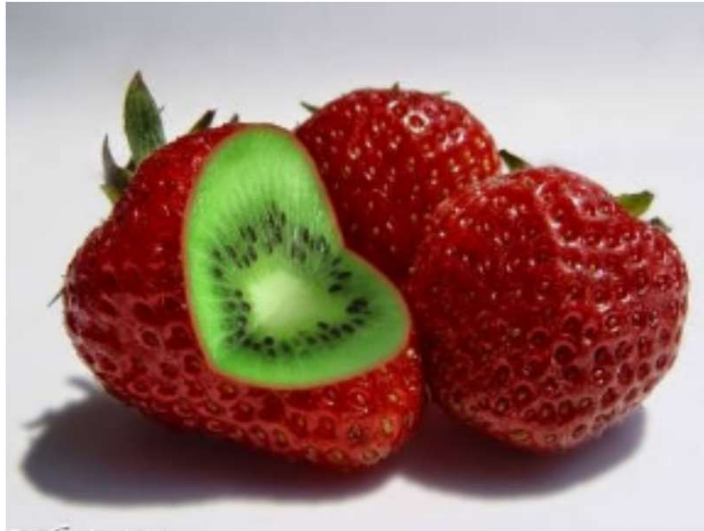


# Organismos Transgênicos



Bianca Zingales  
zingales@iq.usp.br

# Organismos transgênicos

---

## Organismos Geneticamente Modificados (OGM)

Definição:

São organismos em cujo genoma foram introduzidos um ou mais genes de outro organismo (bactéria, vegetal, animal, etc.) por técnicas de Biologia Molecular.

O OGM passa a expressar a característica codificada pelo gene exógeno.

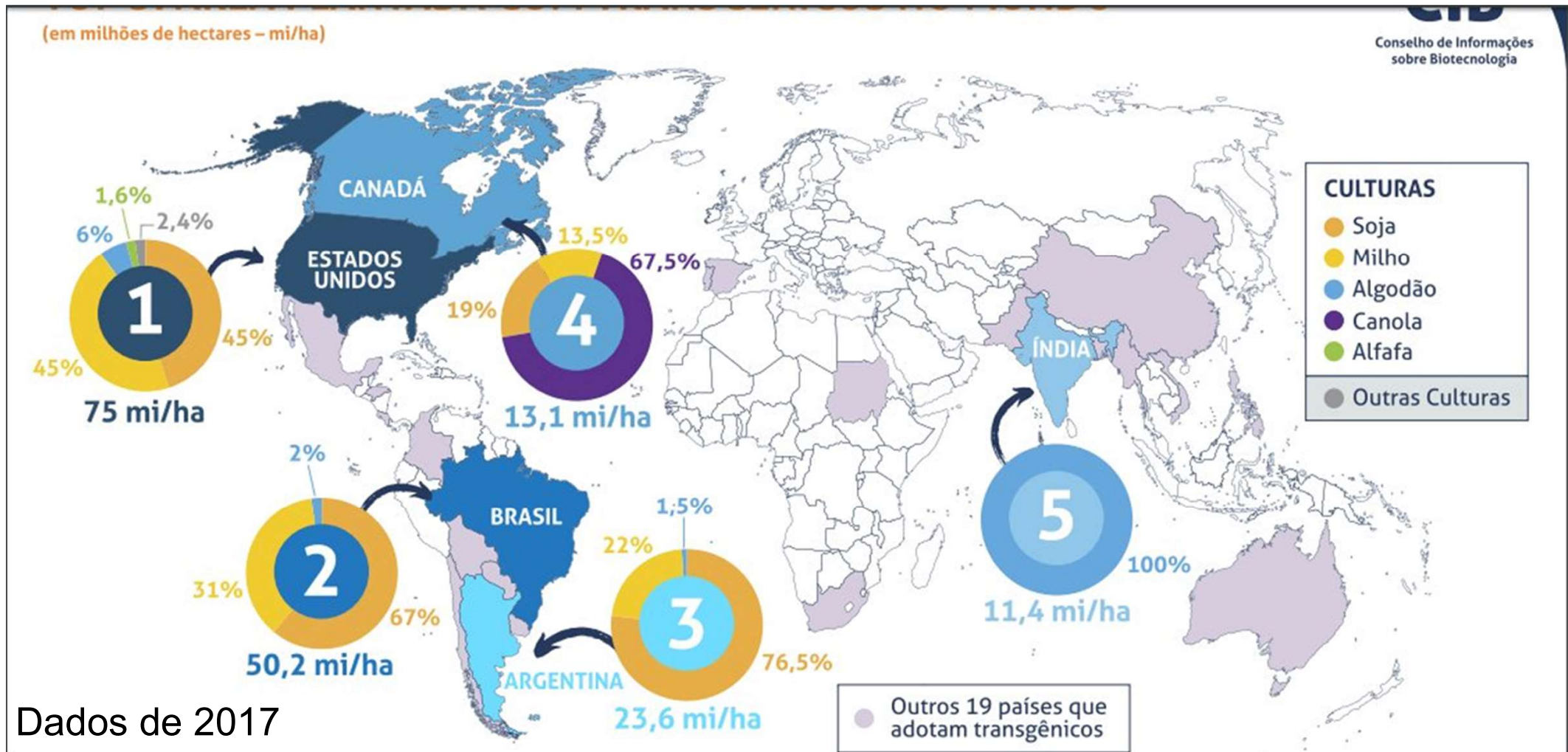
A característica é transmitida aos descendentes

# Objetivos Finais da Transgenia em Plantas

---

- Aumentar a produtividade das colheitas
- Reduzir o custo da produção

# Área plantada com Transgênicos



Brasil responsável por 26% de todo o cultivo global de transgênicos  
Cultivo de soja, milho e algodão.

# Plantas Transgênicas

## Vantagens de se transformar Vegetais

- Auto-fecundação
- Alta capacidade de regeneração

## Desvantagens

- Genomas muito grandes
- Monocotiledôneas (ex. milho, arroz, trigo)
- Dicotiledôneas (ex. feijão, soja) (genomas maiores)





# Como fazer uma planta transgênica

---

## Etapas

1. Clonagem do gene de interesse em um vetor
2. Transferência do vetor recombinante na célula vegetal
3. Integração do gene de interesse no genoma da célula
4. Regeneração da planta inteira a partir da célula transformada
5. Levar para o campo

## Resultado

Haverá transmissão do gene para as gerações futuras da planta.

## Referência

[https://www.esalq.usp.br/visaoagricola/sites/default/files/VA\\_13\\_Melhoramento\\_Genetico-artigo2.pdf](https://www.esalq.usp.br/visaoagricola/sites/default/files/VA_13_Melhoramento_Genetico-artigo2.pdf)

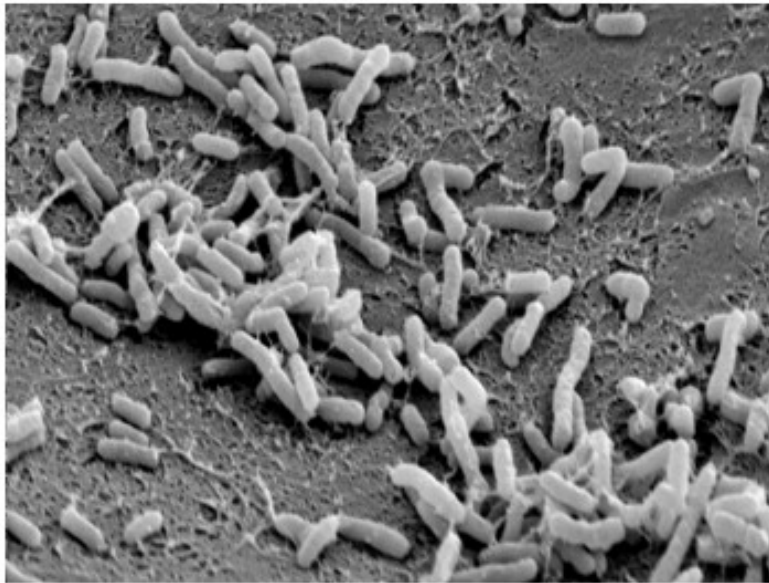
# Métodos para transgenia em plantas

---

- Sistema da *Agrobacterium tumefaciens*
- Biobalística

# Sistema da *Agrobacterium tumefaciens*

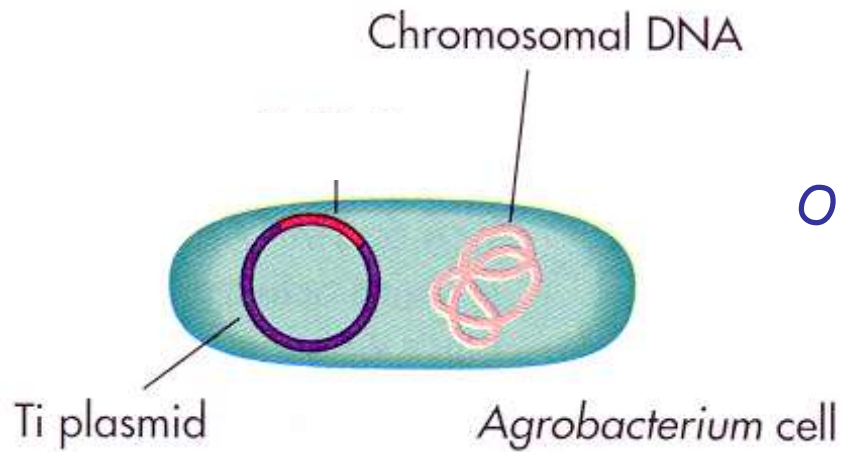
Bactéria de solo, Gram negativa.



Promove a formação de tumores na planta que infecta  
A bactéria induz divisão descontrolada das células vegetais infectadas.



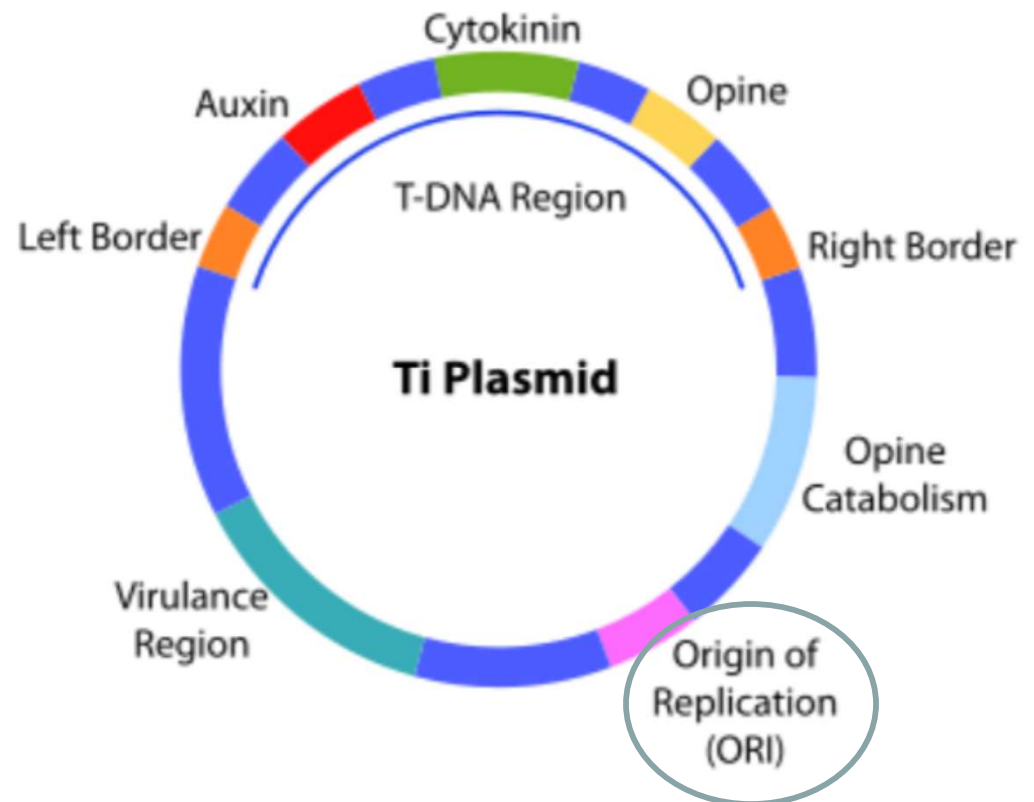
# Agrobacterium tumefaciens possui um plasmídeo



O plasmídeo Ti induz o tumor na planta

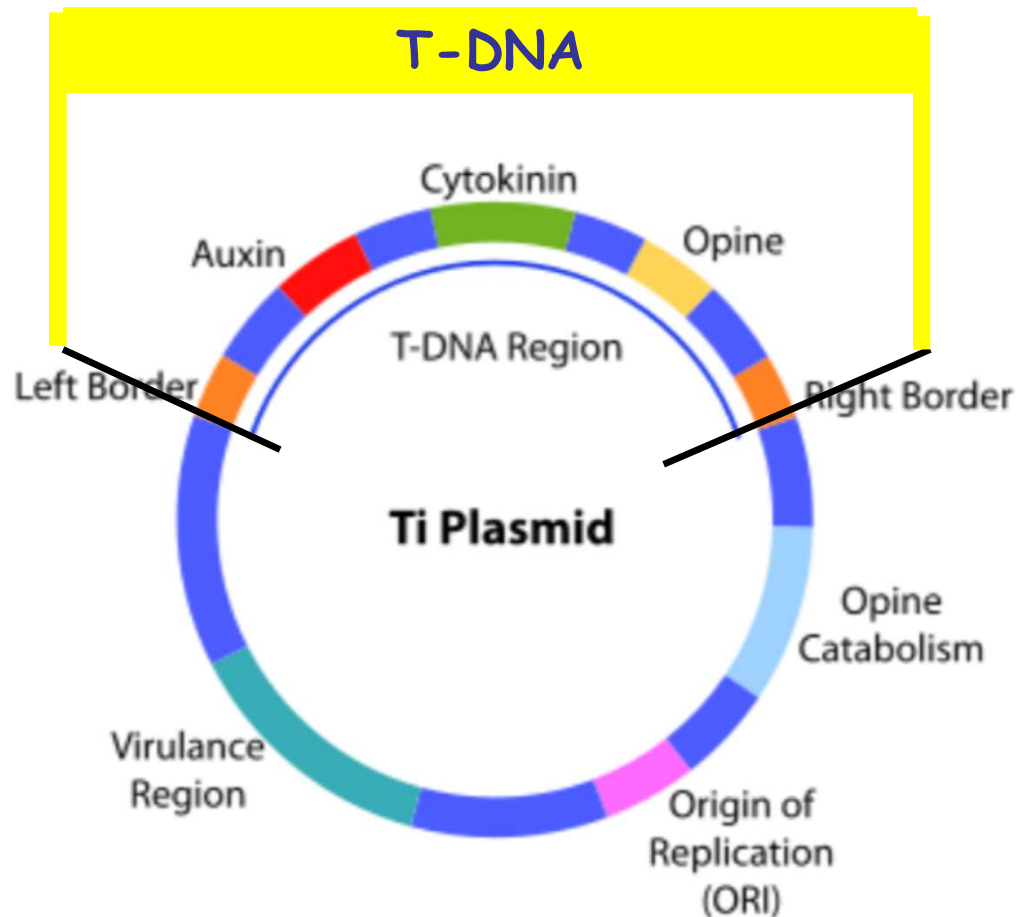
Ti = Tumor inducing plasmid

O plasmídeo Ti é usado para clonar o gene de interesse



# Plasmídeo Ti

No plasmídeo Ti há uma região - T-DNA - (~20 kb) - que se integra no genoma da célula vegetal no processo de infecção pela bactéria.

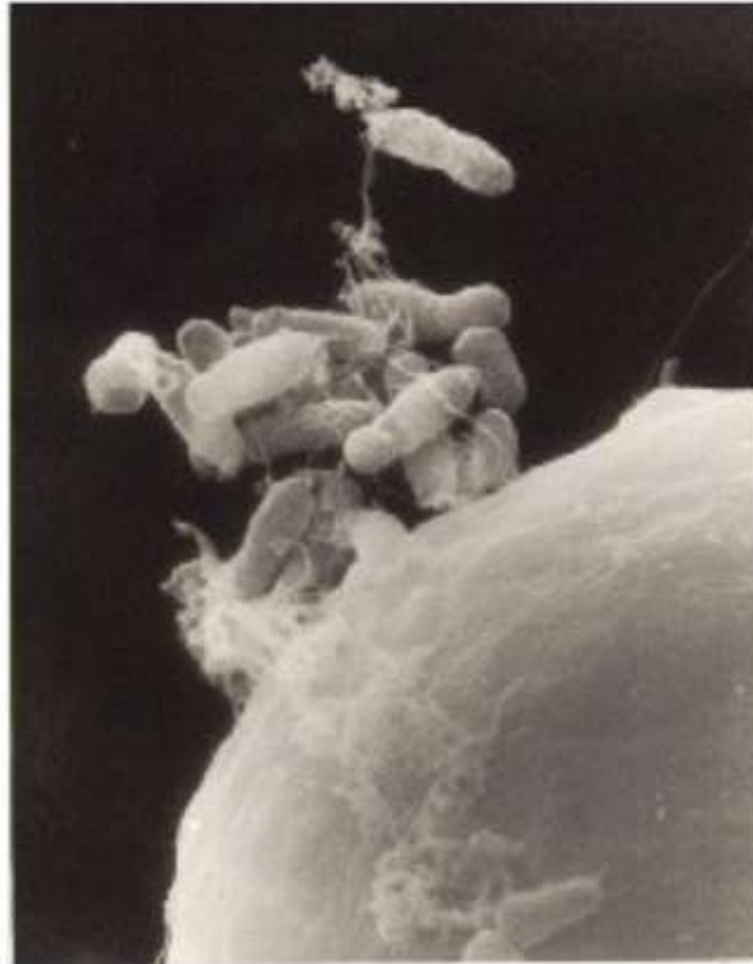


T-DNA contém os genes que promovem a formação do tumor - Genes codificam hormônios que promovem a divisão celular: Auxina, Citocinina e Opina

Right and Left border - regiões que permitem a integração no DNA da planta

# Infecção por *A. tumefaciens*

Bactéria adere à superfície da célula vegetal



Electron microscopy of Attachment of *Agrobacterium* cells to plant cell

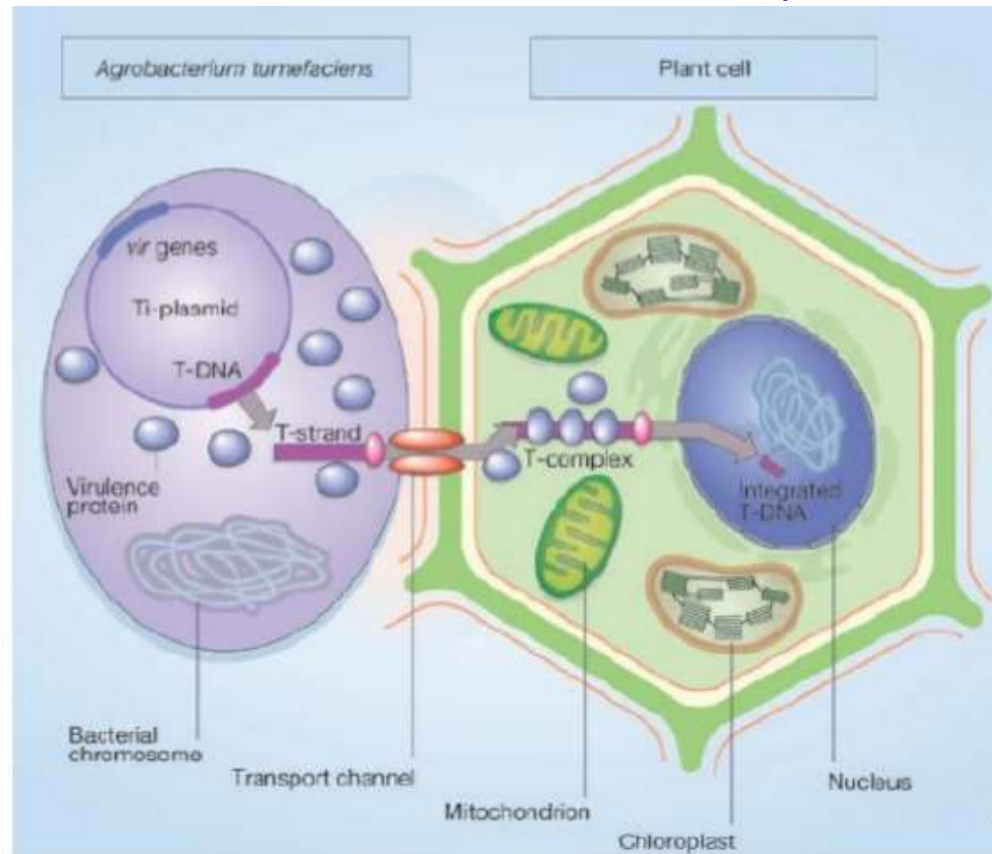
30

<https://www.slideshare.net/DARSHANDHARAJIYA1/molecular-biology-of-agrobacterium-infection>

# Infecção por *A. tumefaciens*

Bactéria injeta T-DNA, que se integra no DNA da célula

Célula passa a se dividir descontroladamente ➡ **Tumor**



<https://slideplayer.com.br/slide/2925053/>

<https://www.slideshare.net/DARSHANDHARAJIYA1/molecular-biology-of-agrobacterium-infection>

Não queremos que a planta transgênica tenha tumor...

Então os biólogos moleculares "engenheiraram" o plasmídeo Ti

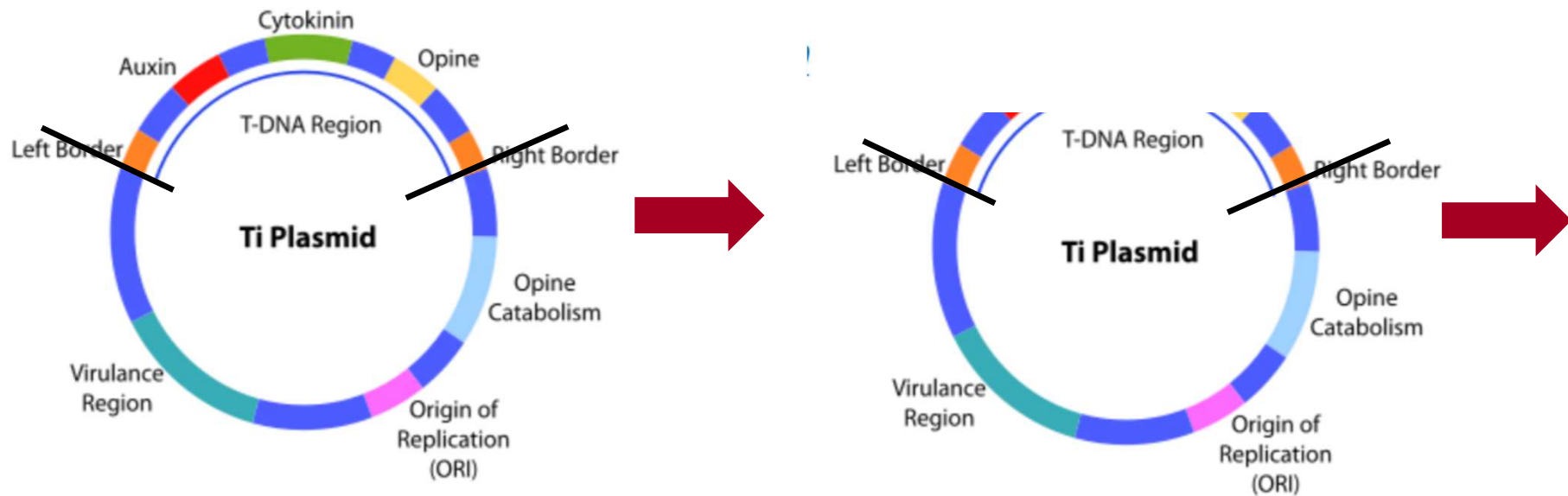




# Construção do Plasmídeo Ti para torná-lo um vetor de clonagem

Estratégia: Retirar do plasmídeo Ti parte da região do T-DNA que promove tumores

Deixar regiões que permitem a integração no genoma da célula vegetal: left border e right border

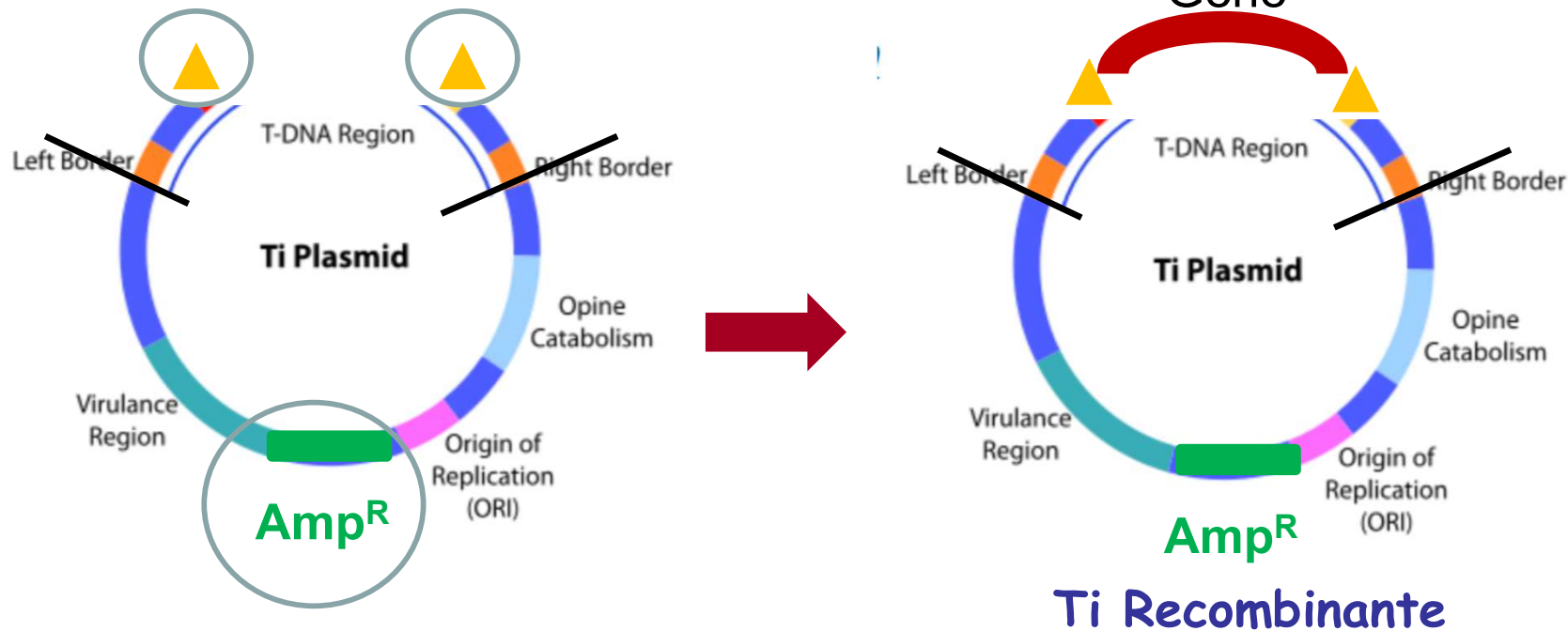


# Construção do Plasmídeo Ti para torná-lo um vetor de clonagem

1. Colocar sítios para enzimas de restrição. ▲
2. Adicionar região Amp<sup>R</sup> (que codifica a beta-lactamase) ■

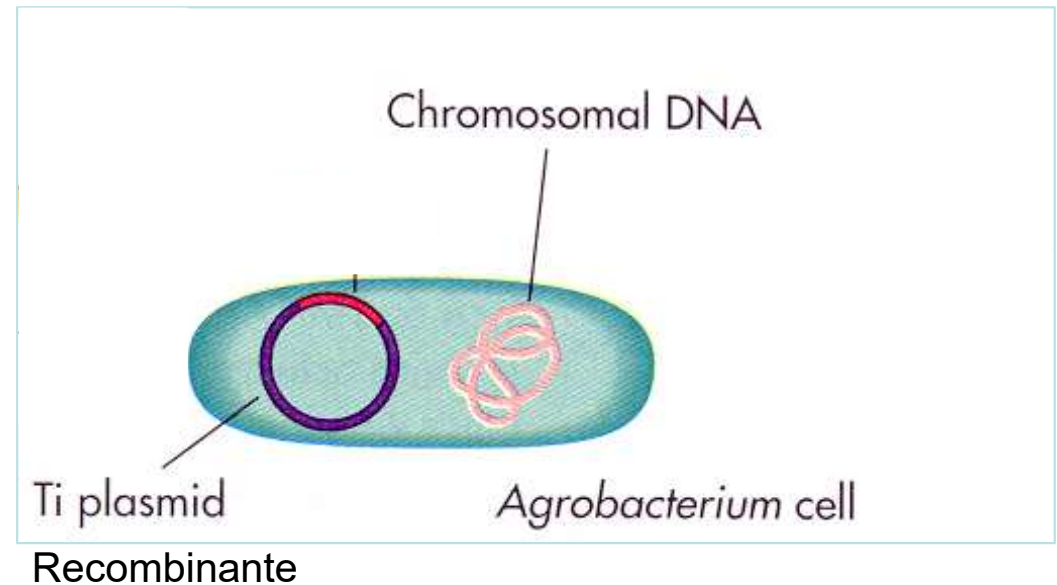
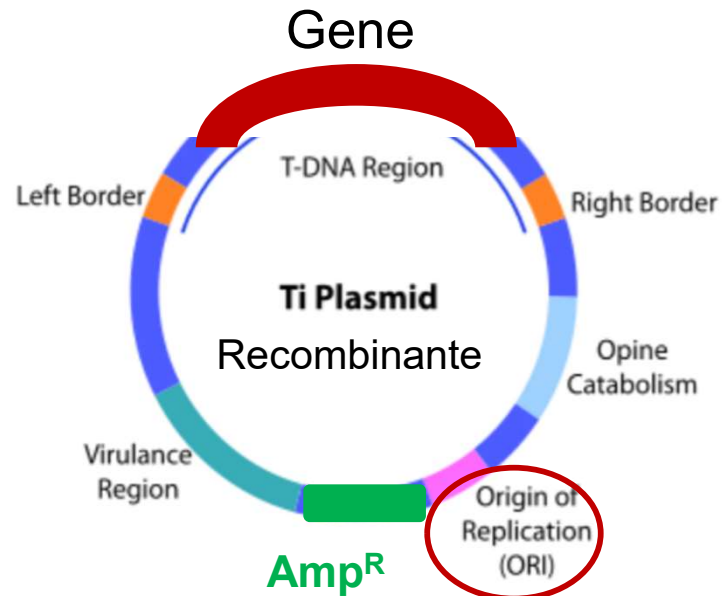
## Clonagem do gene

1. Amplificar o gene de interesse por PCR
2. Ligar o gene exógeno no local indicado ◡



# Plasmídeo Ti recombinante construído in vitro

Plasmídeo é inserido por transformação em *A. tumefaciens*

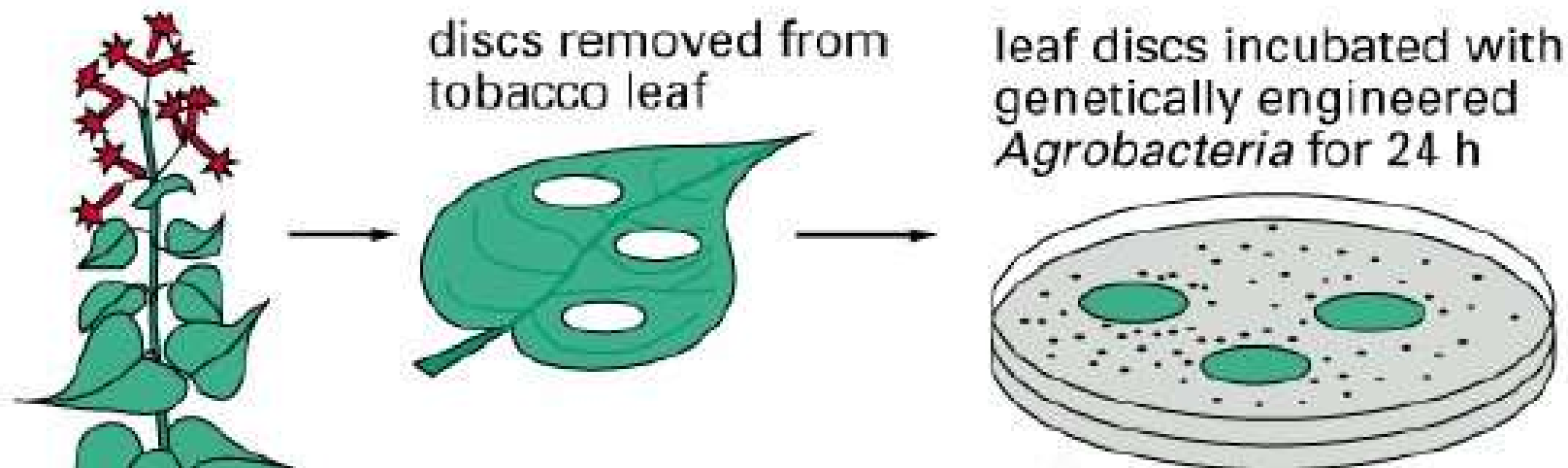


Como inserir o vetor recombinante na célula vegetal?

Infecção da *A. tumefaciens* recombinante na célula vegetal

# Procedimento para obter Planta Transgênica

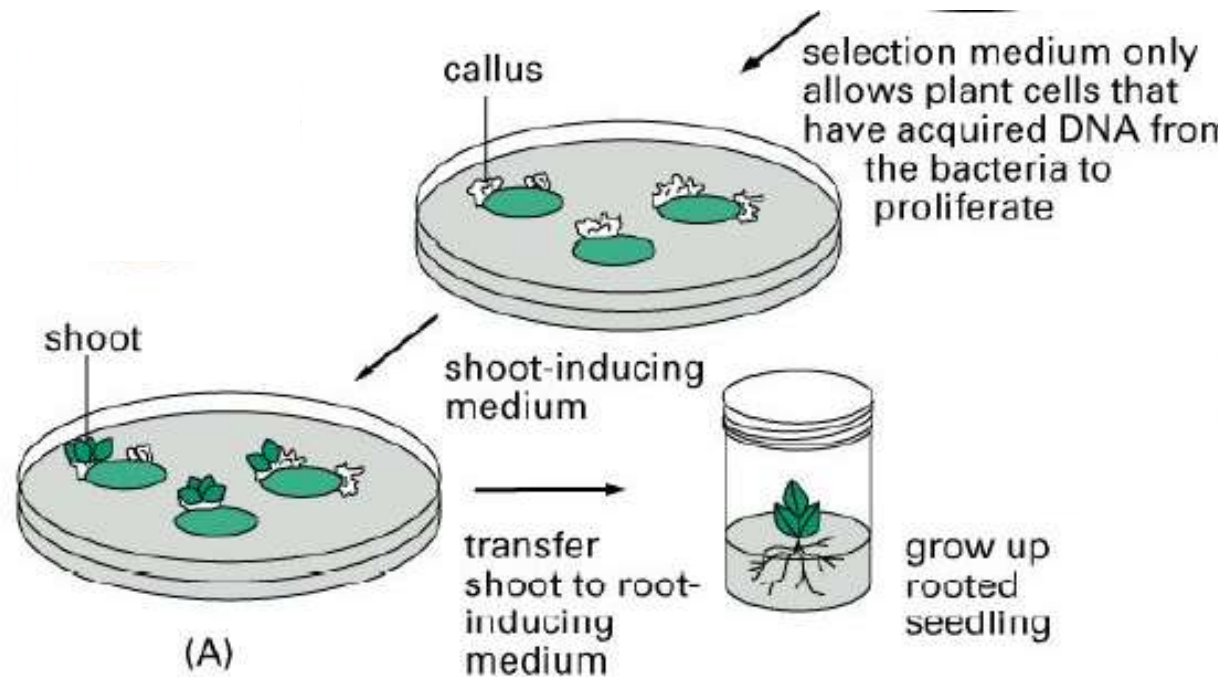
1. Cortar discos das folhas da planta. Colocar em meio de cultura apropriado.
2. Adicionar *A. tumefaciens* carregando o Ti com o gene de interesse.
3. A bactéria entra pelas bordas dos discos das folhas e o T-DNA recombinante se integra no cromossomo da célula vegetal



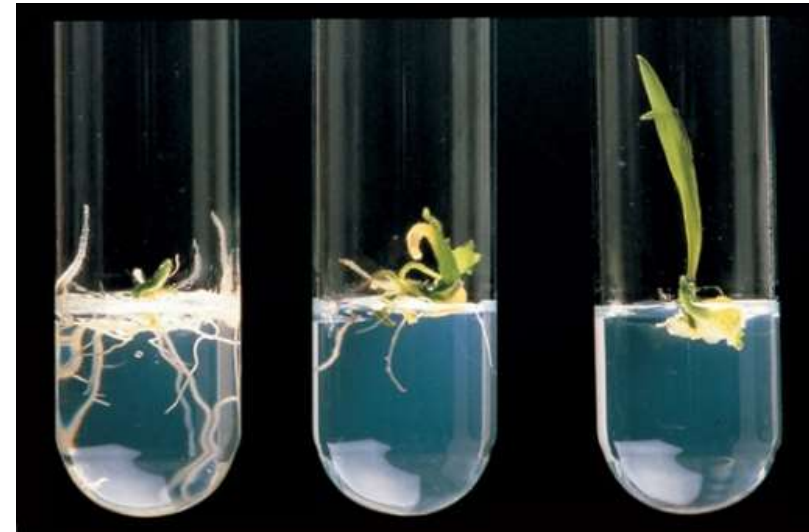
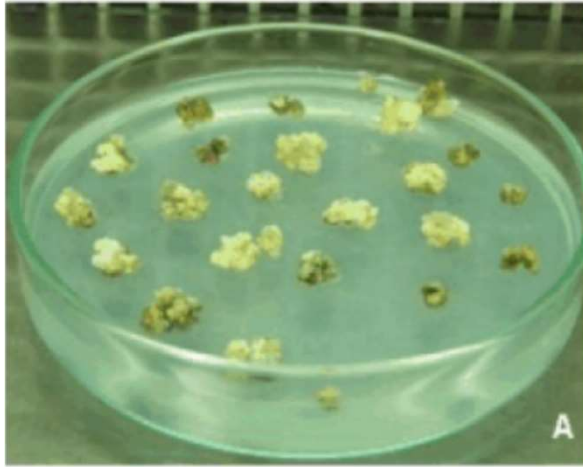


# Procedimento para obter Planta Transgênica

4. Cultivo dos discos das folhas num meio de seleção apropriado
5. Só crescem células que têm o plasmídeo recombinante
6. Colocar em meio de cultura para formação de calos



# Calos e Plântulas transgênicas



**Calos** são tecidos que têm a capacidade de se diferenciar em órgãos, regenerando plantas inteiras

Calos são transferidos para meios de cultura apropriados

**Plântulas** crescem

Plântulas são transferidas para estufa

---



Após crescer, as plantas são transferidas para o campo



As plantas transgênicas, desenvolvidas no Cenargen, ficam em casas-de-vegetação, onde são observadas e testadas, antes de irem para o campo.

Nota importante:

O gene foi inserido no genoma de UMA célula.

Todas as células da planta têm o gene e expressam o gene

As sementes da planta contém o gene

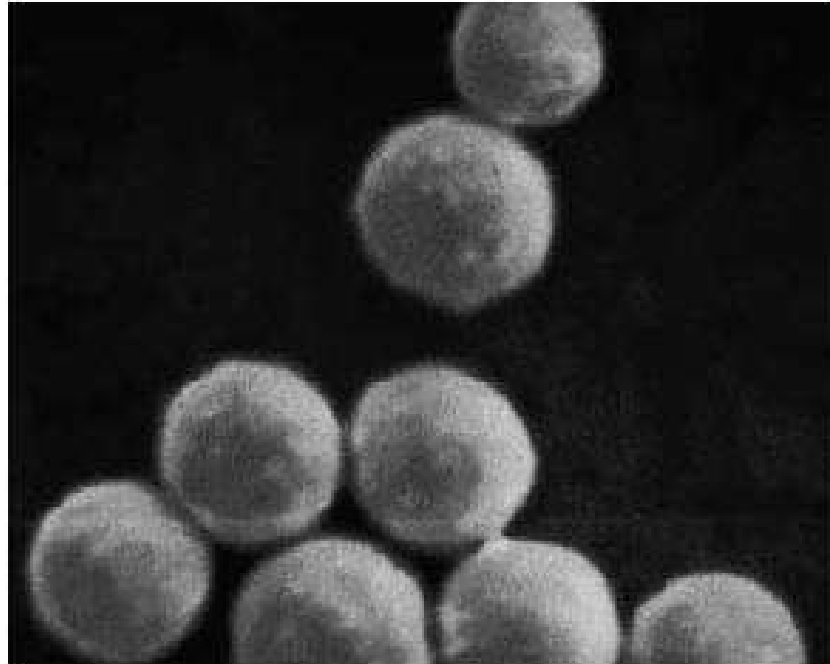
## Outro método: Biobalística

Utilizado em algumas espécies vegetais que são intolerantes à transformação por *Agrobacterium*



# Bombardeamento (biobalística)

- Método mecânico.
- O gene (DNA) a ser inserido na planta é usado para **revestir microprojéteis** de ouro (1,0 a 3,0  $\mu\text{m}$ ) ou tungstênio (0,2 a 3,0  $\mu\text{m}$ ).



Microscopic nucleic acid-coated gold particles.

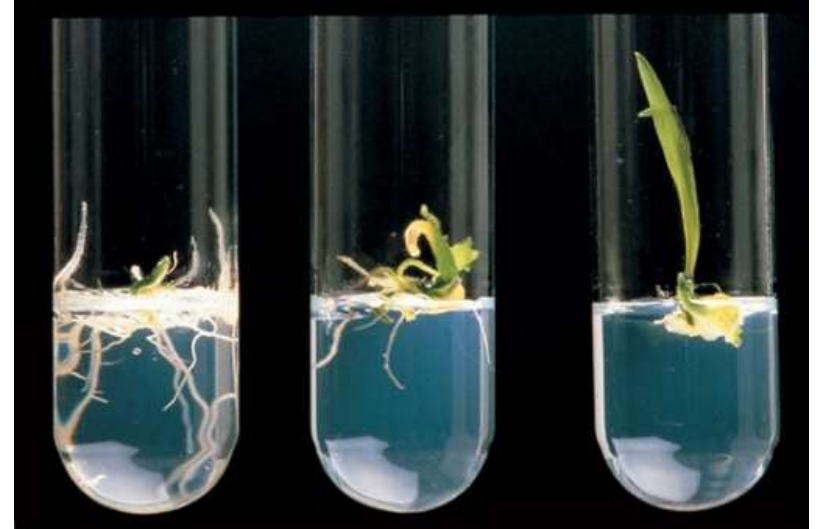
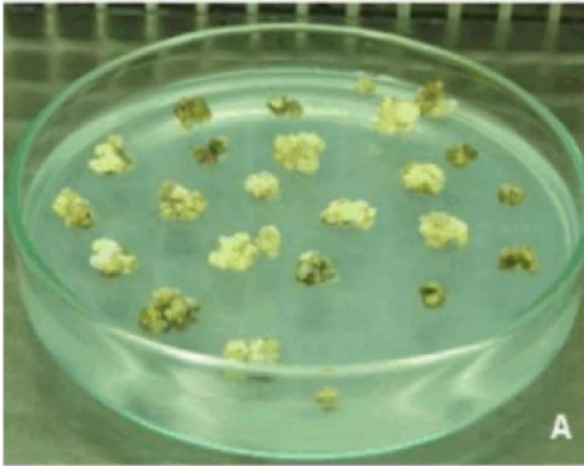
# Bombardeamento (biobalística)



- Um acelerador (geralmente impulsionado por He) bombardeia as partículas com velocidades superiores a 1.500 km/h.
- As partículas atravessam a parede celular e a membrana plasmática, levando o DNA para o interior da célula
- Podem ser bombardeados embriões, hipocótilos, cotilédones, discos foliares, calos e suspensões celulares
- Eficiência de transformação de 1% a 5%.

[https://www.youtube.com/watch?v=VqkIR\\_8YRfA](https://www.youtube.com/watch?v=VqkIR_8YRfA)

# Calos e Plântulas transgênicas



Calos crescem a partir dos protoplastos

Plântulas são transferidas para estufa onde crescem

Em seguida, as plantas são transferidas para o campo

# Referências

<http://www.bespa.agrarias.ufpr.br/paginas/livro/capitulo%20transgenicos.pdf>

<http://slideplayer.com.br/slide/49875/>

<http://www.fruticultura.iciag.ufu.br/transgenicos.htm>



# Exemplos de Transgenias em Plantas

**Objetivo Final:**

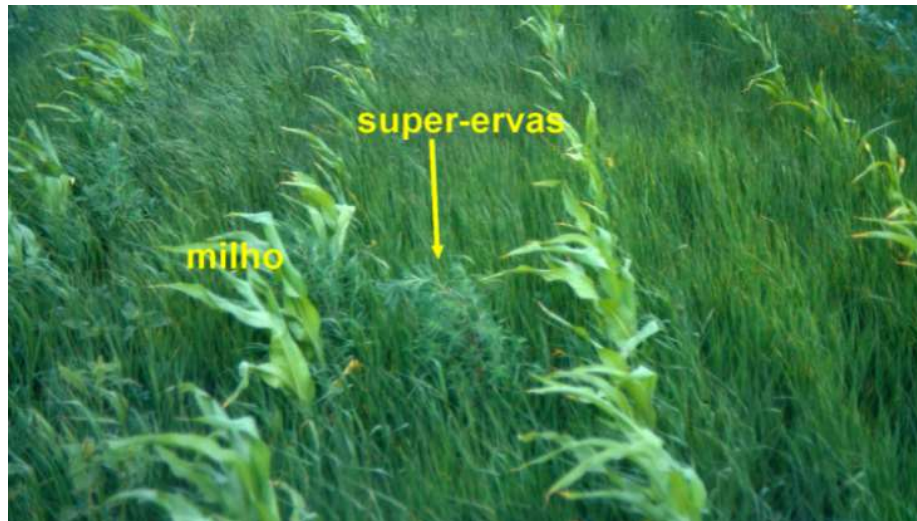
**Aumento da produção**

**Redução do custo de produção**

## Exemplo 1

Plantas transgênicas com resistência a herbicidas

Ervas daninhas crescem nas plantações e competem com elas

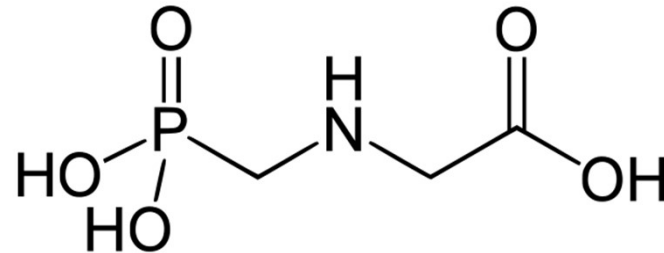


Objetivo: Matar as ervas sem danificar a planta de interesse

Nota: A maioria das plantas transgênicas já liberadas para plantio comercial contém transgenes para essa característica

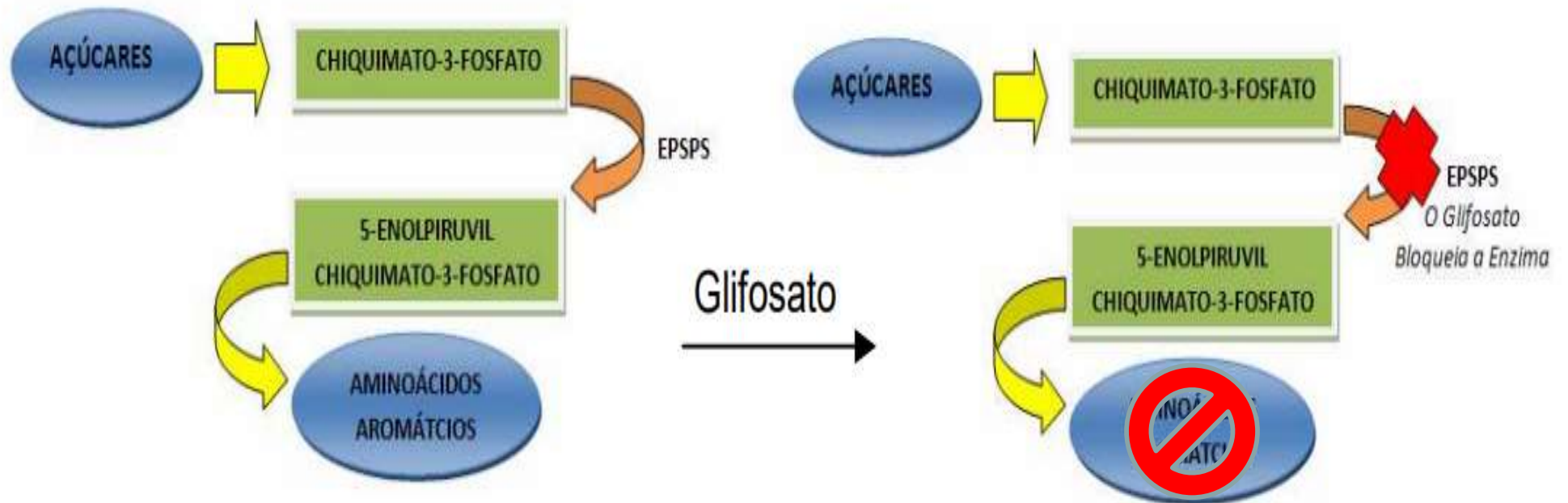
# Resistência a Herbicidas

Herbicida: Glifosato ((N-fosfometil)glicina) = Roundup



- Glifosato mata vegetais pois inibe síntese de aminoácidos aromáticos.
- Aminoácidos aromáticos são essenciais para a sobrevivência da planta
- Glifosato inibe a enzima EPSPS (5-enolpiruvato-shiquimato-3-fosfato sintase), que atua na síntese de aminoácidos aromáticos.

# Via de síntese de aminoácidos aromáticos nos vegetais



# Resistência a Herbicidas

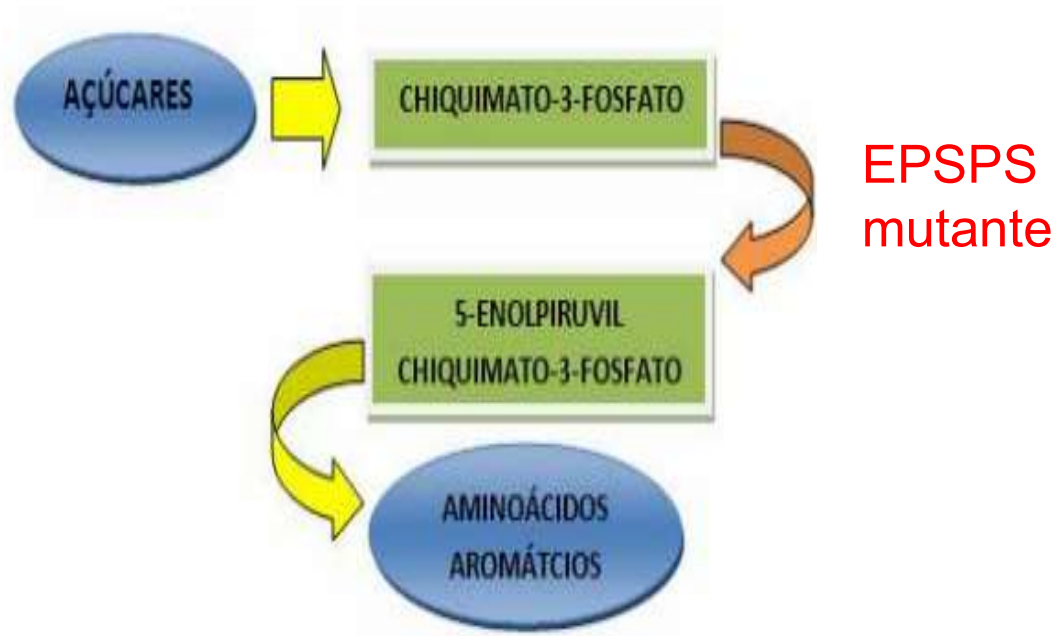
---

A enzima EPSPS é codificada pelo gene *cp4-epsps*

Foi descoberta uma enzima EPSPS mutante que NÃO é inibida por Glifosato.

Esta enzima é codificada pelo gene *cp4-epsps<sup>R</sup>*

# Abordagem: Introduzir na soja o gene *cp4-epsps<sup>R</sup>*



Há síntese de aminoácidos aromáticos MAS A ENZIMA NÃO É INIBIDA POR GLIFOSATO



# Transgenia - Estratégia Monsanto

---

- Amplificar o **gene cp4-epsps<sup>R</sup>** por PCR
- Clonar o gene
- Transferir o gene para plantas que se quer tornar resistentes a **Glifosato** (por Biobalística ou Plasmídeo Ti)
- Cultivar as plantas e obter **SEMENTES** que carregam o **gene cp4-epsps<sup>R</sup>**
- *Vender as sementes aos agricultores*

# Resistência a Herbicida

---

- As sementes dão origem a plantas
- A planta expressa a enzima **EPSPS mutante** e fica resistente ao Glifosato
- Quando pulverizar Glifosato, as ervas daninhas morrem

# Resistência a Herbicida

Aspecto após aplicar Glifosato na lavoura

The image shows two rows of soybean plants side-by-side, separated by a vertical yellow line. The left row, labeled 'Soja Transgênica', shows healthy green plants. The right row, labeled 'Soja Convencional', shows plants that are severely damaged, with yellowed and wilted leaves. Below the plants is a chemical reaction diagram illustrating the mechanism of glyphosate resistance. The diagram shows the conversion of shikimate-3-phosphate to 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate by the enzyme CP4-EPSPS. This reaction is inhibited by glyphosate, which is shown as a red arrow pointing to the enzyme's active site. The chemical structures are shown with their respective labels: shikimate-3-phosphate, phospho-enolpyruvate, CP4-EPSPS, and 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate.

**Soja Transgênica** | **Soja Convencional**

shikimate-3-phosphate + phospho-enolpyruvate  $\xrightarrow{\text{CP4-EPSPS}}$  5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate

Glyphosate

# Resistência a Herbicidas

## Resultado:

A planta transgênica cresce porque é resistente ao glifosato.  
Nota: Discussão sobre as vantagens econômicas para o agricultor.



A soja Roundup Ready® da empresa Monsanto possui resistência ao herbicida glifosato.

Problema Qual das duas sementes é transgênica para a resistência a glifosato?

---

1



2



Nota: não é necessário ver se o gene é expresso.  
Basta ver se o gene está presente na semente.

Como?

Por PCR!



# Qual das duas sementes é transgênica para resistência a glifosato?

## Procedimento

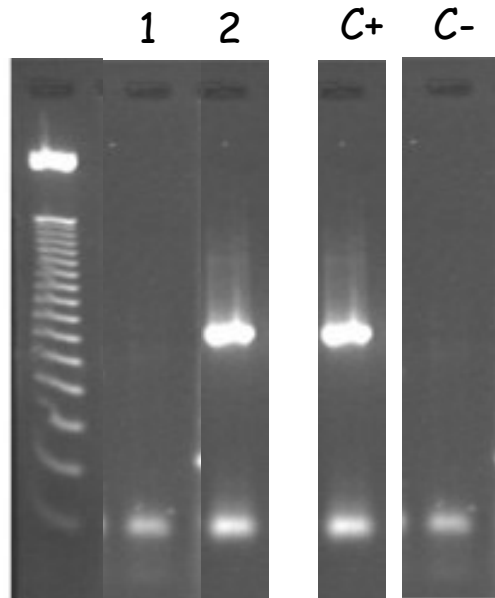
- Extrair o DNA das duas sementes
- Desenhar primers para fazer PCR do gene *cp4-epsps<sup>R</sup>*
- Fazer PCR com DNA de cada semente
- Fazer PCR de um controle do gene (C+) e um controle sem DNA (C-)
- Eletroforese dos produtos da PCR.

# Qual das duas sementes é transgênica para resistência a glifosato?

1



2



C+: DNA do plasmídeo com o gene *cp4-epsps<sup>R</sup>*

Qual a semente transgênica?



## Exemplo 2

---

### Plantas com resistência a insetos (pragas)

Inseticidas são usados também para o controle de pragas nas plantações

A utilização de plantas transgênicas com resistência a insetos reduz a aplicação de agrotóxicos,

Consequente redução dos custos de produção e menor toxicidade para o ambiente.

# Pragas



# Resistência a insetos (pragas)

A bactéria *Bacillus thuringiensis* produz uma proteína chamada Cry que é tóxica para insetos.

Se o inseto se alimentar de Cry - MORRE

Proteína Cry



Bactéria *B. thuringiensis*

# Resistência a insetos (pragas)

---

**Objetivo:** Obter plantas de interesse comercial transgênicas contendo o gene Cry

**Procedimento:**

- Isolar DNA da bactéria *Bacillus thuringiensis*
- Amplificar o gene Cry por PCR
- Clonar o gene Cry em vetor apropriado
- Introduzir a construção na planta (qualquer método)
- Gene exógeno integra-se no genoma da planta
- Obtenção de plantas transgênicas que expressam Cry
- Inseto come a planta e **morre**



## Milho-Bt com gene Cry

## Milho Selvagem



Figura 09: Sintomas de danos causados pela alimentação de *Spodoptera frugiperda* (Smith) em folhas de milho Bt contendo a toxina Cry 1 A(b) (A) e em folhas do isogênico não-Bt (B), Sete Lagoas-MG, outubro de 2008

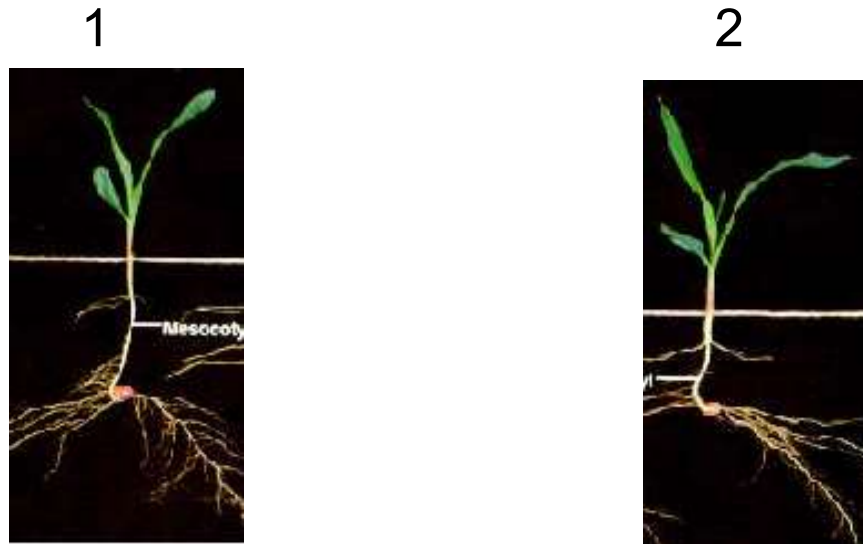


• <http://www.cnpms.embrapa.br/mipmilho/arquivos/500PRMT.pdf>

<https://www.embrapa.br/documents/1344498/2767891/milho-bt-teoria-e-pratica-da-producao-de-plantas-transgenicas-resistentes-a-insetos-praga.pdf/4af81f7d-c402-4c02-8ad2-a3700588388f>

## Problema

Qual das plantas é transgênica para o gene *Cry*?



Proponha um procedimento utilizando técnicas de Biologia Molecular para responder a pergunta

## Exemplo 3

### Melhoramento nutricional

- Clonagem de genes que codificam enzimas das vias metabólicas

Exemplo: "arroz dourado": produz cerca 20 vezes mais beta caroteno (precursor da vitamina A).





# Plantas Transgênicas

---

- **Vantagens :**

Aumento da Produção de 10 a 20%

- **Desvantagens:**

Alteração do ecossistema

**Conclusão: NECESSIDADE de:**  
Controle científico e governamental  
Normatização

# Animais Transgênicos

---



“Animais contendo moléculas de **DNA recombinante** introduzidas em seu genoma **por intervenção humana**”

# APLICAÇÕES

---

Melhoramento Animal

Estudo da Regulação gênica e do Desenvolvimento

Estudo de doenças genéticas

Animais como fábrica de proteínas

Diagnóstico por imagem

Terapia gênica

# Transgênicos 1001 aplicações