



# **BIOTECNOLOGIA VEGETAL**

## **SILENCIAMENTO DE GENES EM PLANTA**

**Protocolo das aulas práticas**

**Ano letivo 2024/25**

**Patrick Materatski**

**Carla Varanda**

**TÍTULO:**

BIOTECNOLOGIA VEGETAL: SILENCIAMENTO DE GENES EM PLANTA, Protocolo das aulas Práticas, Ano letivo 2024/25

**AUTORES:**

Patrick Materatski

Carla Varanda

**ENDEREÇO:**

Instituto Politécnico de Santarém, Escola Superior Agrária de Santarém – ESAS  
Quinta do Galinheiro – S.Pedro, 2001-904 Santarém,

**EDITOR:** INSTITUTO POLITÉCNICO DE SANTARÉM

COPYRIGHT © 2025

**ISBN:**

**Ano Letivo 2024/25**

## **Unidade Curricular de Biotecnologia Vegetal**

### **Autores:**

#### **Carla Varanda**

Professora Adjunta

Departamento de Tecnologia Alimentar, Biotecnologia e Nutrição, Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Santarém

Investigadora integrada

CERNAS—Research Centre for Natural Resources, Environment and Society

E-mail: [carla.varanda@esa.ipsantarem.pt](mailto:carla.varanda@esa.ipsantarem.pt)

Ciência Vitae: <https://www.cienciavitae.pt/061E-C9D5-C76E>

Orcid ID: <http://orcid.org/0000-0002-6915-1793>

#### **Patrick Materatski**

Investigador Auxiliar

MED—Instituto Mediterrâneo para a Agricultura, Ambiente e Desenvolvimento & CHANGE—Global Change and Sustainability Institute, IIFA—Instituto de Investigação e Formação Avançada, Universidade de Évora,

E-mail: [pmateratski@uevora.pt](mailto:pmateratski@uevora.pt)

Website institucional: <https://www.uevora.pt/pessoas?id=37663>

Ciência Vitae: <https://www.cienciavitae.pt/portal/9010-F718-9E95>

Orcid ID: <https://orcid.org/0000-0001-5769-1963>

## ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	5
ÍNDICE DE TABELAS.....	6
LISTA DE ACRÓNIMOS.....	7
INTRODUÇÃO.....	8
ETAPA 1 – PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE ANTIBIÓTICOS E CRESCIMENTO DAS A. TUMEFACIENS C58C1.....	10
ETAPA 2 – TRANSFORMAÇÃO E AGROINFILTRAÇÃO.....	14

## **INDICE DE FIGURAS**

**Figura 1.** Agroinfiltração do gene GFP na face abaxial da folha de *N. benthamiana* 16c.

\_\_\_\_\_ 17

**Figura 2.** Observação visual de folhas de *N. benthamiana* 16c agroinfiltradas sob luz ultravioleta: A - folhas não infiltradas; B - folhas agroinfiltradas com *A. tumefaciens* C58C1 + vetor pK7WG2 + GFP (2 dpi); C - folhas agroinfiltradas com *A. tumefaciens* C58C1 + vetor pK7WG2 + GFP (5 dpi); e C - folhas agroinfiltradas com *A. tumefaciens* C58C1 + vetor pK7WG2 + GFP+TAV. \_\_\_\_\_ 17

## ***INDICE DE TABELAS***

**Tabela 1.** Antibióticos, concentrações e seleção específica de cada um, direcionado para o crescimento das *A. tumefaciens* com vetor pK7WG2 + gene de interesse. \_\_\_\_ **11**

## **LISTA DE ACRÓNIMOS**

mg/mL	<i>Miligrama/mililitro</i>
µg/mL	<i>micrograma/mililitro</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
TE	Tris/EDTA
GFP	<i>'Green Fluorecence Protein'</i>
LB	<i>Luria Bertani</i>
SOC	<i>'Super Optimal Broth (SOB)' + glicose</i>
DMSO	<i>Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo</i>
MES	(ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico)
CaCl <sub>2</sub>	<i>Cloreto de cálcio</i>
MgCl <sub>2</sub>	<i>Cloreto de magnésio</i>

## INTRODUÇÃO

A Unidade Curricular (UC) de Biotecnologia Vegetal (LBBA1250), é uma UC obrigatória para o 2º ano da Licenciatura em Biologia e Biotecnologia Alimentar. Esta UC compreende, para além das aulas teóricas, uma componente teórico-prática e uma componente de prática-laboratorial, nas quais se pretende que os alunos aprofundem conhecimentos e obtenham competências no método de silenciamento de genes em planta com recurso a agroinfiltração através de *Agrobacterium tumefaciens* e que são compatíveis com o vetor binário pK7WG2 (Materatski e Varanda, 2025). Esta metodologia permite a realização de diversos estudos de análise funcional de genes de planta através do silenciamento dos mesmos, bem como a expressão de proteínas específicas. No caso de estudos em virologia, esta tecnologia possibilita também a análise funcional dos genes virais envolvidos na supressão do silenciamento, que é crucial para a correta descrição da biologia das doenças (Varanda, et al., 2018). Estas tecnologias sustentam os vários domínios da biotecnologia em plantas e seus sistemas e processos. Assim, os protocolos aqui descritos, incluem as principais etapas realizadas num laboratório de biotecnologia vegetal, e uma vez que são transversais em biotecnologia, os estudantes aprendem de forma simples, as principais metodologias usadas rotineiramente num laboratório de biotecnologia vegetal.

Este manual descreve os protocolos a realizar nas aulas práticas no ano letivo de 2024/25.

### BIOTECNOLOGIA VEGETAL

**Código:** LBBA1250

5 ECTS

**Área de Ensino:** Ciências biológicas

**Área Científica:** Biologia e Bioquímica

**Objetivos de Desenvolvimento Sustentável**



### REFERÊNCIAS:

Materatski, P.; Varanda, C. (2025). Biotecnologia vegetal: Introdução de um gene de interesse num vetor binário utilizando a tecnologia Gateway, Protocolo das aulas Práticas, Ano letivo 2024/25. Instituto Politécnico de Santarém. 1: 1-22.

Varanda, C.M.; Materatski, P.; Campos, M.D.; Clara, M.I.E.; Nolasco, G.; Félix, M.D.R. (2018). Olive Mild Mosaic Virus Coat Protein and P6 Are Suppressors of RNA Silencing, and Their Silencing Confers Resistance against OMMV. *Viruses*, 10, 416.

## ETAPA 1 – PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE ANTIBIÓTICOS E CRESCIMENTO DAS *A. tumefaciens* C58C1

### INTRODUÇÃO

Para gerar o crescimento e a seleção adequada da *A. tumefaciens* e do vetor pK7WG2 com os genes de interesse (Varanda e Materatski, 2025), serão utilizados diferentes antibióticos para o protocolo de agroinfiltração. A rifampicina permite o crescimento das agrobactérias da espécie *A. tumefaciens*, excluindo o crescimento de outras bactérias. Já a *A. tumefaciens* C58C1 é portadora do plasmídeo pMP90 Ti, que apresenta resistência à gentamicina, ou seja, a combinação destes dois antibióticos em meio LB irá permitir somente o crescimento da *A. tumefaciens* C58C1. Ainda, esta estirpe é capaz de carregar o vetor binário pK7WG2. O vetor pK7WG2 apresenta resistência ao antibiótico espectinomicina, pelo que a combinação destes 3 antibióticos em meio LB permitirá o crescimento de somente da *A. tumefaciens* C58C1 + pK7WG2 (com o gene de interesse) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Antibióticos, concentrações e seleção específica de cada um, direcionado para o crescimento das *A. tumefaciens* com vetor pK7WG2 + gene de interesse.

Antibiótico	Tipo seleção	Solução	
		Stock	Final de trabalho
		mg/mL	µg/mL
Rifampicina	Agrobacterium	5	50
Gentamicina	C58C1	20	50
Espectinomicina	vetor pK7WG2	20	50

### MATERIAL, REAGENTES E EQUIPAMENTO:

- Centrífuga de bancada
- Espectrofotômetro
- Gelo
- Micropipetas
- Termociclador
- Banho seco
- Agitador orbital com controlo de temperatura
- Palitos (para picar colónias) autoclavados
  
- DNA plasmídico extraído no protocolo anterior
- TE buffer, pH 8
- LR clonase II

- Placas de Petri com meio LB + spectinomomicina
- Meio LB líquido (sem agar) + spectinomomicina
- Células competentes de *A. tumefaciens*
- SOC

## PROTOCOLO EXPERIMENTAL:

### I - Preparação das soluções de trabalhos dos antibióticos



#### Determinação da concentração de antibiótico

##### Rifampicina:

50 mg de rifampicina em 10 mL de DMSO ----- 5mg/mL de rifampicina

##### Espectinomomicina:

200 mg de espectinomomicina em 10 mL de água ----- 20mg/mL de espectinomomicina

##### Gentamicina (sulfato de gentamicina):

É adquirida uma solução de 20mg/mL de gentamicina



#### Dicas

- ✓ As soluções de antibióticos devem ser armazenadas em -20 °C.
- ✓ Cada frasco de cada antibiótico deve-se envolver folha de alumínio para diminuir a incidência de luz, que apresenta um efeito de alteração no antibiótico, diminuindo a sua eficácia.

### II - Crescimento das *A. tumefaciens* C58C1 em meio sólido

#### 1. Crescer *A. tumefaciens* C58C1:

- Colocar 150 µL de células competentes de *A. tumefaciens* C58C1 a crescer em placa de Petri LB previamente suplementadas com 50 µg/mL de rifampicina e 50 µg/mL de gentamicina.

#### 2. Programa de crescimento

- Incubar a 28°C, 'overnight' ( $\pm 18$ h)

### III - Crescimento das *A. tumefaciens* C58C1 em meio líquido

#### 1. Adicionar:

- Picar colónias (colocar o palito dentro do LB líquido)
- 5 mL LB meio líquido + rifampicina e gentamicina.

#### 2. Crescer:

- Crescer colónias (em agitador orbital) em meio líquido a 28°C 'overnight' ( $\pm 18$  h).

#### 3. Adicionar:

- Adicionar 2 ml da cultura de agrobactéria do passo anterior a 40ml LB líquido + rifampicina e gentamicina.

#### 4. Crescer:

- Crescer colónias (em agitador orbital) em meio líquido a 28°C até o crescimento atingir  $DO_{600} = 0.5 - 1$ .



#### Dicas

- ✓ Se às 11h:00 da manhã foi transferido 2 mL da cultura de agrobactéria do passo anterior a 40mL LB<sup>2</sup> meio líquido + rifampicina e gentamicina, então teremos aproximadamente:

- 11h:00-----DO600 (2mL) = 3.8
- 12h:30-----DO600 (40mL) = 0.129
- 14h:00-----DO600 (40mL) = 0.271
- 16h:00-----DO600 (40mL) = 0.446
- 16h:50-----DO600 (40mL) = 0.597

#### 5. Concentrar:

- Transferir a cultura de agrobacteria para um tubo de falcon (50 mL)
- Colocar o tubo 10 min em gelo
- Centrifugar a cultura 3000 rpm por 5 min a 4°C
- Descartar o sobrenadante e manter o tubo invertido por 1 min sobre papel absorvente
- Ressuspender o pellet em 1mL em CaCl<sub>2</sub> (20mM) frio e manter a amostra em gelo por 10 min

#### **6. Congelar:**

- Adicional 70 µL de DMSO e agitar suavemente
- Colocar em gelo 15 min
- Adicional 70 µL de DMSO e agitar suavemente
- Fazer alíquotas para tubos de eppendorfs (1.5mL) frios
- Congelar em azoto líquido
- Armazenar em ultracongeladora a -80°C

## ETAPA 2 – TRANSFORMAÇÃO E AGROINFILTRAÇÃO

### INTRODUÇÃO

Os vetores binários pK7WG2 com o gene da GFP que foram transformados na estirpe competente de *E. coli* C58C1, descrito no protocolo da tecnologia Gateway (Materatski e Varanda, 2025) serão utilizados neste protocolo. Este protocolo tem como objetivo transformar o vector pK7WG2 + GFP na estirpe competente *A. tumefaciens* C58C1 e proceder ao protocolo de agroinfiltração em plantas de *Nicotiana benthamiana* 16c. Esta linhagem de *N. benthamiana* 16c expressa a proteína fluorescente verde (GFP) de forma constitutiva e em grande quantidade (Haseloff e Siemering, 2005). Esta planta modificada geneticamente tem sido um recurso importante para estudos de silenciamento de genes, assim como estudos de supressão de silenciamento, com recurso ao conhecido gene supressor 2b do *Tomato aspermy virus* (TAV), por exemplo (Varanda et al., 2018). Neste sentido, neste protocolo será possível visualizar o silenciamento da GFP em plantas de *N. benthamiana* 16c sob luz ultravioleta.

### I – Transformação em *A. tumefaciens* C58C1

#### 1. Transformar:

1 µL DNA plasmídico LR

50 µL de células competentes de *A. tumefaciens* C58C1

#### 2. Programa de ligação

- Incubar a 37°C, 5 min
- Incubar em gelo 30 min

#### 3. Adicionar

- 100 µL da reação de transformação em placas de Petri com meio sólido LB+ espectinomicina, rifampicina e gentamicina.
- Incubar 'overnight' (±18h)

### II – Agroinfiltração em plantas de *N. benthamiana*

#### 4. Adicionar:

Picar colónias (colocar o palito dentro do LB líquido)

5 mL LB meio líquido + espectinomicina, rifampicina e gentamicina.

#### 5. Crescer:

- Crescer colónias (em agitador orbital) em meio líquido a 28°C a 200 rpm 'overnight'
- Adicionar 1 mL da cultura de agrobactéria do passo anterior a 20mL LB meio líquido + rifampicina e gentamicina a 28°C a 200 rpm ( $\pm$  5 horas) com:

10mM de MES (para 20mL – 200  $\mu$ L de MES, partindo do stock de 1M)

20mM de Acetoceringona (para 20mL – 8  $\mu$ L de MES, partindo do stock de 1M)

- Ver DO<sub>600</sub> até um valor = 0.4 – 0.6

#### 6. Precipitar:

- Precipitar as agrobactérias em 5000 rpm por 5 min
- Rensuspender numa alíquota de 45mL:

10mM de MgCl<sub>2</sub> (450 $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> 1M pH 5.6)

10mM de MES (450 $\mu$ L)

100 $\mu$ M de Acetoceringona (90 $\mu$ L)

- Deixar a solução bacteriana no escuro em temperatura ambiente por 1 h antes de agroinfiltrar

#### 7. Agroinfiltração:

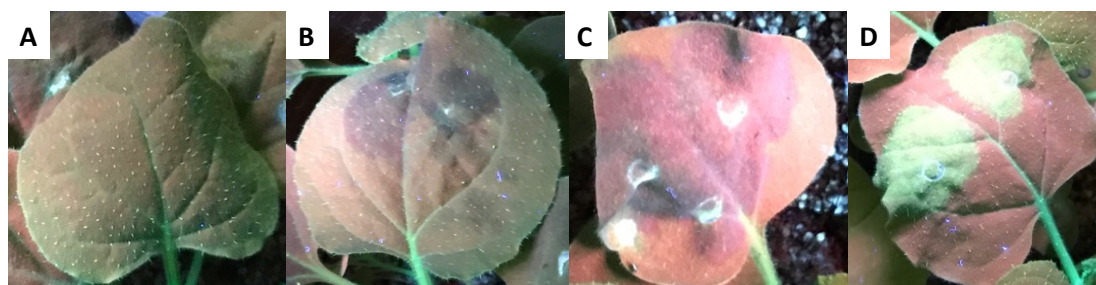
- Proceder a agroinfiltração com uma seringa de 2 mL, pressionar a seringa sem agulha contra a face abaxial da folha da planta de *N. benthamiana* e com o dedo indicador da mão exercer uma força contrária no lado oposto da folha (figura 1)
- Carregar gentilmente no embolo da seringa e infiltrar o líquido no máximo de folhas possível.



**Figura 1.** Agroinfiltração do gene GFP na face abaxial da folha de *N. benthamiana* 16c.

#### **Resultados esperados:**

Espera-se que o silenciamento do gene da GFP comece após 48 horas, no caso de plantas *N. benthamiana* 16c que em observação visual sob luz ultravioleta emitem naturalmente a cor vermelha (figura 2 - A). No entanto, estas plantas em processo de silenciamento devem no local da agroinfiltração ficar com a cor vermelha mais intensa (figura 2 - B). Após aproximadamente 5 dpi o silenciamento deve atingir o máximo e a cor vermelha mais intensa deve ocupar mais área da folha agrinfiltrada (figura 2 - C). Caso a agroinfiltração inclua, para além da GFP um supressor de silenciamento forte como o TAV, o local de agroinfiltração deve ficar verde, isto deve-se ao facto deste supressor impedir a planta de silenciar o gene da GFP, processo descrito como supressão de silenciamento. As plantas de *N. benthamiana* 16c que expressam constitutivamente a GFP irão então deixar de conseguir silenciar a GFP devido à presença do TAV, assim a GFP agroinfiltrada irá ser expressa, emitindo a cor verde no local da agroinfiltração.



**Figura 2.** Observação visual de folhas de *N. benthamiana* 16c agrinfiltradas sob luz ultravioleta: A - folhas não infiltradas; B - folhas agrinfiltradas com *A. tumefaciens* C58C1 + vetor pK7WG2

+ GFP (2 dpi); C - folhas agroinfiltradas com *A. tumefaciens* C58C1 + vetor pK7WG2 + GFP (5 dpi); e C - folhas agroinfiltradas com *A. tumefaciens* C58C1 + vetor pK7WG2 + GFP+TAV.



#### Dicas

- ✓ **Ao agroinfiltrar é possível ver o líquido entrar na folha, pois esta muda de cor, caso isto não esteja a acontecer o líquido vai escorrer (ou espirrar) pela folha. Neste caso deve exercer mais força de pressão da seringa na folha.**
- ✓ **Também é importante não exercer demasiada força para não romper os tecidos da folha**

#### REFERÊNCIAS:

Materatski, P.; Varanda, C. (2025). Biotecnologia vegetal: Introdução de um gene de interesse num vetor binário utilizando a tecnologia Gateway, Protocolo das aulas Práticas, Ano letivo 2024/25. Instituto Politécnico de Santarém. 1: 1-22.

Haseloff, J. and Siemering, K.R. (2005). The Uses of Green Fluorescent Protein in Plants. *Green Fluorescent Protein: John Wiley & Sons, Inc.*; p. 259–84

Varanda, C.M.; Materatski, P.; Campos, M.D.; Clara, M.I.E.; Nolasco, G.; Félix, M.D.R. (2018). Olive Mild Mosaic Virus Coat Protein and P6 Are Suppressors of RNA Silencing, and Their Silencing Confers Resistance against OMMV. *Viruses*, 10, 416.