



Scuola Superiore
Sant'Anna
di Studi Universitari e di Perfezionamento

Corso di BIOTECNOLOGIE VEGETALI

Introduzione alle Biotecnologie 2 parte

A cura di

Pierdomenico Perata & Elena Loreti

I GENI sono alla base delle Biotecnologie



Arabidopsis thaliana a model plant system

Arabidopsis thaliana genome sequence is available: about 25.000 genes on 5 chromosomes



Trasformazione

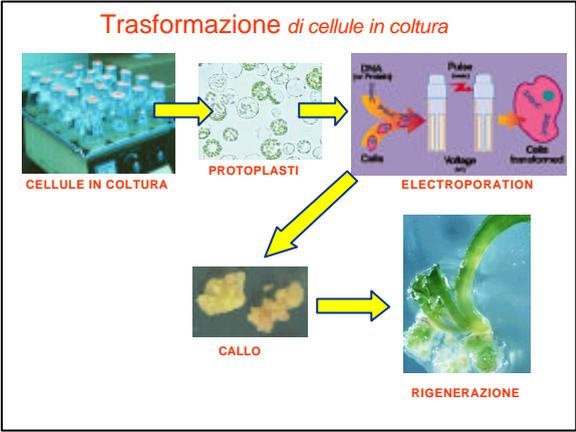
Metodi principali

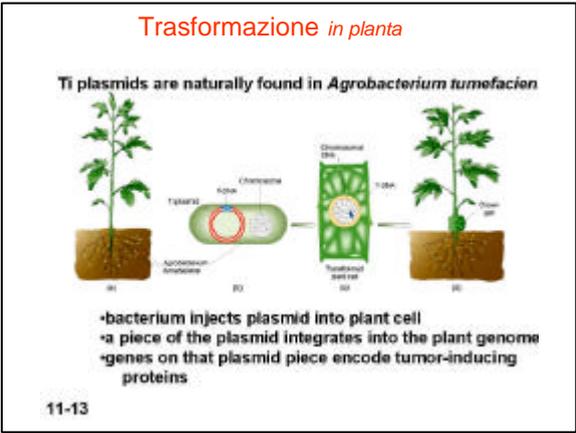
di cellule in coltura → electroporation

in planta

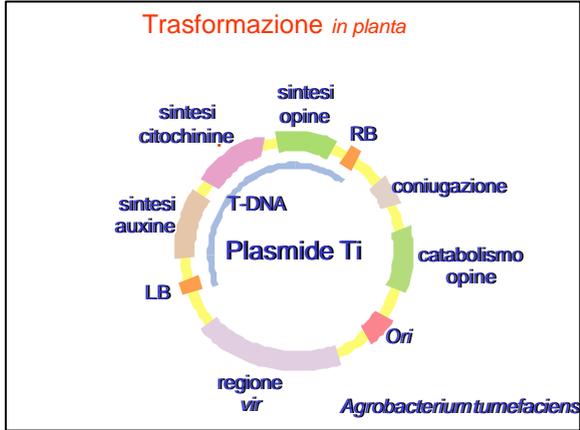


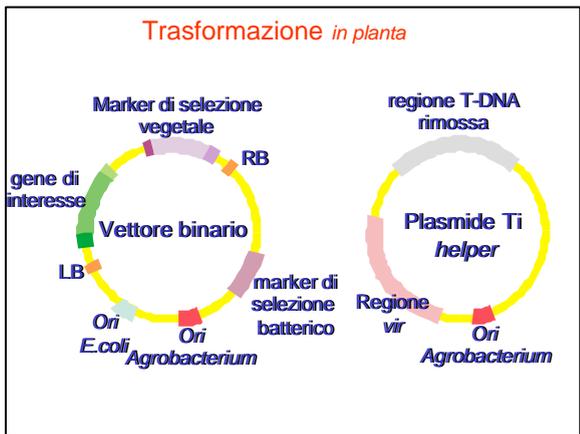
Agrobacterium tumefaciens
tecnica bio-balistica













Trasformazione *in planta*



Trasformazione *in planta*

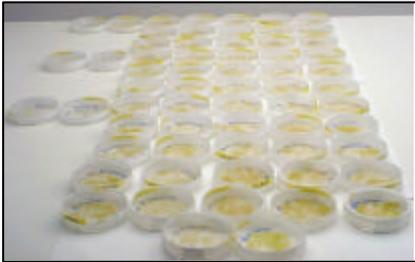


Trasformazione *in planta*



Trasformazione *in planta*

Screening per l'individuazione delle plantule trasformate

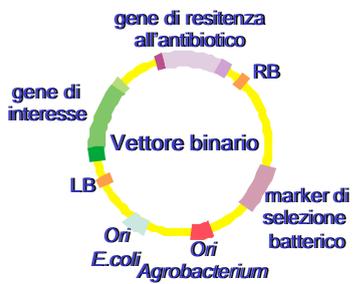


Trasformazione *in planta*

Screening per l'individuazione delle plantule trasformate



Trasformazione *in planta*



Trasformazione *in planta*

METODI DI SELEZIONE: antibiotici

Non trasformato:
Antibiotico → Tossicità

Trasformato:
Antibiotico → Gene resistenza → Resistenza



Trasformazione *in planta*

METODI DI SELEZIONE: antibiotici

Gene di resistenza ad antibiotici piu' usato:
Neomycin phosphotransferase (NPTII)

Problematiche connesse:

- Trasferimento resistenza a microrganismi intestinali
- Non esistono evidenze sperimentali a supporto
- L'eventuale microrganismo resistente non si diffonderebbe in assenza di continua pressione selettiva (antibiotico)
- Se avvenisse: scarso impatto, già esistono numerose popolazioni di microrganismi resistenti a questi antibiotici
- Promotore vegetale, non funzionerebbe in batteri
- Proteina NPT prodotta dalla pianta rapidamente degradata nell'intestino;
- Cofattori necessari al funzionamento di NPT assenti in giusta concentrazione
- Kanamicina e Neomicina sono scarsamente usati in medicina

Trasformazione *in planta*

METODI DI SELEZIONE: mannosio

Non trasformato:

Mannosio $\xrightarrow[\text{HKK}]{\text{ATP} \rightarrow \text{ADP}}$ M6P

M6P M6P M6P
M6P M6P M6P

Tossicità da carenza di P

Trasformato:

Mannosio $\xrightarrow[\text{HKK}]{\text{ATP} \rightarrow \text{ADP}}$ M6P $\xrightarrow{\text{MPI}}$ F6P → Glicolisi

Trasformazione *in planta*

METODI DI SELEZIONE: resistenza a erbicidi

Preferiti agli antibiotici: maggior tossicità
inserimento carattere agronomicamente utile

Il gene *Bar* (da *Streptomyces hygroscopicus*) conferisce resistenza agli erbicidi a base di Phosphinothricin:

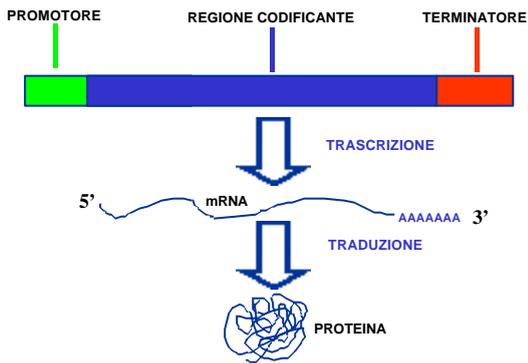
- Basta (registered in Europe)
- Bialaphos (registered in Japan)
- Ignite (registered in the USA).

La proteina Bar inattiva la Phosphinothricin aggiungendole un gruppo acetile preso dal Acetyl-CoA

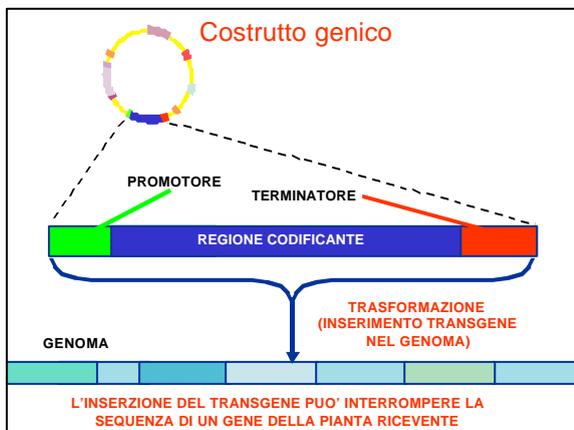
Problematiche:

Piante resistenti a erbicidi possono indurre l'agricoltore ad un maggior uso di erbicidi (maggiori residui nei prodotti alimentari)
Sviluppo di piante resistenti in seguito all'eccessivo uso di diserbanti

Costrutto genico



Costrutto genico



Costrutto genico

TIPOLOGIE DI PROMOTORE

COSTITUTIVO: GARANTISCE UNA ELEVATA ESPRESSIONE IN TUTTI I TESSUTI DELLA PIANTA A TUTTI I SUOI STADI DI SVILUPPO

ESEMPIO: PROMOTORE 35S DEL VIRUS del MOSAICO DEL TABACCO (CaMV)

TESSUTO SPECIFICO: GARANTISCE L' ESPRESSIONE IN ALCUNI TESSUTI DELLA PIANTA

ESEMPIO: PROMOTORE PEP-CARBOSSILASI, ESPRESSO IN FOGLIE DI PIANTE A FOTOSINTESI C4

TESSUTO-TEMPO SPECIFICO: GARANTISCE L' ESPRESSIONE IN ALCUNI TESSUTI DELLA PIANTA AD UNO SPECIFICO STADIO DI SVILUPPO

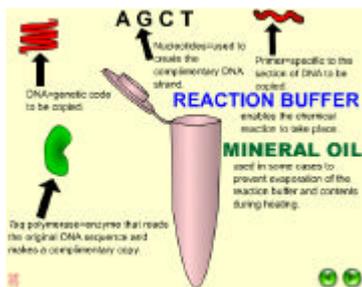
ESEMPIO: PROMOTORE LEA (Late Embryogenesis Abundant), ESPRESSO IN EMBRIONI ALLO STADIO TERMINALE DI SVILUPPO

INDUCIBILI: GARANTISCE L' ESPRESSIONE IN RISPOSTA AD UN TRATTAMENTO CHIMICO

ESEMPIO: PROMOTORE INDUCIBILE DA ANTIBIOTICI

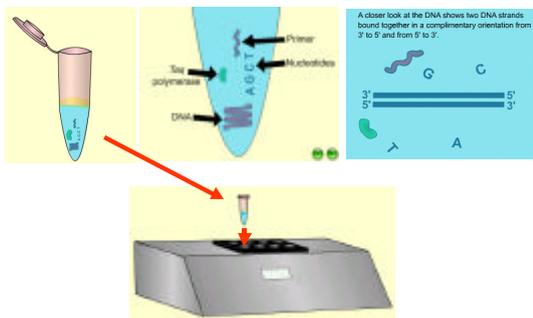
Trasformazione *in planta*

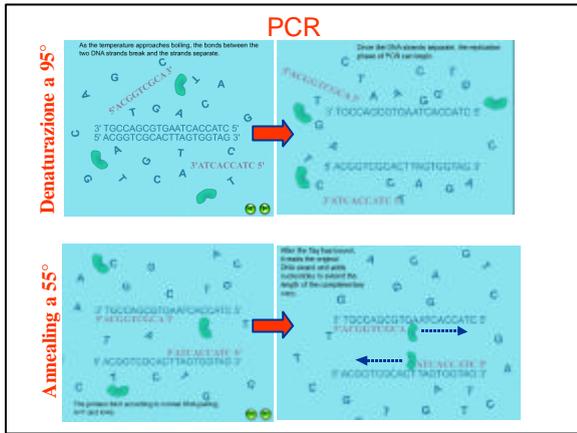
Controllo inserzione del transgene

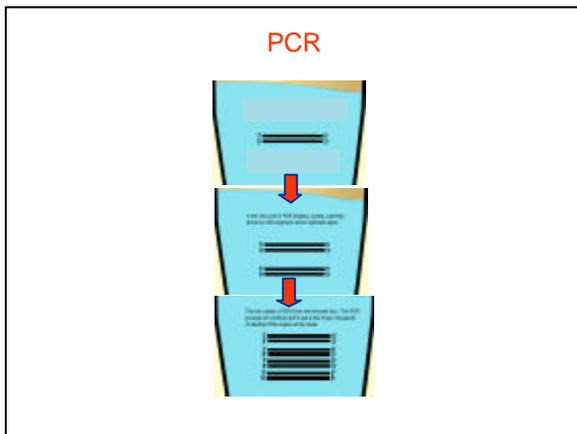


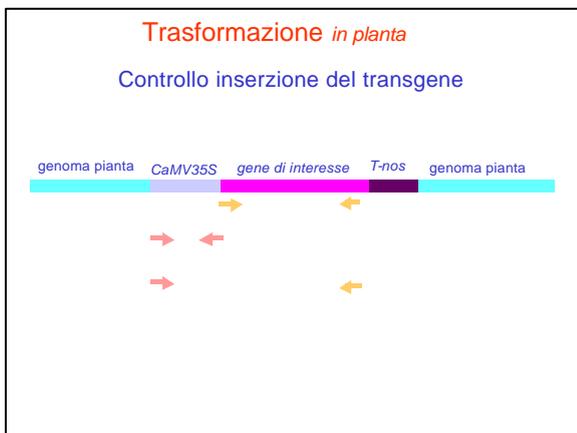
Trasformazione *in planta*

Controllo inserzione del transgene



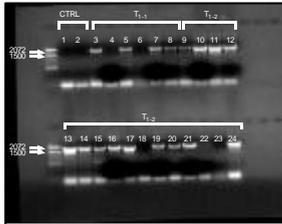






Trasformazione *in planta*

Controllo inserzione del transgene

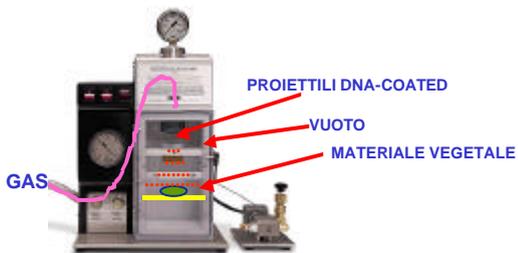


Trasformazione *in planta*

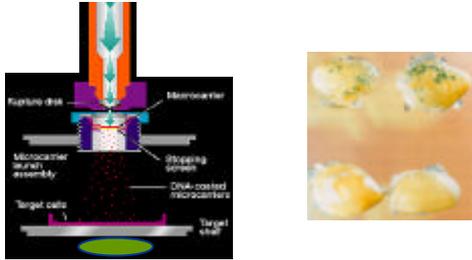
Controllo espressione del transgene
tramite Northern Blot



Trasformazione *metodo biolistico*



Trasformazione *metodo biolistico*



Trasformazione *metodo biolistico*



Trasformazione *metodo biolistico*
Trasformazione di genoma del cloroplasto



Trasformazione di genoma del cloroplasto

VANTAGGI

I GENI CLOROPLASTICI NON SONO TRASMESSI MEDIANTE IL POLLINE (MINOR RISCHIO DI FLUSSO GENICO)

ELEVATI LIVELLI DI ESPRESSIONE DEL TRANSGENE DOVUTI ALLA PRESENZA DI MOLTI CLOROPLASTI NELLA CELLULA (CONTRO UN SOLO NUCLEO)

IL DNA INSERITO NEL GENOMA DEL CLOROPLASTO E' COPIATO 5.000-10.000 VOLTE (NEL NUCLEO SOLO 1-4 VOLTE)

Trasformazione

