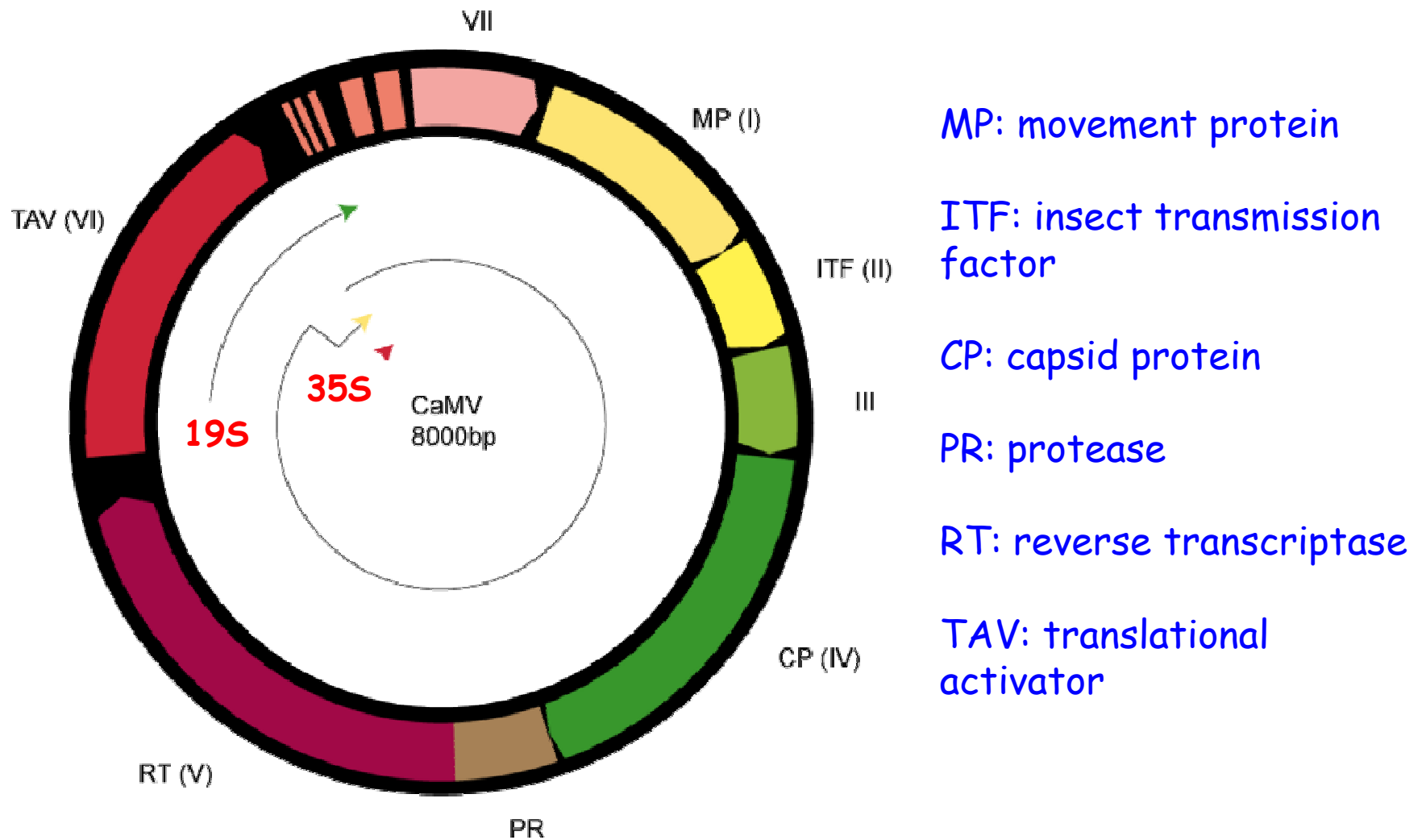


PROMOTORI

- COSTITUTIVI
- TESSUTO-SPECIFICI
- INDUCIBILI

- **Costitutivi**

- **CaMV 35S** (elevati livelli di espressione)
RNA 35S del virus a mosaico del cavolfiore
- **Actina di riso**
- **Ubiquitina di mais**
- **Nos, Ocs** (nopalina, octopina sintasi)



virus a mosaico del cavolfiore

- Tessuto-specifici

- semi
- radici
- foglie
- polline
- etc.

Tissue-specific promoters

α -Amylase

Glutenin

β -Hordenine

Phaseollin

Tissue expression

Aleurone

Endosperm

Endosperm

Cotyledon

- Inducibili

- espressione regolata dallo sviluppo
- indotti da luce, stress, ormoni

Inducible promoters

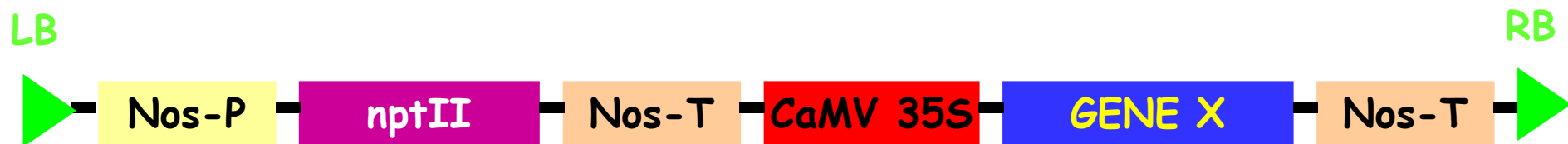
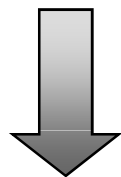
Small subunit Rubisco
Chlorophyll a/b binding protein
Alcohol dehydrogenase-1
Heat shock proteins
Chalcone synthase
Potato inhibitor-II

Induction conditions

Light
Light
Anaerobiosis
Heat shock
Fungal elicitors
Wounding

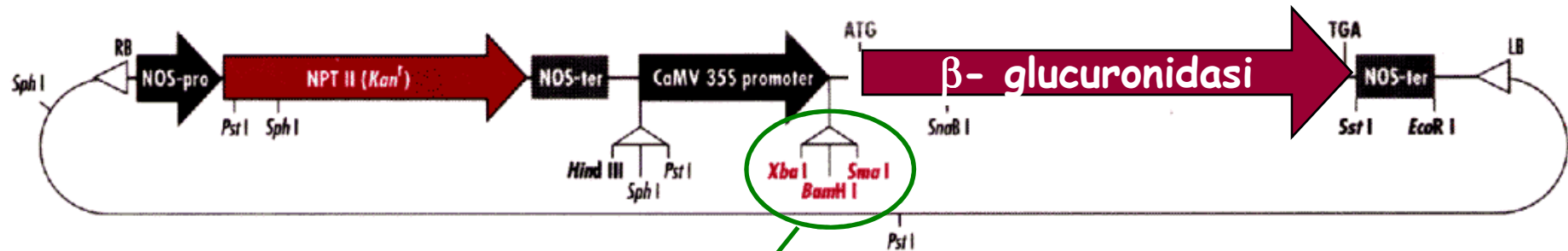


← T-DNA →



← T-DNA →

gene di interesse



pBI121

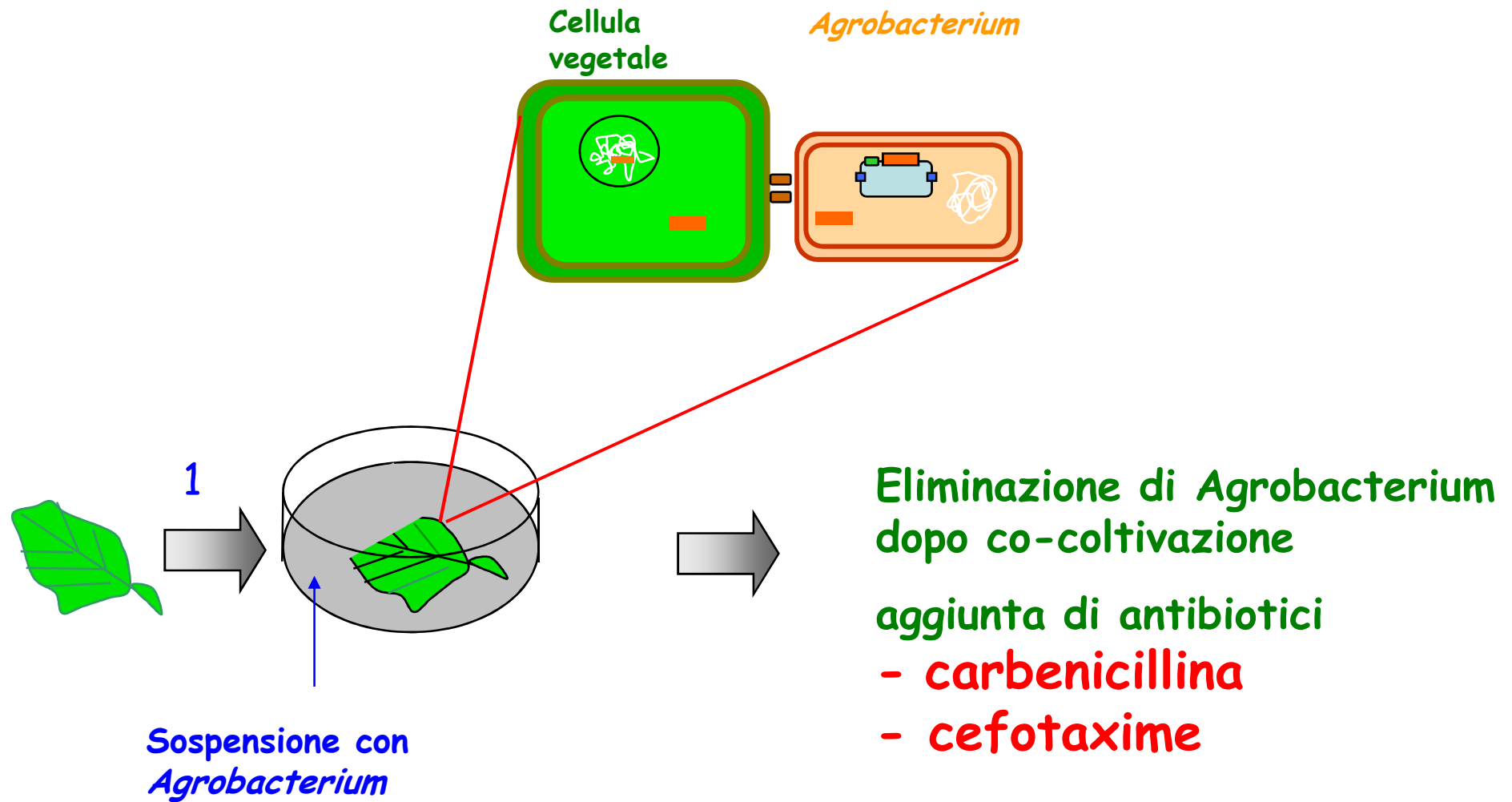
siti di clonaggio

TCT AGA GGA TCC CCG GGT GGT CAG TCC CTT ATG
Xba I BamH I Sma I

from Clontech
catalogue 1996 / 97

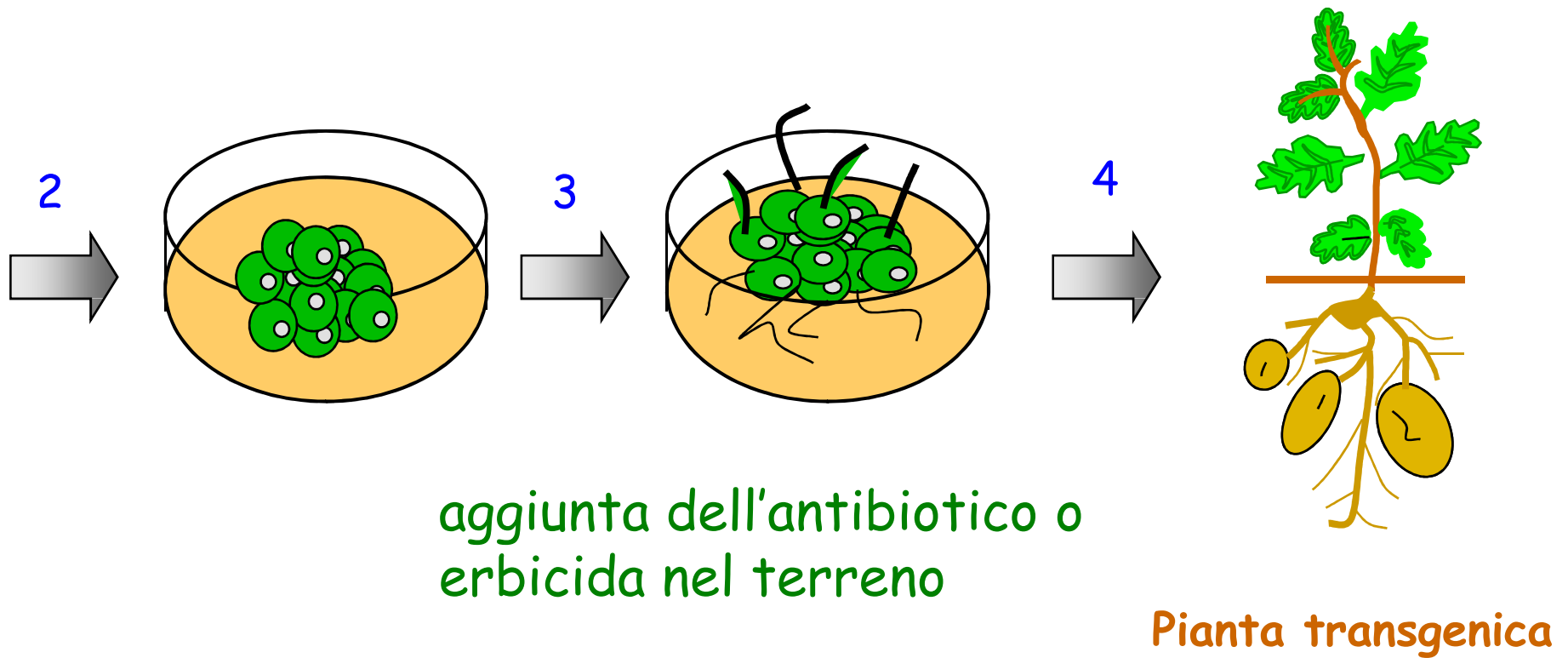
vettore binario in commercio

Infezione con Agrobacterium



Infezione con *Agrobacterium*

selezione delle
piante trasformate



TRASFORMAZIONE POMODORO AGROBACTERIUM



GERMINAZIONE

**Semi di pomodoro, sterilizzati in superficie,
sono posti in piastre petri contenenti mezzo
nutriente per la germinazione**



ESPIANTI

Dopo 7-10 giorni le piantine di pomodoro sono allo stadio in cui i cotiledoni possono essere tagliati (espianti) ed utilizzati per la trasformazione



TAGLIO DEGLI ESPIANTI

Gli espianti di cotiledone sono tagliati dalle piantine. Le cellule ferite ottenute dal taglio saranno il sito del trasferimento del DNA dall'Agrobacterium

ESPOSIZIONE ALL'AGROBACTERIUM

Dopo un periodo di adattamento (24 h) nelle piastre ottimali per l'infezione, gli espianti sono competenti per la trasformazione e sono quindi esposti all'Agrobacterium



ELIMINAZIONE DELL'ECESSO DI AGROBACTERIUM

Si elimina dagli espianti con carta assorbente per evitare una eccessiva crescita dei batteri durante la co-coltivazione.

TRASFERIMENTO DEL DNA (CO-COLTIVAZIONE)

Gli espianti sono co-coltivati per 48 h per permettere il trasferimento del DNA dall'agrobatterio alle cellule vegetali.



RIGENERAZIONE DELLE PIANTE DI POMODORO

Gli espianti sono posti in un mezzo contenente:

- antibiotico per il controllo dell'*Agrobacterium* (es. carbenicillina)
- regolatori di crescita delle piante: auxina e citochinine
- antibiotico per la selezione dei calli trasformati (es. kanamicina)

Time point: 3 settimane



FORMAZIONE DI PLANTULE

Dopo 6 settimane si prelevano i calli dai cotiledoni e le piantule che si cominciano a formare sono trasferite su un mezzo fresco di crescita.

Time point: 9 settimane



MEZZO DI RADICAZIONE

Le plantule di pomodoro rigenerate dai calli vengono trasferite su un mezzo che favorisce la radicazione (no citochinina) sempre in presenza dell'antibiotico per la selezione

Time point: 11 settimane



TRASFERIMENTO NEL TERRENO

La piantine sono trasferite in terra in contenitori chiusi.
Le piante devono essere acclimatate all'aria lentamente in
un tempo di 4-5 giorni.

Time point: 13 settimane



TRASFERIMENTO IN SERRA

Le piante trasgeniche sono pronte per essere trasferite in serra.

Time point: 15 settimane