

# **Transformação genética de plantas e bactérias**

Profa. Maria Teresa Portes  
Departamento de Botânica IB/USP

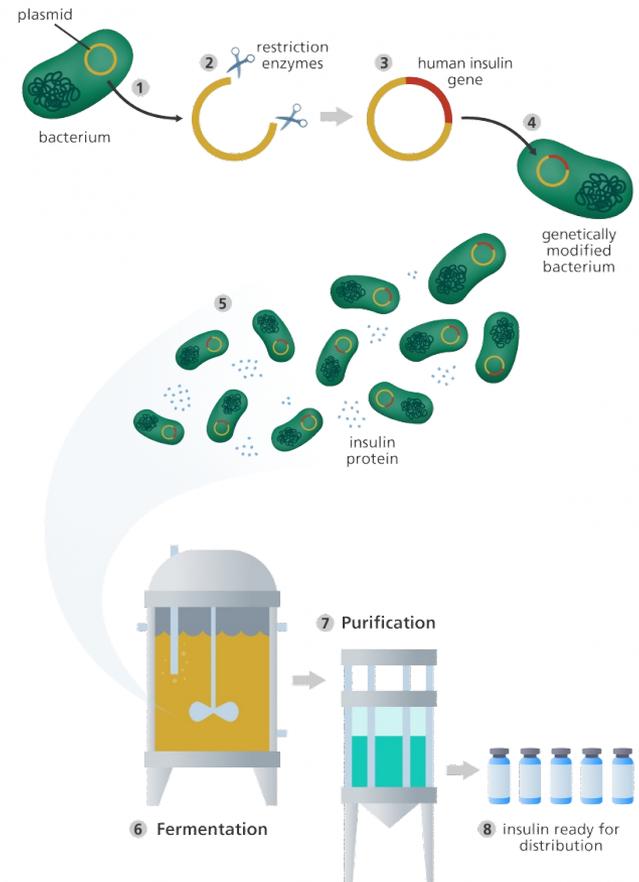
**Lab de Bio I - CCM0215**  
**Abril de 2025**

# O que é a transformação genética?

-> Transformação genética envolve a **transferência e incorporação de DNA exógeno** no genoma do hospedeiro.

-> Usada para modificar geneticamente diversos organismos, incluindo: leveduras, bactérias, plantas e mamíferos.

-> Modificação genética de bactérias:  
*E. coli* modificada que produz insulina

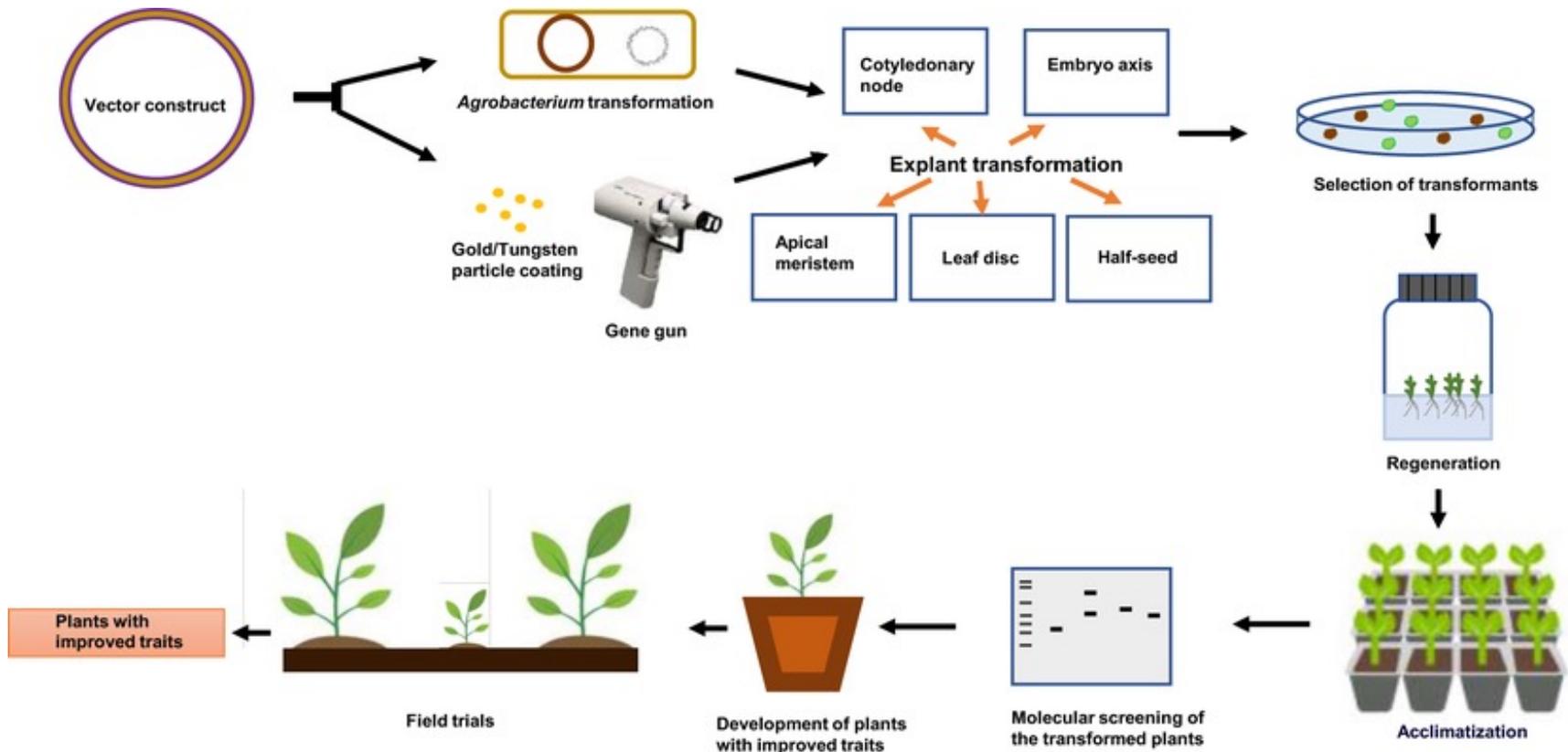


# **Transformação genética de plantas**

*Agrobacterium tumefaciens* como uma ferramenta  
para engenharia genética de plantas

# Transformação genética de plantas

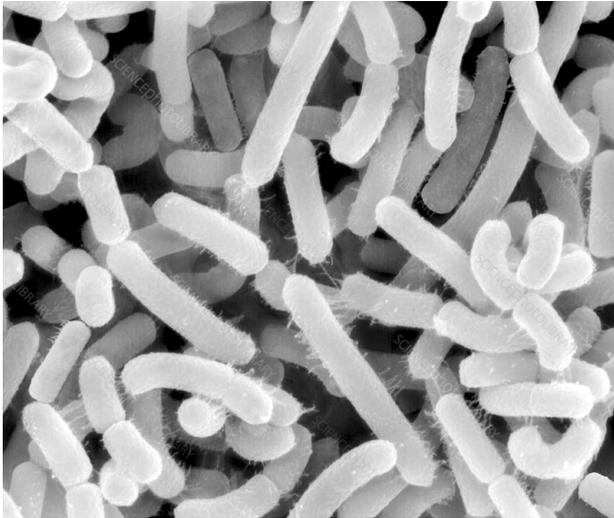
Transformação de plantas é usada para estudar a função de determinados genes (pesquisa básica), para melhorar características nutricionais, de resistência a doenças, tolerância ao estresse, ou relacionadas à produtividade.



# Transformação via *Agrobacterium*

*Agrobacterium* é uma bactéria gram-negativa patogênica, em forma de bastonete, que ocorre naturalmente no solo, a qual tem a habilidade singular de transferir parte do seu DNA para as células vegetais.

Essa bactéria causa a doença galha da coroa.



*Agrobacterium tumefaciens*

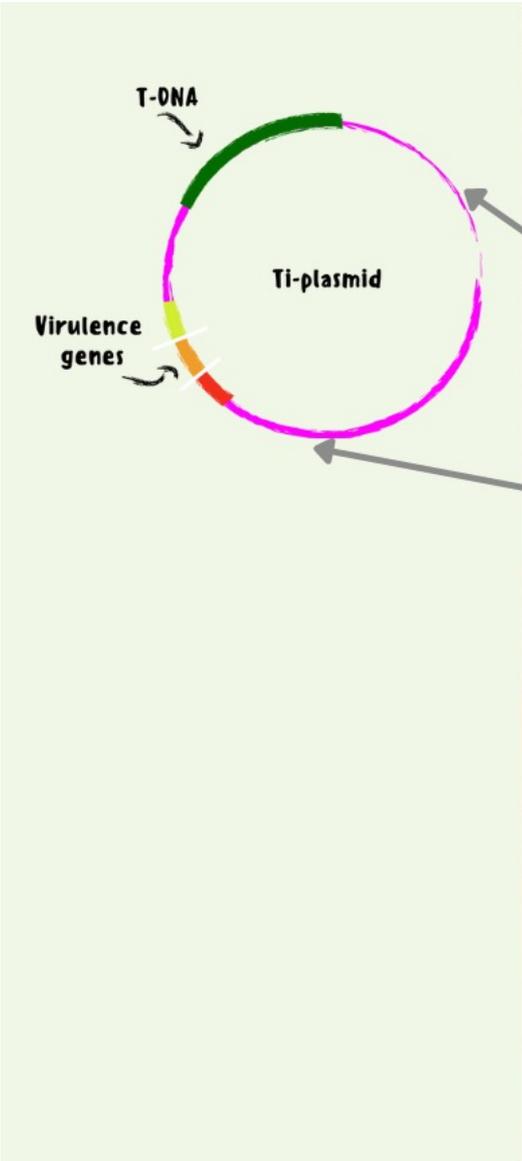


Infectando um célula vegetal

## Doença causada pela *Agrobacterium tumefaciens*: galha-da-coroa

Os sintomas da doença são causados pela inserção de um pequeno fragmento de DNA (conhecido como T-DNA – DNA de transferência) de um plasmídeo para a célula vegetal, o qual é incorporado no genoma da planta, causando uma rápida divisão celular e o desenvolvimento de tumores persistentes nas plantas.



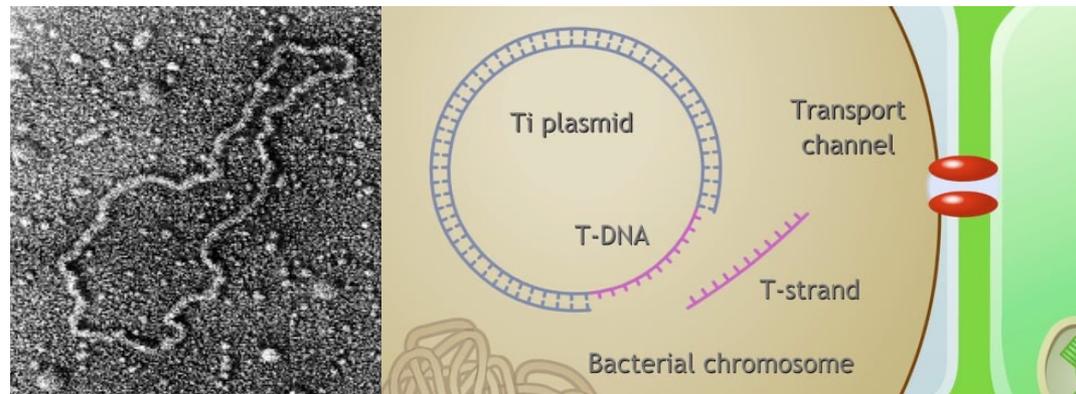
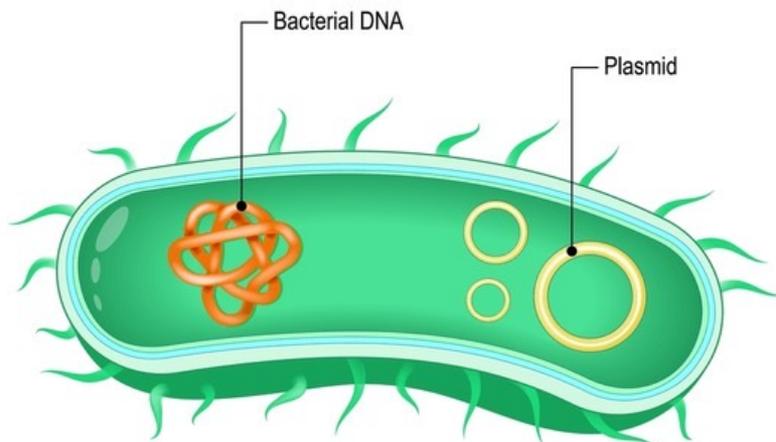


# Mas como isso acontece?

## Como *Agrobacterium* infecta as células?

O fator bacteriano responsável pela indução do tumor é um plasmídeo chamado Ti (indutor de tumor), que confere sua **virulência**.

Os **plasmídeos** são pequenas moléculas extracromossômicas (fragmentos de cromossomos) circulares (ou lineares) de DNA bacteriano (fita dupla) que atuam principalmente em funções adaptativas. Cada plasmídeo tem somente poucos genes e são capazes de auto-replicação.



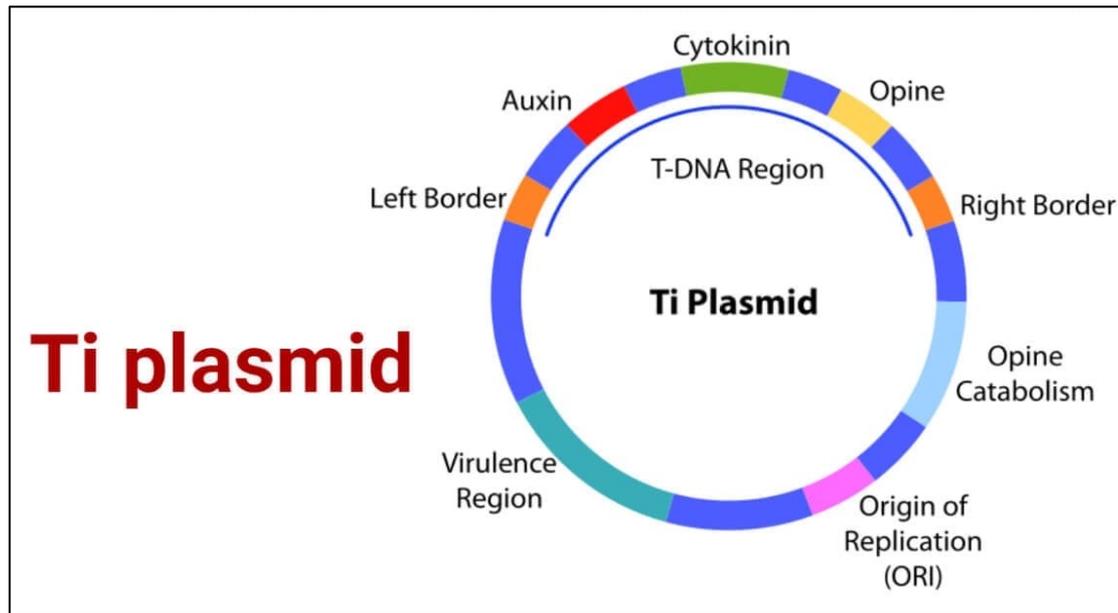
# Composição do plasmídeo Ti

O tamanho dos plasmídeos Ti são de 200-800 kb.

**O plasmídeo Ti (indutor de tumor) é composto por:**

- T-DNA (DNA de transferência) que é transferido para as células vegetais e integrado ao genoma
- região de virulência - fornece todas as funções necessárias para a transferência do T-DNA, que envolve o seu processamento e a exportação para a célula vegetal.

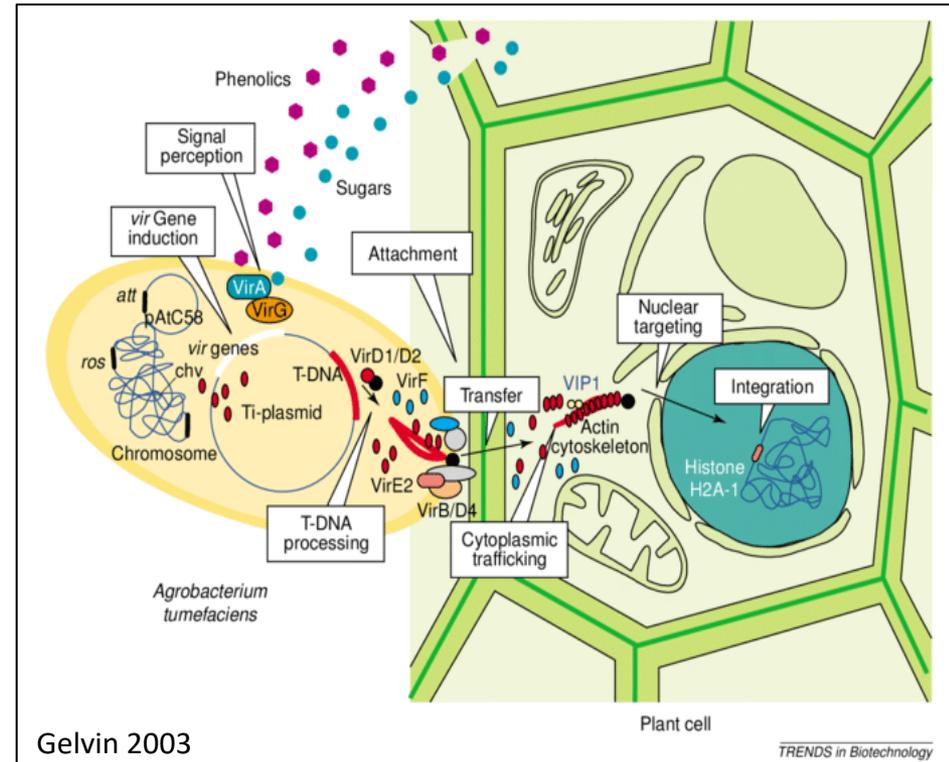
Duas sequências repetitivas de 25bp na borda direita e do T-DNA são essenciais para a transferência do T-DNA.

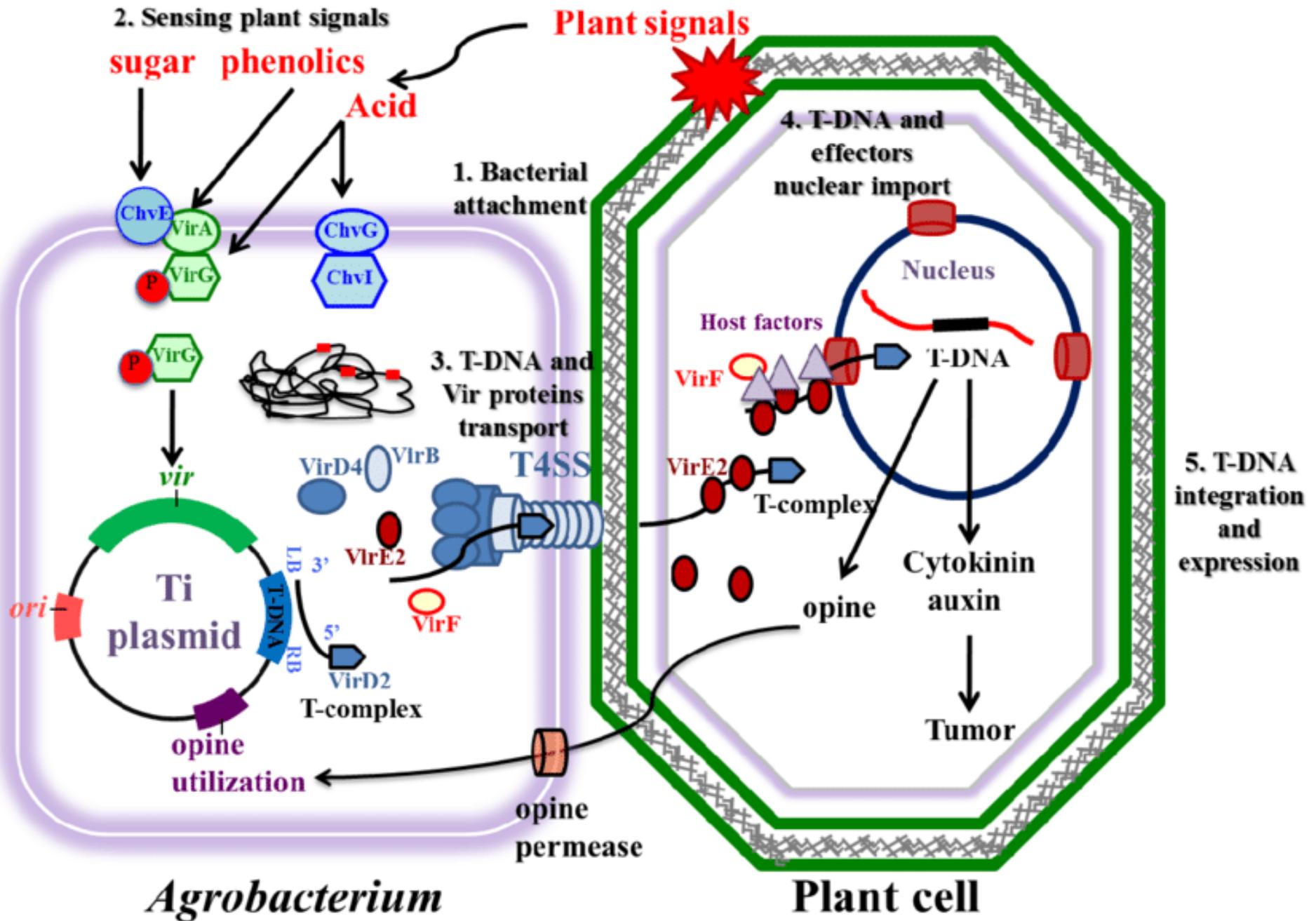


# Como o T-DNA é transferido para a planta?

## Passos da infecção:

- > Percepção dos sinais
- > Indução dos genes de virulência
- > Processamento do T-DNA
- > Ligação - *attachment*
- > Transferência do T-DNA processado e das proteínas de virulência - canal
- > Transporte citoplasmático
- > Alvo nuclear
- > Integração no genoma da planta

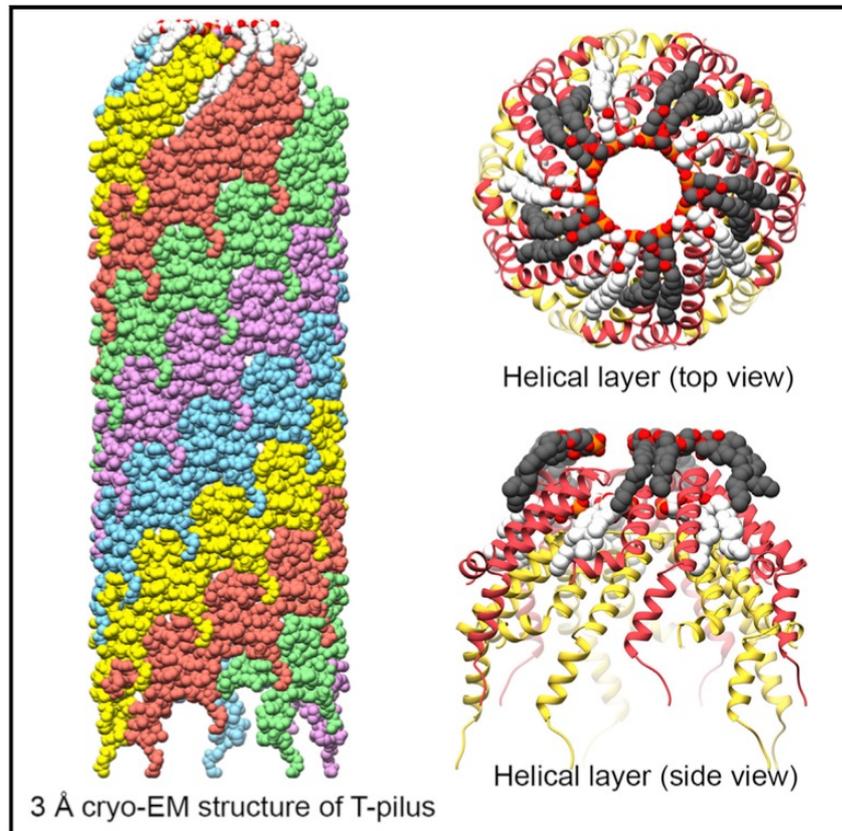




# Structure

## Cryo-EM structure of the *Agrobacterium tumefaciens* T4SS-associated T-pilus reveals stoichiometric protein-phospholipid assembly

### Graphical abstract



### Authors

Stefan Kreida, Akihiro Narita,  
Matthew D. Johnson, Elitza I. Tocheva,  
Anath Das, Debnath Ghosal,  
Grant J. Jensen

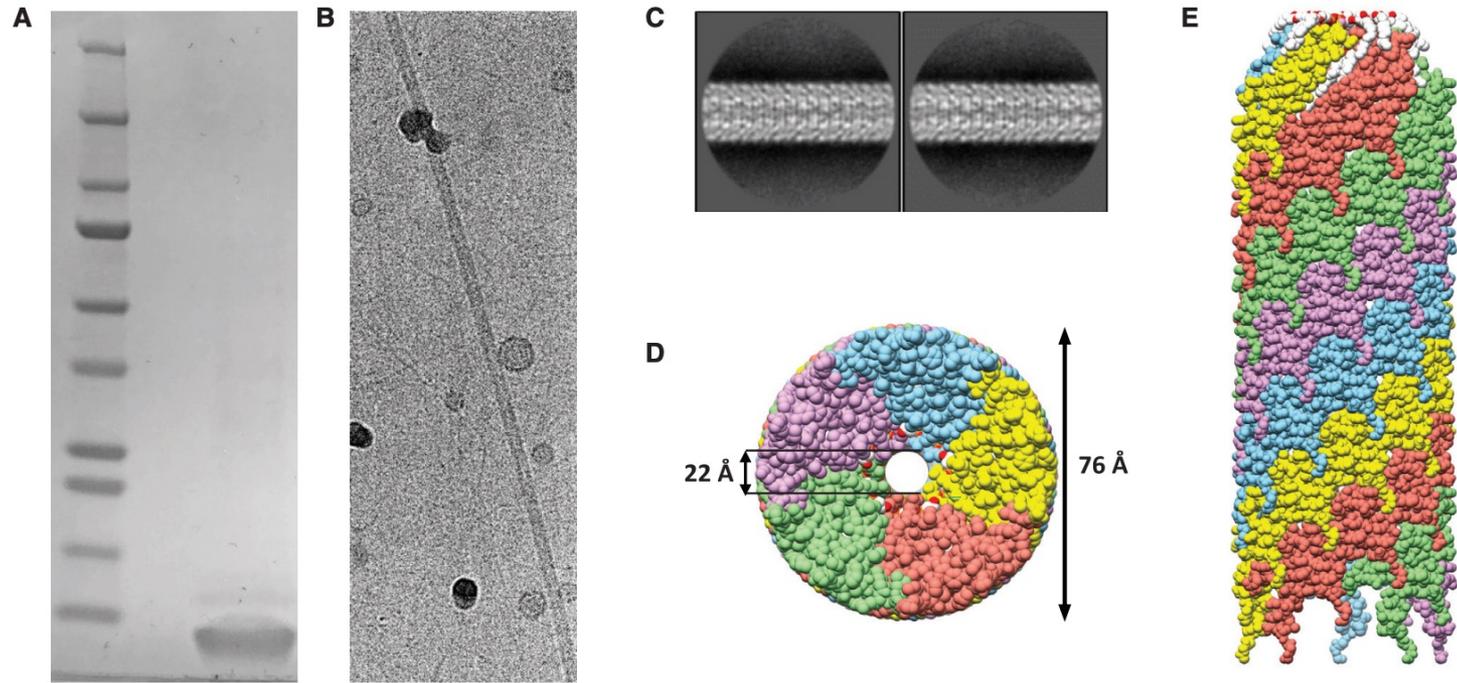
### Correspondence

debnath.ghosal@unimelb.edu.au (D.G.),  
grant\_jensen@byu.edu (G.J.J.)

### In brief

The *A. tumefaciens* T-pilus is involved in interkingdom conjugation. Kreida and Akihiro et al. report the cryo-EM structure of the assembled T-pilus, composed of VirB2 proteins and PG. The structure suggests that the T-pilus is an unlikely conduit for ssDNA transfer and will help in elucidating its role in conjugation.

Criogenic electron microscopy  
T4SS complex



**Figure 1. Structure determination of the T-pilus**

(A) SDS-PAGE of purified VirB2 protein stained with Coomassie (lane 2). Mature VirB2 has a predicted MW of 7.2 kDa. Precision plus molecular weight marker was used (lane 1).

(B) Cryo-electron micrograph of intact purified T-pilus.

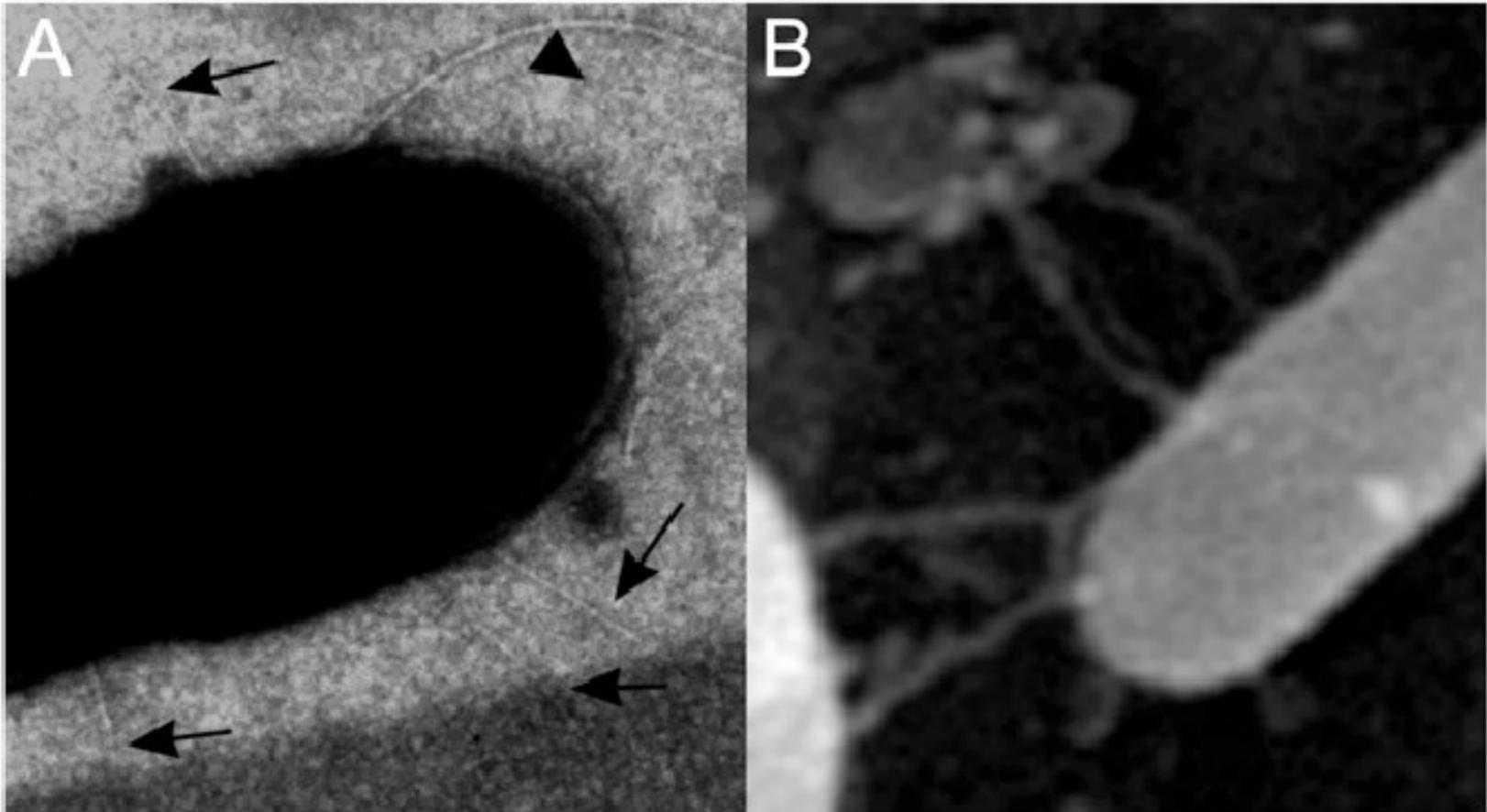
(C) Representative 2D class averages from Relion with a 300 pixel box size.

(D) Bottom view of the filament model; colored by individual VirB2 molecules.

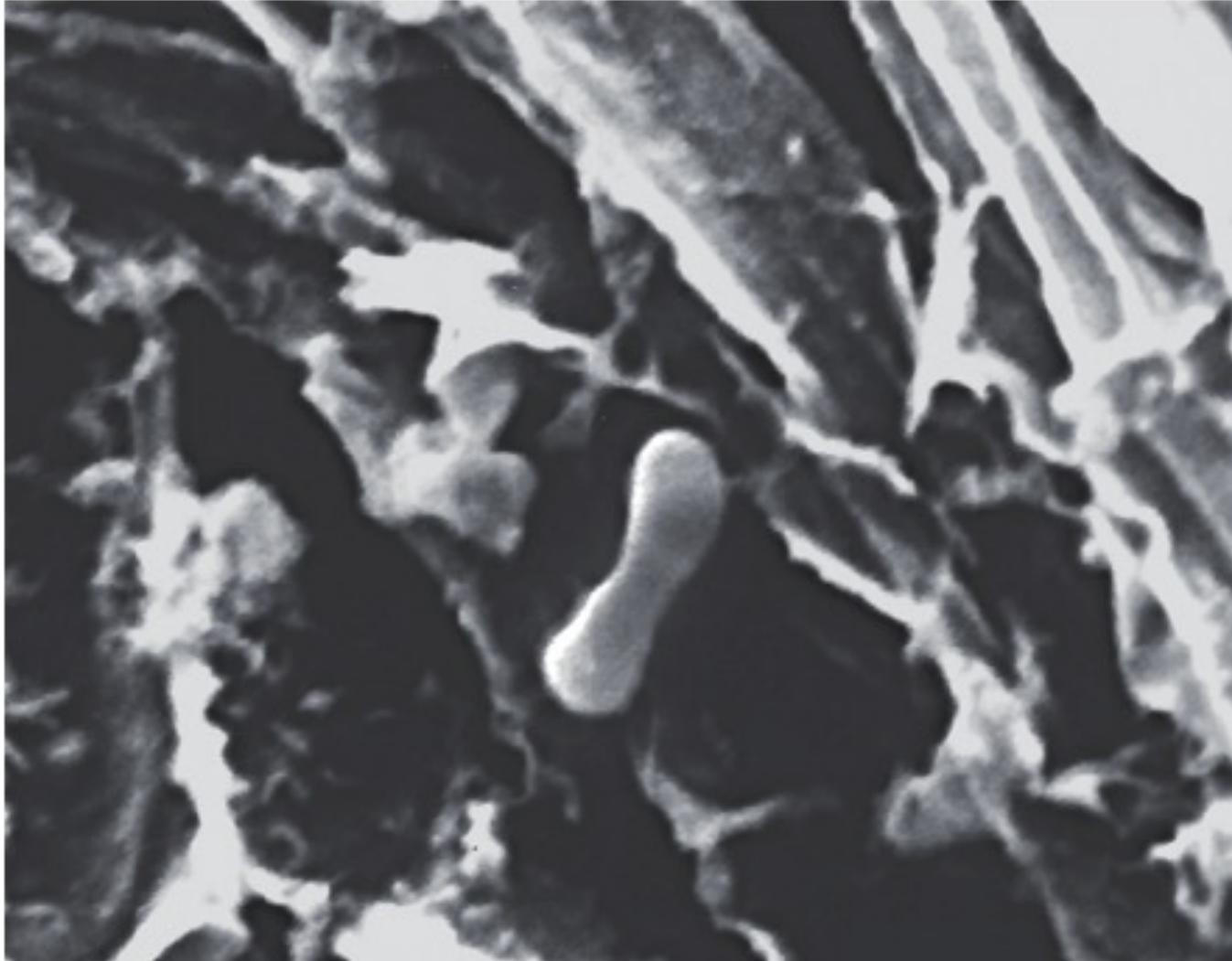
(E) Side view of the filament. The filament is built up by five parallel helices, and each of these have a unique color. The top of the represented filament is toward the tip (as determined before<sup>52</sup>).

## Como o T-DNA é transferido para a planta?

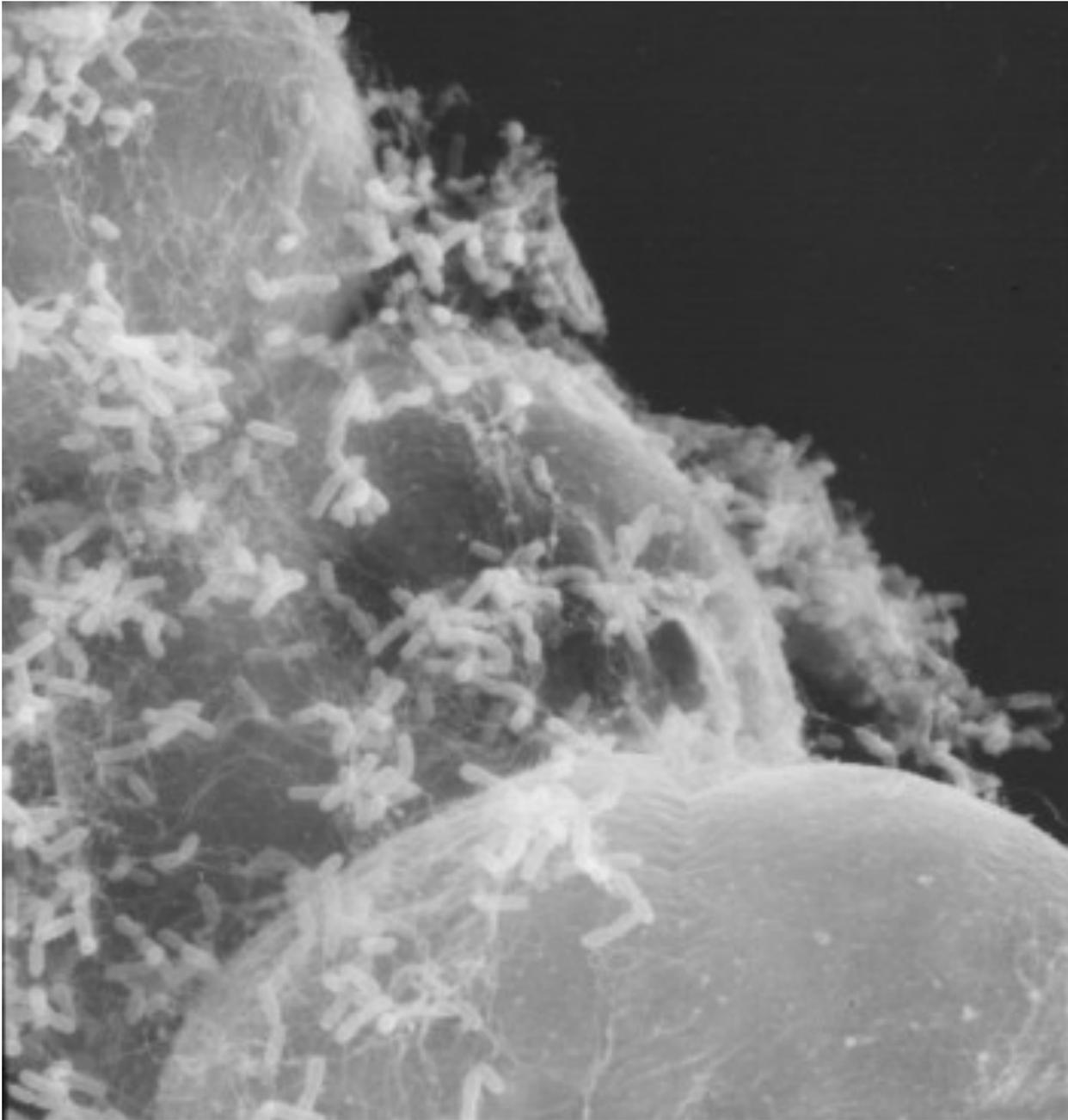
-> A ligação (attachment) – ocorre em 2 passos: após uma ligação fraca e reversível, a bactéria sintetiza fibrilas de celulose que ancoram a bactéria à célula vegetal, para a qual ela foi atraída. 4 genes principais estão envolvidos neste processo: *chvA*, *chvB*, *pscA*, (síntese das fibrilas) e *att*. As fibrilas ligam a bactéria à célula vegetal e também ligam bactérias entre si.



Micrografia eletrônica mostrando a aderência/ligação de *Agrobacterium* no cotilédone de girassol



Ozyigit et al. (2013)

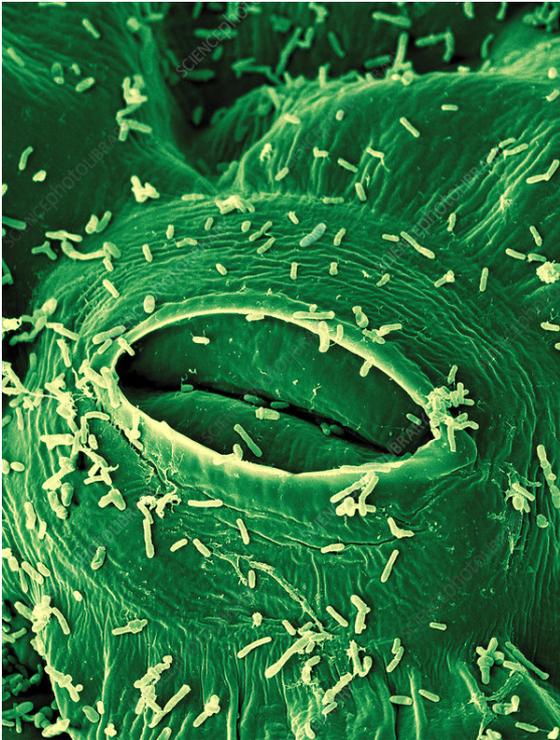


# Expressão transiente

Em folhas de *Nicotiana tabacum* ou *Nicotiana benthamiana*

Para transformação estável – tecidos com ferimentos

Em folhas íntegras, a entrada da Agro ocorre pelos estômatos.



# Floral dip – *Arabidopsis thaliana* – planta modelo

Outra técnica – mais moderna e mais eficiente – poupa 1 geração de desenvolvimento.

Outros marcadores de seleção são possíveis, proteína presente no tegumento da semente – seleção direta.



During the *Arabidopsis* transformation process, floral organs are immersed in *Agrobacterium* culture in a 50 mL Falcon tube. Weigh boats or old pipette tip boxes are good alternative containers for dipping plants.

Major stages of transformation of *Arabidopsis thaliana* using floral dip method: A – developmental stage of floral buds used for plant transformation, B–D – cultivation of transgenic *Arabidopsis* plants, E–F – examples of histochemical analysis of the *gus* gene expression in transgenic *Arabidopsis* seedlings.





**BOOM OF  
SYNTHETIC  
BIOLOGY**

Toggle switch  
*in bacteria*



Artemisinic acid  
*in yeast*



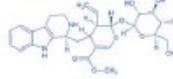
Taxol precursors  
*In bacteria*



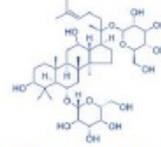
Artemisinin  
*in yeast*



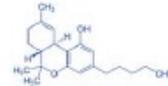
Vinca-  
Alkaloid  
precursors  
*In yeast*



Ginsenosides  
*in yeast*



Cannabinoids  
*in yeast*



2000

2005

2010

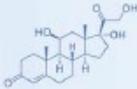
2015

2020

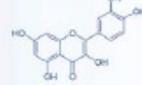
First plant  
genome  
sequence  
*Arabidopsis*



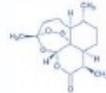
Hydroxy-  
cortisone  
*in yeast*



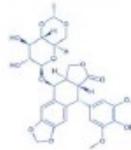
Polyphenols  
*in yeast*



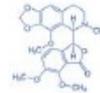
Artemisinin  
*in tobacco*



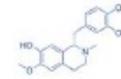
Lignans  
*In tobacco*



Noscapine  
*in yeast*



New-to-nature  
opioids  
*in yeast*



# Espécies transgênicas mais comercializadas

**milho**



**soja**



**algodão**



**canola**



**tomate**



Resistência a herbicida e inseticida

**Espécies florestais usadas para madeira, aglomerados, papel e polpa de celulose**

**batata**



**eucalyptus**



**alamo**



**pinus**

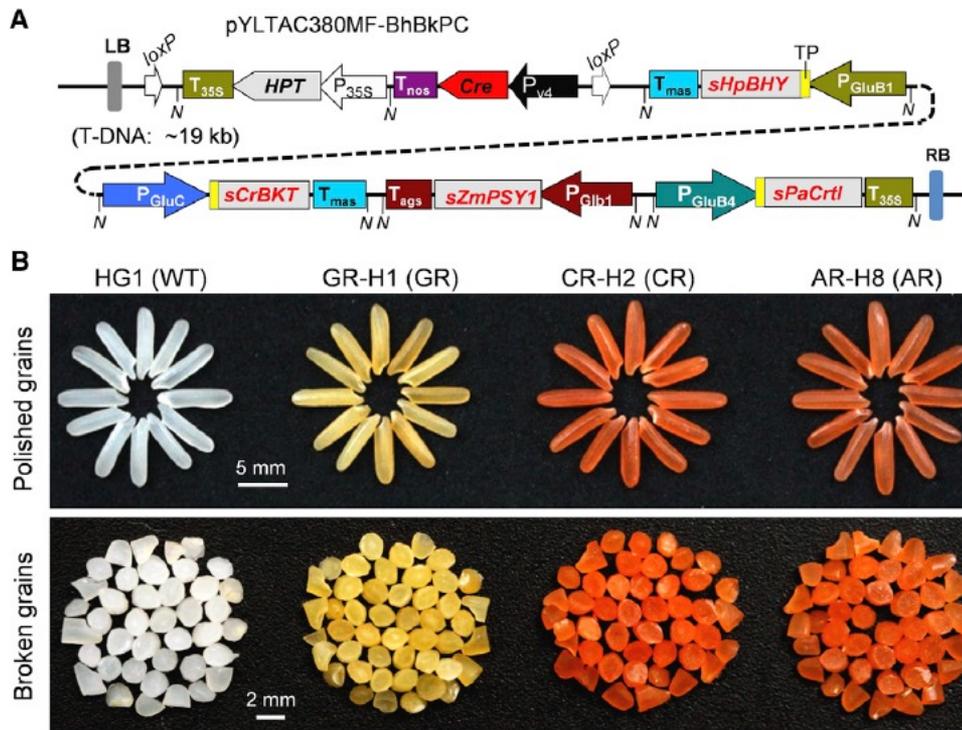
# Depois do Golden rice - aSTARice

GR = Golden rice

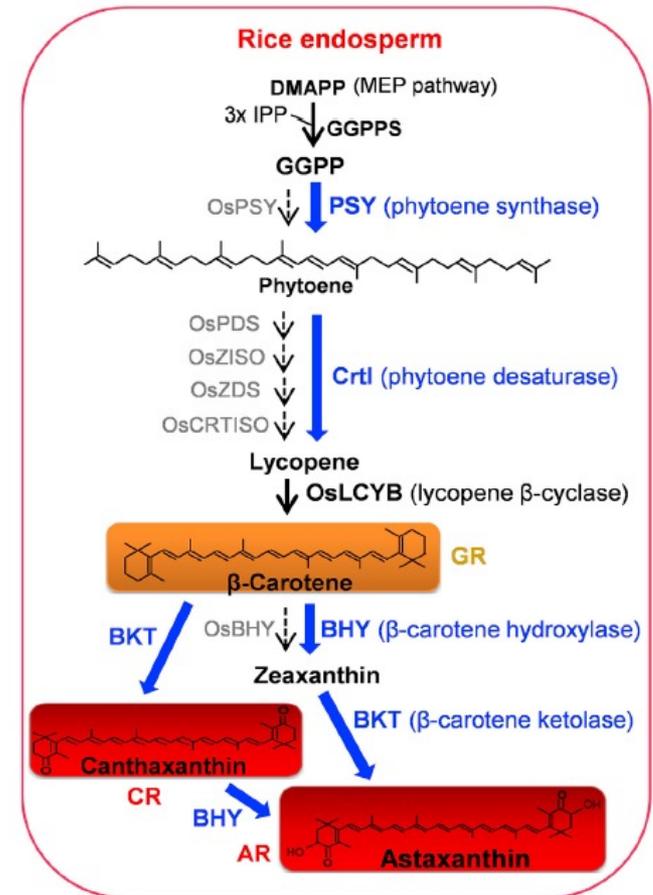
CR = Canthaxanthin rice

AR = Astaxanthin rice

Propriedades antioxidantes - produção de suplementos



Introdução de 4 genes



# Culturas resistentes

---

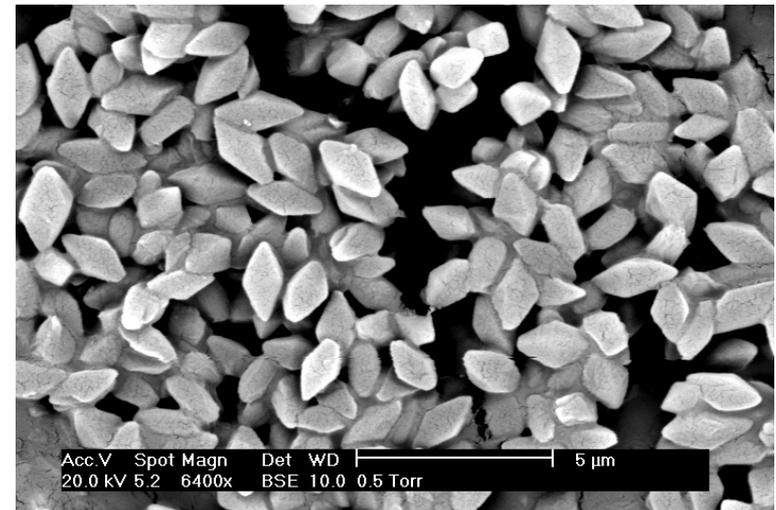


# Culturas resistentes a insetos

Variedades Bt - genes do *Bacillus thuringiensis*

**Proteínas Cry** – inseticida natural – cristal protéico que rompe intestine

Diferentes cepas são utilizadas – ação contra lepidópteros (lagartas), dípteros (moscas e mosquitos), coleópteros (besouros), larvas de mosquitos e certas espécies de nematóides.



Plant/crop	Gene introduced	Target insects
Cotton	<i>cryIA(a)</i>	Lepidoptera
	<i>cryIA(b)</i>	
	<i>cryIA(c)</i>	Homoptera
	<i>cryIIA</i>	
	<i>cryIEC</i>	
	Potato inhibitor	
Potato/sweet potato	<i>GNA</i>	
	<i>cry3Aa</i>	
	<i>cryIA(c)</i>	Coleoptera
	Cowpea trypsin inhibitor	Lepidoptera
	<i>GNA</i>	
	Soybean	<i>cryIA(b)</i>
<i>cryIA(c)</i>		
<i>cryIA(b)</i>		
<i>cryIA(c)</i>		
Rice	PinII	Lepidoptera
	<i>cry1C</i>	
	sbk+sck	
	<i>cry3Bb1</i>	
	<i>cry1Ab</i>	
	<i>cry1Ab</i> (MON810)	
Maize	<i>cry19c</i>	Lepidoptera
Canola	<i>cry1A(c)</i>	Lepidoptera
Chickpea	<i>cry1A(c)</i>	Lepidoptera
	<i>cry2Aa</i>	
	<i>cry1A(c) + cry1A(b)</i>	
Tomato	<i>cry1A(c)</i> <i>cry1A(b)</i>	Lepidoptera
Alfalfa	<i>cry3a</i>	Coleoptera

## Espécies resistentes – cry

### Tipos de pragas

Cry gene	Targeted insect pests (common names)	Insect order
<i>cryIA(a)</i>	Silk worm, tobacco horn worm, European corn borer	Lepidoptera
<i>cryIA(b)</i>	Tobacco horn worm, cotton boll worms, cabbage worm, mosquito	Lepidoptera and Diptera
<i>cryIA(c)</i>	Tobacco budworm, cabbage looper, cotton bollworm	Lepidoptera
<i>cryIA(e)</i>	Tobacco budworm	Lepidoptera
<i>cryIB</i>	Cabbage worm	Lepidoptera
<i>cryIC</i>	Cotton leaf worm, mosquito	Lepidoptera and Diptera
<i>cryIC(b)</i>	Beet army worm	Lepidoptera
<i>cryID</i>	Beet army worm, tobacco horn worm	Lepidoptera
<i>cryIE</i>	Cotton leaf worm	Lepidoptera
<i>cryIF</i>	European corn borer, beet army worm	Lepidoptera
<i>cryIG</i>	Greater wax moth	Lepidoptera
<i>cryIIA</i>	Gypsy moth, mosquito, cotton bollworm	Lepidoptera
<i>cryIIB</i>	Gypsy moth, cabbage looper, tobacco horn worm	Lepidoptera
<i>cryIIC</i>	Tobacco horn worm, gypsy moth	Lepidoptera
<i>cryIIIA</i>	Colorado potato beetle	Coleoptera
<i>cryIIIA(a)</i>	Colorado potato beetle	Coleoptera
<i>cryIIIB</i>	Colorado potato beetle	Coleoptera
<i>cryIIIC</i>	Spotted cucumber beetle	Coleoptera
<i>cryIVA</i>	Mosquito ( <i>Aedes</i> and <i>Culex</i> )	Diptera
<i>cryIVB</i>	Mosquito ( <i>Aedes</i> )	Diptera
<i>cryIVC</i>	Mosquito ( <i>Culex</i> )	Diptera
<i>cryIVD</i>	Mosquito ( <i>Aedes</i> and <i>Culex</i> )	Diptera
<i>cryV</i>	European corn borer, spotted cucumber beetle	Lepidoptera and Coleoptera



## Featured: The High Antioxidant Purple Tomato

The Big Purple Tomato is the result of listening to consumers' unmet needs and applying award winning science to develop beautiful tomatoes with enhanced nutrition and great flavor.

[LEARN MORE](#)



Although purple-skinned tomato varieties exist, they do not accumulate useful levels of these healthy compounds within the fruit flesh.



By carefully adding two genes from snapdragons that work like “on switches,” the purple tomatoes and juice become a rich source of antioxidants.



**Boca de leão**

This is because the purple pigments are made in the whole tomato, not just the skins.



**Snapdragon gene turns on purple**



### **Fresh Purple Tomatoes**

Our purple tomatoes produce high levels of anthocyanins, which are antioxidant compounds with widely-recognized health benefits.



### **Purple Tomato Juice**

Purple tomatoes are processed to make a tomato juice. A healthy and delicious start to the day!



### **Purple Tomato Seeds**

We are developing seeds of elite purple tomatoes bred for backyard gardens.

## Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors

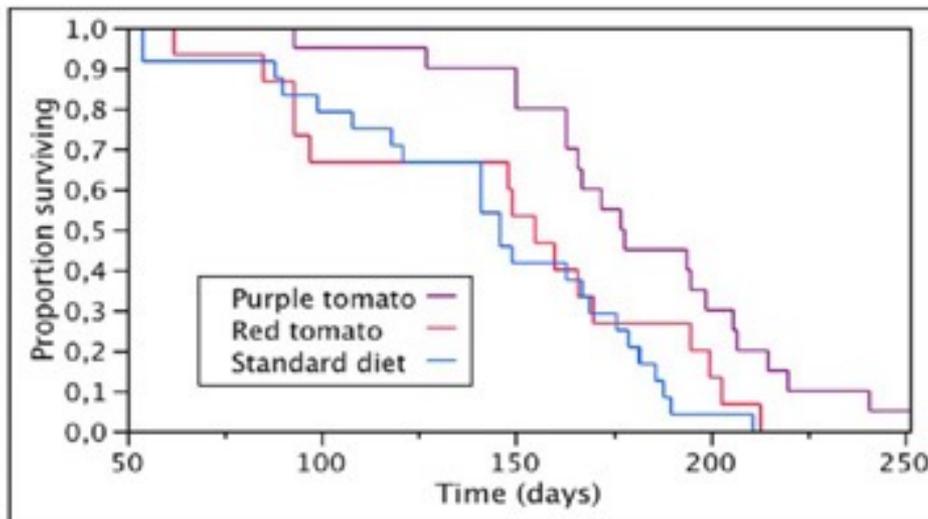
Eugenio Butelli<sup>1</sup>, Lucilla Titta<sup>2</sup>, Marco Giorgio<sup>2</sup>, Hans-Peter Mock<sup>3</sup>, Andrea Matros<sup>3</sup>, Silke Peterek<sup>3</sup>, Elio G W M Schijlen<sup>4</sup>, Robert D Hall<sup>5</sup>, Arnaud G Bovy<sup>4</sup>, Jie Luo<sup>1</sup> & Cathie Martin<sup>1</sup>

Figure 1. Survival of highly tumorigenic p53<sup>-/-</sup> mice fed a standard diet, a diet supplemented with 10% red (control) tomatoes and a diet supplemented with 10% purple (high anthocyanin 4 mg g FW) tomatoes (from Butelli et al. (2008) Nature Biotechnology, 26, 1301-1308)

# Biotecnologia na saúde humana

Propriedades do consumo de GABA  
(Ácido gama-aminobutírico ) via oral:

- Diminuição pressão arterial
- Calmante
- Moderador de humor

news

## GABA-enriched tomato is first CRISPR-edited food to enter market

Sanatech Seed's Sicilian Rouge CRISPR-edited 'health-promoting' tomatoes reach consumers and may open the market to more genome-edited fruit, vegetables and even fish.

Genome-edited food made with CRISPR-Cas9 technology is being sold on the open market for the first time. Since September, the 'Sicilian Rouge' tomatoes, which are genetically edited to contain high amounts of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA), have been sold direct to consumers in Japan by Tokyo-based Sanatech Seed. The company claims oral intake of GABA can help support lower blood pressure and promote relaxation.

In Japan, dietary supplements and foods enriched for GABA are popular among the public, says Hiroshi Ezura, chief technology officer at Sanatech and a plant molecular biologist at the University of Tsukuba. "GABA is a famous health-promoting compound in Japan. It's like vitamin C," he says. More than 400 GABA-enriched food and beverage products, such as chocolates, are already on the Japanese market, he says. "That's why we chose this as our first target for our genome editing technology," he says.

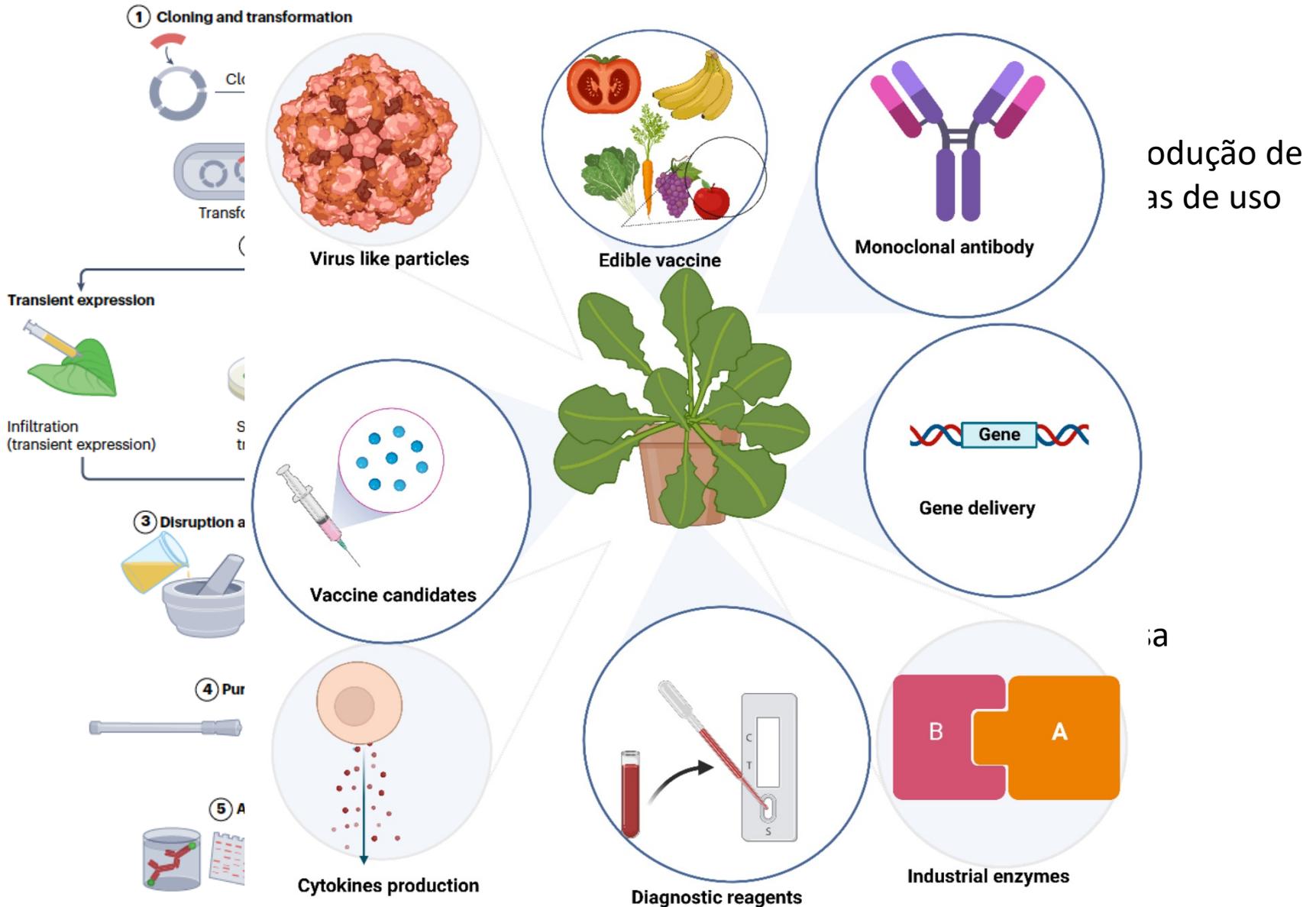
Sanatech, a startup from the University of Tsukuba, first tested the appetite of consumers in Japan for the genome-edited



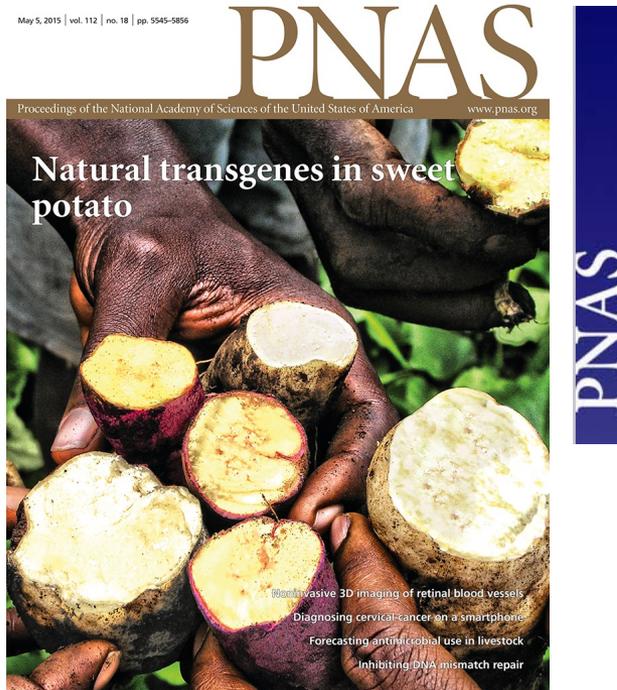
A CRISPR-edited tomato containing higher GABA than its unedited counterparts takes off in Japan. Credit: Aflo Co., Ltd. / Alamy Stock Photo



# Produção de proteínas recombinantes em plantas



# Batata doce – transgênico natural



## The genome of cultivated sweet potato contains *Agrobacterium* T-DNAs with expressed genes: An example of a naturally transgenic food crop

Tina Kyndt<sup>a,1</sup>, Dora Quispe<sup>a,b,1</sup>, Hong Zhai<sup>c</sup>, Robert Jarret<sup>d</sup>, Marc Ghislain<sup>b</sup>, Qingchang Liu<sup>c</sup>, Godelieve Gheysen<sup>a</sup>, and Jan F. Kreuze<sup>b,2</sup>

<sup>a</sup>Department of Molecular Biotechnology, Ghent University, 9000 Ghent, Belgium; <sup>b</sup>International Potato Center, Lima 12, Peru; <sup>c</sup>Beijing Key Laboratory of Crop Genetic Improvement/Laboratory of Crop Heterosis and Utilization, Ministry of Education, China Agricultural University, Beijing, China, 100193; and <sup>d</sup>Plant Genetic Resources Unit, US Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Griffin, GA 30223



Variedades naturais de batatas doce =  
índice variável de  $\beta$ -caroteno







# Transformação genética de bactérias

*Escherichia coli*: a porta de entrada para  
engenharia genética mais pesada!

## > *E. coli* = Modelo em biologia

- Fácil de crescer em laboratório
- Fácil de manipular geneticamente
- Ciclo de vida curto

> provavelmente o procarioto mais estudado

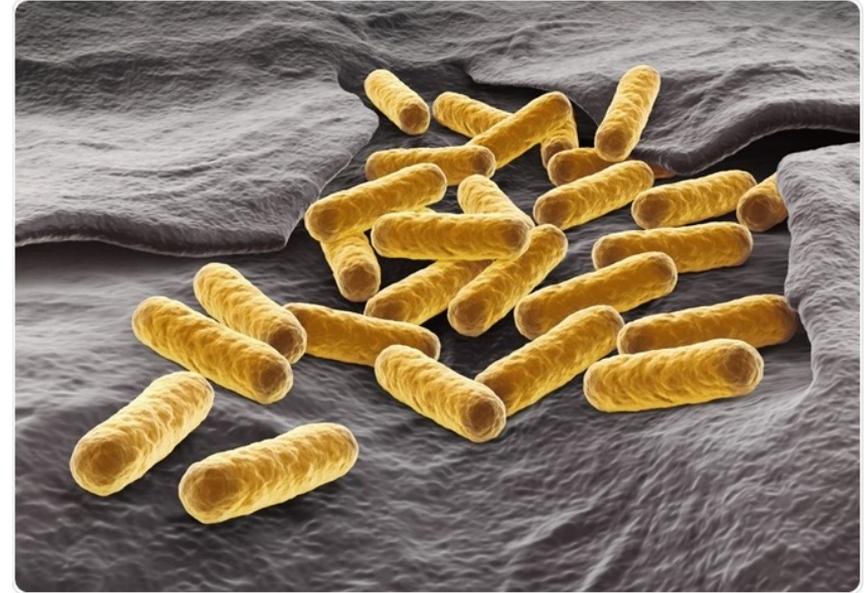
> Descoberta em 1885 pelo médico Theodor Eserchich, que isolou do intestino de uma criança.

> Em 1930, *E. coli* foi usada em estudos bioquímicos e fisiológicos por crescer rápido e facilmente e ter diversas capacidades metabólicas.

> Em 1946, Joshua Lederberg e Edward Tatum descobriram a conjugação bacteriana, a qual foi importante para estabelecer *E. coli* como um organismo modelo.

> Em 1952, Alfred Hershey e Martha Chase usaram *E. coli* para demonstrar que o DNA é o material genético de organismos vivos.

> 1953, Watson e Crick – dupla hélice do DNA



## > *E. coli* = Diversos usos

### - Armazenamento e replicação de plasmídeos – clonagem molecular

### - Engenharia Metabólica

Produção de proteínas e compostos químicos variados (uso médico e industrial)

Insulina, hormônios de crescimento, interferons, outras proteínas terapêuticas;

### - Engenharia Genética e Biologia Sintética

Usada como uma plataforma de teste inicial para circuitos genéticos sintéticos e para aumentar a complexidades destes sistemas – Biosensores, vias metabólicas, microorganismos “engenheirados”;

### - Ferramenta em Biologia Molecular

Para investigar a expressão e regulação gênica, função de estruturas protéicas, facilidade para amplificar produto da expressão gênica (plasmídeos);

### - Produção de enzimas e compostos bioquímicos

Produção de enzimas industriais, biocombustíveis, bioplásticos

Modificação para metabolizar substratos não-usuais ou sintetizar compostos raros

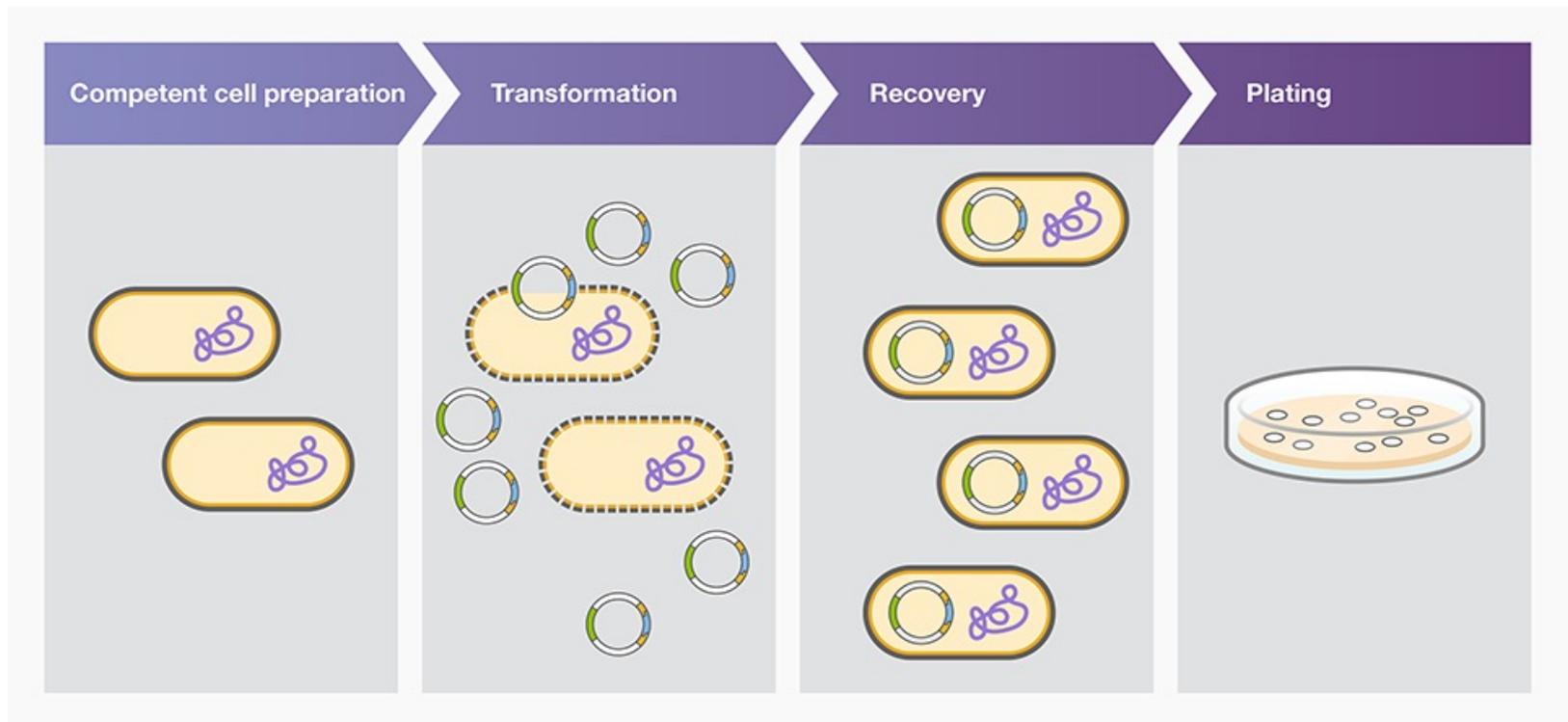
### - Aplicações ambientais

Para detecção e degradação de poluentes (hidrocarbonetos e metais pesados).

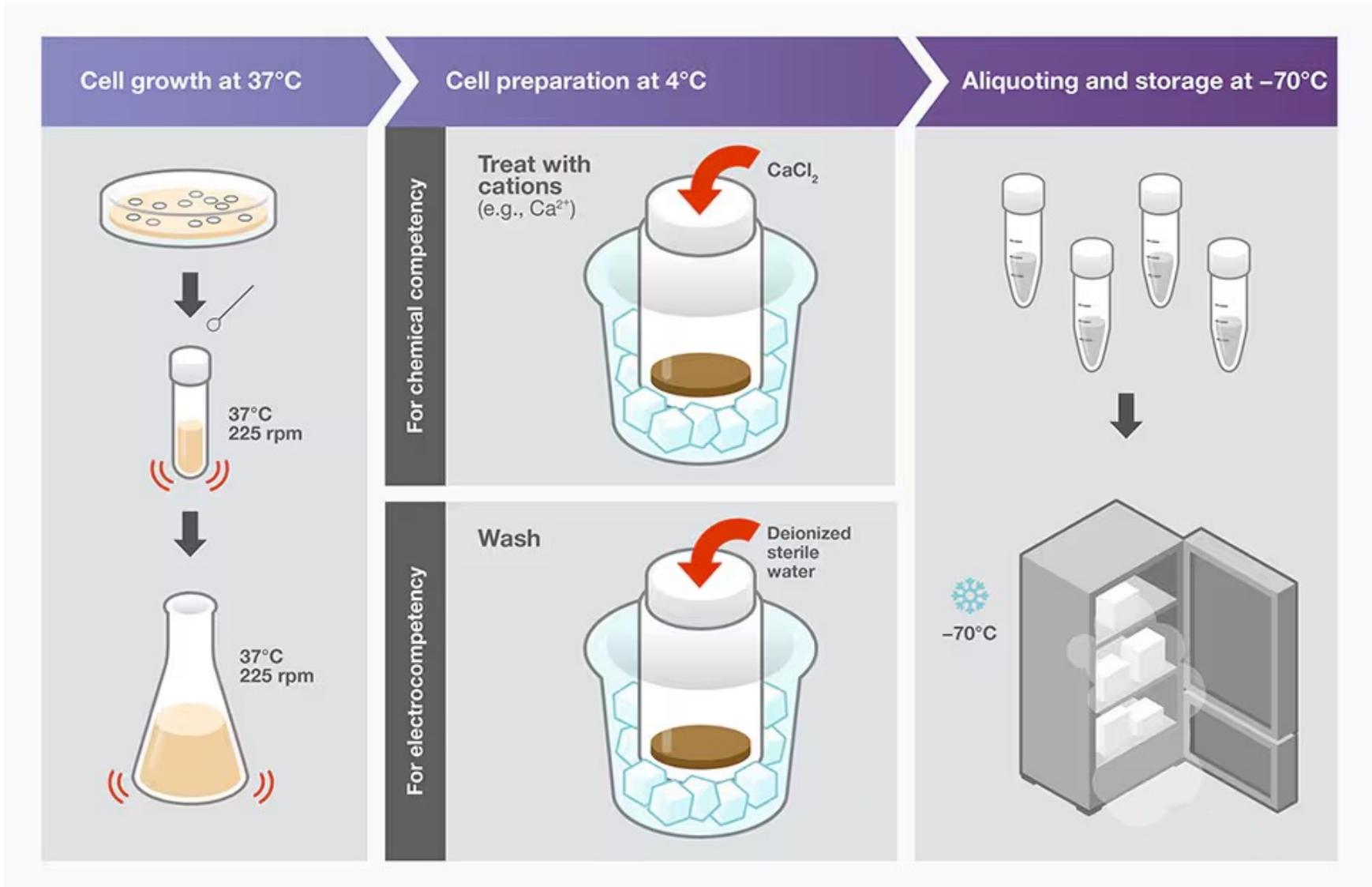
Biosensores para monitoramentos ambiental – Biologia Sintética

# Mas como transformar uma bactéria?

- Preparação de células competentes
- Plasmídeo de interesse
- Método de transformação (choque térmico ou eletroporação)
- Recuperação
- Plaqueamento - crescimento - marcador de seleção
- Seleção de bactérias transformadas

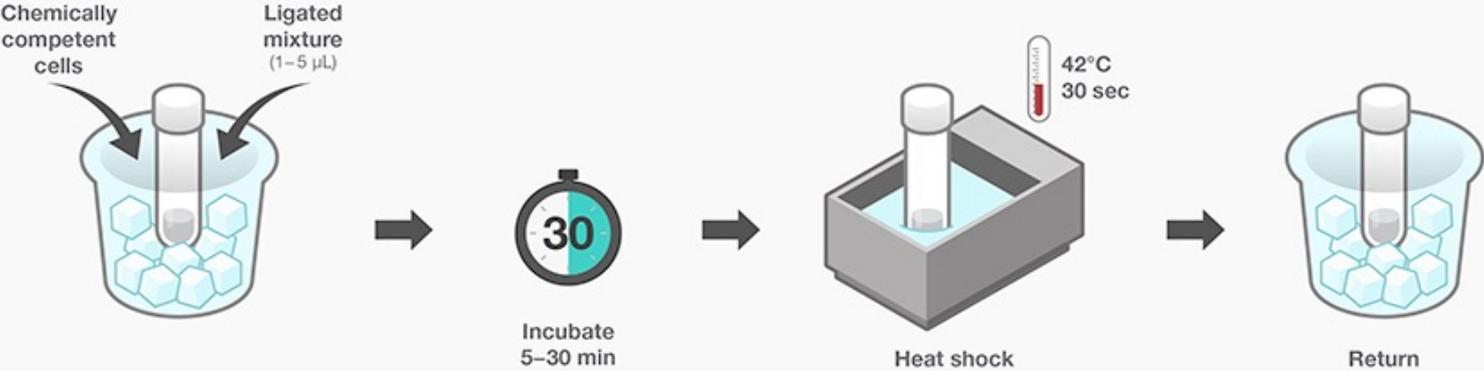


# Preparação de bactérias competentes

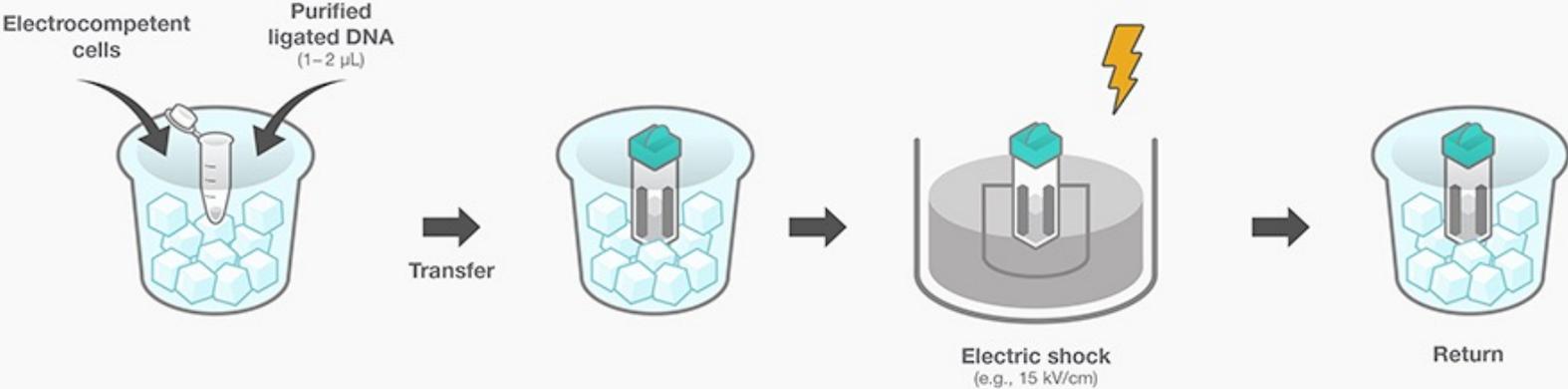


# Transformação

## A Chemical transformation

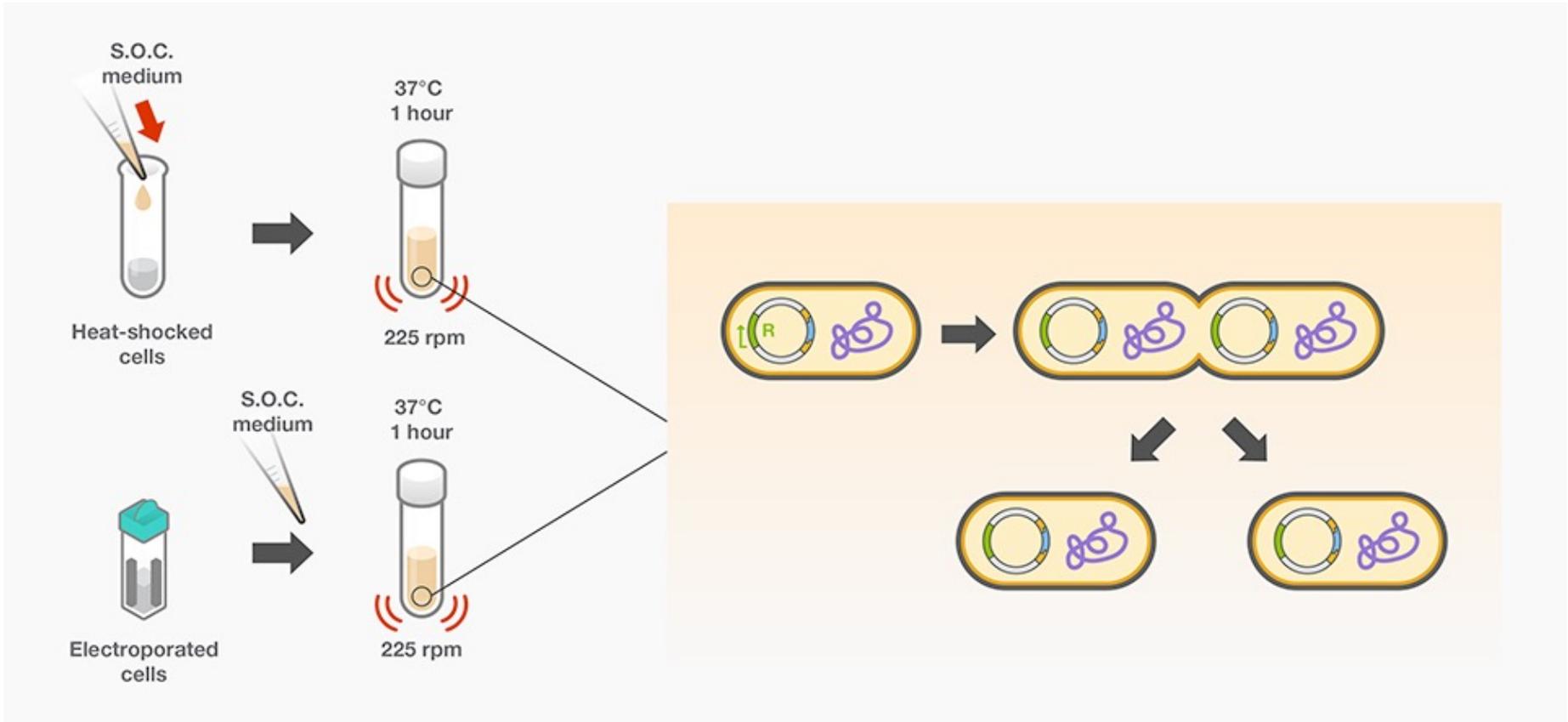


## B Electroporation



# Recuperação

- Crescimento em solução nutritiva e sem antibióticos para expressão dos genes de resistência a antibióticos



# Plaqueamento e seleção

- Crescimento em placas com os antibióticos para seleção

