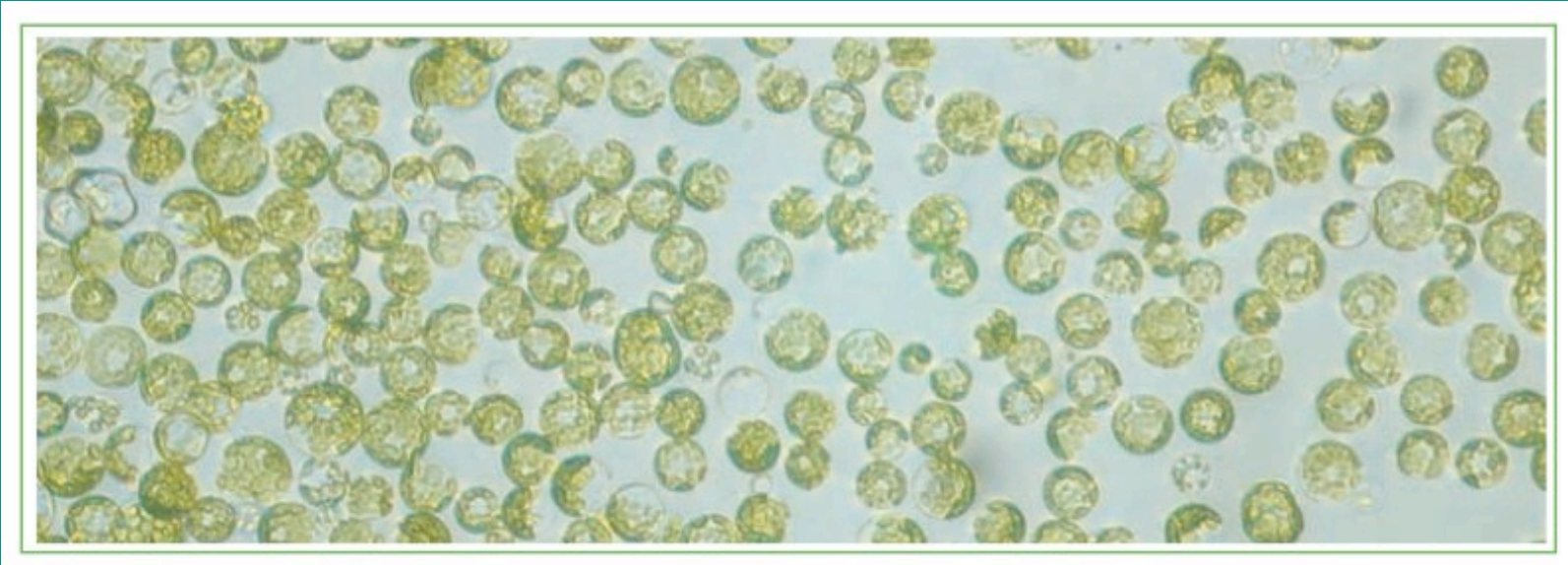
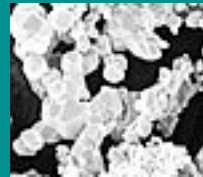
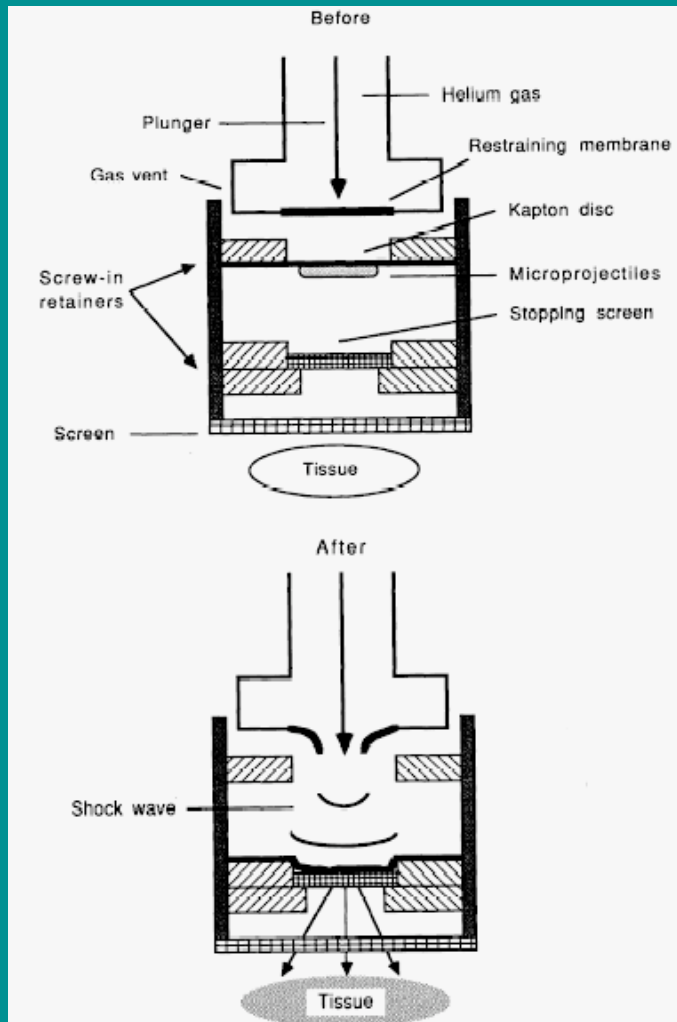


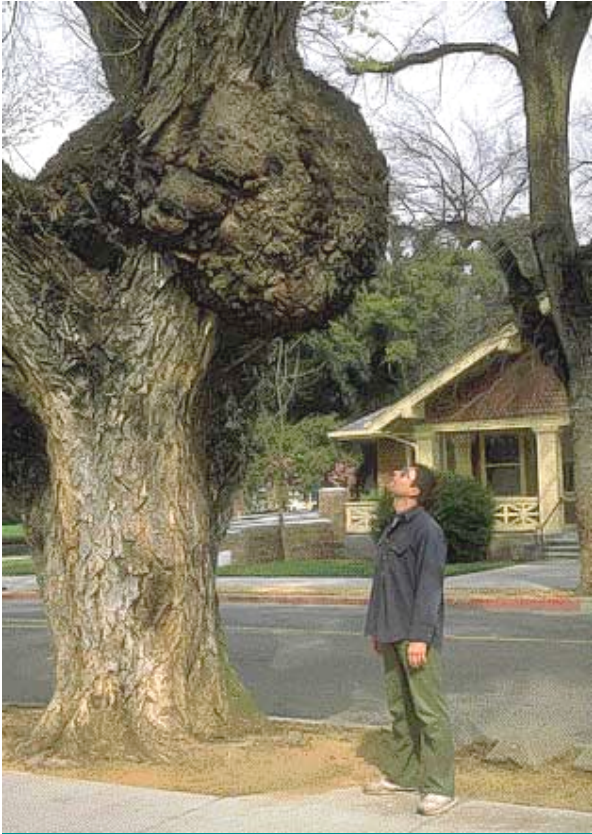
Protoplasti

- Preparazione attraverso digestione enzimatica della parete cellulare (per mezzo di cellulasi)
- Devono essere mantenuti in terreni isotonici per evitare shock osmotici
- Una volta trasformati possono rigenerare una pianta intera



Il metodo biolistico (*Gene gun*)





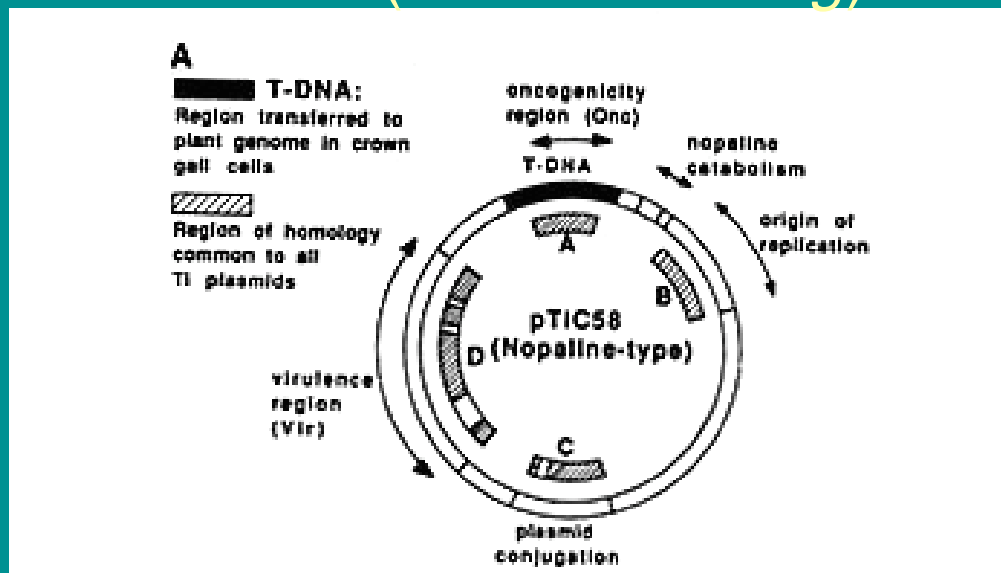
Agrobacterium tumefaciens

- Batterio Gram-negativo normalmente presente nel terreno
- Ceppi virulenti possono infettare piante dicotiledoni che presentino ferite o abrasioni e causare tumori (galle)
- Molte piante soffrono abrasioni a livello del colletto: galla del colletto
- Spettro d'ospite: molte dicotiledoni, no le monocotiledoni (in condizioni naturali)

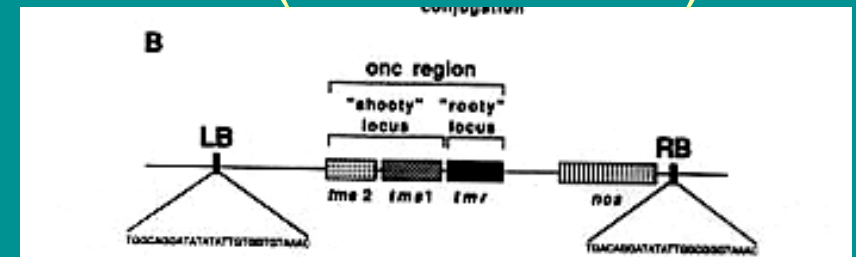
Un “ingegnere genetico naturale”

- Nei ceppi virulenti di *Agrobacterium* è presente il plasmide Ti (tumor inducing) di circa 130-230 kb su cui si trovano geni *vir* che conferiscono la virulenza, geni che controllano la morfologia della galla e geni per la sintesi e il catabolismo di particolari amminoacidi (*opine*)

Plasmide Ti (*Tumor inducing*)



T-DNA (*Transfer DNA*)



Interazione tra *Agrobacterium* e cellula vegetale

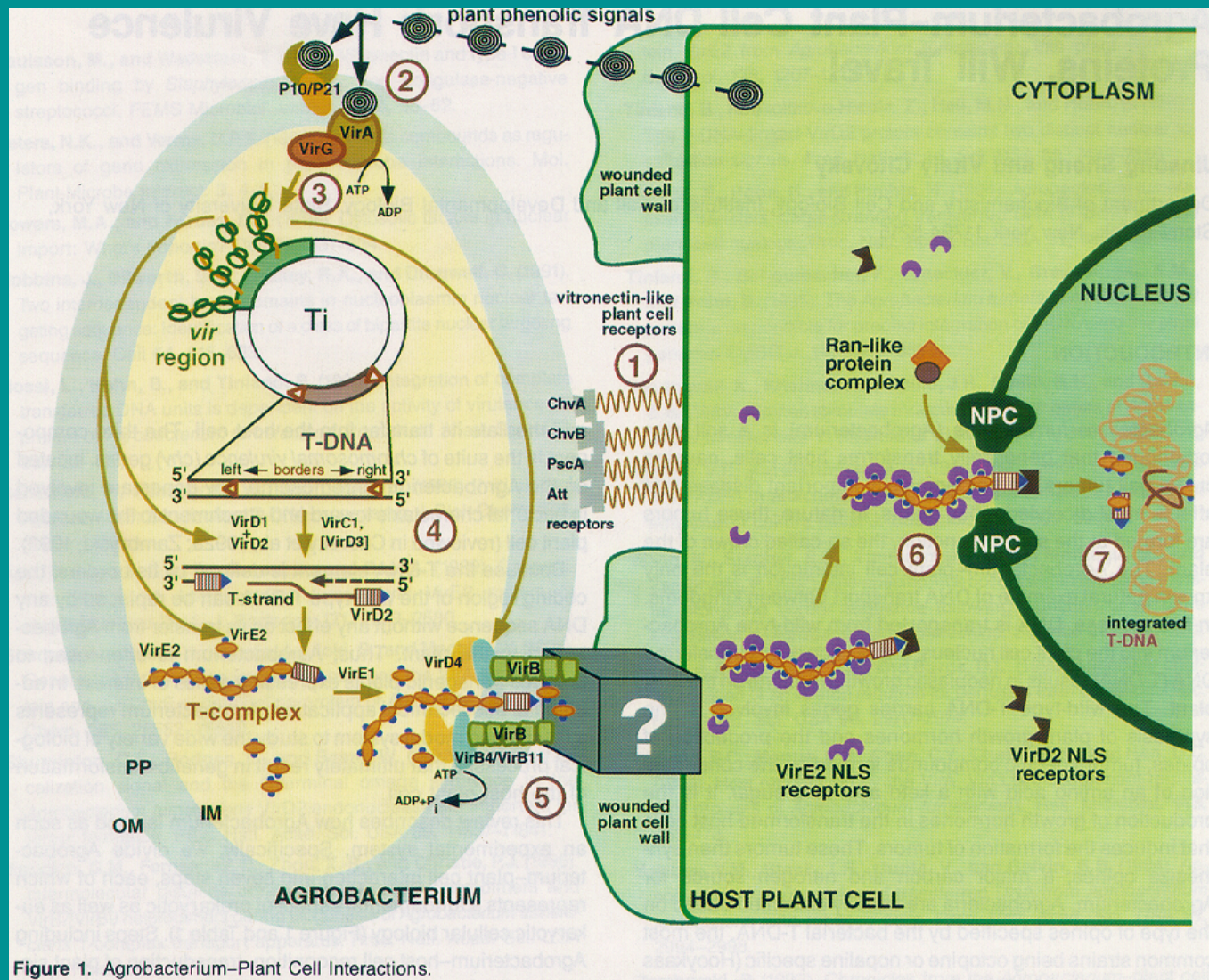


Figure 1. *Agrobacterium*-Plant Cell Interactions.

Marcatori selezionabili per sistemi vegetali

Metodi di selezione “negativa”

- Gene *nptII* per resistenza all'antibiotico kanamicina
- Gene *hpt* per resistenza all'antibiotico igromicina
- Gene *bar* per resistenza all'erbicida glufosinate
- Gene per Enolpyruvyl-shikimate-phosphate synthase (EPSPS) per resistenza all'erbicida glifosate (Round-up)

Metodi di selezione “positiva”

- Gene *manA* per la resistenza al mannosio
- Gene *ipt* per la selezione su base del fenotipo di sviluppo

Glufosinate

Glufosinate is a natural compound isolated from two species of *Streptomyces* fungi. It inhibits the activity of an enzyme, glutamine synthetase, which is necessary for the production of glutamine and for ammonia detoxification. The application of glufosinate leads to reduced glutamine and increased ammonia levels in the plant tissues. This causes photosynthesis to stop and the plant dies within a few days. Glufosinate also inhibits the same enzyme in animals.

Trasformazione mediata da *Agrobacterium tumefaciens*

- Co-coltivazione del ceppo ingegnerizzato di *A. tumefaciens* con un espianto vegetale da cui si possano ottenere piante rigenerate
- Mantenimento dell'espianto su terreno di rigenerazione in presenza di un agente selettivo (ad es. kanamicina) e un antibiotico per eliminare *Agrobacterium*
- Selezione di germogli rigenerati (o embrioni) resistenti
- Rigenerazione di piante complete con trattamenti ormonali