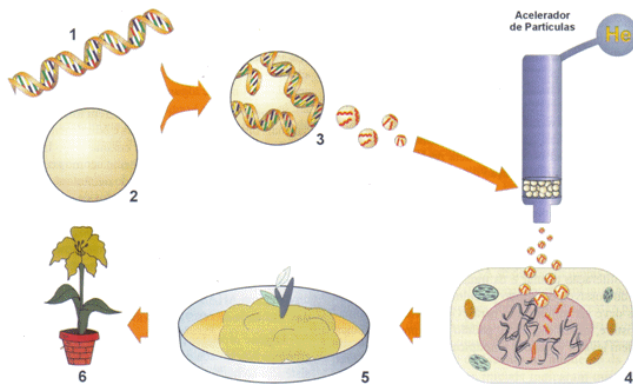


LGN0232 - Genética Molecular

Métodos de Transformação de Plantas

7^a aula



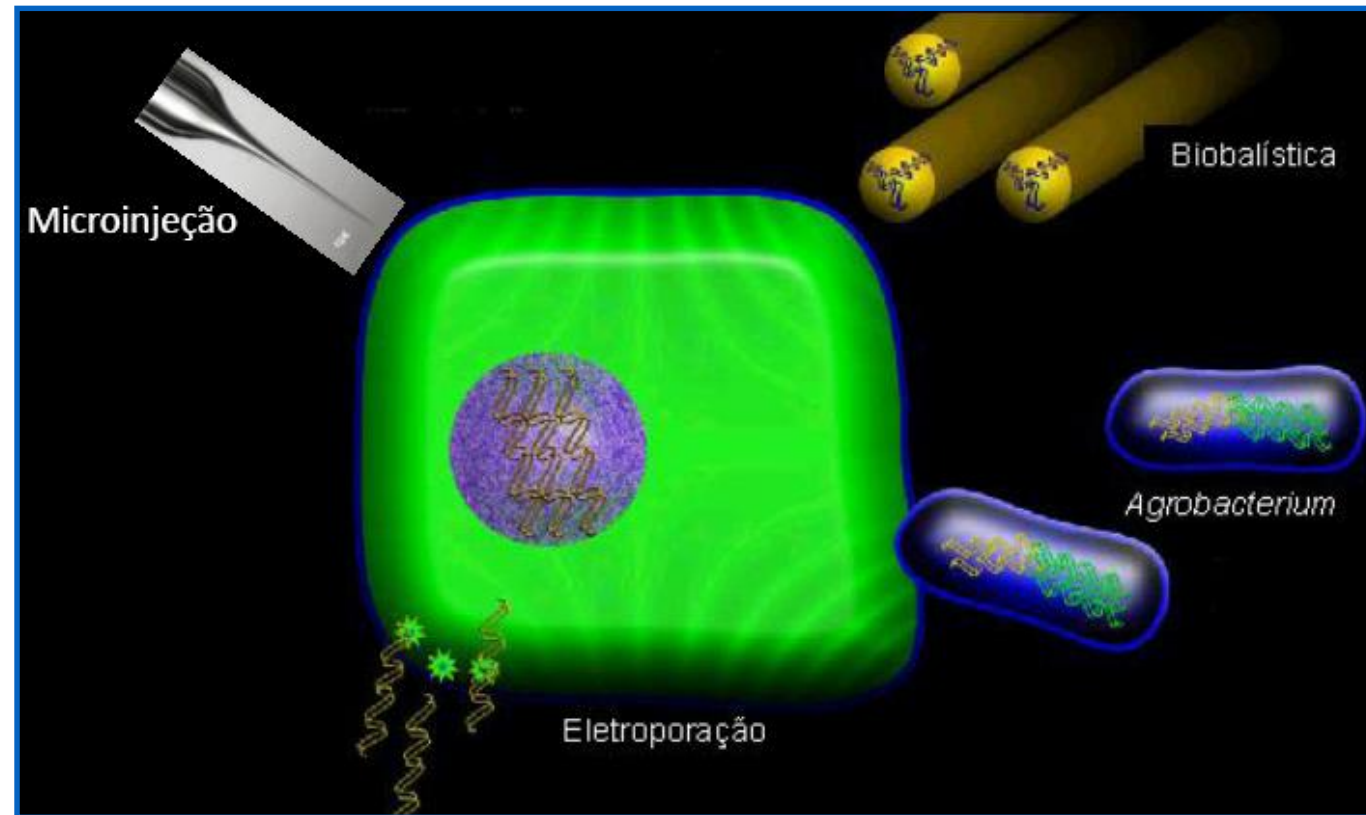
Antonio Figueira
CENA
figueira@cena.usp.br

Conceitos Importantes

- O processo de introdução de sequências (genes) de interesse em organismos chama-se **transformação genética**
- O gene sendo transferido para o organismo é chamado de **transgene**
- Organismos com modificações genéticas que recebem um **transgene** são denominados de **transformados** ou **transgênicos**;
- Denominação mais ampla = **Organismos Geneticamente Modificados (OGM)**

NÃO É TODO OGM QUE É UM TRANSGÊNICO!

Métodos de Introdução de Genes na Célula



Altamente dependente do organismo!

Engenharia Genética em Plantas

OGM = Organismos Geneticamente Modificado

GMO = Genetically Modified Organism

Exemplos de culturas atuais

Culturas resistentes à **herbicida**



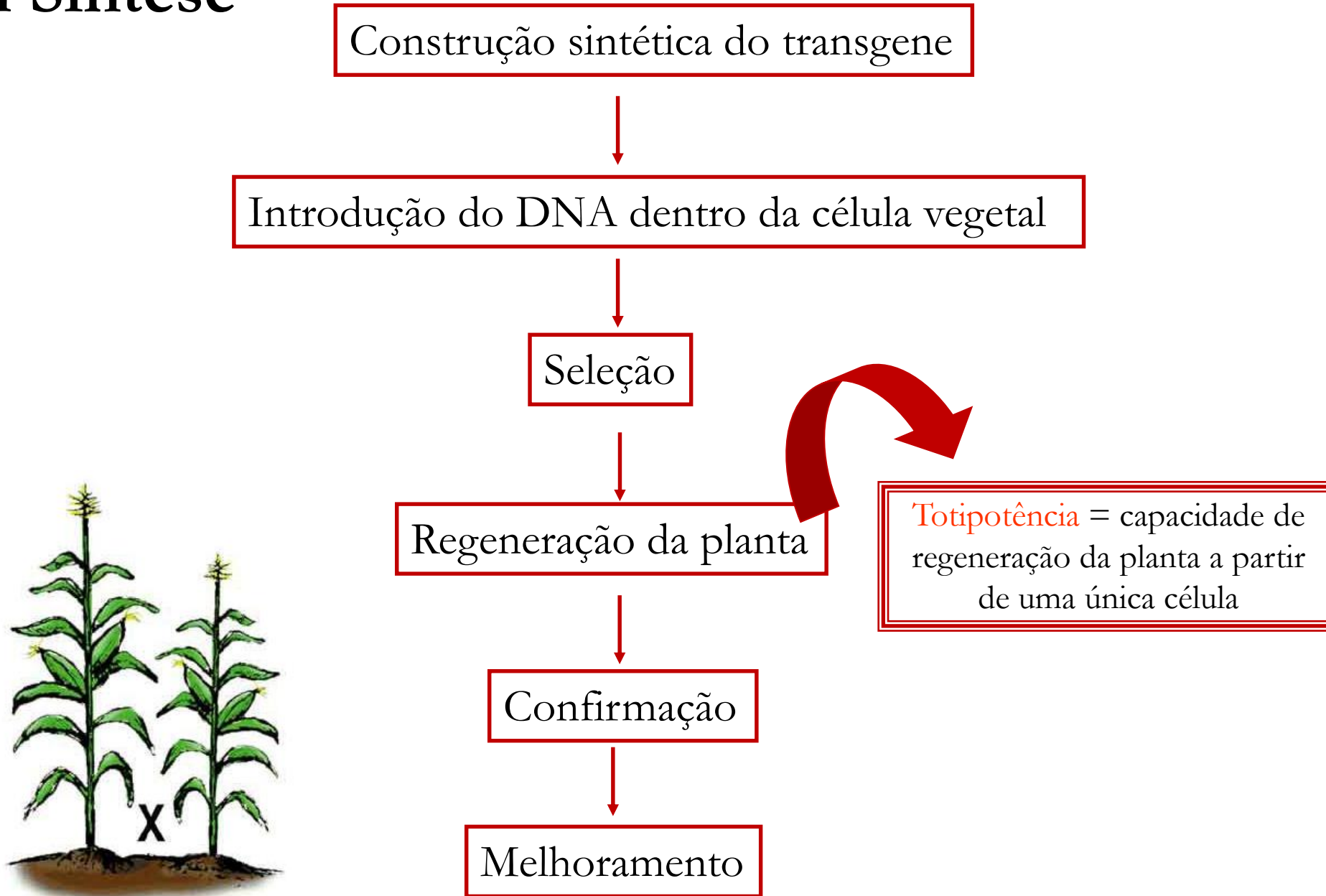
- soja
- milho
- canola
- outras

Culturas resistentes à **insetos**



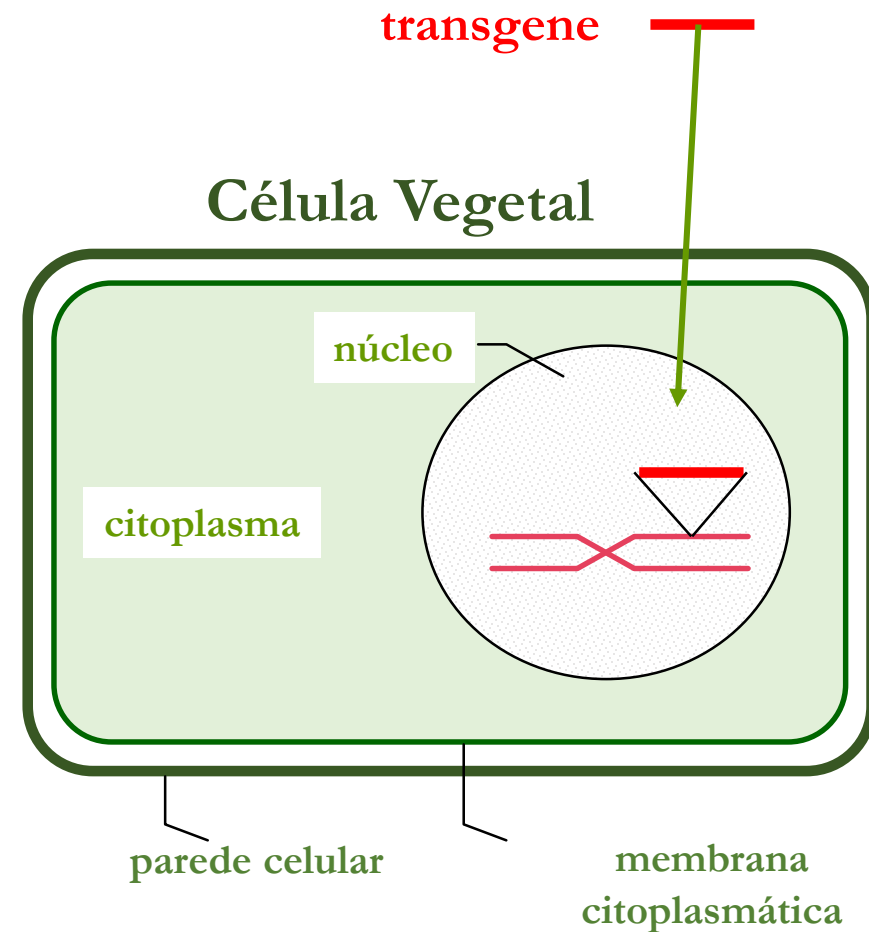
- algodão
- batata
- milho

Em Síntese



Transferindo DNA para Células de Plantas

1. DNA pode ser transferido para a célula vegetal por **meio biológico** (via *Agrobacterium*) ou **físico** (bombardeamento com micropartículas),
2. DNA deve cruzar várias barreiras,
3. DNA deve se integrar ao cromossomo no núcleo da célula vegetal,
4. Cada célula transformada é única
5. Número de células transformadas é mínimo.



Métodos para a Introdução do Transgene na Planta

Agrobacterium

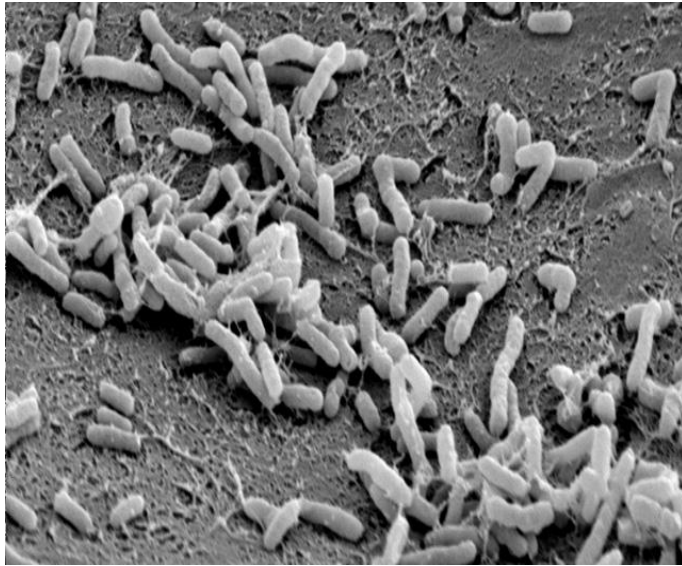
- Bactéria fitopatogênica do solo que tem a capacidade de transferir parte do seu DNA para dentro da célula da planta
- No laboratório, a bactéria é colocada em cultura junto com as células de plantas, ou inoculada no tecido da planta, transferindo parte do seu DNA para as células da planta

Bombardeamento (Biobalística)

- Micropartículas de ouro ou tungstênio são recobertas 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* - em monocotiledôneas.

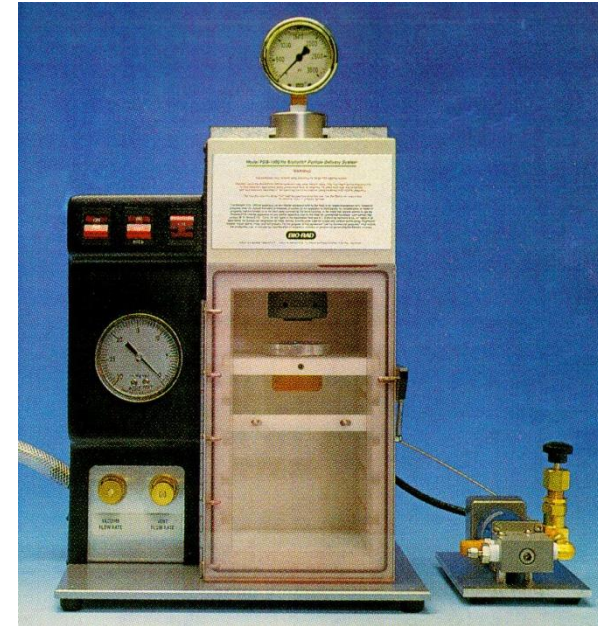
Método Biológico x Físico

Agrobacterium tumefaciens



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

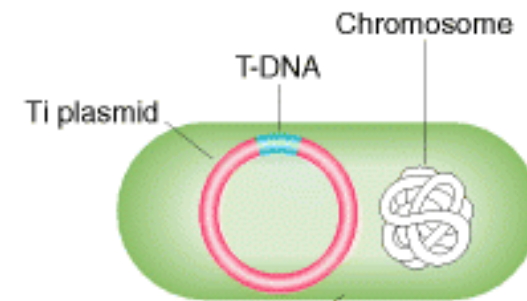
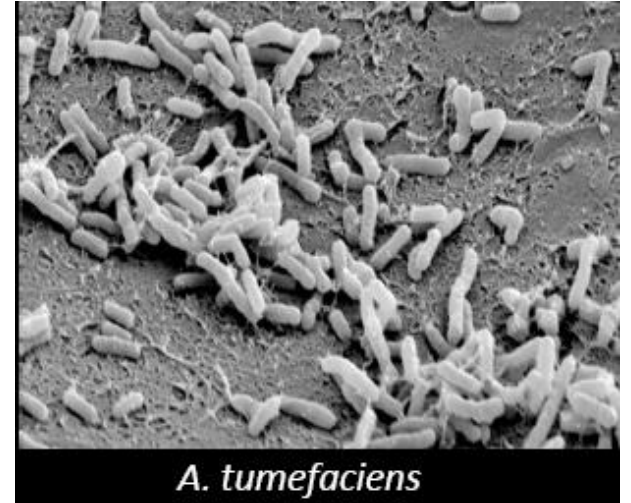
Bombardeamento de microprojéteis
“Biolística” ou *gene gun*



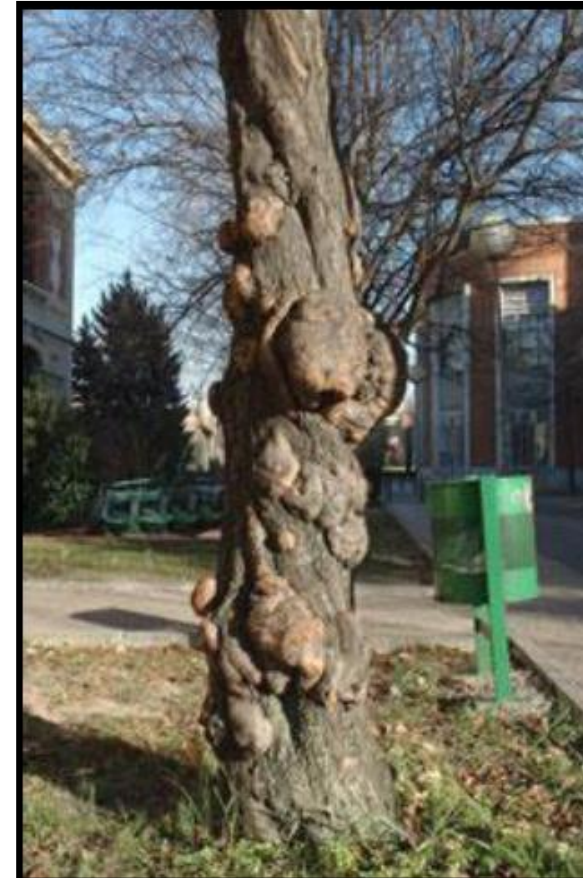
Partículas são cobertas de DNA e aceleradas para dentro da célula da planta.

Agrobacterium tumefaciens

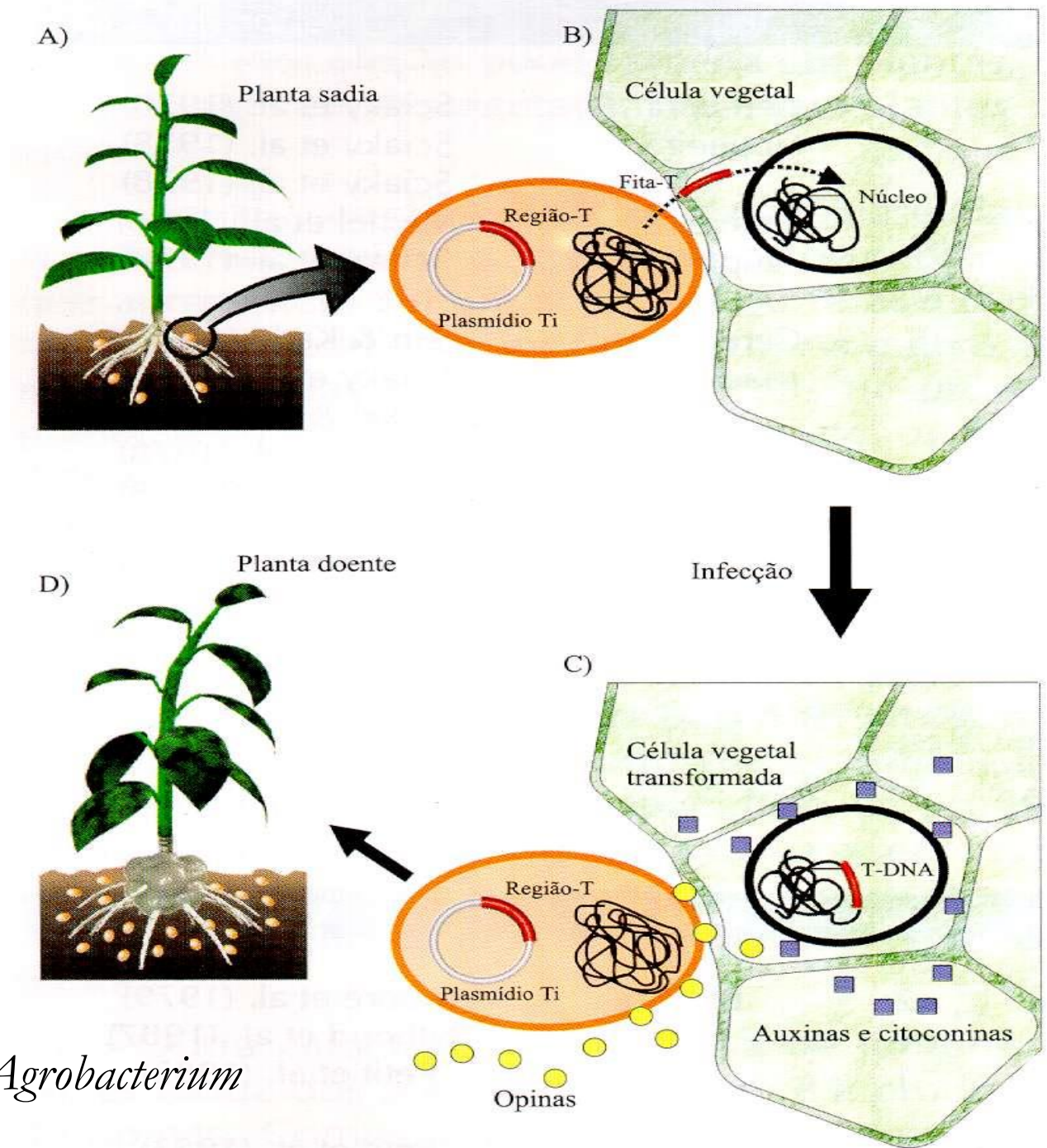
- Bactéria de solo Gram-negativa, tipo bacilo
- Causa ‘galha da coroa’ (*crown gall* disease): videira, maçã, etc.
- Afeta mais dicotiledôneas e pouco monocotiledôneas
- Família Rhizobiaceae
- Outras espécies:
 - *Agrobacterium rhizogenes* -raiz em cabeleira (“*hairy root*”)
 - *Agrobacterium radiobacter* - não tumorogênica (sem Ti)



Galha da Coroa

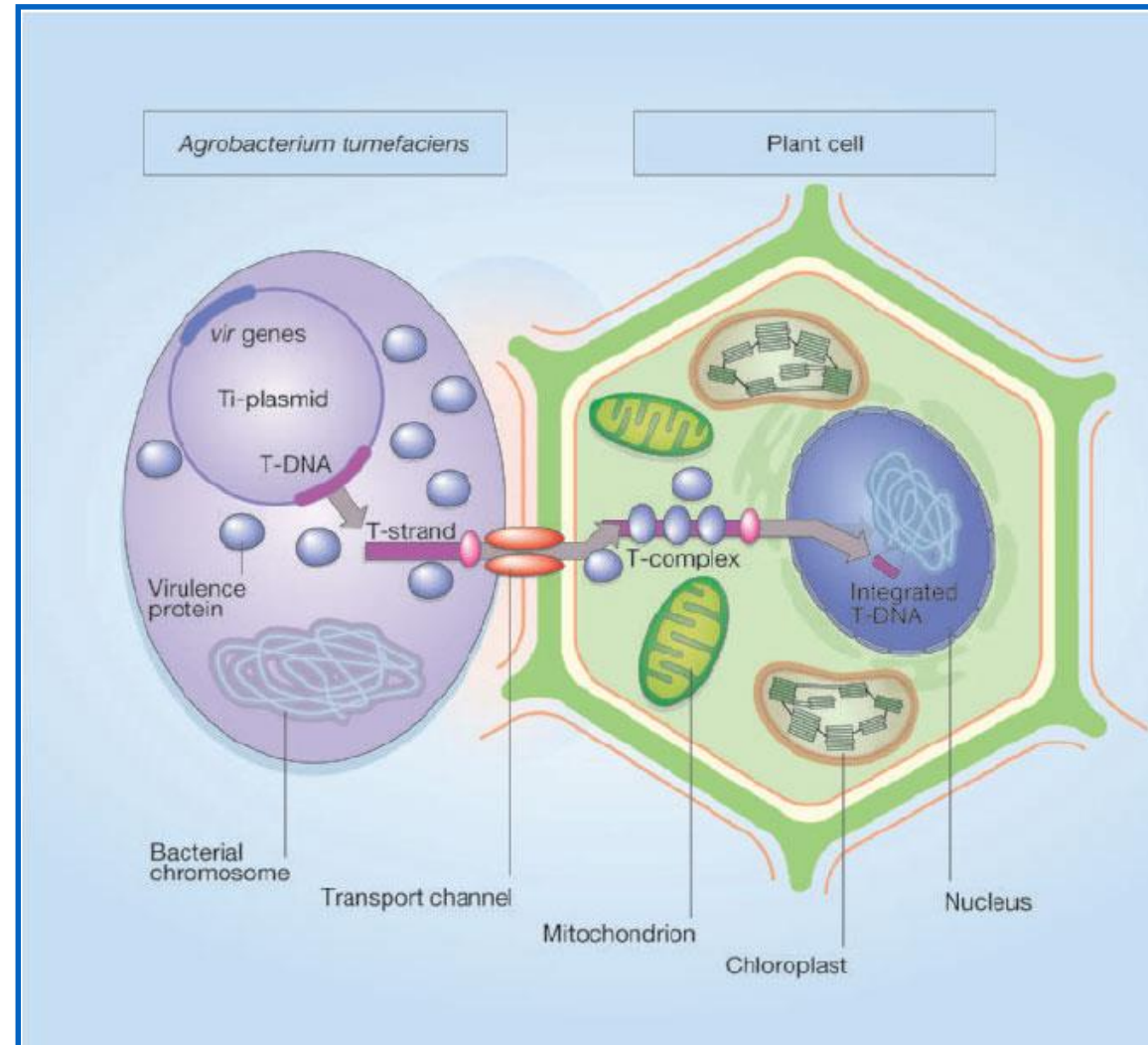


Patogenicidade natural de *A. tumefaciens*



Opinas: fonte de C e N para *Agrobacterium*

Patogenicidade natural de *A. tumefaciens*



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

Planta ferida

- Libera substâncias que atraem a agrobactéria
- Ativa genes da região de virulência

Contato planta-bactéria

- As bactérias sintetizam microfibrilas de celulose para favorecer a formação de agregados de células bacterianas em volta do tecido vegetal ferido;

Inserção do T-DNA

- o T-DNA integrado ao genoma vegetal é expresso de forma estável
- A síntese de auxinas e citocininas (oncogenes) levam a planta a um desbalanço hormonal

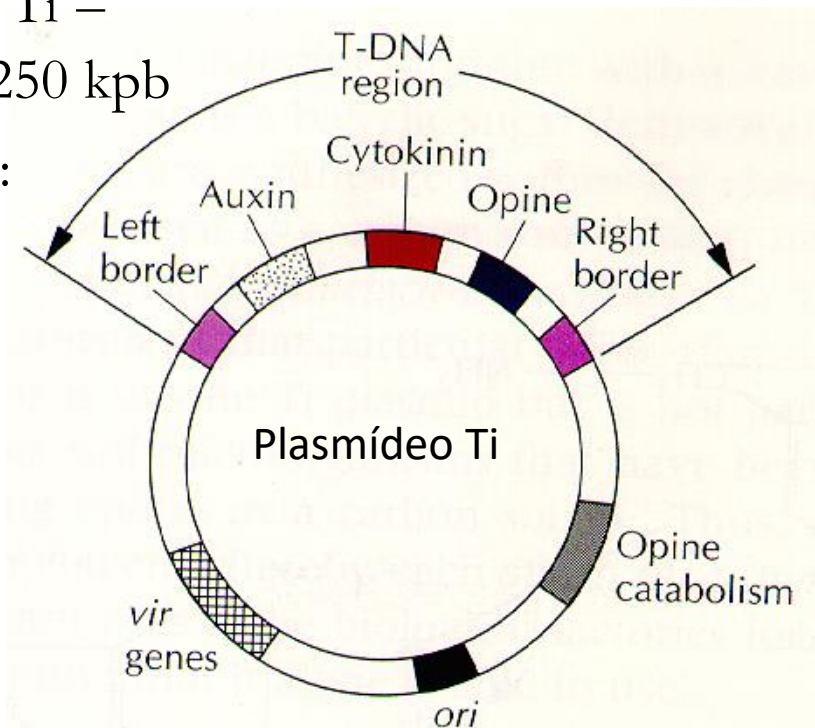
Síntese de Opina

- Quanto mais a célula da planta se divide maior é a produção de opina e o nicho da agrobactéria se torna extremamente favorável
- Somente a linhagem indutora é capaz de catabolizar a opina produzida como fonte de energia, carbono e nitrogênio

Apesar de sua origem procariótica, a expressão dos genes presentes no T-DNA só é possível por serem os sinais de regulação desses genes reconhecidos pelo sistema de transcrição eucarioto vegetal!!

Agrobacterium

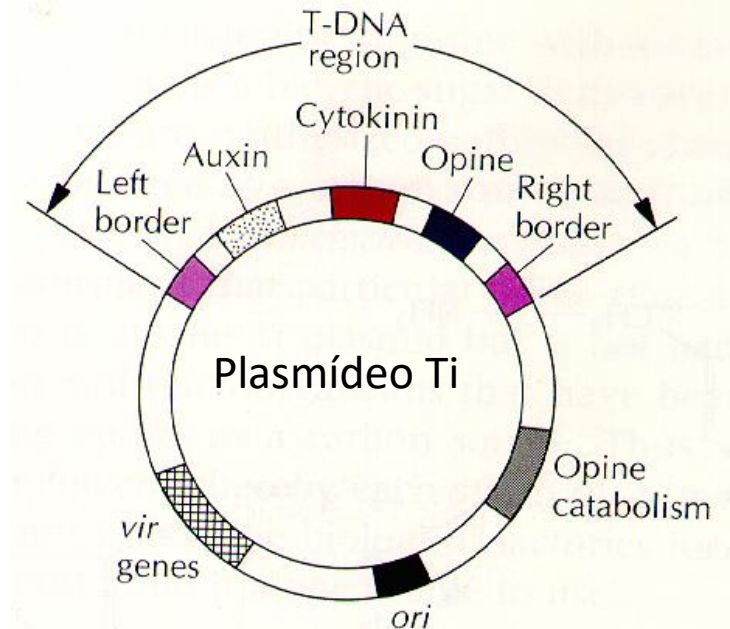
- Infecção natural – ferimentos;
- Quimiotactismo - fenóis, açúcares, amino ácidos;
- Expressão de genes da bactéria transferidos e integrados de forma estável ao genoma vegetal
- Formação de tumores;
- Capacidade tumorigênica - plasmídeo Ti =
 - **Ti = Tumor Inducing** - 150 a 250 kpb
- Regiões do plasmídeo **Ti** importantes:
 - **região T-DNA - *Transfer DNA***
 - **região *vir* - genes de virulência**



Agrobacterium

Região T-DNA

- Tamanho: de 12 a 24 kb
- Limitada por sequências repetidas = bordas
 - bordas direita (RB) e esquerda (LB) - delimitam T-DNA
- Contém genes de síntese de reguladores de crescimento (hormônios vegetais) e de opinas
- Transferem genes para direcionar metabolismo para manutenção da *Agrobacterium*



Agrobacterium

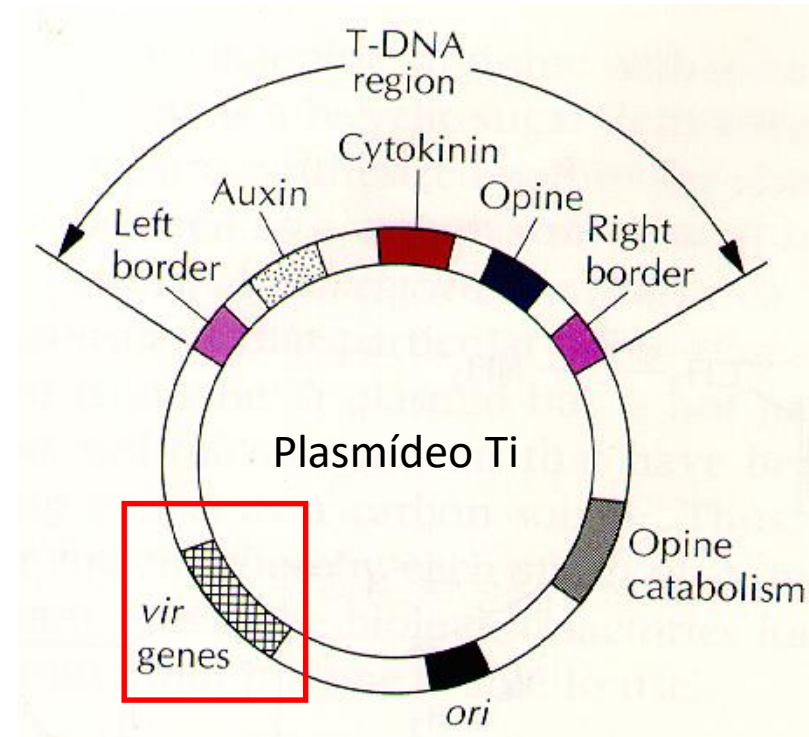
Região *vir*

- genes responsáveis pela síntese de enzimas da transferência e integração do T-DNA

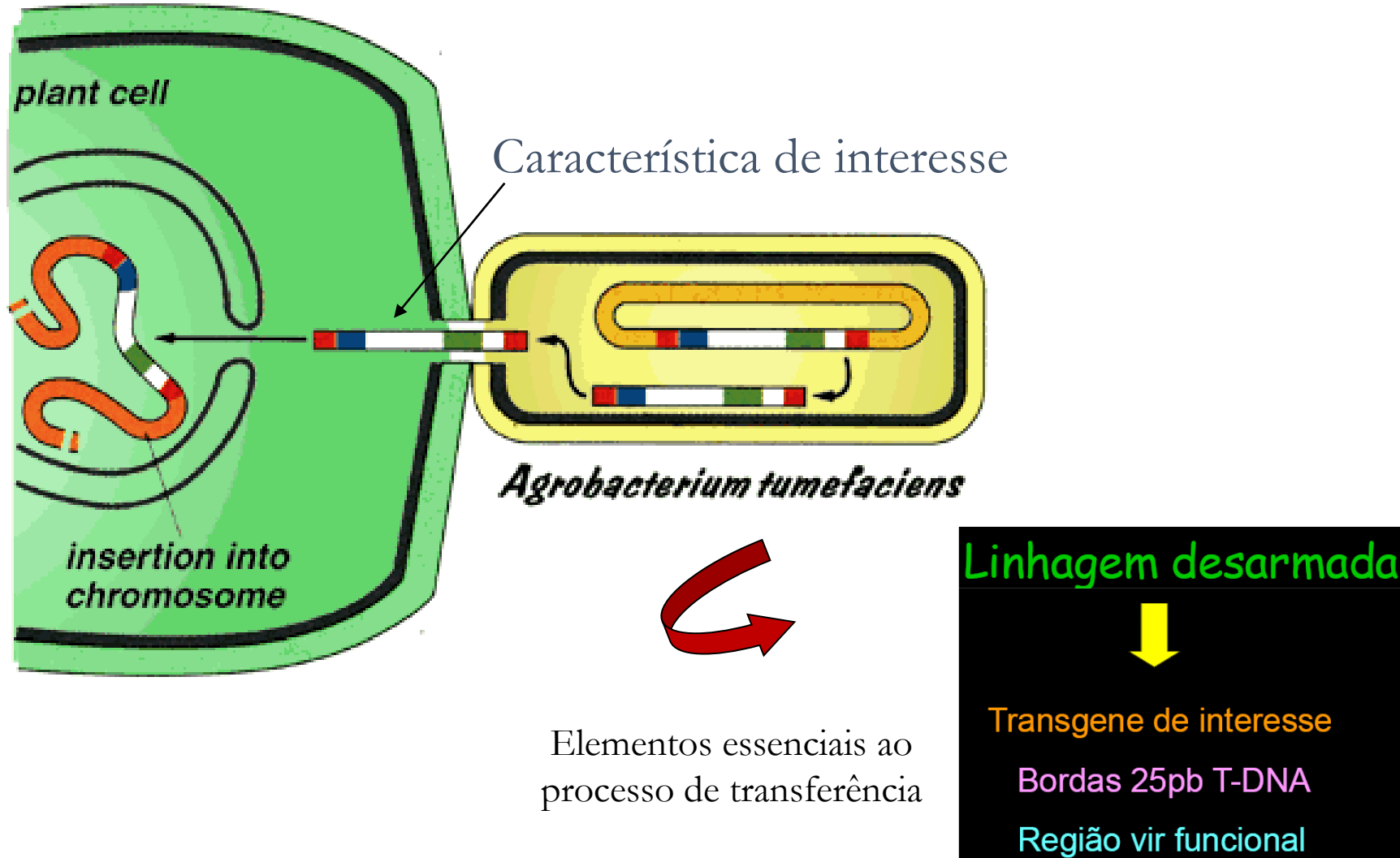
Região *vir* é suficiente para transferir qualquer T-DNA - reconhece bordas

Gene indutores de tumores podem ser retirados e substituídos no T-DNA

Ti desarmado



TRANSFERÊNCIA DO TRANSGENE



Construção Sintética do Transgene

A característica de interesse pode e deve ser
engenheirada...



Precisa conter no mínimo:

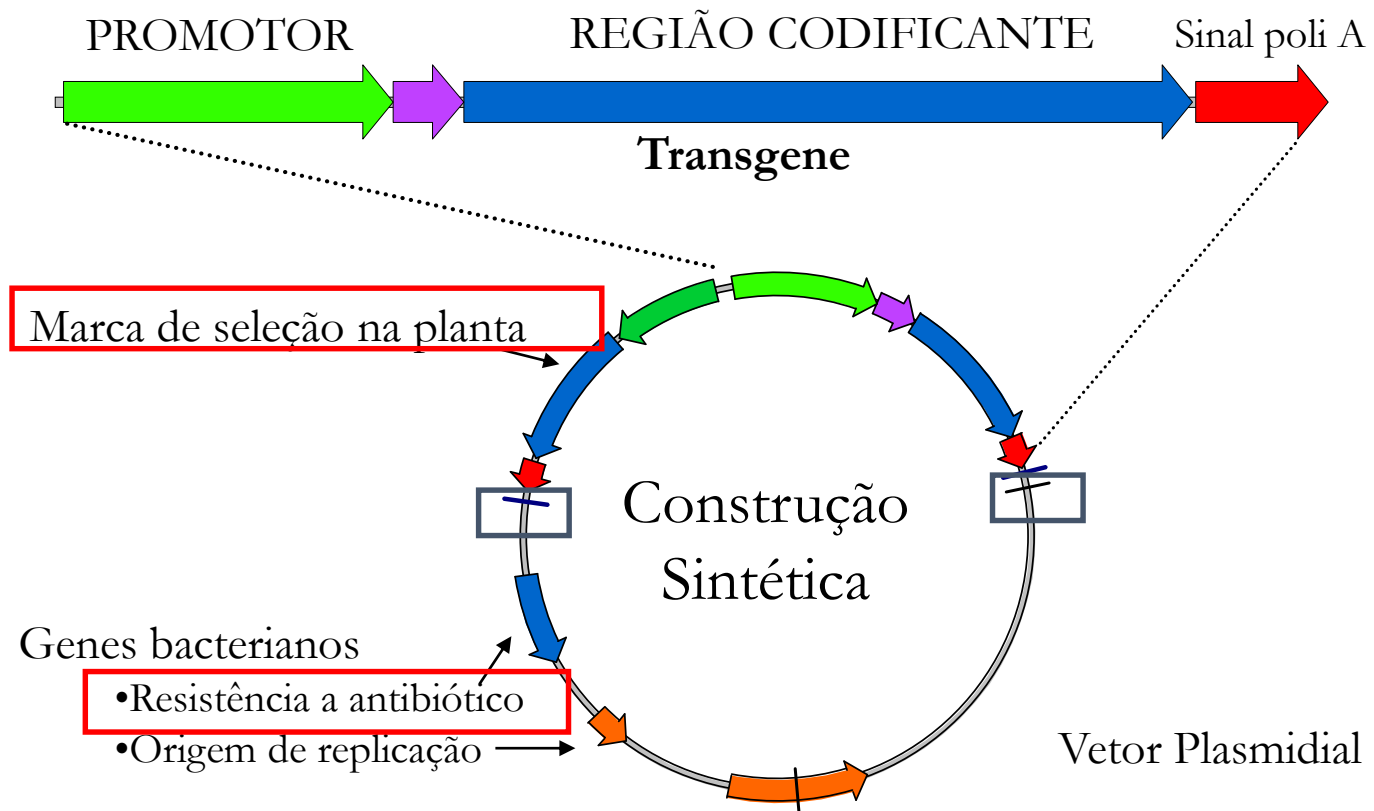
1. Gene de interesse

- A região de interesse e seus elementos controladores

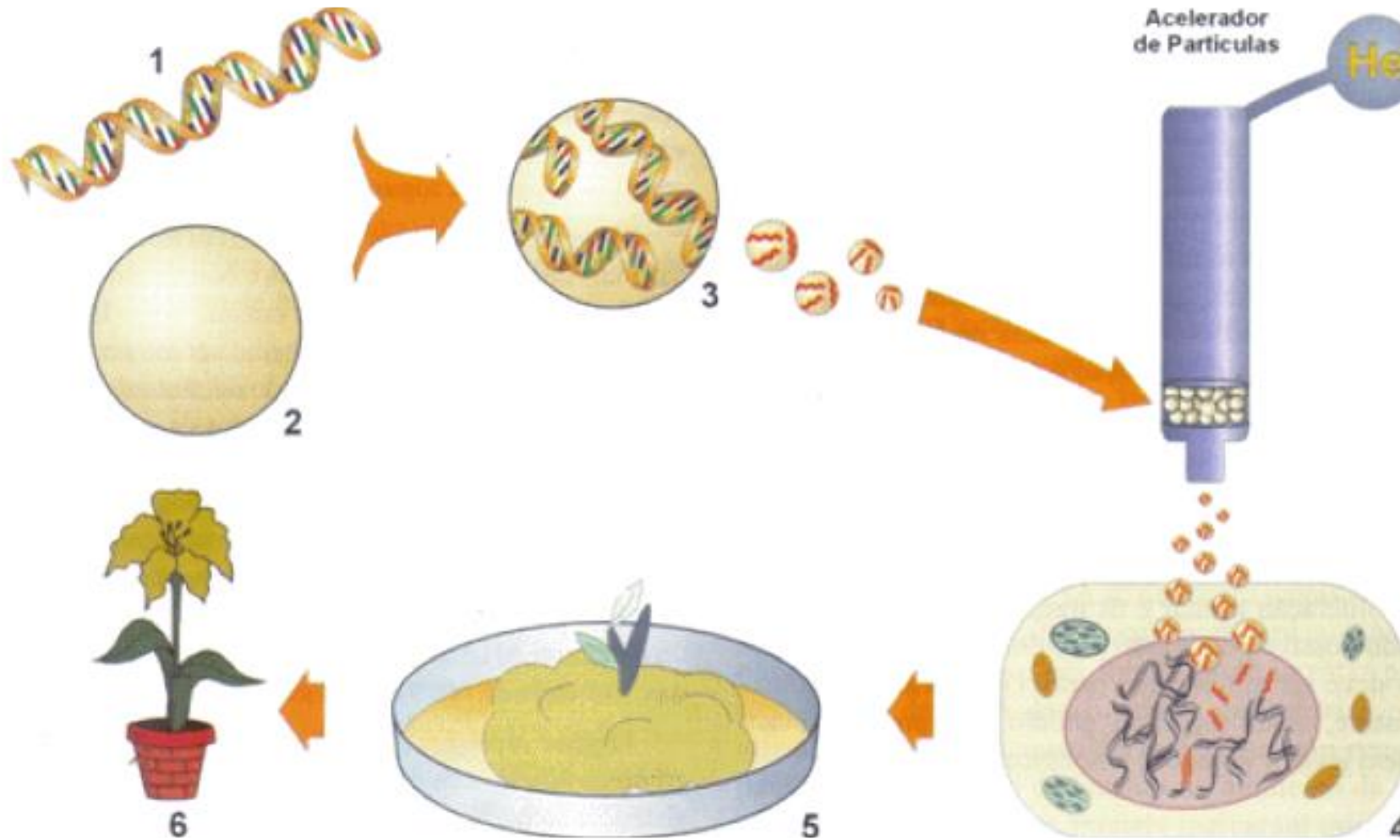
2. Gene Marcador de seleção

- Diferenciar células/plantas transformadas e não transformadas

Construindo o Transgene



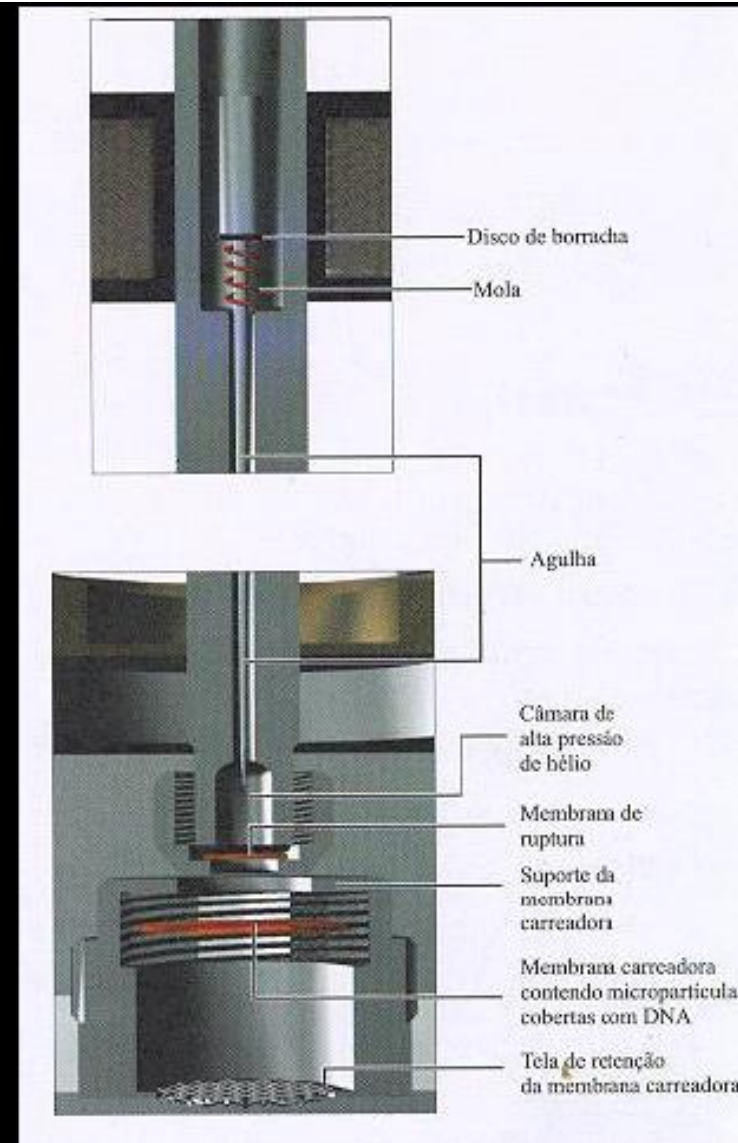
Transformação via Biobalística



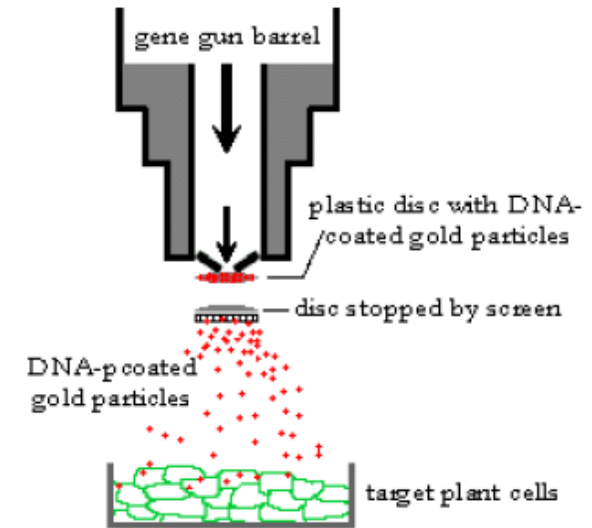
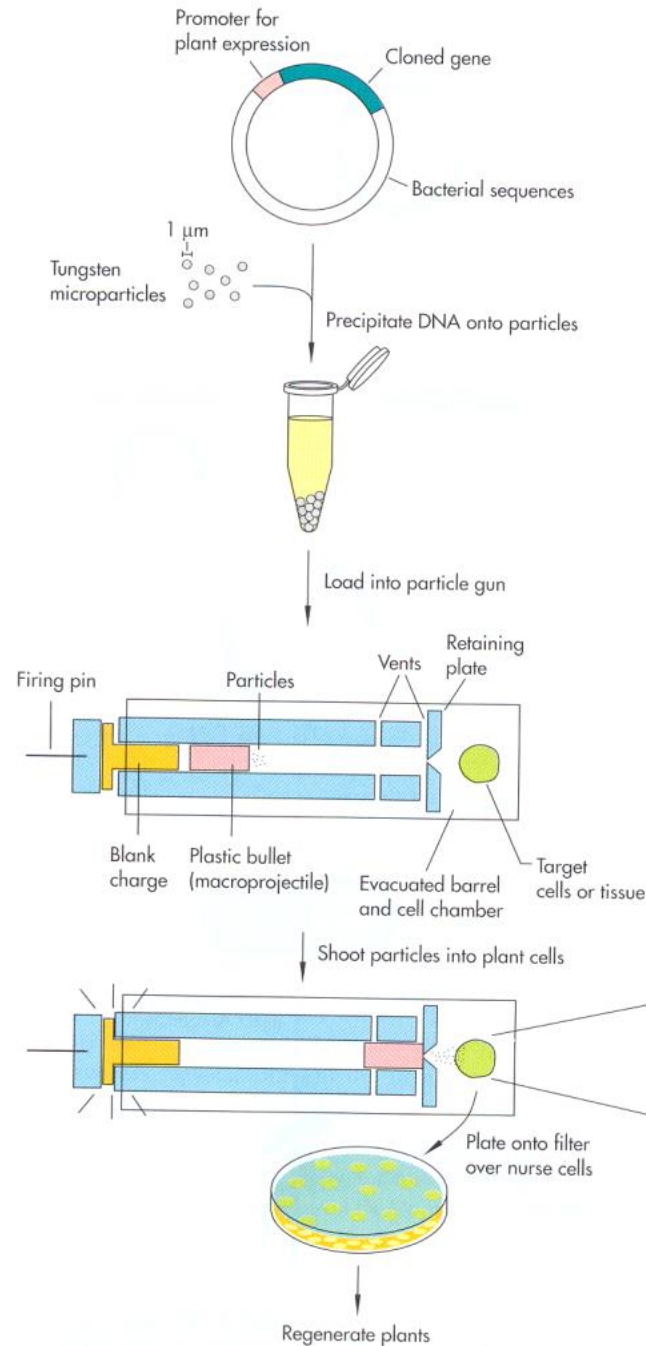
Transformação via Biobalística



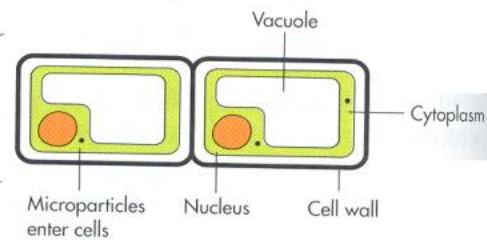
Bombardeador



Transformação via Bombardeamento Biobalística



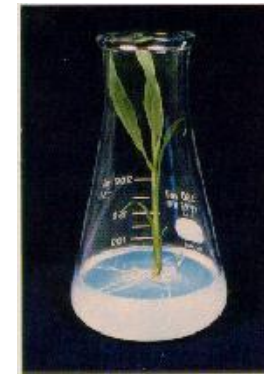
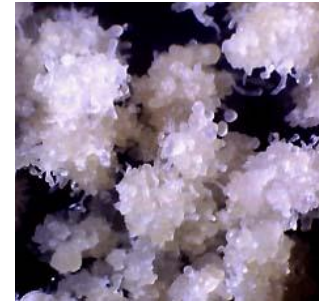
Gene gun method

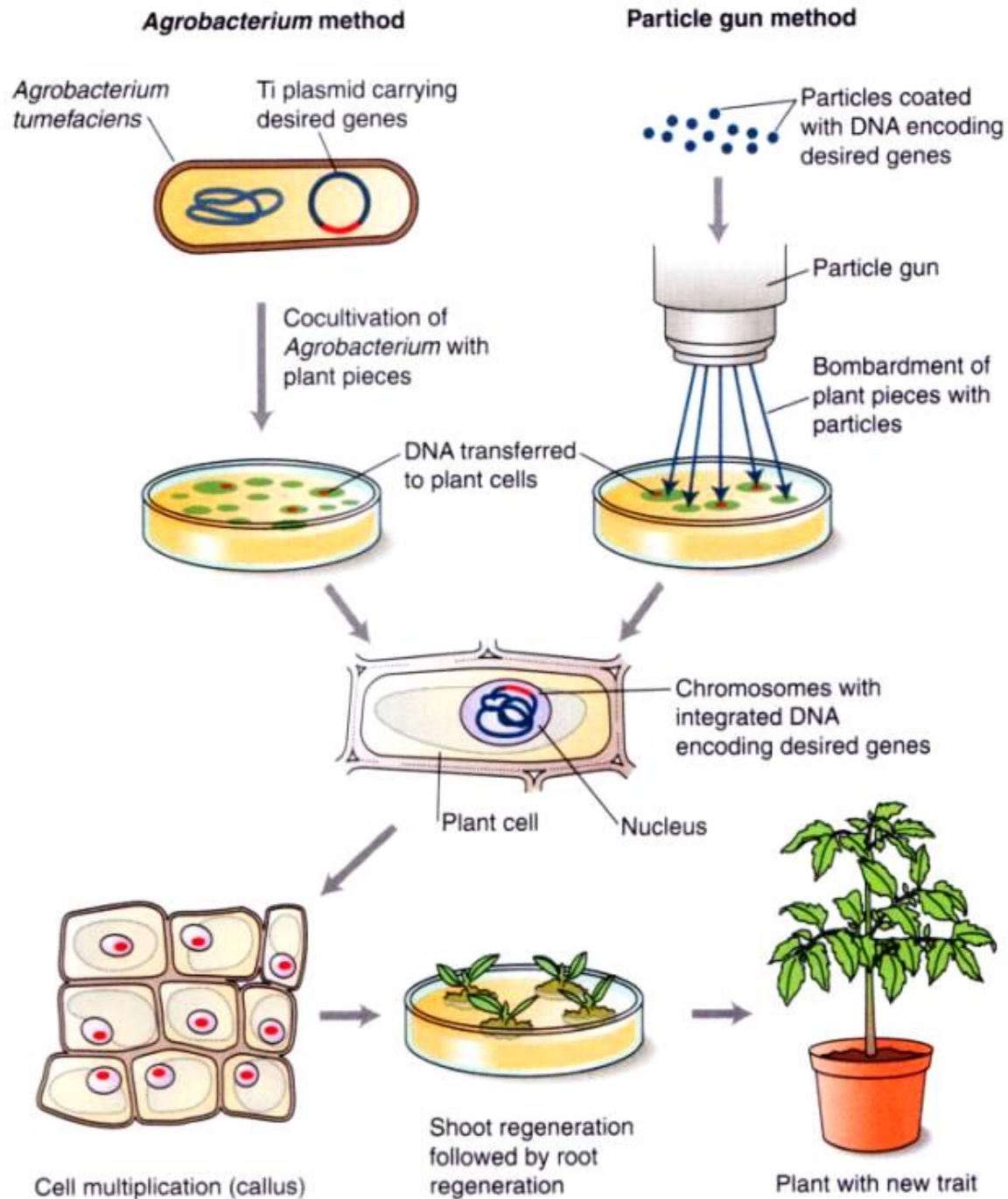


Transformação – Célula Alvo

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

- ✓ Cultura *in vitro* 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 (alterações) não desejáveis (variantes somaclonais)

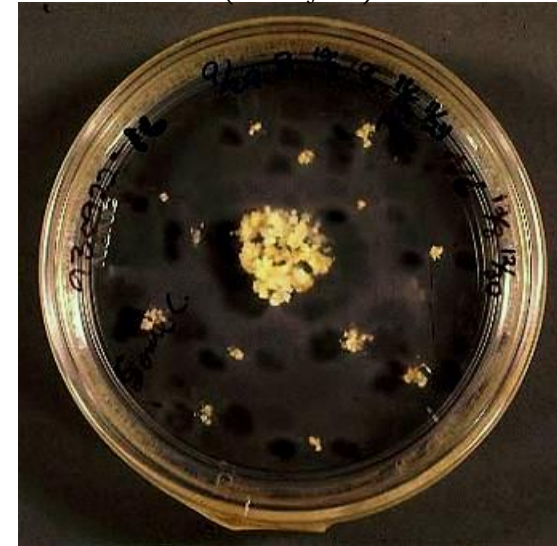




Transformação - Seleção

- 1 em 1.000 células terá o DNA integrado no genoma na planta
- 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
 - Dois principais agentes seletivos:
 - **antibióticos**
 - **herbicidas**
- Marcadores seletivos auxiliam os passos seguintes de estudos sobre a herança do transgene.

Células em cultura
(seleção)



Ensaio resistência à herbicida
transgênico não-transgênico
Resistente Susceptível



Transformação – Seleção e Confirmação

Gene de seleção

Antibiótico:

Canamicina

Higromicina

Herbicida:

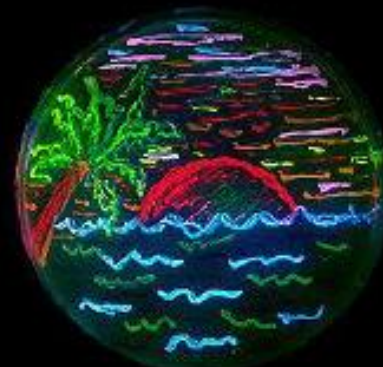
Glifosato

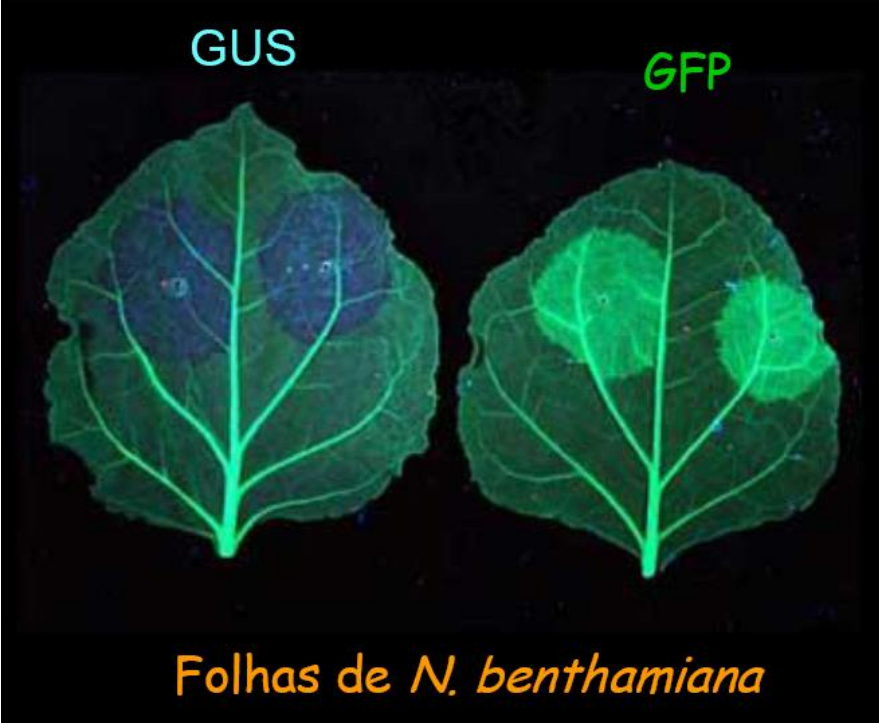
Genes repórters:

GFP, mRFP, CFP, YFP, mCherry etc

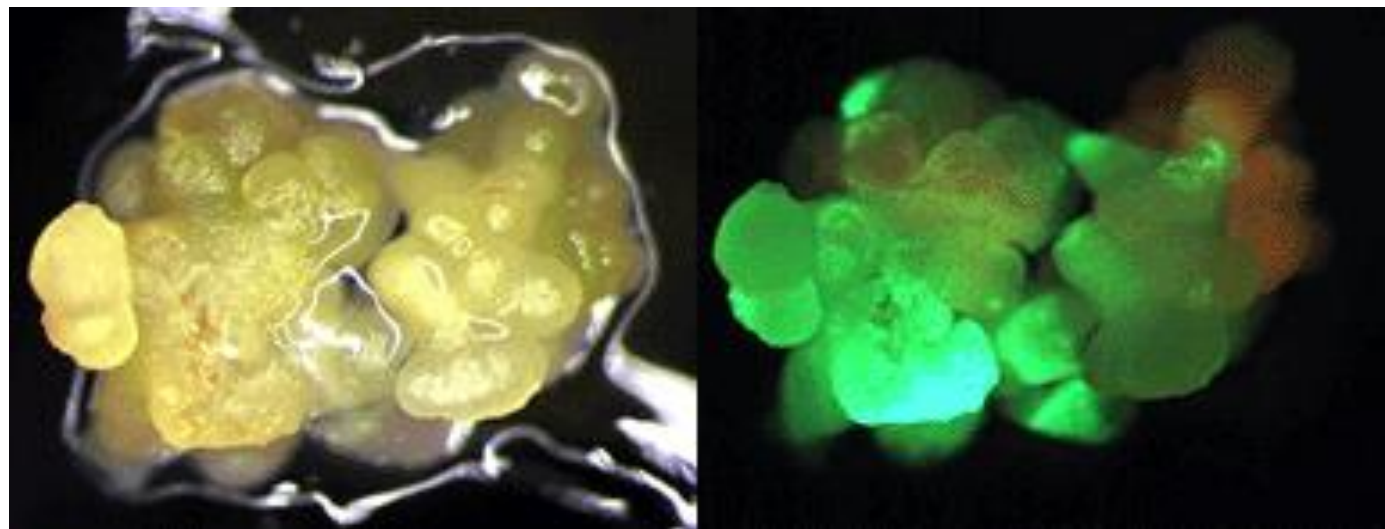
GUS

Luciferase

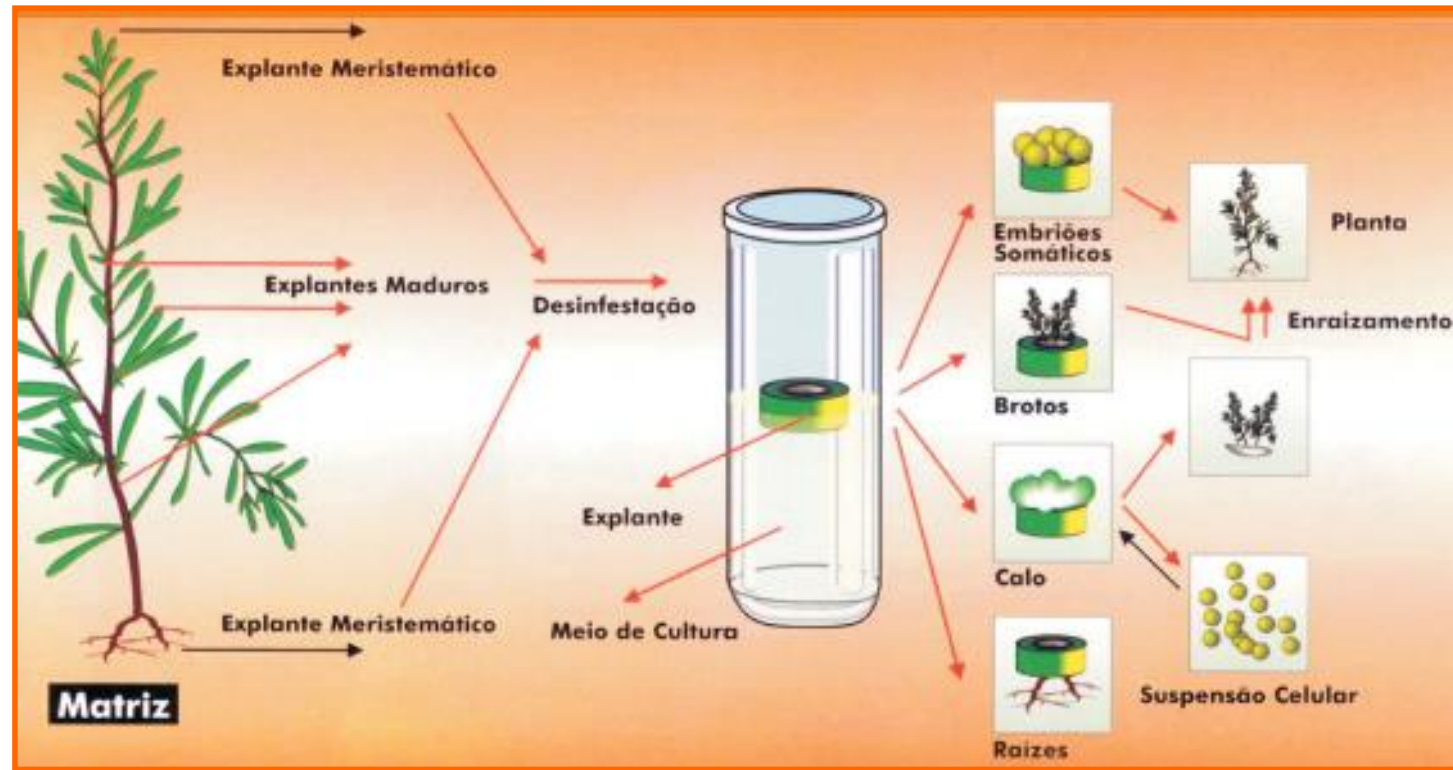




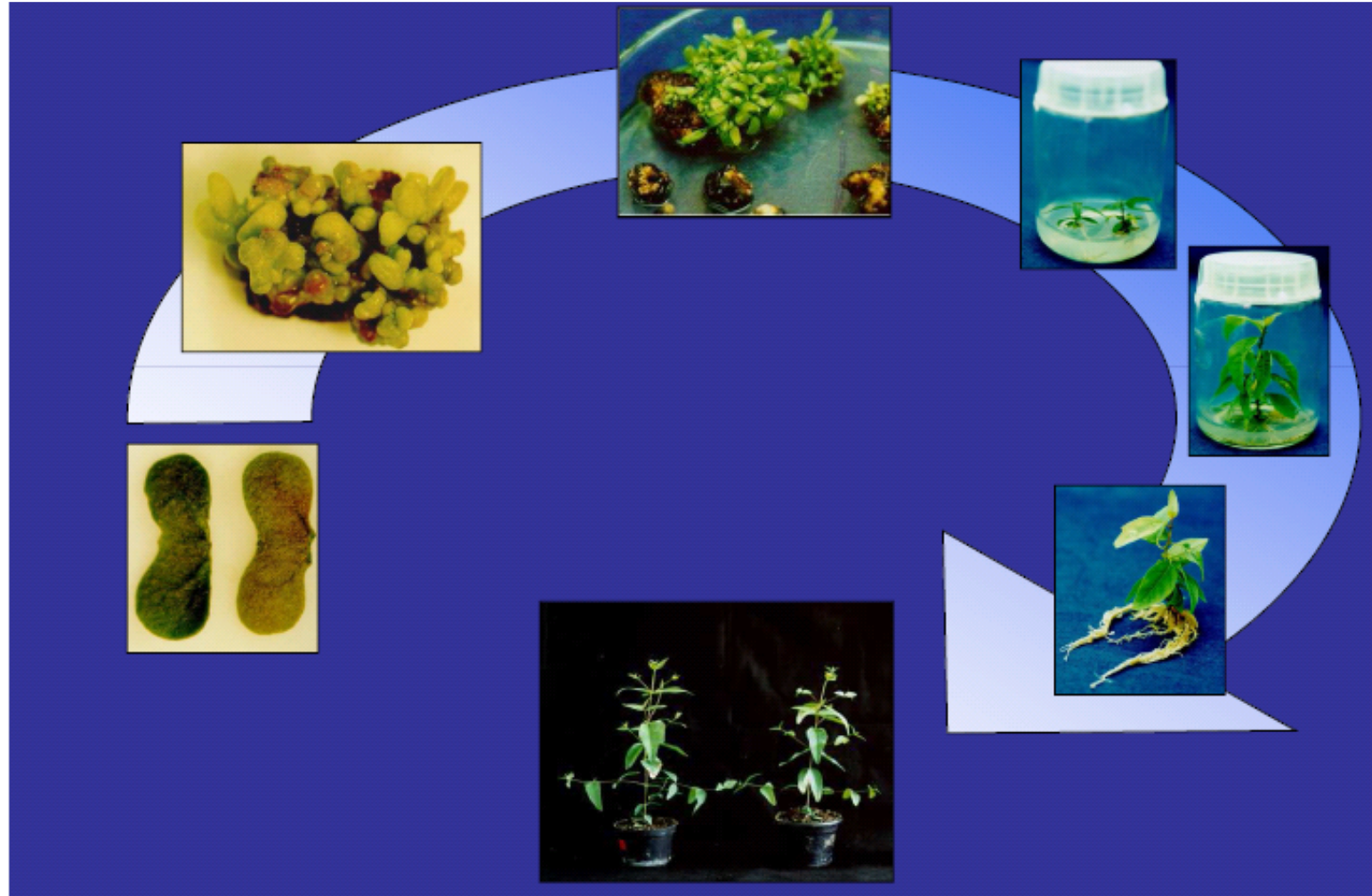
Transformação - Confirmação



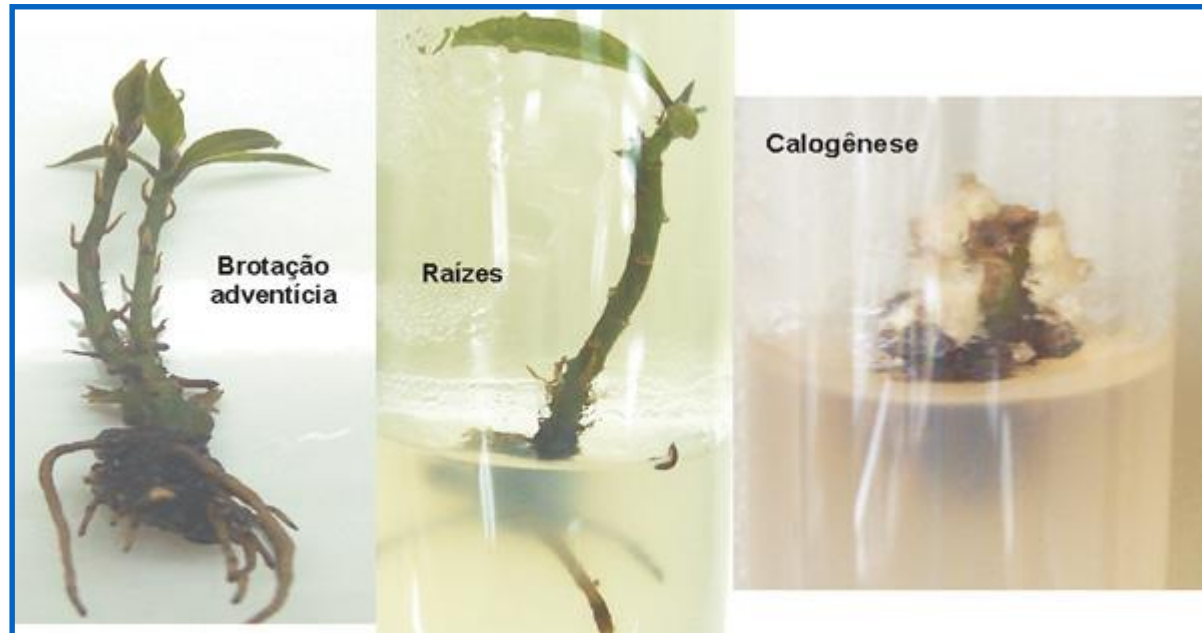
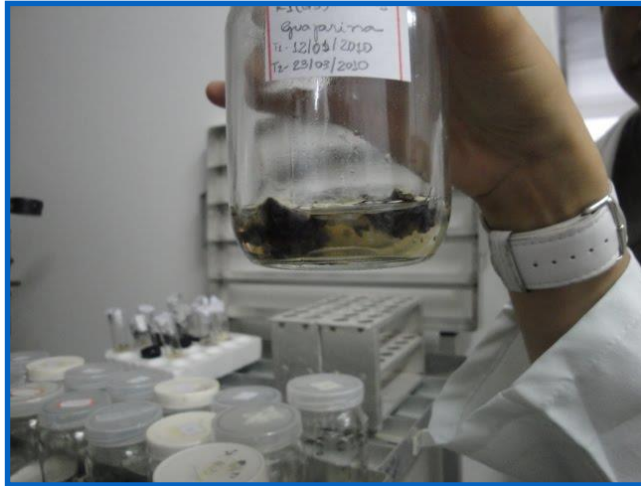
Princípios da Cultura de Tecidos Vegetais



Regeneração depende do explante..



Etapas no Laboratório



Planta regenerada



Germinação

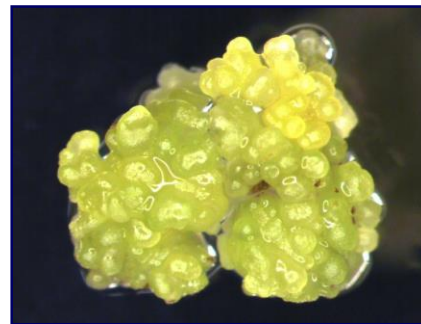


Cultura de tecidos de soja

Desenvolvimento

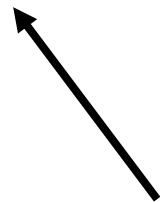
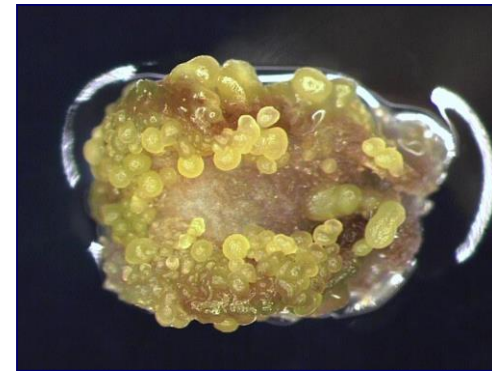
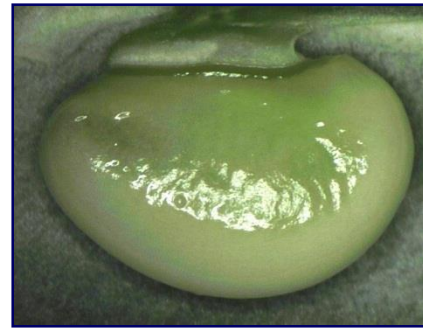


Proliferação



Indução

Sementes imaturas



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

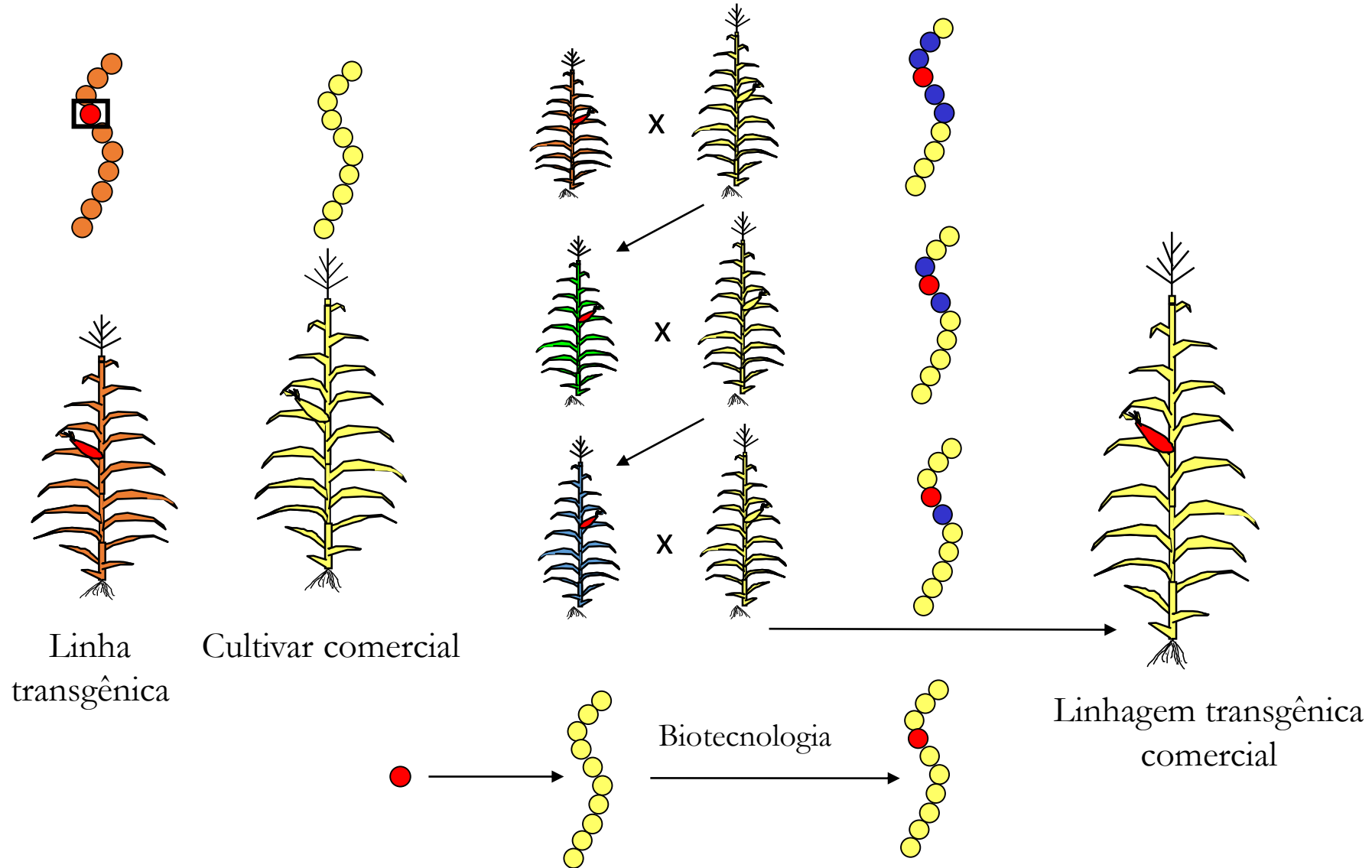
Variedade Comercial

V
A
R
I
A
Ç
Ã
O

S
E
L
E
Ç
Ã
O

Construção da Cultivar Transgênica

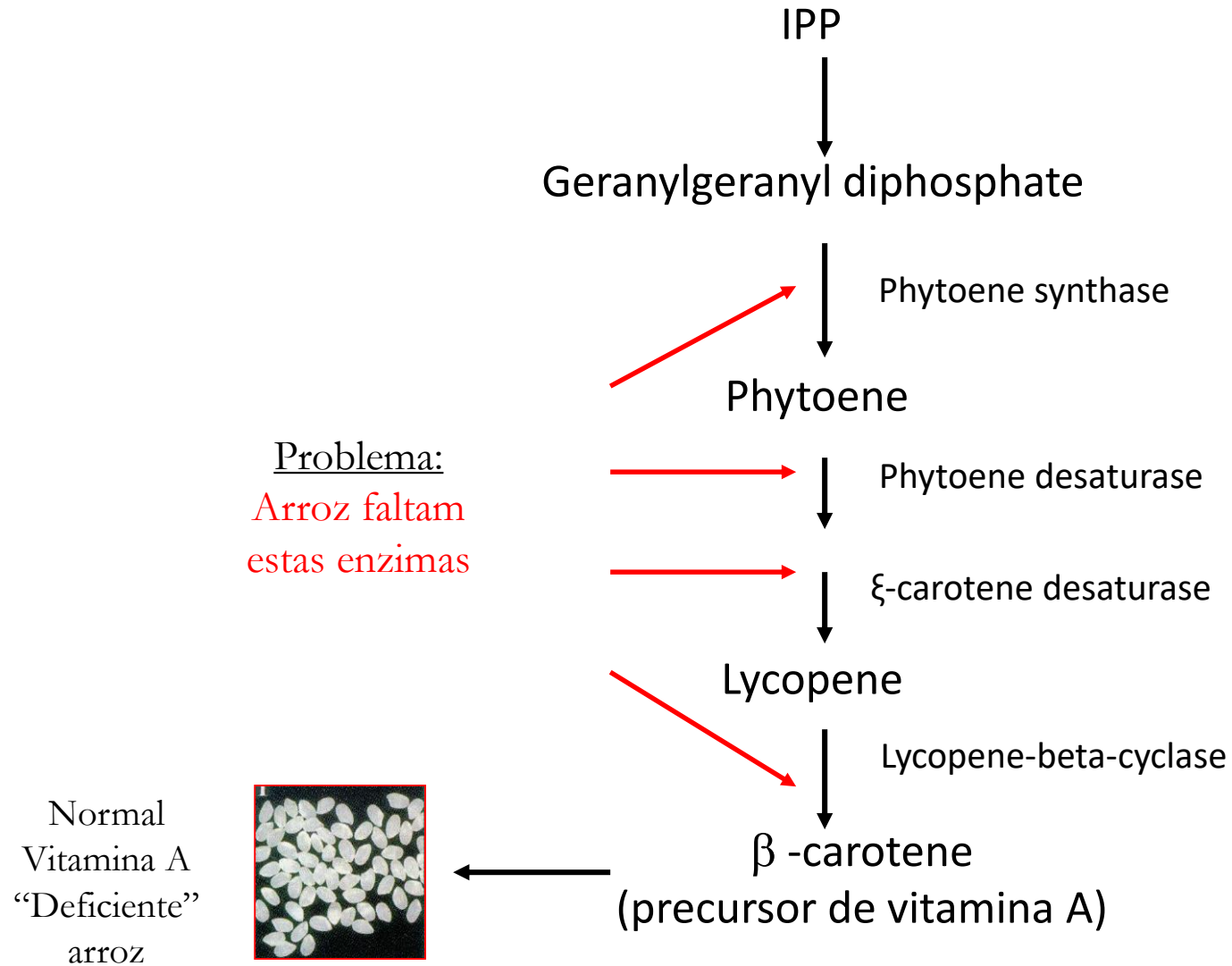
Retrocruzamento e seleção (6 - 8 gerações)



The Golden Rice Story

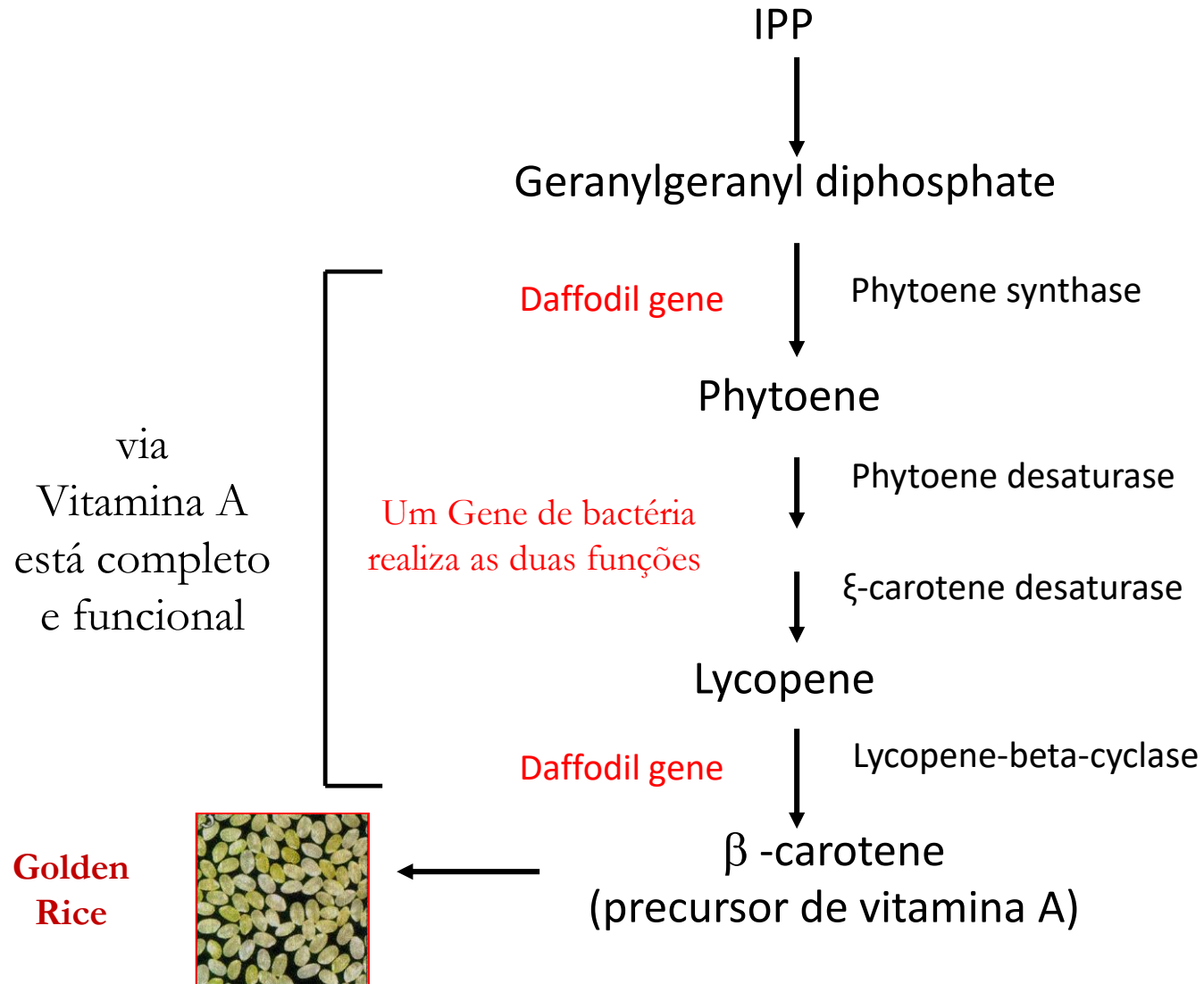
- Deficiência em vitamina A é um problema importante de saúde pública
 - Causa cegueira
 - Influencia na severidade de diarreias e sarampo
- >100 milhões de crianças tem este problema
- Para muitos países a infraestrutura não existe para entregar pílulas de vitaminas
- Melhorar o conteúdo de vitamina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

Via do β -Caroteno em Plantas



The Golden Rice

Adicionar os genes da via do β -Caroteno



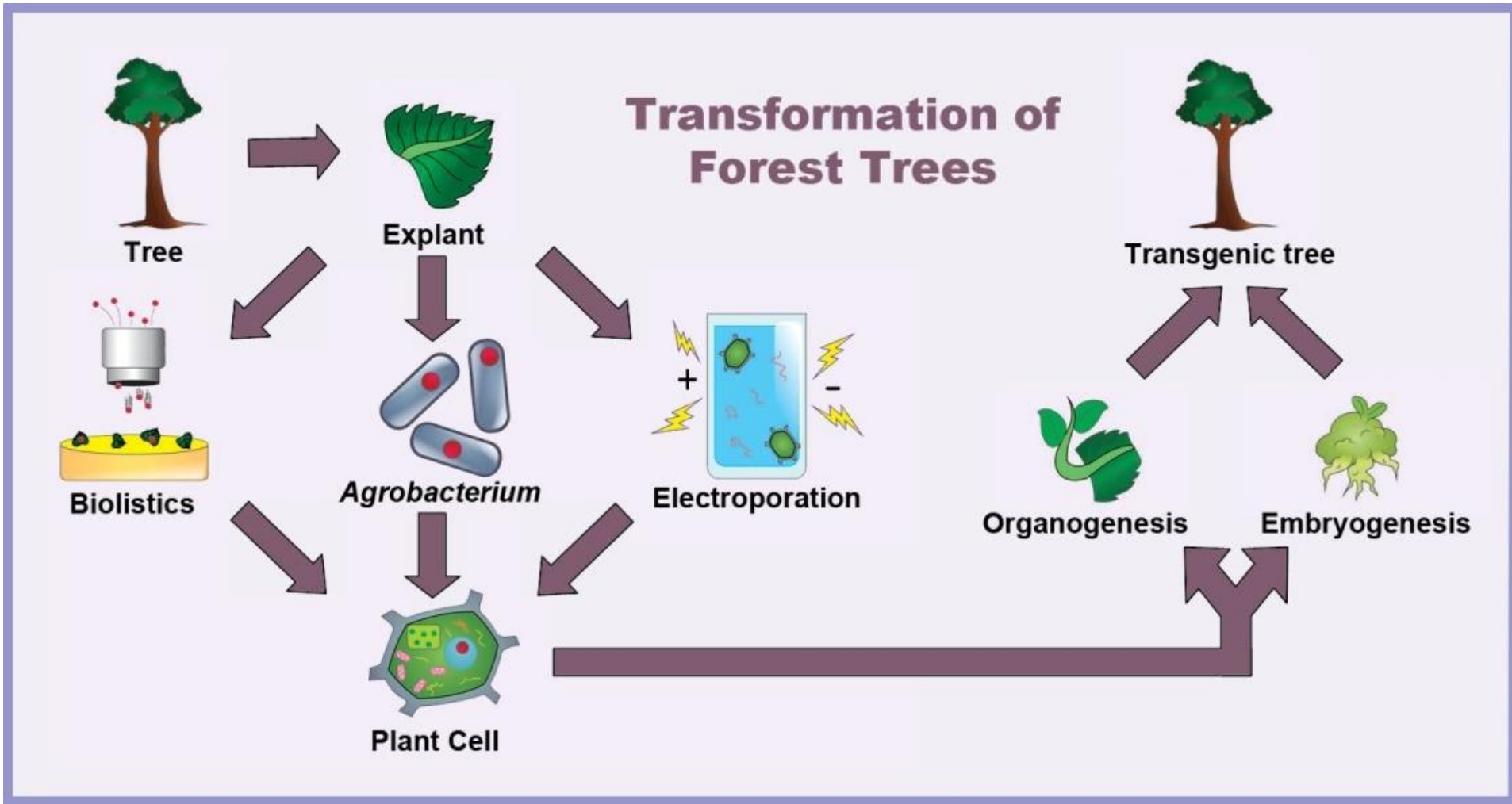
Teste Final dos Transgêncios

RoundUp Ready



Antes

Depois



Transformação de Animais

Microinjeção

Por meio de agulhas microscópicas é injetado DNA no núcleo da célula alvo

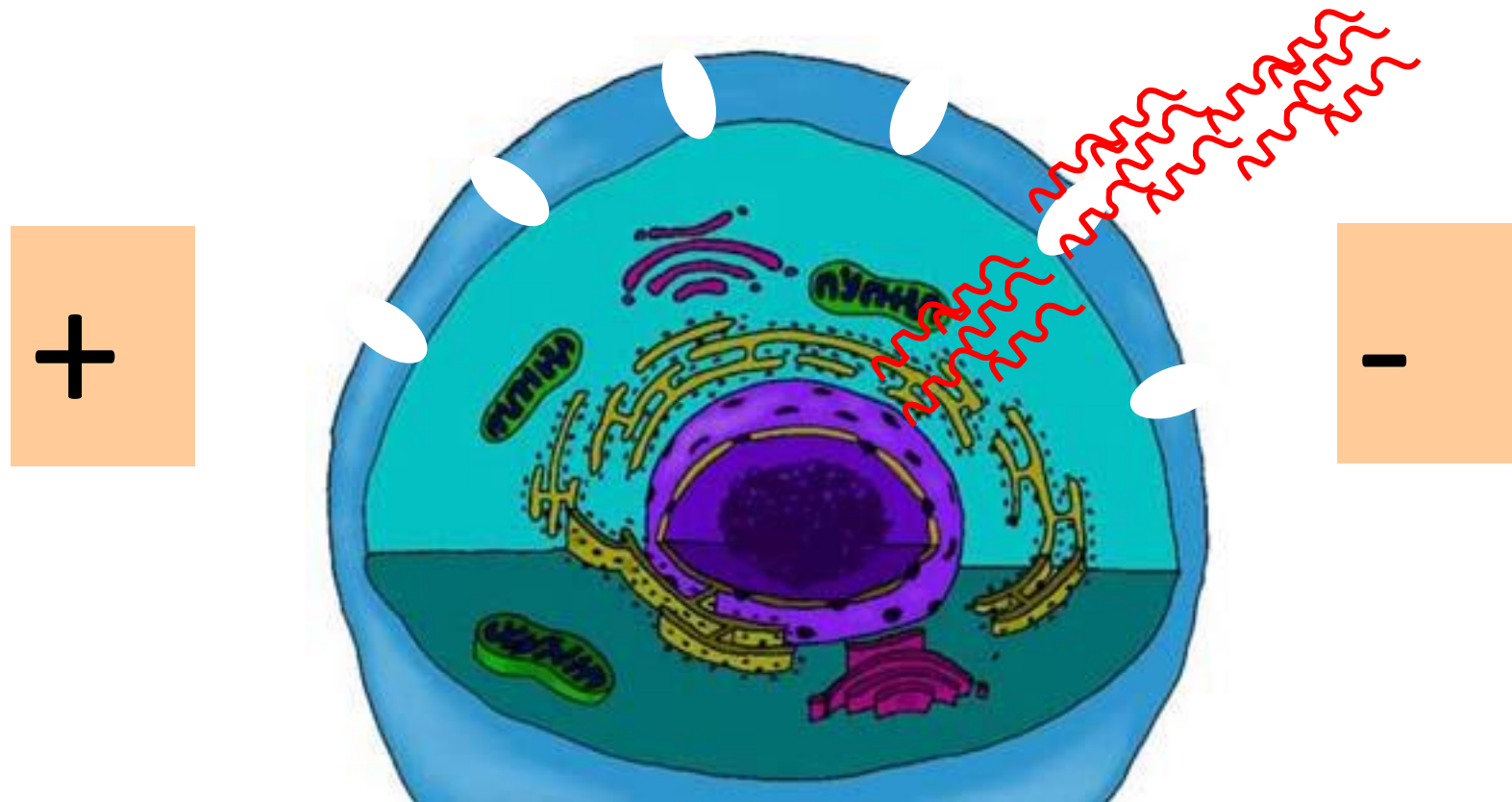
- rotina para transformação de célula animais
- utiliza micromanipulador
- complexo e demorado



DNA recombinante + transgenia em embriões de frango

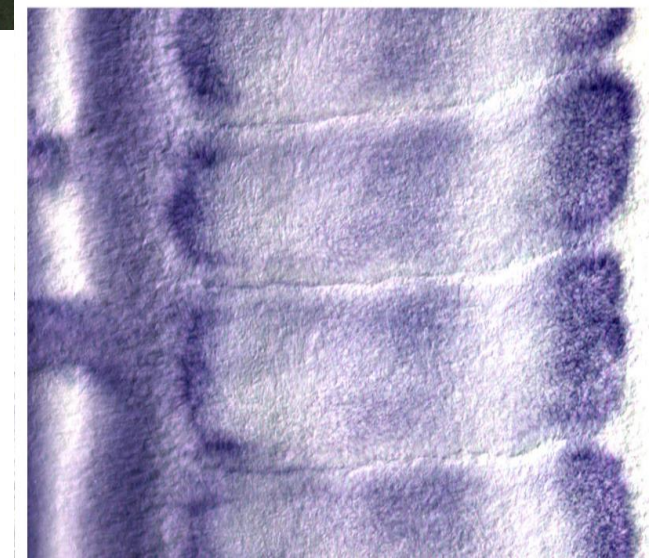
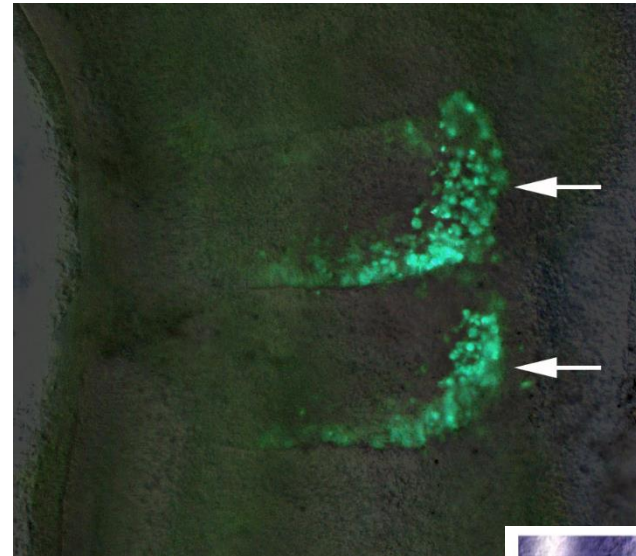
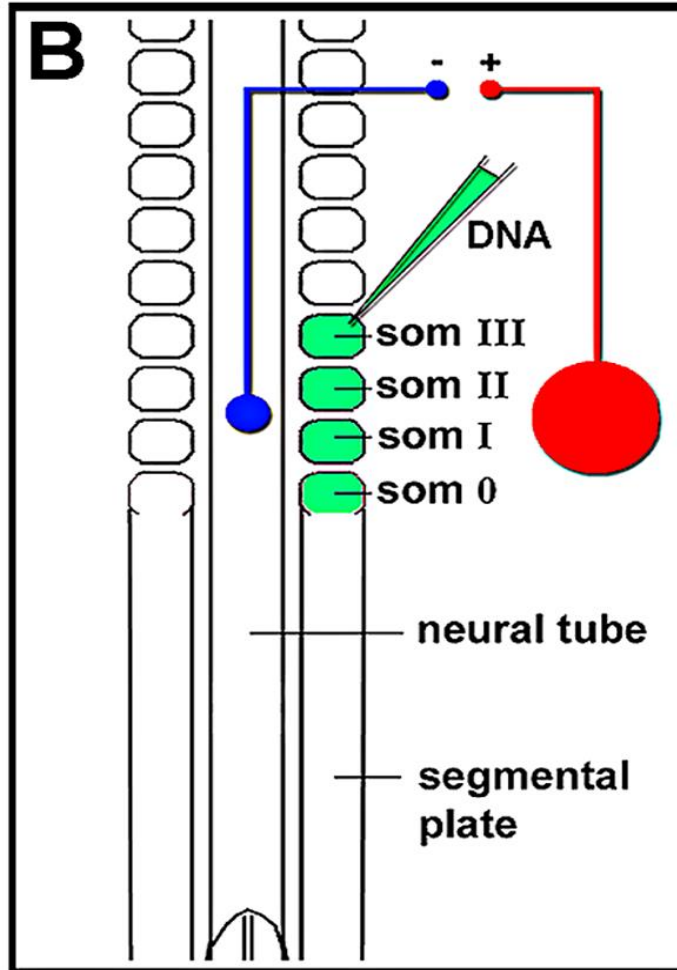
Muramatsu *et al.* (1997) – ELETROPORAÇÃO

DNA exógeno



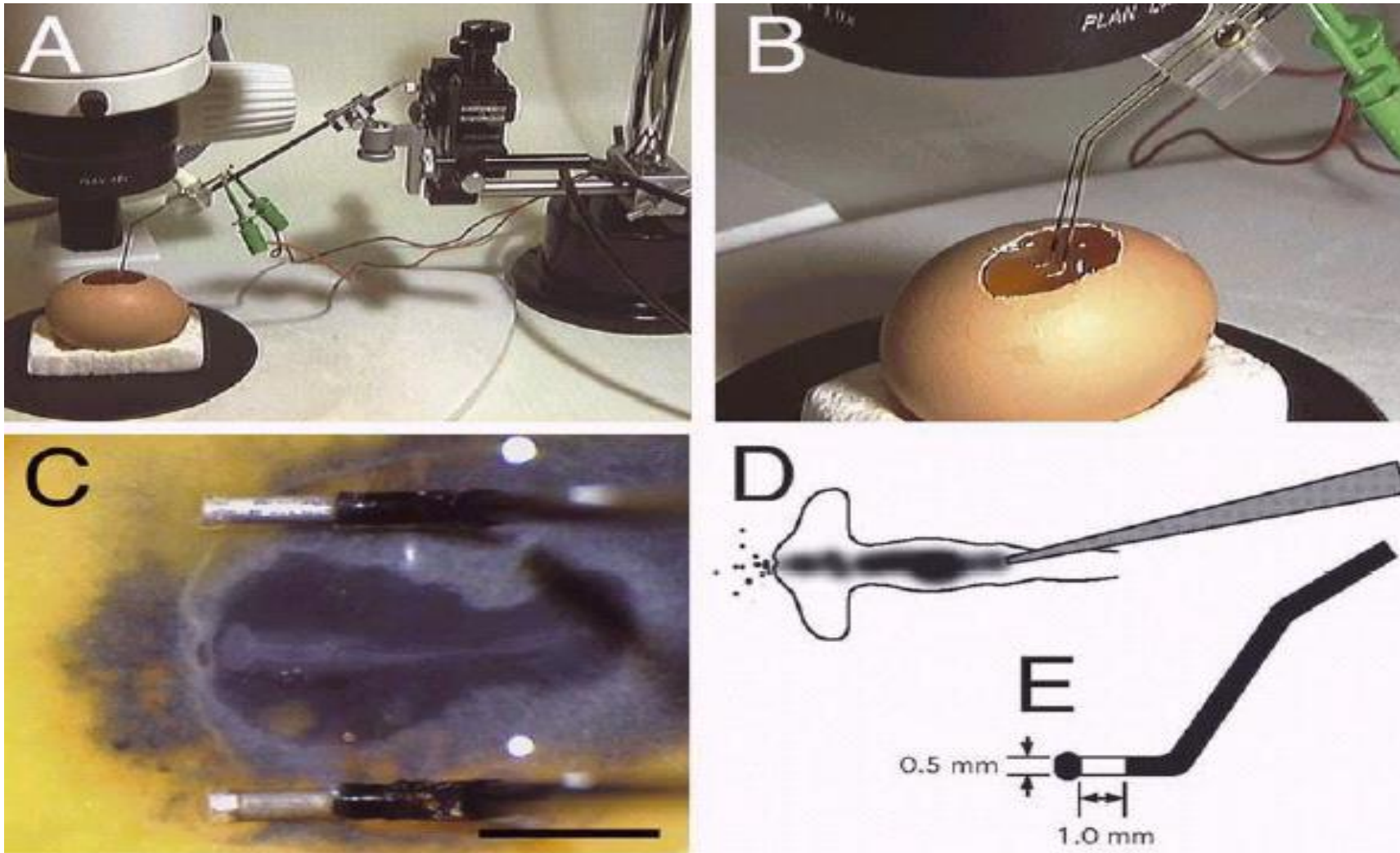
Eletroporação *in ovo*

Eletroporação dos embriões - SOMITOS



Eletroporação *in ovo*

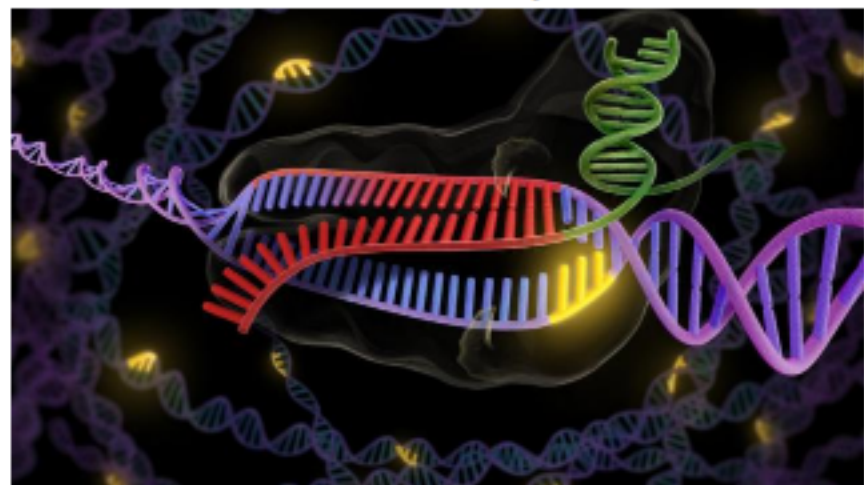
Eletroporação dos embriões – TUBO NEURAL



Técnica de edição de genoma promete revolucionar a ciência



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.

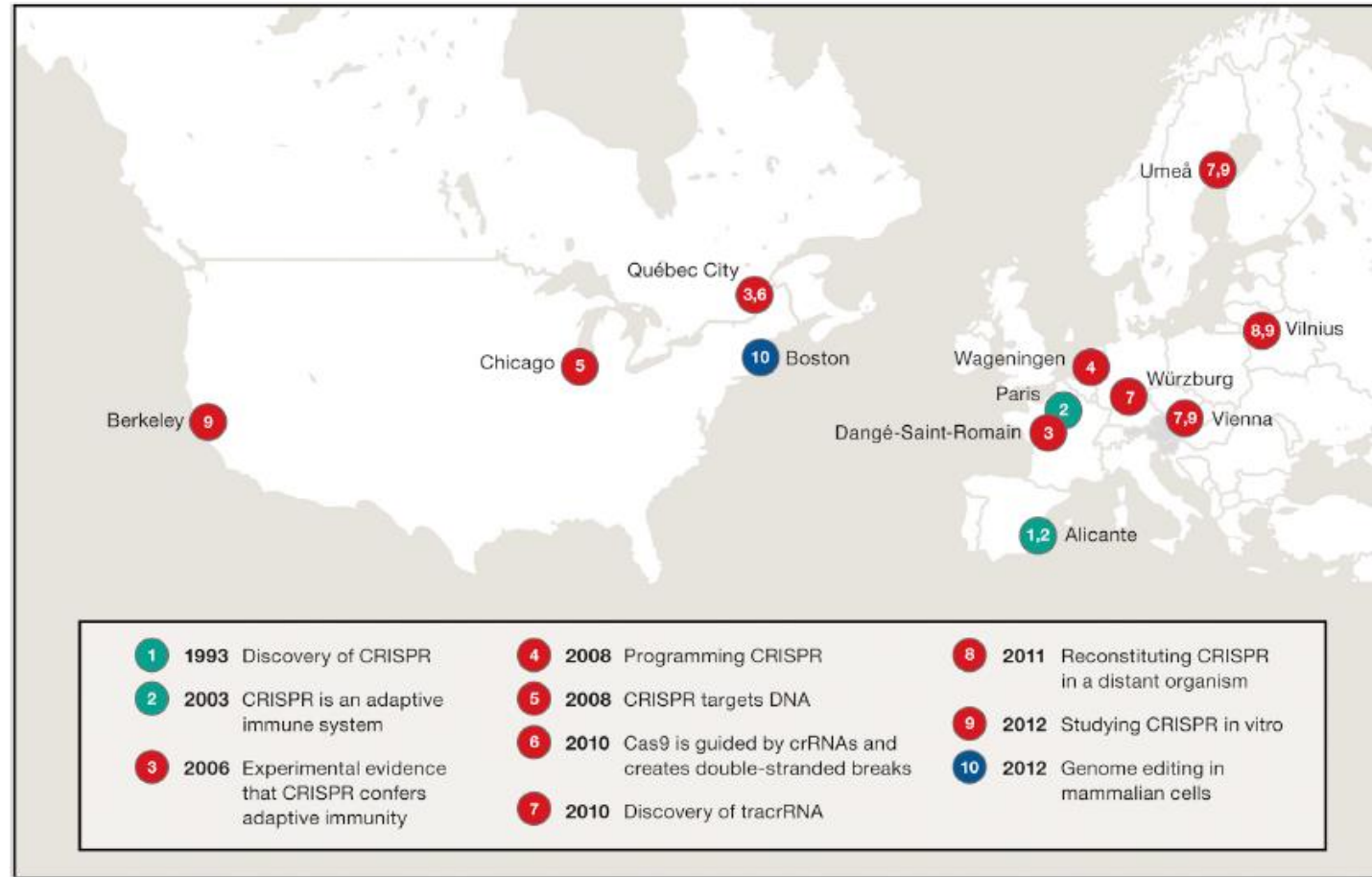
Segundo o pesquisador Alexandre Nepomuceno, da Embrapa Soja (Londrina, PR), um dos pioneiros na utilização do CRISPR na Empresa, essa tecnologia é relativamente nova – começou a ser utilizada na agricultura em 2014.

"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.

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) + Cas (CRISPR-associated)



CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) + Cas (CRISPR-associated)

Sistema Imune Adaptativo

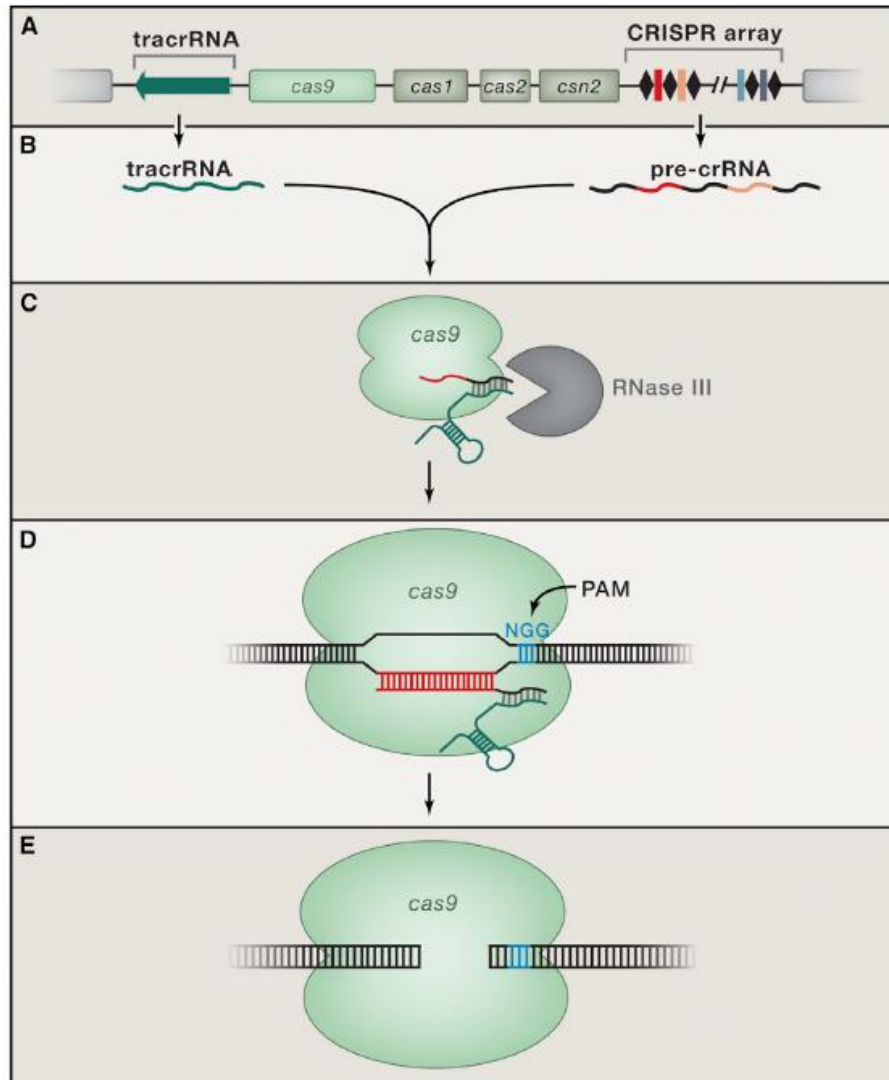


Figure 1. Class 2, Type II CRISPR-Cas9 System from *Streptococcus thermophilus*

Type II systems are the simplest of the three types of CRISPR systems and have been the basis for genome editing technology.

(A) The locus contains a CRISPR array, four protein-coding genes (*cas9*, *cas1*, *cas2*, and *csn2*) and the tracrRNA. The CRISPR array contains repeat regions (black diamonds) separated by spacer regions (colored rectangles) derived from phage and other invading genetic elements. The *cas9* gene encodes a nuclease that confers immunity by cutting invading DNA that matches existing spacers, while the *cas1*, *cas2*, and *csn2* genes encode proteins that function in the acquisition of new spacers from invading DNA.

(B) The CRISPR array and the tracrRNA are transcribed, giving rise to a long pre-crRNA and a tracrRNA.

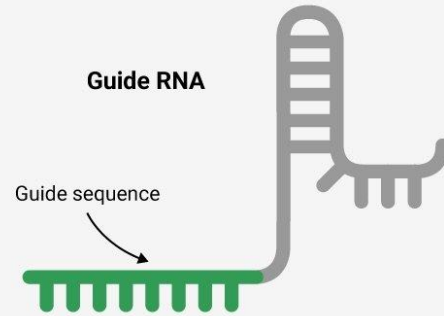
(C) These two RNAs hybridize via complementary sequences and are processed to shorter forms by Cas9 and RNase III.

(D) The resulting complex (Cas9 + tracrRNA + crRNA) then begins searching for the DNA sequences that match the spacer sequence (shown in red). Binding to the target site also requires the presence of the protospacer adjacent motif (PAM), which functions as a molecular handle for Cas9 to grab on to.

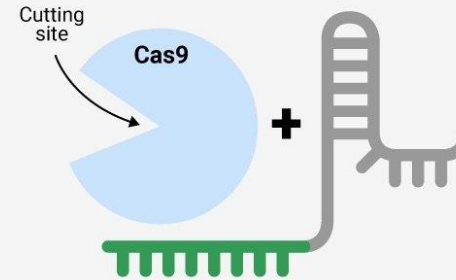
(E) Once Cas9 binds to a target site with a match between the crRNA and the target DNA, it cleaves the DNA three bases upstream of the PAM site. Cas9 contains two endonuclease domains, HNH and RuvC, which cleave, respectively, the complementary and non-complementary strands of the target DNA, creating blunt ends.

EDITING A GENE USING THE CRISPR/CAS9 TECHNIQUE

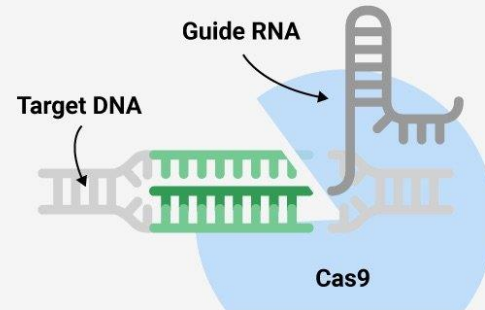
- 1** Scientists create a genetic sequence, called a "guide RNA," that matches the piece of DNA they want to modify.



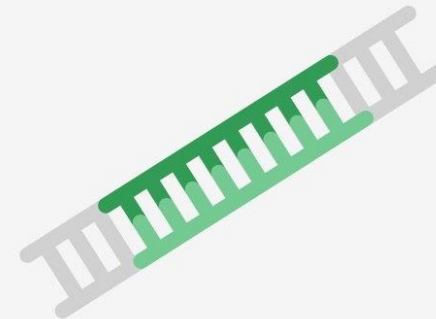
- 2** This sequence is added to a cell along with a protein called Cas9, which **acts like a pair of scissors** that cut DNA.



- 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

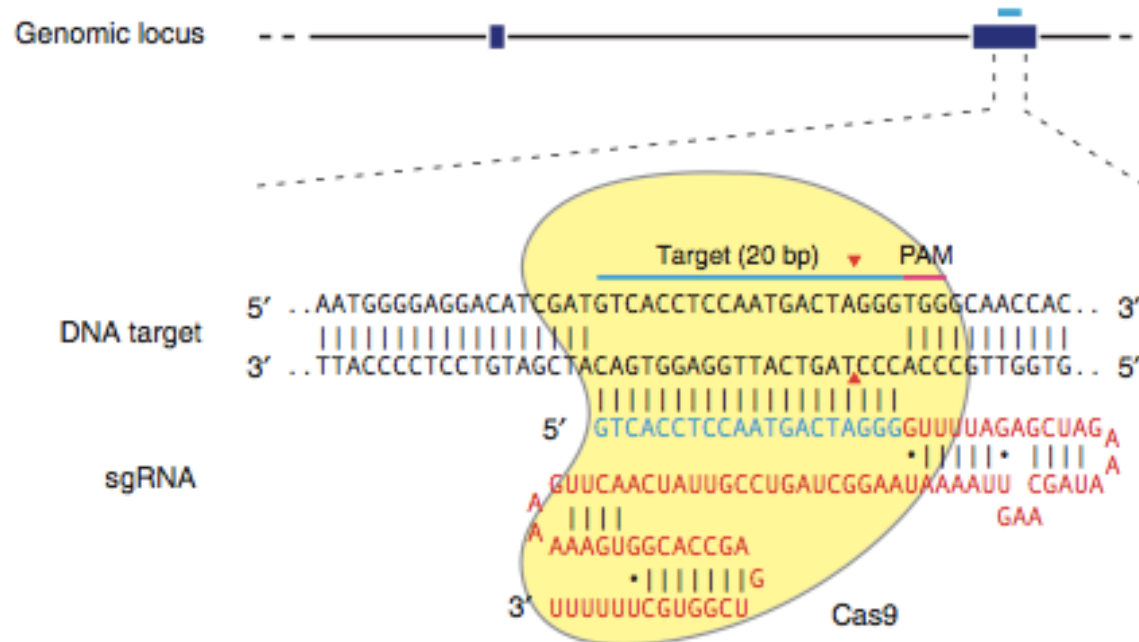
BUSINESS INSIDER

<https://www.youtube.com/watch?v=0Mkie4R7haA>

<https://www.youtube.com/watch?v=47pkFey3CZ0>

CRISPR-Cas9

CRISPR (**C**lustered **R**egularly **I**nterspaced **S**hort **P**alindromic **R**epeats) + Cas (**C**RISPR-**a**ssociated)



<https://www.youtube.com/watch?v=2pp17E4E-O8>



[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](#)

Animações

https://www.youtube.com/watch?v=UfA_jAKV29g

<https://www.youtube.com/watch?v=TnzcwTyr6cE>

<https://www.youtube.com/watch?v=jAhjPd4uNFY>

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. Transformação animal
6. Técnica de CRISPR

