

Obtenção de organismos geneticamente modificados

1. Transgenia em plantas, métodos de transformação de plantas (biobalística e *Agrobacterium tumefaciens*);
2. CRISPR.
3. Criação de uma linhagem transgênica e utilização em programas de melhoramento;
4. Exemplos do processo de criação de transgênicos com diferentes construções sintéticas.

OGMs = Organismos Geneticamente Modificados

Exemplos de culturas atuais

Culturas resistentes a herbicida



- soja
- milho
- canola
- outras

Culturas resistentes a insetos



- algodão
- batata
- milho

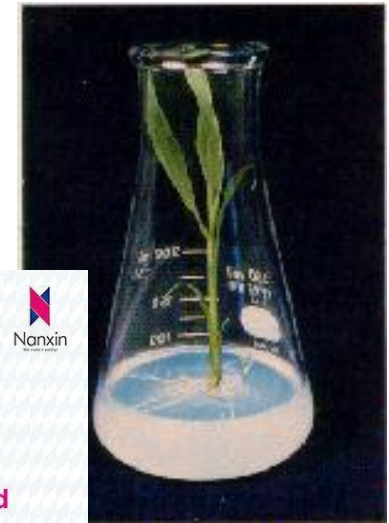
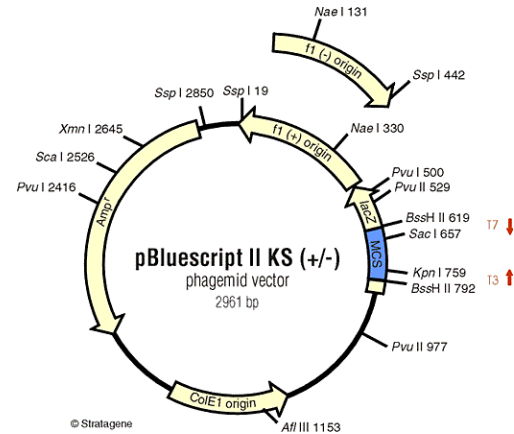
http://cera-gmc.org/index.php?action=gm_crop_database

Questionamentos relevantes:

1. A característica desejada pode ser engenherada?
2. Quantos genes precisam ser introduzidos?
3. Onde o gene precisa ser expresso?
4. Algum órgão específico, tecido, fase do desenvolvimento, localização dentro da célula.
5. Existem genes e elementos de expressão disponíveis para a característica desejada?
6. Interação do produto com produtos de outros genes; ou na expressão de outros genes?

Engenharia Genética de Plantas

- Produto e viabilidade do projeto
- Construção do transgene
- Transformação de plantas
- Seleção
- Melhoramento de planta



- ↓
- produção da variedade cultivada

Construção sintética do transgene



Introdução do DNA dentro da célula vegetal



Seleção



Regeneração da planta



Totipotência = capacidade de regeneração da planta a partir de uma única célula



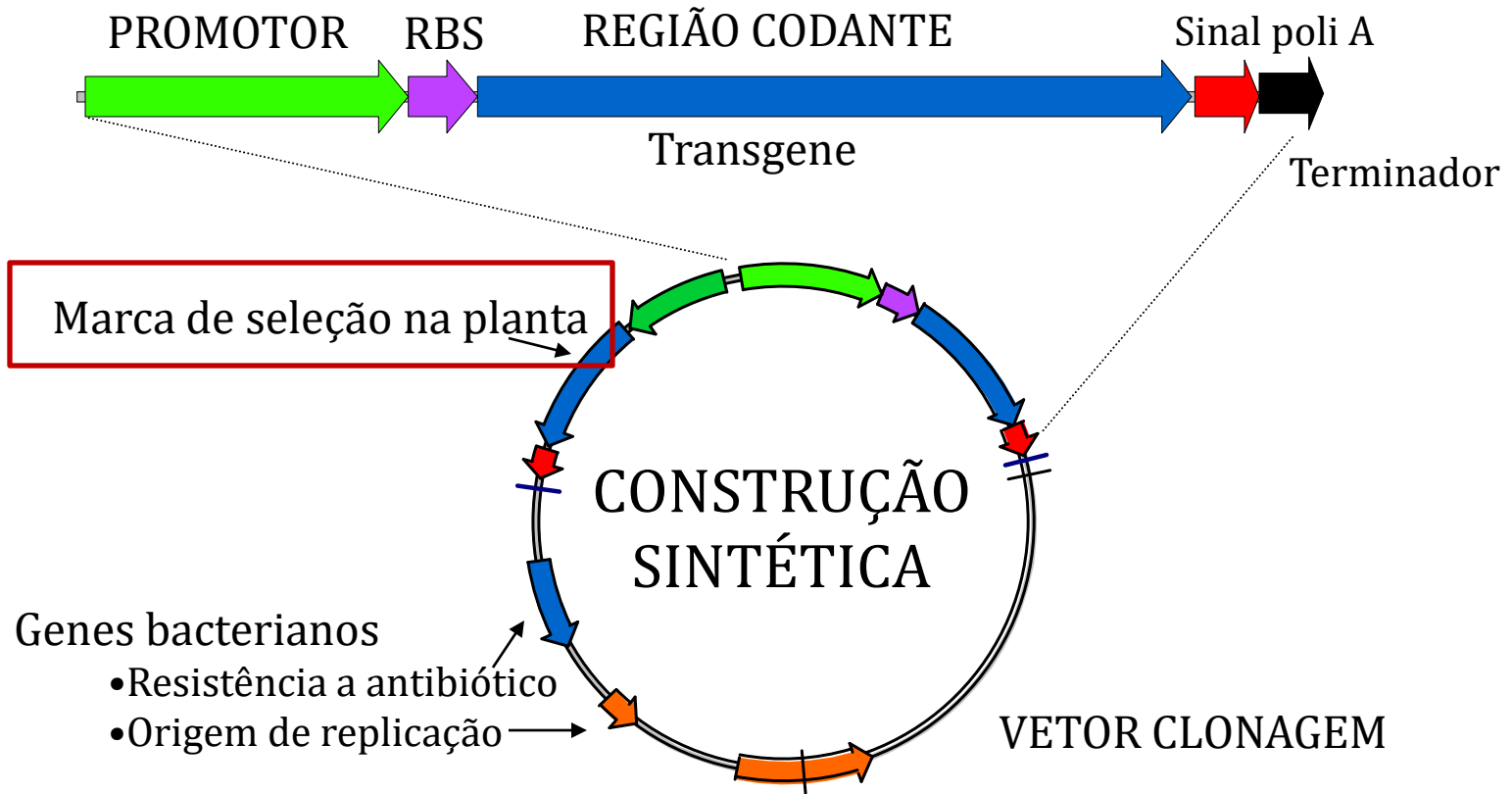
Confirmação



Melhoramento



Construção do Transgene

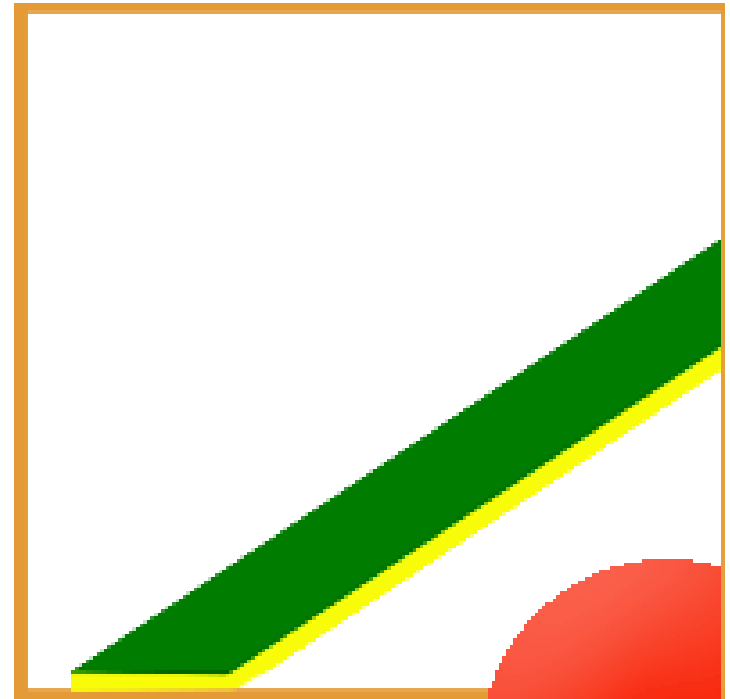


Transformação – Introdução do DNA

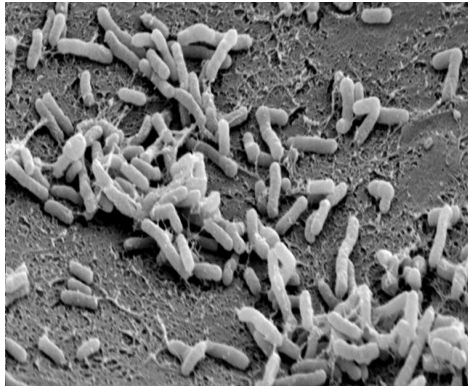
Bombardeamento de microprojéteis
“biolística” ou “*gene gun*”



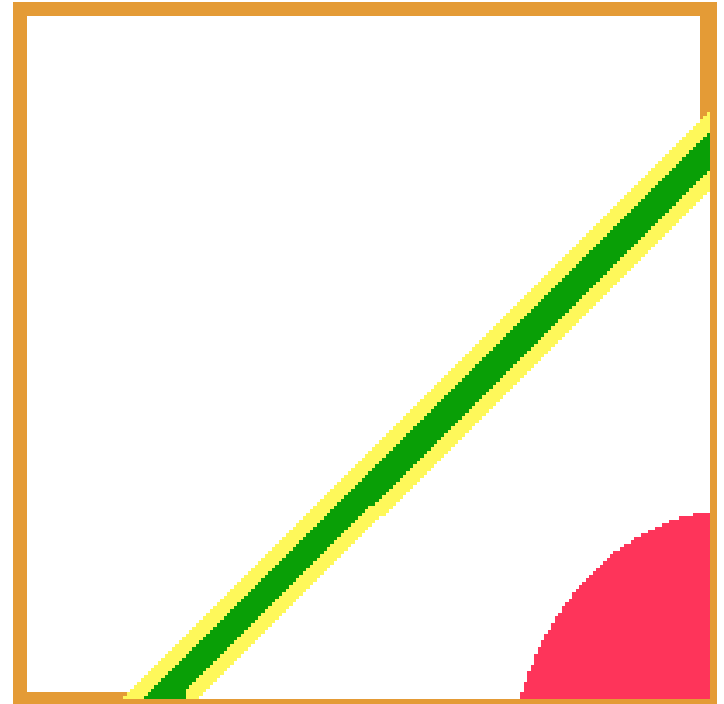
Partículas inertes são cobertas de
DNA e atiradas para dentro da
célula da planta.



Agrobacterium tumefaciens



Propriedade natural da bactéria *Agrobacterium* de transferir DNA para dentro da célula da planta.



Agrobacterium

- Bactéria do solo que tem a capacidade de transferir parte do seu DNA para dentro da célula da planta;
- No laboratório, a bactéria é colocada em cultura junto com as células de plantas, ou inoculada no tecido da planta, transferindo parte do seu DNA para as células da planta;

Bombardeamento

- Partículas de ouro ou tungstênio são cobertas com DNA e aceleradas em direção ao tecido da planta (hélio comprimido);
- As partículas perfuram a parede celular e penetram dentro da célula;
- Utilizado quando não é possível por incompatibilidade biológica o uso de *Agrobacterium* .

Raiz em cabeleira



<http://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5357075>



Galha da Coroa



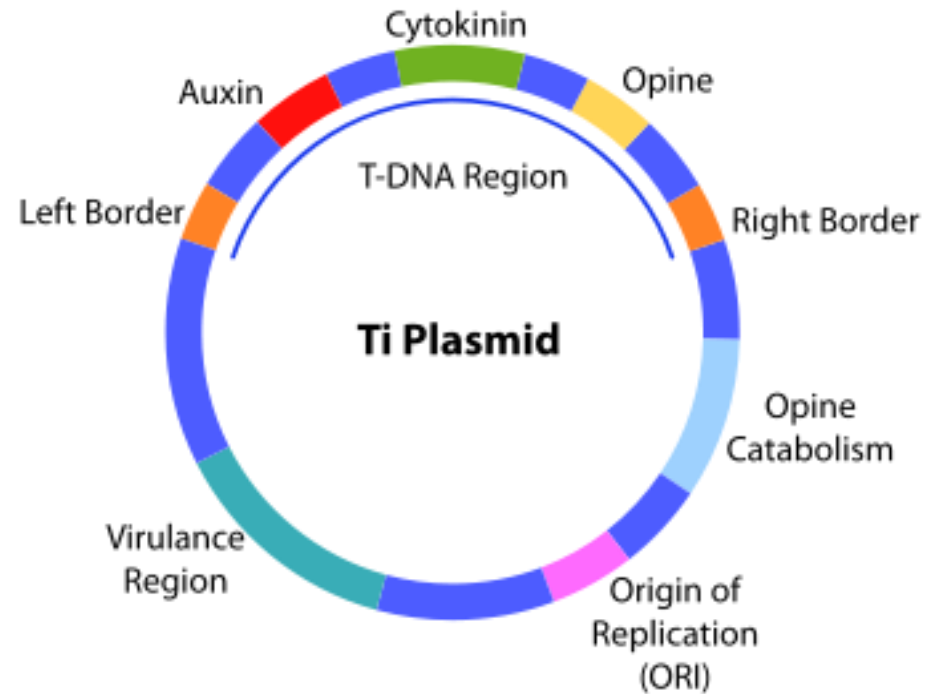
Agrobacterium

Quimiotactismo - fenóis, açúcares, aminoácidos.

T-DNA – segmento de DNA que é transferido para a célula vegetal;

Região vir genes responsáveis pelo corte e transferência do T-DNA;

Bordas- 25pb altamente conservados com funções ligadas a replicação, manutenção e estabilidade do plasmídeo Ti dentro da bactéria.

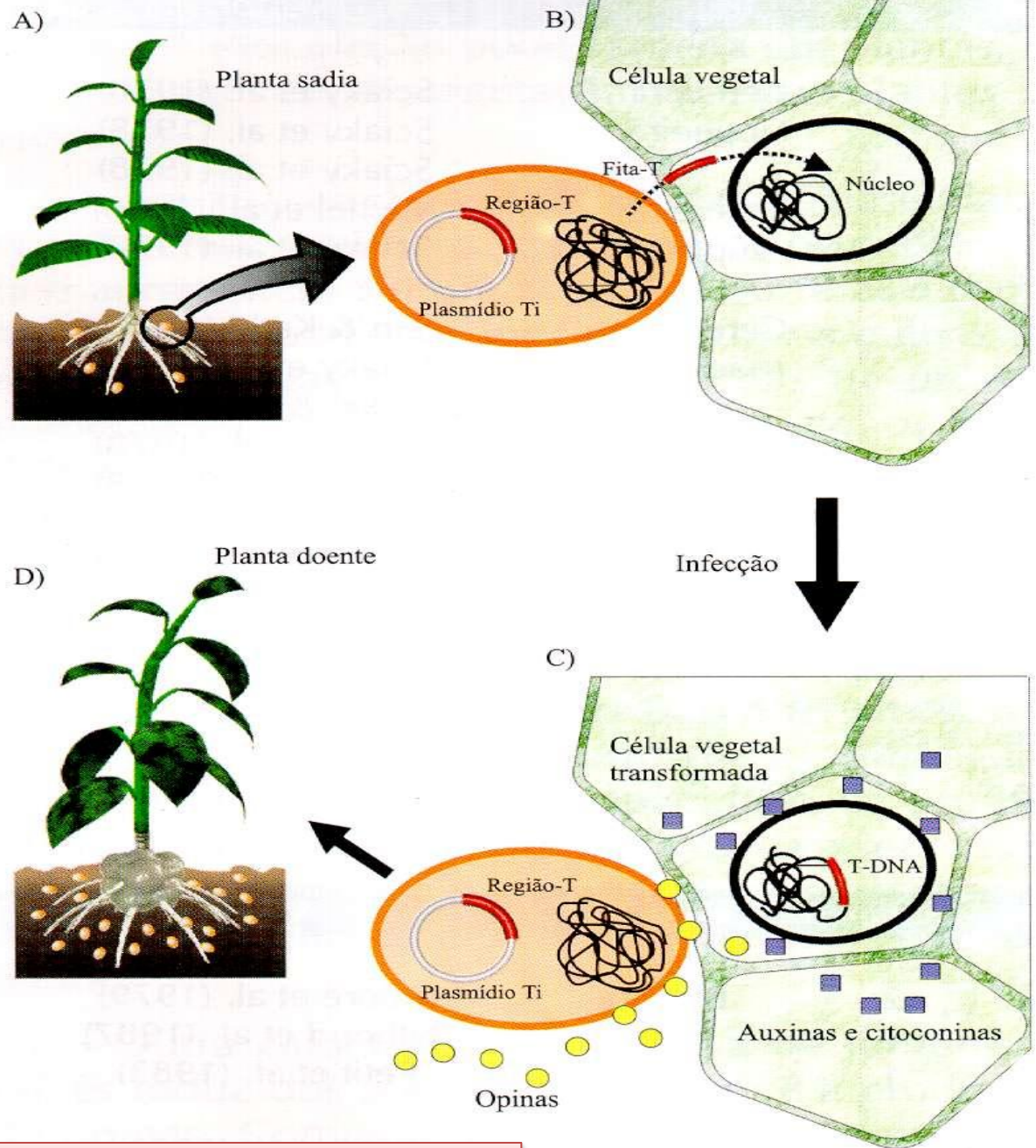


Ti = “*tumor inducing*”

T-DNA = “*transferred - DNA*”

<http://www.biotechnologia.com.br/revista/bio15/agrobac.pdf>

Patogenicidade natural de *A. tumefaciens*



Opinas: fonte de C e N para *Agrobacterium*

Técnica de maneira geral utilizada em Dicotiledôneas



SISTEMA ÚNICO DE INFECCÃO DE PLANTAS



TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE PLANTAS



**Ivo Zaenen
(1974)**



**Marie-Dell Chilton
(1977)**



**Patricia C. Zambryski
(1992)**

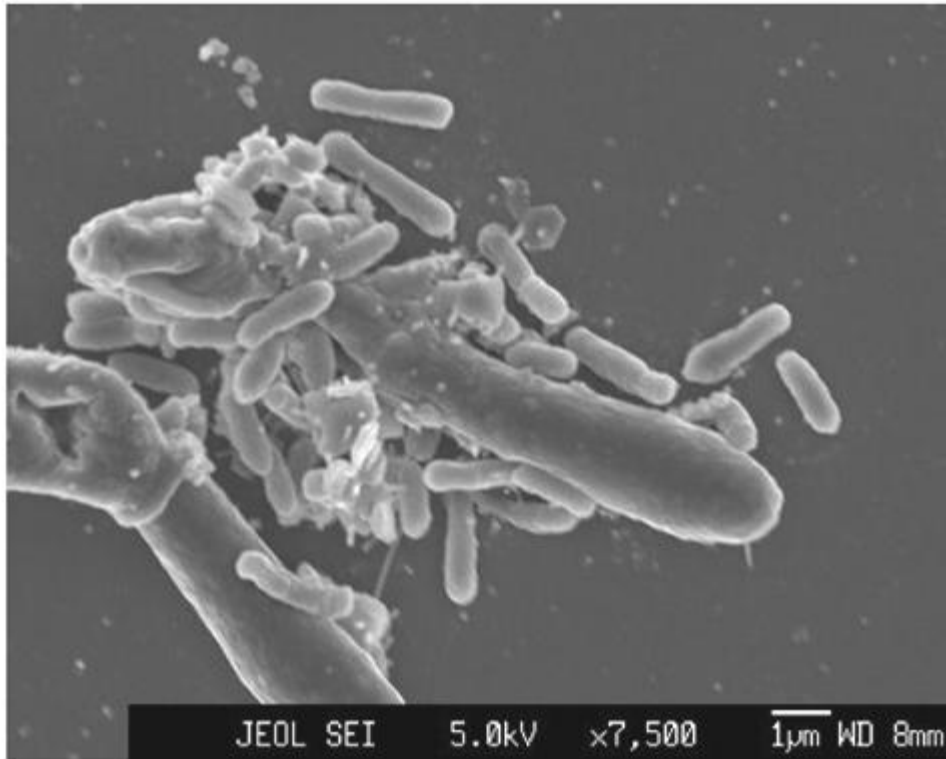
http://www.syngentabiotech.com/biotech/mary_dell_chilton.aspx

<http://www.plantphysiol.org/content/125/1/9.full>

<http://pmb.berkeley.edu/profile/pzambryski>



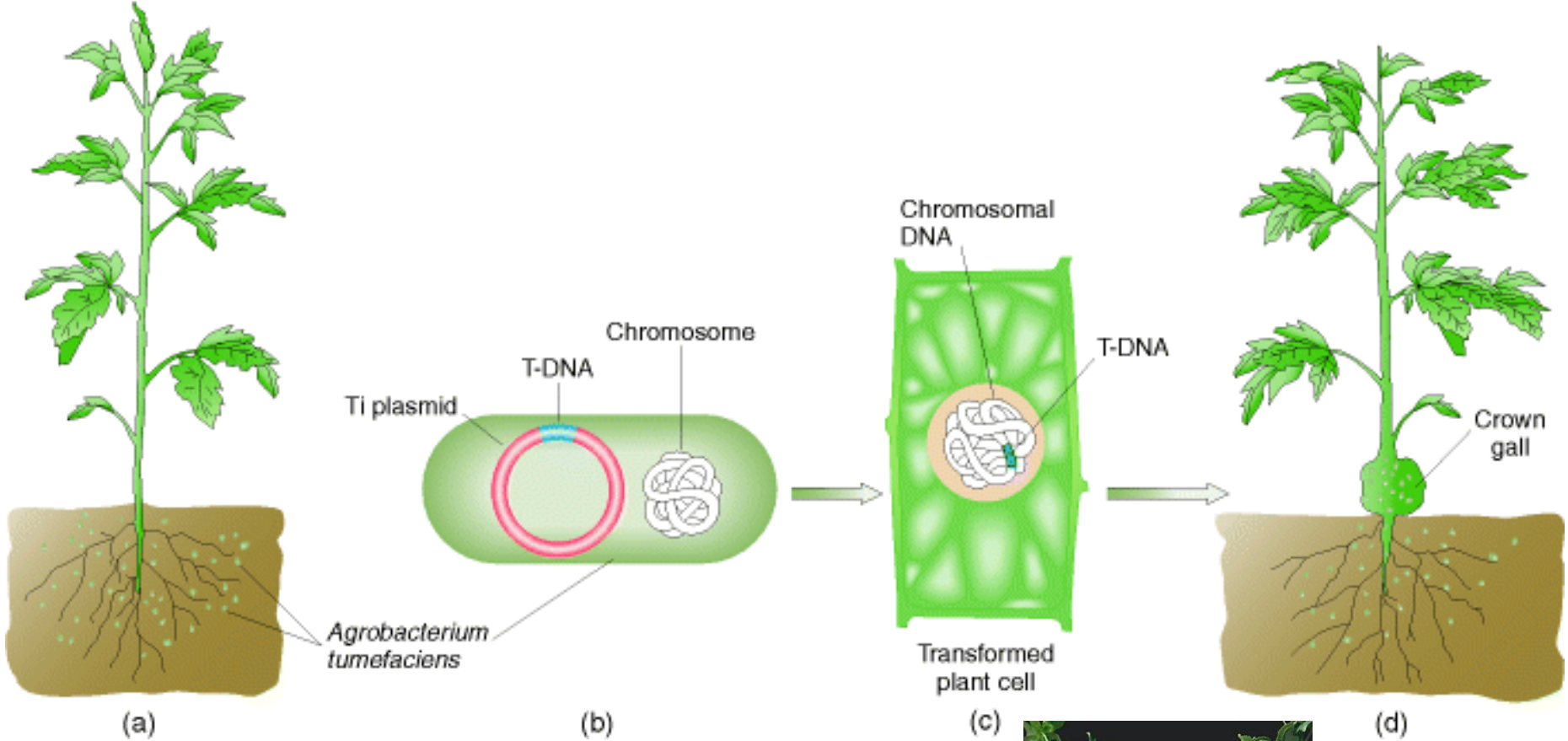
Scanning electron microscopy reveals several *Agrobacterium tumefaciens* as they begin to infect a **carrot cell**. In the process, the bacteria's genetic material will enter the plant cell. *Source: A. G. Matthyse, K. V. Holmes, R. H. G. Gurlitz*

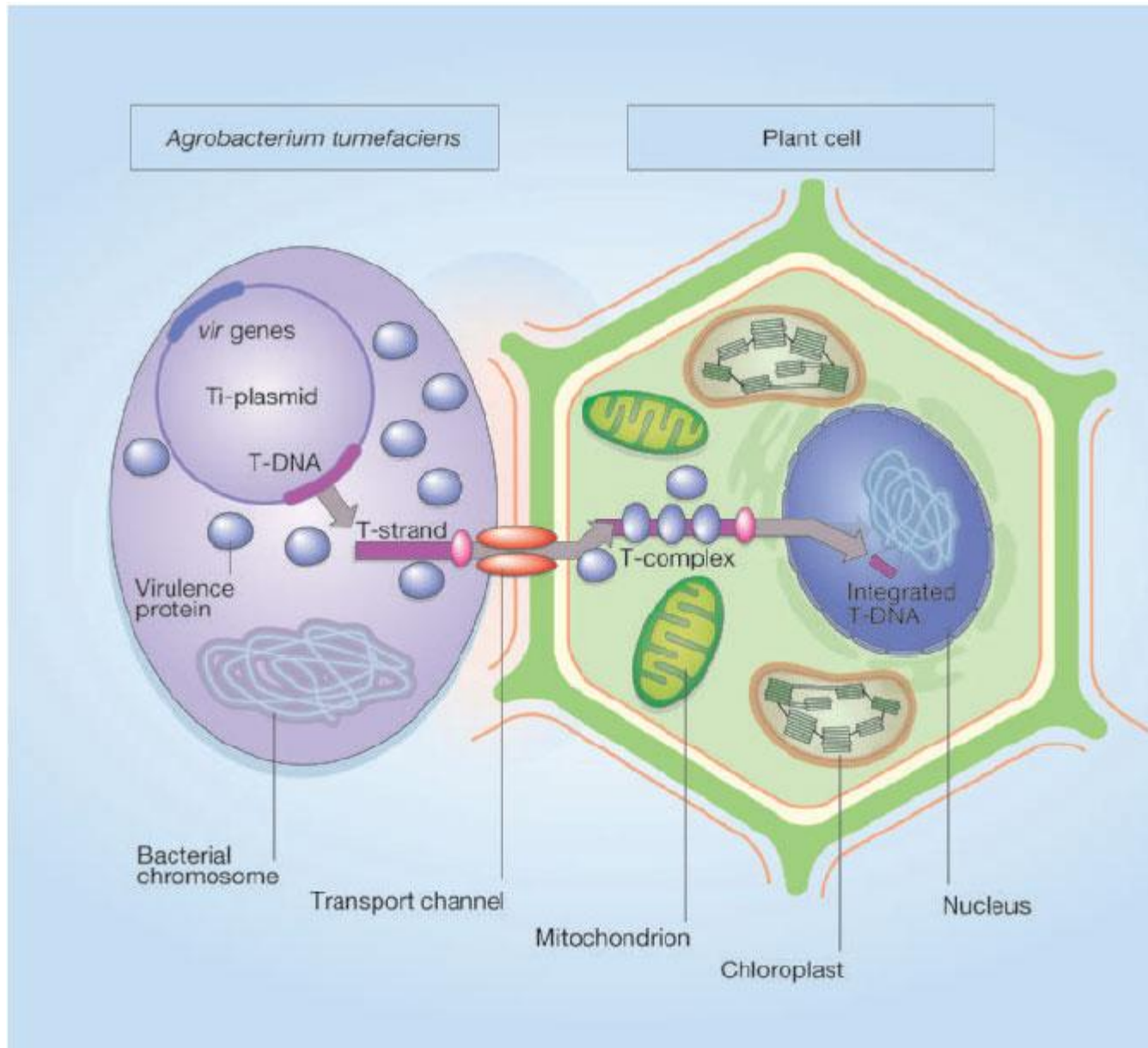


MEV

Transferência de material genético entre uma bactéria e um fungo

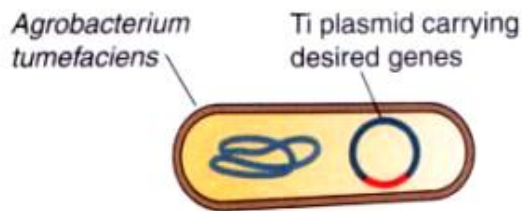
Metarhizium anisopliae* e *Agrobacterium tumefaciens. Microscópio: JEOL-JSM-6340F Field Emission SEM, da Universidade Federal do Rio de Janeiro. (Estudo sobre transferência de material genético da bactéria para o fungo)



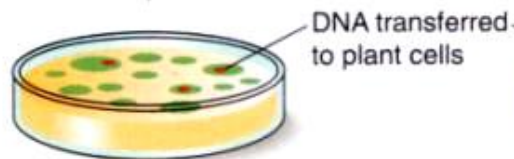


Agricultural biotechnology: Gene exchange by design (*Nature* 433, 583-584;10 February 2005)

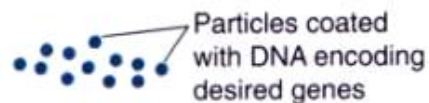
Agrobacterium method



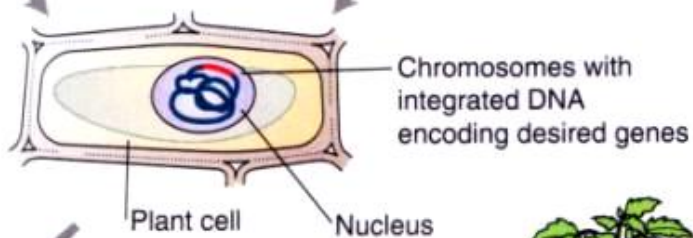
Cocultivation of *Agrobacterium* with plant pieces



Particle gun method



Bombardment of plant pieces with particles



Cell multiplication (callus)



Shoot regeneration followed by root regeneration



Plant with new trait

Transformação – Célula Alvo

Todos os protocolos de transformação introduzem o DNA nas células de plantas em cultura de tecidos

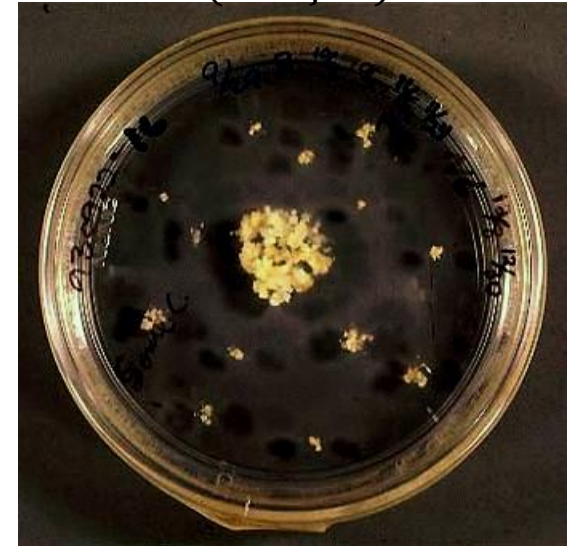
- ✓ Cultura de tecidos permite a regeneração de plantas férteis a partir de uma única célula;
- ✓ Grande número de células alvo na forma de calo;
- ✓ Estabelecimento, manutenção e regeneração de plantas é bastante trabalhoso e com um alto grau de dificuldade;
- ✓ Métodos estão limitados a alguns genótipos, geralmente de variedades não comerciais;
- ✓ Pode introduzir mutações não desejáveis.



Transformação – Seleção

- ✓ 1 in 1000 células terá o DNA integrado no genoma;
- ✓ Células transformadas são marcadas pela co-introdução de um gene de resistência a agentes seletivos;
- ✓ Células transformadas são selecionadas pela morte de células não transformadas pelo agente seletivo;
- ✓ 2 principais agentes seletivos:
 - antibióticos
 - herbicidas
- ✓ Marcadores seletivos auxiliam os passos seguintes de estudos sobre a herança do transgene.

Células em cultura
(seleção)



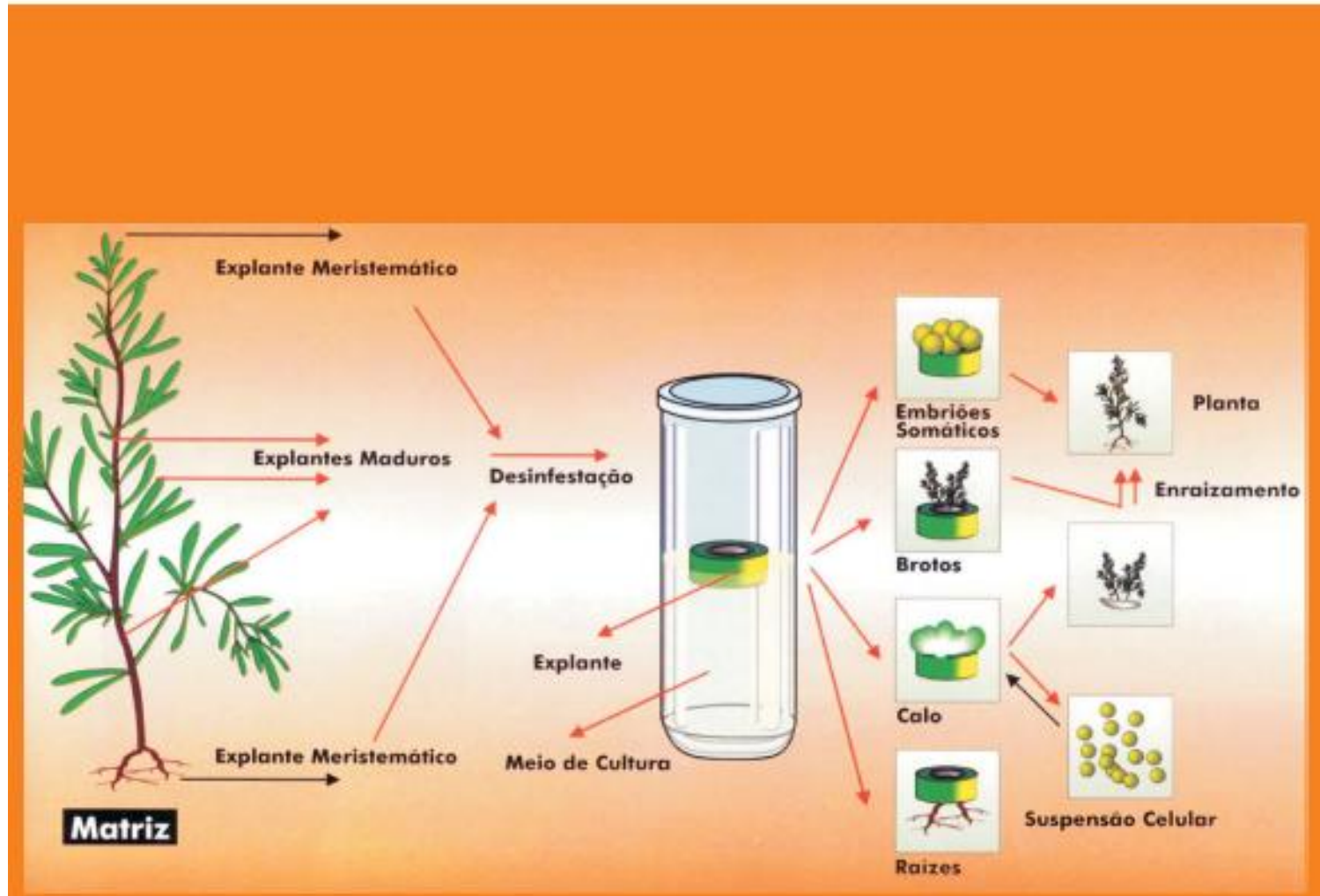
Ensaio resistência a herbicida
transgênico não-transgênico
Resistente Suscetível



Etapas no laboratório



Princípios da Cultura de Tecidos Vegetais



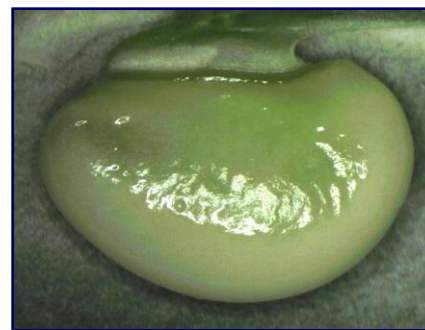
Planta regenerada



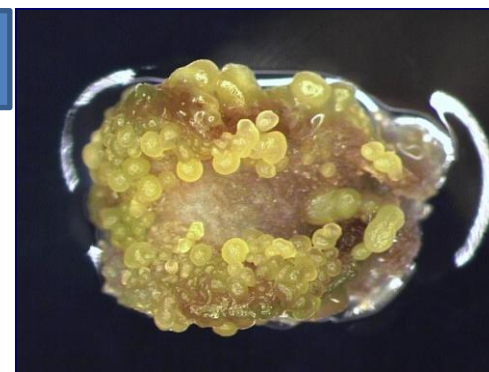
Germinação



Cultura de tecidos de soja



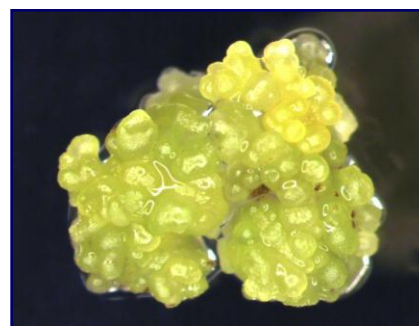
Sementes imaturas



Desenvolvimento



Proliferação



Com o auxílio da
engenharia genética

Pelos métodos
clássicos

Fonte de Genes

Plantas, Bactérias,
Fungos e Vírus

Identificação, Isolamento,
síntese de genes

Transferência de
genes para células

Regeneração de
plantas

Plantas da mesma
espécie ou relacionadas

Avaliação de
caracteres
importantes

Hibridização

Avaliação

Testes
quantitativos

Testes qualitativos

Seleção

Avaliação Final

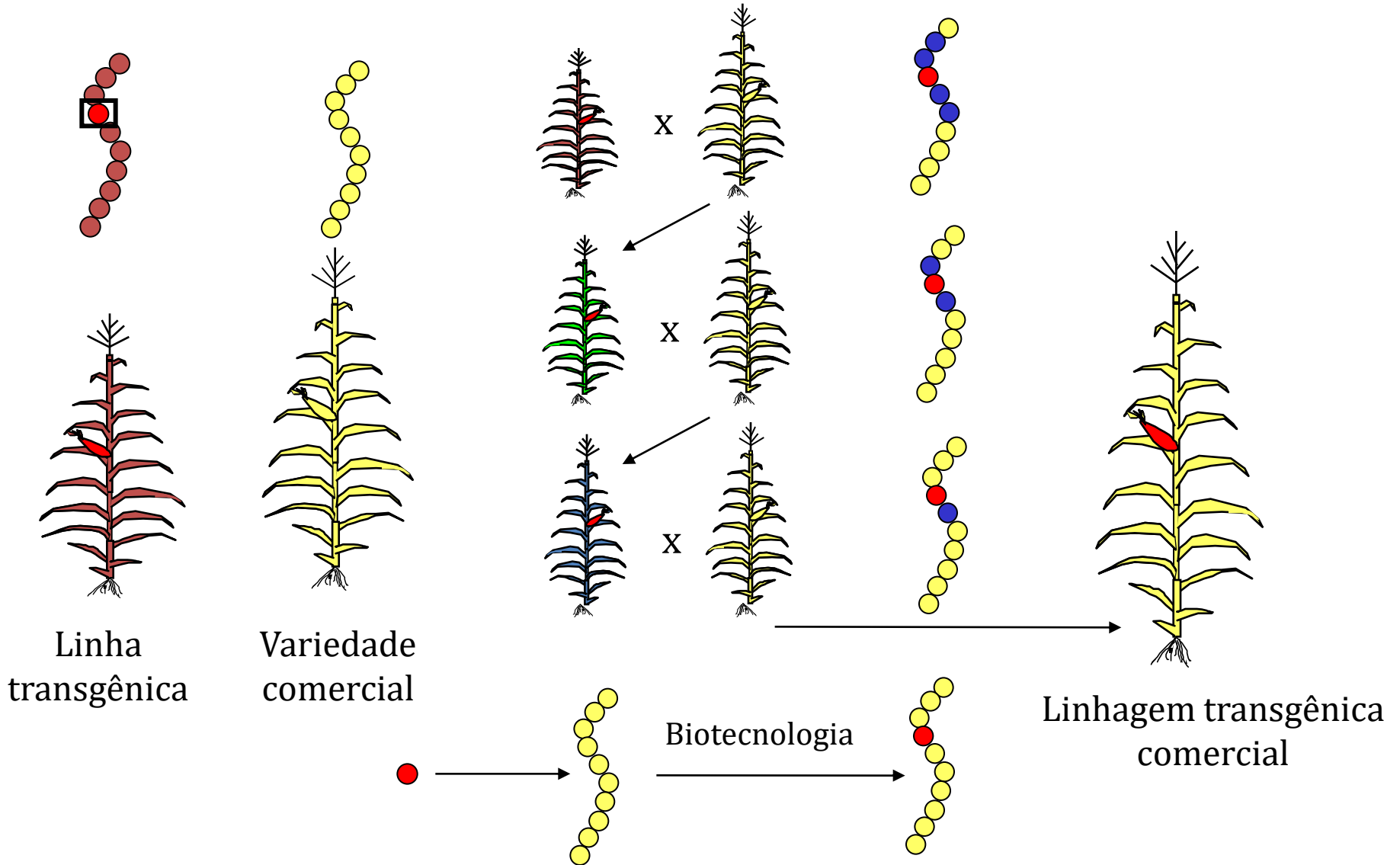
Variedade
Comercial

V
A
R
I
A
Ç
Ã
O

S
E
L
E
Ç
Ã
O

Construção da variedade transgênica

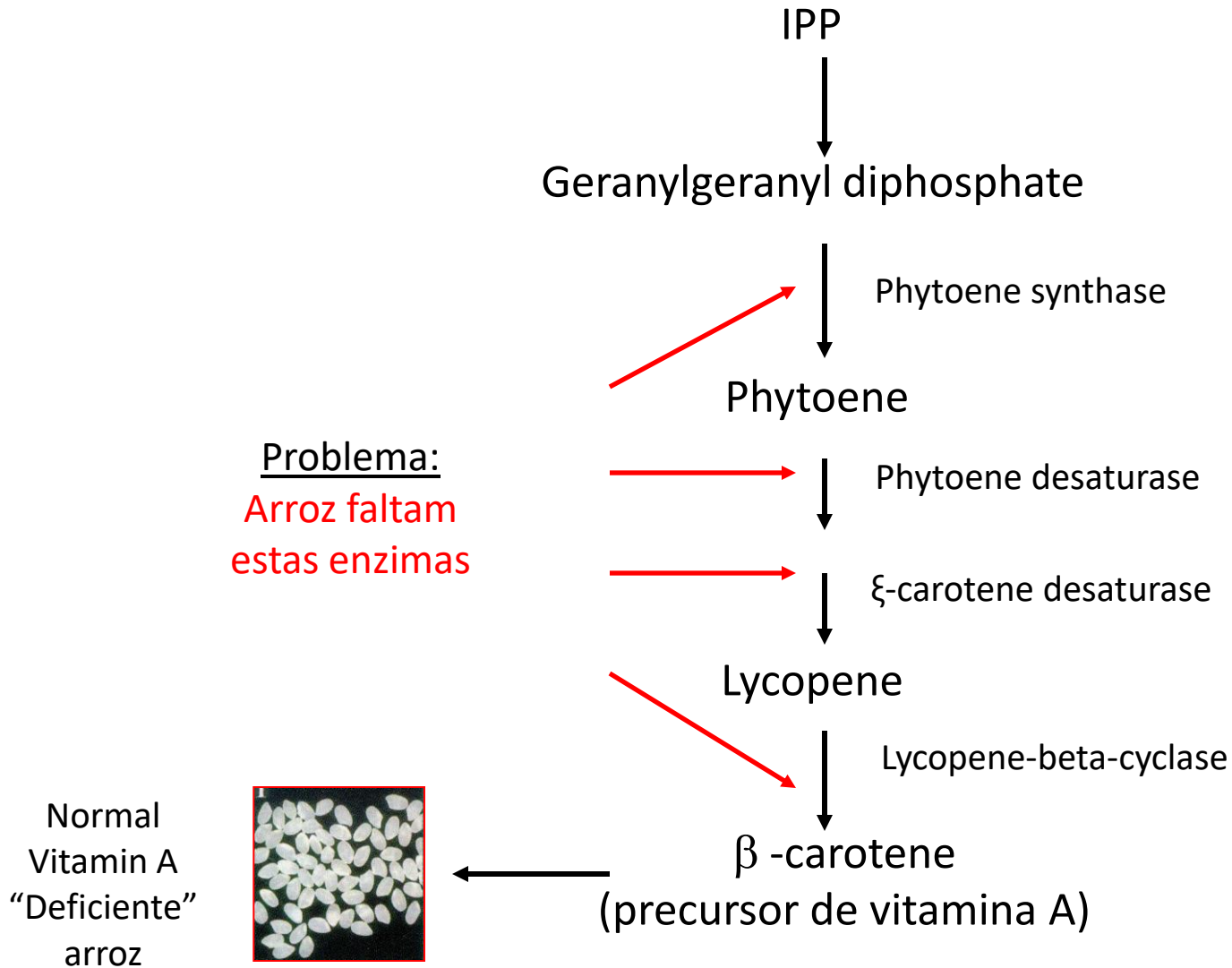
Retrocruzamento e seleção (6 - 8 gerações)



The Golden Rice Story

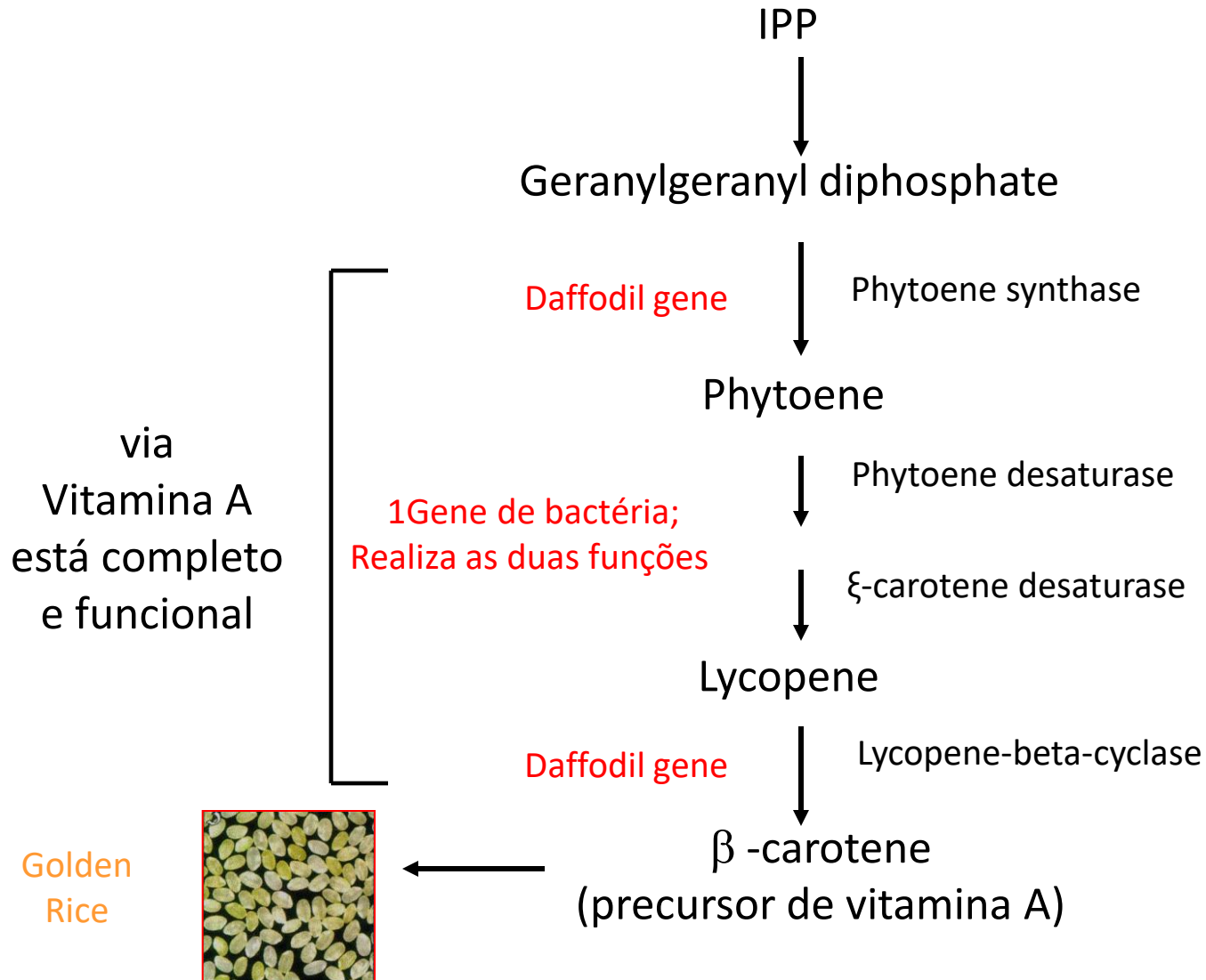
- Deficiência em vitamina A é um problema importante de saúde pública
 - Causa cegueira
 - Influencia na severidade de diarreias e sarampo
- >100 milhões de crianças tem este problema
- Para muitos países a infra-estrutura não existe para entregar pílulas de vitaminas
- Melhorar o conteúdo de vitamina A em cereais parece uma alternativa atrativa

Via do β -Caroteno em Plantas



The Golden Rice Solution

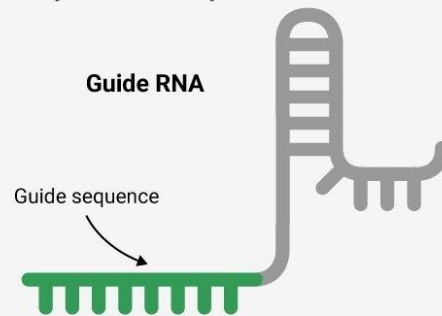
Adicionar os genes da via do β -Caroteno



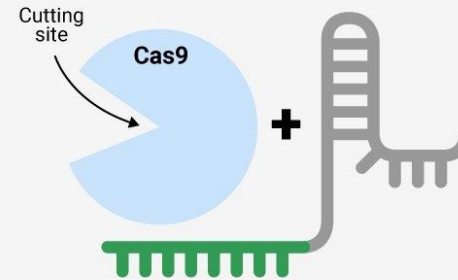
FIQUE DE OLHO, NOVAS TÉCNICAS VEM SURGINDO!

EDITING A GENE USING THE CRISPR/CAS9 TECHNIQUE

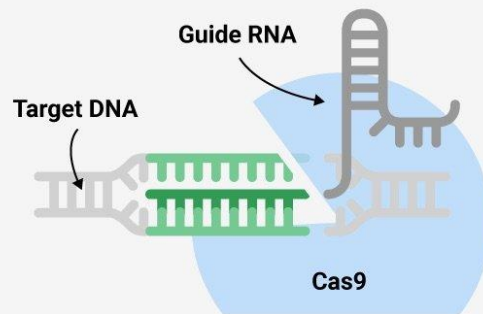
- 1** Scientists create a genetic sequence, called a "guide RNA," that matches the piece of DNA they want to modify.



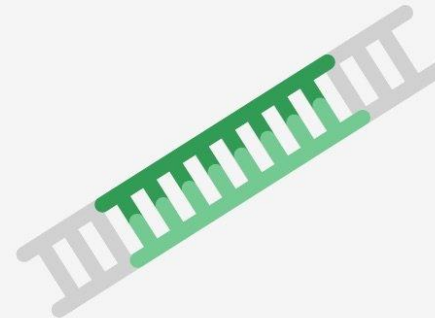
- 2** This sequence is added to a cell along with a protein called Cas9, which **acts like a pair of scissors** that cut DNA.



- 3** The guide RNA homes in on the target DNA sequence, and Cas9 **cuts it out**. Once their job is complete, the guide RNA and Cas9 leave the scene.



- 4** Now, another piece of DNA is swapped into the place of the old DNA, and **enzymes repair the cuts**. Voilà, you've edited the DNA!



SOURCES: Nature News; Carl Zimmer

BUSINESS INSIDER

Notícias

16/06/16 | Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação | Melhoramento genético

Técnica de edição de genoma promete revolucionar a ciência



Tweet



Compartilhar

46



G+1



Foto: Jennifer Doudna/UC Berkeley



CRISPR, do inglês Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, é uma tecnologia de edição de genoma que permite identificar genes de interesse, no DNA de qualquer espécie, e modificá-lo de acordo com as necessidades da pesquisa, sem a inclusão de genes de outras espécies.

Segundo o pesquisador Alexandre Nepomuceno, da Embrapa Soja (Londrina, PR), um dos pioneiros na utilização do CRISPR na Empresa, essa tecnologia é relativamente nova – começou a ser utilizada na agricultura em 2014.

"Já existiam ferramentas de edição de genoma, mas eram muito complexas. O CRISPR é mais acessível. Qualquer laboratório com treinamento adequado tem a capacidade de usar essa ferramenta para editar um genoma", explica o pesquisador.

De acordo com ele, o CRISPR funciona como um corretor ortográfico. "Por exemplo: no caso de uma doença genética, fruto de uma mutação nas bases nitrogenadas da cadeia de DNA, é possível corrigir isso por meio dessa ferramenta".

Nepomuceno explica que o sistema CRISPR é composto por substâncias químicas: uma molécula de RNA e uma proteína. A combinação dessas duas substâncias consegue localizar a sequência de DNA que se quer modificar dentro do núcleo da célula e a modifica.

A técnica foi descoberta estudando o sistema imunológico de bactérias, que quando são atacadas por um vírus guardam pedaços da informação do DNA desse organismo que ela destruiu. Assim, toda vez que a bactéria é invadida pelo mesmo vírus, ela o reconhece rapidamente.



[日本語要約](#)

Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype

[Hao Yin](#), [Wen Xue](#), [Sidi Chen](#), [Roman L Bogorad](#), [Eric Benedetti](#), [Markus Grompe](#), [Victor Koteliansky](#), [Phillip A Sharp](#), [Tyler Jacks](#) & [Daniel G Anderson](#)

[Affiliations](#) | [Contributions](#) | [Corresponding author](#)

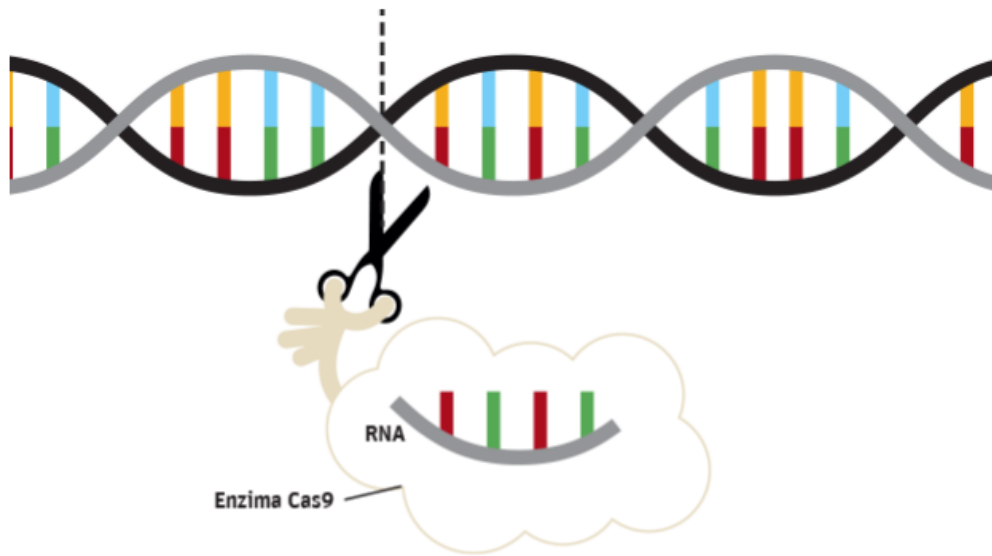


O MUNDO DO CRISPR

Nova técnica de edição genética pode mudar completamente desde a área da saúde até produção de combustível

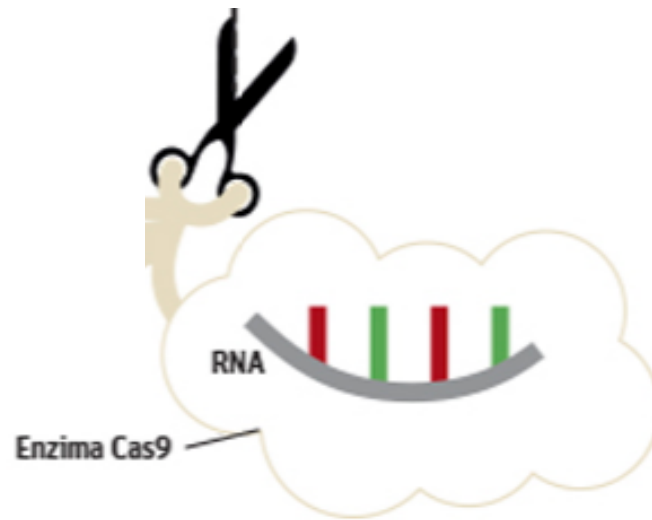
Feito com o
thinglink..

SABER MAIS >



EDIÇÃO GENÔMICA

Conheça a técnica que permite fazer mudanças precisas no DNA

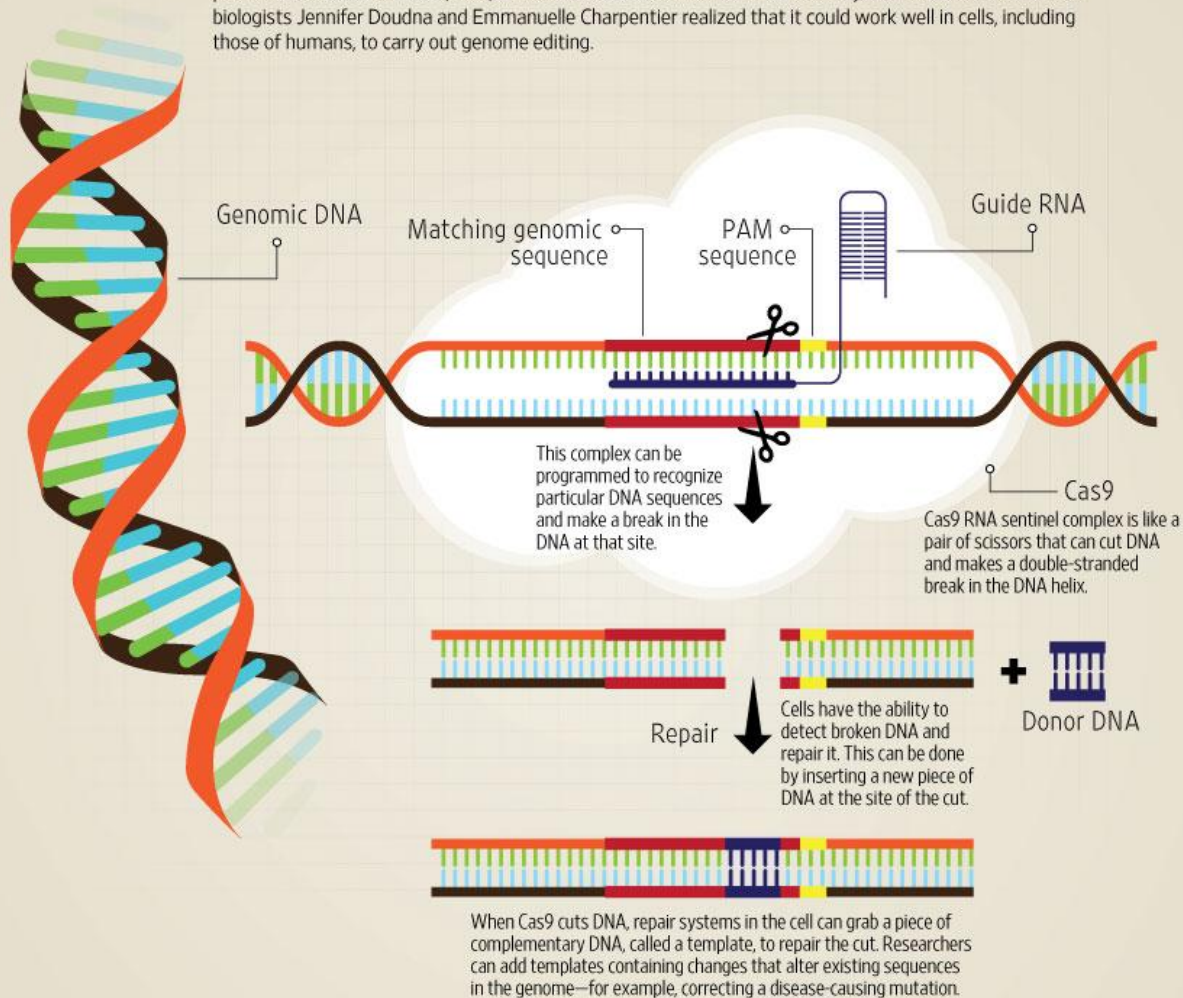


EXEMPLOS

Um dos casos de sucesso já reportados pelos cientistas envolve o reparo de proteínas importantes para a contração do músculo, melhorando a distrofia muscular; em outro caso, alterou-se o DNA de mosquitos, reduzindo a transmissão de malária

HOW CRISPR WORKS

CRISPR-Cas9, abbreviated from clustered regularly-interspaced short palindromic repeats, is a hybrid of protein and ribonucleic acid (RNA) which works as an efficient hunt-and-cut system in bacteria. Molecular biologists Jennifer Doudna and Emmanuelle Charpentier realized that it could work well in cells, including those of humans, to carry out genome editing.



● When viruses infect a cell, they inject their DNA. In bacterium, the CRISPR system allows that DNA to be plucked out of the virus and inserted in little bits

into the chromosome of the bacterium.

● These integrated bits of viral DNA get inserted at a site in the bacteria.

● CRISPR allows cells to record over time the viruses that they have been exposed to, so that cells are protected from those viruses.



TECHNOLOGY QUARTERLY THE FUTURE OF AGRICULTURE

Factory fresh

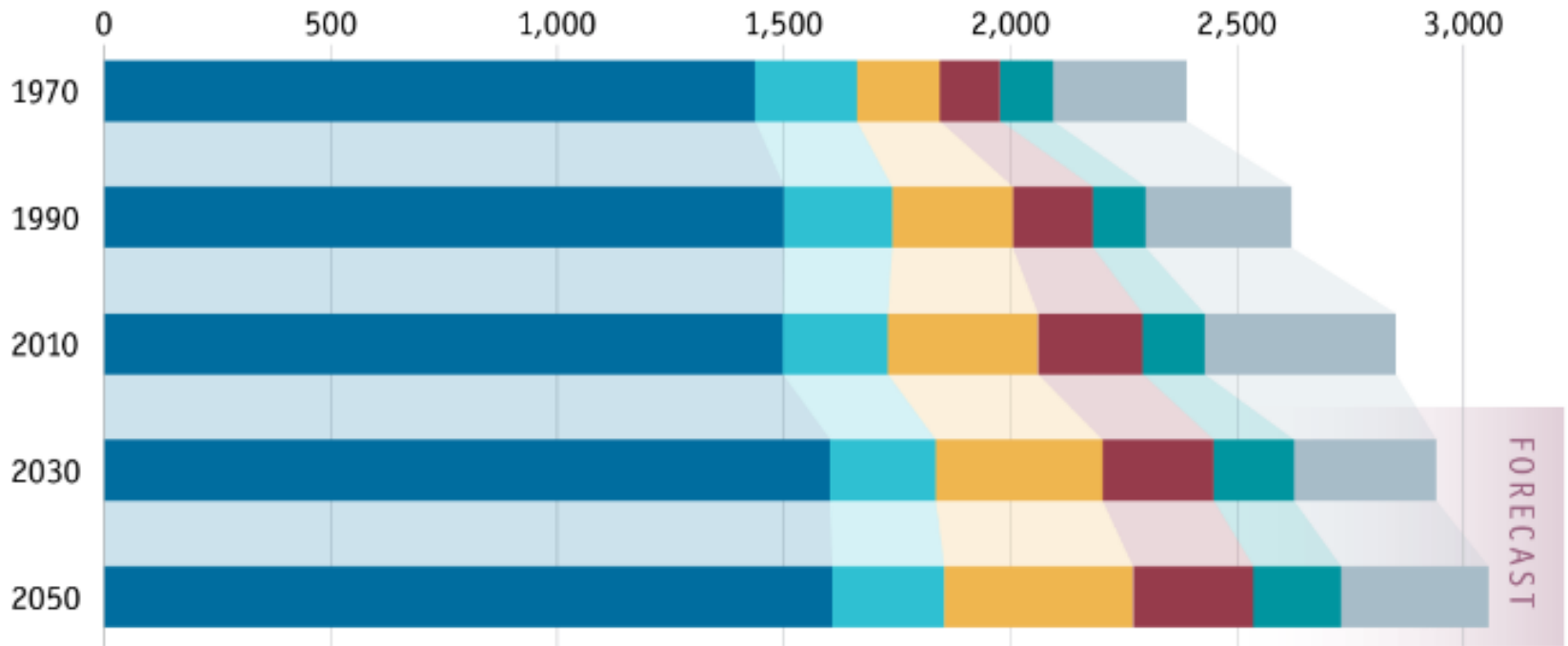
1

<http://www.economist.com/technology-quarterly/2016-06-09/factory-fresh>

What's on the world's menu

Daily calories per person by type of food

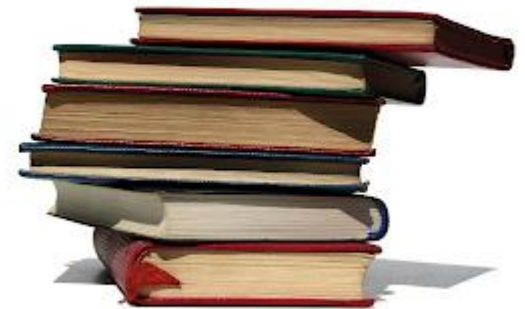
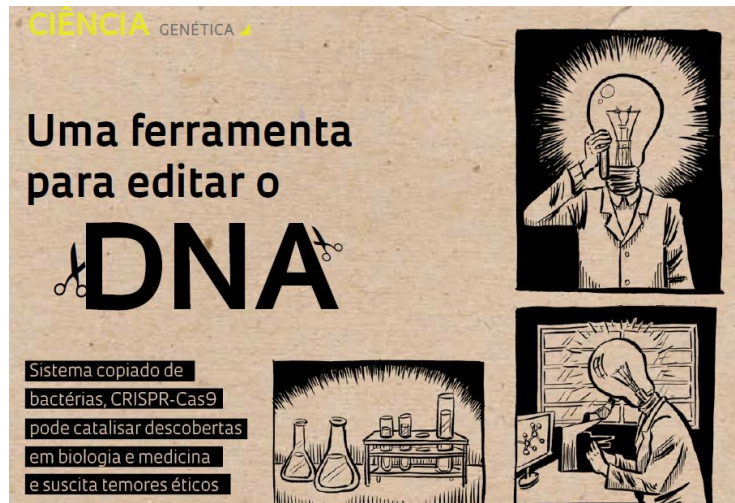
Cereals, roots and pulses Sugar Vegetable oils Meat Dairy Other



Source: FAO

BIBLIOGRAFIA RECOMENDADA

Biotecnologia Aplicada ao Melhoramento de Plantas
Ed(s) Borém, A. Fritsche-Neto, R. (2013)
Cap 7 – Plantas Transgênicas, pp. 229-266.



ESTUDO DIRIGIDO

1. Conceitos referentes a transgênicos
2. Transformação por agrobactéria
3. Transformação por biobalística
4. A importância da cultura de tecido na transformação de plantas
5. Novas tecnologias

NO RESTAURANTE
TRANSGÊNICO...



Animação da expressão de GFP em tecidos de soja

