

Universidade de São Paulo (USP)
Escola de Engenharia de Lorena (EEL)
Engenharia Bioquímica



Aula 7

Transformação Genética de Plantas

Elisson Romanel

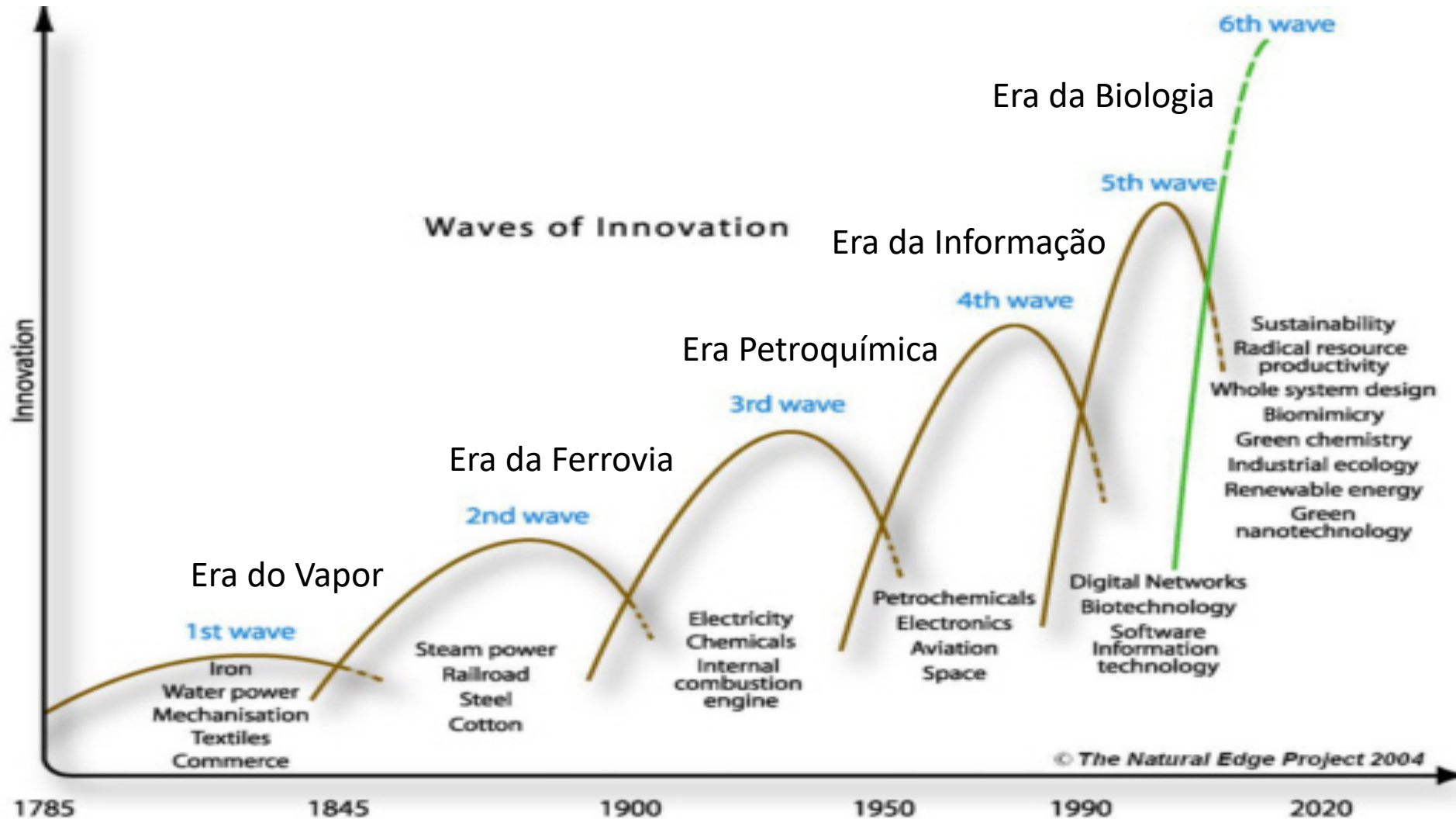
1. Transformação indireta

2. Transformação direta

Mudanças Fundamentais na Tecnologia

Nikilai Kondratiev (1892-1938) – economista russo

The Major Economic Cycles (1925)

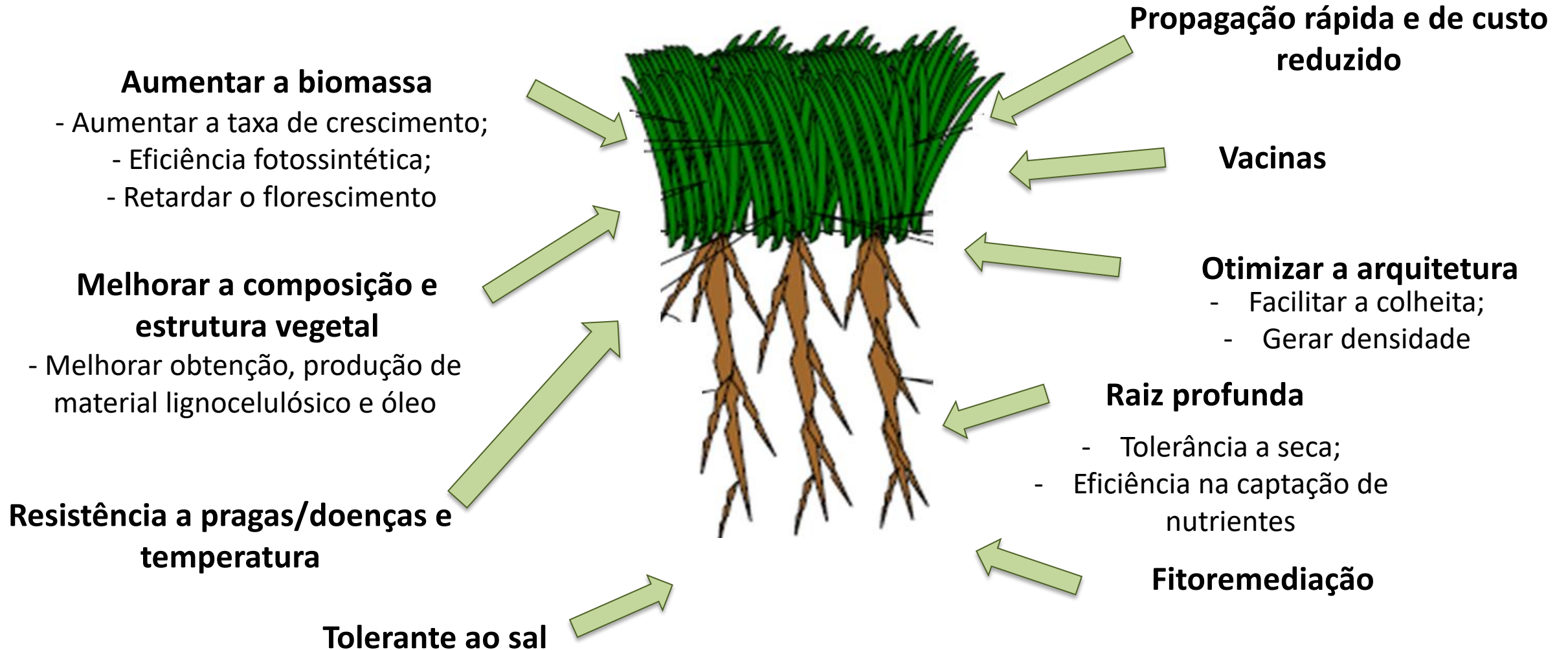


- População
- Alimento
- Energia



Biotecnologia de Plantas

Transformação Genética de Plantas



Transferência Gênica Mediada por *Agrobacterium*

Da Curiosidade para a Ciência



Tumor galha de coroa
(Guaratinguetá-SP)



Tumor galha de coroa em carvalho

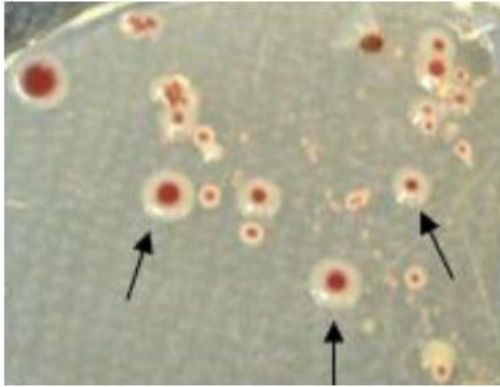


Galha de coroa em tomate

- *Agrobacterium*: engenheiro natural (*Rhizobium radiobacter* - 2001)

Transferência Gênica Mediada por *Agrobacterium*

Colônia



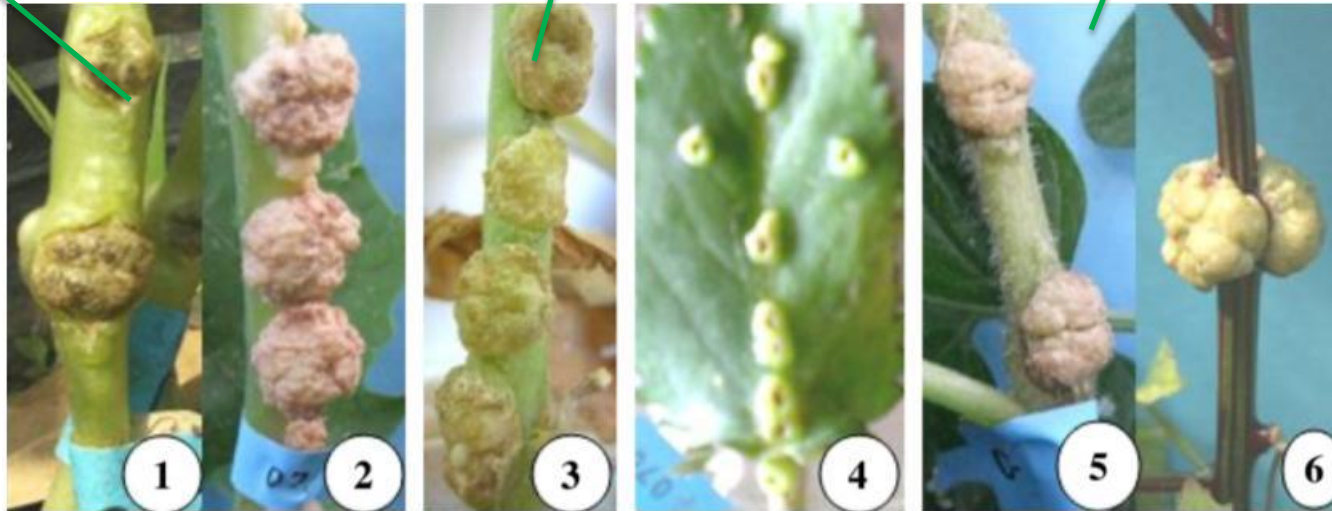
Infecção artificial e progresso do tumor em videira



Transferência Gênica Mediada por *Agrobacterium*

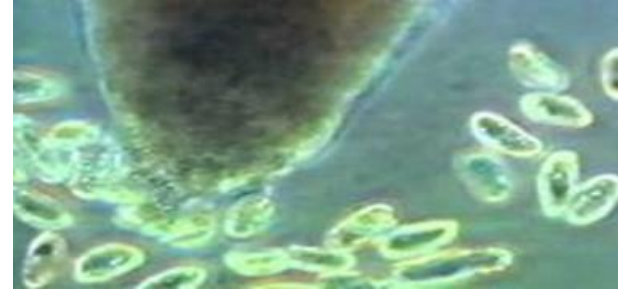


Tumor em girassol,
datura, tabaco,
kalanchoe, tomate,
and chenopodium



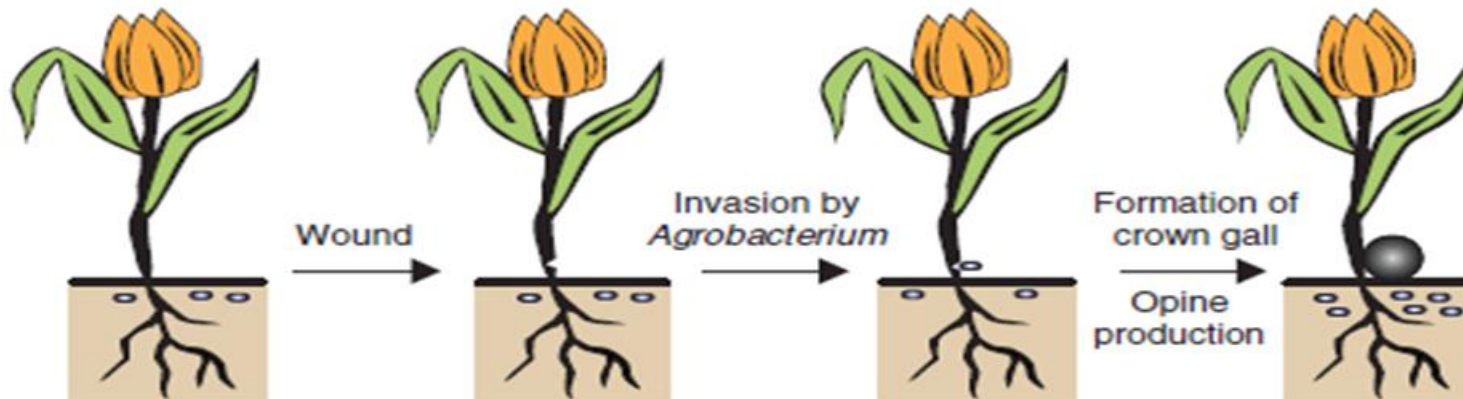
Transferência Gênica Mediada por *Agrobacterium*

Rizosfera

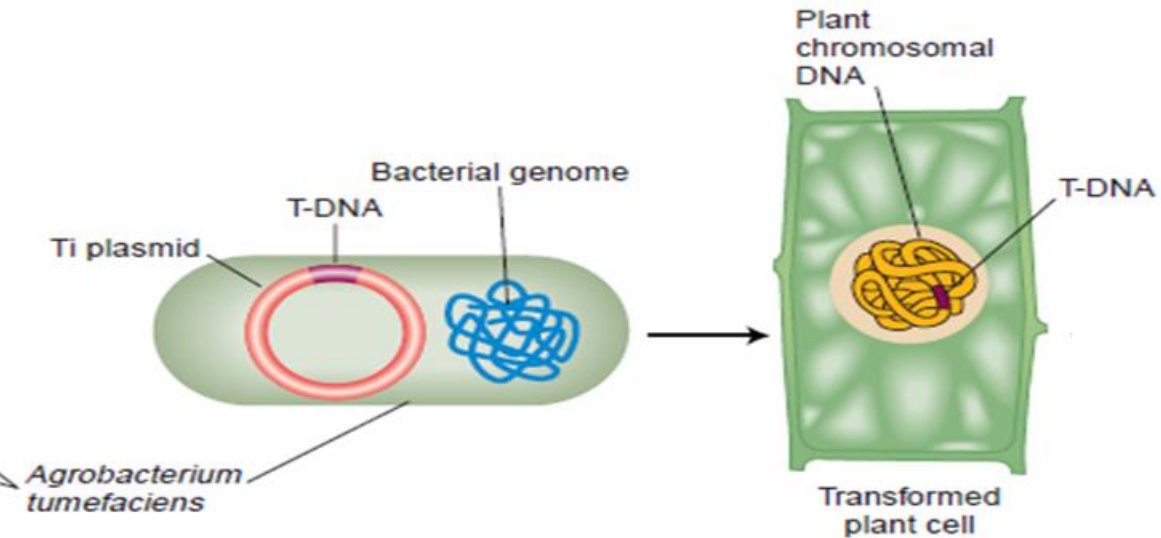
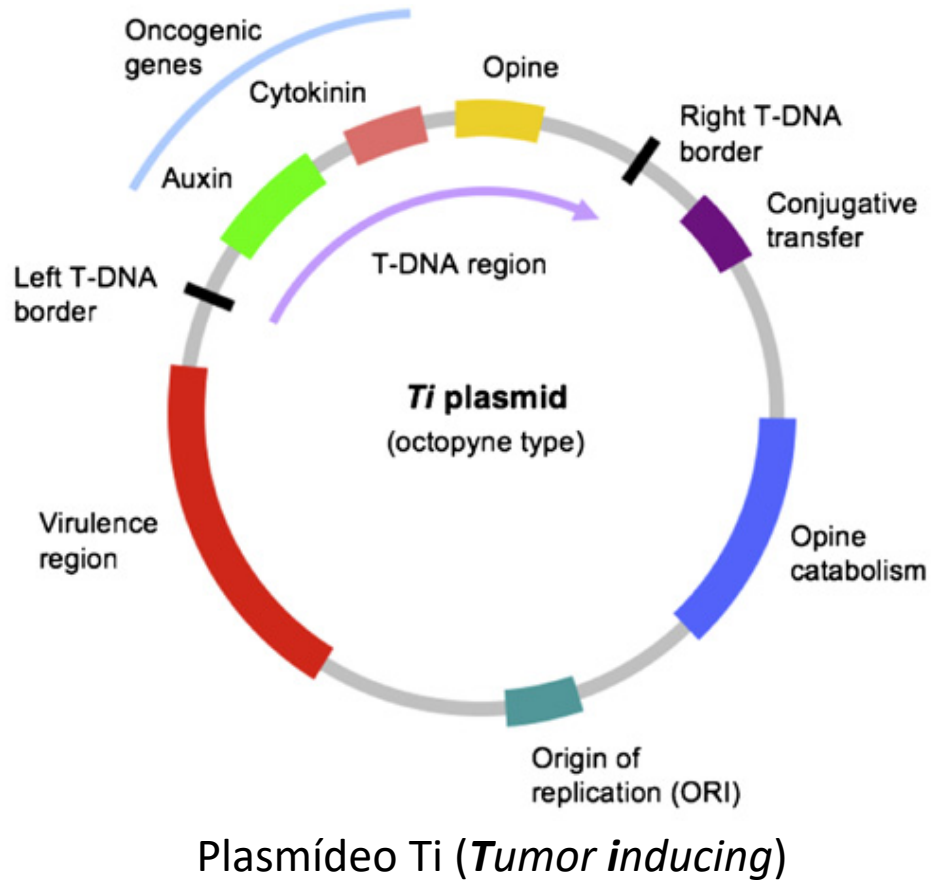


A. tumefaciens infecta após lesão

Quimiotaxia (açúcares e compostos fenólicos)



Transferência Gênica Mediada por *Agrobacterium*



Transferência horizontal (T-DNA)

Transferência Gênica Mediada por *Agrobacterium*



[Citocinina]



[Auxina]



Processo de Transferência e Integração

Passo 1 – Reconhecimento de sinal (VirA-VirG) (acetoceringona)

Passo 2 – Ligação de *Agrobacterium* ao tecido (indução da região *vir*)

Passo 3 – Heterodímero VirD2/VirD1 funciona como ssDNA nuclease

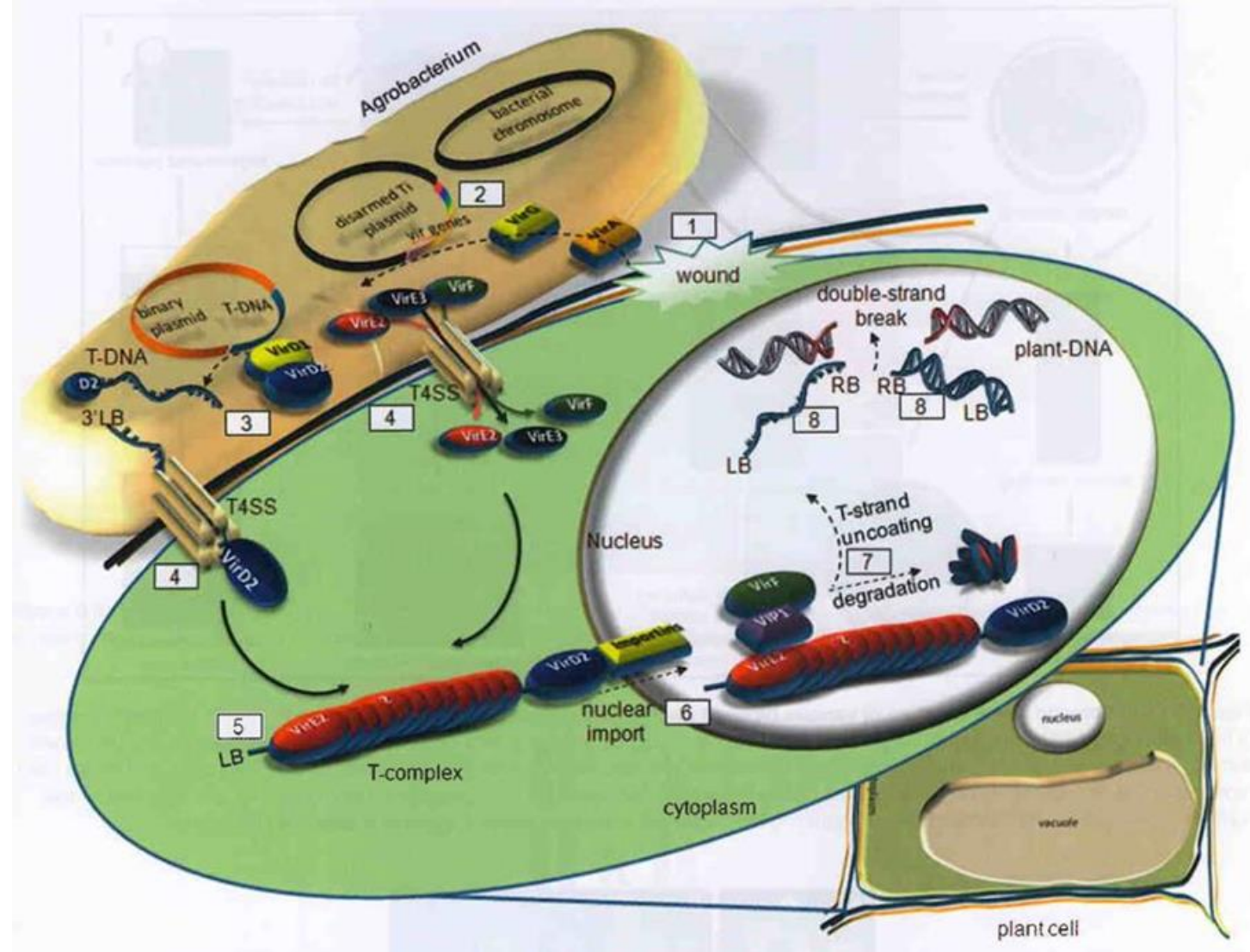
Passo 4 – Complexo-T imaturo (VirD2/ssT-DNA). Sistema de excreção VirB/VirD4 para a planta

Passo 5 – Completo-T maduro. T-DNA é coberto por VirE2

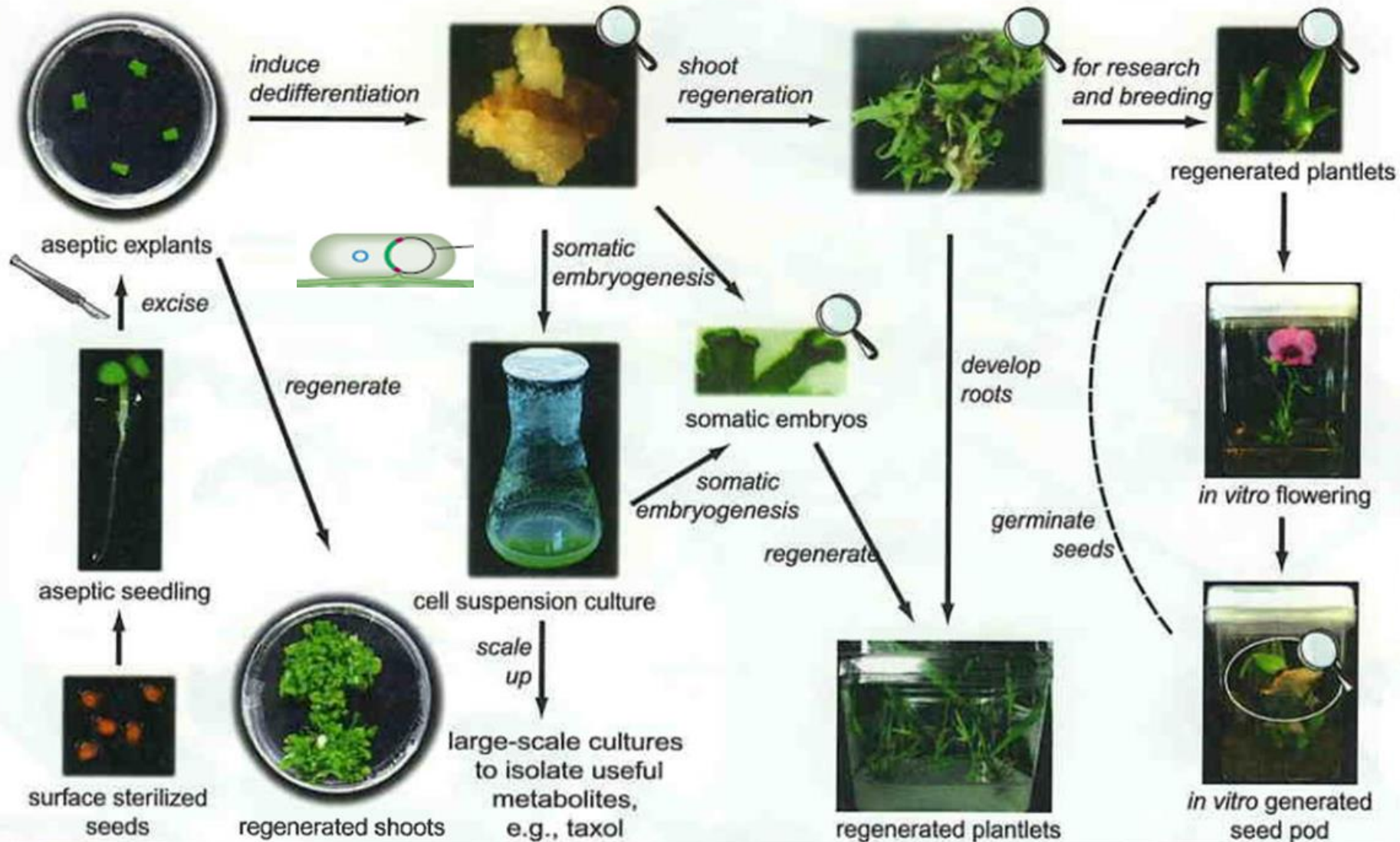
Passo 6 – Passagem para o núcleo

Passo 7 – VIP1 auxilia a integrar na cromatina

Passo 8 – Integração aleatória



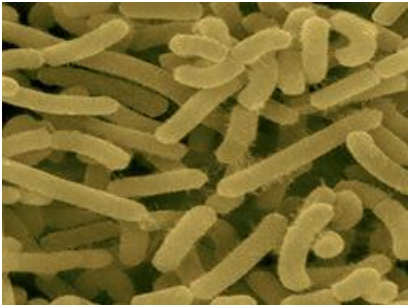
Aplicações práticas da transformação mediada por *Agrobacterium*



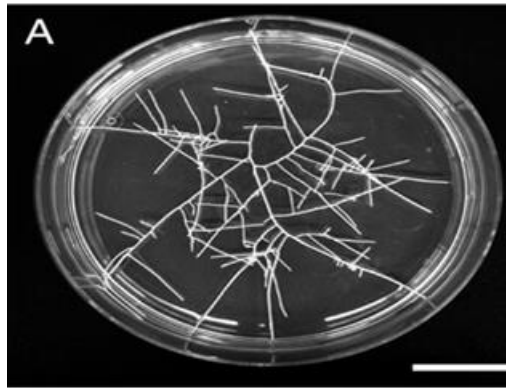
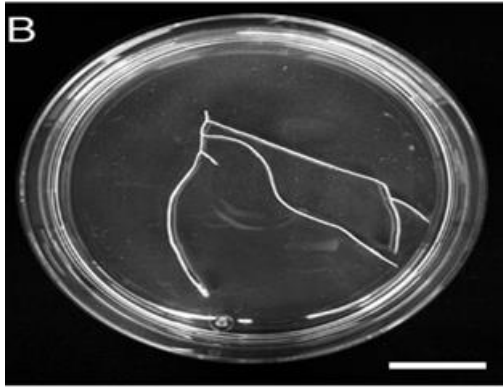
- Protocolo transformação
- Protocolo regeneração
- Dependente de espécies
- Razões históricas
- Menor rearranjo genético
- Menor N° cópias

- 1) Identificar um explante adequado
- 2) Co-cultivo com *Agrobacterium*
- 3) Eliminar a *Agrobacterium* com antibiótico específico
- 4) Selecionar por células vegetais transformadas
- 5) Regenerar uma planta inteira

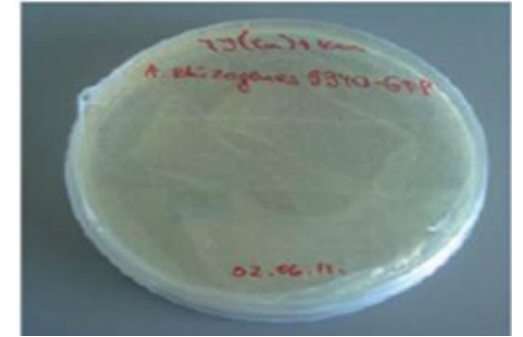
Aplicações práticas da transformação mediada por *Agrobacterium*



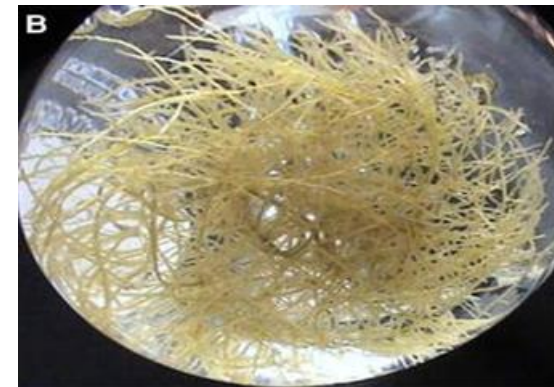
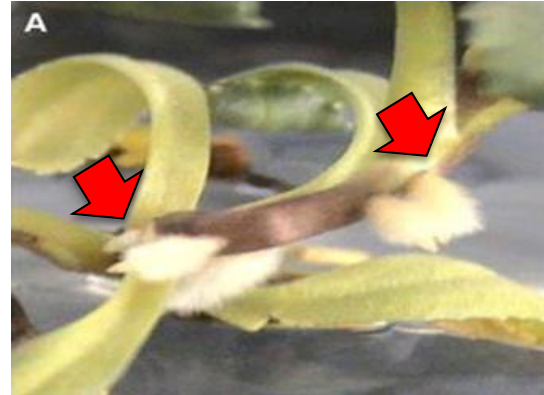
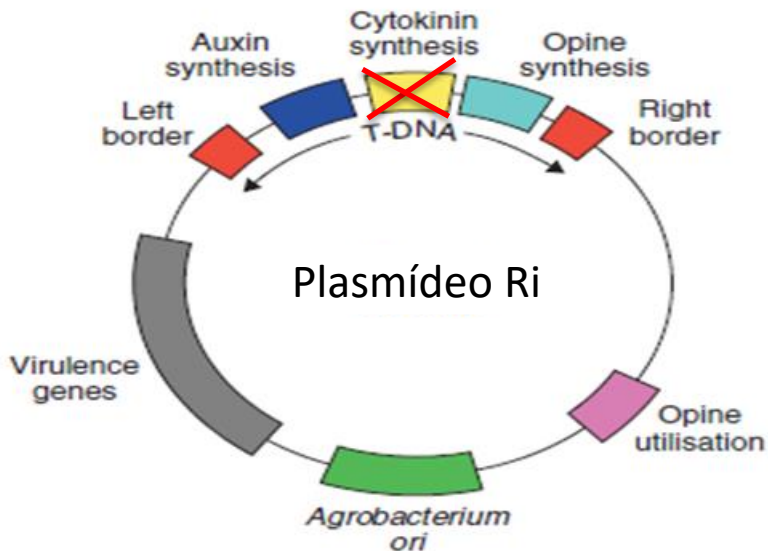
A. rhizogenes



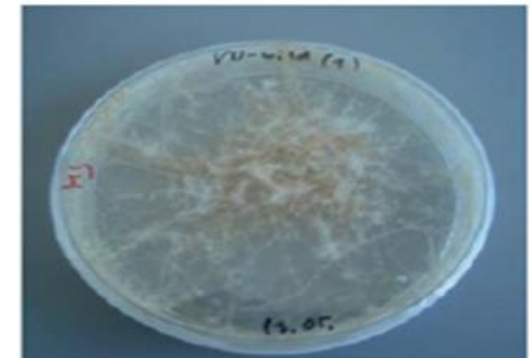
Raiz-em-cabeleira (*hairy root*)



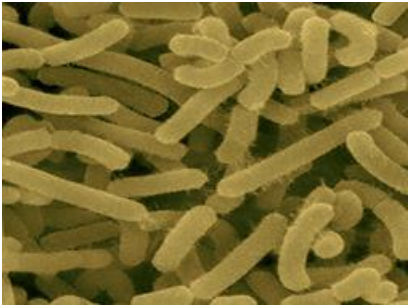
Síntese
Metabolismo



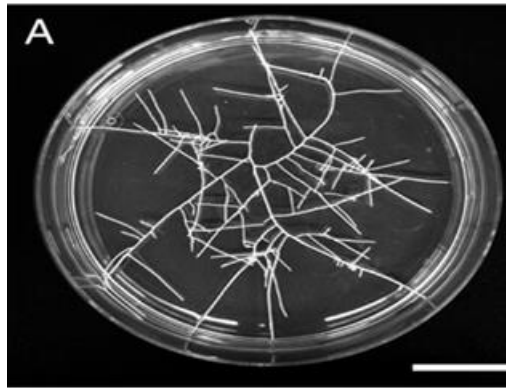
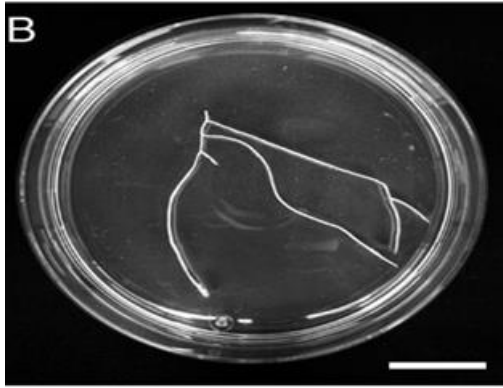
(b) Pre-bioreactor



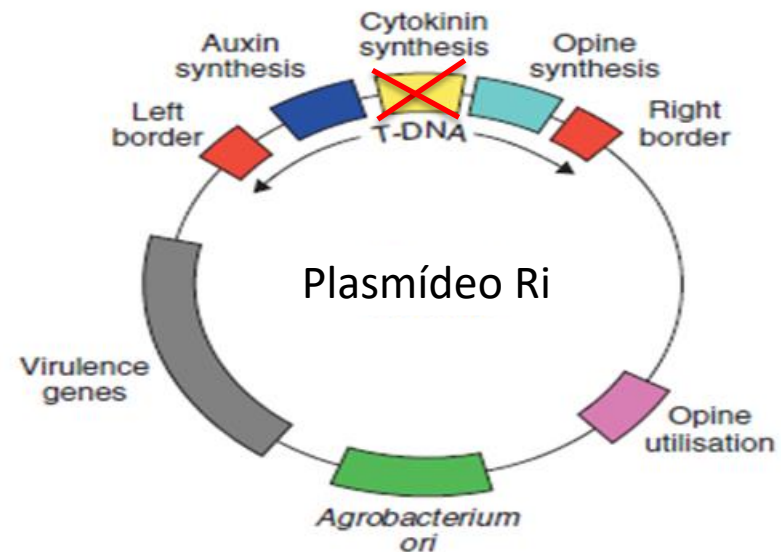
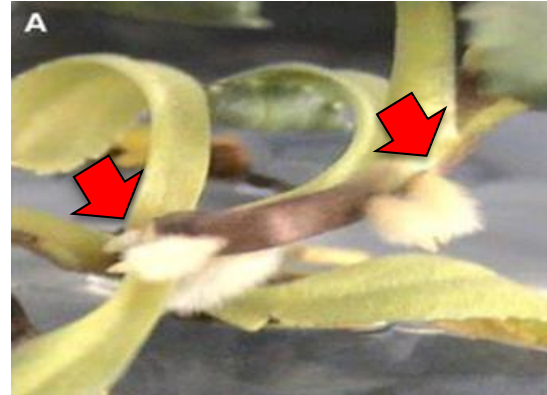
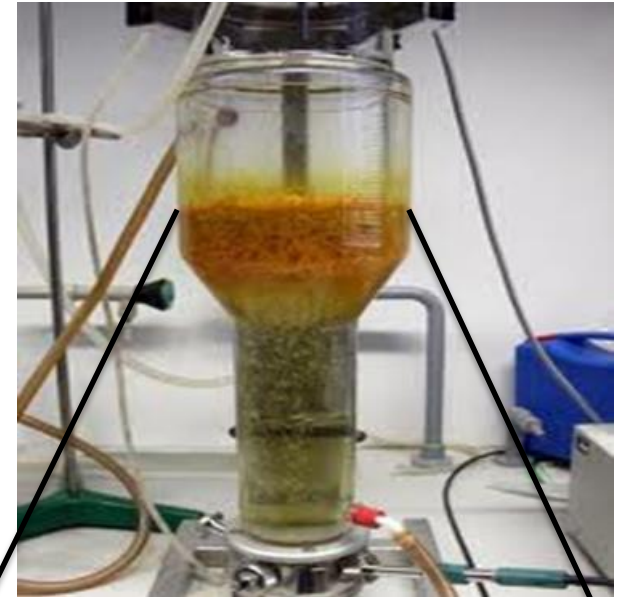
Aplicações práticas da transformação mediada por *Agrobacterium*



A. rhizogenes



Raiz-em-cabeleira (*hairy root*)



Aplicações práticas da transformação mediada por *Agrobacterium*

Transformação por infiltração da inflorescência (*Floral dip*)

Protocol

Nature Protocols **1**, 641 - 646 (2006)

Published online: 29 June 2006 | doi:10.1038/nprot.2006.97

Subject Categories: [Genetic modification](#) | [Cell and tissue culture](#) | [Plant biology](#)

Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method

Xiuren Zhang¹, Rossana Henriques¹, Shih-Shun Lin¹, Qi-Wen Niu¹ & Nam-Hai Chua¹

Collective efforts of several laboratories in the past two decades have resulted in the development of various methods for *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. Among these, the floral dip method is the most facile protocol and widely used for producing transgenic *Arabidopsis* plants. In this method, transformation of female gametes is accomplished by simply dipping developing *Arabidopsis* inflorescences for a few seconds into a 5% sucrose solution containing 0.01–0.05% (vol/vol) Silwet L-77 and resuspended *Agrobacterium* cells carrying the genes to be transferred. Treated plants are allowed to set seed which are then plated on a selective medium to screen for transformants. A transformation frequency of at least 1% can be routinely obtained and a minimum of several hundred independent transgenic lines generated from just two pots of infiltrated plants (20–30 plants per pot) within 2–3 months. Here, we describe the protocol routinely used in our laboratory for the floral dip method for *Arabidopsis* transformation. Transgenic *Arabidopsis* plants can be obtained in approximately 3 months.

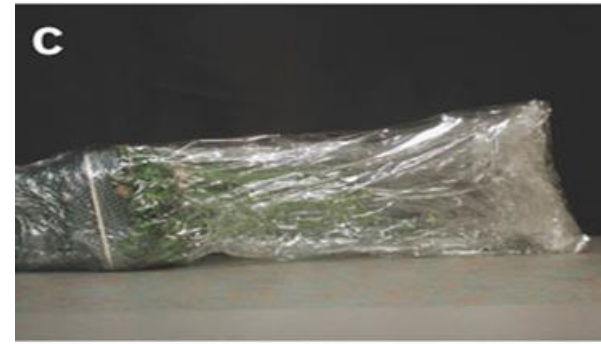
ARTICLE TOOLS

-  Send to a friend
-  Export citation
-  Export references
-  Rights and permissions
-  Order commercial reprints

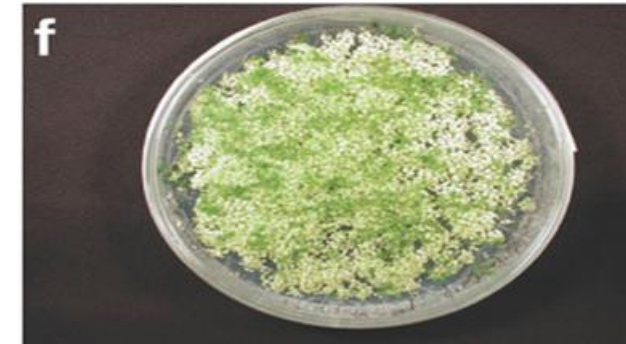
SEARCH PUBMED FOR

- ▶ Xiuren Zhang
- ▶ Rossana Henriques
- ▶ Shih-Shun Lin
- ▶ Qi-Wen Niu
- ▶ Nam-Hai Chua

Aplicações práticas da transformação mediada por *Agrobacterium*



Aplicações práticas da transformação mediada por *Agrobacterium*



1. Transformação indireta

2. Transformação direta

Transferência Gênica Direta

Métodos Físicos

- Biobalística
- Eletroporação de protoplastos
- Microinjeção de DNA
- Lipossomos
- Transformação mediada por ultrassom
- Microfibrilas de carboneto de silício

Métodos Químicos

- Transferência gênica mediada por PEG (polietilenoglicol)
- Coprecipitação com fosfato de cálcio
- Transferência gênica mediada por dimetilsulfóxido (DMSO)
- Transferência gênica mediada por dietilaminoetil-dextran (DEAE dextran)

Transferência Gênica Direta

Biobalística ou Bombardeamento de Partículas ou Acelerador de partículas

- Biologia + balística. 1987 – John Sanford



- DNA coberto com partículas de tungstênio ou ouro
- Número e tamanho da partícula, dano e quantidade de DNA
- Expressão transiente

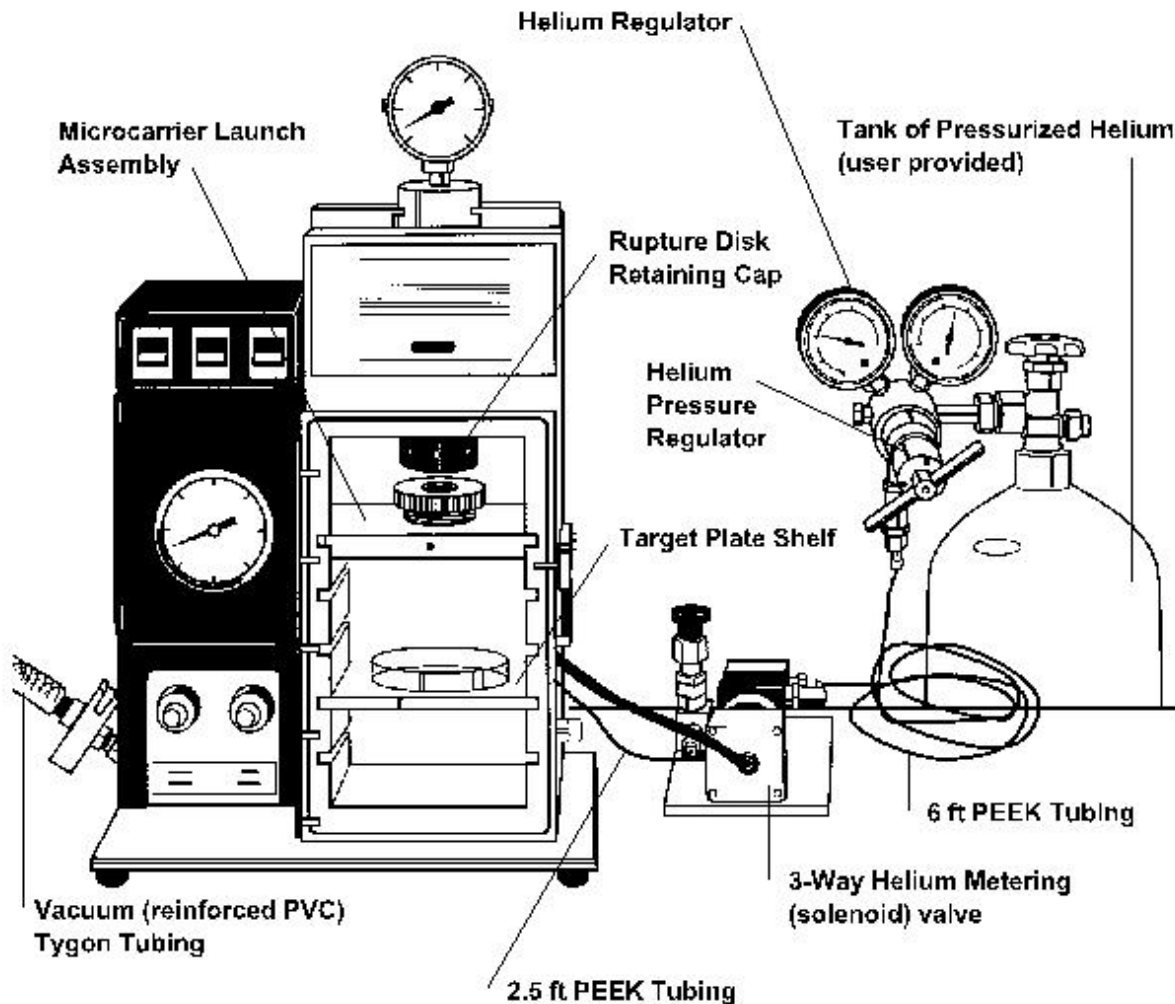


- Razão histórica – cereais (recalcitrância)
Ex.: milho *Bt* (*Bacillus thuringiensis*) 1988
- Alto frequência de rearranjo gênico
- Alto número de cópias (silenciamento)

Transferência Gênica Direta

Biobalística ou Bombardeamento de Partículas ou Acelerador de partículas

PDS-1000/He

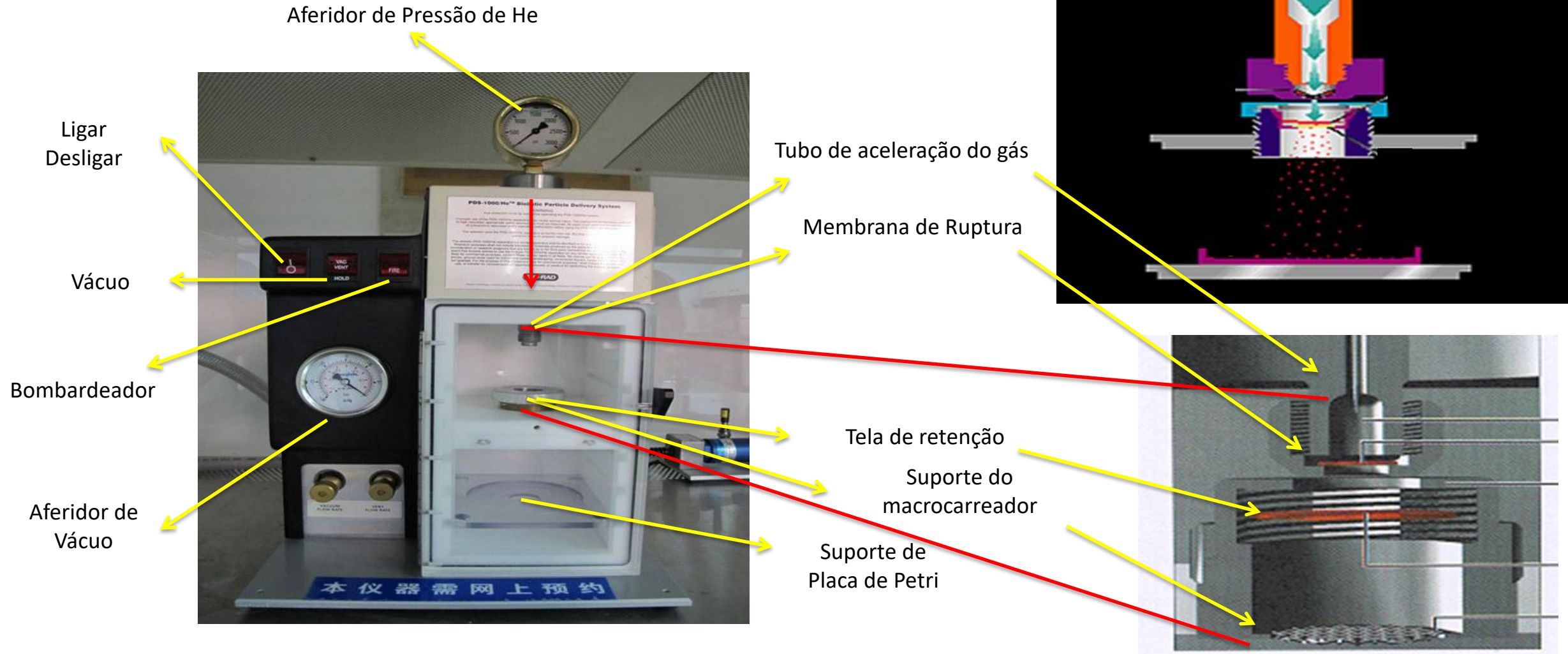


Bomba de Vácuo

Tanque de Hélio Pressurizado

Transferência Gênica Direta

Biobalística ou Bombardeamento de Partículas ou Acelerador de partículas



Transferência Gênica Direta

Biobalística ou Bombardeamento de Partículas ou Acelerador de partículas

Helios Gene Gun System
(portátil)



**A Cell-to-cell Macromolecular Transport Assay in
Planta Utilizing Biolistic Bombardment**

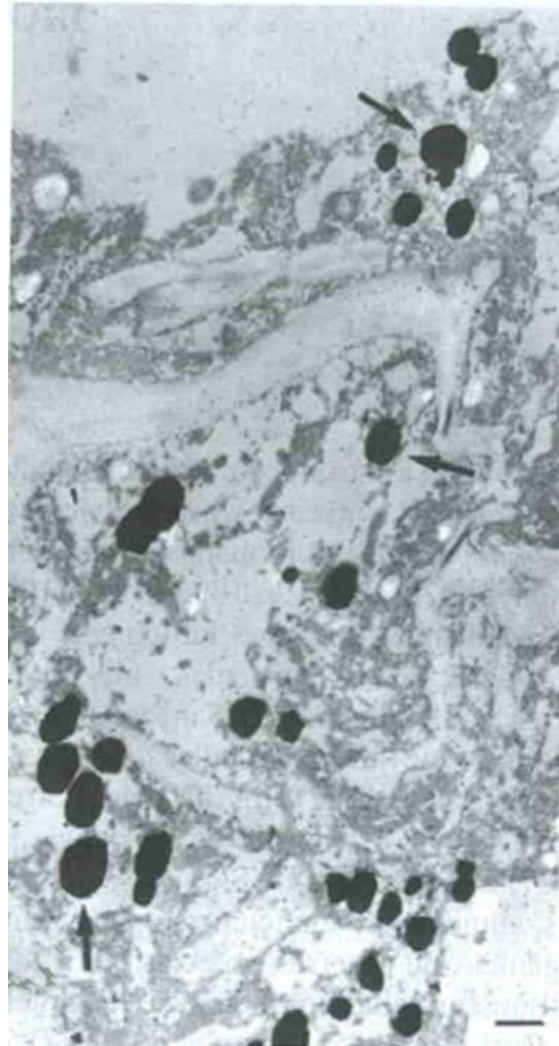
Video



Transferência Gênica Direta

Biobalística ou Bombardeamento de Partículas ou Acelerador de partículas

Eletromicrografia de células
meristemáticas de feijão



Cultura de tecidos e transformação genética de plantas (EMBRAPA-Vol.2)

Transferência Gênica Direta

Biobalística ou Bombardeamento de Partículas ou Acelerador de partículas



Recursos Genéticos e Biotecnologia

The logo for "nature protocols" is shown in white text on a dark purple background. To the right, there is a faint image of laboratory glassware.

Access
To read this story in full you will need to login or make a payment (see right).
nature.com > Journal home > Table of Contents

Protocol

Nature Protocols **3**, 410 - 418 (2008)
Published online: 21 February 2008 | doi:10.1038/nprot.2008.9

Subject Categories: [Cell and tissue culture](#) | [Genetic analysis](#) | [Genetic modification](#) | [Model organisms](#) | [Nucleic acid based molecular biology](#) | [Recombinant technology](#) | [Plant biology](#)

High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants

Elibio L Rech¹, Giovanni R Vianna¹ & Francisco J L Aragão¹

This protocol describes a method for high-frequency recovery of transgenic soybean, bean and cotton plants, by combining resistance to the herbicide imazapyr as a selectable marker, multiple shoot induction from embryonic axes of mature seeds and biolistics techniques. This protocol involves the following stages: plasmid design, preparation of soybean, common bean and cotton apical meristems for bombardment, microparticle-coated DNA bombardment of apical meristems and *in vitro* culture and selection of transgenic plants. The average frequencies (the total number of fertile transgenic plants divided by the total number of bombarded embryonic axes) of producing germline transgenic soybean and bean and cotton plants using this protocol are 9, 2.7 and 0.55%, respectively. This protocol is suitable for studies of gene function as well as the production of transgenic cultivars carrying different traits for breeding programs. This protocol can be completed in 7–10 months.

ARTICLE TOOLS

- Send to a friend
- Export citation
- Export references
- Rights and permissions
- Order commercial reprints

SEARCH PUBMED FOR

- Elibio L Rech
- Giovanni R Vianna
- Francisco J L Aragão