



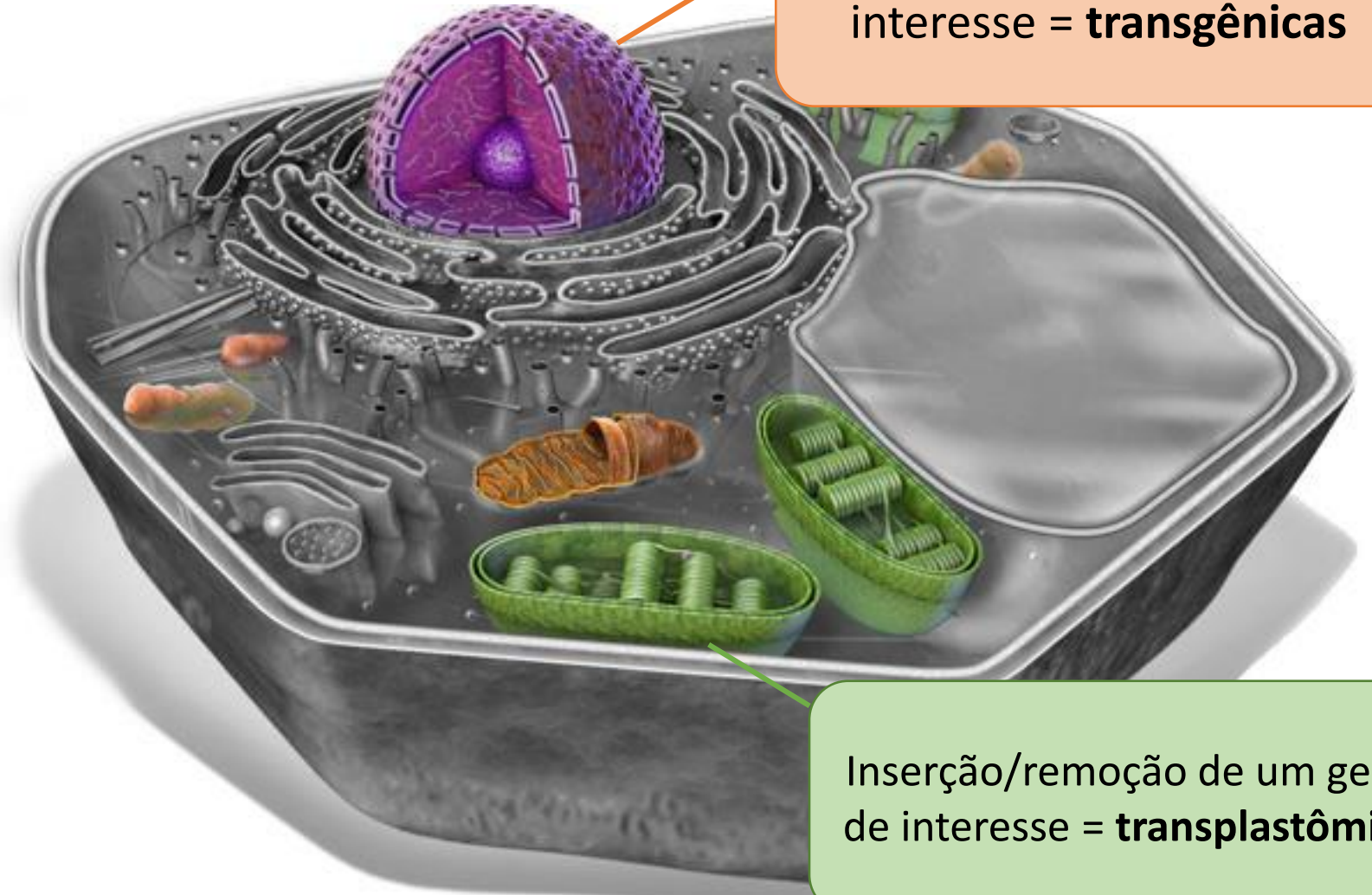
Transformação Genética Nuclear de Plantas

BIB452 e BIB5741– Biologia Molecular de
Plantas

Abril, 2023

Transformação Genética de Plantas

Introdução de fragmentos de DNA exógeno dentro de células de um organismo receptor

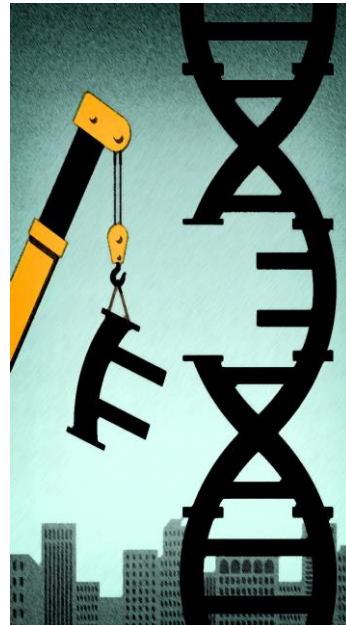


Inserção de um gene de interesse = **transgênicas**

Inserção/remoção de um gene de interesse = **transplastômica**

Passo a passo para obter uma transgênica

1. Clonagem gênica
2. Incorporação da sequência de interesse no genoma da planta
3. Regeneração *in vitro*
4. Triagem de indivíduos homozigotos



Identificação do gene alvo



indeterminado

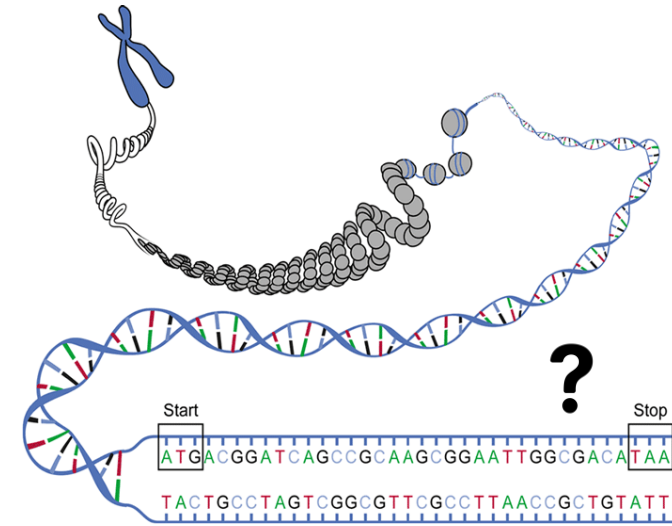


determinado

Qual é o gene responsável pelo fenótipo?



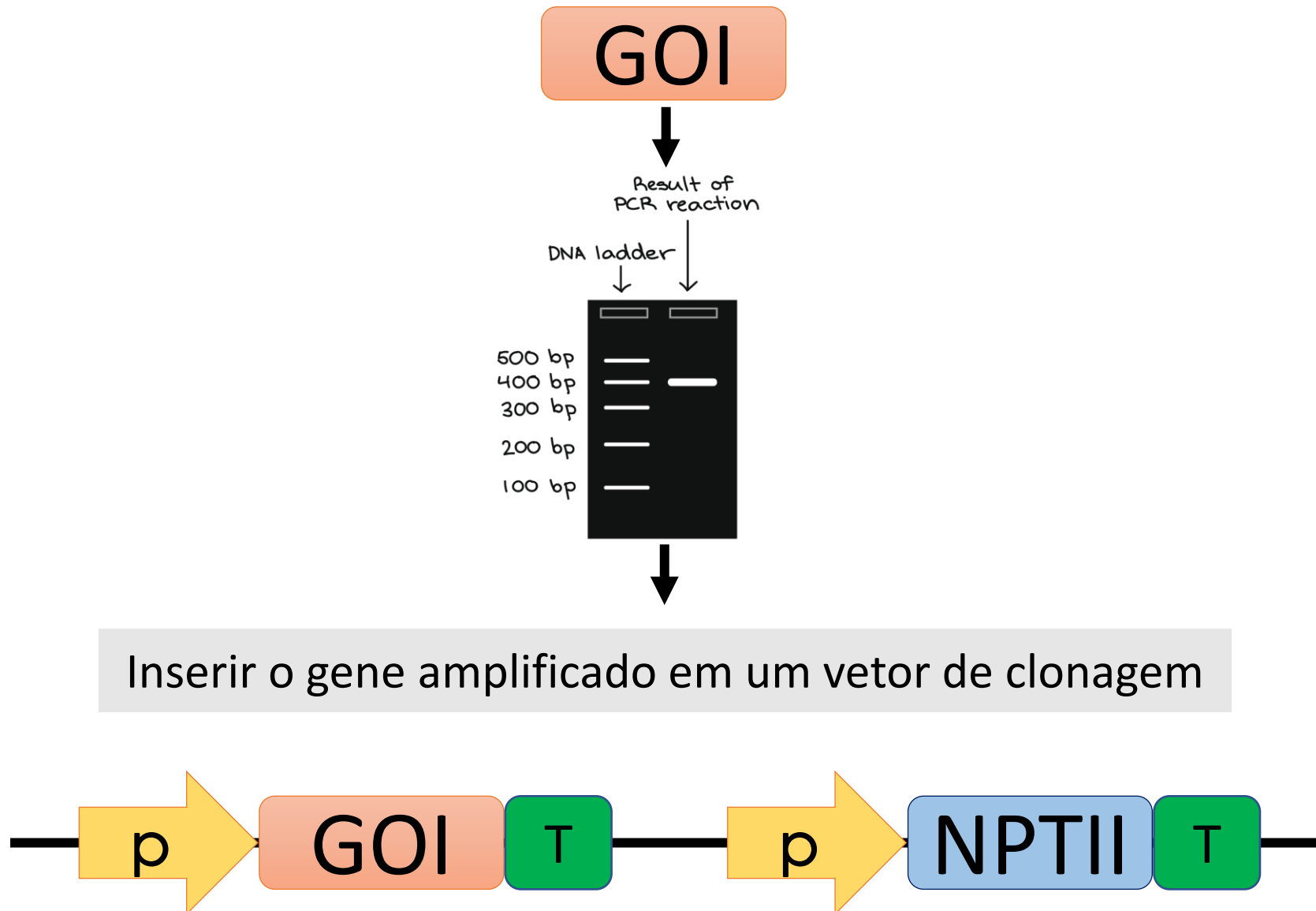
Mapeamento gênico, NGS, GWAS



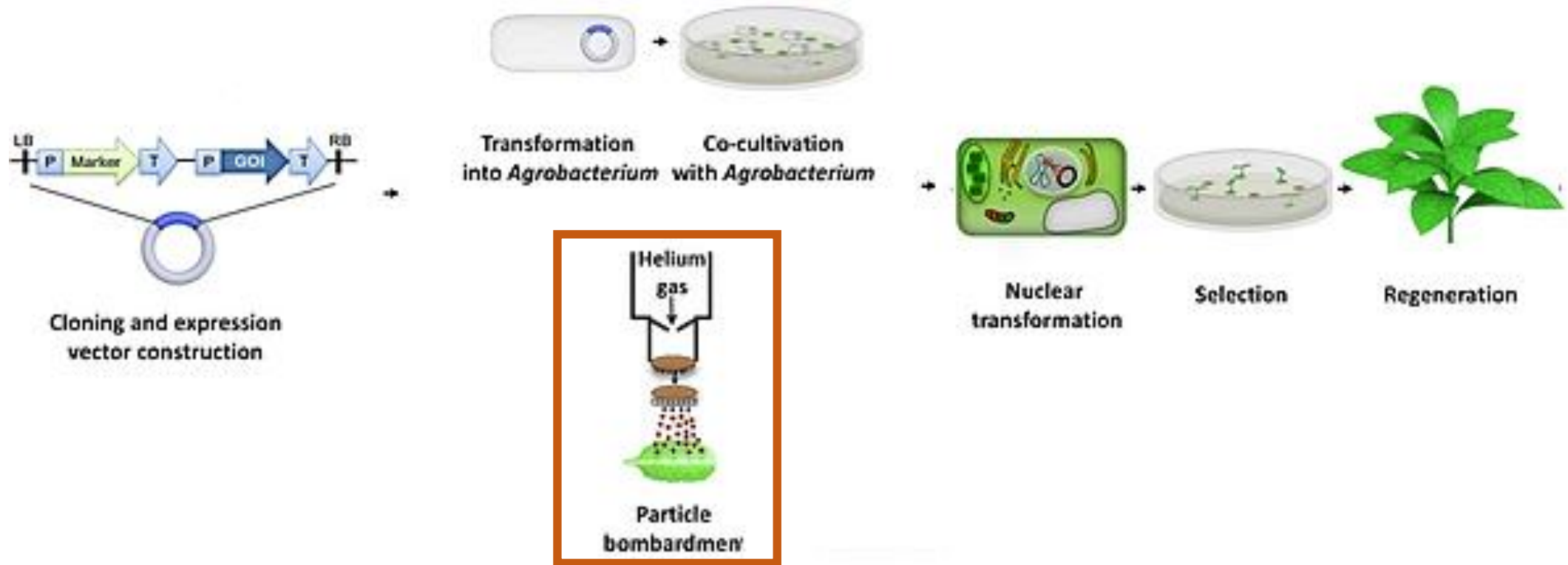
Qual é a função do gene?

GOI

Clonagem gênica

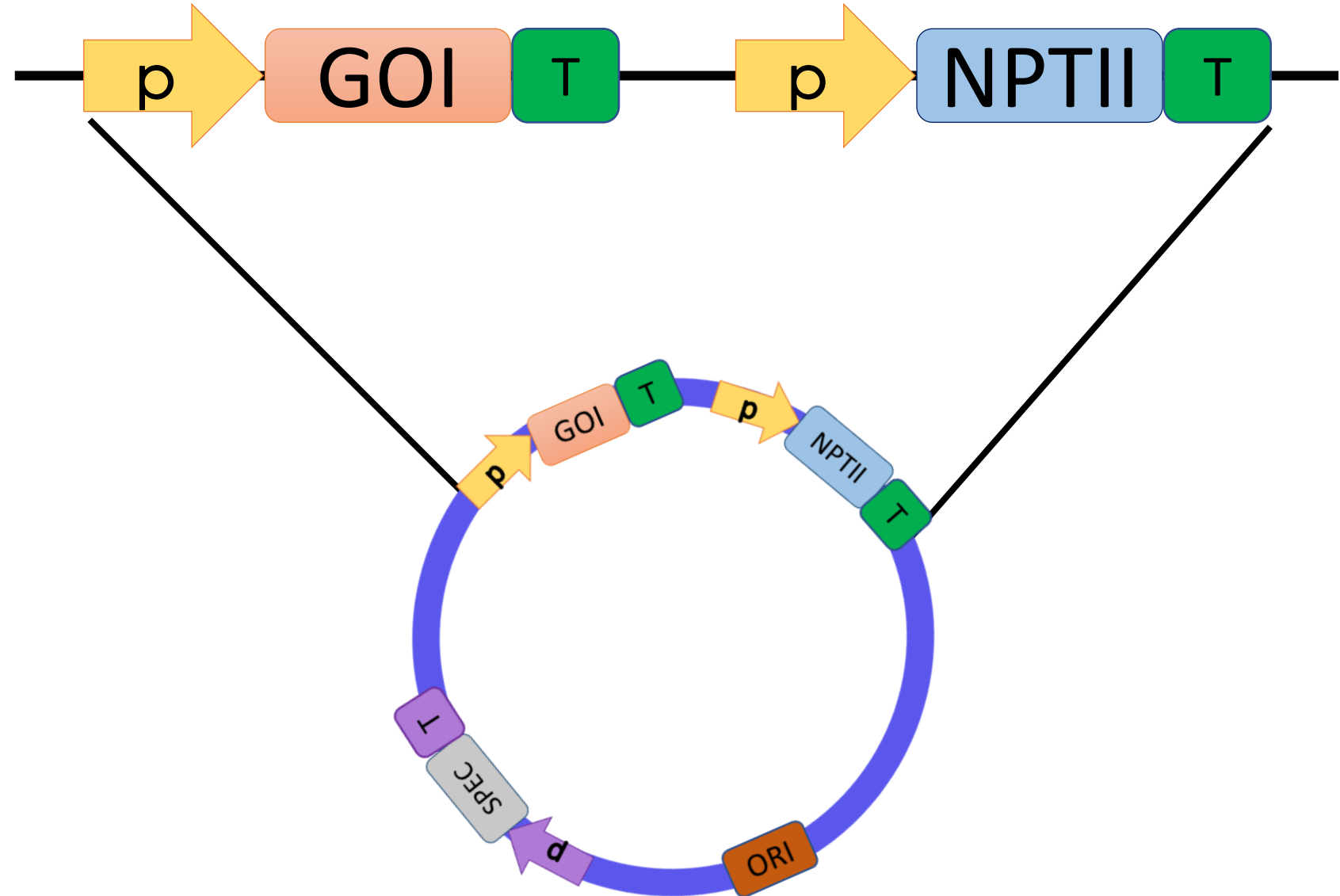


Incorporação da sequência de interesse no genoma da planta



Transformação via Biobalística “gene gun”

Bombardeamento de partículas de ouro ou tungstênio, revestidas com DNA

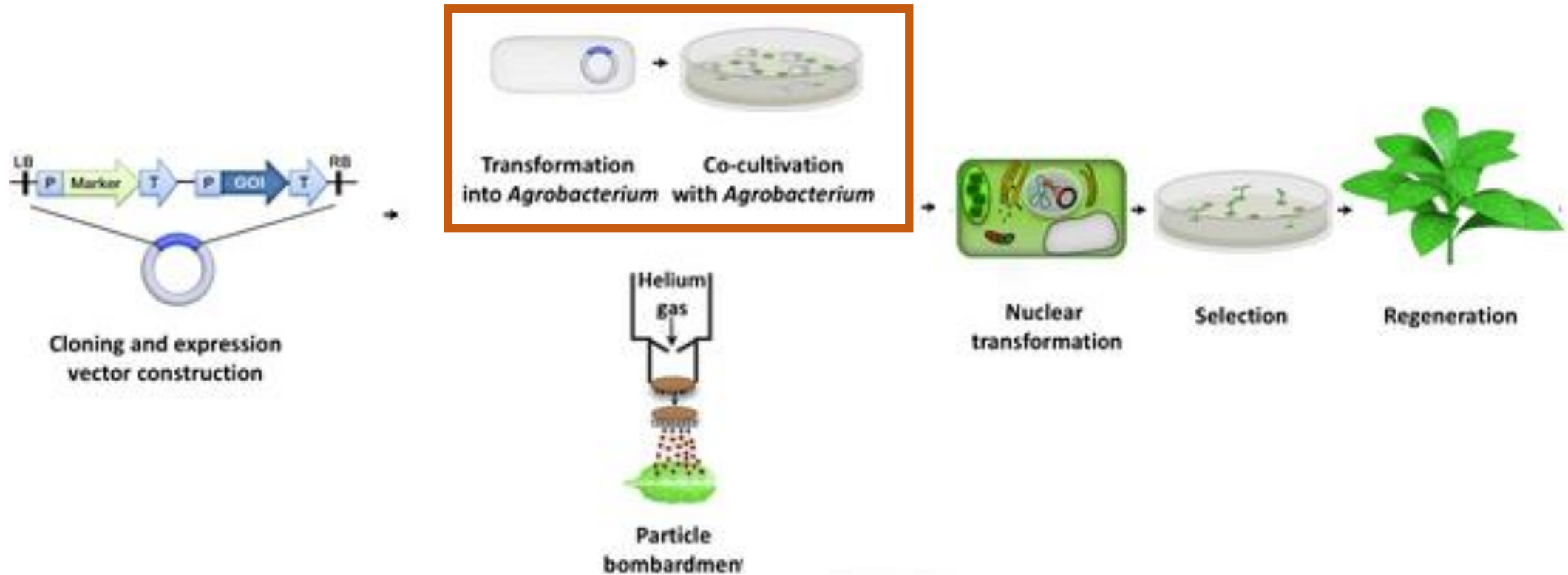


Transformação via Biobalística “gene gun”



- rupture disk retaining cup
- macrocarrier launch assembly
- sample chamber
- plant sample
- target shelf

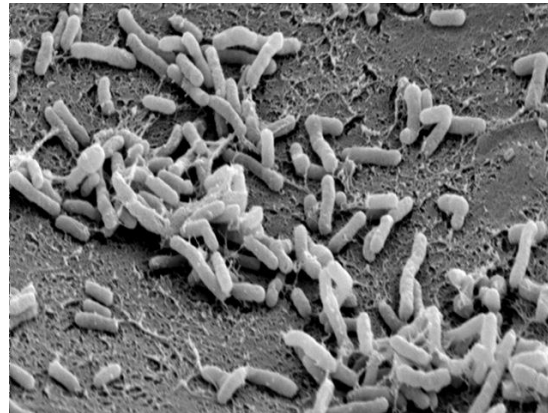
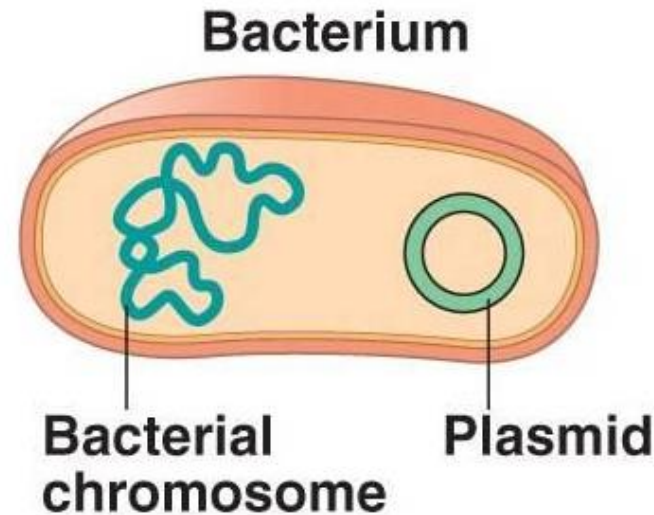
Incorporação da sequência de interesse no genoma da planta



Transformação via *Agrobacterium sp.*

Agrobacterium é um patógeno de plantas

Agrobacterium são bactérias Gram-negativas do solo que induzem crescimento tumoral



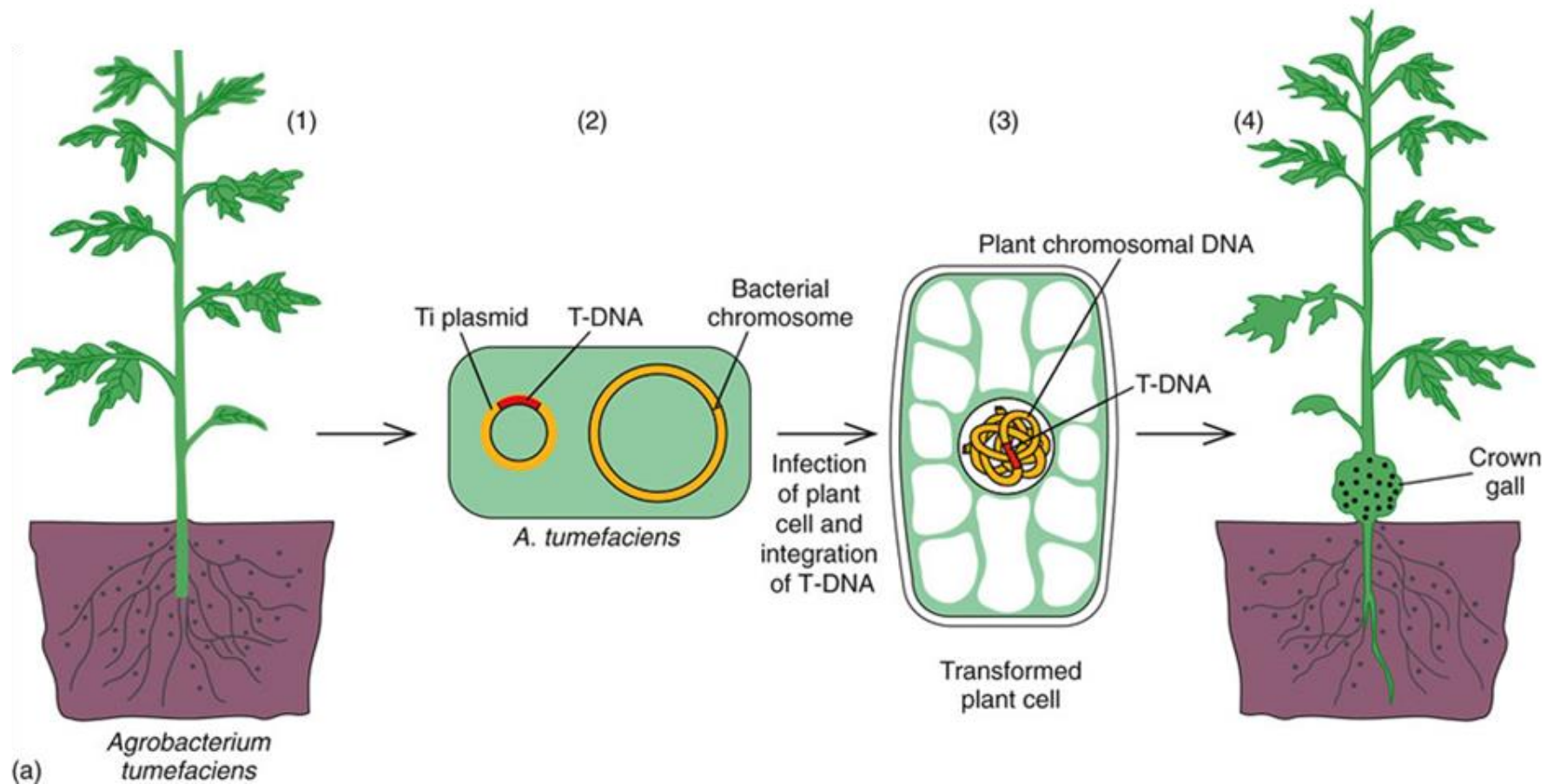
tumefaciens

rhizogenes



Transformação via *Agrobacterium sp.*

Uma região do plasmídeo Ti é transferido para as células vegetais (1977)

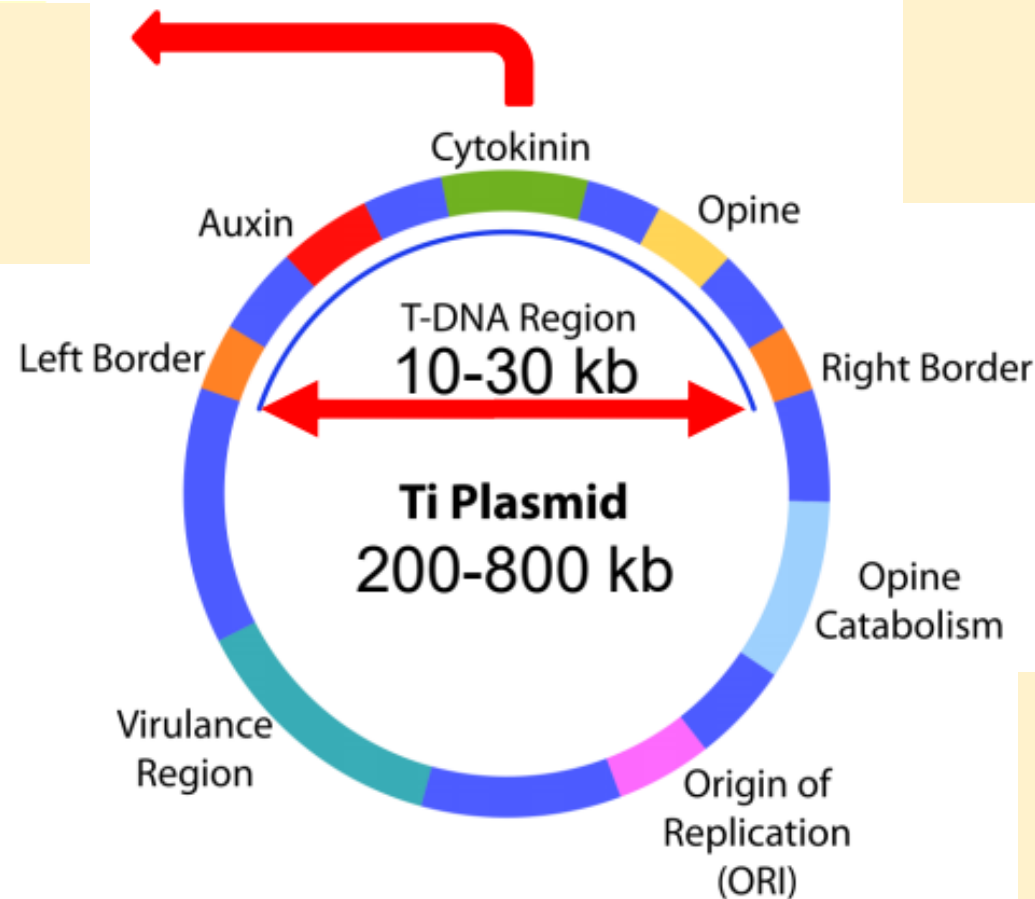


Transformação via *Agrobacterium sp.*

Estrutura do plasmídeo Ti

Transferência e
integração para o
genoma da planta

Genes T-DNA:
- Tumorigênese
- Nutrição



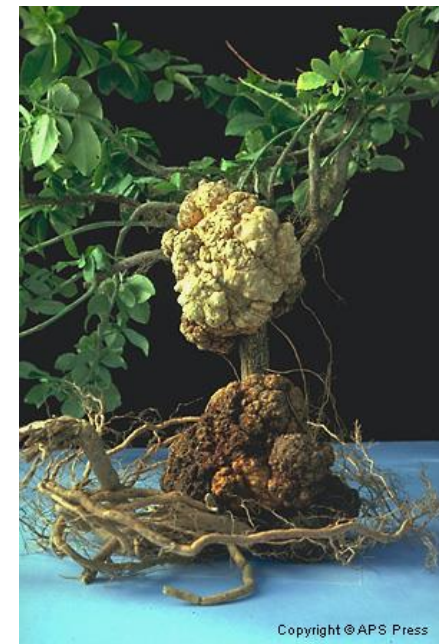
Genes vir:
- Colonização
- Integração do T-DNA

Bordas (25 bp):
- Altamente homólogas,
repetições diretas

Transformação via *Agrobacterium sp.*

O processo de transferência génica de *Agrobacterium* para a planta hospedeira:

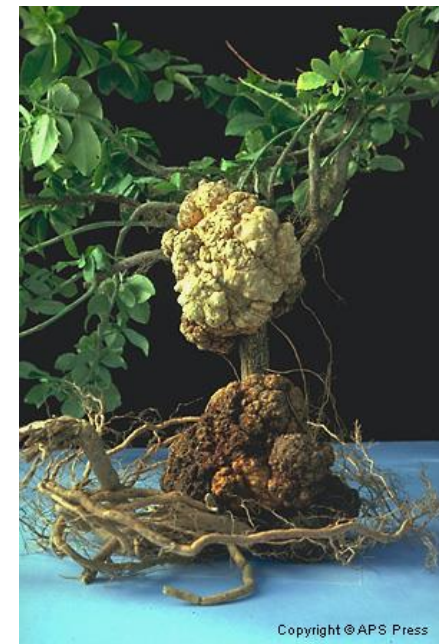
1. Sinalização na rizosfera
2. Indução do sistema de virulência
3. Geração do complexo de transferência do T-DNA
4. Transporte do T-DNA
5. Integração do T-DNA no genoma da planta
6. Seleção de plantas transgênicas e homozigotas



Transformação via *Agrobacterium sp.*

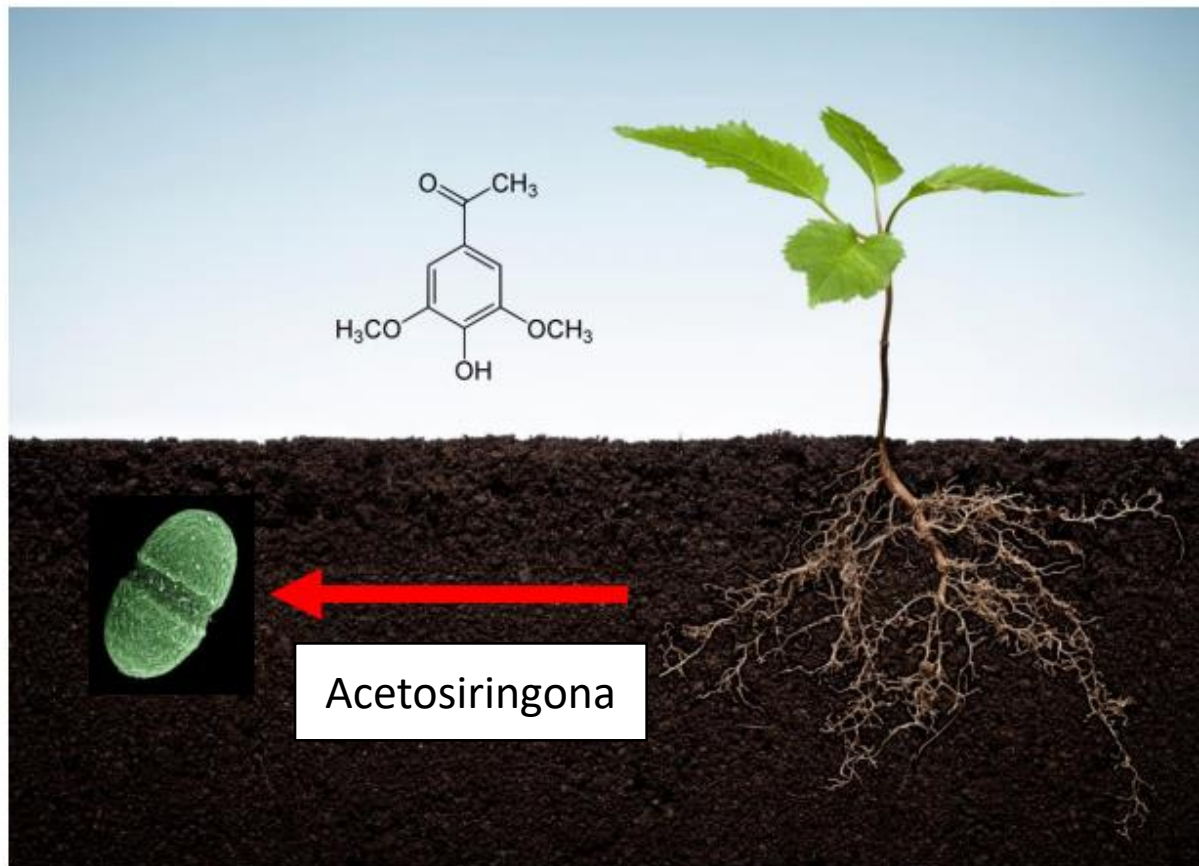
O processo de transferência génica de *Agrobacterium* para a planta hospedeira:

1. Sinalização na rizosfera
2. Indução do sistema de virulência
3. Geração do complexo de transferência do T-DNA
4. Transporte do T-DNA
5. Integração do T-DNA no genoma da planta
6. Seleção de plantas transgênicas e homozigotas



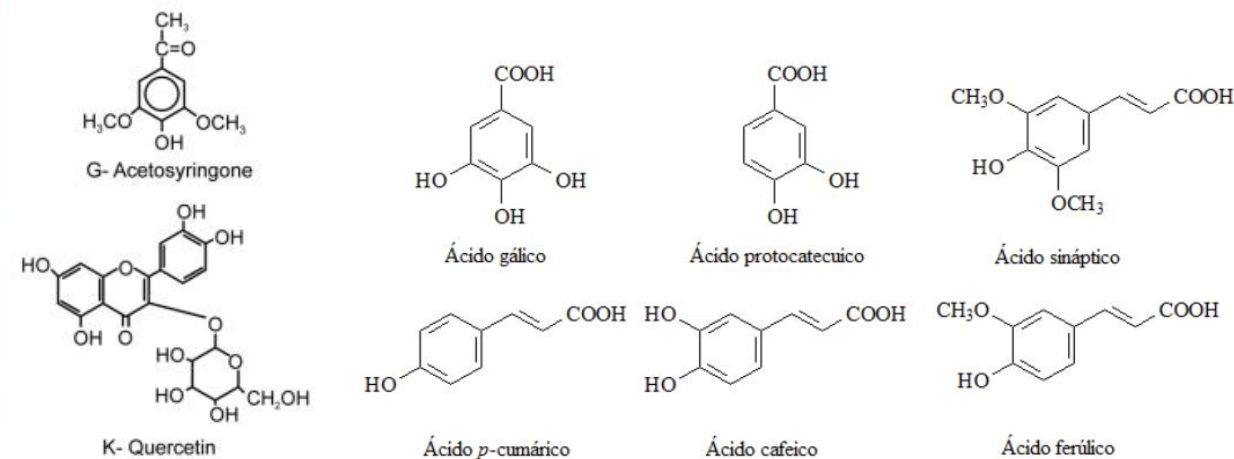
Transformação via *Agrobacterium sp.*

Colonização bacteriana:



A bactéria responde a sinais externos para ativar a maquinaria de virulência

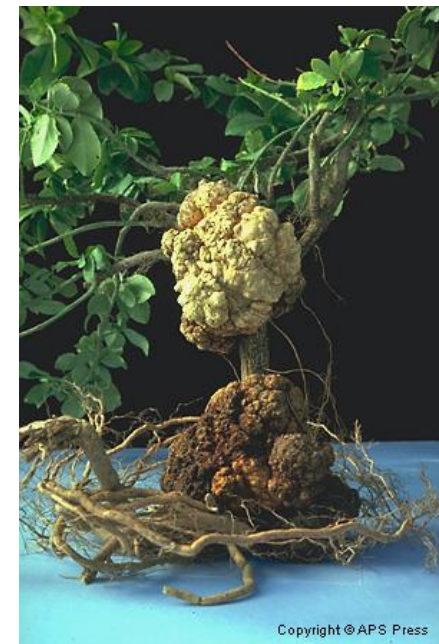
Compostos fenólicos são normalmente de **defesa**. Porém, a Agro. desenvolveu resistência e utiliza eles como **indutores**.



Transformação via *Agrobacterium sp.*

O processo de transferência génica de *Agrobacterium* para a planta hospedeira:

1. Sinalização na rizosfera
2. Indução do sistema de virulência
3. Geração do complexo de transferência do T-DNA
4. Transporte do T-DNA
5. Integração do T-DNA no genoma da planta
6. Seleção de plantas transgênicas e homozigotas

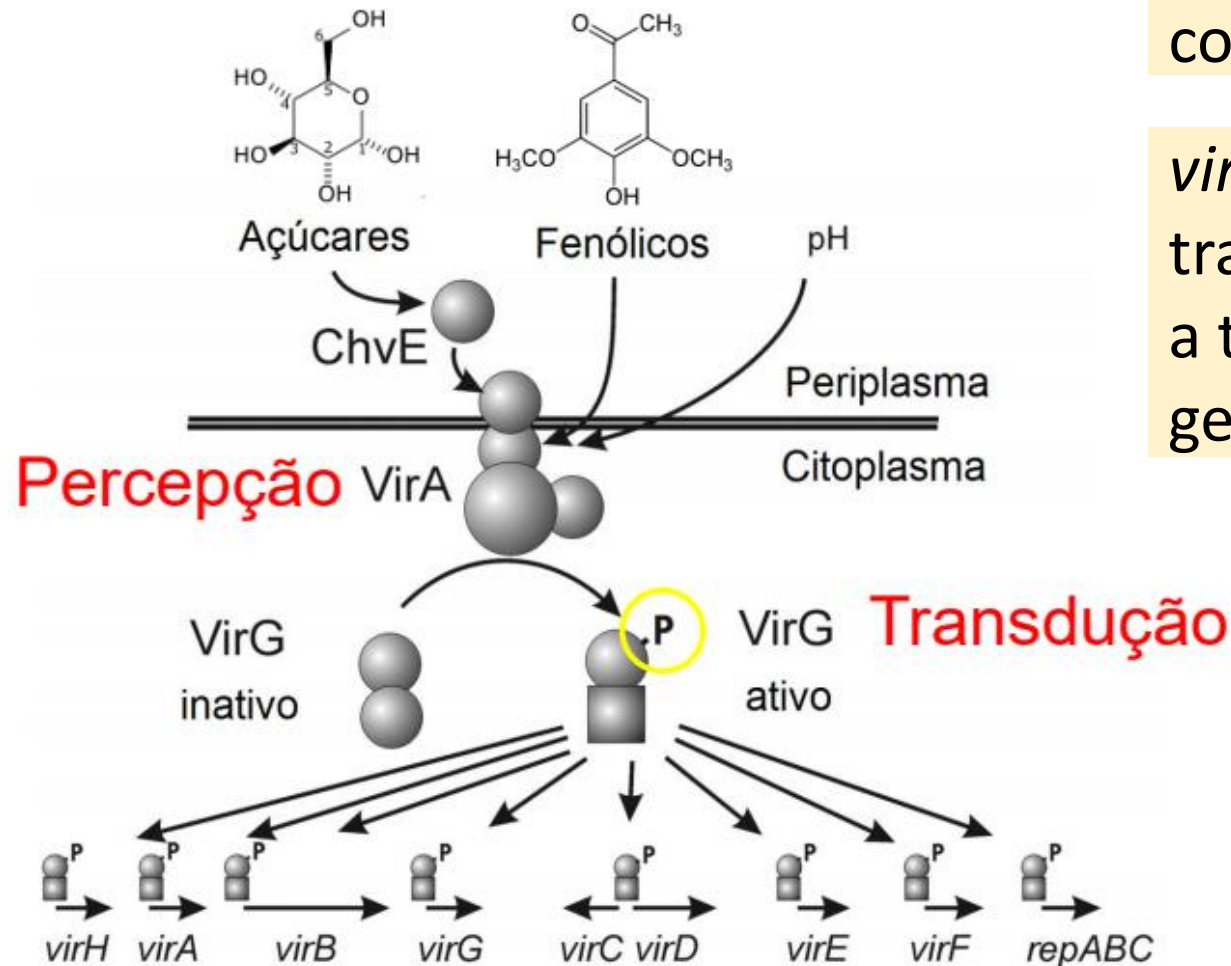


Transformação via *Agrobacterium sp.*

Indução do sistema de virulência:

virA e *virG* formam um sistema de dois componentes

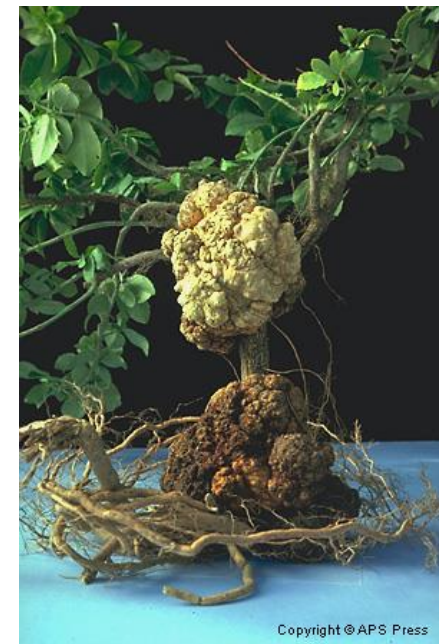
virG é um fator de transcrição que induz a transcrição dos genes *vir*



Transformação via *Agrobacterium sp.*

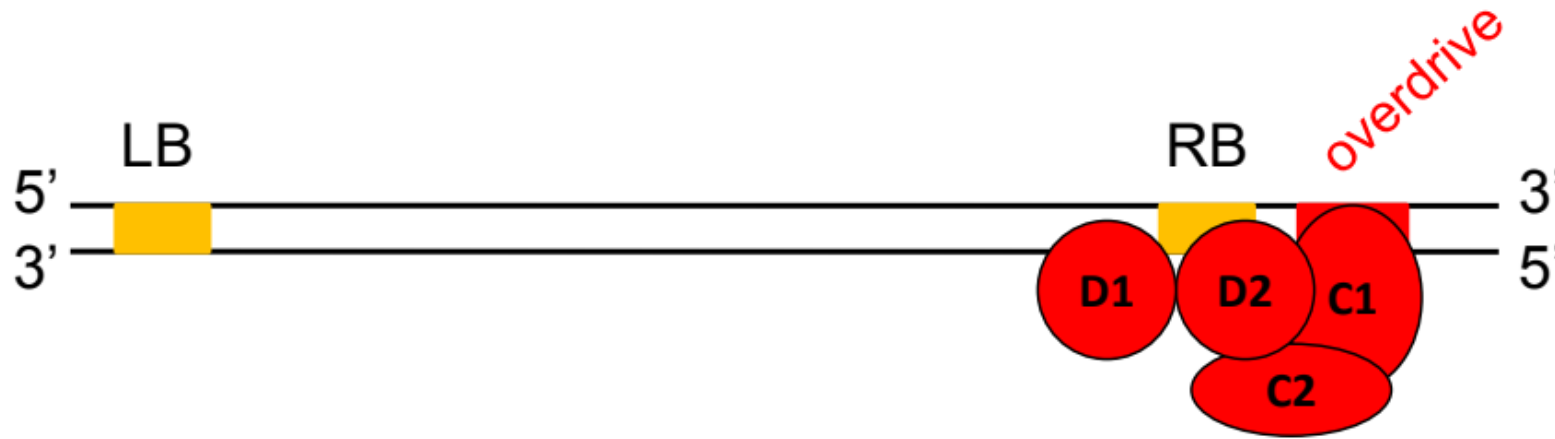
O processo de transferência génica de *Agrobacterium* para a planta hospedeira:

1. Sinalização na rizosfera
2. Indução do sistema de virulência
3. Geração do complexo de transferência do T-DNA
4. Transporte do T-DNA
5. Integração do T-DNA no genoma da planta
6. Seleção de plantas transgênicas e homozigotas



Transformação via *Agrobacterium sp.*

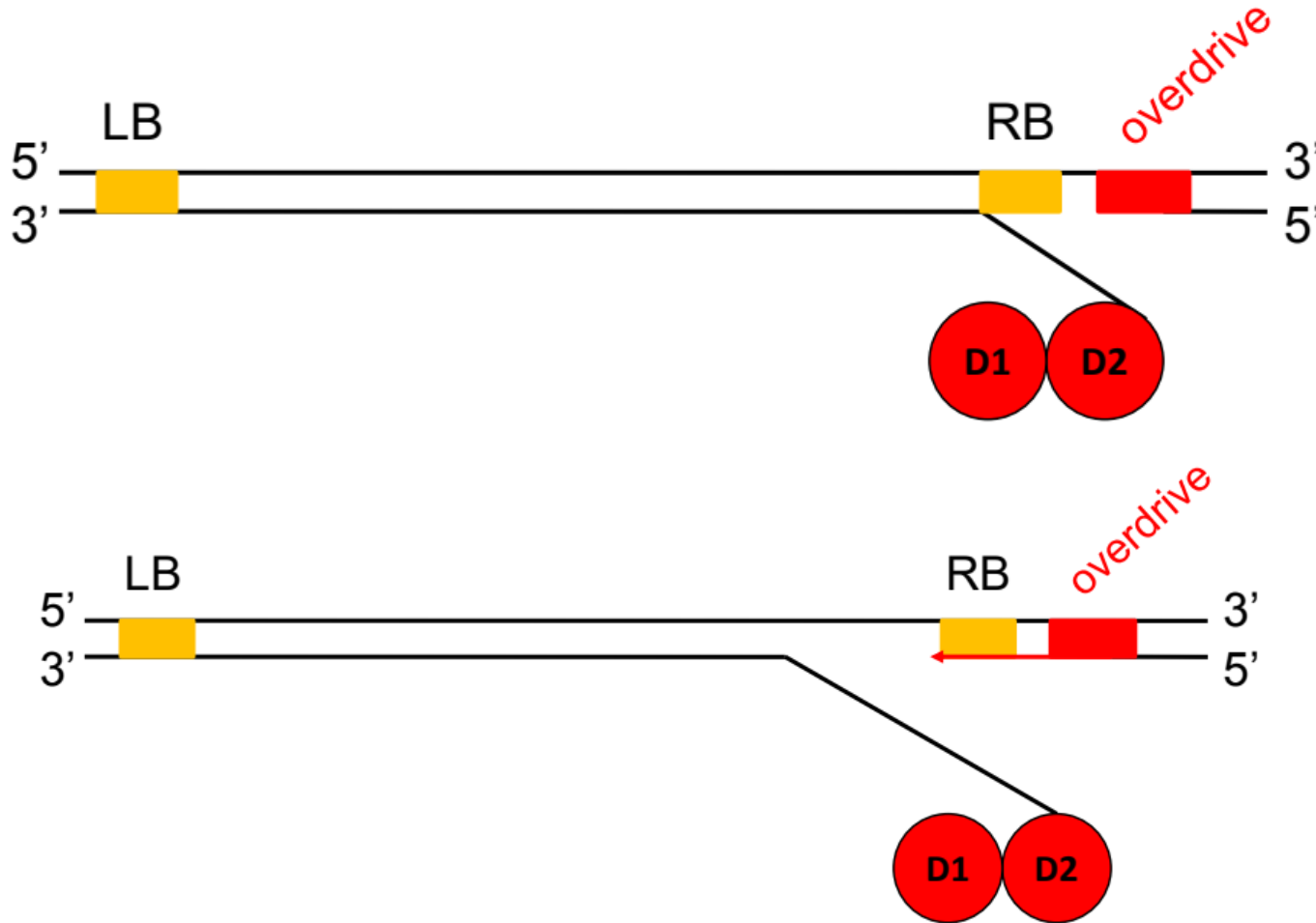
Geração do complexo de transferência:



virC1 e C2 = proteínas adaptadoras
virD1 = topoisomerase
virD2 = endonuclease

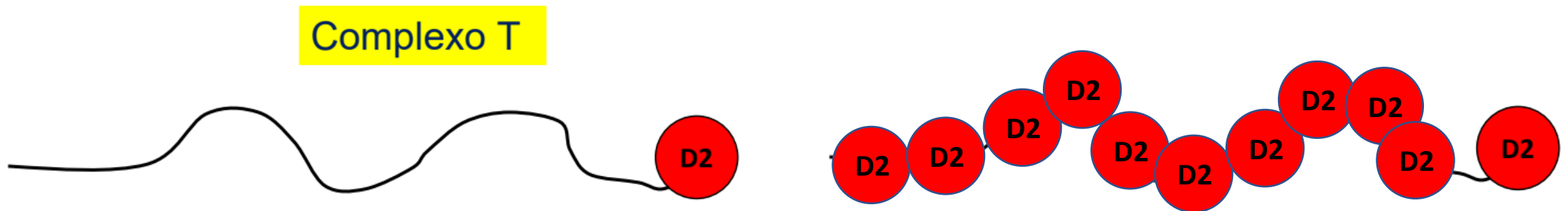
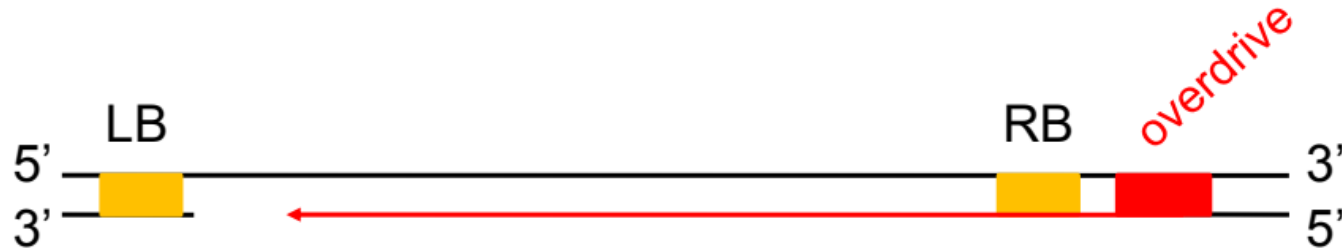
Transformação via *Agrobacterium sp.*

Geração do complexo de transferência:



Transformação via *Agrobacterium sp.*

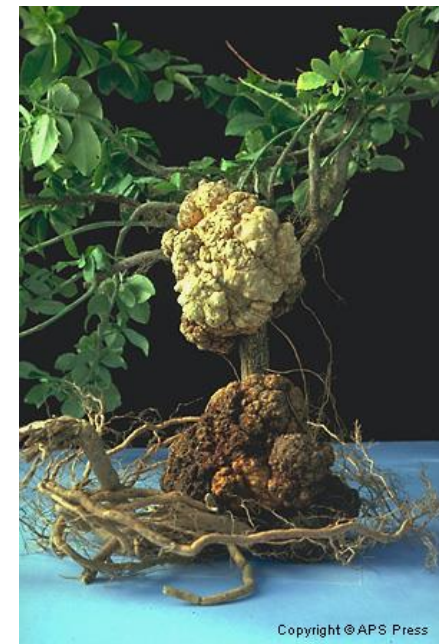
Geração do complexo de transferência:



Transformação via *Agrobacterium sp.*

O processo de transferência génica de *Agrobacterium* para a planta hospedeira:

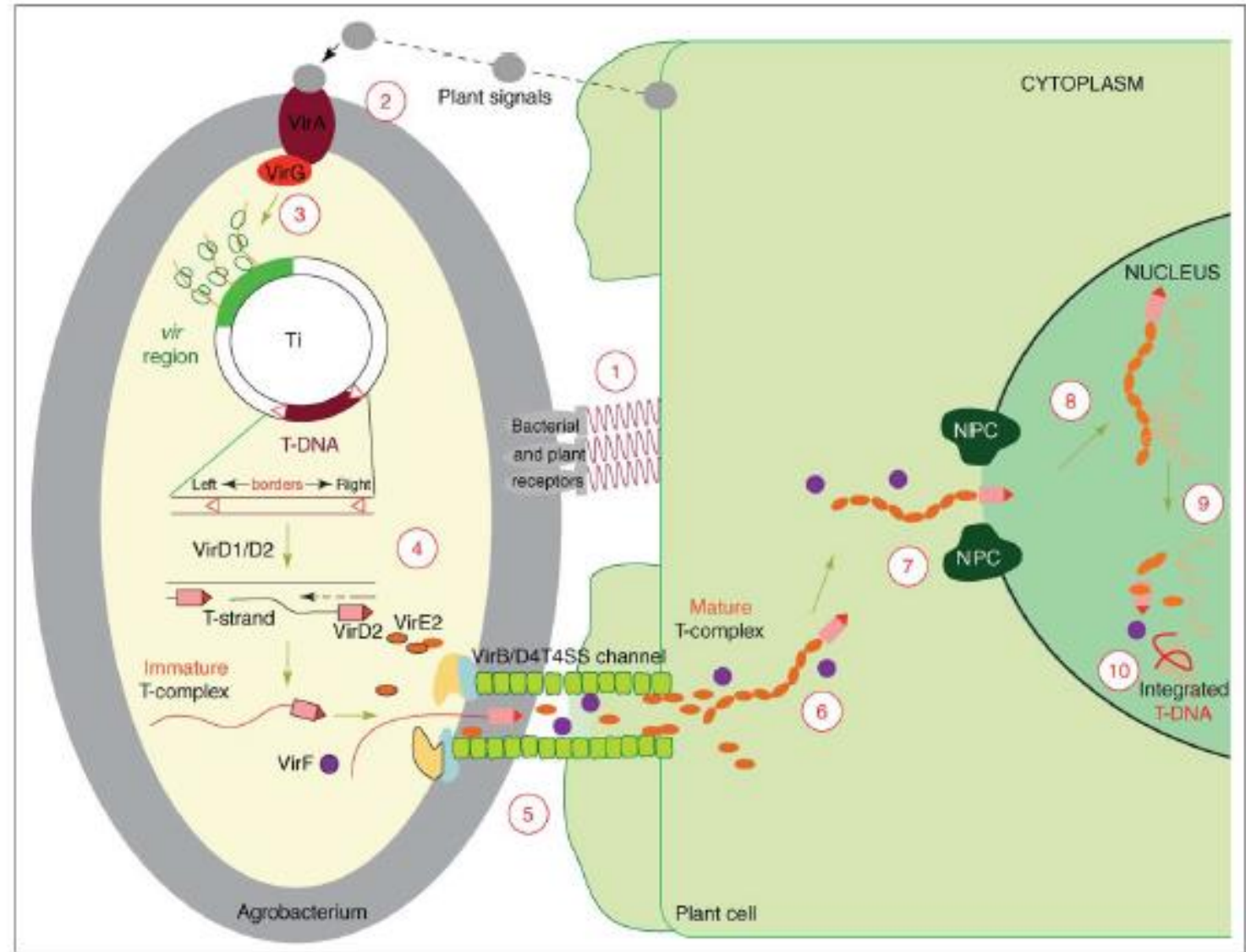
1. Sinalização na rizosfera
2. Indução do sistema de virulência
3. Geração do complexo de transferência do T-DNA
4. Transporte do T-DNA
5. Integração do T-DNA no genoma da planta
6. Seleção de plantas transgênicas e homozigotas



Transformação via *Agrobacterium sp.*

Transporte do T-DNA para a célula da planta:

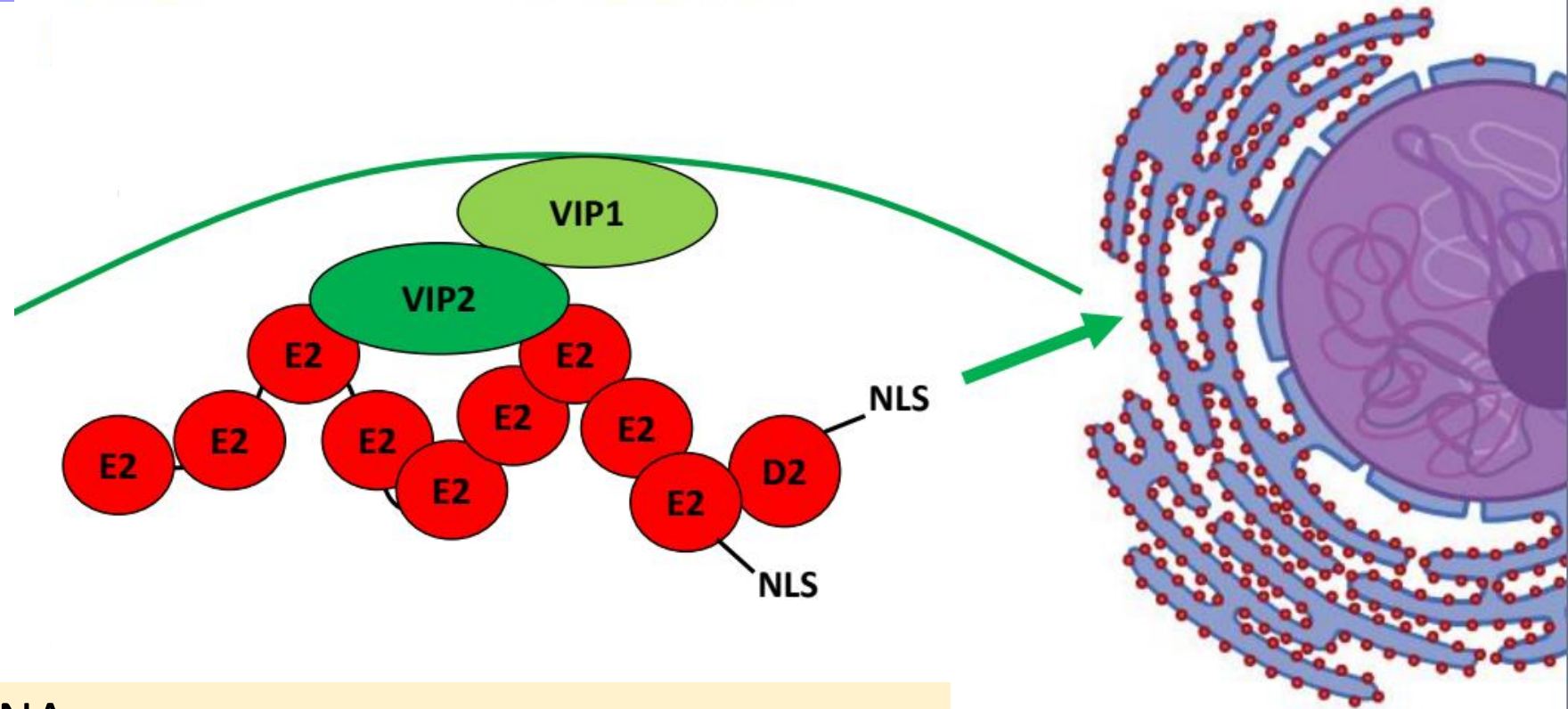
O complexo virB/D4 forma um canal entre as duas células transporta vários componentes para a célula Hospedeira.



Transformação via *Agrobacterium sp.*

Transporte do T-DNA para a célula da planta:

O transporte para o núcleo é um processo ativo



virE2 = proteína de união a DNA

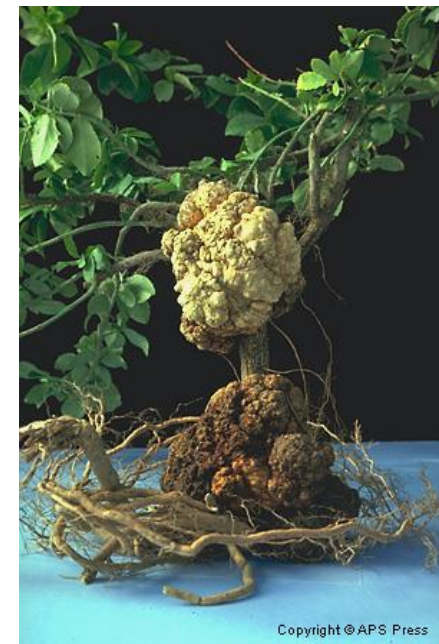
VIP = E2-interacting protein

Empacotamento do T-DNA, proteção contra a degradação, direcionamento para o núcleo (NLS)

Transformação via *Agrobacterium sp.*

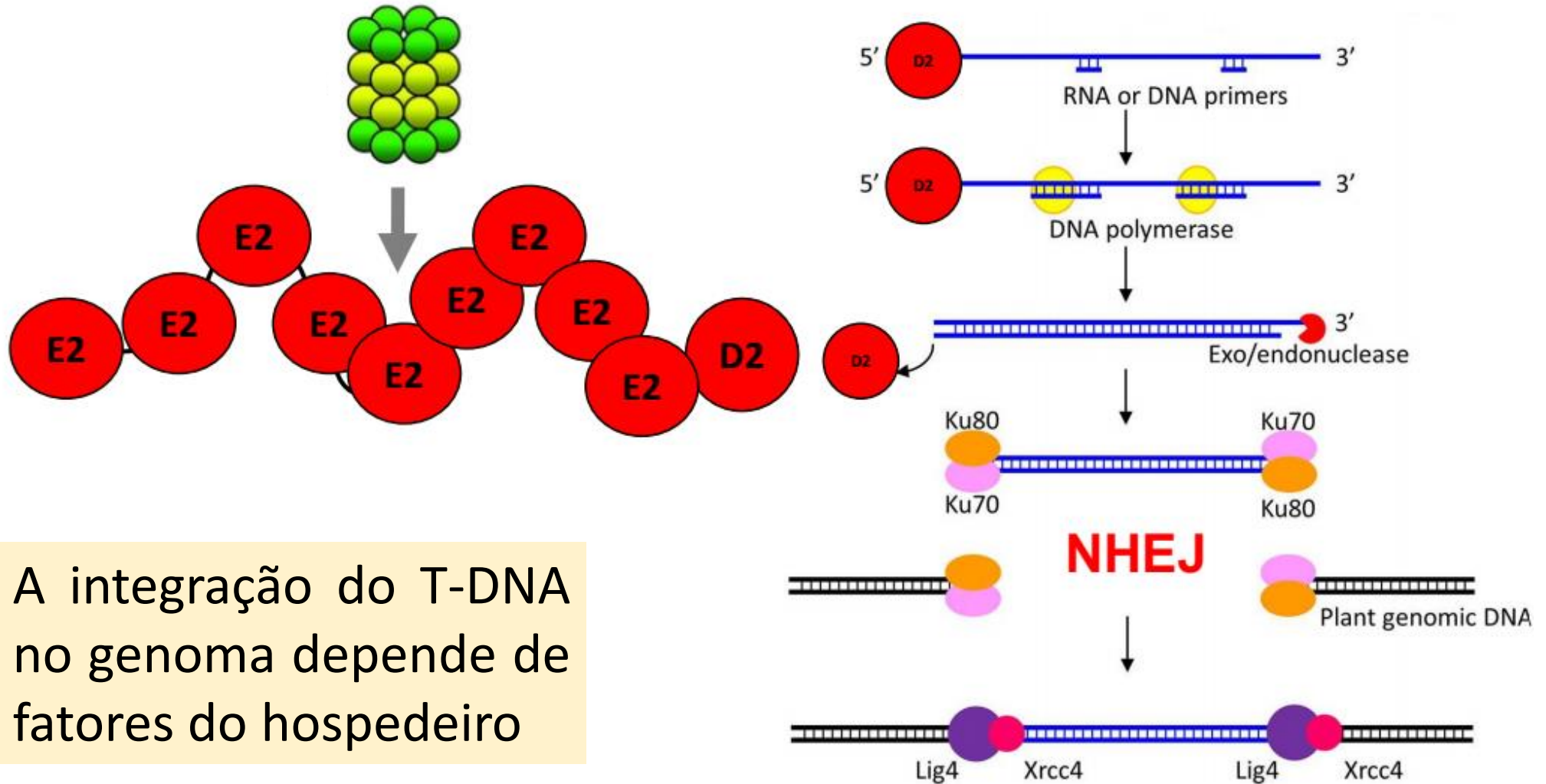
O processo de transferência génica de *Agrobacterium* para a planta hospedeira:

1. Sinalização na rizosfera
2. Indução do sistema de virulência
3. Geração do complexo de transferência do T-DNA
4. Transporte do T-DNA
5. Integração do T-DNA no genoma da planta
6. Seleção de plantas transgênicas e homozigotas



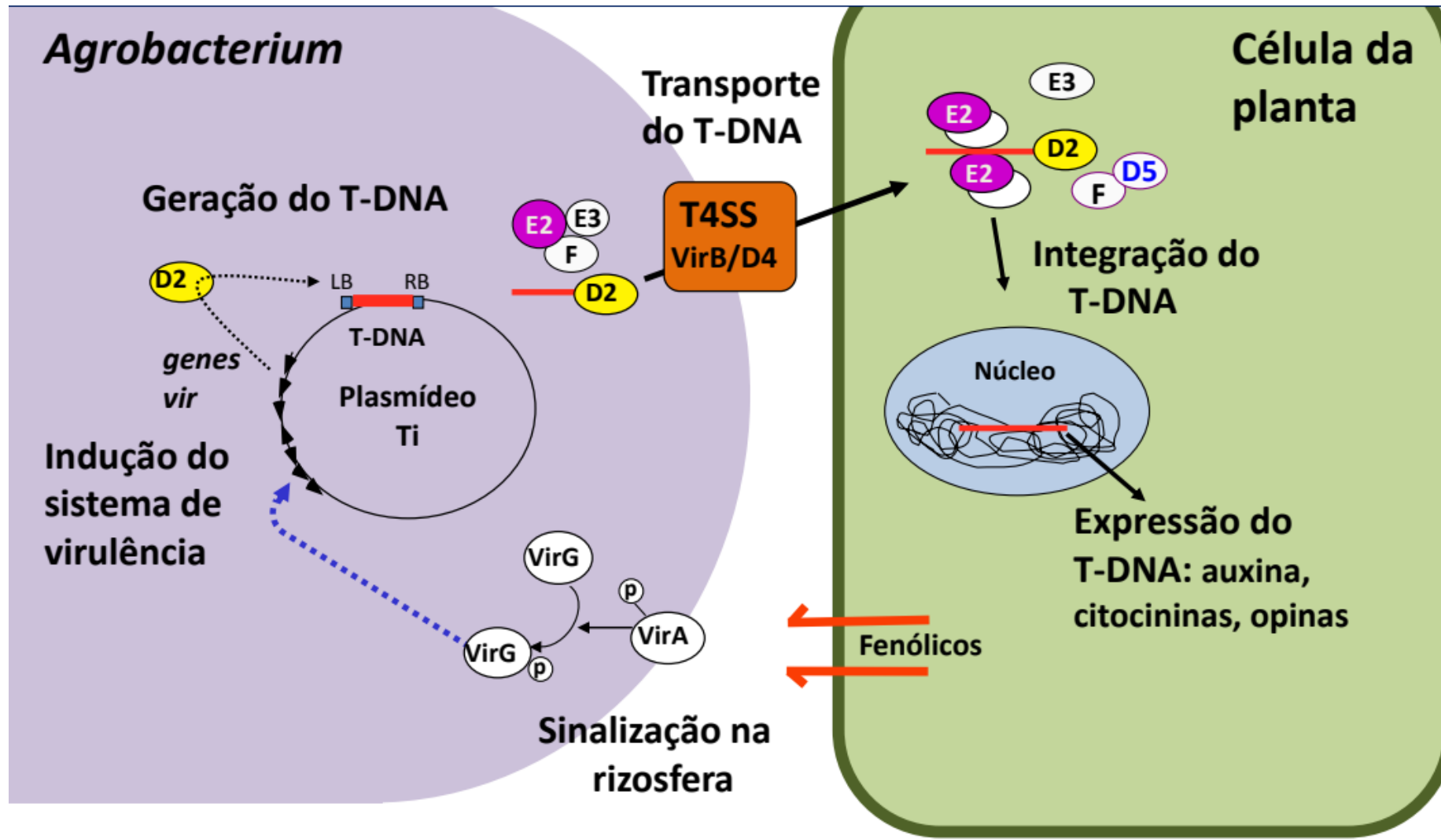
Transformação via *Agrobacterium sp.*

Integração do T-DNA no genoma da planta:



Transformação via *Agrobacterium sp.*

Integração do T-DNA no genoma da planta:

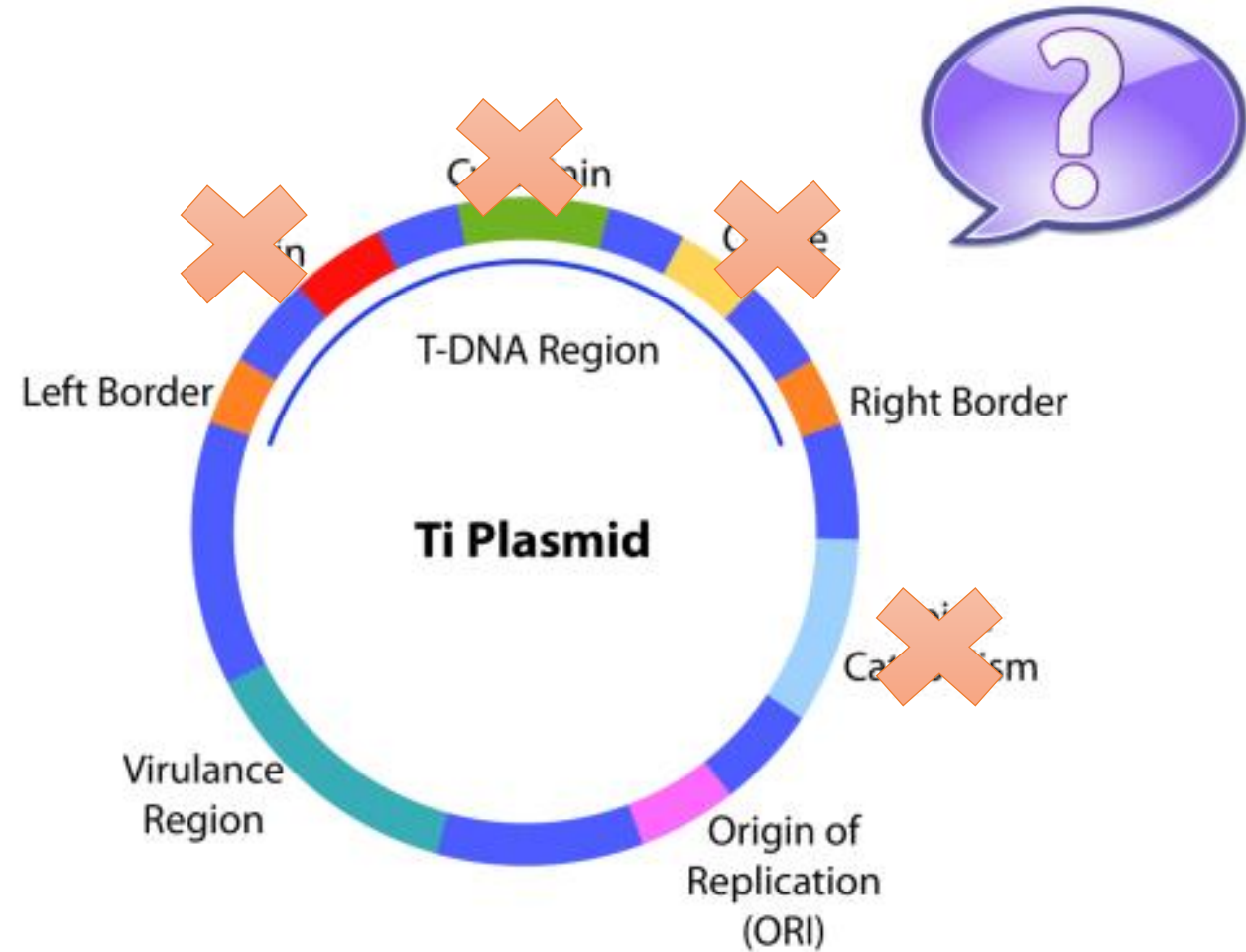


Transformação via *Agrobacterium sp.*

O plasmídeo Ti é muito Grande, difícil de manipular

Presença de oncogenes no T-DNA

Os genes dentro do T-DNA não são necessários para transferir o T-DNA para a planta

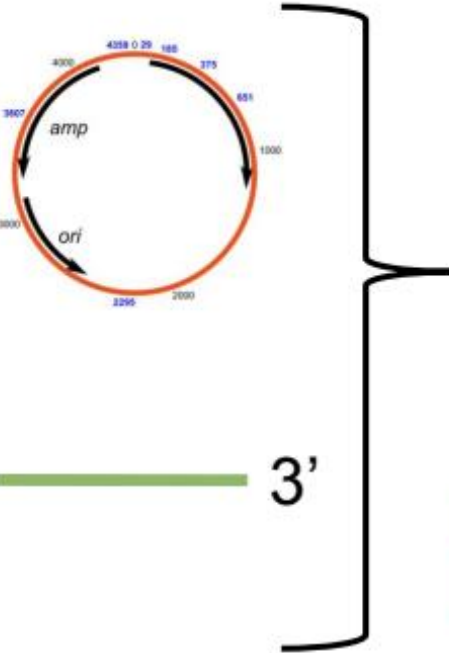


➡ **Ti desarmado**

Transformação via *Agrobacterium sp.*

Método do vetor intermediário:

Vetor intermediário

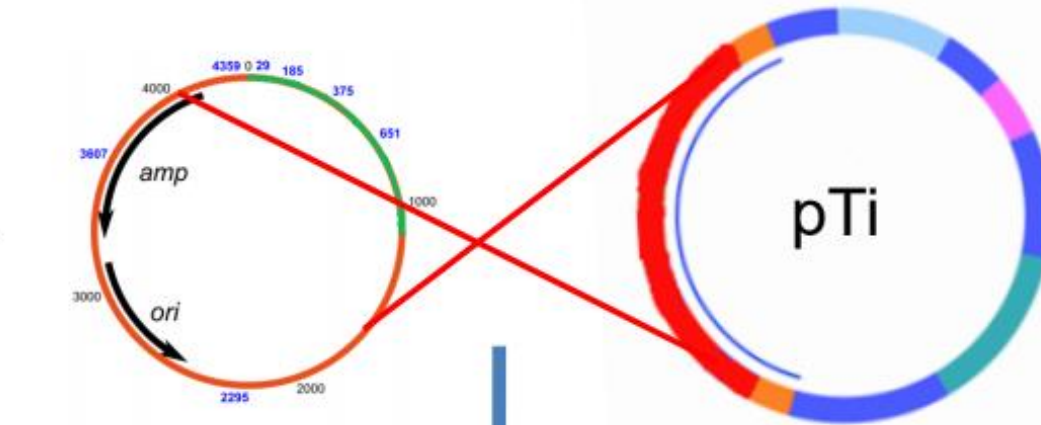


Gene de interesse

5' ————— 3'

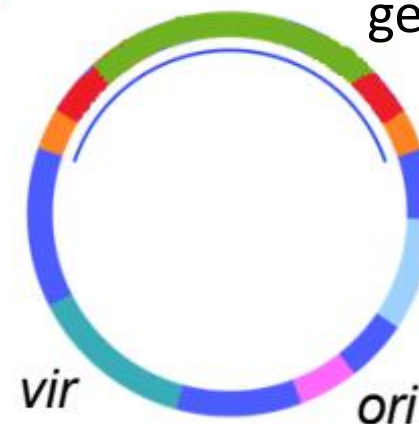
O gene de interesse e os genes *vir* estão no mesmo vetor usado para transformar

Plasmídeo desarmado



Recombinação homóloga

Gene de interesse + gene de seleção

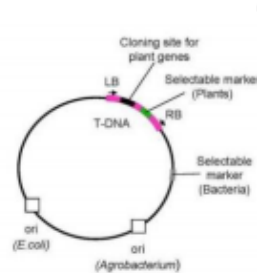


Vetor co-integrado

Transformação via *Agrobacterium sp.*

Método do vetor Binário:

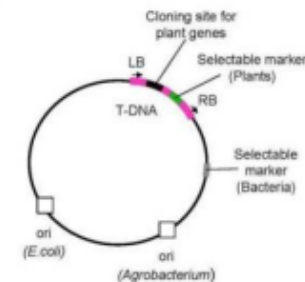
Vetor binário



Gene de interesse

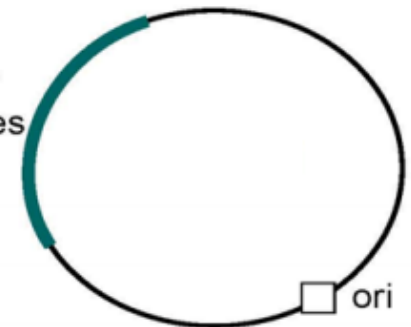
5' ————— 3'

Agrobacterium



binário

vir genes

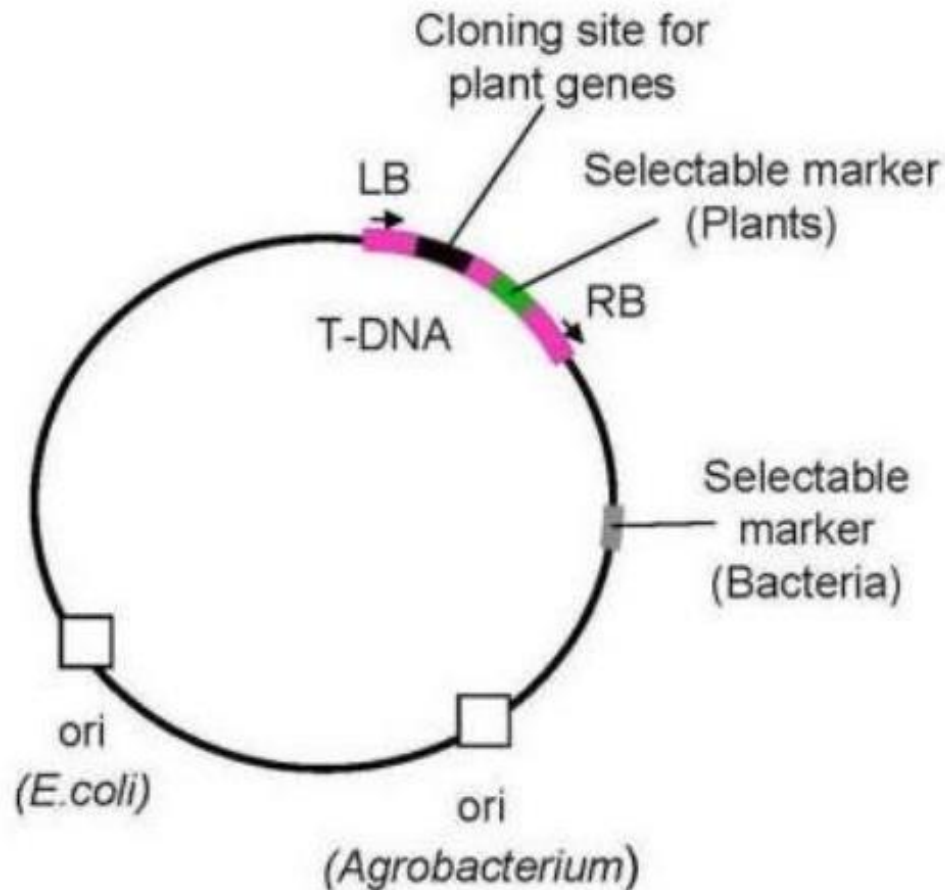


helper

No sistema binário, um plasmídeo carrega o gene de interesse e outro os genes *vir*

Transformação via *Agrobacterium sp.*

Método do vetor Binário:



Sítio de clonagem
(enzimas de restrição ou
Gateway™)

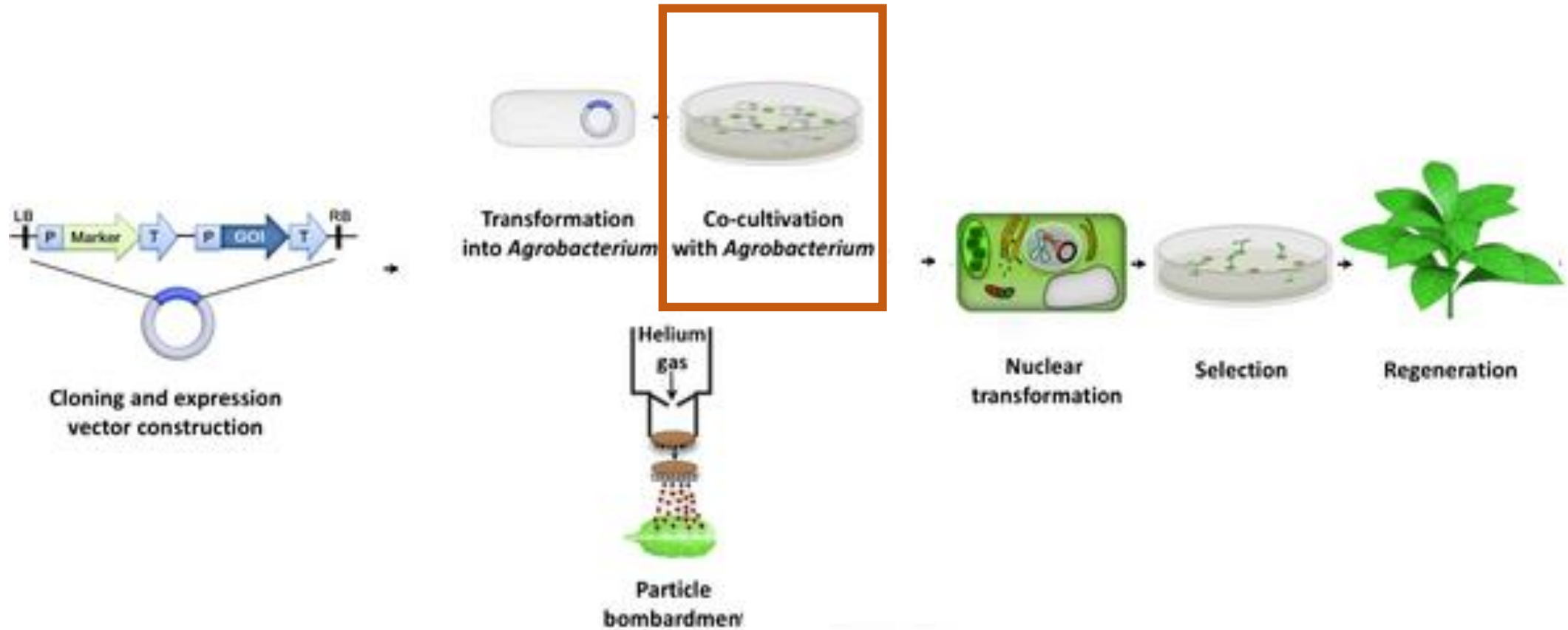
Marcador de seleção
para plantas

Marcador de seleção
para bactérias

Origem de replicação
para *E. coli* e para Agro.

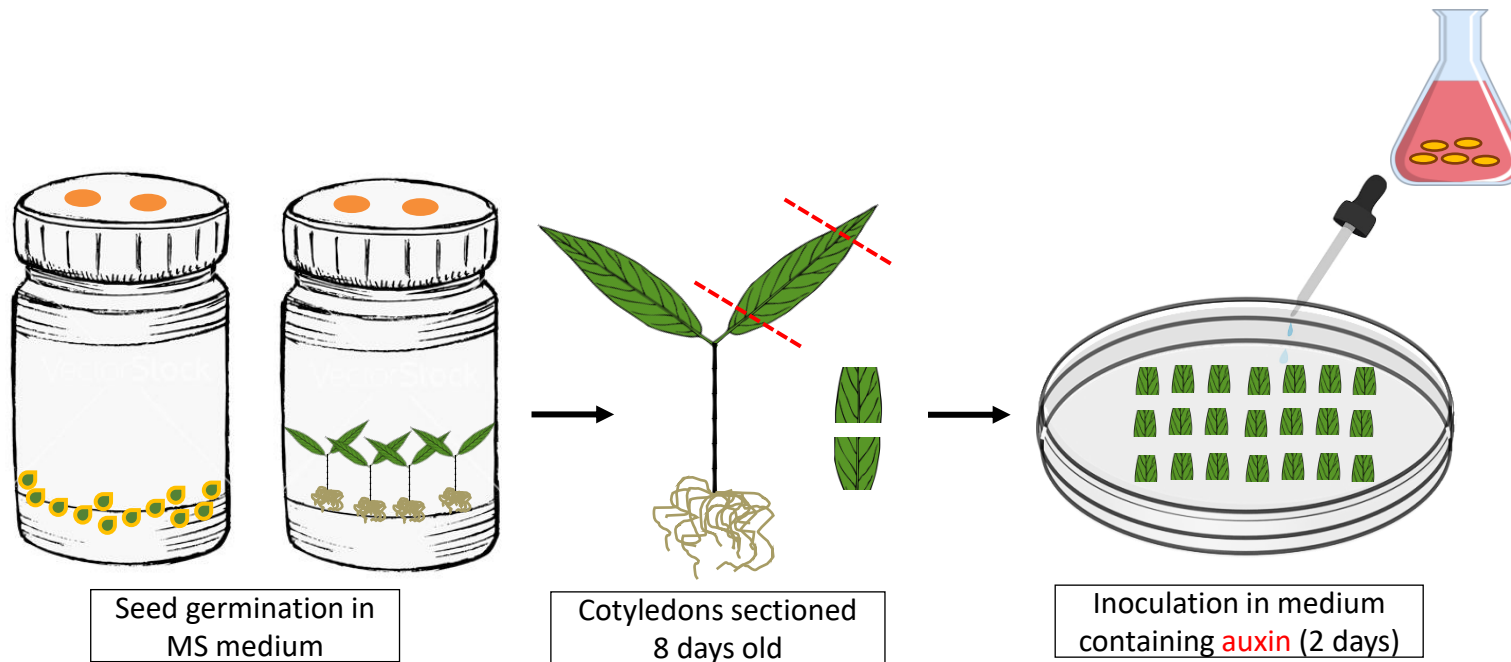
Bordas LB e LR

Transformação Genética de Plantas

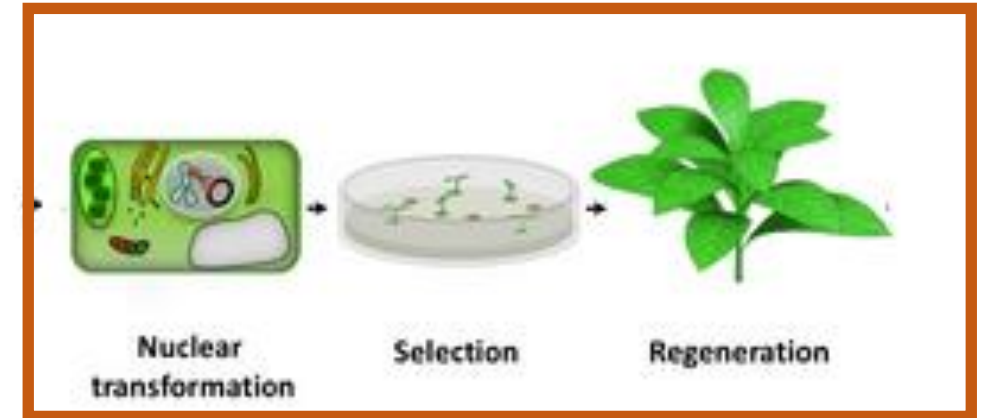
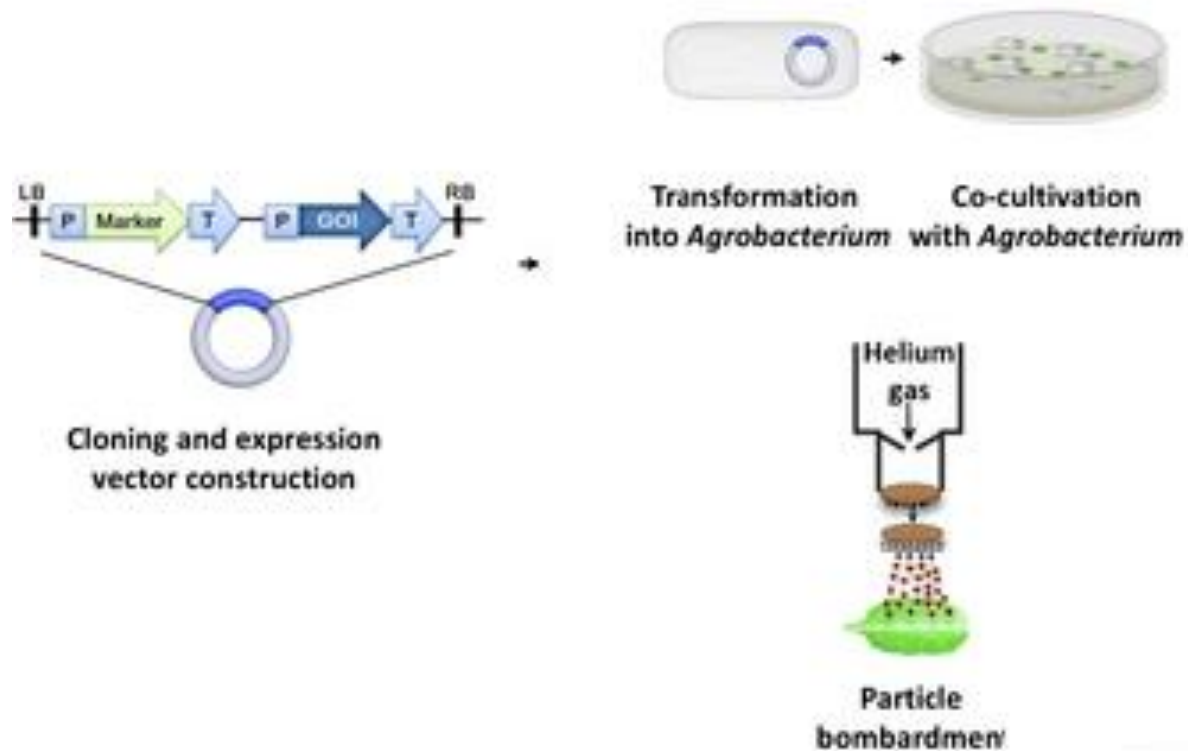


Transformação via *Agrobacterium sp.*

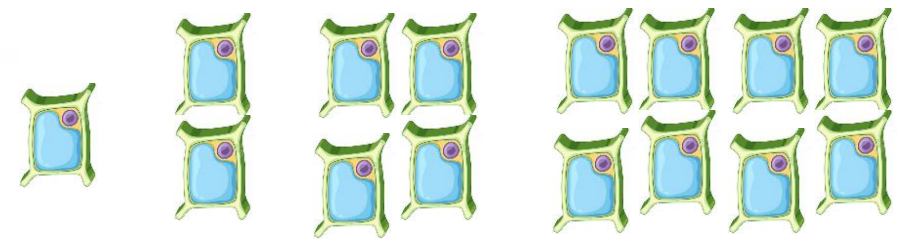
Co-cultivo (*Agrobacterium* + explante):



Transformação Genética de Plantas

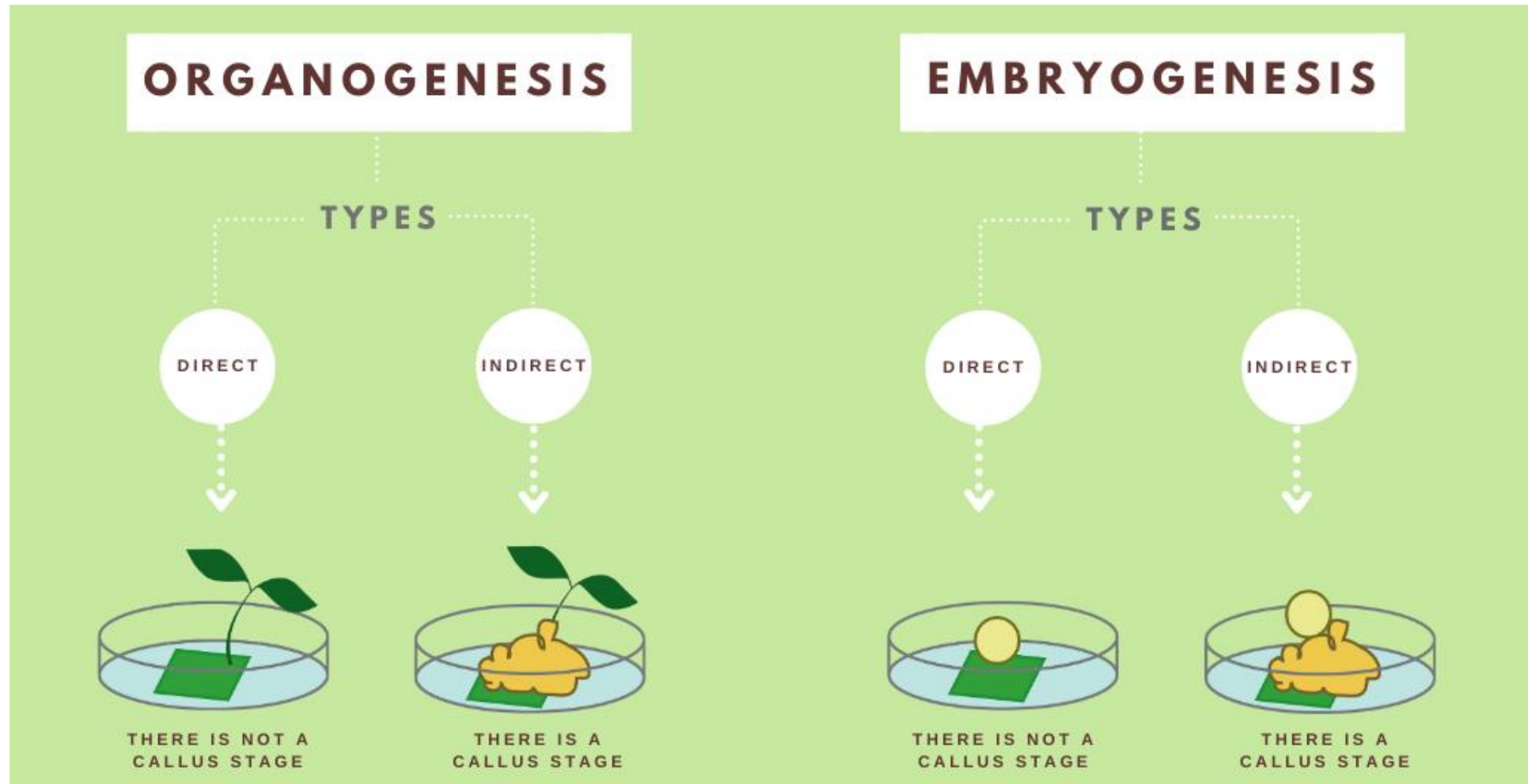


Uma célula é transformada!



Transformação via *Agrobacterium sp.*

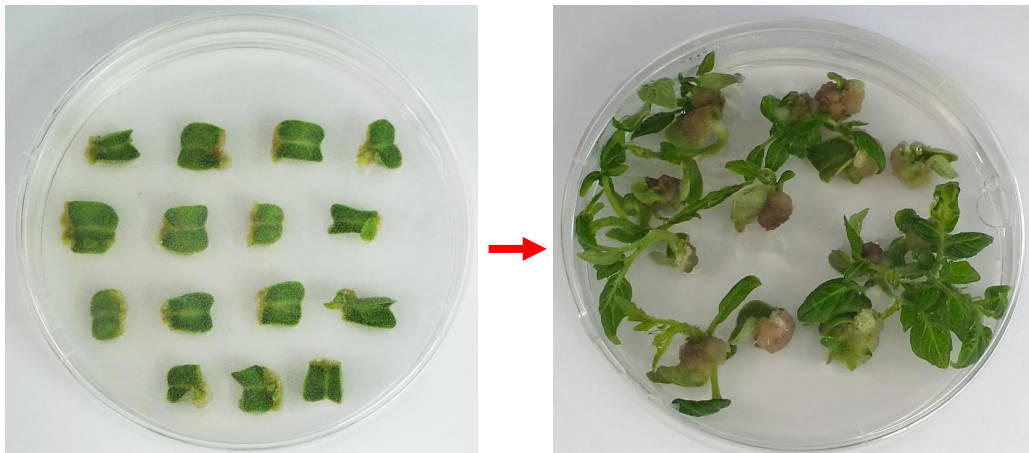
Tipos de regeneração de órgãos vegetais



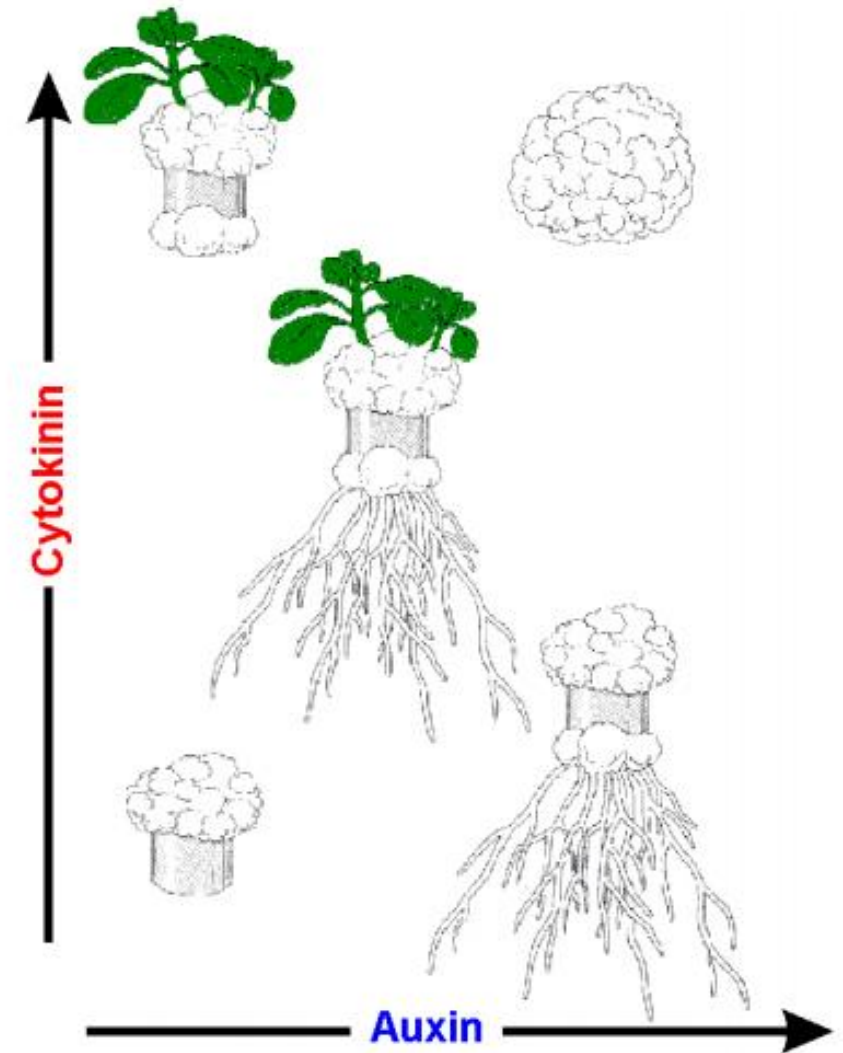
Capacidade de regeneração *in vitro*

É um requisito fundamental para transformação!

O balanço entre auxina e citocinina determina a organogênese *in vitro*



Meio seletivo (Kanamicina)



Transformação Genética de Plantas

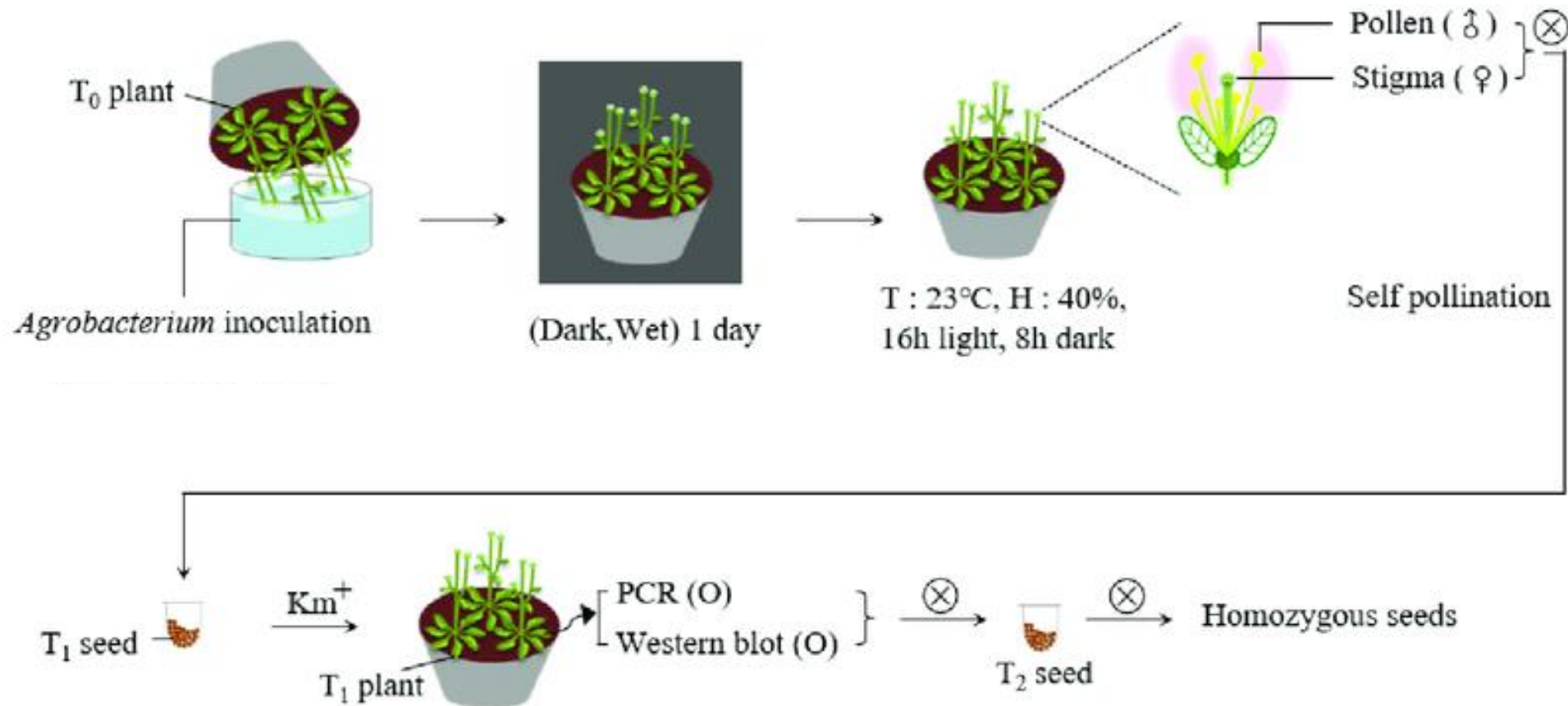
Imersão de botões florais – floral dip



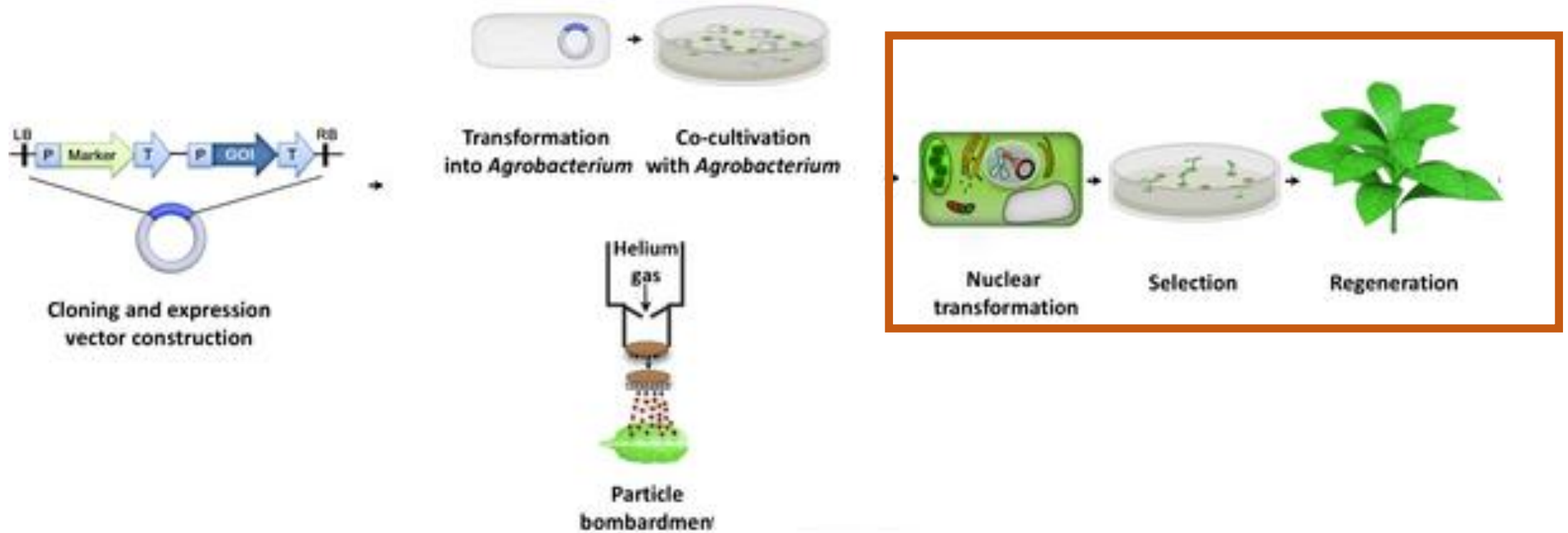
- Técnica eficiente
- Prática e rápida
- Não precisa de técnicas de cultura de tecidos
- Funciona em poucas sp.

Transformação Genética de Plantas

Imersão de botões florais – floral dip

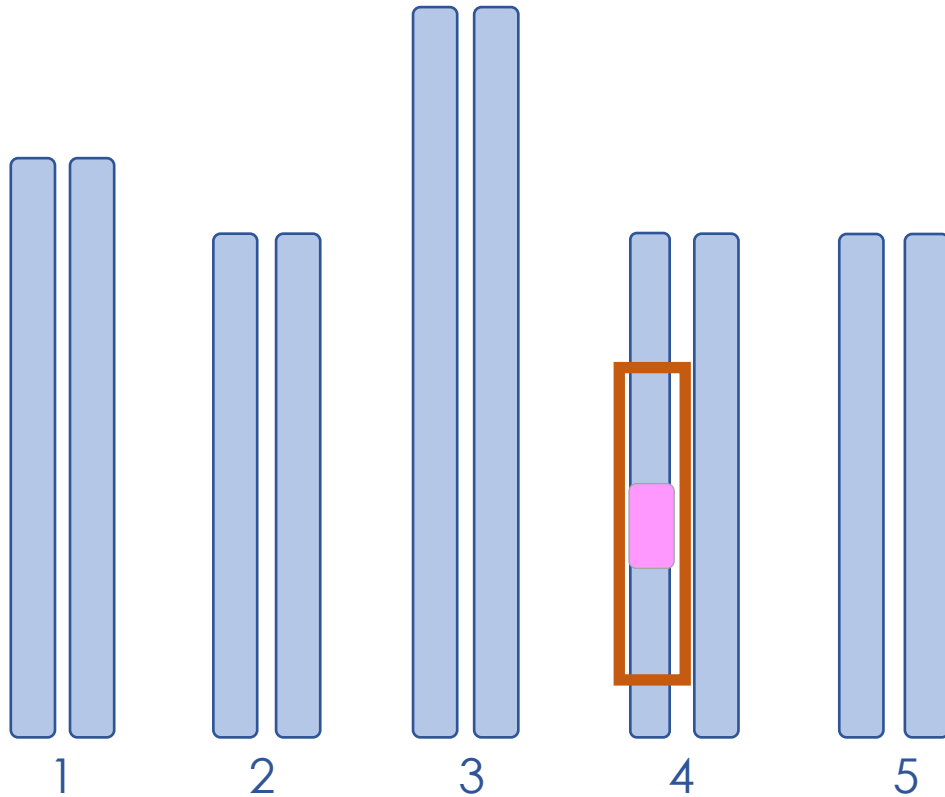


Transformação Genética de Plantas



Triagem de indivíduos homozigotos

GOI+Seleção



Geração de plantas T0

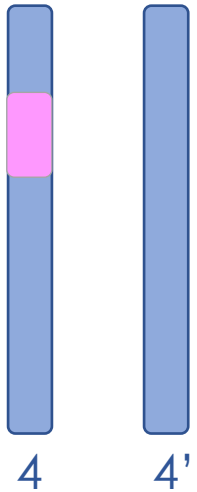
Hemizigoto

Triagem de indivíduos homozigotos

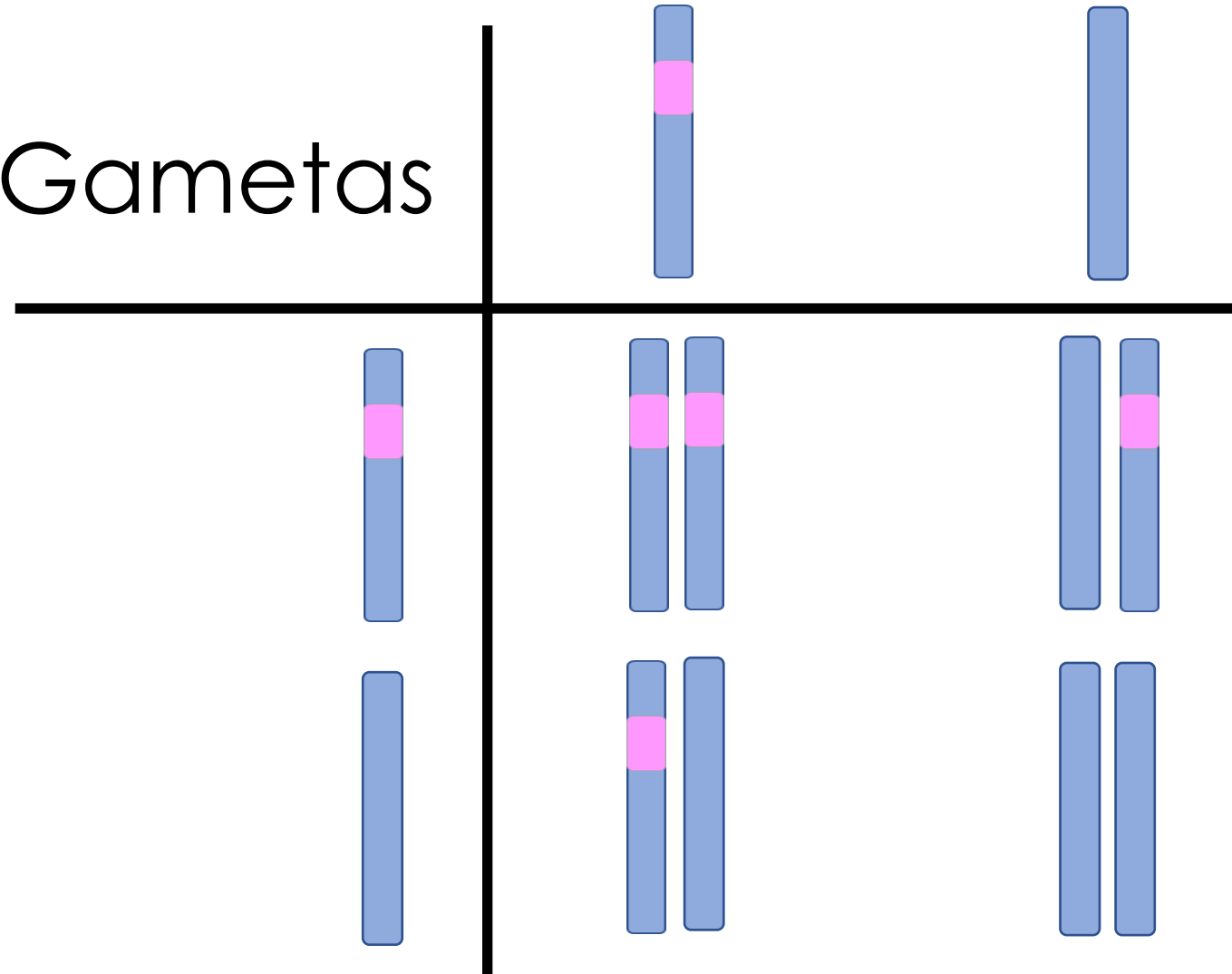
GOI+Seleção



Hemizigoto

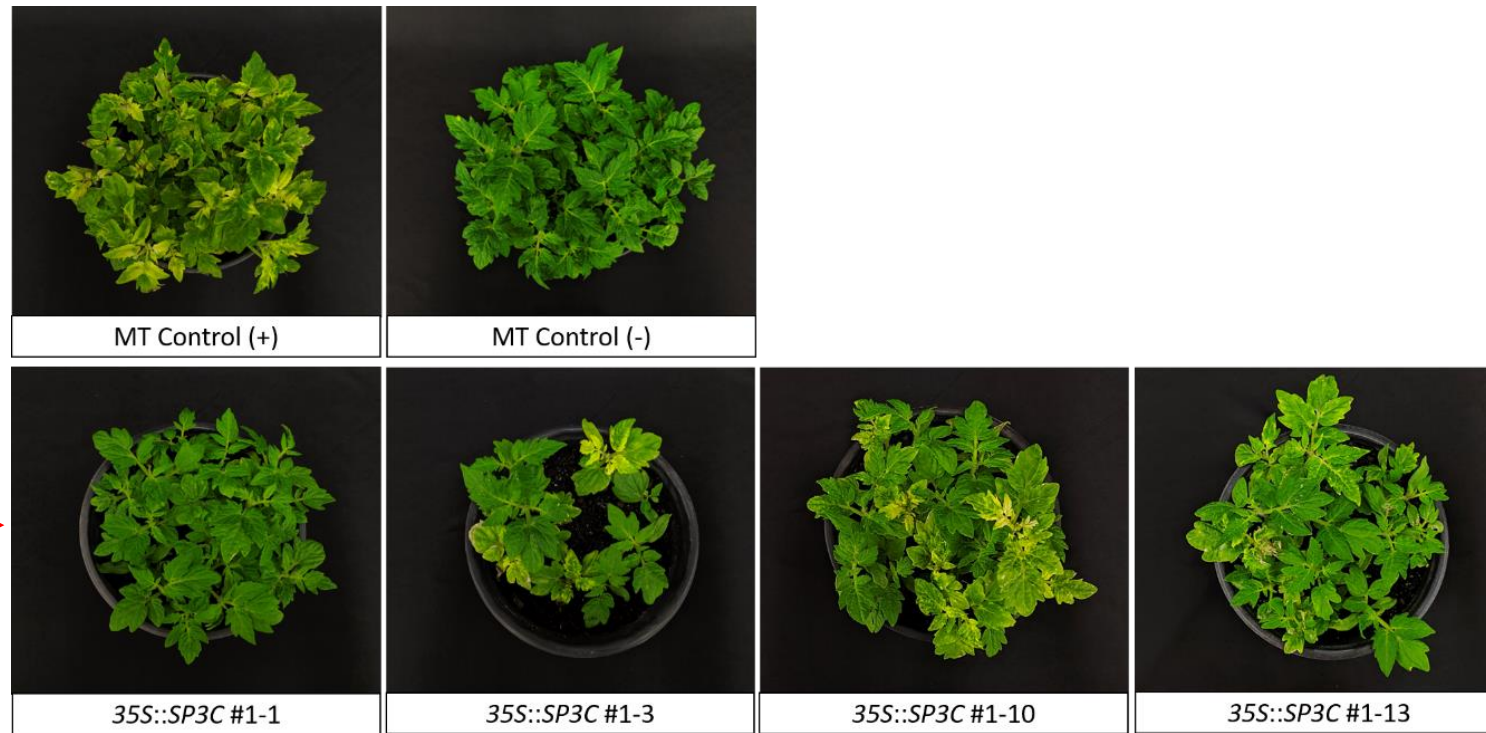
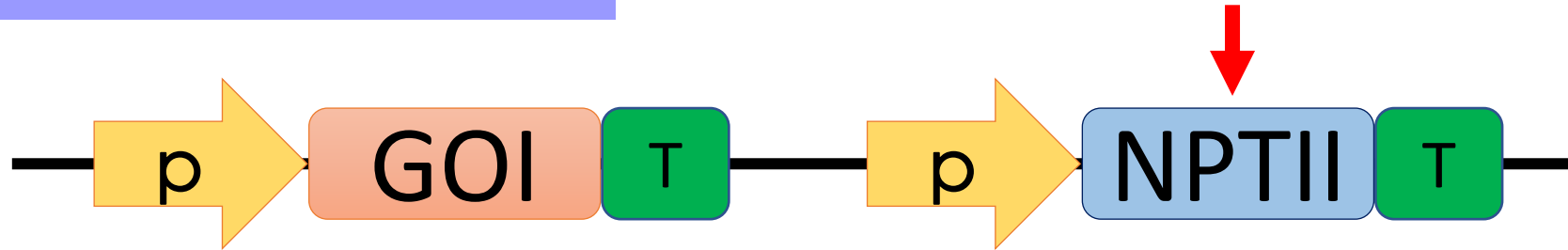


Gametas



Triagem de indivíduos homozigotos

Sistema de seleção: antibióticos



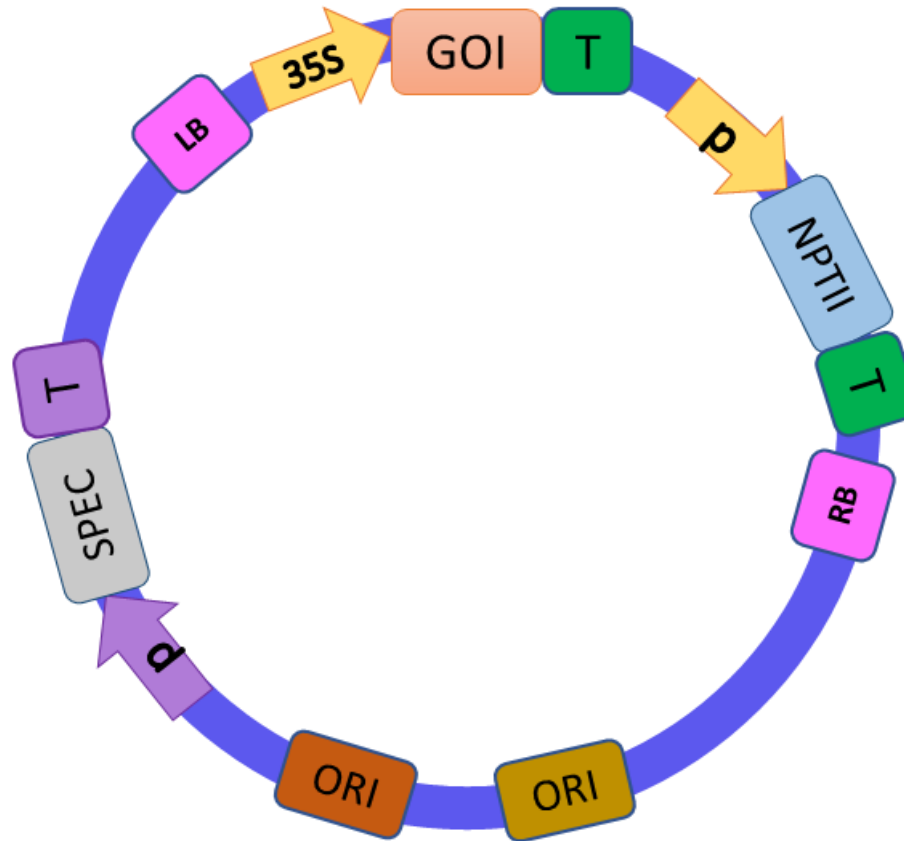
Homozigotas
100%
resistentes

Transformação Genética de Plantas - Aplicações

Vetor de sobreexpressão

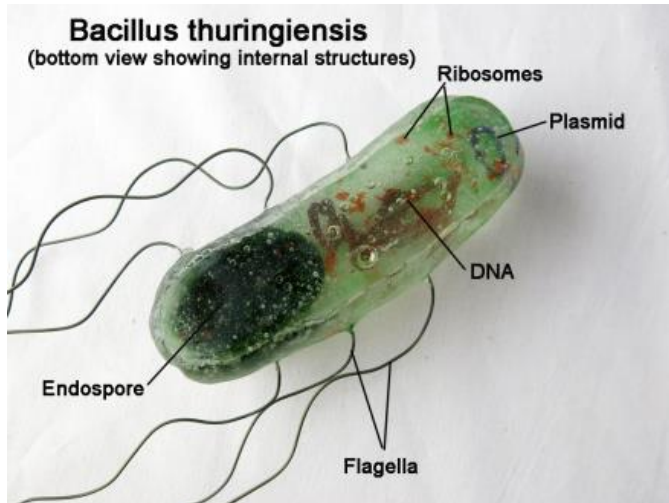


Aumento nos níveis da
proteína alvo

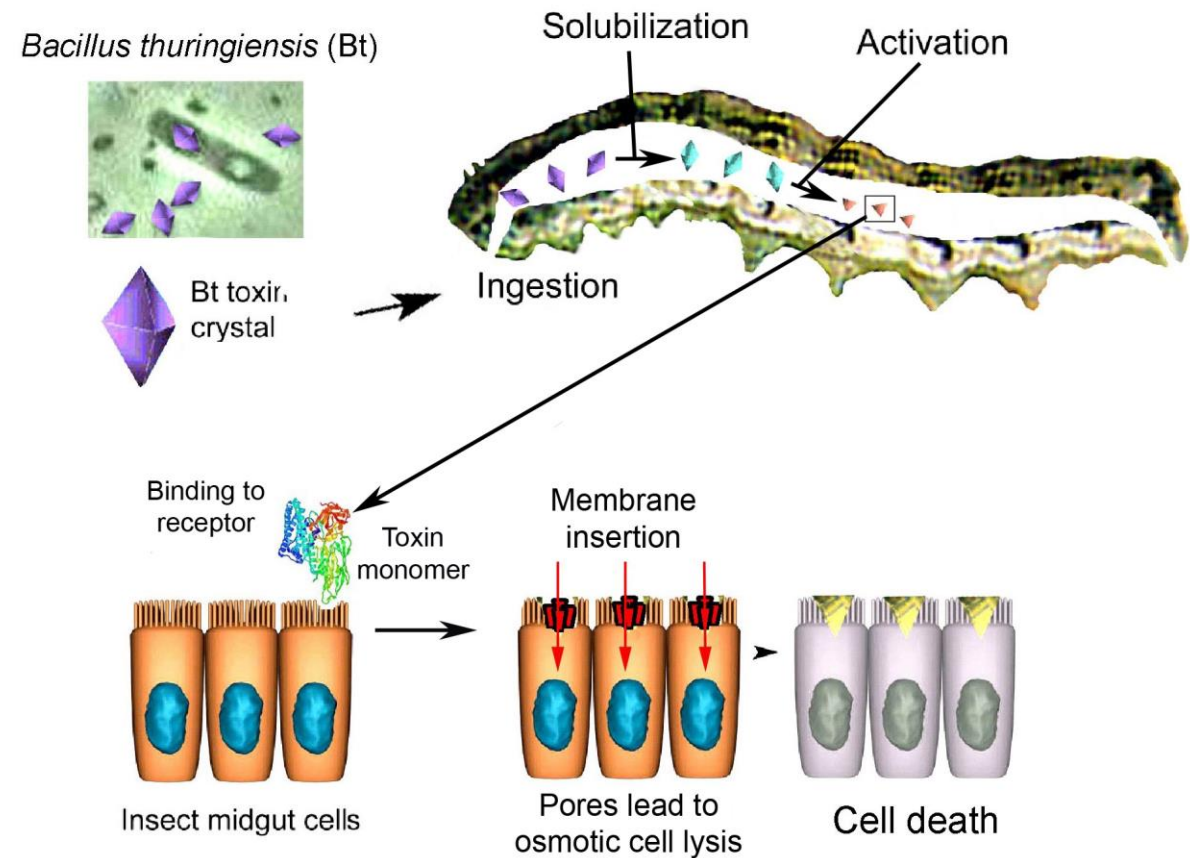


Transformação Genética de Plantas - Aplicações

Indução de Resistência



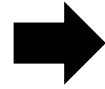
Retirado de
<https://amtecbioagricola.com/2016/01/18/ins-etiqueta-biologico-a-base-de-bacillus-thuringiensis/>



Jurat-Fuentes Laboratory
(<http://web.utk.edu/~jurat/>)

Transformação Genética de Plantas - Aplicações

Indução de Resistência



Toxina Bt - Tabaco

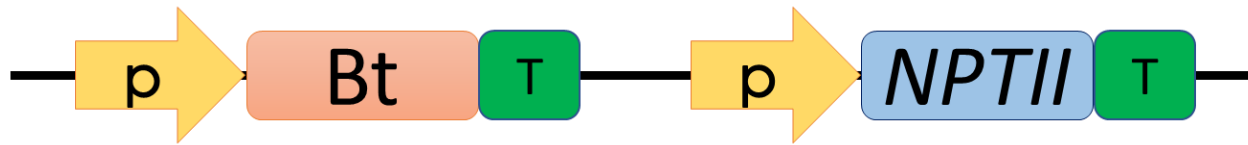
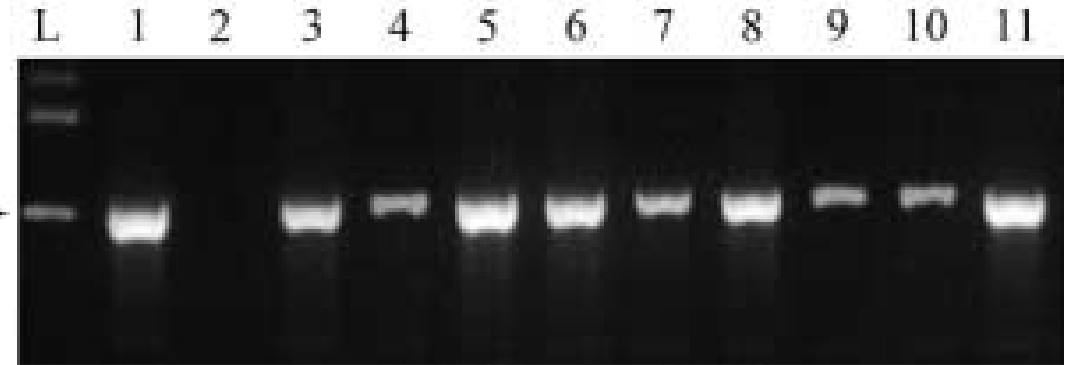
PCR com primers para *cry1C*

1 – vetor

2 – linhagem selvagem

3-11 – linhagens transgênicas

1 kb →

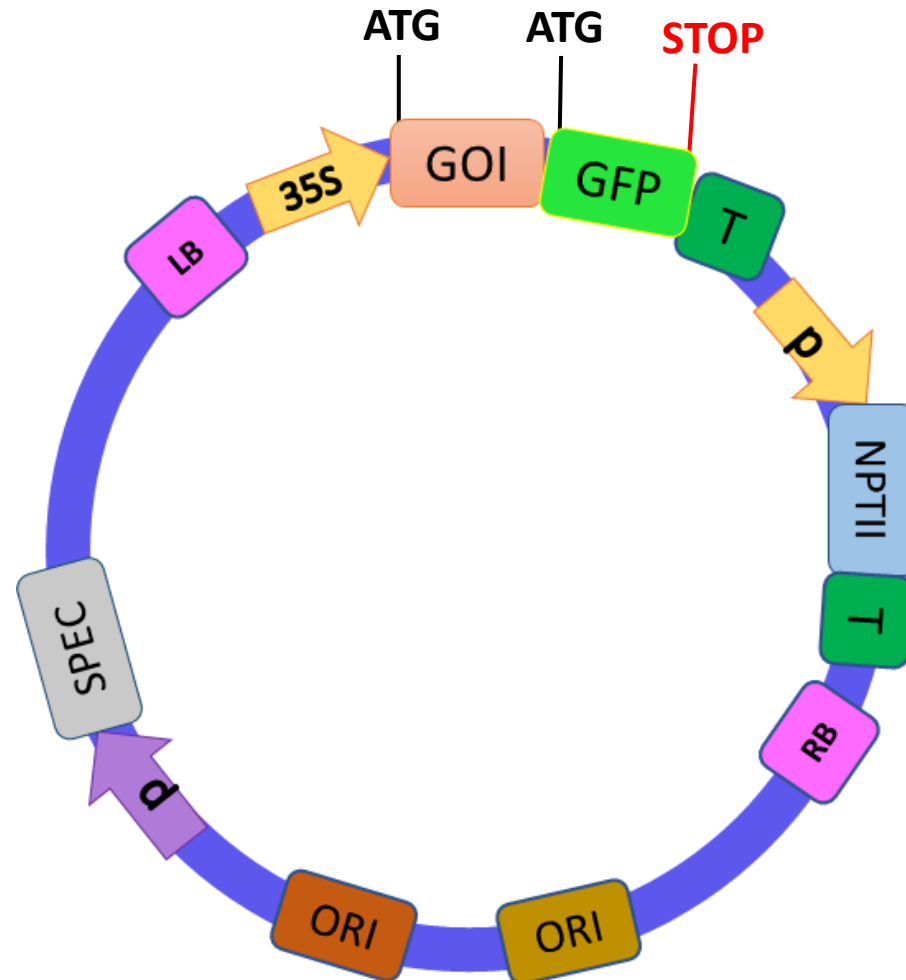


Transformação Genética de Plantas - Aplicações

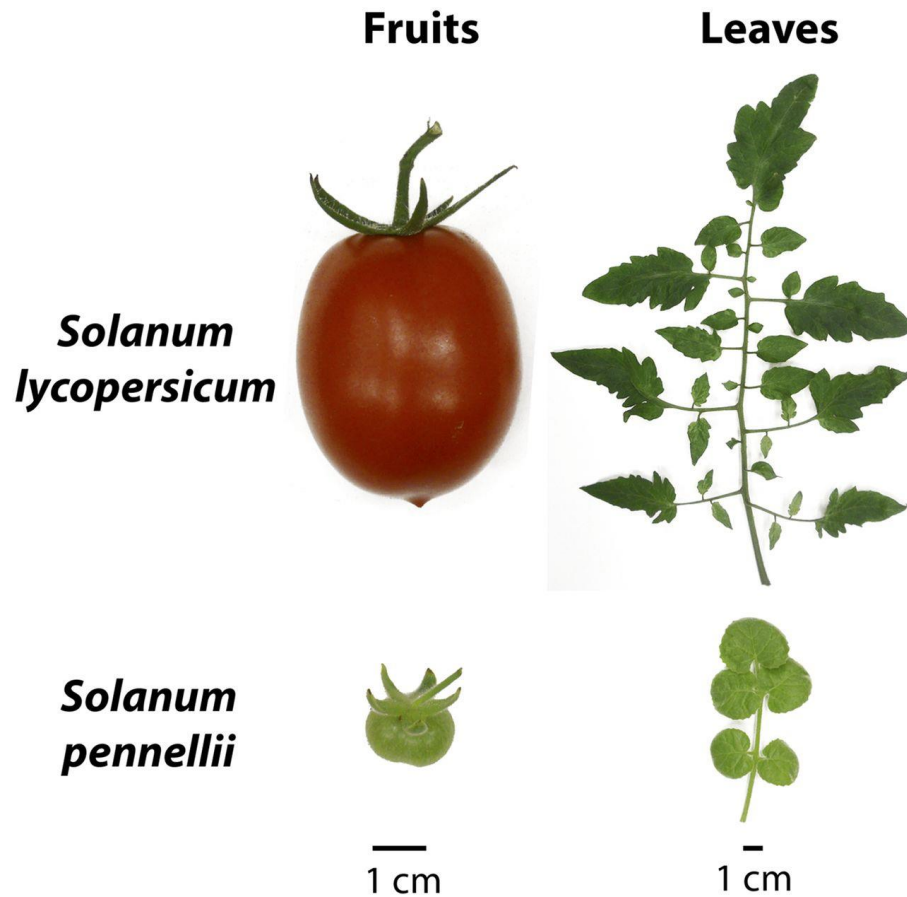
Vetor de fusão com gene repórter



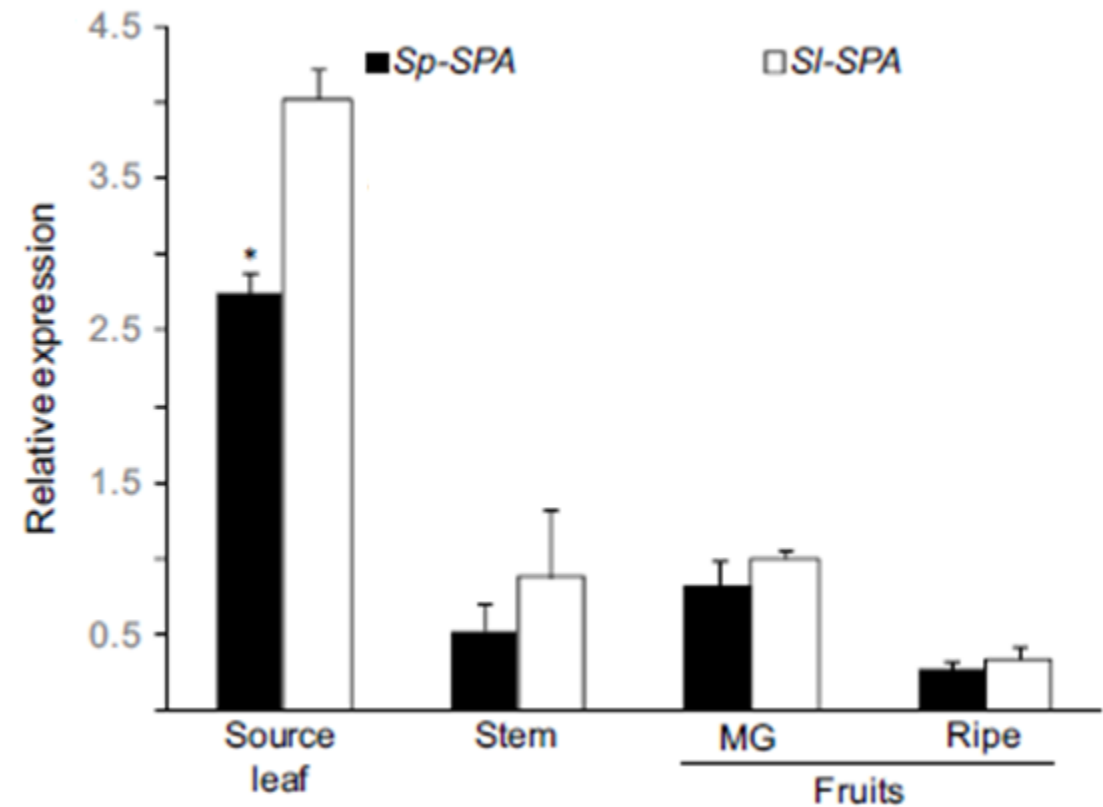
Localização subcelular da proteína



Transformação Genética de Plantas - Aplicações



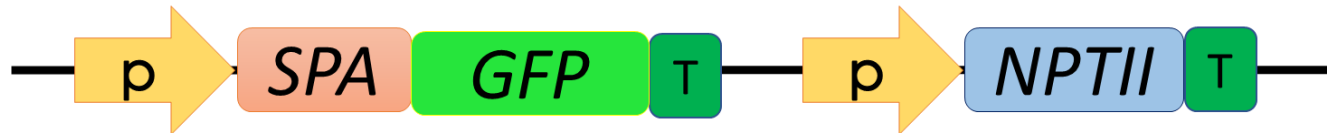
Retirado de Lockhart, J. (2013). A Quantitative Genetic Basis for Leaf Morphology is Revealed in a Set of Precisely Defined Tomato Introgression Lines.



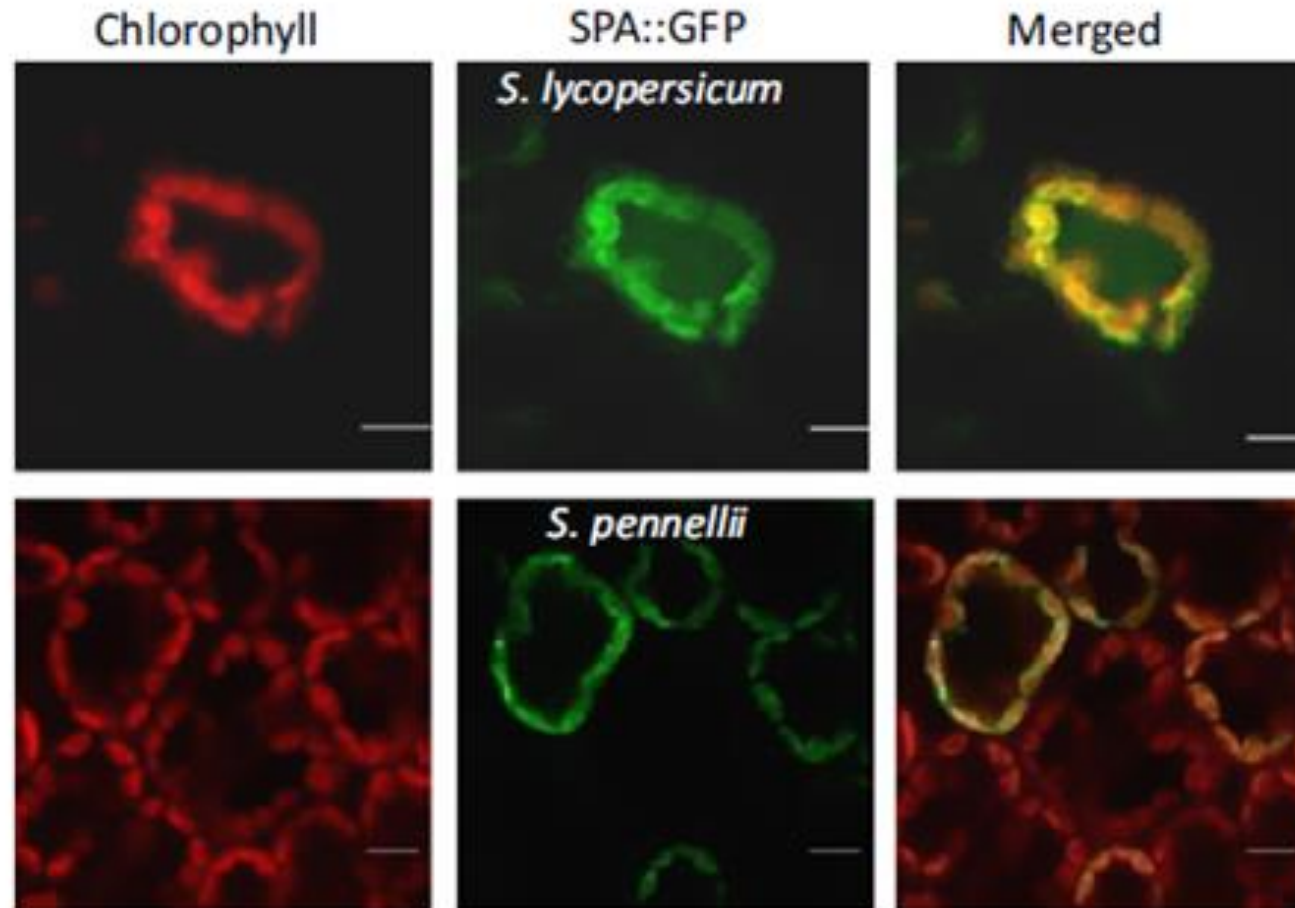
Retirado de Bermúdez, L., Godoy, F., Baldet, P., Demarco, D., Osorio, S., Quadrana, L., ... & Rossi, M. (2014). Silencing of the tomato sugar partitioning affecting protein (SPA) modifies sink strength through a shift in leaf sugar metabolism. The Plant Journal, 77(5), 676-687.

Transformação Genética de Plantas - Aplicações

Onde essa proteína atua?



Transformação Genética de Plantas - Aplicações

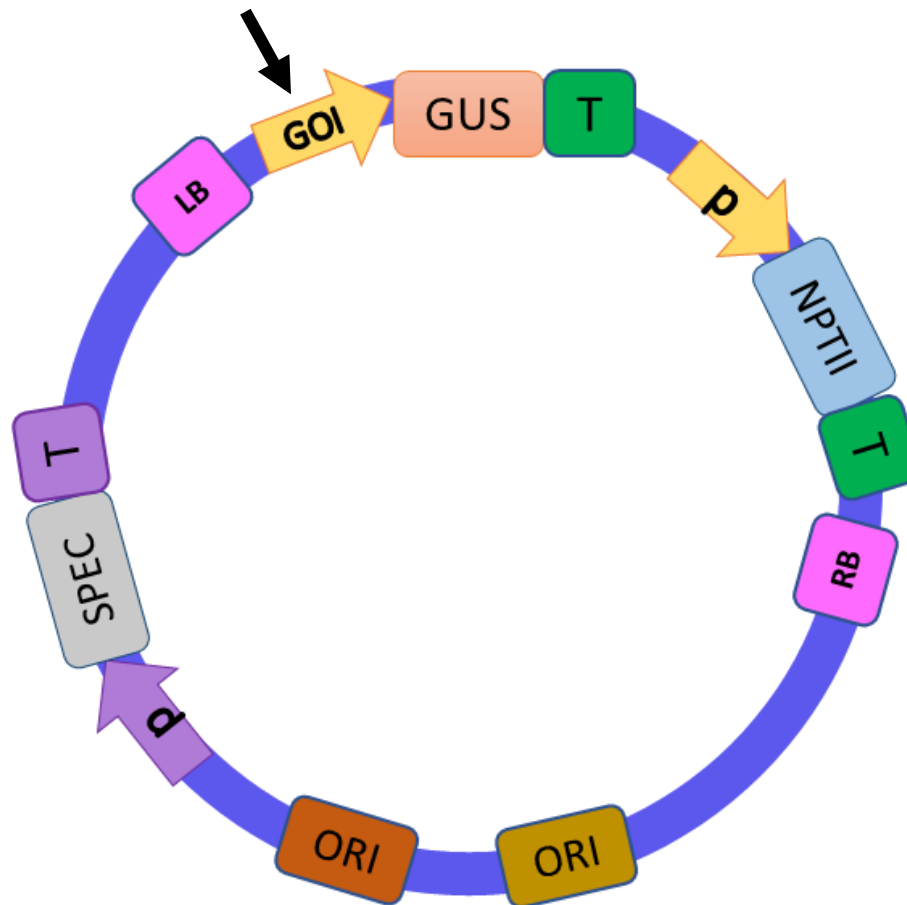


Transformação Genética de Plantas - Aplicações

Vetor de fusão com gene repórter



Atividade do promotor



Transformação Genética de Plantas - Aplicações

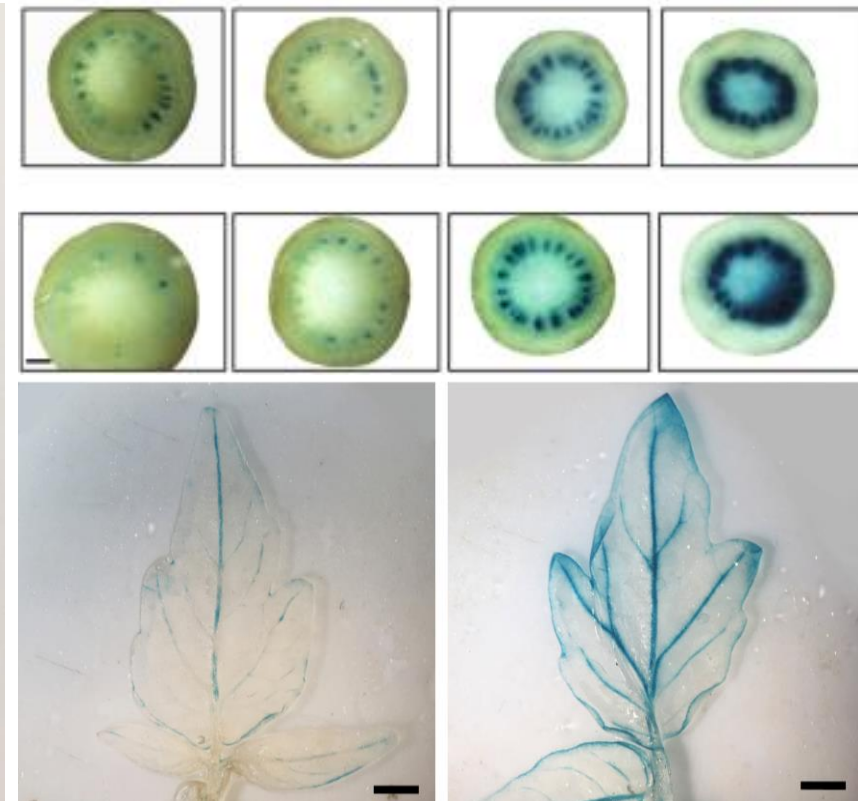
Gene repórter: GUS



regiões com maior responsividade à auxina

β -glucoronidase de *E. coli*

Converte o X-gluc transparente em um precipitado azul

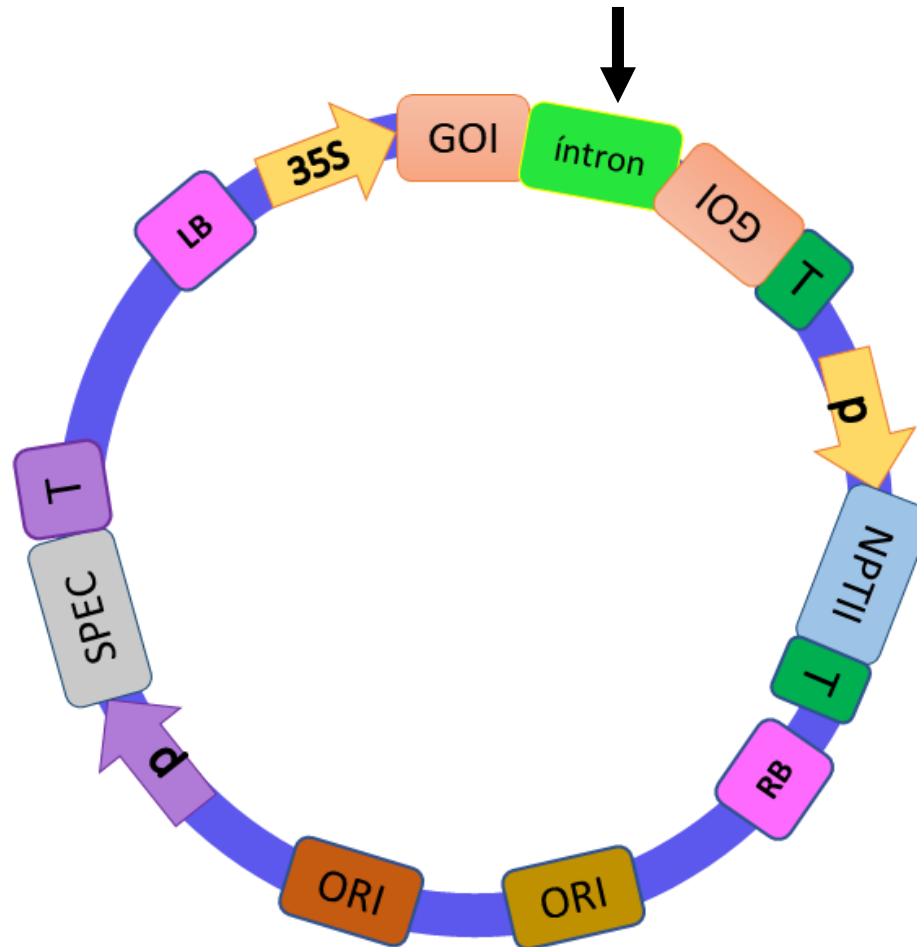


Transformação Genética de Plantas - Aplicações

Vetor de silenciamento gênico



Redução nos níveis da
proteína alvo



Controle pós-transcricional: interferência de RNA (RNAi)

Silenciamento gênico por expressão de um mRNA ANTISENSE



DNA

5' ATGXXXXXXTGA 3'
3' TACXXXXXXACT 5'

RNA_m endôgeno: 5' AUGXXXXXXUGA 3'

Transgene

5' TACXXXXXXACT 3'
3' ATGXXXXXXTGA 5'

RNA_m transgene: 5' UCAXXXXXXXCAU 3'

dsRNA

5' AUGXXXXXXUGA 3'
3' UCAXXXXXXXCAU 5'

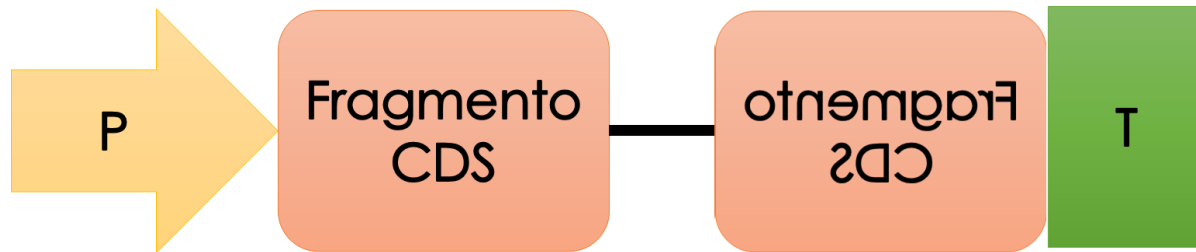


Long dsRNA



Controle pós-transcricional: interferência de RNA (RNAi)

Silenciamento gênico por expressão de um mRNA com estrutura de grampo



Transgene

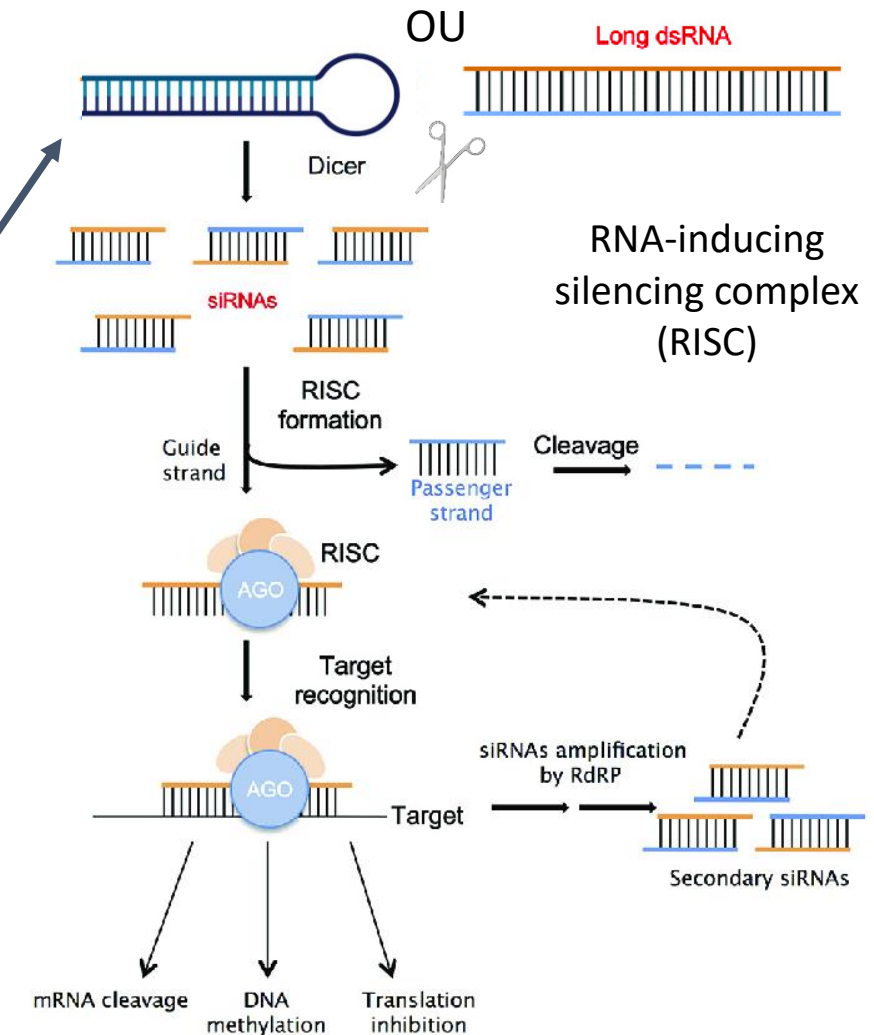
5' ATGXXXXXXTGA 3' TACXXXXXXACT

ítron

5' ATGXXXXXXTGA 3' TACXXXXXXACT

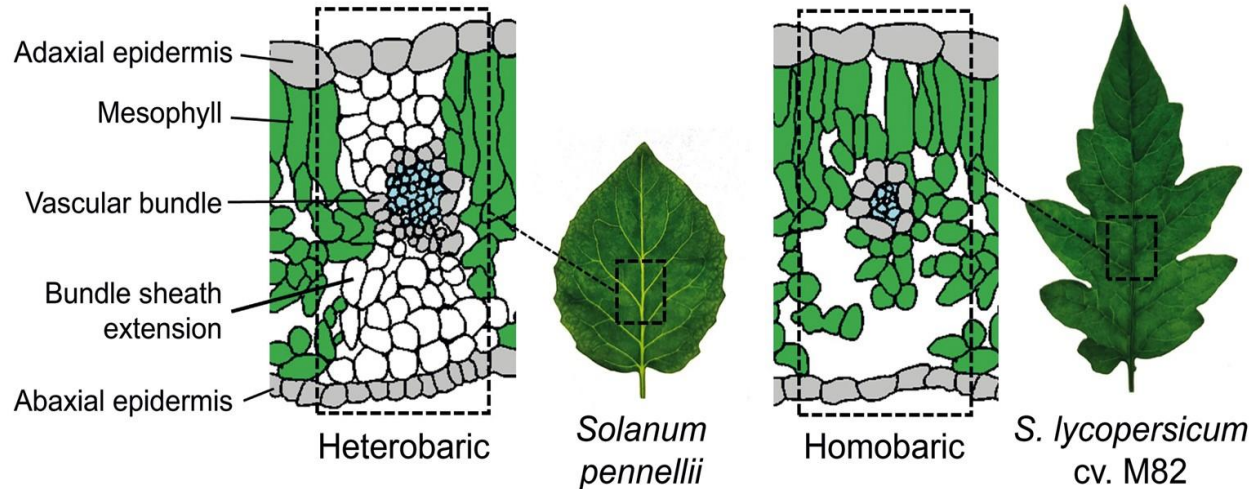
RNAi transgene: 5' ATGXXXXXXTGA 3' TACXXXXXXACT

ítron

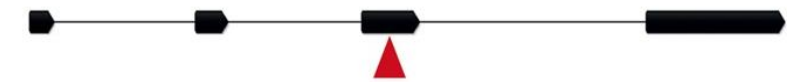


Transformação Genética de Plantas - Aplicações

Silenciamento com estrutura de grampo

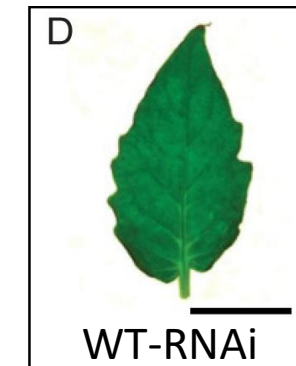
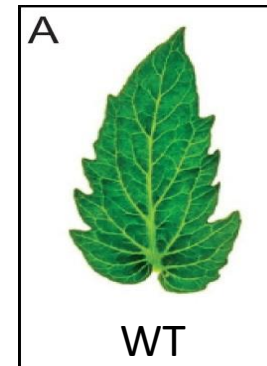
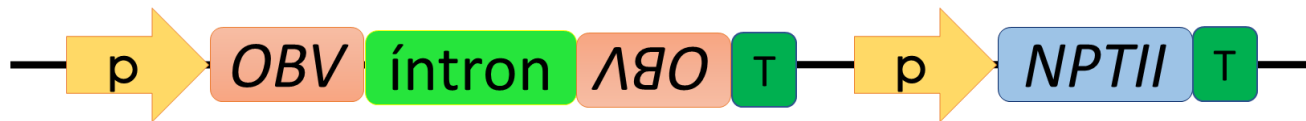


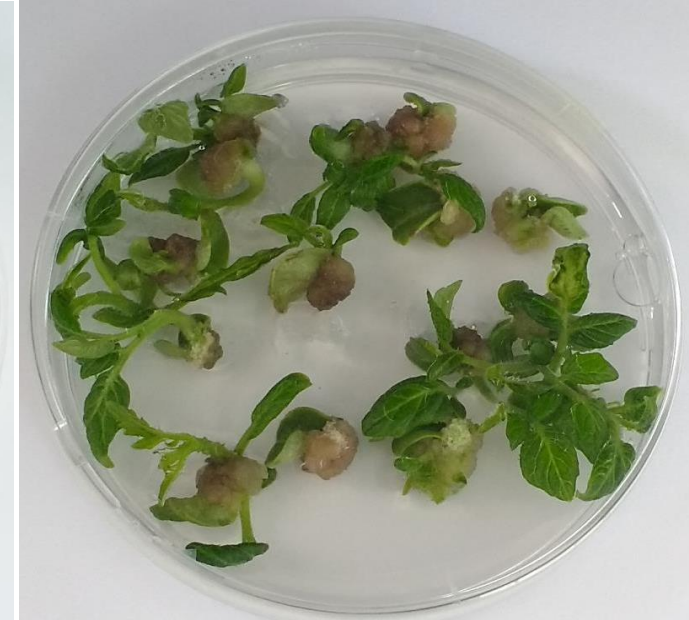
Solyc05g054030



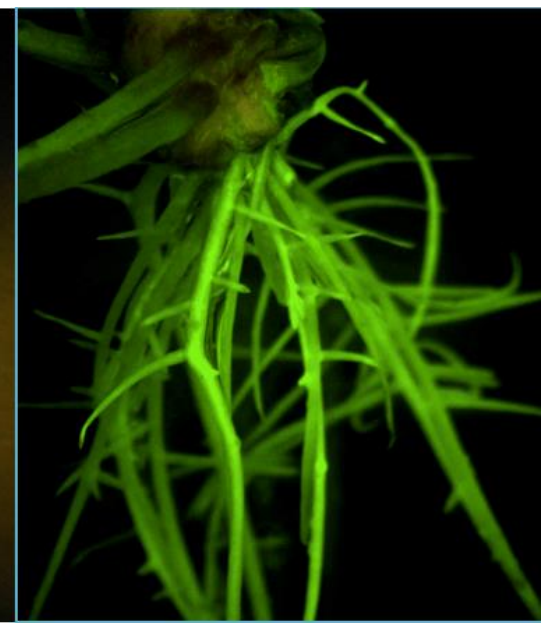
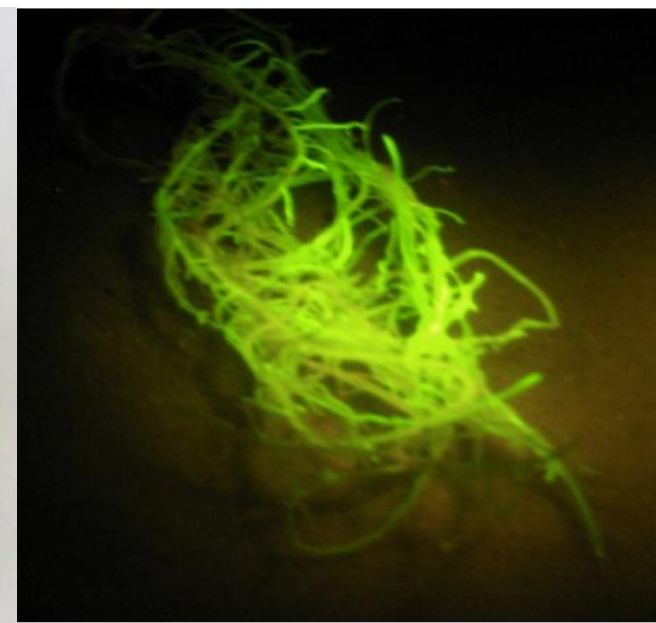
WT TTTAGAAGAAAAC**A**TAGCAATTACAAA
F R R K **H** S N Y K

obv TTTAGAAGAAAAC**G**TAGCAATTACAAA
F R R K **R** S N Y K

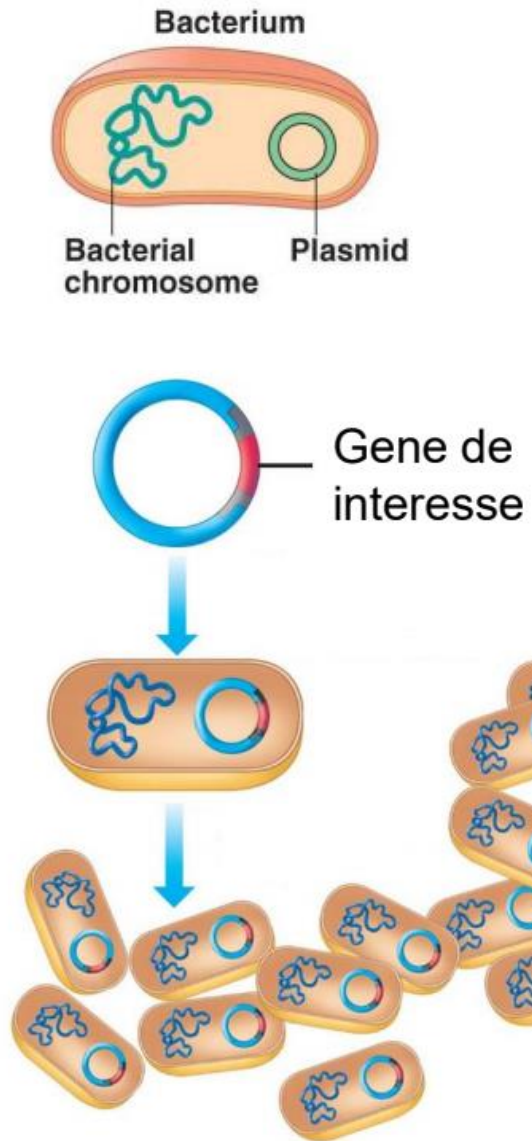




FIM



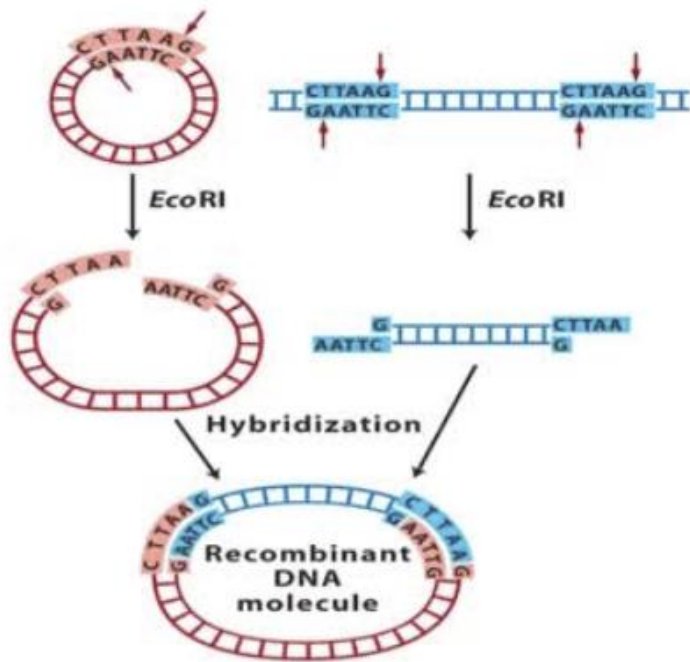
Clonagem gênica



O gene é inserido em um plasmídeo recombinante e multiplicado em bactérias

Múltiplas cópias ('clones') do gene de interesse

Clonagem gênica



- I. Digestão do vetor e fragmento de DNA (gene de interesse) usando enzimas de restrição;
- II. Ligação dos fragmentos, vetor + gene de interesse = DNA recombinante;
- III. Introdução do DNA recombinante na célula de bactéria (**Transformação**);
- IV. Replicação do DNA recombinante na célula hospedeira = Clonagem!!