

# La carenza idrica rappresenta il principale fattore limitante la produttività

I modelli climatici indicano che periodi di siccità saranno sempre più frequenti



L'effetto del "global warming"



Enfatizzano il bisogno urgente di sviluppare delle strategie per la coltivazione in ambienti caratterizzati da carenze idriche

1. MAS per l'identificazione di caratteri di resistenza alla siccità
2. Lo sviluppo di piante GM caratterizzate da tolleranza alla siccità
3. Aumento dell'efficienza nell'utilizzo delle risorse idriche



Assicurare la produzione di cibo per la popolazione in aumento

# Meccanismi di resistenza alla siccità

Le piante hanno sviluppato due strategie per resistere alla siccità



Drought avoidance



- Abilità di mantenere turgore cellulare:
- approfondimento radicale
  - chiusura degli stomi
  - ridotta area fogliare

Dehydration tolerance



L'abilità di sopportare perdite consistenti d'acqua es.  
resurrection plants

I programmi di breeding hanno sempre lavorato sulla capacità di evitare lo stress idrico e mai sulla tolleranza

# Resurrection plant



*Craterostigma plantagineum*

Lo studio dei meccanismi coinvolti nella risposta agli stress ha permesso di migliorare questa risposta attraverso l'ingegneria genetica

In *Arabidopsis*

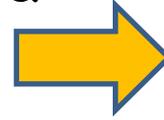
alcune centinaia di geni indotti dallo stress

1. codificanti proteine con funzione enzimatica o strutturale, sintesi di osmoprotettori, LEA, canali di membrana, proteasi ecc

2. Geni a funzione non nota

3. Geni a funzione regolativa come kinasi, fosfatasi e fattori di trascrizione

Piante transgeniche per migliorare la risposta allo stress idrico



Azione di un singolo gene

Osmoregolazione è uno dei metodi più efficienti che si sono evoluti nelle piante tolleranti per combattere gli stress abiotici

## Sovraespressione di osmoprotettori :

Aminoacidi  
Zuccheri

prolina  
mannitolo, trialosio

L'accumulo di soluti compatibili protegge le piante contro i danni di ROS, o funzionano come chaperonine e proteggono altre proteine

for major cereals, resistance to drought is more important at the reproductive stage, to ensure pollen fertility and grain development

Sovraespressione di geni LEA e CSP (cold-shock-proteins)

2 CSP di E. coli e B. subtilis

Approccio molto promettente, si  
migliora la produttività della pianta  
(mais +20% in grain yield in cond. di scarsità idrica)

**Late embryogenesis abundant**

Espressi in semi, polline e tessuti vegetativi delle  
resurrection plants

Il trasferimento (sovraespressione) di un singolo gene  
codificante per una specifica proteina indotta da stress  
non è sempre sufficiente a produrre tolleranza

# Sovraespressione di geni regolatori:

Fattori di trascrizione  
appartenenti a diverse  
famiglie



bZIP, MYB, zinc finger, WRKY,  
AP2/ERF



Isolamento

Caratterizzazione in *Arabidopsis*, sovraespressione in  
piante di interesse

Riconoscimento di elementi ABRE, DRE, sui  
promotori

# Differenti strategie per evitare lo stress idrico:

Ciclo vitale breve

Chiusura degli stomi

Cambio di allocazione di assimilati (source/sink)

accrescere le radici/ridurre l'area fogliare

Rapida senescenza e abscissione fogliare sono associate in natura allo stress idrico (è un sistema per ridurre la superficie fogliare traspirante)

Vantaggiosa per le piante perenni

Svantaggioso per le piante annuali (riduce la produttività)

## **Ipotesi:**

è possibile aumentare la tolleranza alla siccità ritardando la senescenza indotta dallo stress idrico?

Questo tipo di senescenza fogliare è dovuta ad un tipo di morte cellulare programmata. Può essere inappropriatamente attivata durante lo stress?

## **Se l'ipotesi è corretta**

Sopprimere questo tipo di senescenza renderebbe la pianta più tollerante al secco e con una riduzione di perdite di produzione

Si era dimostrato che la senescenza fogliare può essere ritardata in piante transgeniche esprimenti

## Isopentenyltransferase (IPT)

Un enzima chiave della biosintesi delle citochinine

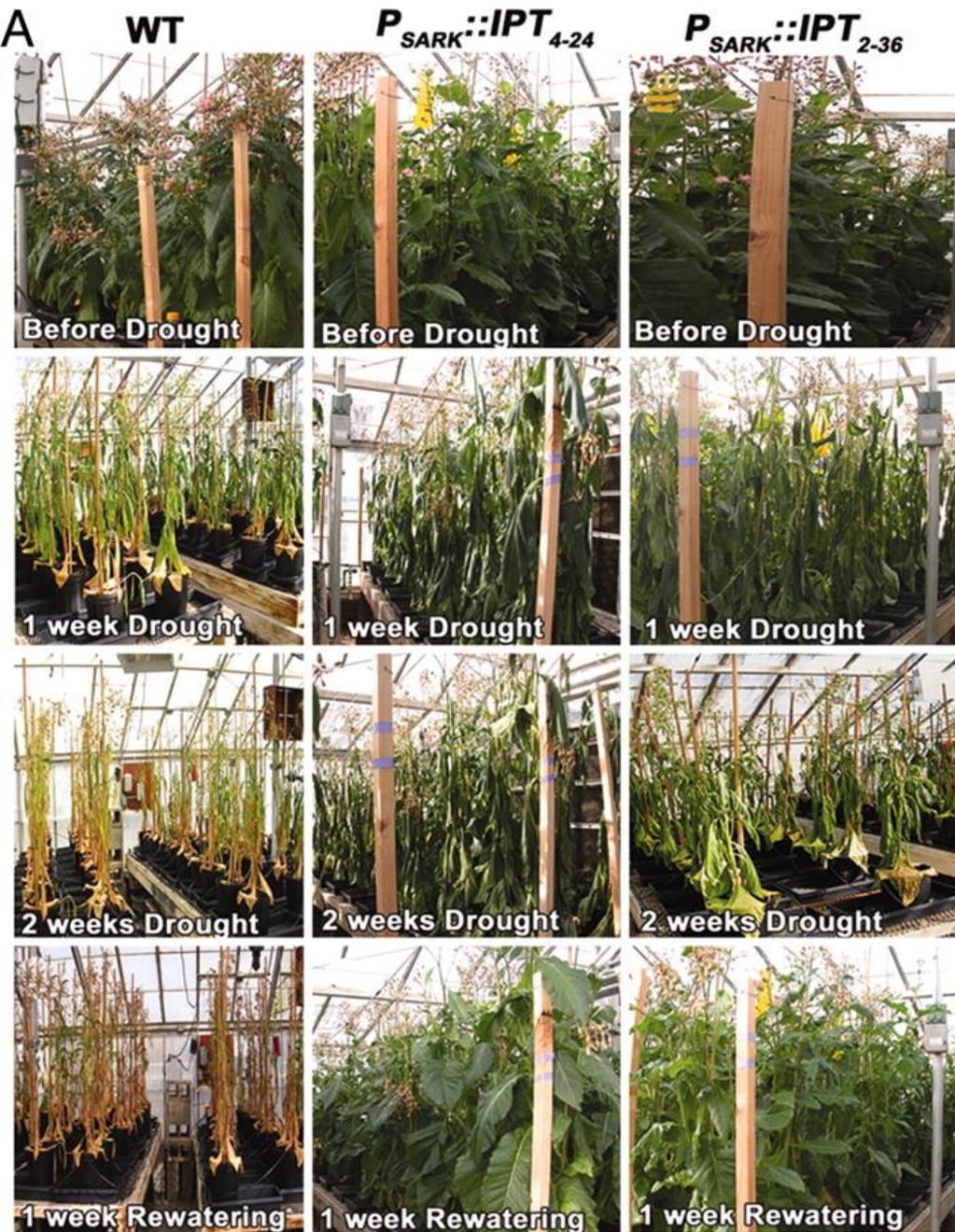
Costrutto:



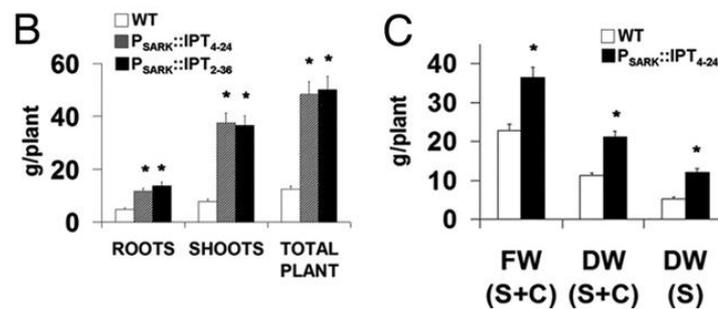
**Promotore** di un gene che codifica per un recettore di una proteina chinasi attivato dalla maturazione/senescenza (da fagiolo)

**IPT** da *A. tumefaciens*

Avevano già osservato l'espressione del gene SARK durante lo stress idrico

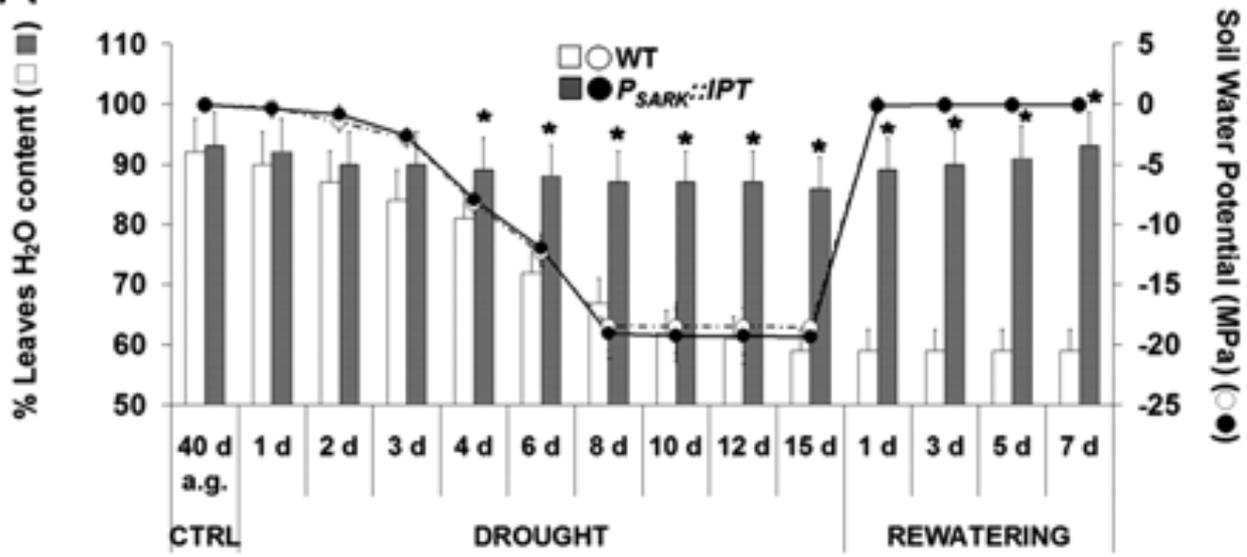


## Trasformazione e analisi piante transgeniche tabacco:

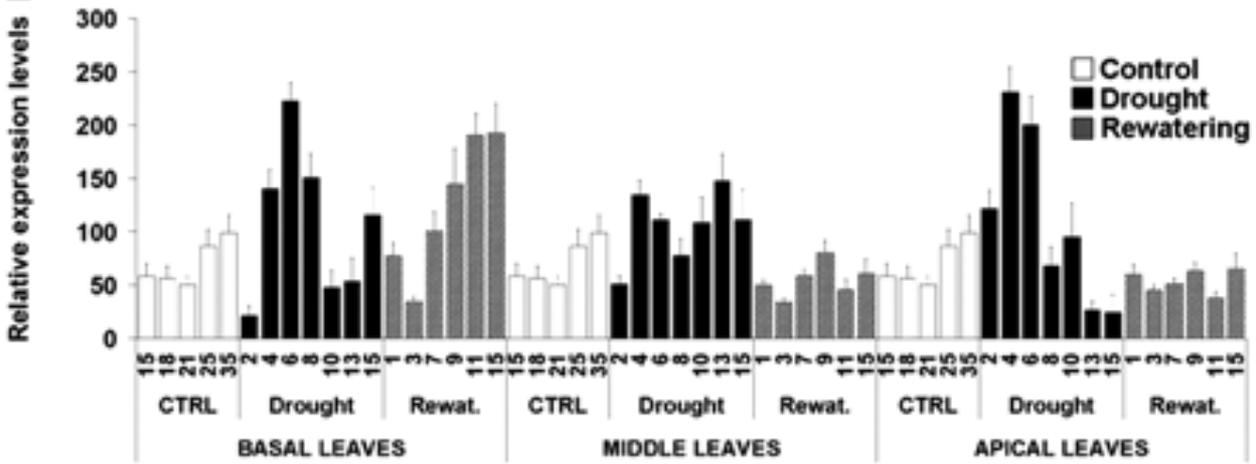


seeds (S) and capsules containing seeds (C) collected at the end of the drought/rewatering experiments.

**A**



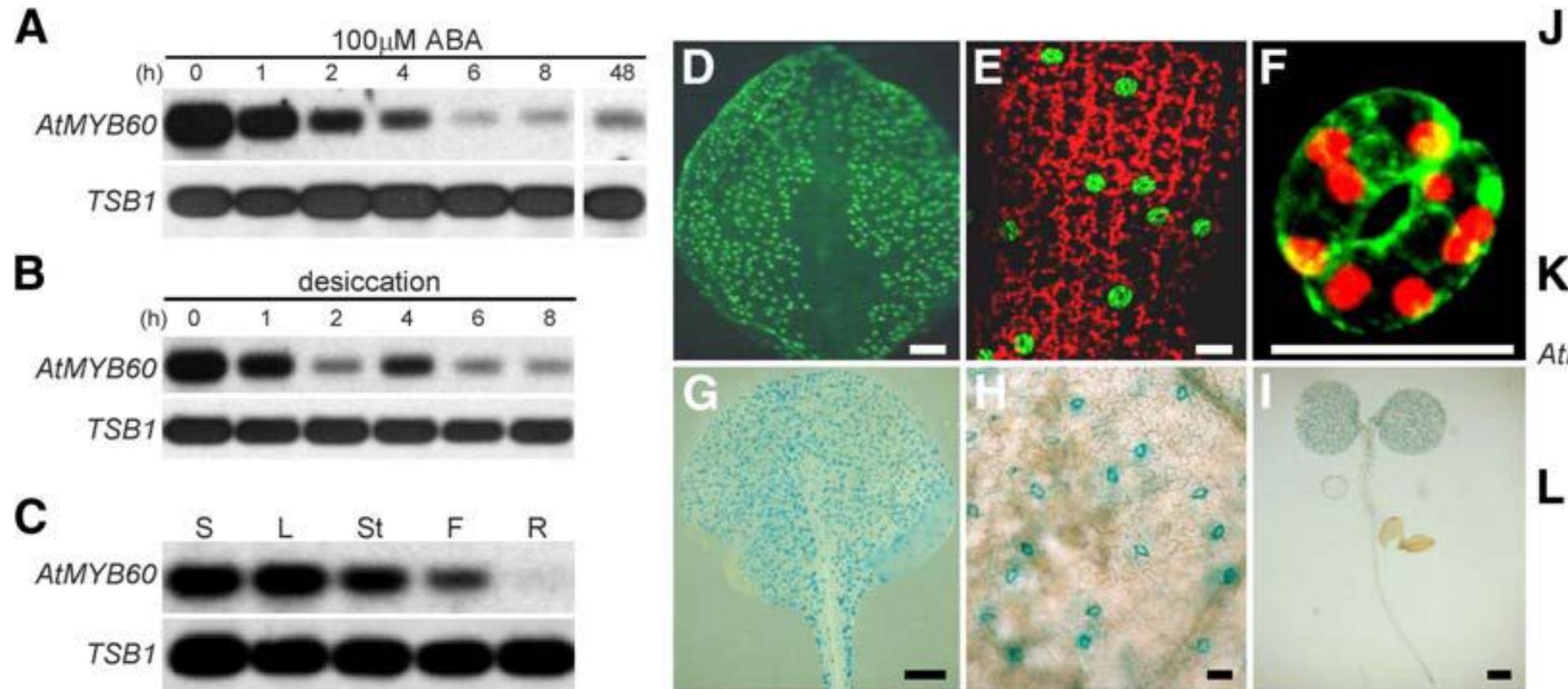
**B**



in controllo:  
 l'espressione di *ipt* aumenta durante la maturazione

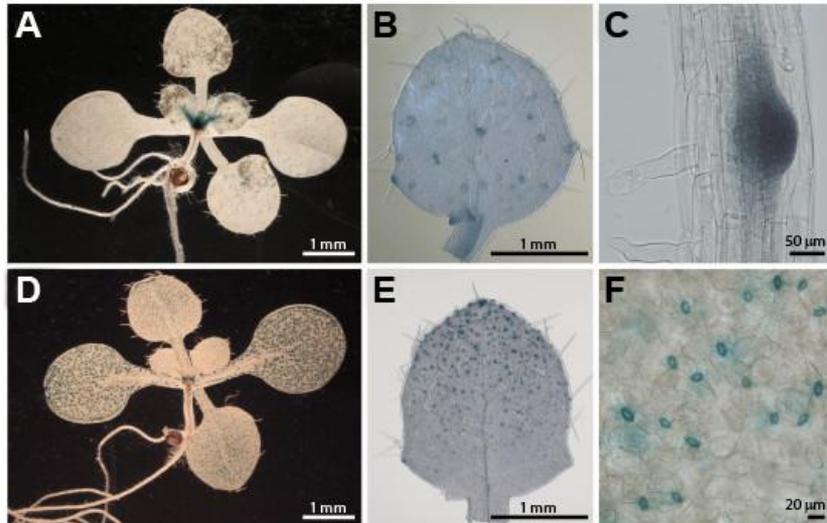
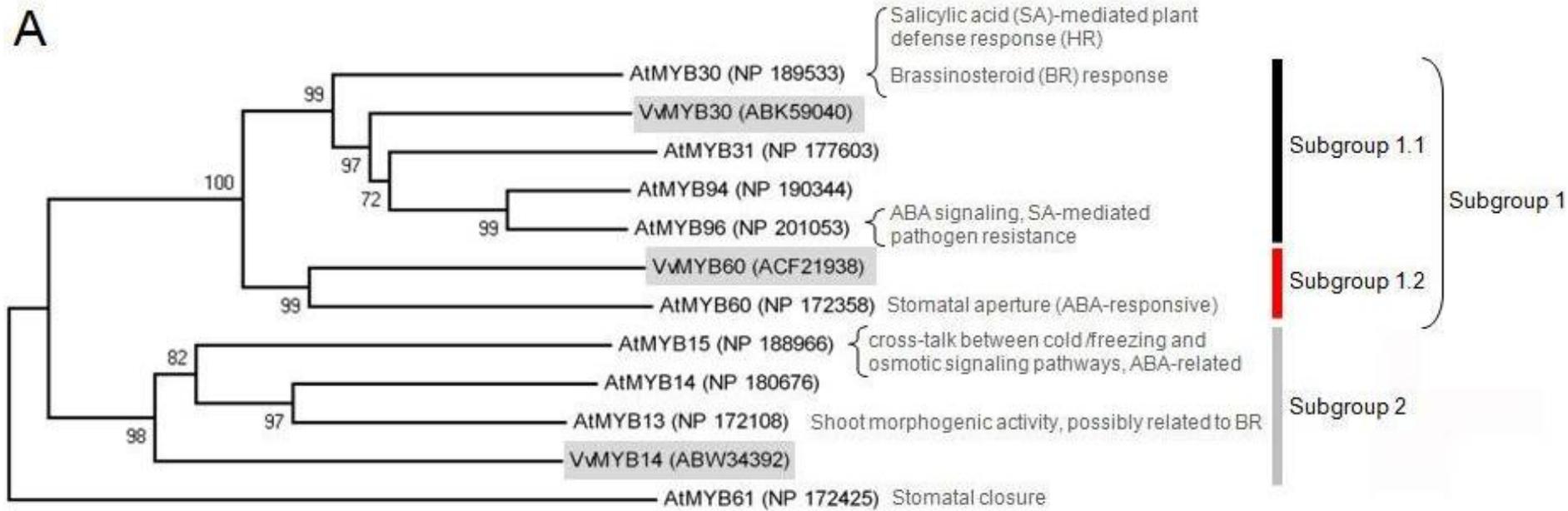
Il livello è massimo durante lo stress e non solo nelle foglie basali

# A Guard-Cell-Specific MYB Transcription Factor Regulates Stomatal Movements and Plant Drought Tolerance

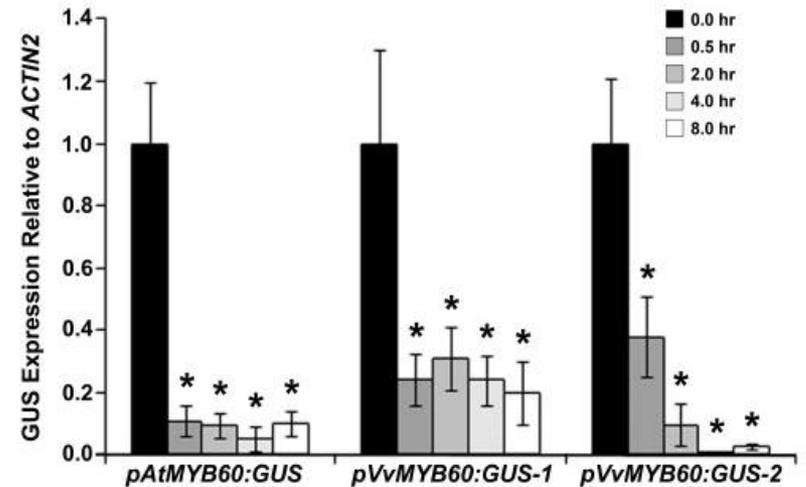


# Vitis vinifera

A



G



**Rice** uses 2-3 times more water than other food crops such as wheat or maize and uses 30% of the freshwater used for crops worldwide

**Rice** is also the primary source of food for more than half of the world's population, especially in developing countries in Asia, where water scarcity and drought are an imminent threat to food security

La relazione tra utilizzo di acqua e produttività viene definita come **WUE**

Prodotto (fotosintesi)/traspirazione

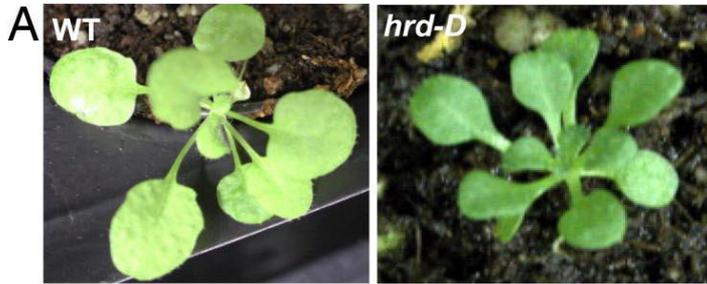
Considerando drought avoidance e drought tolerance



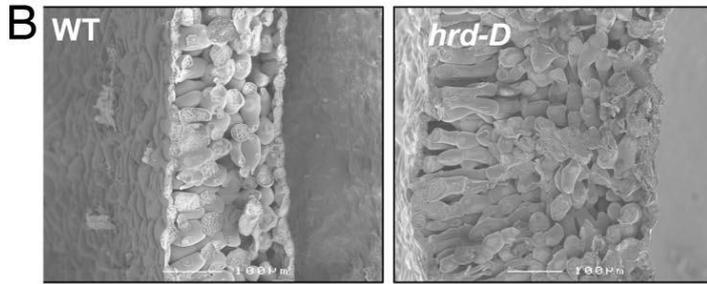
Tende a conservare acqua promuovendo WUE

Difficile agire sui meccanismi che controllano la traspirazione e la fotosintesi con un unico gene!

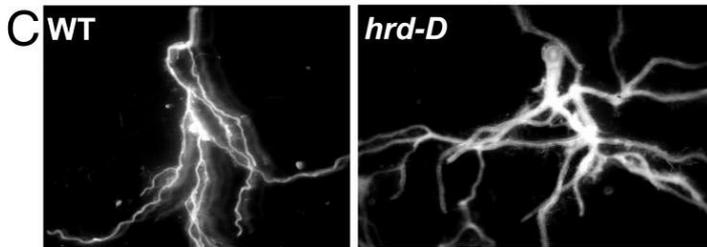
an activation tagged mutant collection in *Arabidopsis* a gain-of-function mutant **hardy**



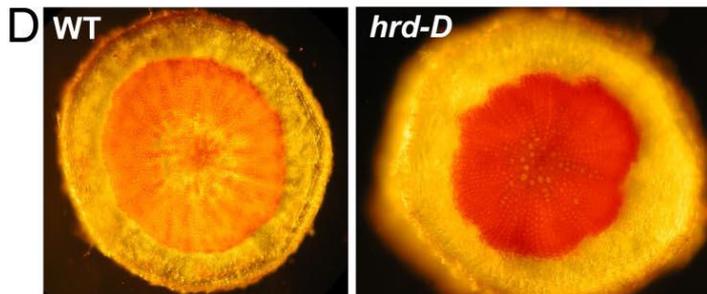
*hrd-D* mutant with smaller, slightly curled, thicker deep-green leaves



more mesophyll cell layers

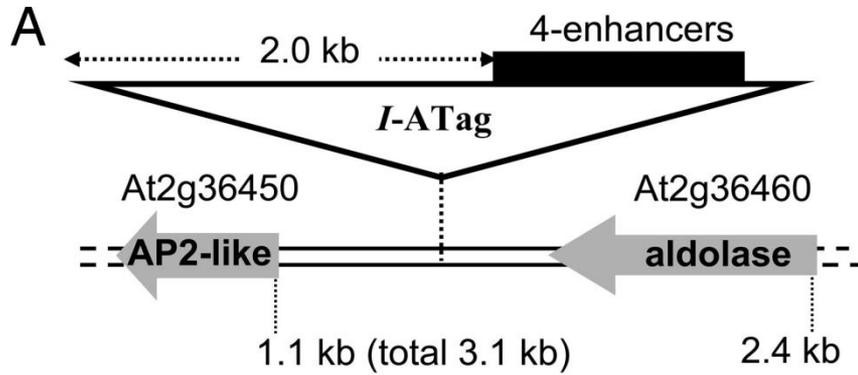


more profuse secondary and tertiary roots at the root base

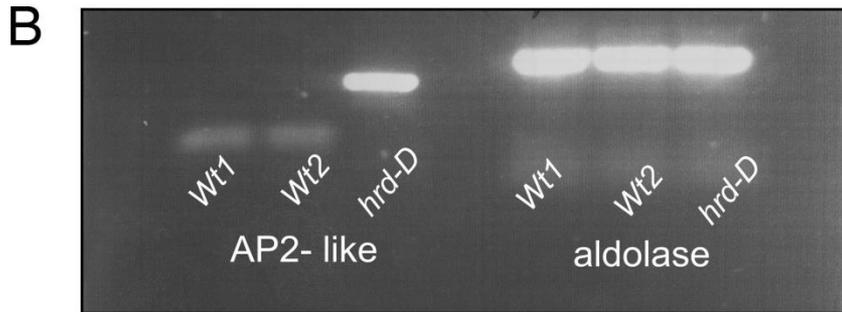


increased cortical cell layers (lighter stained) and compact stele in the mutant

# arabidopsis



Analisi del genómico nel mutante



Espress dell' aldolase costitutiva

Espress di AP2-like è indotta

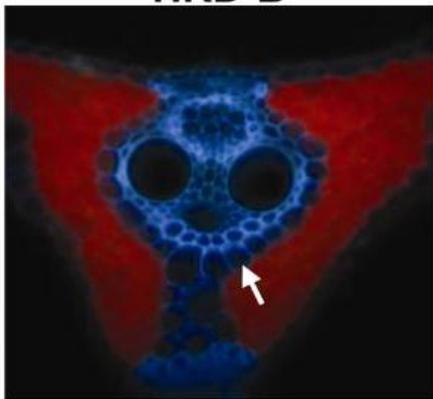
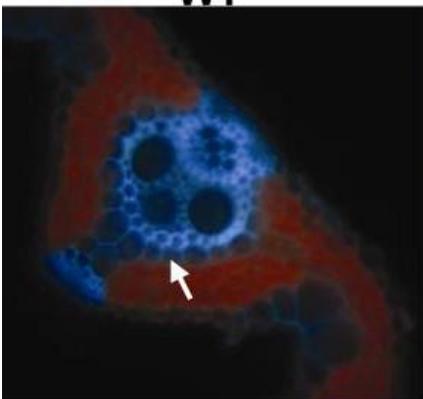
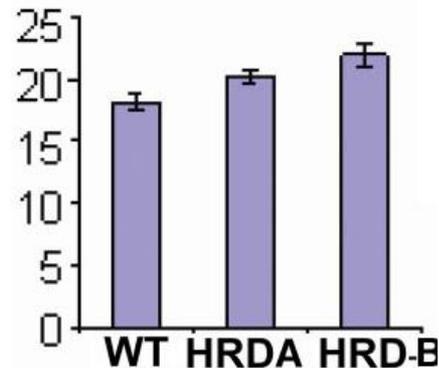
# Analisi fenotipica del mutante (carenza idrica e salinità)



Linee transgeniche 35S::HRD-GR



the HRD-GR lines tested in an inducible drought-resistance assay showed significant drought resistance, even when mild dexamethasone treatments were used (only treated from bottom by watering)

**HRD-Control****WT-Control****HRD-Drought****WT-Drought****WT****HRD-B****C**

*N. of bundle sheath cells in WT compared with HRD overexpressors*

Blue vascular bundles surrounded by the bundle sheath cells marked

Nessun effetto su:  
crescita  
produz semi  
Germinazione  
In normali cond crescita

- Superficie fogliare
- tiller
- n di cellule dei fasci vascolari

WUE : the rice *HRD lines*  
revealed a significant 50-100% increase under well watered  
control conditions and an 50% increase under drought stress

The total biomass (root and shoot) of rice *HRD lines*, shows a very significant  
increase of 50% under drought stress and 25-80% under nonstress control  
conditions

- >> increased number of cells in the bundle sheath that might also contribute to increased photosynthetic assimilation.
- >> *HRD overexpression increases root biomass under drought stress*, indicating an ability to adapt by inducing roots to harvest the scarce water
- >> The increases in photosynthesizing area and carbon assimilation would contribute significantly to canopy photosynthesis, resulting in high biomass

Prevista la commercializz del Hardy rice nei Paesi asiatici

# Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor

Mie Kasuga<sup>1</sup>, Qiang Liu<sup>1,2</sup>, Setsuko Miura<sup>1</sup>, Kazuko Yamaguchi-Shinozaki<sup>1\*</sup>, and Kazuo Shinozaki<sup>3</sup>

***a cis-acting promoter element, the dehydration response element (DRE), plays an important role in regulating gene expression in response to these stresses***

**The transcription factor DREB1A specifically interacts with the DRE and induces expression of stress tolerance genes**

**overexpression of the cDNA encoding DREB1A in transgenic plants activated the expression of many of these stress tolerance genes under normal growing conditions and resulted in improved tolerance to drought, salt loading, and freezing**

35S:DREB1Aa

35S:DREB1Ab

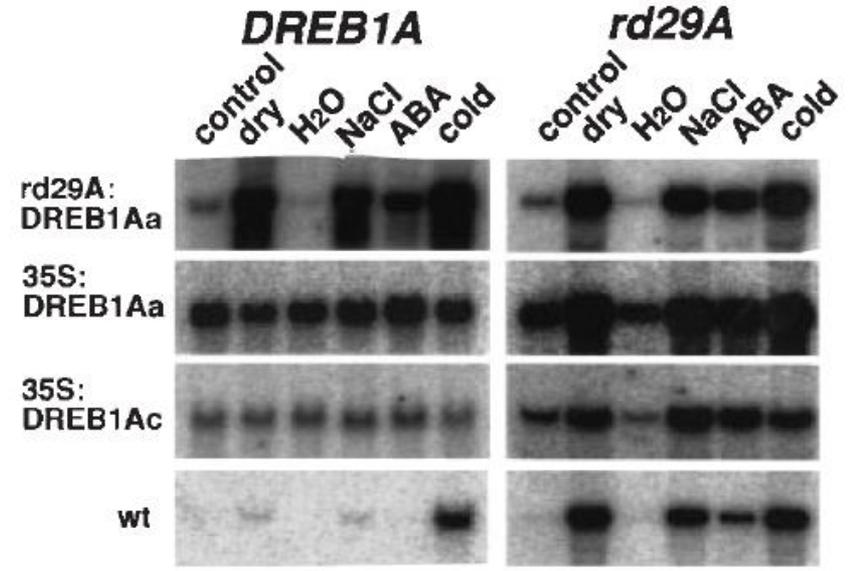
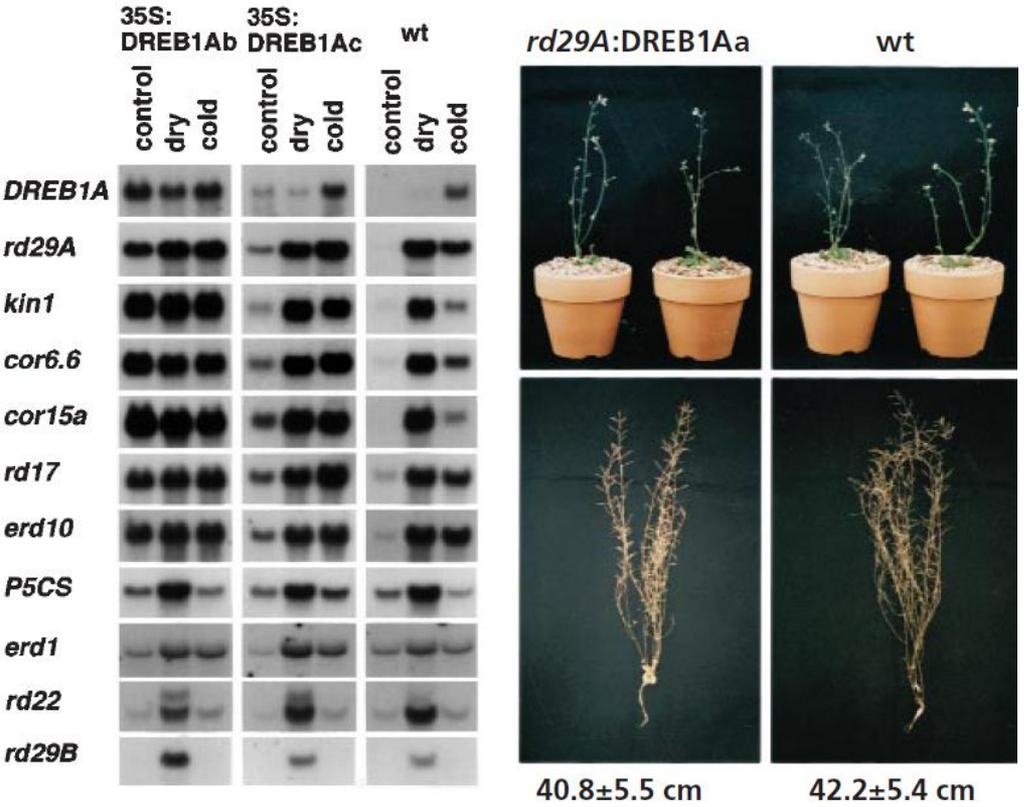
35S:DREB1Ac

wt

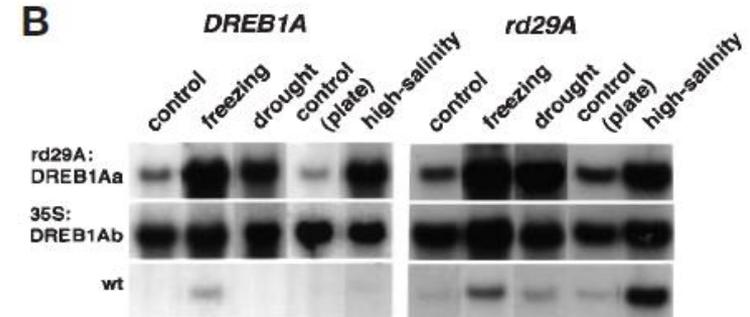
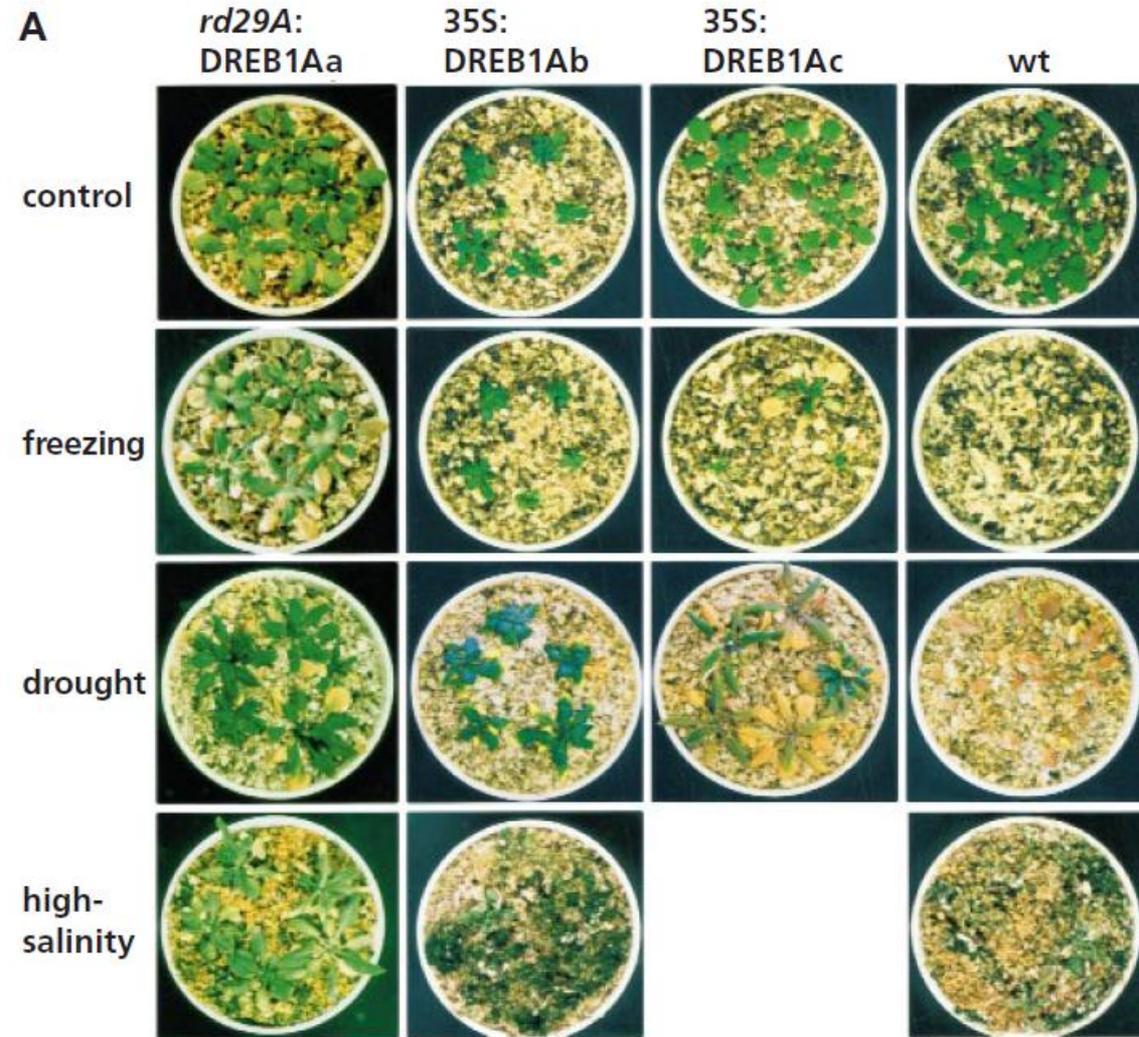


**use of the strong constitutive 35S promoter to drive expression of *DREB1A* also resulted in severe growth retardation under normal growing conditions.**

# Espressione di geni target nelle piante 35S:DREB1A



Expression of the DREB1A and rd29A genes in 35S:DREB1A and rd29A:DREB1A transgenic plants



**Freezing, drought, and salt stress tolerance of the 35S:DREB1Ab, 35S:DREB1Ac, and *rd29A*:DREB1Aa transgenic plants**

Trasformazione di molte specie di interesse con DREB1A

# Plant nuclear factor Y (NF-Y) B subunits confer drought tolerance and lead to improved corn yields on water-limited acres

Donald E. Nelson<sup>\*†</sup>, Peter P. Repetti<sup>‡</sup>, Tom R. Adams<sup>\*</sup>, Robert A. Creelman<sup>‡</sup>, Jingrui Wu<sup>\*</sup>, David C. Warner<sup>\*</sup>, Don C. Anstrom<sup>\*</sup>, Robert J. Bensen<sup>\*</sup>, Paolo P. Castiglioni<sup>\*</sup>, Meghan G. Donnarummo<sup>\*</sup>, Brendan S. Hinchey<sup>\*</sup>, Roderick W. Kumimoto<sup>‡</sup>, Don R. Maszle<sup>‡</sup>, Roger D. Canales<sup>\*‡§</sup>, Katherine A. Krolikowski<sup>‡</sup>, Stanton B. Dotson<sup>\*</sup>, Neal Gutterson<sup>‡</sup>, Oliver J. Ratcliffe<sup>‡</sup>, and Jacqueline E. Heard<sup>\*‡§</sup>

<sup>\*</sup>Monsanto Company, 62 Maritime Drive, Mystic, CT 06355; and <sup>‡</sup>Mendel Biotechnology, Inc., 21375 Cabot Boulevard, Hayward, CA 94545

Communicated by Maarten J. Chrispeels, University of California at San Diego, La Jolla, CA, August 29, 2007 (received for review December 20, 2005)

*A genome-wide systematic analysis of Arabidopsis transcription factor families was conducted to identify genes that improve tolerance to environmental stress.*

*A selection of transcription factors was discovered from a range of families that condition enhanced abiotic stress tolerance when constitutively expressed in Arabidopsis*

***AtNF-YB1**, a subunit of the nuclear factor Y (NF-Y complex, also known as the HAP or the CAAT family), which mediates transcriptional control through CCAAT DNA elements*

Identification of an NF-YB protein from *Arabidopsis thaliana* and an orthologous **NF-YB protein from *Zea mays*** that coordinate plant responses to drought tolerance.



Conservazione della funzione nel pathway della tolleranza alla siccità tra monocot e dicot

**Microarray Analysis of 35S::AtNF-YB1 Arabidopsis Lines**

only 108 distinct genes were differentially expressed relative to WT

most overrepresented processes in the 35S::AtNF-YB1 profile were related to polysaccharide metabolism, in various forms.



To assess whether the mechanism of drought tolerance in  
*35S::AtNF-YB1* plants is novel,

*Comparisons of gene induction between*

*35S::AtNF-YB1* profile

*ABA-treated WT* plants

*CBF4* transcription factor-expressing plants,



a significant set of genes was similarly induced by ABA and CBF4  
constitutive expression,

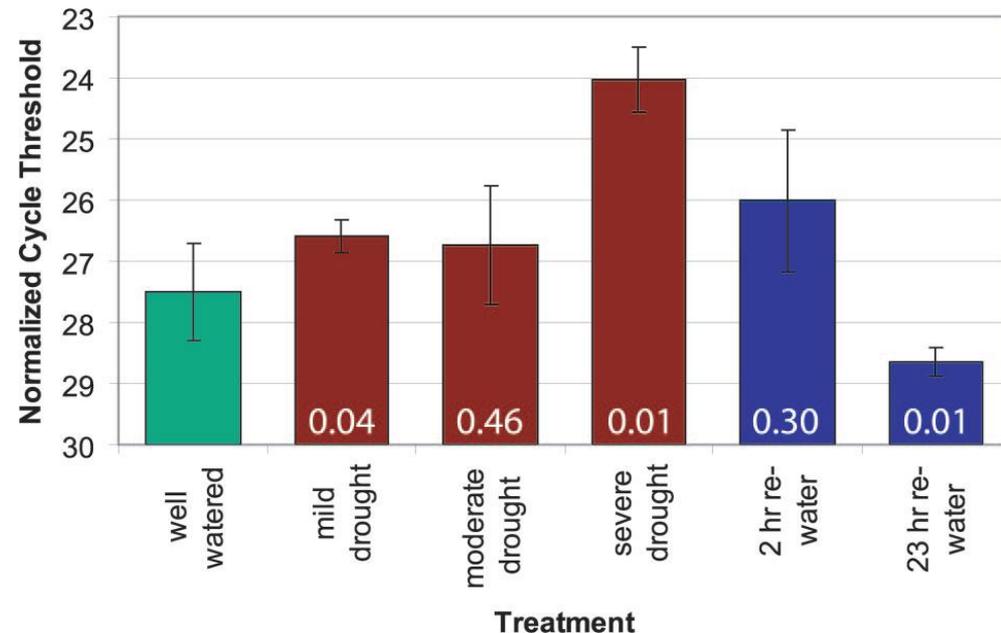
no such correlation was  
found with the expression profile of *35S::AtNF-YB1*.

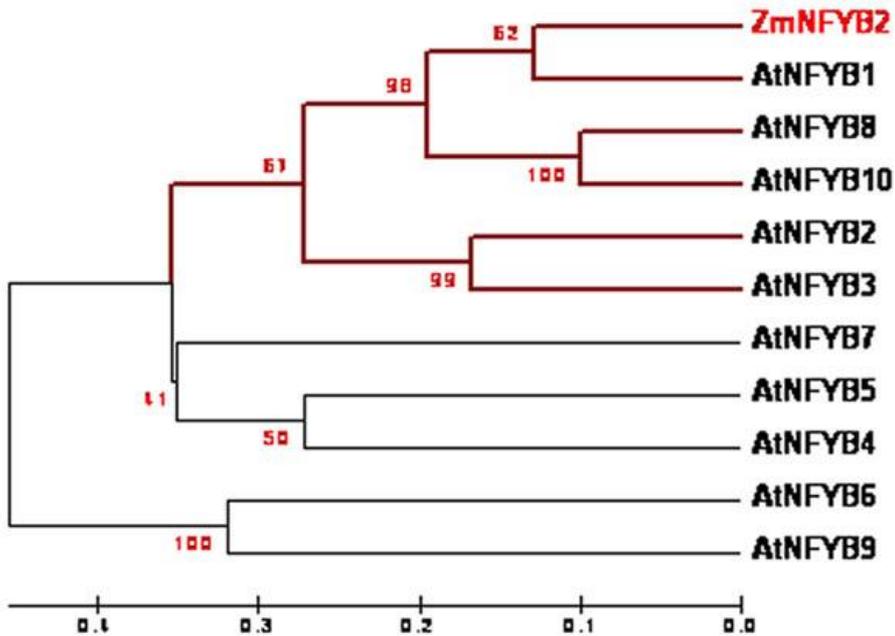
To confirm that *AtNF-YB1* was not acting through previously characterized drought-response mechanisms even during water deficit

several component genes from the CBF (**CBF4**, **RD29B**, **RAB18**) and ABA response (**COR15B**, **LEA76**) by RT-PCR in an independent experiment on 35S::*AtNF-YB1* and wild-type *Arabidopsis* grown under either well watered or droughted conditions,

*AtNF-YB1* does not transcriptionally regulate either the CBF or ABA drought tolerance

*AtNF-YB1* transcript levels showed a highly significant increase under severe drought relative to well watered conditions and then returned to basal levels by 24 h after rewatering

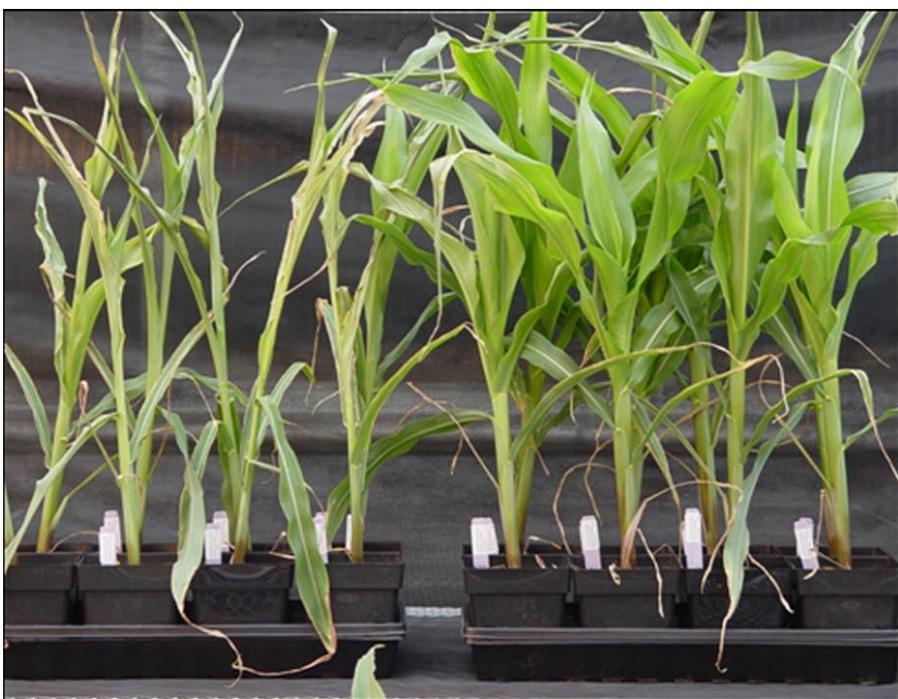




maize protein with 10 different *Arabidopsis* NF-YB proteins

like *AtNF-YB1*, *ZmNF-YB2* is expressed broadly across maize tissues

construct comprised a rice **actin 1 constitutive promoter** and a rice **actin 1 intron** linked to the maize gene (several transgenic lines)



Transgenic lines:  
less wilting,  
increased turgor pressure  
delayed onset of senescence



the existence of common stress-response  
pathways in maize and *Arabidopsis*



ZmNF-YB2 were healthier than the  
wild-type plants with less leaf rolling

a higher chlorophyll content

cooler leaf temperature  
higher stomatal conductance

**In field efficacy trials**, grain yield was measured under controlled drought treatments; the imposed drought stress resulted in a 50% yield reduction in the negative controls compared with what is expected under fully watered normal conditions.

transgenic expression of ZmNF-YB2 in maize enhances yield under drought stress

a greater yield benefit, for two of the three lines, was observed during 2003, under a more intense drought stress as compared with 2004. Indeed, under such relatively severe conditions, the best-performing transgenic maize line produced an 50% increase in yield relative to controls in the same experiment.

**Drought tolerance has been obtained in field trials with maize lines constitutively expressing the ZmNF-YB2 protein, demonstrating the potential of this strategy for improving drought tolerance in commercial crop plants.**

as necessary for chloroplast function

NF-YB subunits

potentially mediating the effect of  
CONSTANS-like proteins on flowering time

we have been unable to detect any marked changes in drought sensitivity in either of two independent T-DNA insertion lines for *AtNF-YB1*

The same strategy is expected to be applicable to many crops commonly grown in locations subject to drought.

data support a role for the *AtNF-YB1* and the *ZmNF-YB2* genes in a drought-adaptive mechanism.

# Ingegnerizzare la resistenza agli insetti



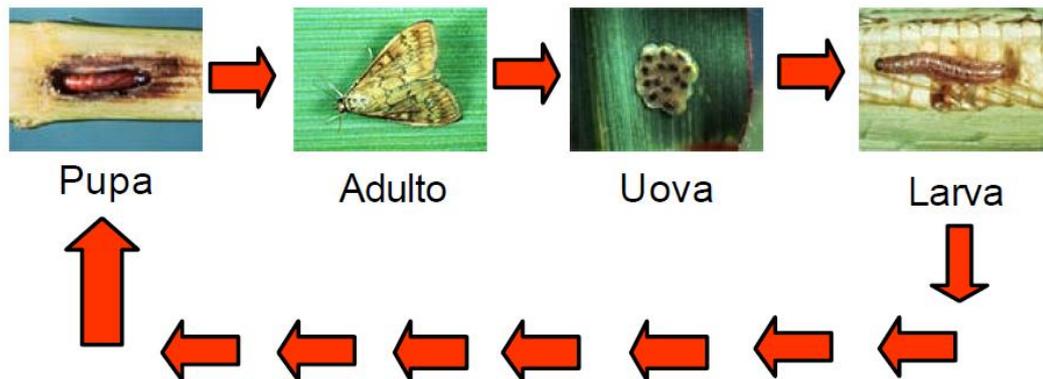
# La dimensione economica del problema degli insetti che attaccano il mais

I danni da insetti su **mais**, nel mondo:

- 52,6 milioni di tonnellate (circa il 9% della produzione totale)
- perdita media economica: 5,7 miliardi US\$

La piralide (*Ostrinia nubilalis*) & friends causano in US:

- perdita media resa: 4,5% (senza controllo stima: 14%)
- perdita media economica: 2 miliardi US\$ (in Europa 0.6)
- ettari infestati: 13 milioni





Preparati a base di *Bacillus thuringiensis* sono impiegati in agricoltura biologica per la difesa delle colture: è un biopesticida.

E' però costoso, instabile agli UV, e sono necessari trattamenti ripetuti

Il gene Bt codificato in *Bacillus thuringiensis* si esprime a livelli bassissimi in p. trans

Il gene privato di circa metà della sequenza al 3' è espresso maggiormente e conserva le sue proprietà insetticide;

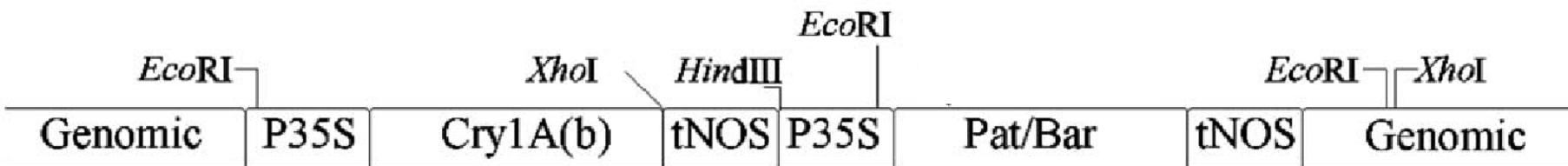
le p. trans così ottenute non sono però in grado di controllare gli insetti (basso livello di espressione della proteina Bt)

Il gene "corto" ulteriormente ingegnerizzato per eliminare sequenze che interferivano con la sua espressione in piante ha consentito di ottenere le prime varietà resistenti agli insetti grazie alla produzione di proteina Bt (fino allo 0,005-1% delle proteine solubili)

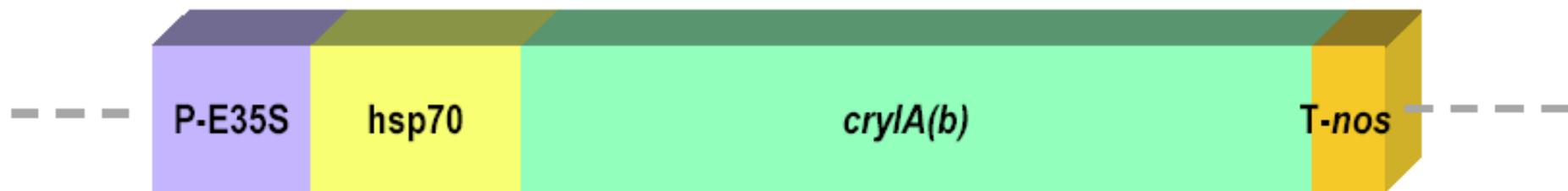
**Ibridi di mais transgenico**  
**Bt attualmente disponibili sul mercato**

<b>Event</b>	<b>Bt gene</b>	<b>Registrar</b>	<b>Trade name</b>	<b>Expression</b>
<b>176</b>	<b>Cry1Ab</b>	<b>Novartis</b> <b>Mycogen</b>	<b>Knockout</b> <b>NatureGard</b>	<b>Green tissue &amp;</b> <b>pollen only</b>
<b>BT11</b>	<b>Cry1Ab</b>	<b>Novartis</b>	<b>YieldGard</b>	<b>All plant parts</b>
<b>MON 810</b>	<b>Cry1Ab</b>	<b>Monsanto</b>	<b>YieldGard</b>	<b>All plant parts</b>
<b>DBT 418</b>	<b>Cry1Ac</b>	<b>Aventis</b>	<b>Bt-Xtra</b>	<b>All plant parts</b>
<b>CBH 351</b>	<b>Cry9C</b>	<b>AgrEvo</b>	<b>StarLink</b>	<b>All plant parts</b>

# Bt11



# Mon 810



## Quanto se ne fa di più con Bt?

Anno	% di incremento di resa per il mais Bt (USA)
1996	6.3=12 M\$
1997	7.4=89M\$
1998	2,4=26M\$
1999	2,5=35M\$
2000	2,9
2001	5,2=125M\$
2002	6,1
<b>Media</b>	<b>5,2</b>

Table 17. Aggregate Impacts of Transgenic *Bt* Corn and *Bt* Cotton in the USA in 1998 and 1999: Increases in Production (metric tons)

Crop	1998	1999
<i>Bt</i> Corn	1,500,000	1,700,000
<i>Bt</i> Cotton	80,740	117,935

Source: Carpenter and Gianessi 2001, Modified.

# Un problema recente: la diabrotica

Si usano contro questo insetto l'80% degli insetticidi del mais USA!



Sicuramente una soluzione biotecnologica di questo problema ridurrebbe di molto l'uso generale di insetticidi

# Soluzioni possibili: biotecnologiche

## Insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* protect corn from corn rootworms

Daniel J. Moellenbeck<sup>1\*</sup>, Melvin L. Peters<sup>1</sup>, James W. Bing<sup>2</sup>, James R. Rouse<sup>2</sup>, Laura S. Higgins<sup>1</sup>, Lynne Sims<sup>1</sup>,  
Tony Nevshemal<sup>1</sup>, Lisa Marshall<sup>1</sup>, R. Tracy Ellis<sup>3</sup>, Paul G. Bystrak<sup>2</sup>, Bruce A. Lang<sup>2</sup>, James L. Stewart<sup>2</sup>,  
Kristen Kouba<sup>1</sup>, Valerie Sondag<sup>1</sup>, Vicki Gustafson<sup>1</sup>, Katy Nour<sup>1,4</sup>, Deping Xu<sup>1</sup>, Jan Swenson<sup>1</sup>, Jian Zhang<sup>1</sup>,  
Thomas Czapl<sup>1</sup>, George Schwab<sup>3</sup>, Susan Jayne<sup>1</sup>, Brian A. Stockhoff<sup>3</sup>, Kenneth Narva<sup>3</sup>, H. Ernest Schnepf<sup>3</sup>,  
Steven J. Stelman<sup>3</sup>, Candace Poutre<sup>3,5</sup>, Michael Koziel<sup>1</sup>, and Nicholas Duck<sup>1</sup>

**Si usano il gene cry3bb1 (2003)  
i geni cy34Ab1 e 35Ab1 (2005)  
il gene cry3Aa modificato (2006).**

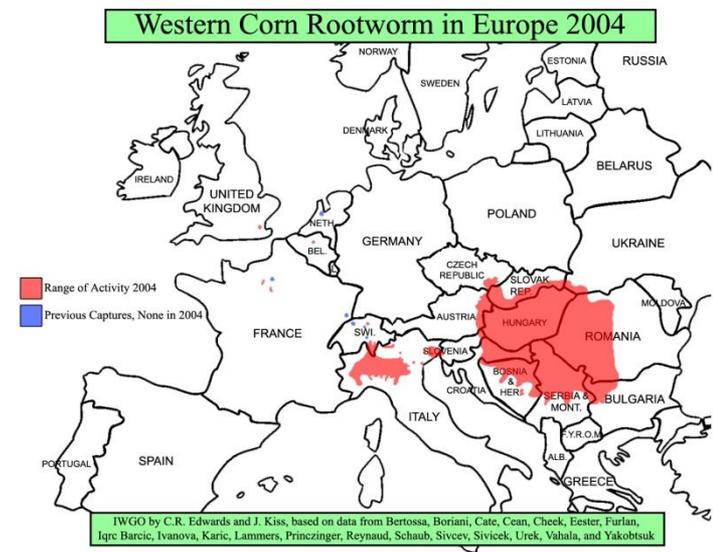
Test di campo di mais che co-esprimono due nuove endotossine di *B. thuringiensis* dimostrano che esiste protezione contro la diabrotica

Il livello di protezione supera quello assicurato dagli insetticidi chimici.

Nel batterio proteine sono codificate da un singolo operone ed hanno masse molecolari di 14 e 44 kDa (nella loro forma attiva, cioè già processata).

le larve vengono colpite nell'epitelio intestinale.

La **diabrotica** è uno dei peggiori nemici del mais



pesticidi

Le piante infestate

si usano organofosfati e piretroidi

sono più sensibili alla siccità

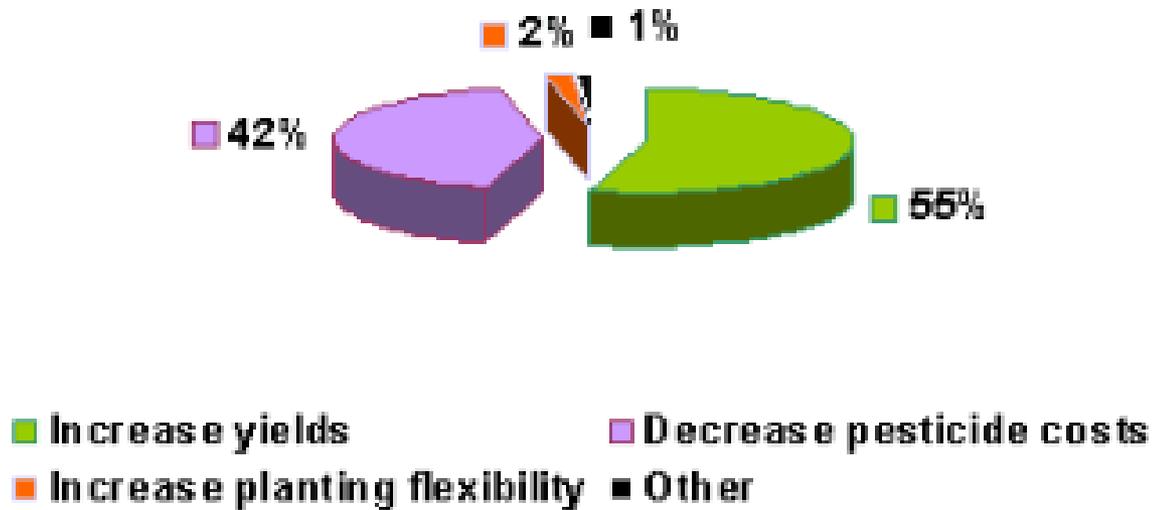
ad ulteriori infestanti radicali

diminuiscono la resa

possono allettare

# Impatto del COTONE Bt (Bollgard) sull'agricoltura USA

Bt Cotton



Il guadagno per il contadino è di 49.80\$ /ha, con un aumento del 10% rispetto al non-Bollgard



Tutto il cotone bollgard attualmente sul mercato deriva da un singolo evento di trasformazione andato particolarmente bene, il **Mon531**

costruito porta la **CryIc** sotto il 35S

attivo contro

bollworm



bollworm rosa



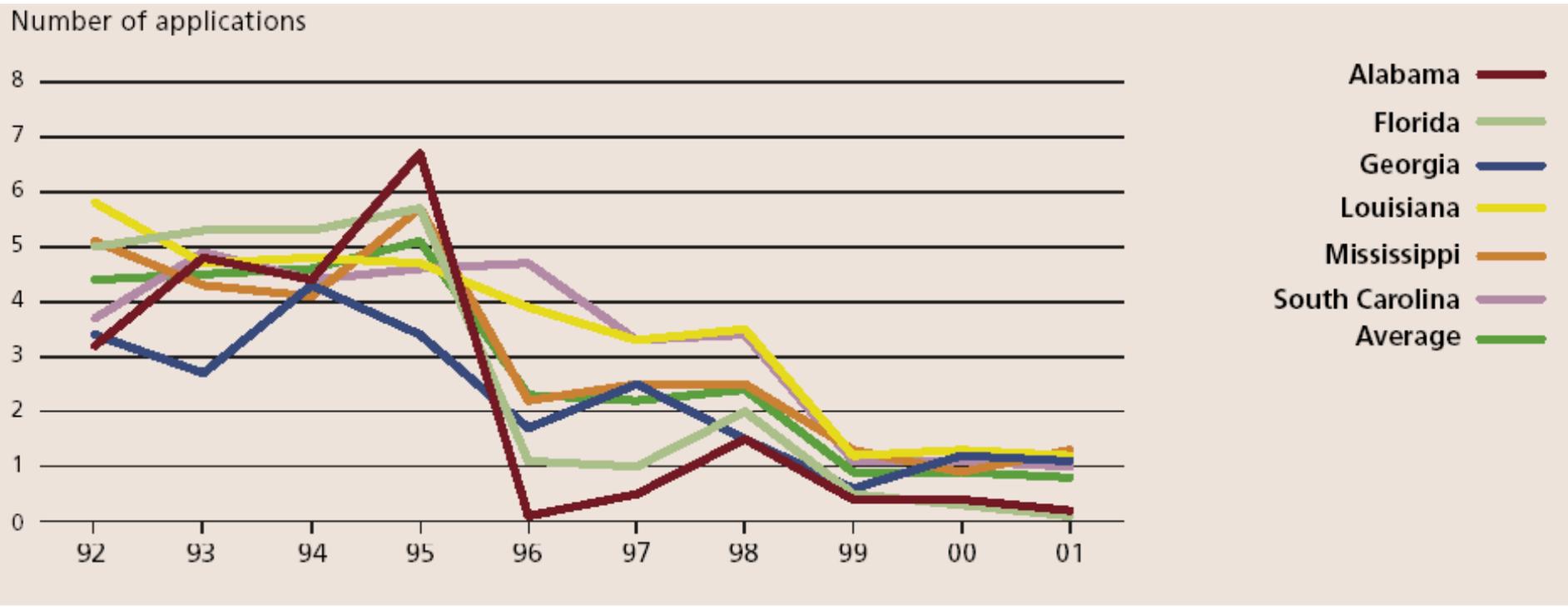
è d'obbligo **l'uso di una lotta chimica** che inficia la validità dell'uso del Bollgard se sono presenti altri insetti

L'uso del cotone Bt si è espanso rapidamente, in tutto il mondo si coltivano oggi (comprendendo anche le colture che hanno resistenza a insetti ed erbicidi) **circa 16 milioni di ettari.**

Si stima che il cotone usi circa il **25% di tutti i presidi chimici usati in agricoltura nel mondo!** (compresi alcuni dei più tossici). Gli organofosfati hanno rimpiazzato il DDT dagli anni 80', in quei Paesi dove il DDT è stato vietato.

Tuttavia gli insetti hanno **rapidamente sviluppato resistenza** a questa classe di insetticidi e alla loro alternativa, i piretroidi.

# Trattamenti chimici su cotone USA-StatI selezionati



Source: Falck-Zepeda, Traxler and Nelson, 1999.



## Ultime considerazioni!

A livello mondiale, l'uso di ibridi Bt o di nuova generazione ha il potenziale di arrivare a sostituire fino al 50% delle ton di insetticidi usati annualmente sul mais (che costano circa 550 milioni di dollari).

**il cotone è la coltura sulla quale si usano più insetticidi (80000 tonnellate per 1.7 miliardi di dollari su 35 milioni di ettari).**

Il numero medio di applicazioni contro il bollworm era di 4.6 nel 1992, ed è ora passato a 0.8, il che significa una riduzione di circa 1000 tonnellate di principio attivo!

# Selezione di piante transgeniche (problemi)

Geni che codificano per antibiotici o erbicidi sono largamente usati come marcatori di selezione  
(bassa efficienza di trasformazione)

Spesso hanno un effetto negativo sulla proliferazione cellulare o sul differenziamento  
(diminuiscono la frequenza di trasformazione)

Alcune specie sono insensibili o tolleranti all'agente selettivo (difficile selezionare le cellule trasformate)

Può diventare difficile trovare il marcatore più appropriato e stabilire le condizioni ottimali per la trasformazione

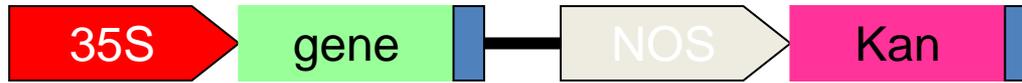
Può diventare difficile introdurre un secondo gene di interesse in piante transgeniche che già contengono geni di resistenza come agenti selettivi

Introdurre più geni simultaneamente è impossibile  
(servono molti marcatori di selezione)

Largo numero di caratteri desiderabili che si potrebbero introdurre in pianta ma un numero limitato di marcatori di selezione

I marcatori di selezione rimangono nelle piante transgeniche ed il prodotto genico deve essere testato per la sicurezza alimentare e impatto ambientale

## Esempio



- *nptII* da *E.Coli* conferisce resistenza alla kanamicina e Neomicina (che sono limitatamente usate in ambito umano).
- Viene detossificato per **fosforilazione**.

### *Effetti negativi:*

- trasferimento alla microflora intestinale o ad altri micro-organismi
- insorgenza di resistenza in talune specie vegetali

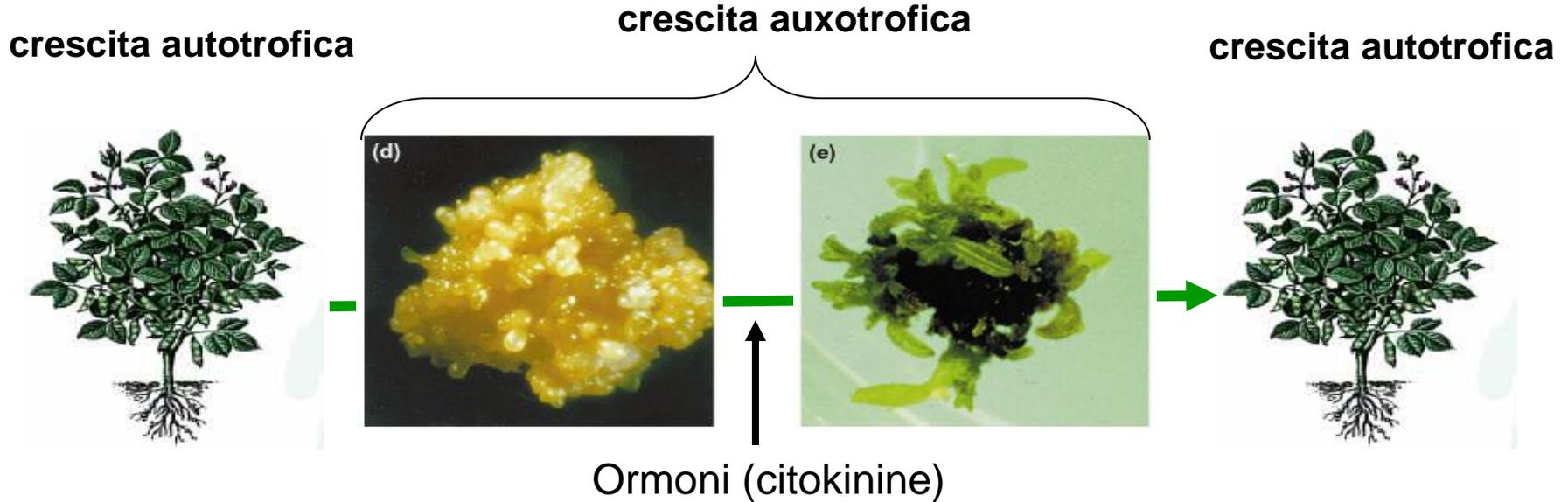
## Fenomeno molto dibattuto

rischio di trasferimento ed espressione in batteri, fenomeno che potrebbe compromettere le **possibilità di uso clinico o veterinario di certi antibiotici**

## Sistemi alternativi all'uso del marker o per la sua eliminazione:

1. sistemi alternativi (viene usato un marker che pone meno problemi "ambientali")
2. eliminazione del marker dopo la selezione

# Sistemi marker alternativi



Il **principio** dei metodi alternativi di selezione positiva: le cellule trasformate subiscono un vantaggio di sviluppo, conducendo ad un aumento della efficienza rigenerativa delle piante trasformate

Molti studi han dimostrato che la manipolazione del livello di citochinina endogena usando il gene *ipt* (*CaMV35S*) porta alla proliferazione (selezione) di cellule transgeniche e al differenziamento di germogli avventizi in mezzo di coltura senza ormoni

Le piante transgeniche mostrano un ESP e perdono la dominanza apicale



Facile selezione ma difficile radicazione per la sovrapproduzione di citochinina



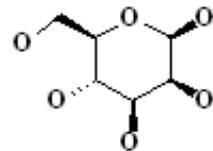
**Interessante:**

Sviluppare dei sistemi per la rimozione del marcatore di selezione

si eviterebbero i problemi ambientali  
trasformare la pianta transgenica

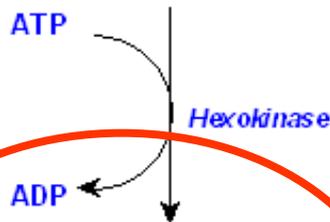
## Sistemi marker alternativi

- **Mannose-6-phosphate isomerase**
- E' codificato dal gene *pmi* di E. Coli (converte il mannosio 6-P, altrimenti non utilizzabile, in fruttosio 6-P)
- I trasformanti sono "incoraggiati" a crescere su mannosio



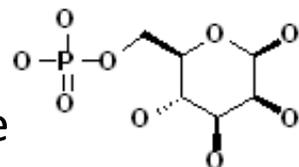
mannose

Frequenza di trasformazione alta



Blocco della crescita

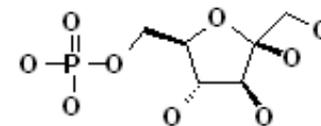
tossico in piante



mannose-6-phosphate

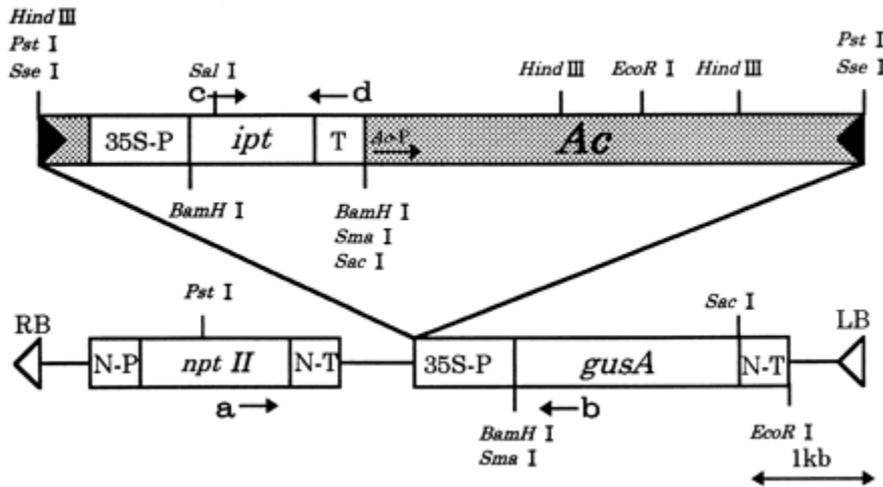
phosphomannose isomerase

*pmi*



fructose-6-phosphate

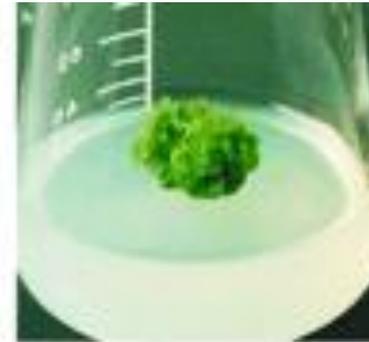
# Eliminazione del marker dopo la selezione



Utilizzo di Ac per rimuovere il gene *ipt*

Nel processo di trasposizione circa il 10% degli elementi Ac che vengono excisi non si reinseriscono

Rigenerazione in mezzo non selettivo



Differenziamento di ESP

Sviluppo di germogli normali da ESP

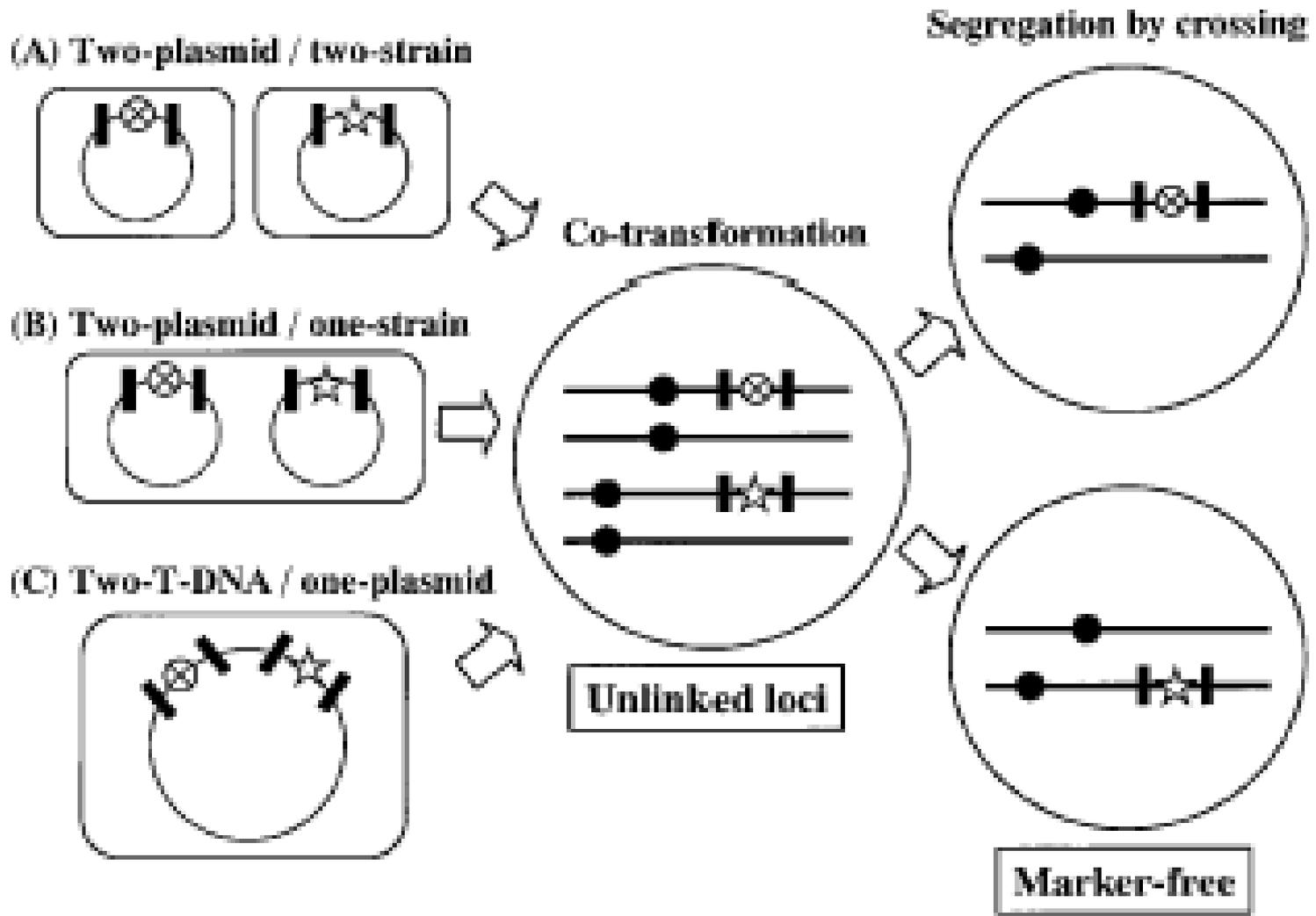


Radicazione

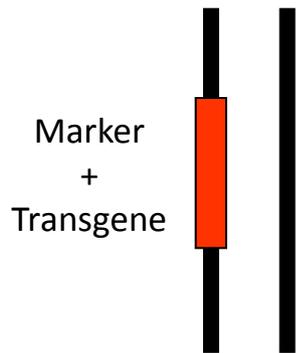
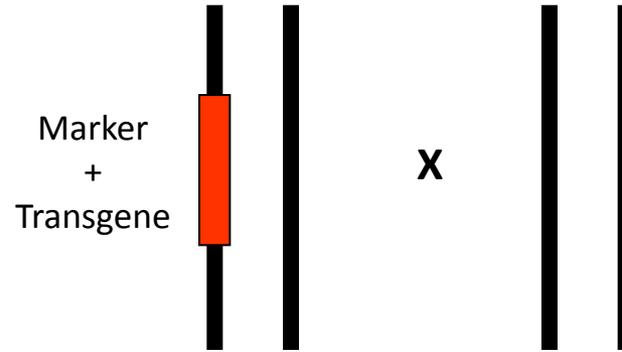
## Eliminazione del marker dopo la selezione

- Cotrasformazione di due diversi costrutti e successiva segregazione in incroci genetici
- È necessario rigenerare piante fertili per la separazione genetica dei due loci transgenici
- Un gene per la selezione ed un gene di interesse da un diverso T-DNA sono introdotti in una cellula vegetale mediante co-trasformazione.
- Il gene di selezione ed il gene di interesse sono cotrasformati in due loci **non in associazione** genetica.
- Il gene di interesse viene quindi segregato dal gene marker mediante incroci sessuali e selezione.

# Cotrasformazione



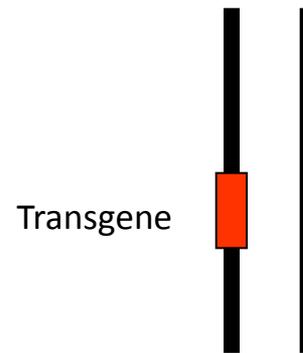
Un evento di crossing-over all'interno delle 400 bp che separano il gene marker dal transgene è altamente improbabile



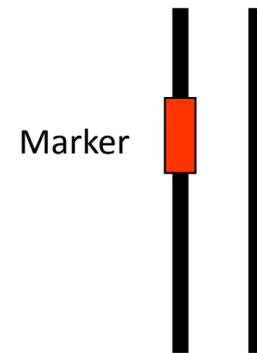
1/2



1/2



Altamente  
improbabile



Altamente  
improbabile

Se il gene marker è stato trasposto sufficientemente distante dal transgene i due caratteri segregheranno come due loci distinti

