

Lecția 3. TRANSFORMAREA GENETICĂ A PLANTELOR (I)

Constructul genetic. Metode de transfer indirect



Conținut:

1. Elementele de bază ale unui insert genetic (construct genetic)
2. Gene de interes utilizate în transformarea genetică a plantelor
3. Metode de transfer a alogenelor la plante
4. Transformarea mediată de *Agrobacterium*, caracteristici generale
5. Elementele sistemului *Agrobacterium* ca vector de transfer
6. Vectorii virali

Rezumat

Izolare și clonarea fragmentelor de interes

I

↓
Prin digestie cu
restrictaze

ER I; II, III

(palindrom, situsuri,
trei tipuri de
extremități ADN: cos,
truncate)

↓
PCR

Program de amplificare

Tag-polimeraza, dNTP,
primeri
specifci/arbitrari, matriță

Real-time PCR, RAPD

↓
Revers-transcripție

ARN

Revers transcriptaza

Oligo (dT)

sinteza ADNc

PCR cu primeri specifici

II

Clonarea/multiplicarea fragmentelor de interes

Clonarea *in vitro* și *in vivo*

Vectori de clonare, ADN recombinat, ADNligaza, linker, bacterii, Bibliotecă de gene (genomică ADNc)

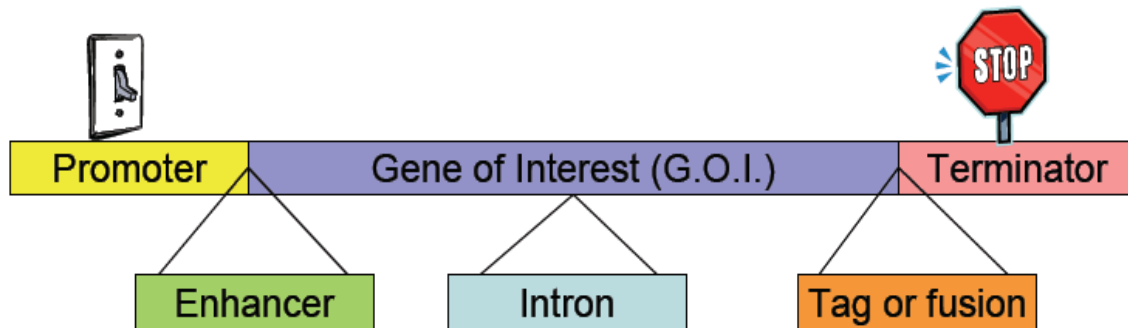
Un vector de clonare trebuie să corespundă...: polilinker, regiune *ori*, marker

1. ELEMENTELE DE BAZĂ ALE UNUI INSERT GENETIC (constructul genetic)

Pentru obținerea unui construct genetic sunt necesare:
fragmente de ADN „de interes” - utilizate în obținerea genelor **himere funcționale**. Secvențele hibride pot fi alcătuite din:

- **promotorul unei gene,**
- **regiunea codificatoare a altei gene**
- **secvența de terminare de la o a treia genă**

Este posibil ?



... Deoarece codul genetic este universal, secvențele codificatoare de origine procariotă sau de origine eucariotă, de ex. de la animale, pot fi ușor exprimate în plante.

Cunoașterea secvenței principalelor părți componente ale genei de interes – primul pas spre succesul transformării genetice

✓ **Promotorul** (5')- reglarea transcripției genei se poate realiza în mod:

- ❑ **constitutiv** asigurând exprimarea genei în toate țesuturile plantei,
- ❑ **tisular-specific** - expresia într-un anumit tip de țesut/organ, sau
- ❑ **expresia inductibilă** prin rănire, stres termic ori atacul unor patogeni

Gene cu expresie tisular-specifică și inductibile

Gena	Planta	Gazda transgenică	Factor inductibil și localizare	
			inductorul	organ/țesut,
RbcS	Mazăre	Tutun	Lumină	
RbcS	Mazăre	Tutun	–	Verde
RbcS	Mazăre	<i>Petunia</i>	–	Verde
Cab	Mazăre	Tutun	–	Verde
Cab	Grâu	Tutun	Lumină	–
ST-LS1	Cartof	Tutun	–	Verde
Patatina	Cartof	Cartof	–	Tubercul
Leghemoglobina	Soia	<i>Lotus</i>	–	Nodul
p-Fazeolina	Fasole	Tutun	–	Semințe
Lectina	Soia	Tutun	–	Semințe
Glutenine	Grâu	Tutun	–	Semințe
Hordeina	Orz	Tutun	–	Semințe
Zeina	Pormb	Tutun	–	Semințe
Hse	Soia	<i>Petunia</i>	Șoc termic	
Inhibitor de protează	Cartof	Tutun	Stres anaerobic	



Embryo-specific expression



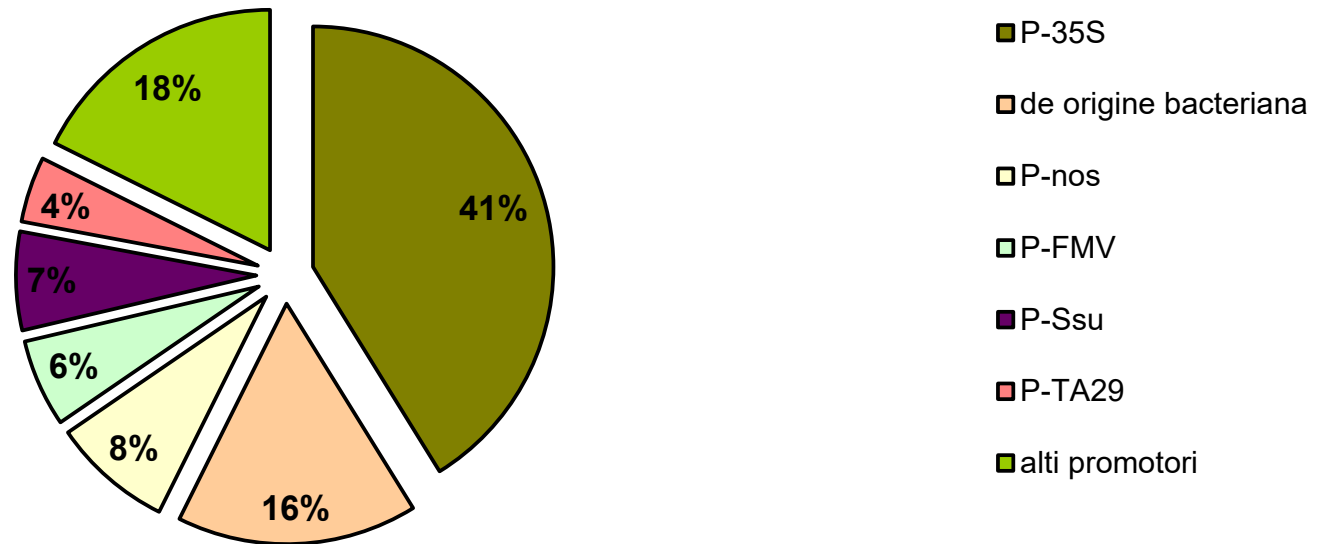
Endosperm-specific expression

Promotorii genelor himere provin:

□ **de la speciile aceluiași grup** – de ex. pentru monocotiledonate: de la alcool dehidrogenaza din porumb *Adh-1*, sau de la actina din orez *Act-1* care conține un intron în secvența-leader

□ **sau de la specii/organisme diferite** – de ex. promotorul 35S de la virusul fitopatogen *Cauliflower Mosaic Virus* (CaMV) - **promotor puternic și constitutiv, se întâlnește la majoritatea PMG**

****Promotorul 35S CaMV (P-35S), nu prezintă activitatea înaltă și la plantele monocotiledonate.**



Rezultatele analizei a 66 culturi transgenice

Exemple de promotori utilizați în obținerea PMG

Promotorul	Abreviere	Organismul donor	Gazda transgenică
Promotor derivat de la Cauliflower Mosaic Virus	P-35s	Cauliflower Mosaic Virus	porumb, bumbac, rapiță, papaia, cartof, tomate
Promotor ALS1 prezent în tutun	P-AIS	Nicotiana tabaccum	bumbac
Promotor derivat de la gena kinasei calciu-dependență (CDPK) expresată exclusiv în polen	P-PCDK	Zea mays	cereale
Promotorul genei cu expresie inductibilă determinat de etilenă	P-E8	Lycopersicon esculentum	tomate
Promotor derivat de la Figwort Mosaic Virus (FMV)	P-FMV	Figwort Mosaic Virus	tomate, bumbac, rapiță
Promotor RuBisCo SSU (ribuloso-1,5-bisfosfate carboxilaza subunitatea mică 1A) de la Helianthus annuus	P-HelSsu	Helianthus annuus	tutun
Regiunea promotor a genei mannopin sintaza a pTiA6	P-mas	Agrobacterium tumefaciens	tomate
Regiunea promotor a genei nopalina sintaza	P-nos	Agrobacterium tumefaciens	tomate
Promotorul fosfoenolpiruvat carboxilasei (PEPC) specifică țesuturilor verzi	P-PEPC	Zea mays	cereale
Promotorul ribulosei-1,5-bisfosfat carboxilaza subunitatea mică 1A	P-SsuAra	Arabidopsis thaliana	cicoare, rapiță, cartof
Regiunea promotor a genei anter-specifică TA29	P-TA29	Nicotiana tabaccum	cicoare, cereale, rapiță

- ✓ **Secvența codificatoare** cu codonul ATG, pentru inițierea translației,
- ✓ **Terminatorul** – o secvență de nucleotide inversate, plasată la sfârșitul unității transcripționale.

Cea mai răspândită secvență terminator este NOS (T-nos), izolată de la gena *nopalinsintasa* (*Agrobacterium Tumefaciens*)

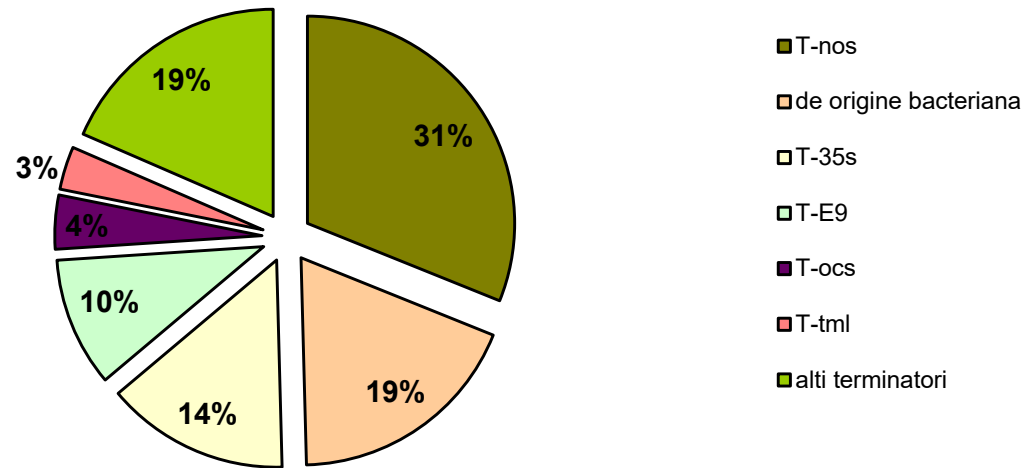
Secvențe-terminator utilizate în transgeneză

Secvența-terminator	Abreviere	Organismul donor	Organismul receptor
Regiunea 3' non-translabilă a genei ribulozo-1,5-bisfosfat carboxilaza subunitatea mică E9	T-E9	<i>Pisum sativum</i>	bumbac, rapiță, cartof, tomate
Regiunea de poliadenilare a genei mannopin sintaza pTiA6	T-mas	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	tomate
Regiunea 3' non-translabilă a genei nopalinsintaza	T-nos	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	cicoare, cereale, bumbac, rapiță, cartof, soia, tutun,
Secvența terminator a genei octopin sintaza	T-ocs	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	cicoare, rapiță, tomate
Regiunea 3' non-translabilă a genei ribulozo-1,5-bisfosfat carboxilaza subunitatea mică	T-SSU	<i>Glycine max</i>	soia
Regiunea de poliadenilare a genei pTiA6	T-tml	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	bumbac, rapiță, tomate
regiunea 3' a genei transcriptului ADN 7	T-Tr7	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	cicoare, cereale, rapiță

Secvențele terminator utilizate cel mai des în transgeneză

(<http://www.bats.ch/bats/en/index.php>)

Numărul de varietăți exprimat în % care conțin inserți genetici cu anumite secvențe terminator

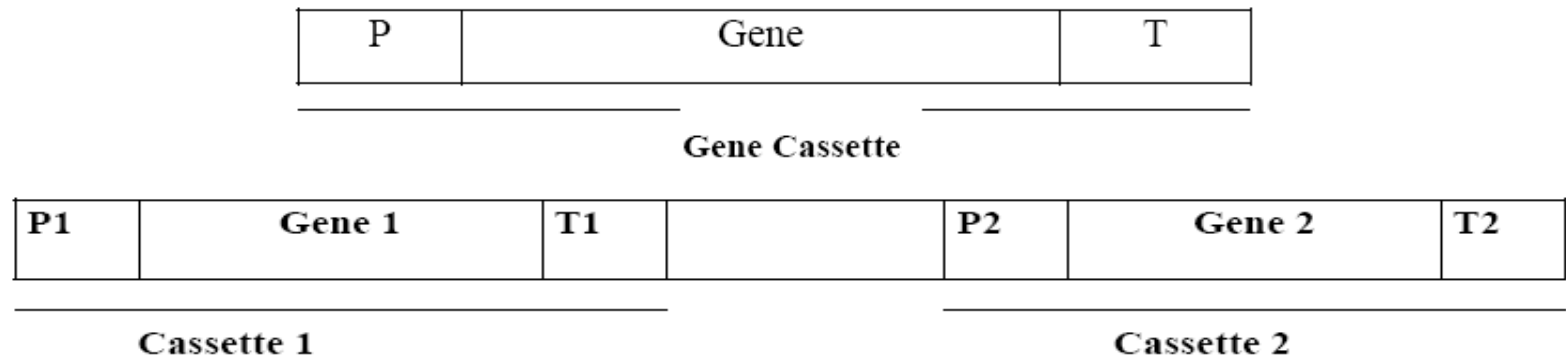


Alte elemente de reglare utilizate în obținerea constructului genetic

Optional în inserții genetici pot fi prezente secvențele:

- **„de destinație”** - provin de la gene codificatoare de proteine cu localizare celulară bine cunoscută. *De ex., secvența peptidei-tranzit pentru destinația cloroplast provine de la gena subunității mici a enzimei Rubisco.*
- **enhanseri**-amplificarea nivelului de expresie a genei
- **introni** – secvențe utilizate pentru a evita o posibilă activitate de transcriere a unor gene bacteriene din construct și a facilita expresia alogenelor în celule vegetale

Prezentare schematică a insertului genetic (construct genetic)

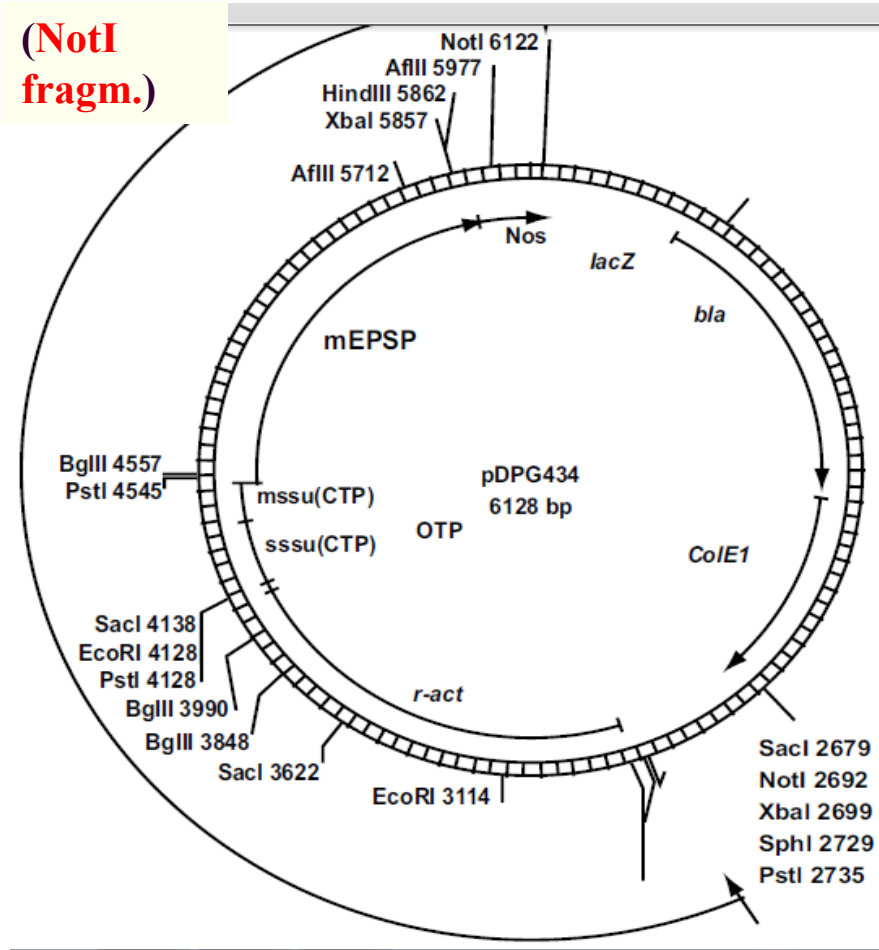


- ! Combinația “**promotor-genă-terminator**” reprezintă o **casetă a genei “de interes”**.
- !**Constructul genetic** – două/mai multe casete a alogenei și suplimentar alte elemente cu rol de control/facilitare a activității genelor străine.
- !**Cunoașterea** elementelor insertului genetic **este esențială** în detecția, identificarea și cuantificarea materialului transformat genetic.

De exemplu, porumbul MG GA21, Roundup Ready (prezintă toleranță la glifosat – ingredientul activ al erbicidului Roundup Ready) a fost obținută în urma transferului unui fragment de restricție NotI cu lungimea de 3,4 kilobaze de la plasmidul pDPG434 prin metoda biolistică.

Harta plasmidului pDPG434

(NotI fragm.)



Fragmentul de restricție NotI (Vectorul plasmidic pDPG434) utilizat pentru transformarea liniei de porumb GA21 Roundup Ready conține o casetă de expresie cu gena EPSPS modificată care include:

- **promotorul r-act** - (1,37kb) și intronul de la gena actinei de la orez;
- **gena - 5-enolpiruvil și kimat-3-fosfat sintaza de la Zea mays - mEPSPS** (1,34 kb) fuzionată cu o secvență N terminală a peptidei tranzit în cloroplast derivată de la genele RuBisCo de la *Helianthus annuus* și *Zea mays* pentru a direcționa proteina mEPSPS spre cloroplast, unde are loc sinteza acizilor aromatici;
- **secvența N-terminală a peptidei tranzit în cloroplast (CTP)** derivată de la secvențele CTP de la *Helianthus annuus* și genele RuBisCo (sssu CTP and mssu CTP) de la *Zea mays* – OTP (0,37 kb);
- **NOS 3'** secvența de terminare provenită de la plasmida Ti din *Agrobacterium*

Alte secvențe conținute în vector:

- gena-marker selectabilă *bla* (codifică rezistența la ampicilină în bacterii și permite selecția bacteriilor care conțin plasmide),
- o origine a replicării (*ori*) necesară pentru replicarea plasmidei în *E. Coli*
- o secvență parțială *lacZ*,

Harta fragmentului de restricție NotI a constructului pDPG434 (Compania Monsanto, US-Patent-Nº: 6,040,497, <http://www.bats.ch/bats/en/index.php>)

2. GENE DE INTERES UTILIZATE ÎN TRANSFORMAREA GENETICĂ A PLANTELOR

Principii generale de identificare a genelor de interes

!! Există gene ai căror produși de expresie – **ARNm** sau **proteine** – sunt cunoscuți și **foarte multe gene** despre care se cunoaște doar modul de transmitere și fenotipul.

Pentru ambele categorii de gene cu funcție cunoscută și necunoscută se aplică o variantă a tehnicii de hibridare *in situ* – **hibridarea coloniilor**.

Acestă metodă permite detecția oricărei gene, pentru care există o sondă de ADN sau ARN marcată radioactiv sau chimic.

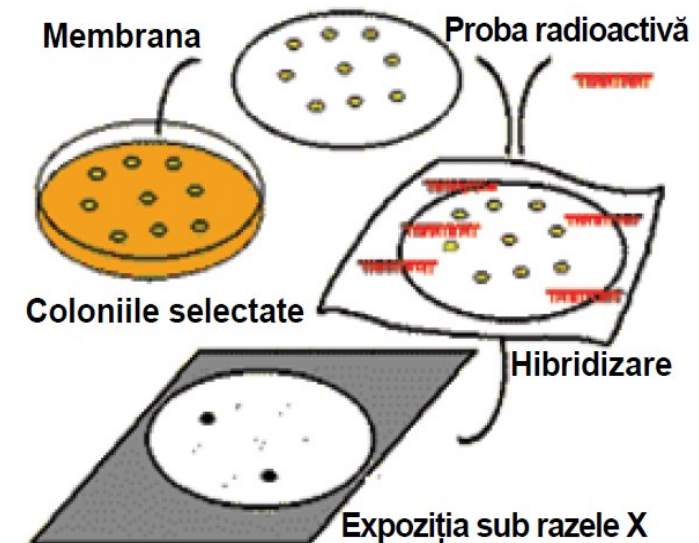
Principiile tehnicii hibridării *in situ*

1. Coloniile bacteriene sunt transferate de pe mediul solid pe un filtru de nitroceluloză, printr-o ușoară apăsare pe suprafața culturii.

O parte din colonii vor rămâne pe mediile de cultivare și constituie placa de referință (control).

2. Coloniile transferate pe membrană (numite replici) după o prealabilă denaturare a ADN-ului sunt incubate cu sonda de hibridizare.

3. După procedurile de înlăturare a „surplusului de sondă”, pozițiile în care sonda a hibridizat sunt identificate prin autoradiografie/al mod de înregistrare.



Izolarea genelor prin tehnica hibridării *in situ*

Obținerea sondei utilizate în hibridizarea *in situ*

!!! Principiul de obținere a sondei de ADN sau ARN marcat, pentru selecția clonelor cu secvențe nucleotidice omologe, depinde de informațiile disponibile cu referire la gena de interes.

De exemplu, **daca în calitate de referință se ia în considerare o proteina *de interes*** (în baza informației la alte organisme), atunci:

1- proteina potențială/candidată este izolată, purificată și identificată secvența de aa (cel puțin 30 aminoacizi).

2- *in silico* (soft-uri de translație), pe baza codului genetic, se deduce secvența nucleotidelor.

3- se sintetizează artificial secvența de oligonucleotide, se marchează radioactiv sau chimic, 4- cu această sondă se *sondează* bibliotecile genomice transferate (replike).

Verificarea ipotezei că proteina nou sintetizată este cea de interes:

Pentru confirmarea faptului că celulele transformate genetic vor sintetiza proteina codificată de gena clonată se apelează la **vectori de expresie** în care se inserează ADNc, adiacent unui promotor, pentru a asigura sinteza proteinei date, în cantitate mare, în bacterii. Astfel se crează așa numite „**bănci de expresie**”.

Identificarea proteinei în „băncile de expresie” se face cu **anticorpi** obținuți pentru proteina respectivă. Poziția anticorpului legat de proteină pe filtru este evidențiată după incubarea cu un al doilea anticorp marcat.

Proteina sintetizată este astfel din nou caracterizată, confirmându-se faptul că a fost clonată gena „de interes”.

Principiul ARN antisens - identificarea funcției genelor

!!! Pentru foarte multe gene, **proteina codificată nu este cunoscută, sau nu poate fi purificată** în cantități suficiente pentru a determina secvența aminoacizilor, sau obținerea anticorpilor specifici.

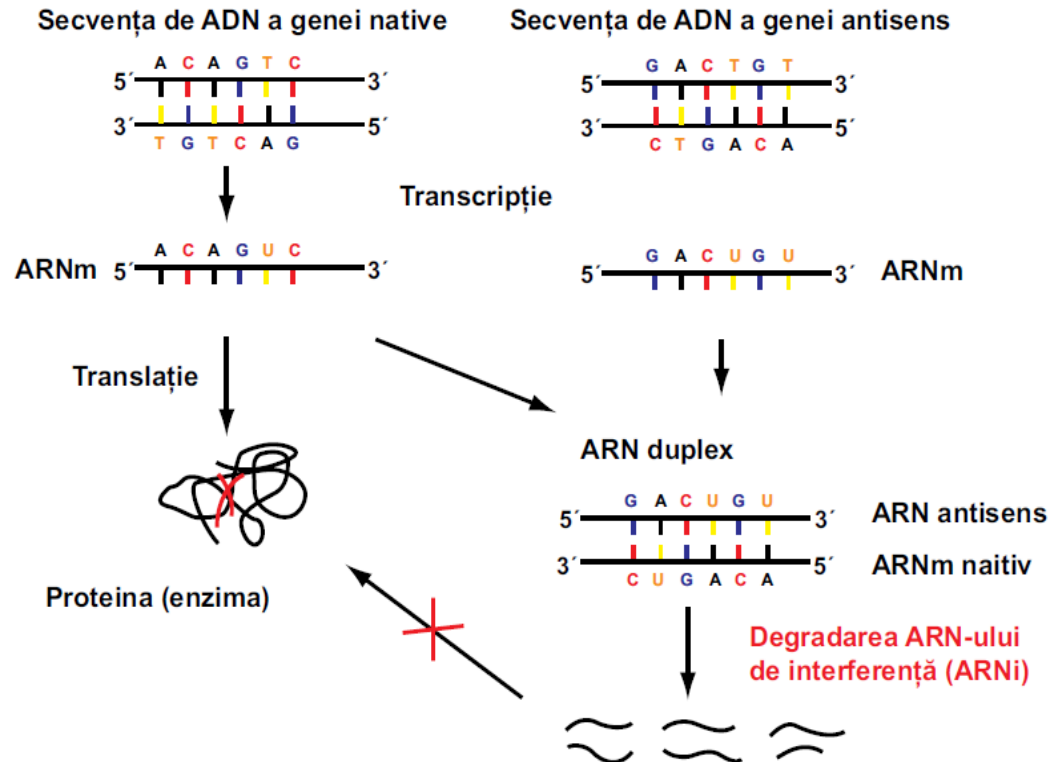
În acest caz pentru **elucidarea funcției unei gene** este utilă **strategia ARN antisens**.

Construcțiile genetice antisens se realizează prin clonarea unui ADNc provenit de la o gena candidat sub controlul unui promotor puternic și orientat astfel, încât, transcrierea în ARN se va realiza de pe catena opusă (antisens) celei de pe care are loc transcripția ARNm în mod natural.

În rezultatul interacțiunii **ARNm-endogen cu ARN antisens** codificat de transgenă se formează un duplex (bicatenar), care este degradat rapid de către nucleazele endogene și, ca urmare, se blochează sau se reduce sinteza proteinei respective.

Prin strategia antisens se creează mutații specifice.

Acest mecanism de represie a fost descoperit pentru prima dată la bacterii.



Inhibarea expresiei unor gene „de interes” prin strategia ARN antisens

ARN antisens – transcripți de mici dimensiuni, difuzibili, fără capacitate de codificare, se atașează de o regiune complementară specifică a unui ARN-țintă, acționează ca un represor al funcției normale și ca un inhibitor de înaltă specificitate al expresiei genei.

Plantele transgenice obținute cu construcție antisens sunt folosite pentru a identifica funcțiile mai multor gene.

https://www.youtube.com/watch?v=cK-OGB1_ELE

<https://www.youtube.com/watch?v=UuicPthdT70>

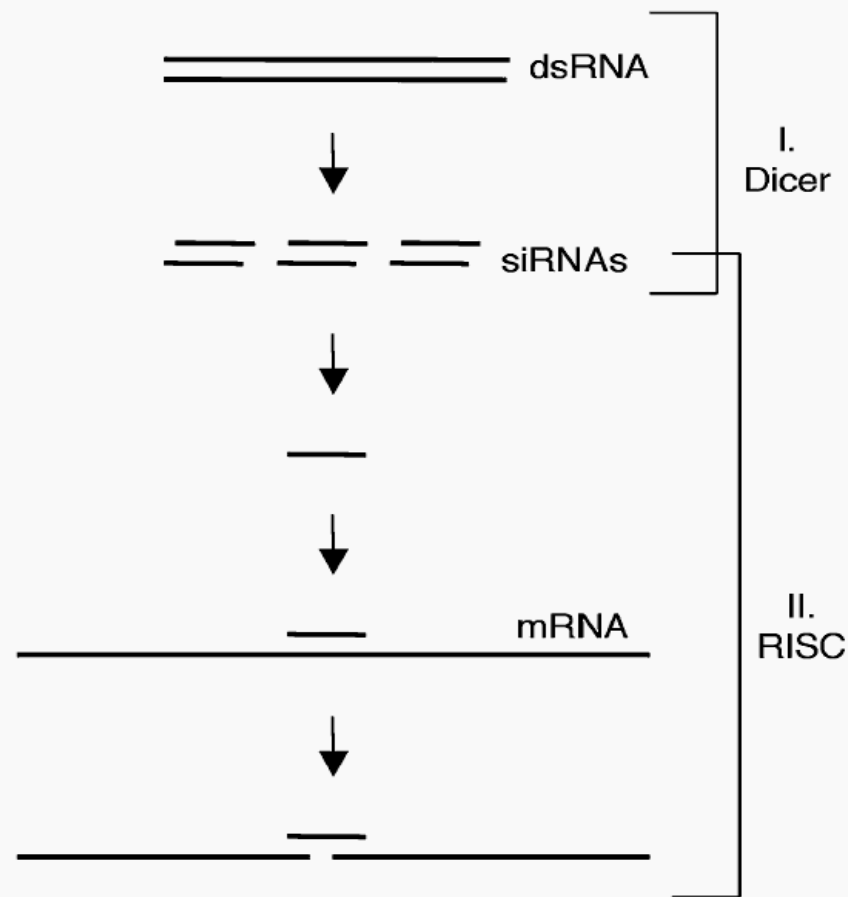


Figure 2 Two-step model to explain RNAi. In the first step, dsRNA is diced by an ATP-dependent ribonuclease (later found to be Dicer) into short interfering RNAs (siRNAs): duplexes of 21–23 nucleotides bearing two-nucleotide 3' overhanging ends. These siRNAs are subsequently transferred to a second enzyme complex, designated RISC for RNAi-induced silencing complex, which contains an endoribonuclease that is distinct from Dicer. The siRNA guides the endonuclease—the antisense strand of the siRNA is perfectly complementary to the target mRNA—to the target mRNA leading to its destruction. The position of the cleavage site in the target is within the sequences covered by the siRNA (near the center) and is determined by the 5' end of the guiding molecules (34, 35).

În transgeneză se recurge foarte des la această strategie pentru a modula expresia unor gene de interes agricol.

Exemplu:

Scopul transgenezei- modificarea expresiei genelor implicate în întârzierea coacerii fructului de tomate:

□ **inhibarea activității poligalacturonazei(PG)** - enzima, care determină degradarea peretelui celular în fructele coapte,

Rezultat – au fost obținute plante ale căror fructe au prezentat caracteristici ce permit o durată mai îndelungată de păstrare, precum și rezistență la o serie de patogenii care atacă după recoltare.

□ **inhibarea activității ACC (acid-aminociclopropan-1-carboxilic) oxidazei** - biosinteza etilenei în plante are loc prin conversia S-adenosil metioninei în acid-aminociclopropan-1-carboxilic (ACC), catalizată de ACC-sintetază și transformarea ACC în etilenă de către ACC-oxidază.

Rezultat

Fructele care conțin ACC-oxidază antisens au un fenotip al coacerii modificat. Acumularea licopenului, cu rol în înroșirea fructului copt, a fost redusă. Au fost reduse și fenomenele de zbârcire asociate cu supracoacerea. **!!! Valoarea comercială este determinată de posibilități mai bune de transportare la distanțe mari.**

Cai de identificare a genelor de interes (rezumat)



□ Clonarea genelor care prezintă omologie de secvență - *există informație privind structura și funcția genei unei specii plante. O genă similară este clonată și transferată altei specii de plante.*

□ Clonarea genelor bazată pe diferențe în expresie- *se identifică genele care sunt expresate ca răspuns la anumiți stimuli/factori interni sau externi. Se analizează și se selectează gena-care îndeplinește un rol cheie în reacția de răspuns.*

□ Clonarea genelor bazată pe poziția lor în genom- *se utilizează un marker molecular care co-segregă cu caracterul de interes și astfel se poate izola o regiune care conține mai multe gene. Se analizează și se selectează gena responsabilă de caracterul dat*

Gene „de interes” (exemple)

Rezistență față de insecte

Rezistență plantelor față de insecte este un obiectiv prioritar al biotehnologiilor agricole - sun minimalizate pierderile de recoltă cauzate de insecte și de costul insecticidelor chimice folosite în agricultură.

Soluții - ameliorarea rezistenței genetice la insecte prin introducerea/transfelul unor gene codificatoare de proteine insecticide de origine vegetală, animală sau din microorganisme în genomul plantelor.

Genele din plasmidele bacteriei *Bacillus thuringiensis*, gene *Bt* codifică proteine (*cry*-crystal).

Au fost identificate peste 1000 de toxine diferite.

Toxinele Bt sunt specifice și acționează în doze mici.

Primele plante cu rezistență mediată de proteinele Bt - tutunul și tomatele MG obținute în 1986 și 1987.

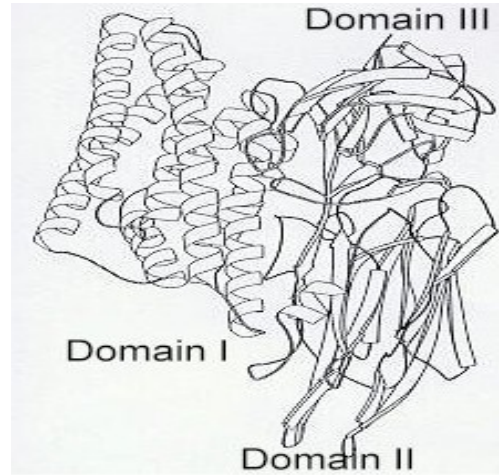
!!!Vertebratele, printre care și omul, nu posedă receptori pentru proteinele Bt.

Gene „de interes”	Sursa de gene
Cry1Ab	<i>Bacillus th. (Btk)</i>
Cry1Ac	<i>Bacillus th (Btk)</i>
cry1F	<i>Bacillus th. var. aizawai</i>
cry2Ab	<i>Bacillus th</i>
cry34Ab1	<i>Bacillus th. PS149B1</i>
cry35Ab1	<i>Bacillus th. PS149B1</i>
cry3A	<i>Bacillus th Tenebrionis</i>
cry3Bb1	<i>Bacillus th. kumamotoensis</i>
cry9c	<i>Bacillus th. Tolworthi</i>
VIP3A	<i>Bacillus th.. AB88</i>

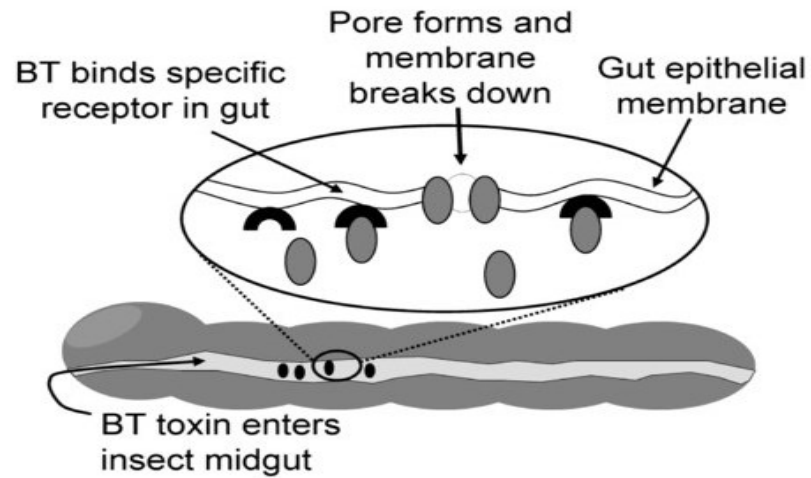
Bt cotton



Bt Cry structure



Stewart, 2004. Genetically Modified Planet 2004



Gene ce codifică proteine insecticide de origine vegetală

Lectinele (implicate în fenomene de recunoaștere celulară), **inhibitorii amilazei și inhibitorii proteazelor** (prezente în semințele leguminoaselor și cerealelor) - ingerate de insecte în doze mari inhibă creșterea și dezvoltarea lor, însă se obține o rată/procent al mortalității insectelor patogeni mai redusă comparativ cu proteinele Bt.

Primele PMG care sintetizau un inhibitor al proteazelor cu serină au fost obținute în 1987.

Tuberculii de cartof conțin anumite glicoproteide numite *palatine* cu o dimensiune de 40 Kda (constituie cca 40% din totalul proteinelor de rezervă). Acești compuși sunt utilizați ca substanțe de protecție contra insectelor și a unor microorganisme.

Transferul genelor ce codifică aceste proteine la tutun și tomate au determinat creșterea capacității de rezistență la atacul larvelor de *Manduca sexta* (omida cu corn).

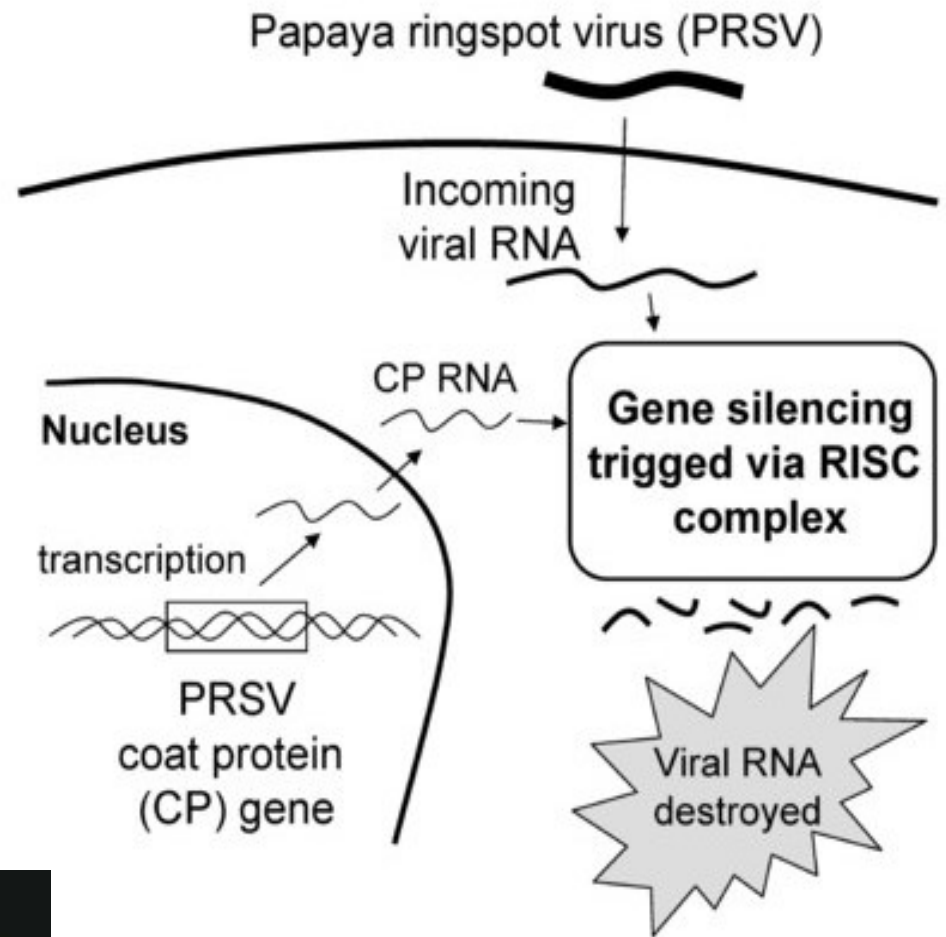
Există peste 50 de toxine diferite pentru larvele de Lepidoptere.

Combaterea dăunătorilor și sporirea rezistenței la boli

Scop:
ameliorarea rezistenței la virusuri se obține prin transformarea genetică a plantelor cu gene responsabile de sinteza proteinelor de înveliș al unui virus. Astfel planta care produce aceste proteine prezintă imunitate/rezistență contra virusului respectiv.

Gene „de interes”	Sursa de gene
Helicază	Virusul răsucirii frunzelor la cartof orf 2 (<i>Potato leafroll luteovirus (PLRV) orf 2</i>)
Replicază (RNA dependent RNA polymeraza)	Virusul răsucirii frunzelor la cartof orf 1 (<i>Potato leafroll luteovirus (PLRV) orf 1</i>)
Proteine de înveliș virale	Virusul mozaicului la castraveți (<i>Cucumber mosaic cucumovirus</i>)
Proteine de înveliș virale	Virusul petelor inelare la papaia (<i>Papaya ringspot potyvirus (PRSV)</i>)
Proteine de înveliș virale	Virusul Y la cartof (<i>Potato potyvirus Y (PVY)</i>)
Proteine de înveliș virale	Virusul mozaicului la pepenele verde (<i>Watermelon mosaic potyvirus 2</i>)
Proteine de înveliș virale	Virusul mozaicului galben la dovlecei (<i>Zucchini yellow mosaic potyvirus</i>)

Prin transferul acestor tip de gene s-a reușit combaterea virusului nervurilor galbene la sfeclă și a virusului mozaicului tutunului.



Combaterea bacteriilor și a ciupercilor fitopatogene

Plantele sintetizează proteine capabile să inhibe creșterea fungilor *in vitro*.

Exemple de proteine antifungice - chitinazele și β -1,3-glucoanazele, reprezintă enzime implicate în hidroliza chitinei și β -1,3-glucoanului din pereții celulelor fungale și astfel are loc inhibarea creșterea fungilor.

Tot la plante s-a descoperit o familie de peptide mici antifungice, numite **defensine**. Unele dintre aceste tipuri de peptide, izolate din semințele mai multor specii (*Raphanus sativus*, *Amaranthus caudatus*, *Mirabilis jatapa*, *Urtica dioica*, *Triticum* și *Hordeum*) manifestă *in vitro* o activitate antifungică față de un spectru larg de patogeni.

Plantele transgenice de cartof care exprimă o genă de origine fungică pentru glucozo - oxidază ce generează H_2O_2 , prezintă niveluri crescute ale rezistenței față de unii patogeni fungici și bacterieni: *Erwinia carotovora*, *Verticillium*, *Phytophthora infestans*.

Rezistență la Erbicide

Combatere a buruienilor din culturi se axează pe două principii:

- ❑ creșterea dozelor de erbicide în scopul eradicării sigure a buruienilor
- ❑ sporirea **potențialului de rezistență a plantelor cultivate** față de erbicidul administrat.

Prin ingineria genetică se extind culturile agricole pentru care pot fi folosite **erbicide sistemice** (cu efecte minime asupra mediului și costuri de producție reduse) și **flexibilizarea aplicării** tratamentelor (lipsa unor condiționalități determinate de sensibilitatea speciilor cultivate).

În acest scop se recurge la următoarele strategii în obținerea PMG:

- ❑ creșterea nivelului de sinteză a enzimei endogene de bază implicată în degradarea **principiului** activ al unui anumit erbicid;
- ❑ expresia unei transgene derivate de la bacterii, sau plante a cărui **produs de expresie nu este afectat de compusul activ al erbicidului** care se utilizează, și astfel determină insensibilitate/rezistență;
- ❑ Introducerea/transferul în plantele de cultură a **unui sistem de degradare a erbicidului**.

Strategii de dezvoltare a rezistenței la erbicide

- ❑ **Erbicidele șikimice** (glifosatul, Roundup) sunt sistemice - au ca țintă inactivarea unei enzime din calea metabolică de sinteză a aminoacizilor aromatici esențiali – **enzima 5-enolpiruvil șikimat-3-fosfat sintază (EPSPS)** care are loc în cloroplaste. În consecință, blocarea sintezei **triptofanului** care este un precursor în sinteza **acidului indolilacetic** conduce la carențe accentuate în auxine naturale și la încetarea creșterii plantelor.

Soluție:

Gena EPSPS modificată determină sporirea de 20 de ori a activității enzimatice a proteinei.

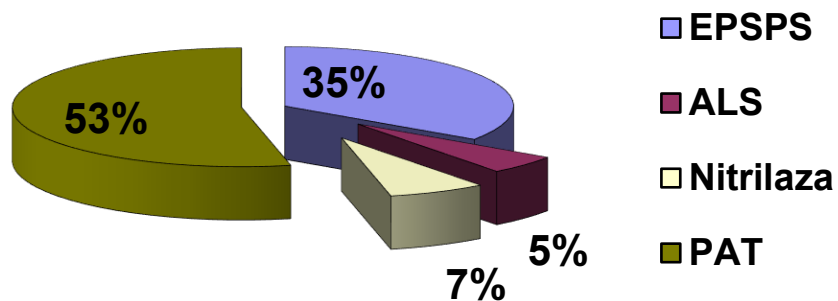
- ❑ **Acetolactat-sintetaza (ALS) care** catalizează prima etapă din biosinteza aminoacizilor cu catenă ramificată: *valină, leucină și izoleucină* este **enzima țintă** pentru erbicidele care conțin sulfoniluree și imidazolinone.

Soluție:

O gena *als* a fost izolată de la linii mutante de tutun, care prezintă rezistență datorită prezenței enzimei insensibile la aceste erbicide, și a fost transferată la alte specii de plante, conferindu-le toleranță la erbicidul respectiv (care conțin sulfoniluree și imidazolinone).

Gene care conferă rezistență la erbicide, exemple

Gena „de interes”	Abreviere	Sursa de gene	Rezistență la erbicidul:
5-enolpiruvilșikimat-3-fosfat sintaza	<i>EPSPS</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens CP4</i> ; <i>Z. mays</i>	Glifosat
Acetolactat sintaza	<i>ALS</i>	Himeră obținută din 2 gene AHAS (S4-Hr4); Linia de <i>A. thaliana</i> tolerantă la Clorsulfuron; <i>Nicotiana tabacum</i> tolerant la clorsulfuron	Sulfonil uree
Nitrilaza	<i>Nitrilaza</i>	<i>Klebsiella pneumoniae s. ozanae</i>	Bromoxinil și ioxinil
Fosfinotricin N acetiltransferaza	<i>PAT</i>	<i>Streptomyces hygroscopicus</i> <i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Glufosinat de amoniu



Numărul de varietăți (%) care conțin gene utilizate în obținerea PMG rezistente la erbicide aprobate la nivel internațional (AGBIOS)

PMG cu compoziție biochimică și dezvoltare modificată

Calitatea și cantitatea substanțelor de rezervă (uleiuri, proteine, hidrați de carbon) sunt caracteristici poligenice individuale ale genului, familiei și chiar ale speciei, care sunt relativ constante. Variabilitatea naturală sau indusă artificial determină apariția unor genotipuri cu un set complet sau incomplet de gene responsabile pentru formarea acestor compuși.

Strategii

□ Prin transferul unor gene străine (de la alte specii de organisme) au fost obținute varietăți proiectate („designer crops”) pentru producerea de uleiuri superioare importante în industrie.

Exemplu

La rapiță au fost produse varietăți noi „designer crops” cu conținut ridicat în **acid stearic** (în proporție de 25-30%, un ingredient major al margarinei și substituent al untului de cacao), acid lauric (cu 25%,) și acidul petroselinic.

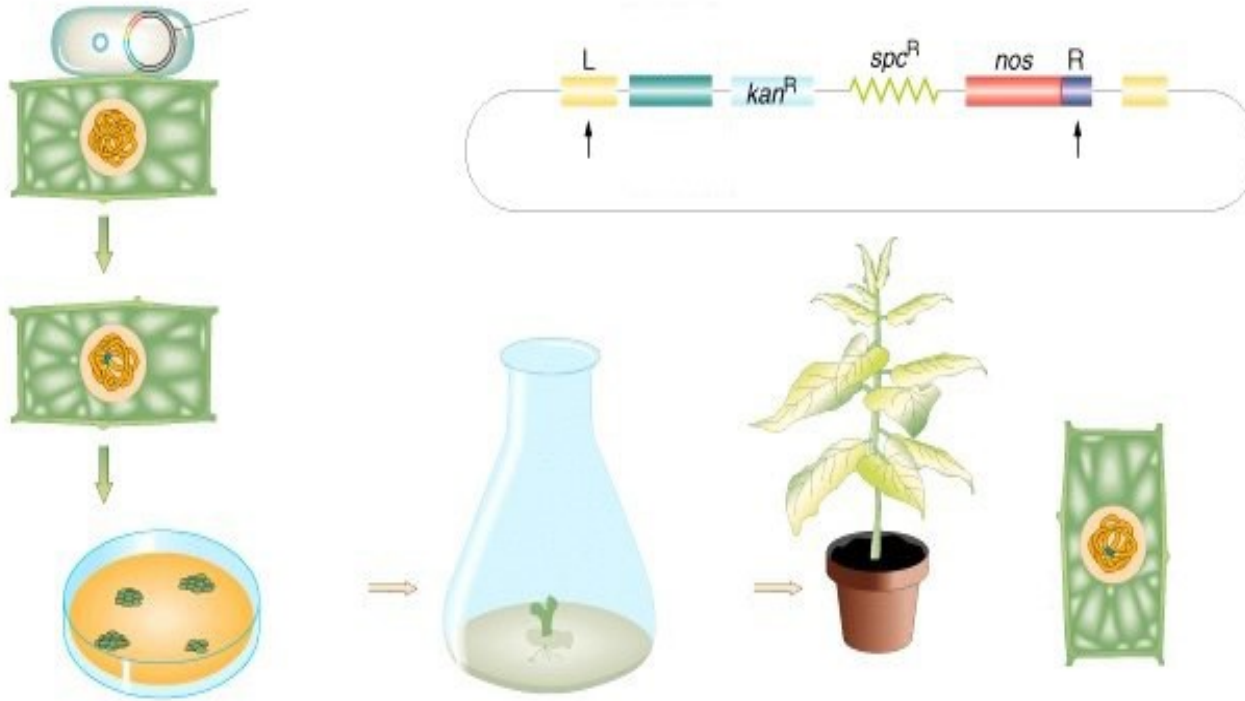


Orez transgenic care produce un precursor al vitaminei A, betacaroten

www.goldenrice.org

Caracterul	Genele „de interes”	Sursa de gene
Compoziție modificată a constituenților biochimici		
Aminoacizi <i>conținut înalt în lizină</i>	<i>cordapA</i> , codifică enzima dihidrodipicolinate sintaza (cDHDPS).	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
Acizi grași <i>conținut înalt al acidului lauric și miristic conținut înalt al acidului oleic</i>	Genele codificatoare ale: Tioesterazei dehidrogenazei acizilor grași- delta	<i>Umbellularia californica</i> <i>Glycine max</i>
Conținut redus de nicotină	Gena nicotinat-nucleotid pirofosforilazei	<i>Nicotiana tabacum</i>
Dezvoltare modificată		
Androsterilitate/ restaurarea fertilității <i>androsterilitate restaurarea fertilității androsterilitate</i>	Genele: ribonucleazei barnaza Barstar Adenin metilazei ADN	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Escherichia coli</i>
Culoare modificată	Gena flavonoid 3p, 5p hidroxilazei	<i>Petunia hybrida, sp. Viola</i>
Creșterea duratei de coacere	Genele: sintazei acidului 1-amino-cyclopropane -1-carboxylic deaminazei acidului 1-amino-ciclopropane-1-carboxylic (ACCd) sintazei acidului 1-aminociclopropan-1-carboxilic (ACC) poligalacturonazei (PG) hidrolazei S-adenosilmetioninei	<i>Dianthus caryophyllus L.</i> <i>Pseudomonas chlororaphis</i> <i>Lycopersicon esculentum</i> <i>Lycopersicon esculentum</i> <i>E. coli bacteriophage T3</i>

Recapitulare

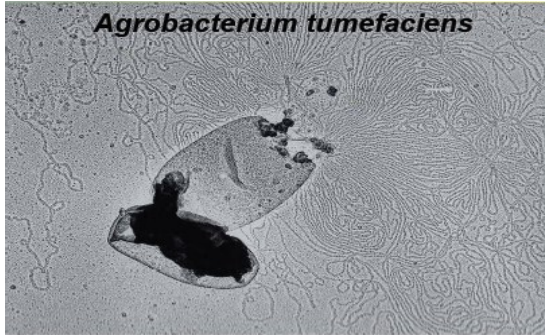


- 1 – Identificarea și izolarea genei „de interes”;
- 2 – Obținerea ADN-ului recombinat (integrarea transgenei în vector);
- 3 – **Transferul genei himere în celula vegetală prin metode directe sau indirecte;**
- 4 – Selectarea celulelor modificate genetic;
- 5 – Regenerarea plantelor din celulele transformate genetic;
- 6 – Reproducerea sexuată/ asexuată a plantelor modificate genetic.

3. METODE DE TRANSFER A ALOGENELOR LA PLANTE

Met. indirecte

mediate de bacterii și virusuri

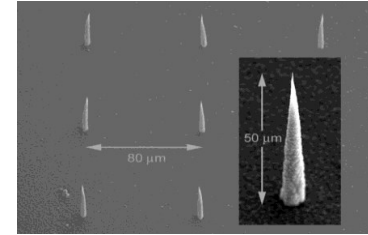


Electron microscopy image of a partially lysed *Agrobacterium* cell releasing its chromosomes

Met. directe

procedee fizice și chimice.

- Transformarea protoplastilor cu PEG
 $\text{HOH}_2\text{C}-(\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2)_n-\text{CH}_2\text{OH}$
- Electroporarea
- Microinjectarea cu ADN
- fibre de carbura de silicon
- Bombardarea cu particule (metoda biolistica)



ȚINTE ALE TRANSGENEZEI

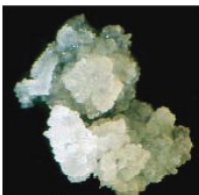
Organe florale
meristeme

Discuri de
Țesut foliar

calus
Explanți



Embrioni
imaturi



4. TRANSFORMAREA MEDIATĂ DE AGROBACTERIUM, caracteristici generale

Tehnicile de transfer a genelor mediat de către bacteriile *Agrobacterium* și cele de transfer direct, începând din anul 1983 (când au fost obținute primele specii de tutun MG) au evoluat concomitent.

!!! Metoda pe larg utilizată este transferul mediat de *Agrobacterium*, datorită simplității în realizare și eficienței la multe specii de plante.

În condiții naturale, *Agrobacterium* infectează speciile dicotiledonate

Limitările impuse de gazdele naturale sunt esențial diminuate prin optimizarea condițiilor de cultură a materialului sursă și procedurii de co-cultivare a țesutului-țintă cu aceste microorganisme.

Bacteriile *Agrobacterium tumefaciens* și *Agrobacterium rhizogenes* (familia *Rhizobiaceae*) sunt localizate în sol și infectează plantele dicotiledonate susceptibile la nivelul leziunilor de diversă natură, determinând apariția unor tumori la nivelul coletului și, respectiv, a unor rădăcini firoase

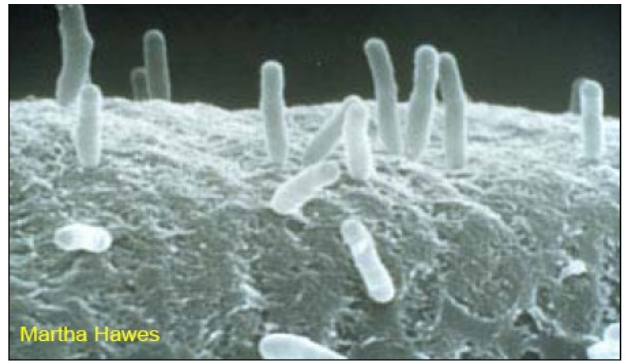
Acțiunea oncogenă

este cauzată de introducerea în celula-gazdă a informației necesare pentru sinteza constitutivă a auxinilor și citochininelor prin căi metabolice complet diferite de cele folosite de plantă. Astfel, sinteza în exces a acestor doi hormoni determină diviziunea necontrolată a celulelor determinând formarea tumorilor.



Agrobacteriile conțin în copii unice megaplasmide cu dimensiuni mai mari de 100 kb:

- **Ti (tumor inducing)** - *Agrobacterium tumefaciens*
- **Ri (root inducing)** - *Agrobacterium rhizogenes*

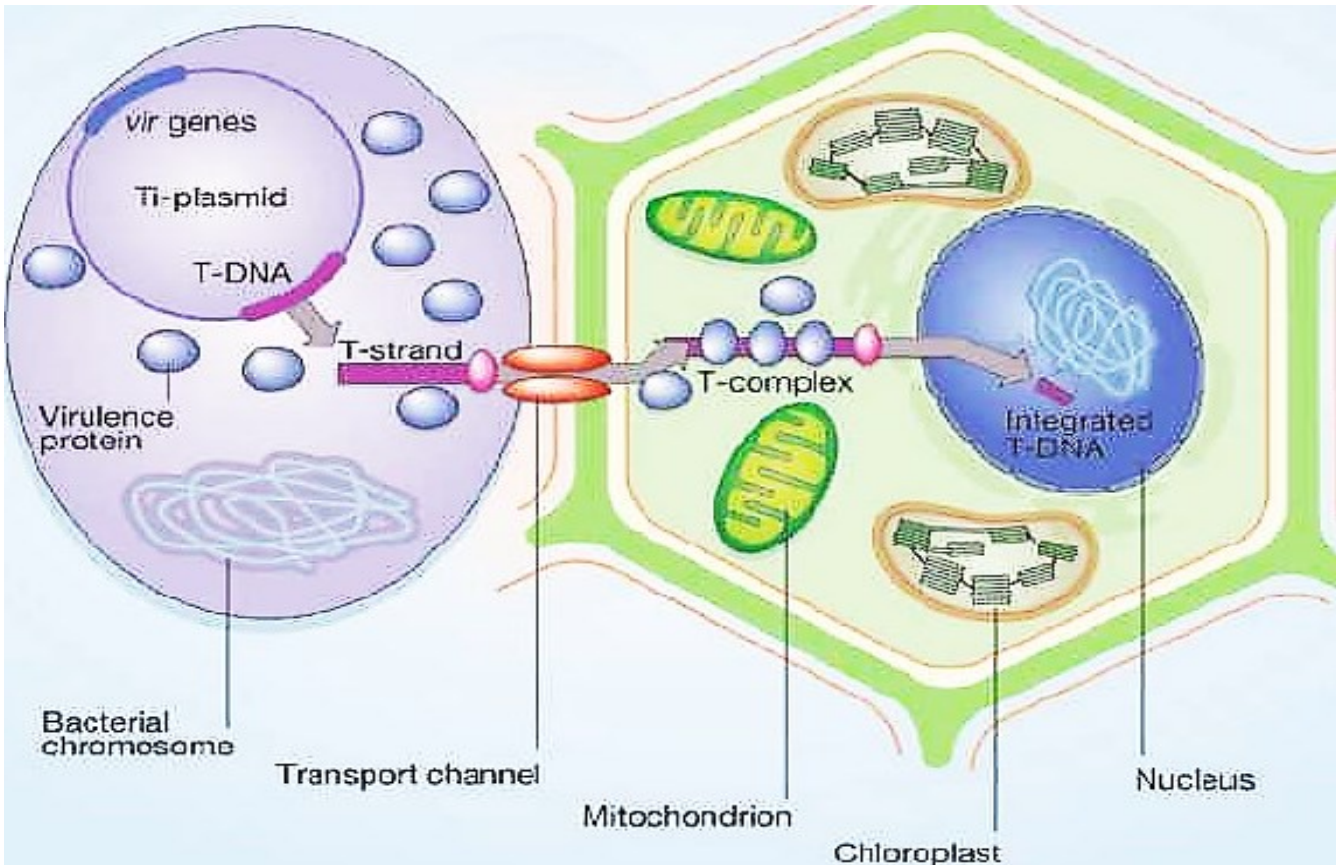


Agrobacterium tumefaciens attached to a plant cell

Agrobacterium: A Plant Gene Transfer Vector

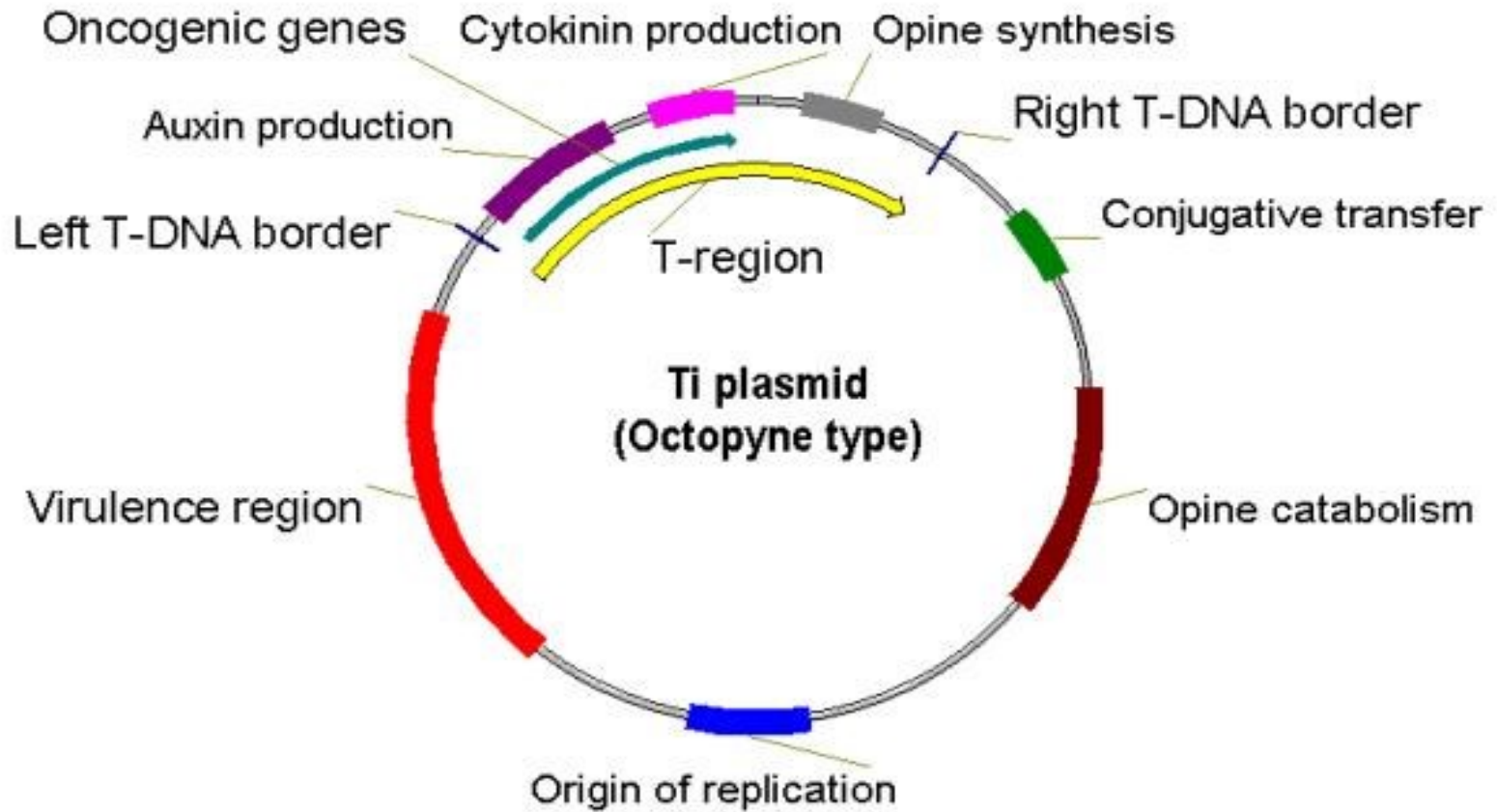
<https://www.youtube.com/watch?v=yesNHd9h8k0>

O regiune din ADN-ul plasmidic – ADN-T (transferred) – este transferată și integrată stabil în genomul plantei.



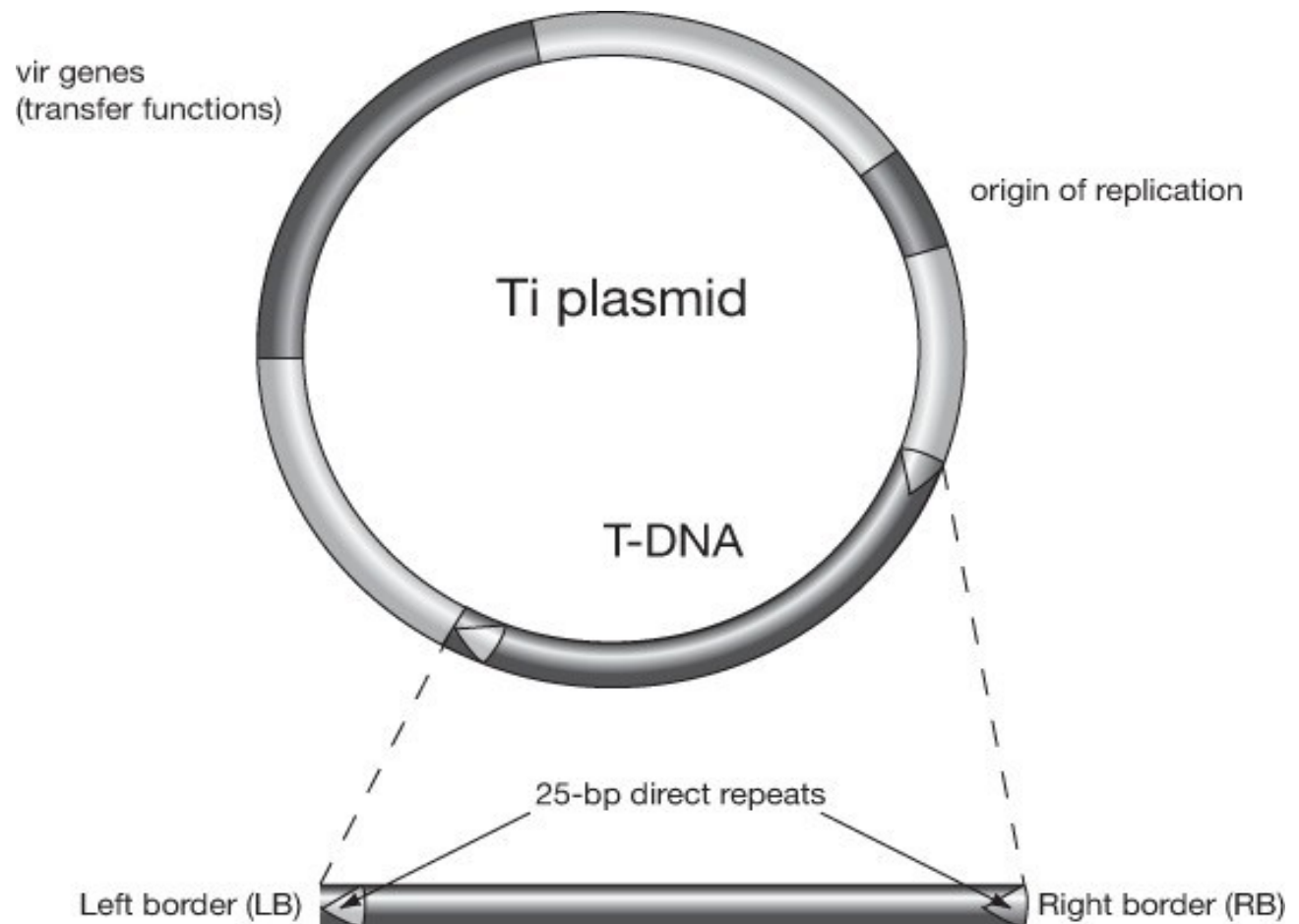
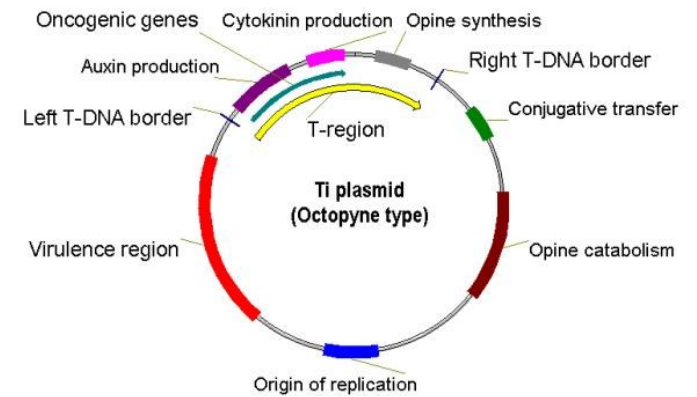
Inducerea tumorilor este determinată de: **regiunea ADN-T**, care include gene responsabile de sinteza unor aminoacizi mai puțin obișnuiți, numiți **opine**.

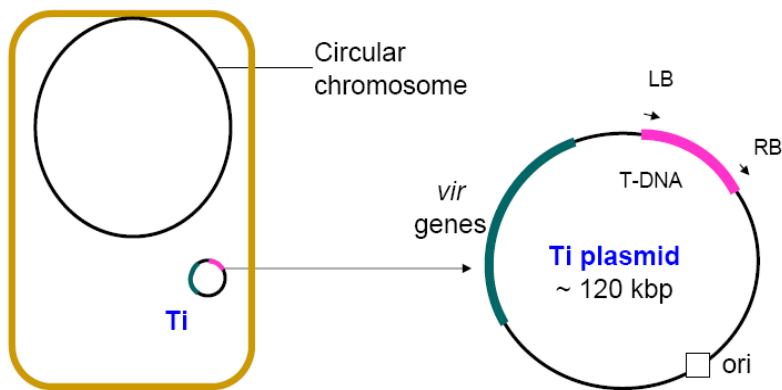
Opinele sunt folosite ca sursă de azot și carbon de către bacterie. De asemenea, în această regiune se găsesc și genele care codifică enzimele implicate în sinteza auxinilor și citochininelor.



Regiunea ADN-T este flancată de două secvențe a câte 25 pb în lungime, reprezentând repetări directe, care acționează ca elemente semnal *cis* în transferul ADN-T.

Regiunea *vir* (virulență) cu dimensiunea de 30 kb este localizată în afara regiunii ADN-T și conține cel puțin 22 gene organizate în 6 operoane, dintre care: *vir A*, *vir B*, *vir D* și *vir G* sunt esențiale pentru excizia și transferul ADN-T, și *vir C* și *vir E* sunt importante pentru sporirea eficienței de transfer.



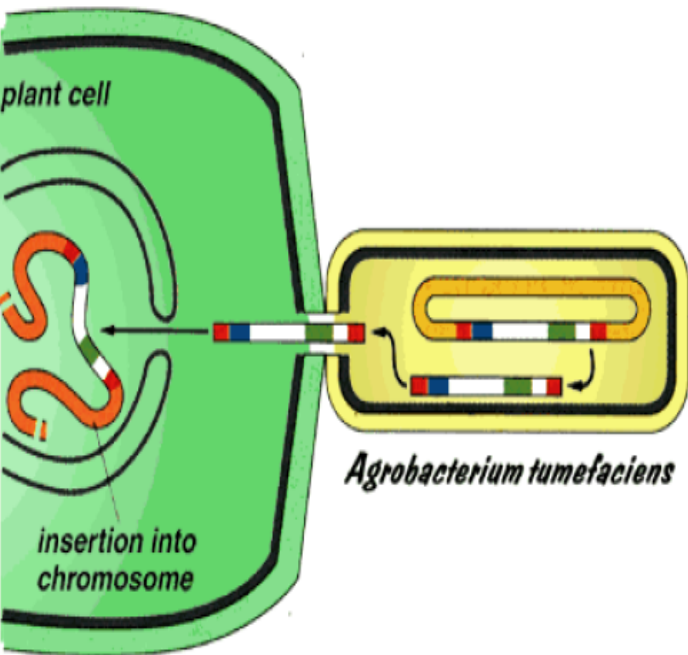
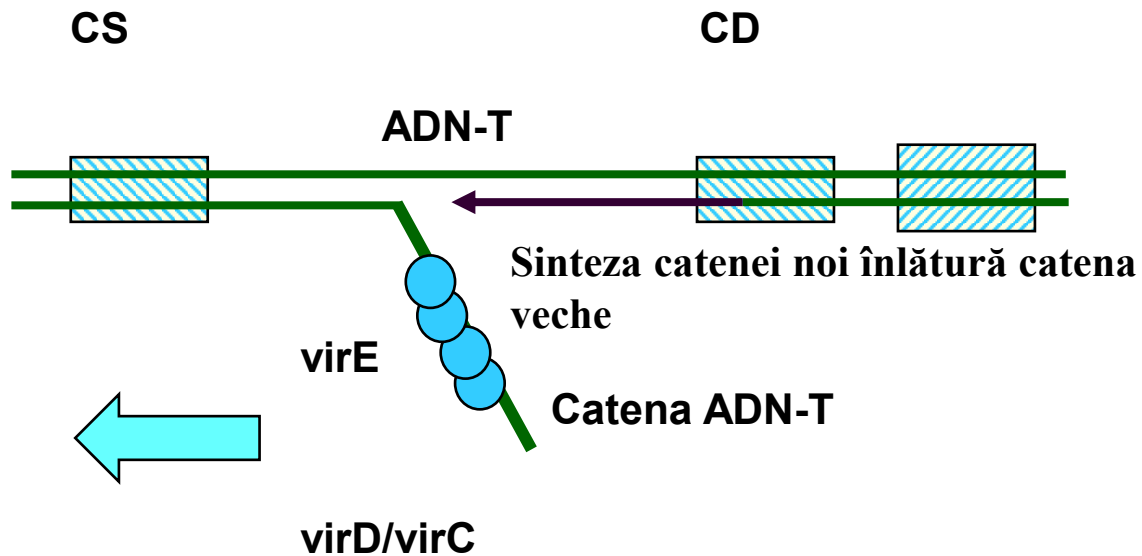


A. tumefaciens

Transferul ADN -T este activat cînd *Agrobacterium* contactează cu țesutul lezat.

ADN -T este nicat la **capatul CD** și ADN-ul se replică spre **CS** fiind transferat spre nucleul celulei. Acest proces este catalizat de **genele vir**

Generarea catenei – ADN-T



Insertie aliatorie a ADN -T

? **Problemă**
Multiplicarea celulară - tumoare

1. Helicazele desfac catena -T , fiind ulterior împachetată/complex cu proteinele virE.
2. ~ o catenă- T este produsă și transferată per celulă.

5. ELEMENTELE SISTEMULUI *AGROBACTERIUM* CA VECTOR DE TRANSFER

Analiza transferului de gene mediat de *Agrobacterium* a pus în evidență trei factori esențiali care au permis dezvoltarea unor sisteme bacteriene ce pot fi utilizate în modificarea genetică.

- **Apariția tumorilor este rezultatul transformării genetice a celulelor vegetale prin integrarea în genom a ADN-T și al expresiei genelor din această regiune.**
- **Genele ADN-T sunt transcrise numai în celulele vegetale și nu au nici un rol în procesul de transfer în plantă.**
- **ADN-ul exogen inserat între cele două capete ale ADN-T poate fi transferat în celulele vegetale.**

Genele transferate în plantă se vor afla sub controlul unui promotor cu secvențe de reglare de tip eucariot, fapt ce va permite expresia acestora în celulă, modificându-i fenotipul.

Elaborarea unui sistem *Agrobacterium* ca vector de transfer utilizat in ingenerie genică a impus:

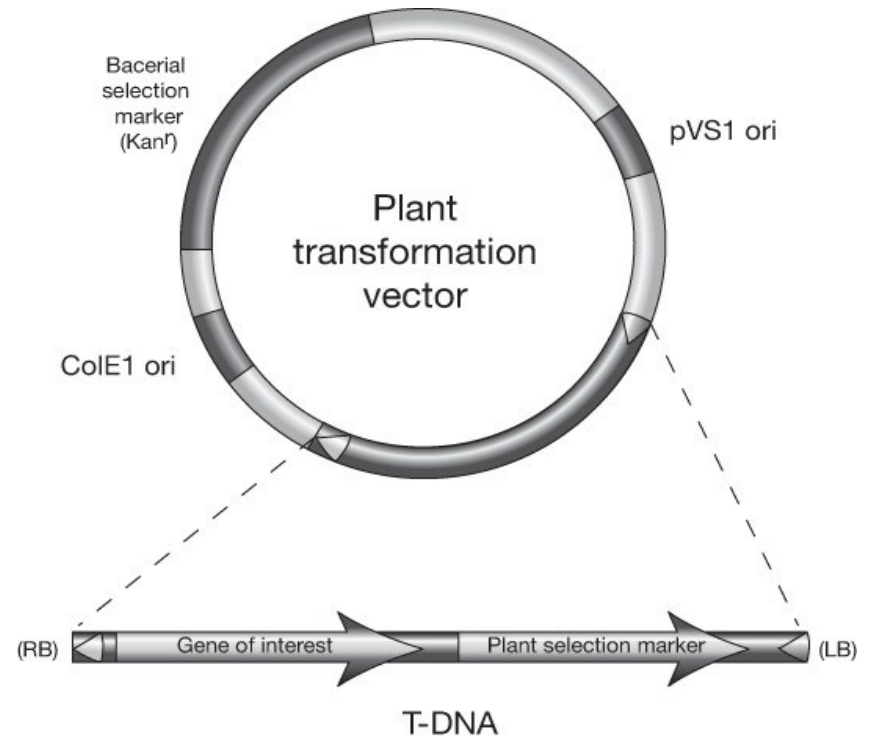
eliminarea oncogenelor din ADN-T pentru a obține celule transformate capabile să regenereze plante dezvoltate și nu proliferarea nediferențiată a celulelor.

? Problemă

Eliminarea oncogenelor face imposibilă selecția celulelor transformate capabile să crească în absența hormonilor.

Soluție

În scopul selecției genelor transformate au fost construite gene himere cu secvențe ce conferă rezistență la un antibiotic (de exemplu, kanamicină) atașată unui promotor adecvat (de exemplu, promotorul genei nopalin-sintazei (nos) sau promotorul genei VI de la virusul mozaicului conopidei.

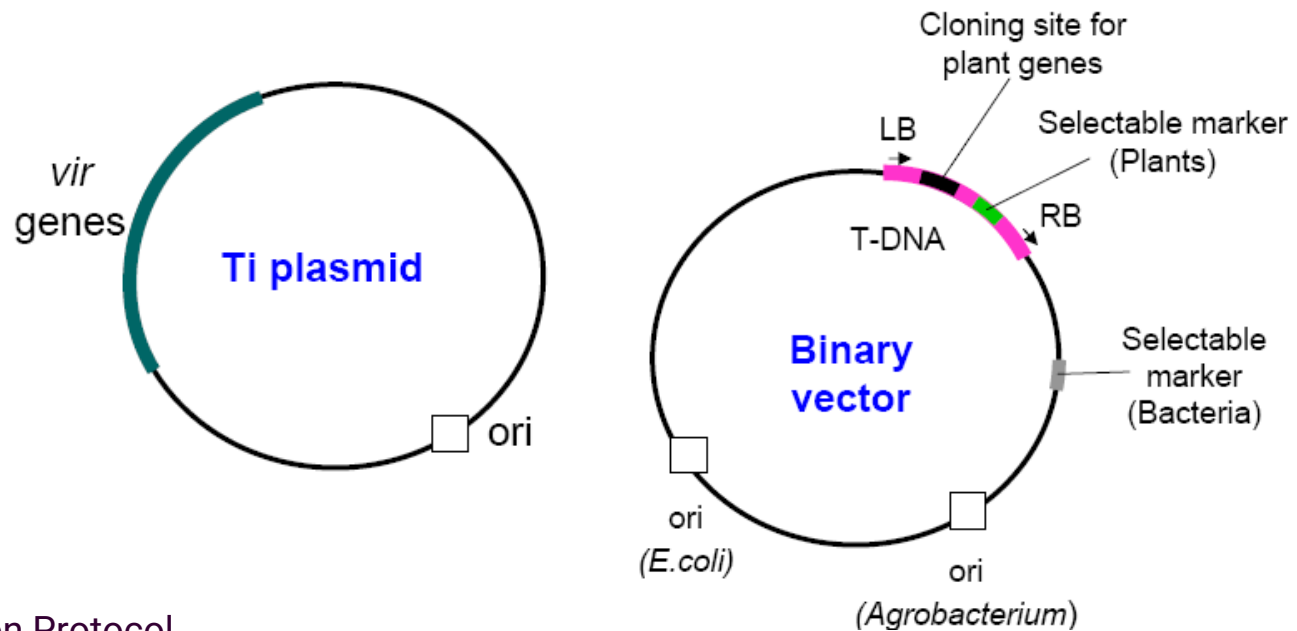


- Deleția genelor pentru auxine și citokinine
- Păstrarea genelor vir, reg. ori, CD și CS (importante pentru transfer),

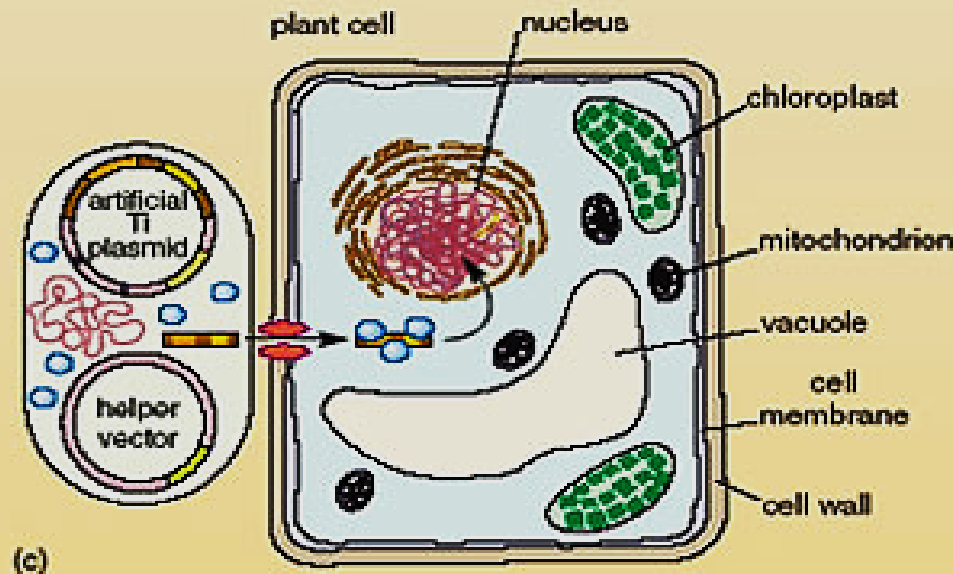
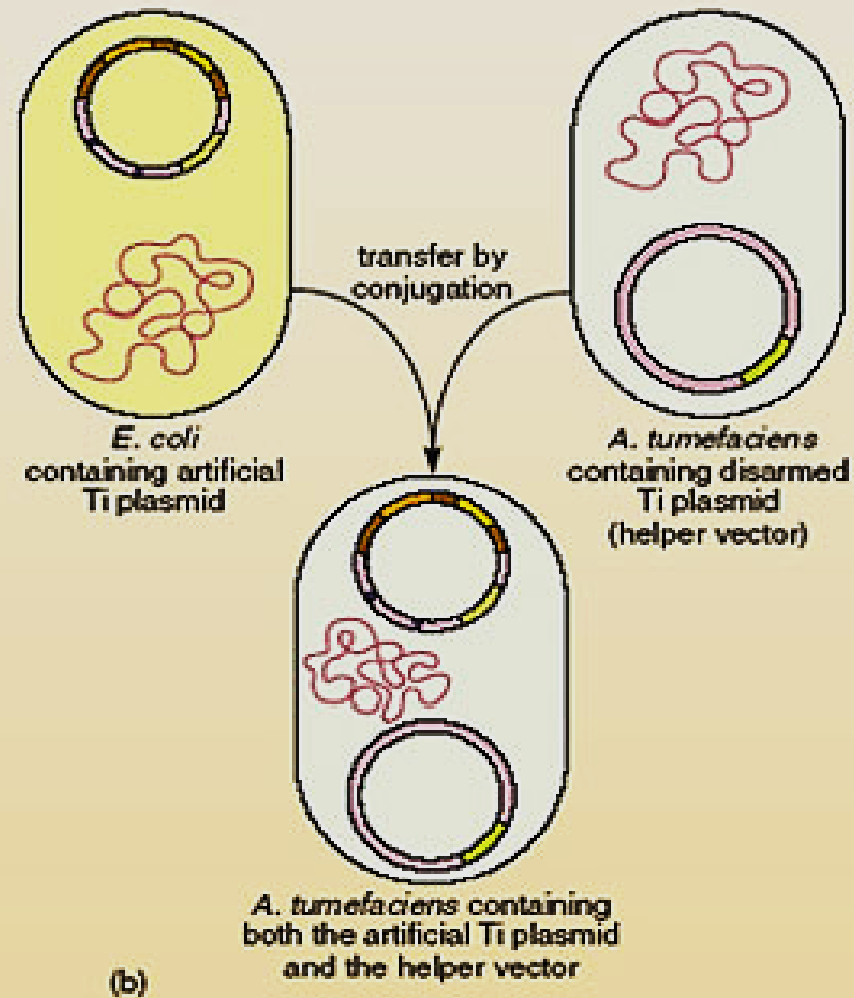
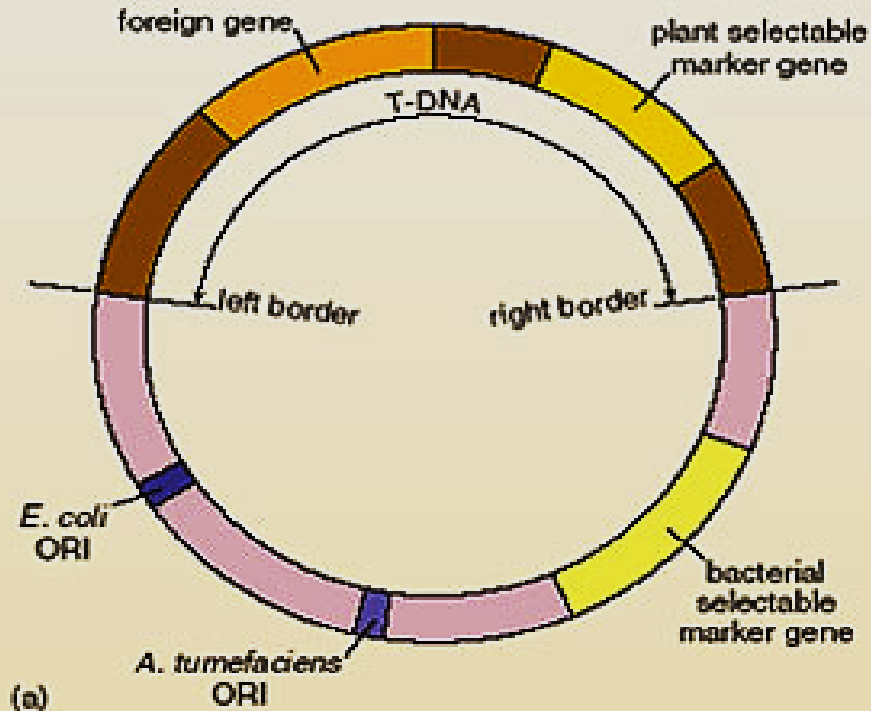
Au fost construiți numeroși vectori nononcogeni cu diferite caracteristici, clasificați în două categorii: **cis și trans**.

- ❑ Vectorii **cis** conțin atât extremitățile în lungime de 25 de perechi de baze, cât și regiunea **vir**, pe același replicon.
- ❑ Vectorii **trans** sunt formați din doi repliconi, unul purtând extremitățile și ADN-ul alogen ce va fi transferat în celula vegetală, iar celălalt (plasmida ajutătoare) posedând funcția **vir** (**sistem vector binar**). **Avantajul vectorilor trans constă în faptul că sunt mai mici decât plasmidele originale Ti/ Ri și astfel sunt mai eficienți unei manipulări genetice.**

În cazul **ambelor tipuri de vectori** 1) genele străine sunt inserate în ADN-T, 2) clonate mai întâi în *E. coli* și apoi 3) transferate în *Agrobacterium* prin conjugare ori electroporare.



Prezentare schematică a transferului de gene la plante mediat de *Agrobacterium*



Plasmidul *pCambia* *1300* - exemplu de vector utilizat în transformarea genetică

Include:

- promotorul 35S, extrimitățile de 25 kb derivate de la ADN-T,
- situsuri unice de restricție grupate în polilinkeri,
- gena raportoare Lac-Z-alfa,
- gena marker NPT (rezistența la antibiotic kanamicin) pentru selecționarea celulelor și plantelor transformate.

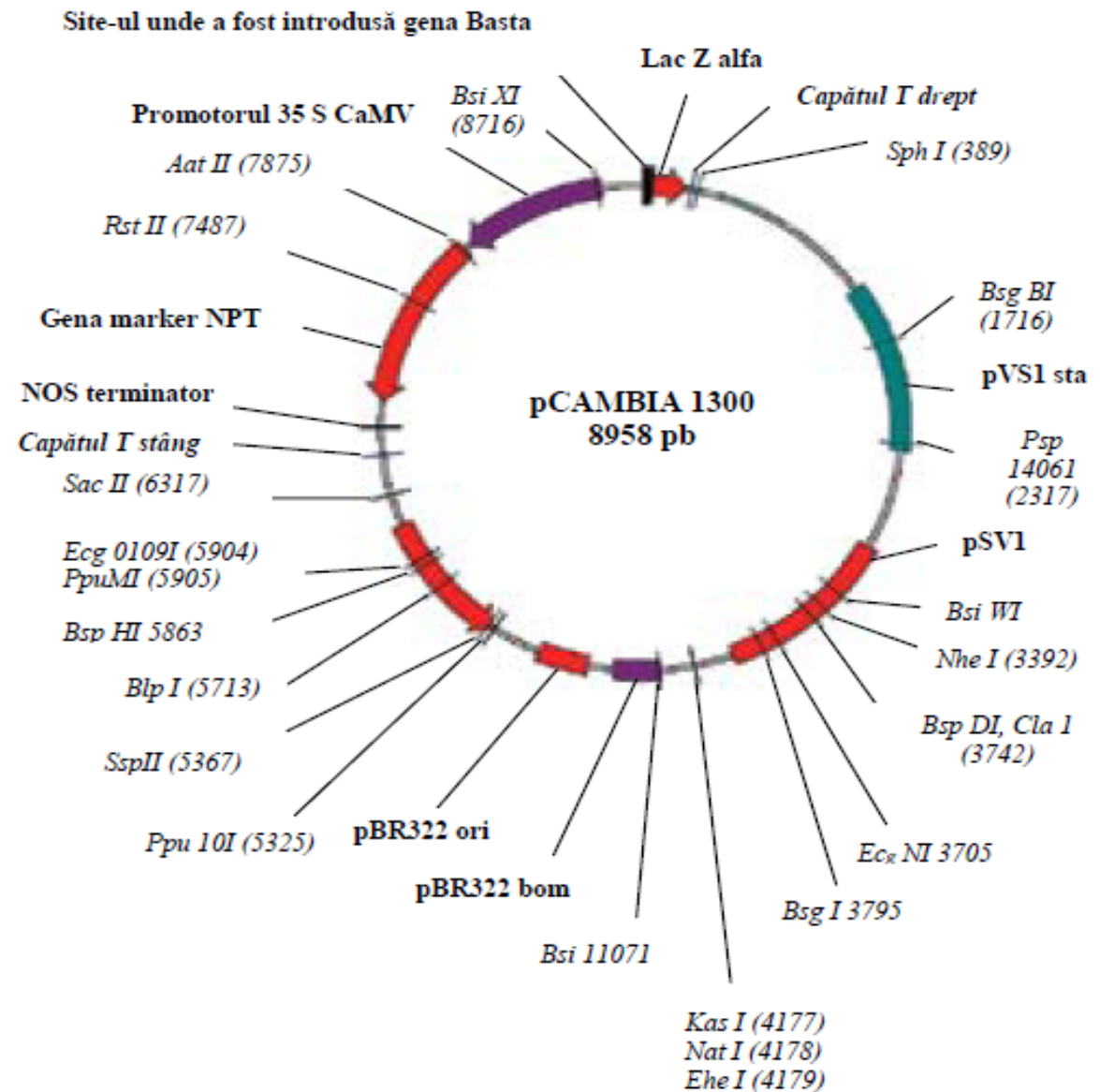
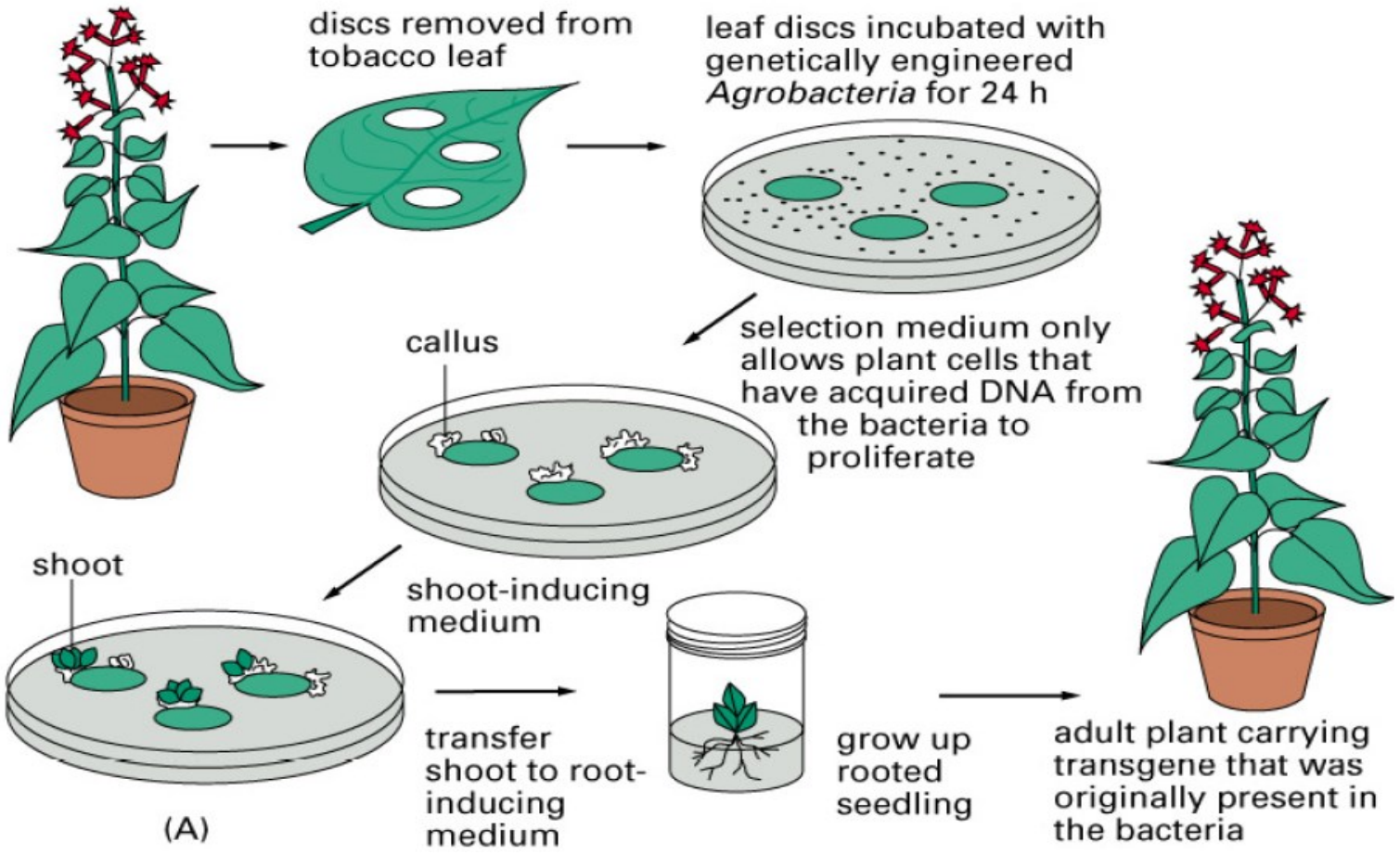


Figura 1.16. Schema plasmidului pCambia 1300

Metodologia folosită în mod curent pentru „agroinfecție” constă în cocultivarea bacteriei cu fragmente de țesut vegetal (frunze, rădăcini, hipocotili, pețioluri, cotiledoane etc.) și ulterior cultivarea *in vitro* pe medii de inducere a regenerării, suplimentate cu antibiotic pentru eliminarea bacteriei.

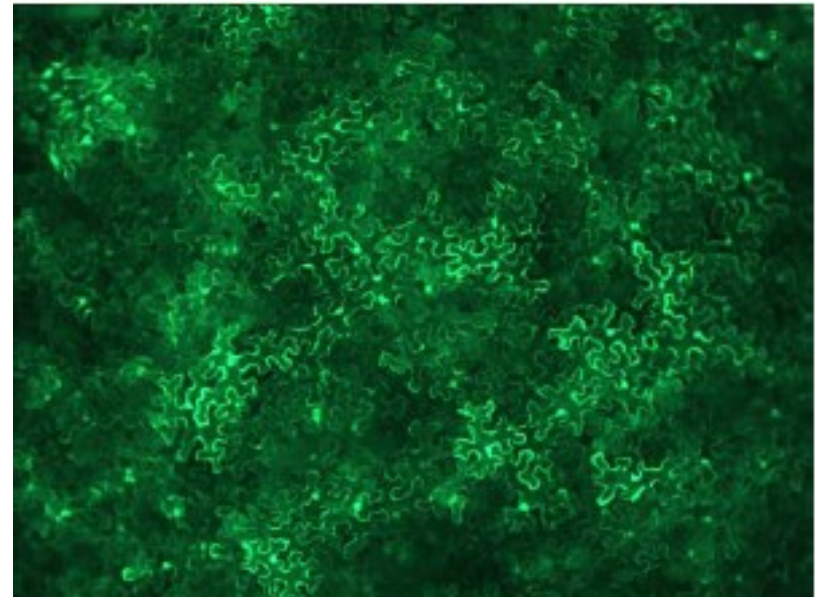
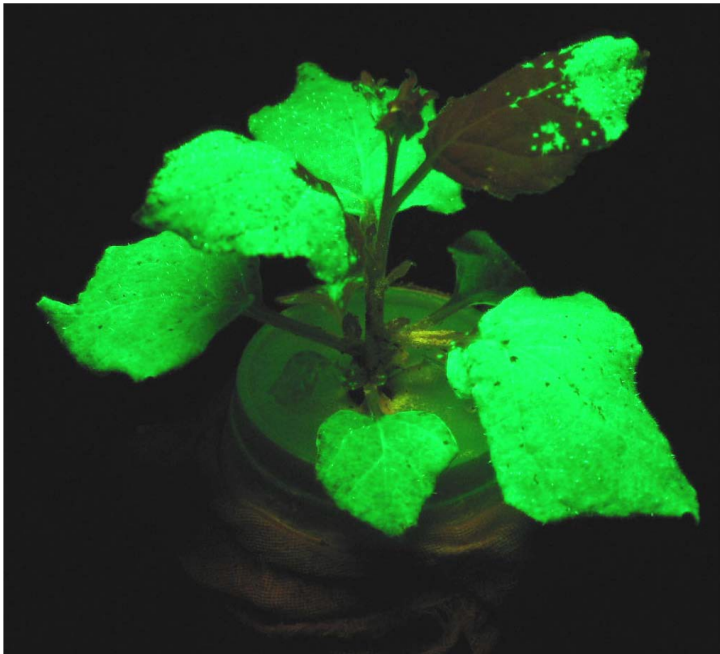


<https://www.youtube.com/watch?v=wTraZwHDHXk>

<https://www.youtube.com/watch?v=I3fCD0uUJk0>

https://www.youtube.com/watch?v=L7qnY_GqytM

Agroinfiltrare cu *Agrobacterium* modificat in frunze (tutun)



6. Vectorii virali

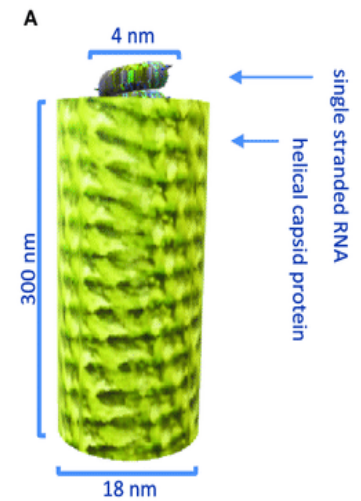
Vectorii virali sunt utilizați mai puțin în transformarea genetică la plante, decât la bacterii și mamifere. În special, virusurile sunt utilizate ca vector pentru transferul genelor, în vederea elucidării unor probleme teoretice, de exemplu caracterizarea expresiei genelor în țesuturi diferențiate fără să fie necesară cultivarea *in vitro*.

!!!

Capacitatea virusurilor de a se răspândi în întreaga plantă asigură niveluri foarte ridicate de expresie a transgenelor. Această însușire a vectorilor virali este exploatată pentru a produce proteine virale în plante.

Au fost construiți vectori virali în baza **virusului mozaicului tutunului**, **virusul X al cartofului** și **virusul piticirii tomatelor**.

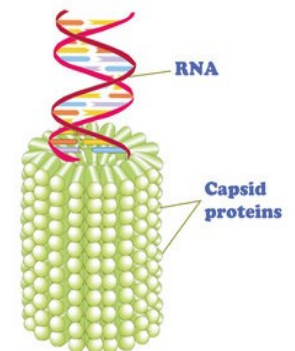
Vectorii virali artificiali nu produc simptomele bolii, dar se răspândesc sistemic și conțin o genă străină.



Tobacco Mosaic Virus (TMV)

Length: 3000Å
Outer Diameter: 180Å
Inner Diameter: 40Å

tobacco mosaic virus



Mulțumesc pentru atenție