

A galha coroa e a transformação de plantas

Agrobacterium tumefaciens

Tecidos da galha coroa sintetizam opinas (ácidos aminados pouco comuns)

Octopinas

Neopalininas

O plasmídeo Ti

Região virulenta

T-DNA

Borda direita e borda esquerda do T-DNA

Genes que permitem o metabolismo de opinas (noc)

Informação genética do T-DNA

Plasmídeos Neopalina Ti – 13 mRNAs

Plasmídeos Octopina Ti – 7 mRNAs

mRNA com o cap 5' e poliadenilados

Promotores de eucariontes

Genes responsáveis pela formação do calo codificam para enzimas chave na síntese de auxina e citocinina.

A célula da planta não controla a atividade dos genes bacterianos

Etapas do processo de infecção

1 - Ligação da Agrobacteria a célula da planta

- Ligação dependente de polissacarídeos sintetizados pela bactéria (succinoglicanos)

2 – Indução dos genes Vir

- O genes vir codificam para funções que preparam o T-DNA e o empacotam para o transporte
- Existem 6 operons vir (vir A, vir B, vir C, vir D, vir E e o vir G)
- **Vir A** codifica para um polipeptídeo hidrofóbico – receptor para compostos fenólicos
- **Vir A** ativa por fosforilação a proteína **vir G**
- **Vir G** é um ativador transcripcional que é responsável pela ativação de outros genes vir

3 – O T-DNA é processado

- Duas matrizes de leitura do vir D codificam para nucleases sítio específicas
- As proteínas vir D possuem sequências de direcionamento para o núcleo

4 – A fita T é transferida

O operon vir B possui 11 sequências abegas de leitura que estão envolvidas na passagem da fita T para a célula vegetal

O plasmídeo Ti e a engenharia genética de plantas

Cassete de expressão

- 1 - Promotor de eucariontes
- 2 - Sítio de clonagem
- 3 - Sequência de poliadenilação

Cassete de expressão CaMV 35S

Possui um acentuador transcripcional antes do TATA-box

Sequência poliadenilada do CaMV

Gene reporter - β -glucoronidase (gus) ou o chloranfenicol acetil transferase (cat)

Marcadores de seleção

Kanamicina (neomicina fosfotransferase)

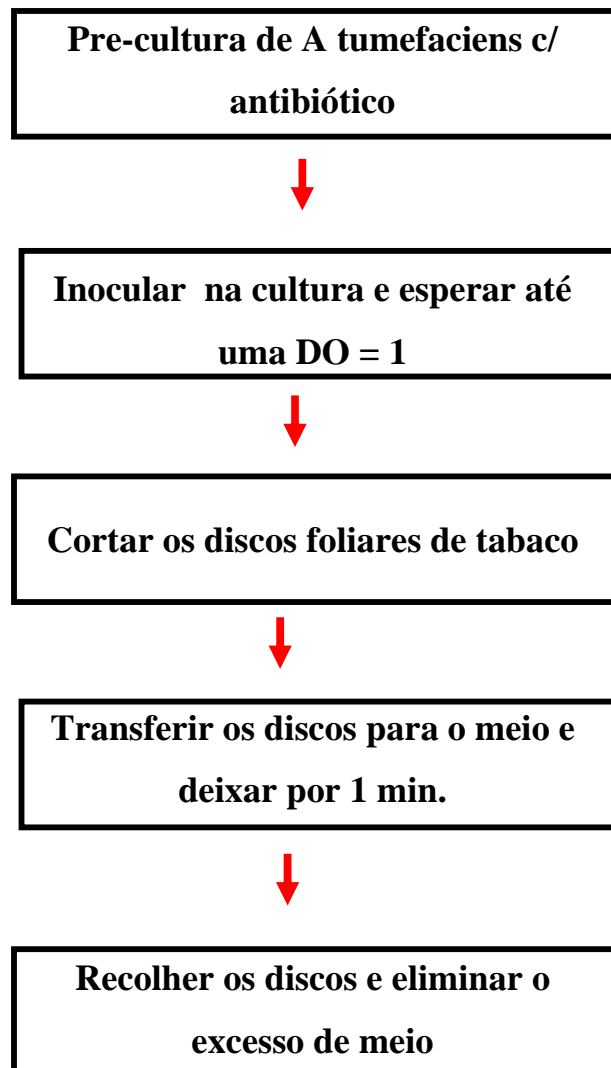
Higromicina (higromicina fosfotransferase)

Estromicina/Spectomicina (aminoglicosídeo- 3''- adeniltransferase)

Plasmídeo binário deve ter as seguintes características:

- 1 – Marcador para seleção de bactérias
- 2 – Marcador para seleção de células vegetais
- 3 – Um sítio de clonagem múltiplo
- 4 – A borda esquerda (LB) e a da direita (RB) do T-DNA do plasmídeo Ti

Transformação de discos foliares de fumo por *A tumefaciens*





Colocar os discos em meio de cultura de co-cultivo e deixar 2 d a 25° C



Transferir os discos para o meio de regeneração e seleção (BAP + Cefotaxime) e deixar por 2 d 25° C



Após 2 semanas cortar em 4 os discos e colocar em um novo meio



Após 3 semanas cortar os brotos e colocar em meio de seleção (Ex: + Kanamicina)



Selecionar apenas as plantas que desenvolverem raízes



Confirmar a transformação por PCR ou por Southern Blot