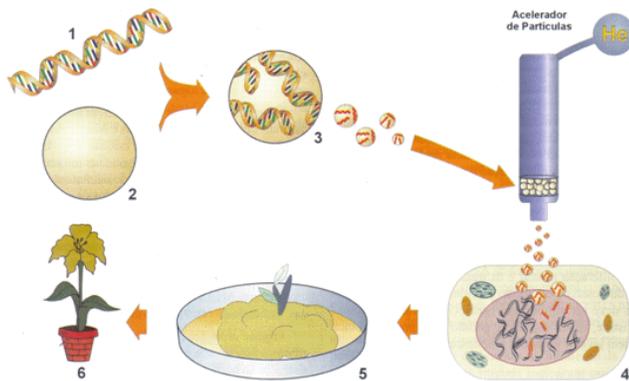


LGN0232 - Genética Molecular

# Métodos de Transformação de Plantas

9<sup>a</sup> 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**
  - **Transgene** pressupõe um gene que originou-se de outra espécie!
  - **Cisgênese** – gene de espécie sexualmente compatível reintroduzido!
- Organismos com modificações genéticas que recebem um **transgene** são denominados de **transformados** ou **transgênicos**
- **Organismos Geneticamente Modificados (OGM)**

NÃO É TODO **OGM** QUE É UM **TRANSGÊNICO!**

# 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**



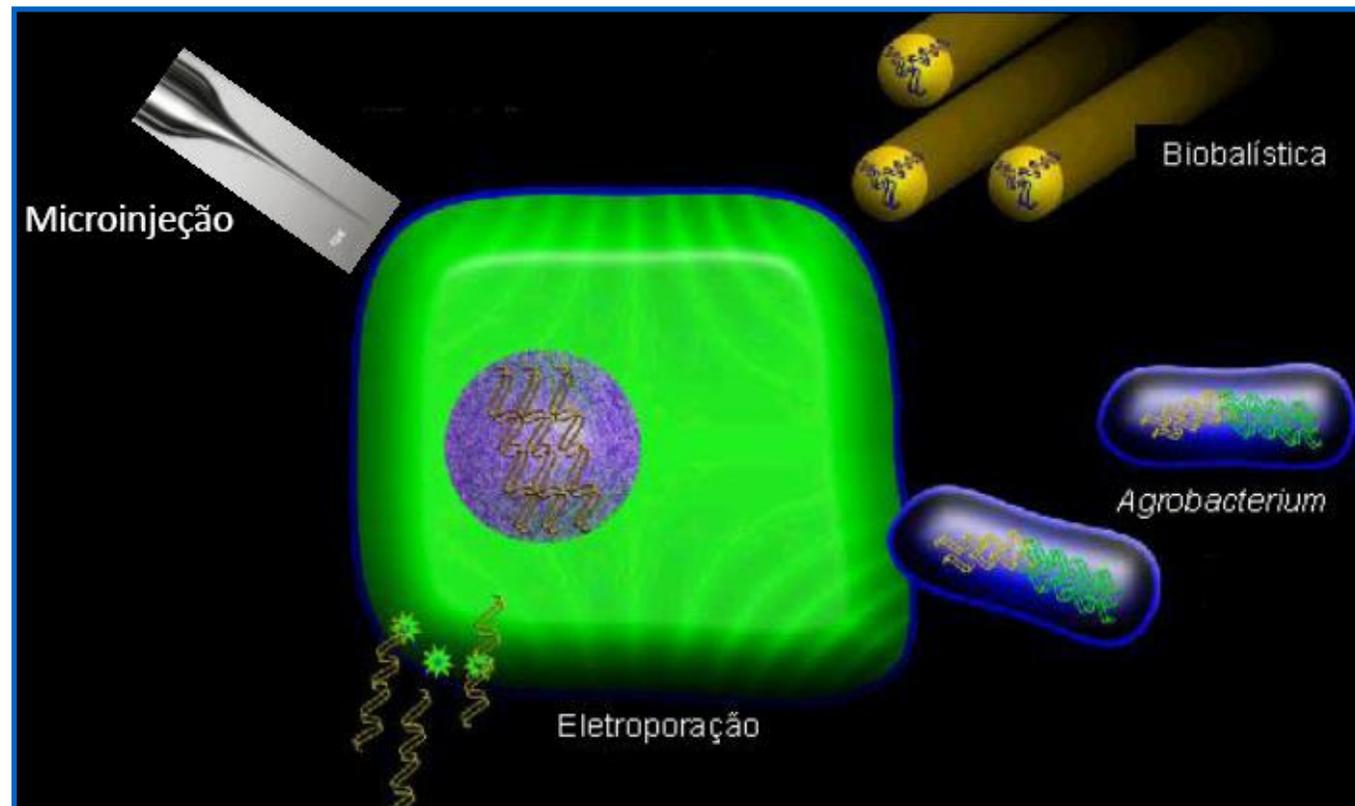
- algodão
- batata
- milho

**Banco de dados sobre culturas GM**

# Métodos de Introdução de Genes na Célula

Métodos usados:

- *Agrobacterium*
- Biobalística
- Eletroporação
- Microinjeção



**Dependente do organismo alvo!**



# Etapas Laboratório

Construção do vetor com o transgene



Introdução do DNA dentro da célula vegetal



Seleção



Regeneração da planta



Confirmação



Avanço de gerações (sementes)

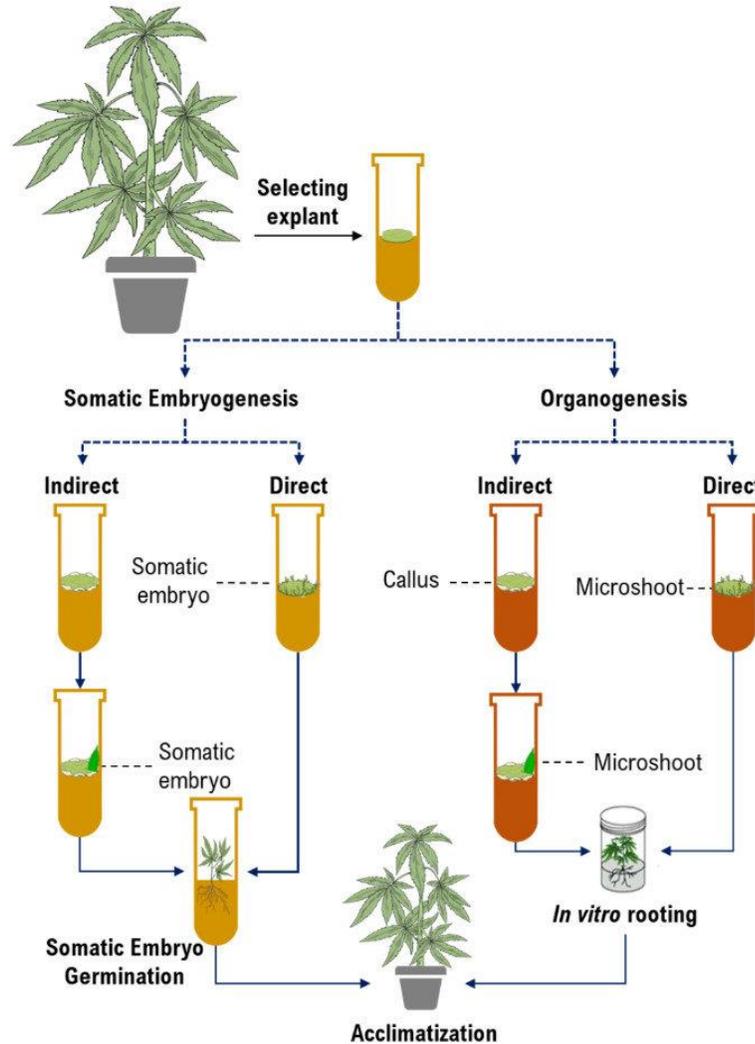


**Totipotência** = capacidade de regeneração da planta a partir de uma única célula

Cultura *in vitro*



# Cultura *in vitro* de Plantas

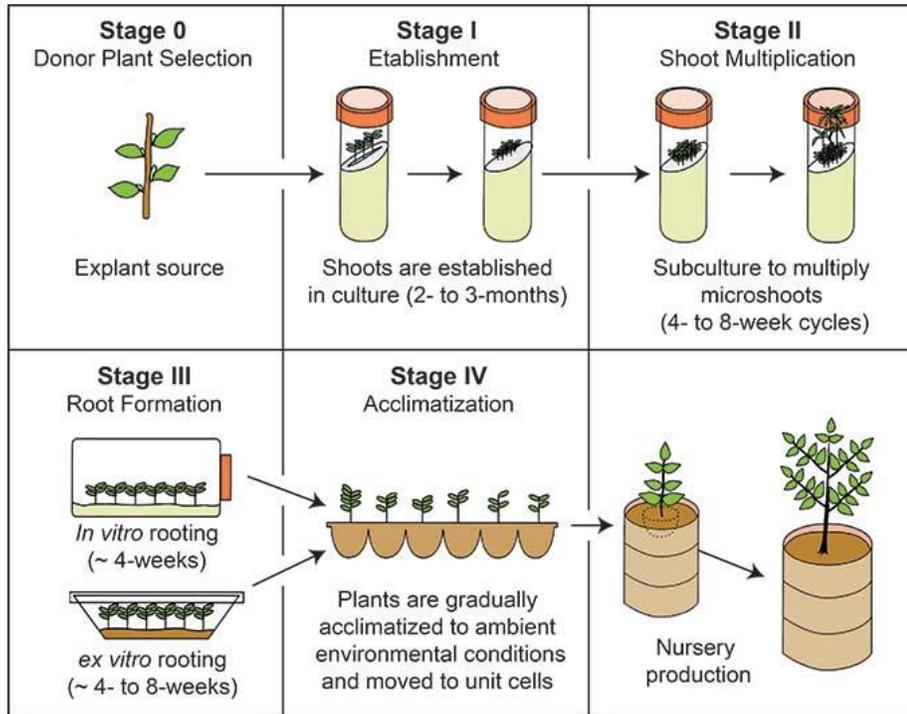


## Rotas de Morfogênese *in vitro*

- Organogênese
  - Direta
  - Indireta – após calogênese
- Embriogênese Somática
  - Direta
  - Indireta – após calogênese
- Micropropagação

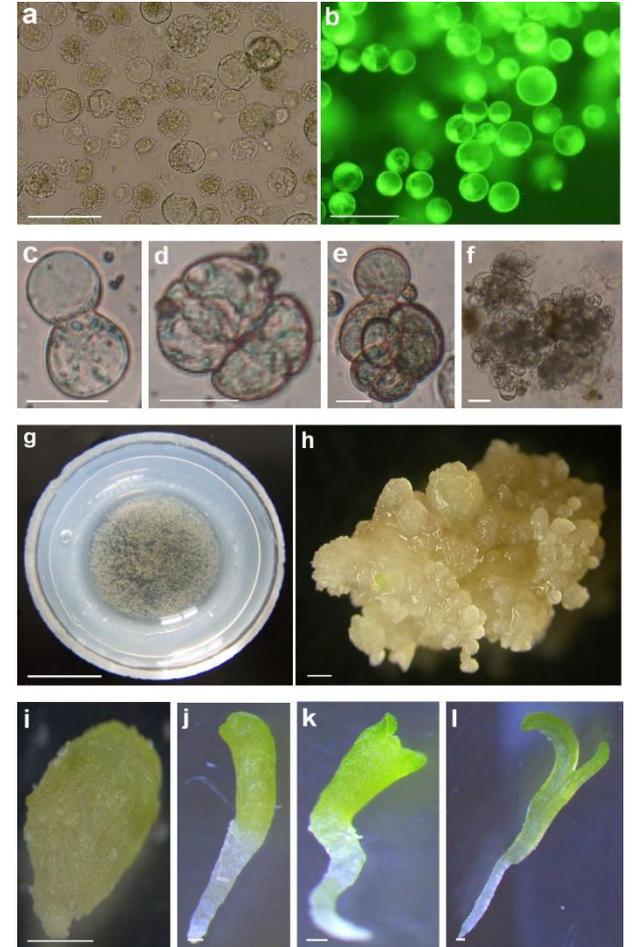
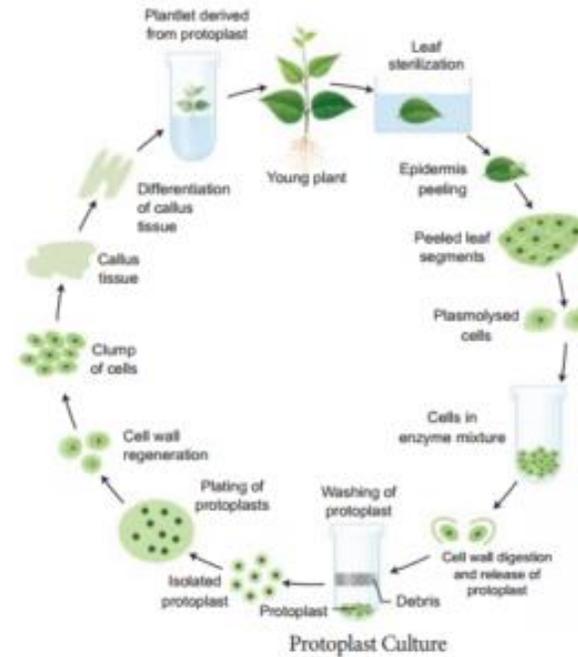
# Cultura *in vitro* de Plantas

## Micropropagação

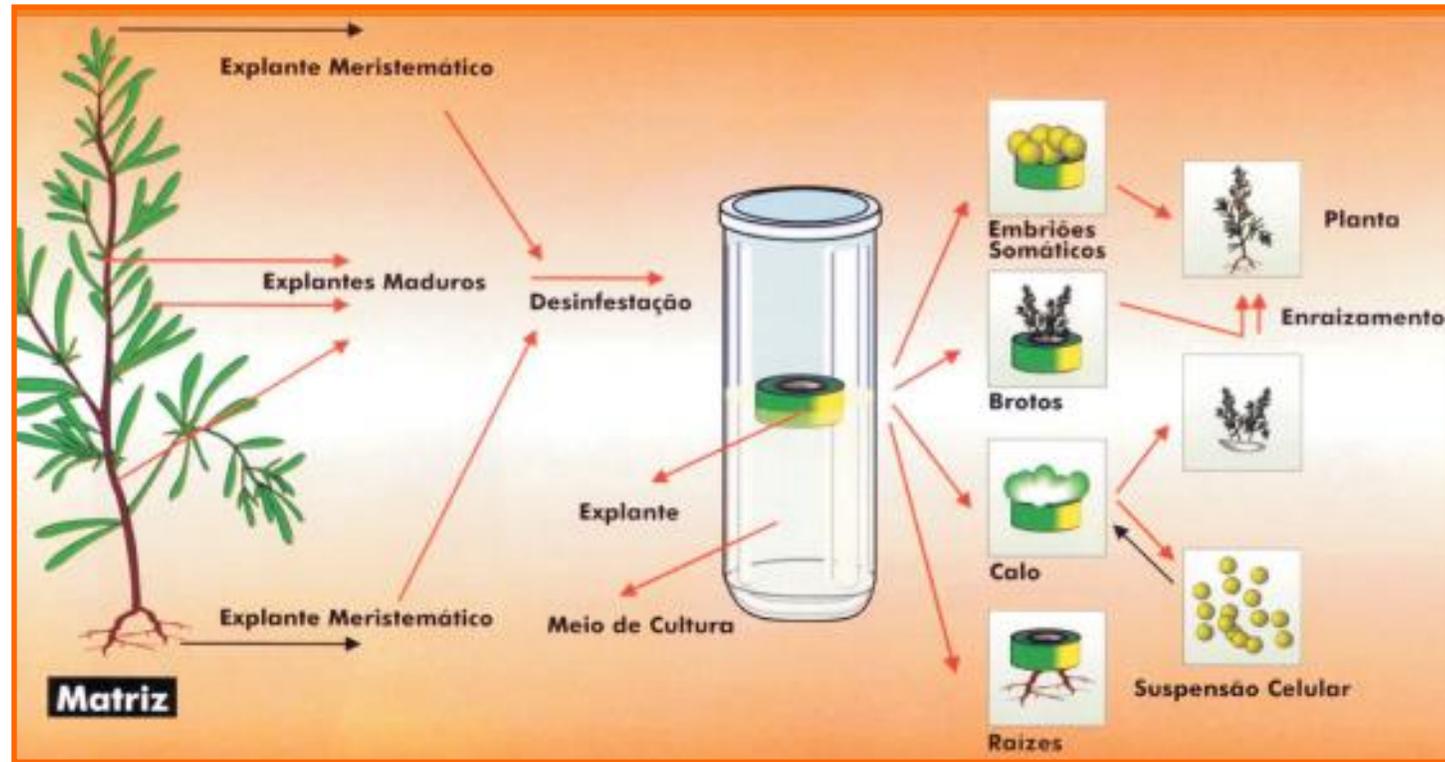


## Micropropagação

## Protoplastos



# Cultura *in vitro* de Plantas



Planta regenerada



Germinação



# Cultura *in vitro* de soja

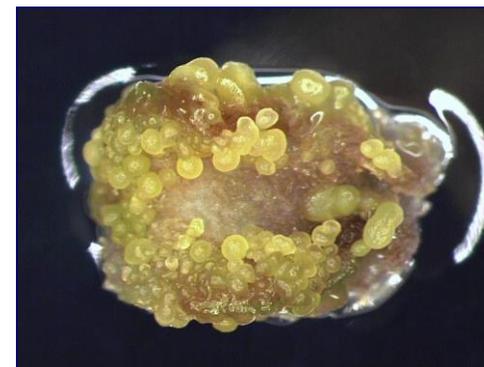
Desenvolvimento



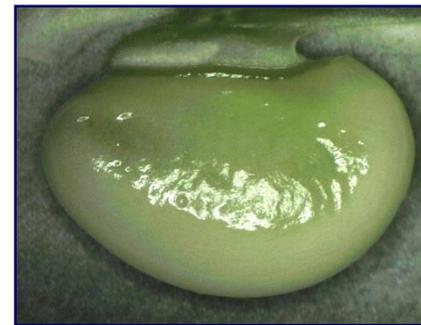
Proliferação



Indução



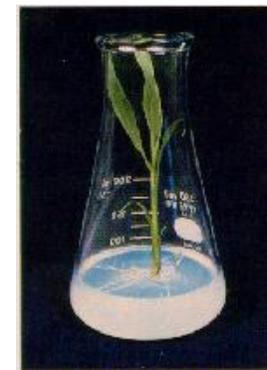
Sementes imaturas



# Transformação – Célula Alvo

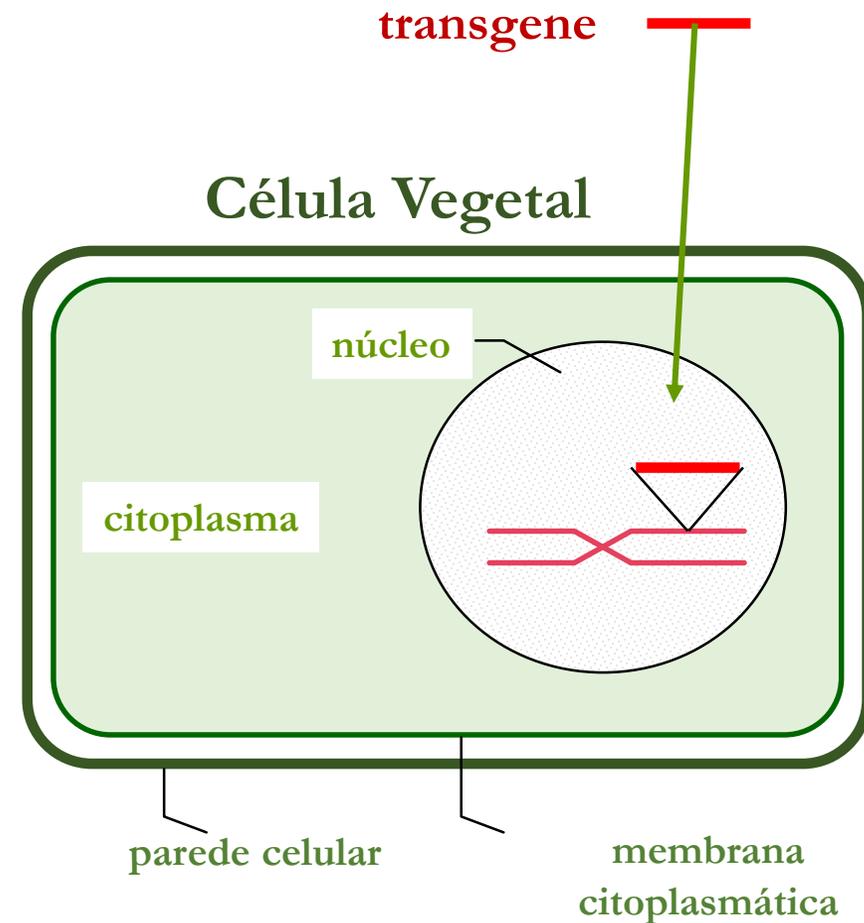
Os protocolos de transformação introduzem o DNA nas células de plantas em cultura *in vitro*\*

- 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)



# 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*

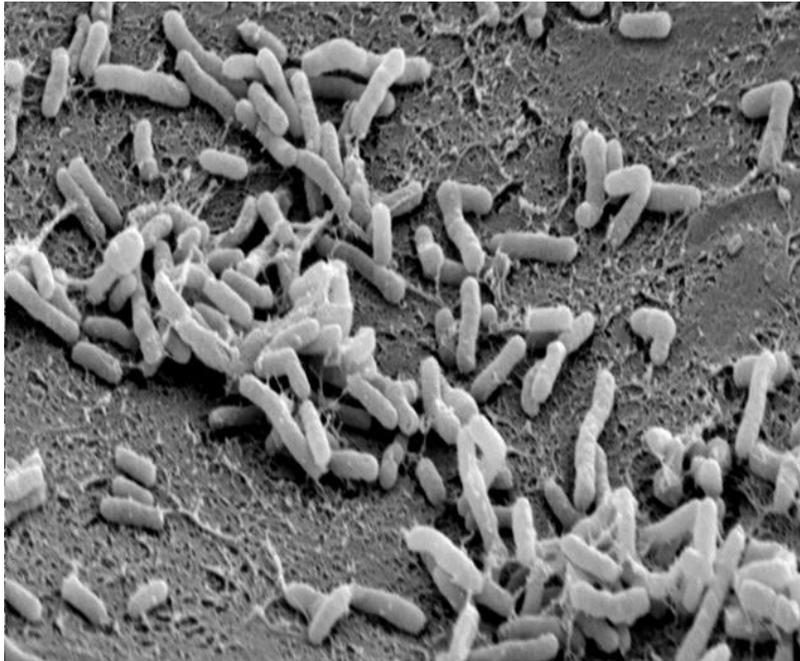
- Bactéria fitopatogênica de solo que tem a capacidade de transferir parte do seu DNA para dentro da célula da planta
- No laboratório, a bactéria é colocada em cultura junto com as células de plantas, ou inoculada no tecido da planta, transferindo parte do seu DNA para as células da planta

## **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.

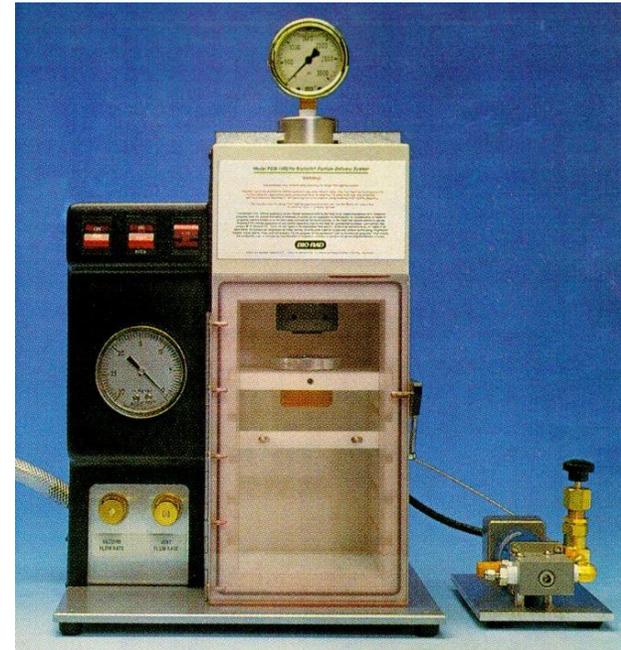
# Método Biológico x Físico

## *Agrobacterium tumefaciens*



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

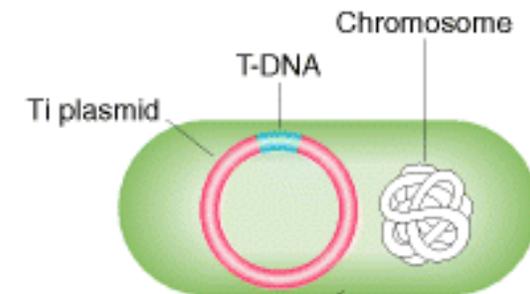
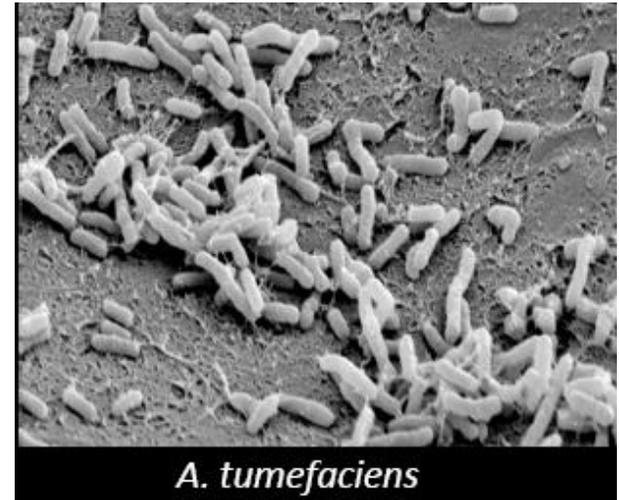
## Bombardeamento de microprojéteis “Biolística” ou *gene gun*



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

# *Agrobacterium tumefaciens*

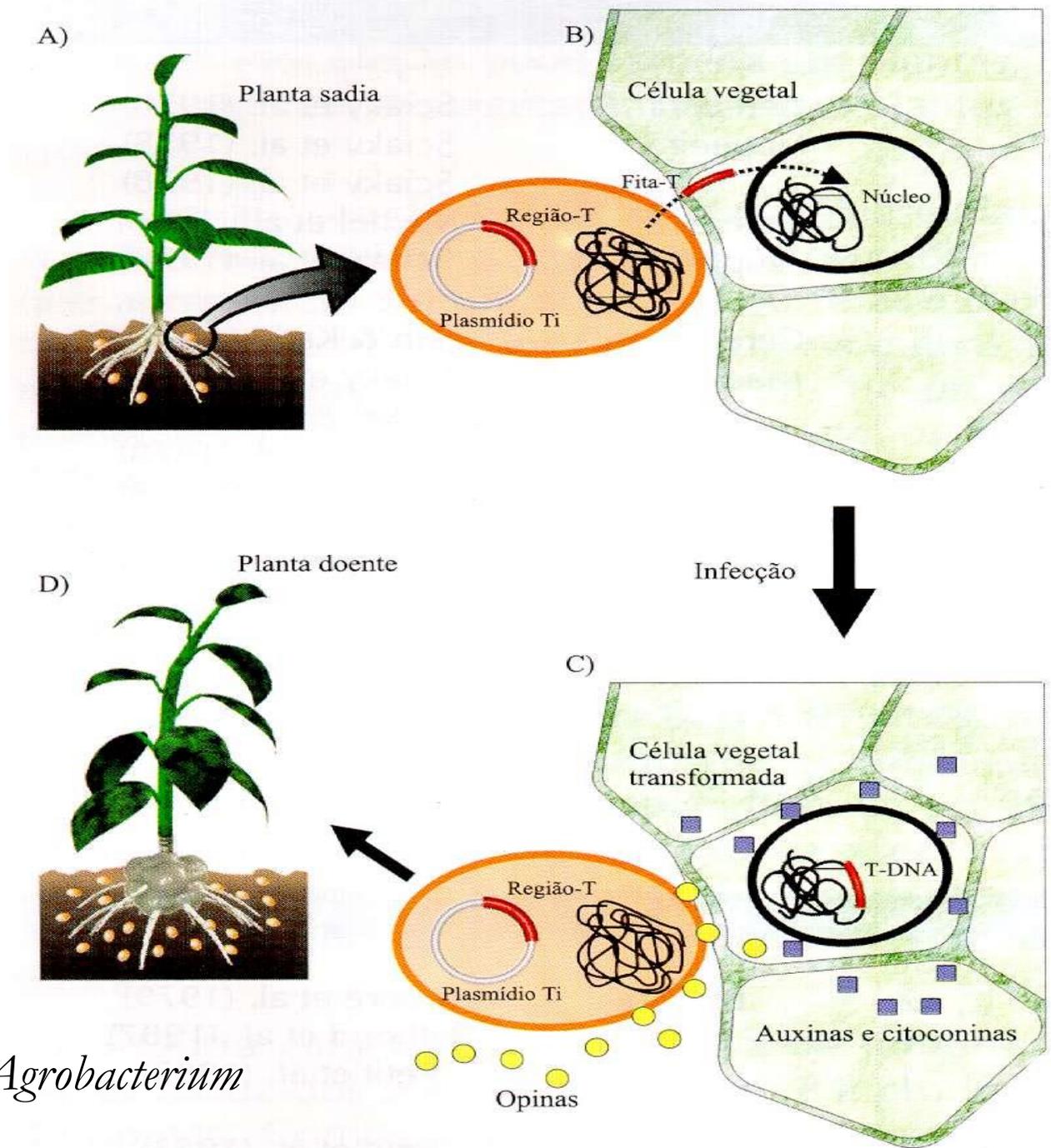
- Bactéria de solo **Gram-negativa**, tipo bacilo
- Causa ‘galha da coroa’ (*crown gall* disease): videira, maçã, etc.
- Afeta mais dicotiledôneas e pouco monocotiledôneas
- Família Rhizobiaceae
- Erwin Smith – descreveu em 1892
  
- Outras espécies:
  - *Agrobacterium rhizogenes* - raiz em cabeleira (“*hairy root*”)
  - *Agrobacterium radiobacter* - não tumorogênica (sem Ti)



# Galha da Coroa

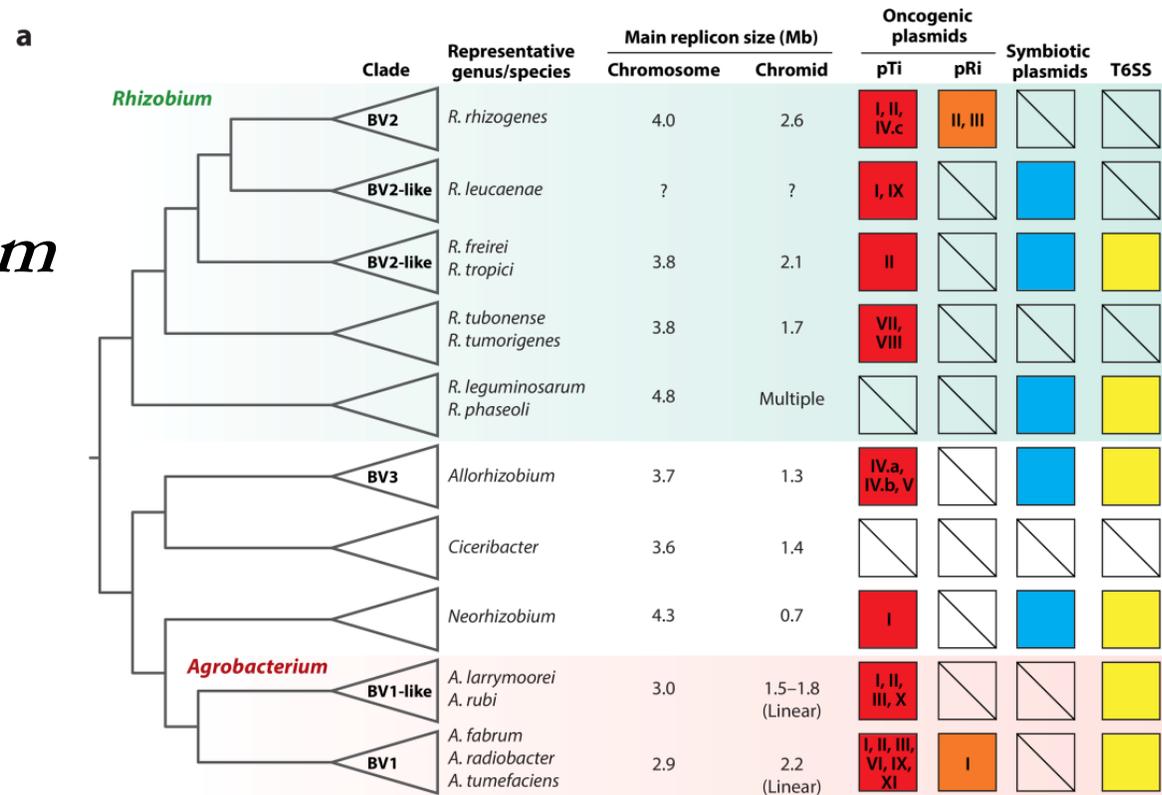


# Patogenicidade natural de *A. tumefaciens*

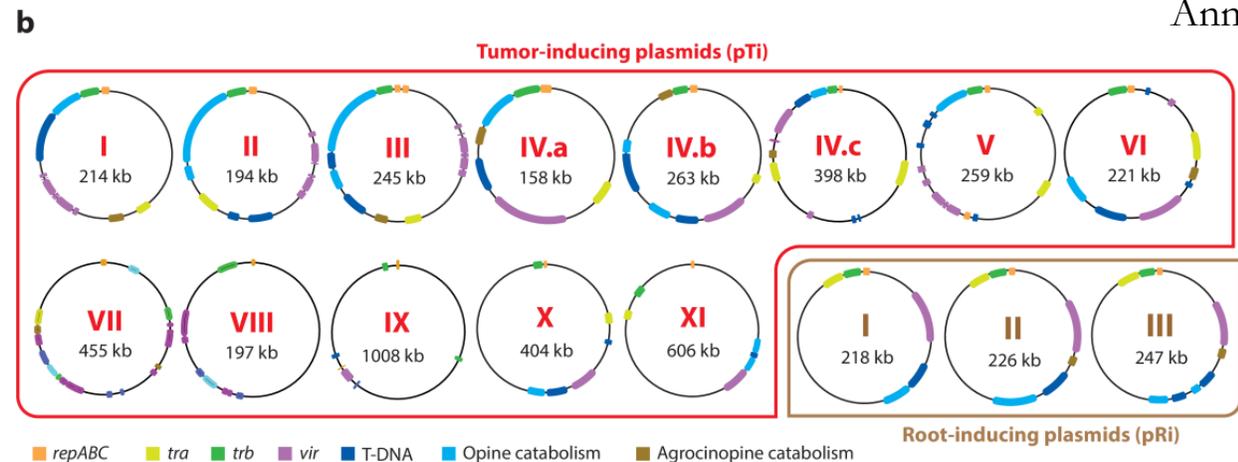


Opinas: fonte de C e N para *Agrobacterium*

# Classificação de *Agrobacterium* e *Rhizobium*

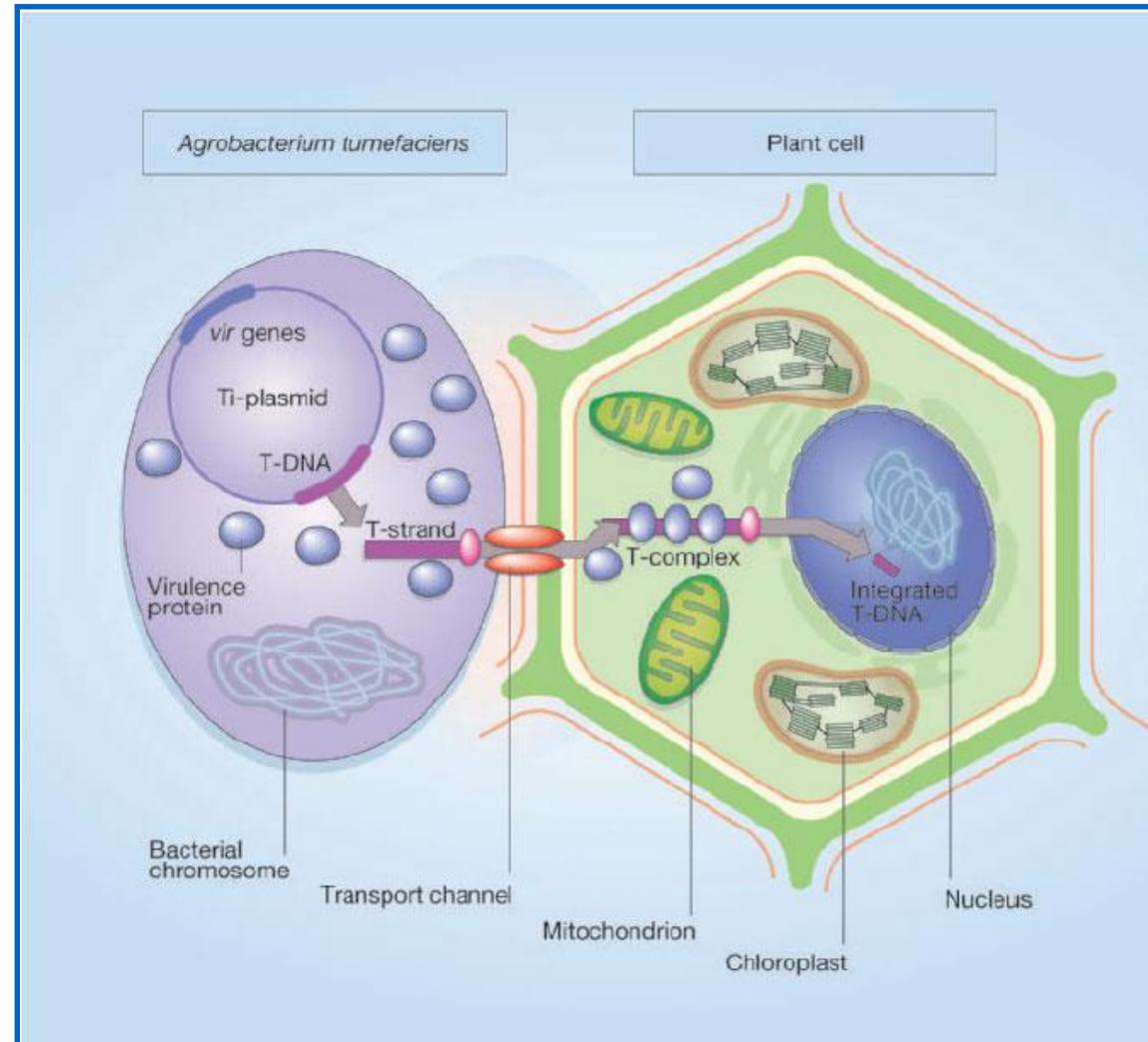


# Classificação por estrutura e organização de plasmídeos virulentos - pTi e pRi



# Patogenicidade natural de *A. tumefaciens*

## Animação



### 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

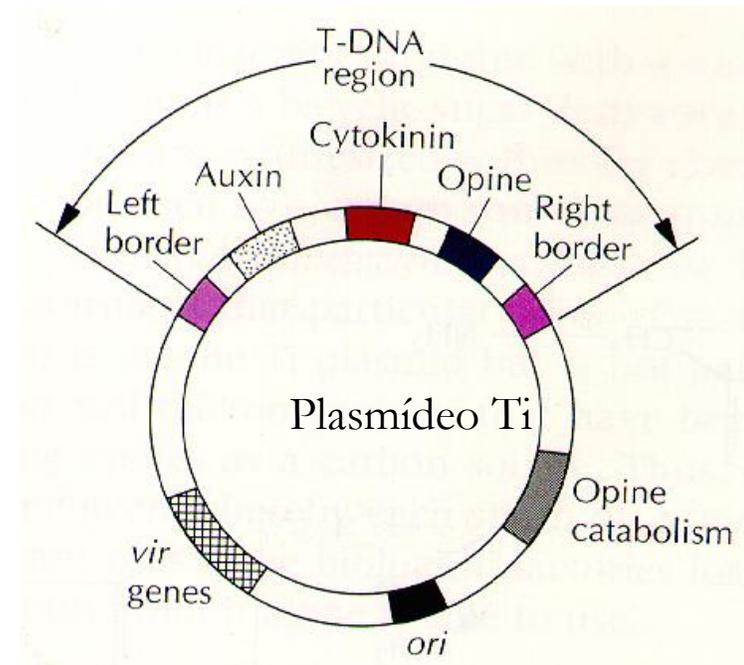
### Síntese de Opina

- 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*

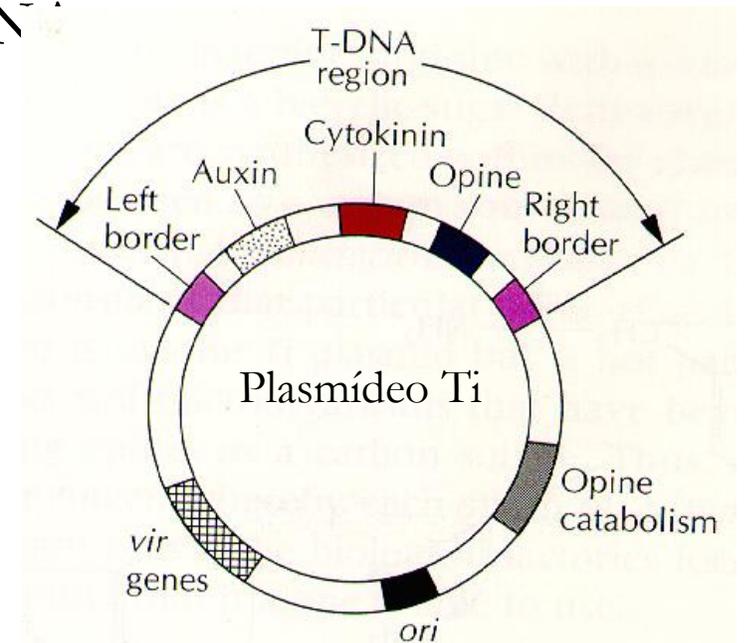
- Infecção natural – ferimentos
- Quimiotactismo - fenóis, açúcares, amino ácidos
- Expressão de genes da bactéria transferidos e integrados de forma estável ao genoma vegetal
- Formação de tumores;
- Capacidade tumorigênica - plasmídeo **Ti** =
  - **Ti = Tumor Inducing** - 150 a 250 kpb
- Regiões do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

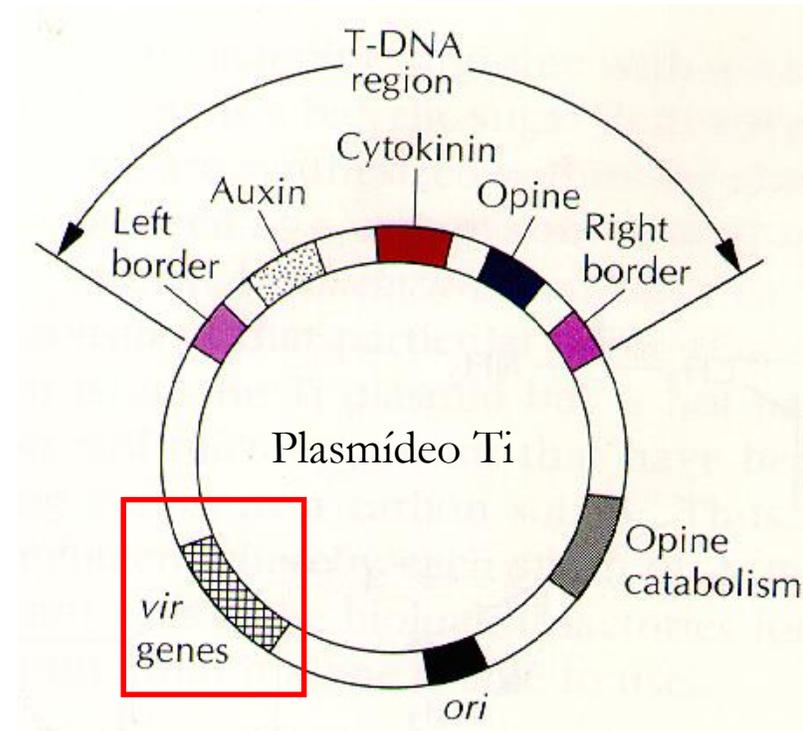
## Região *vir*

- 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**

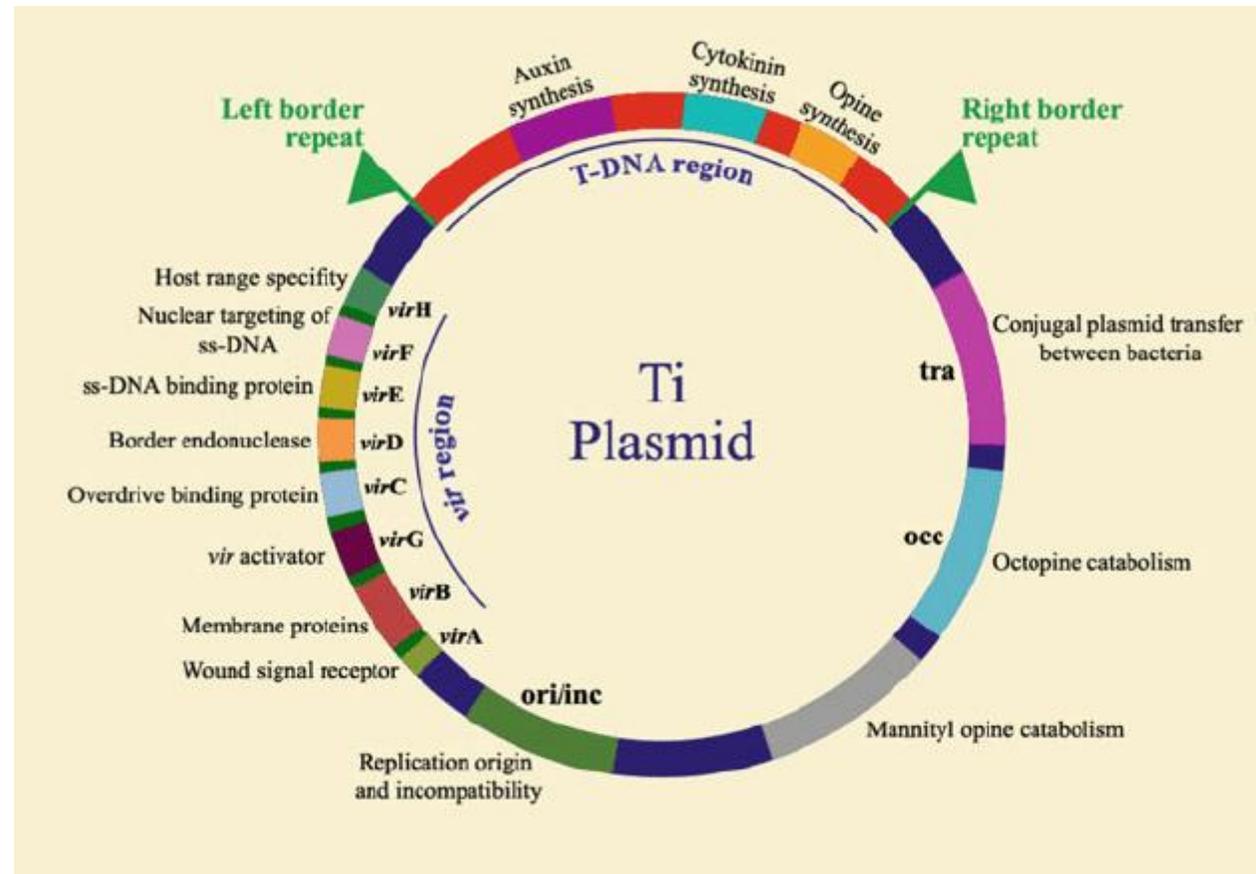
**Ti desarmado**



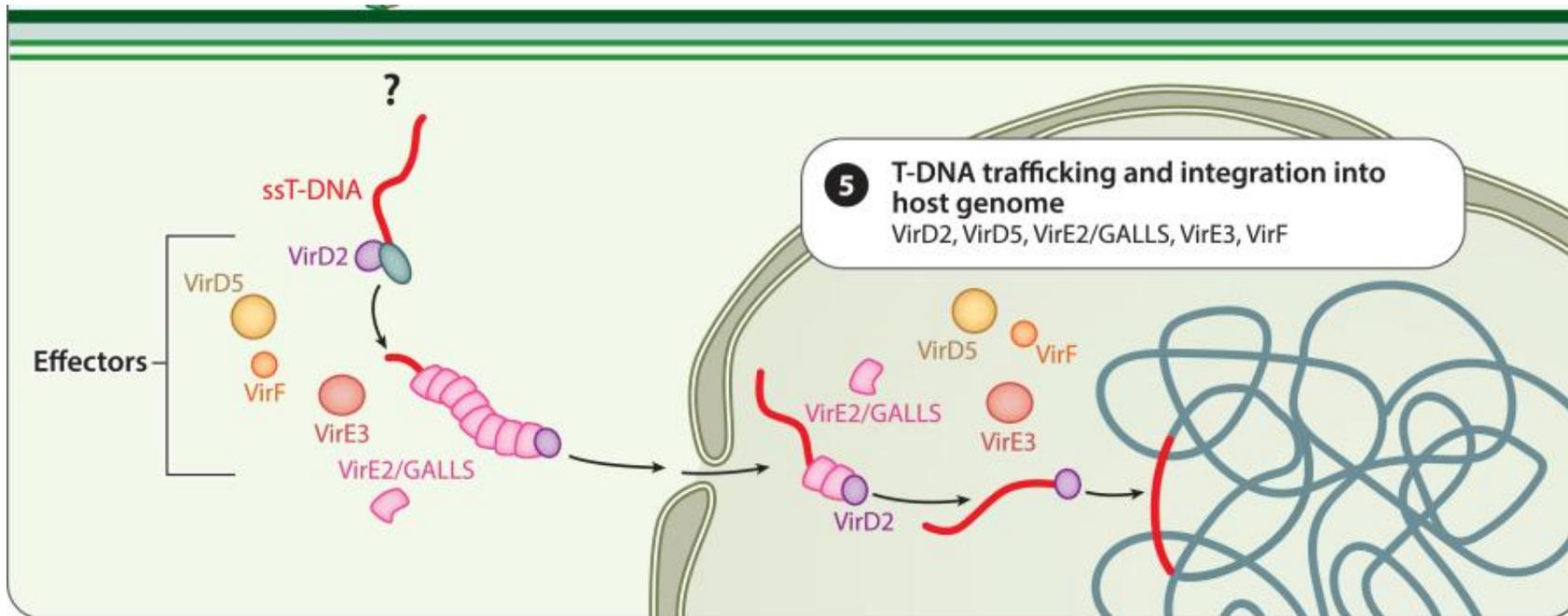
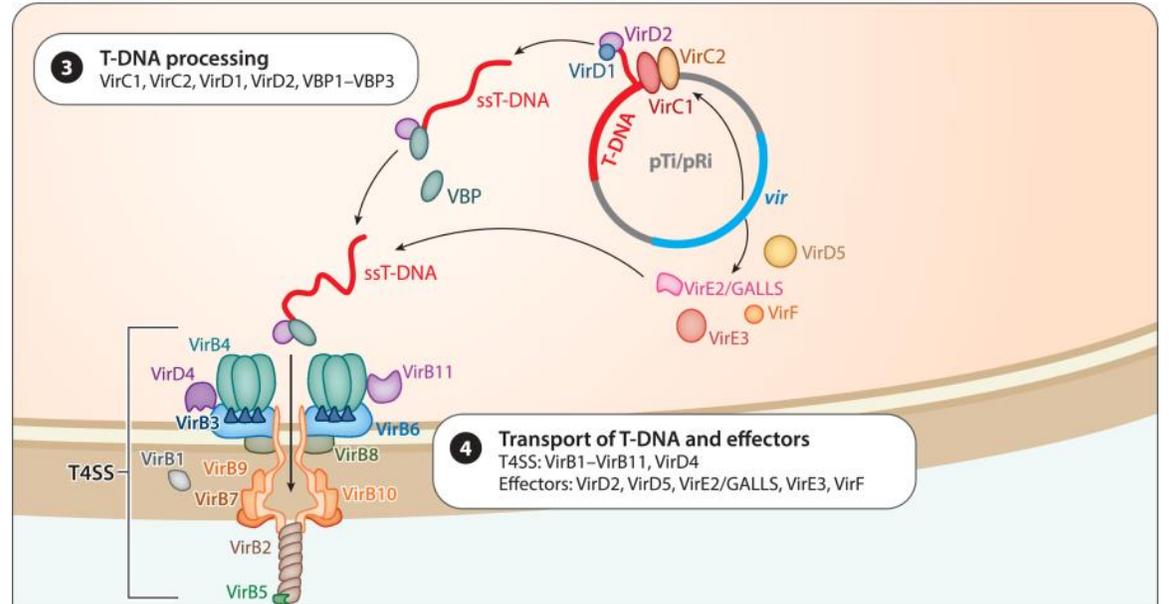
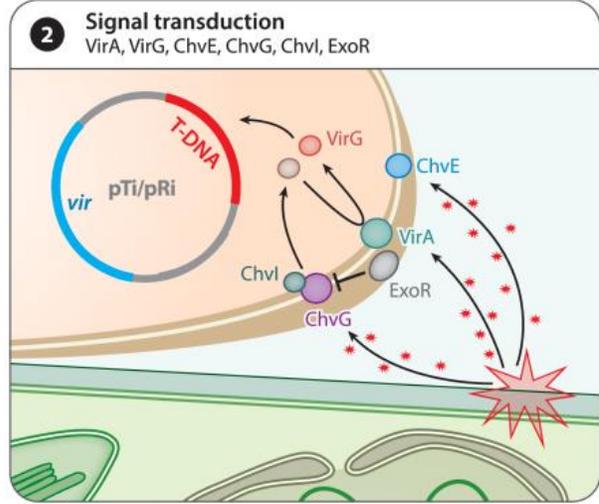
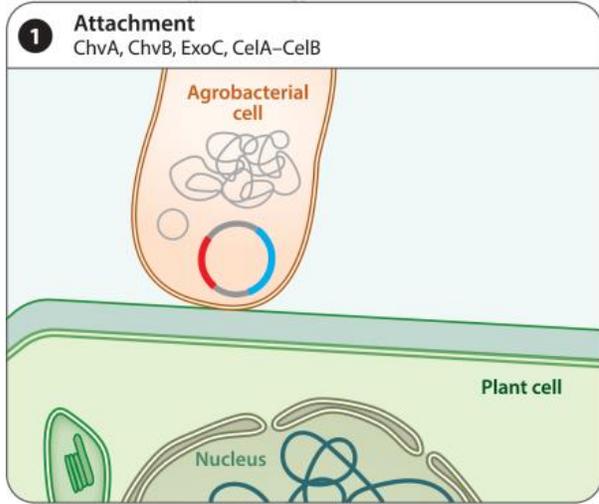
# Agrobacterium

## Região vir

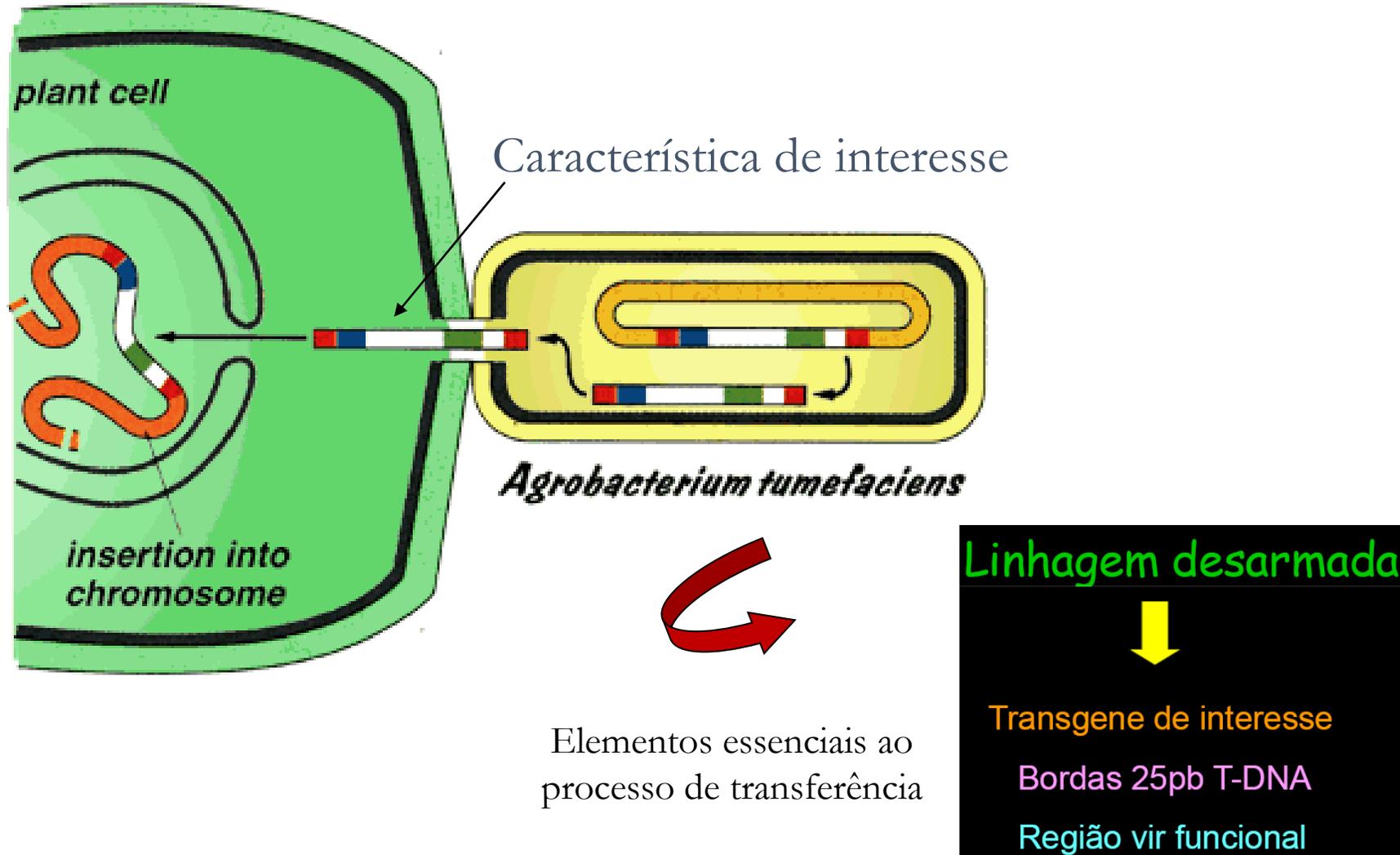
- genes responsáveis pela síntese de enzimas da transferência e integração do T-DNA



## Animação



# TRANSFERÊNCIA DO TRANSGENE



# Construção Sintética do Transgene

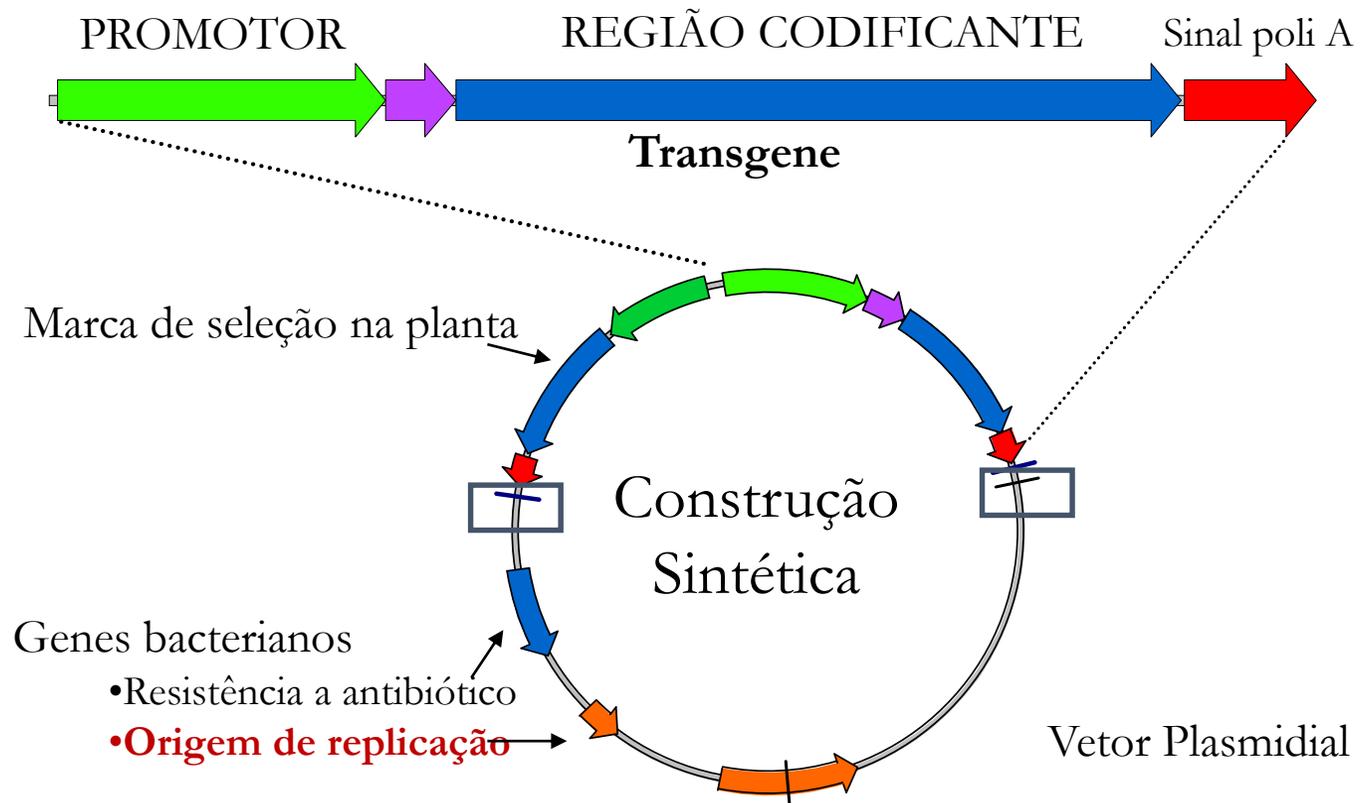
A característica de interesse pode e deve ser  
engenheirada...



Precisa conter no mínimo:

1. Gene de interesse – GOI = *gene of interest*
  - A região de interesse e seus elementos controladores
2. Gene Marcador de seleção
  - Diferenciar células/plantas transformadas e não transformadas

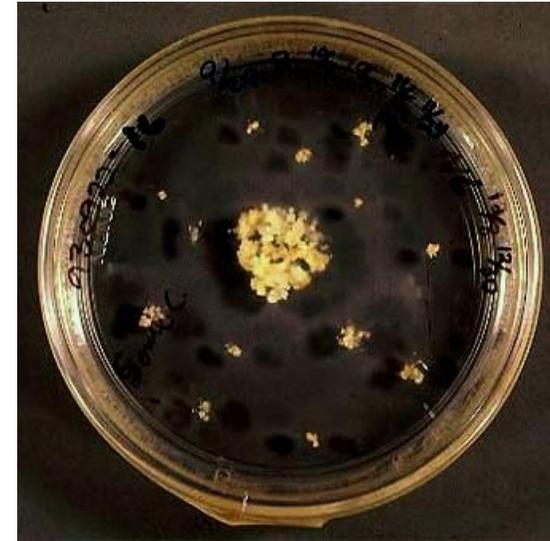
# Construindo o Transgene



# 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 tipos 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:**

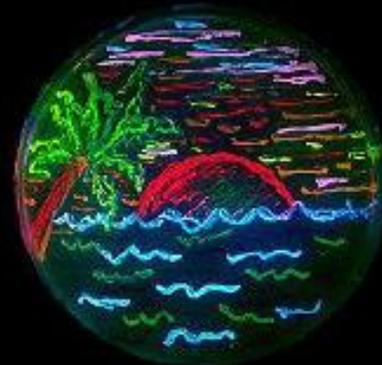
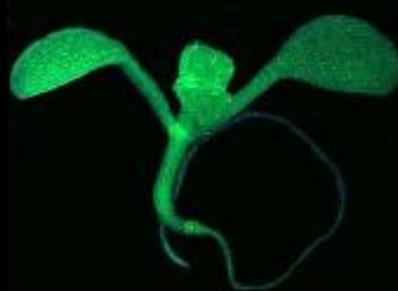
Canamicina  
Higromicina

**Herbicida:**

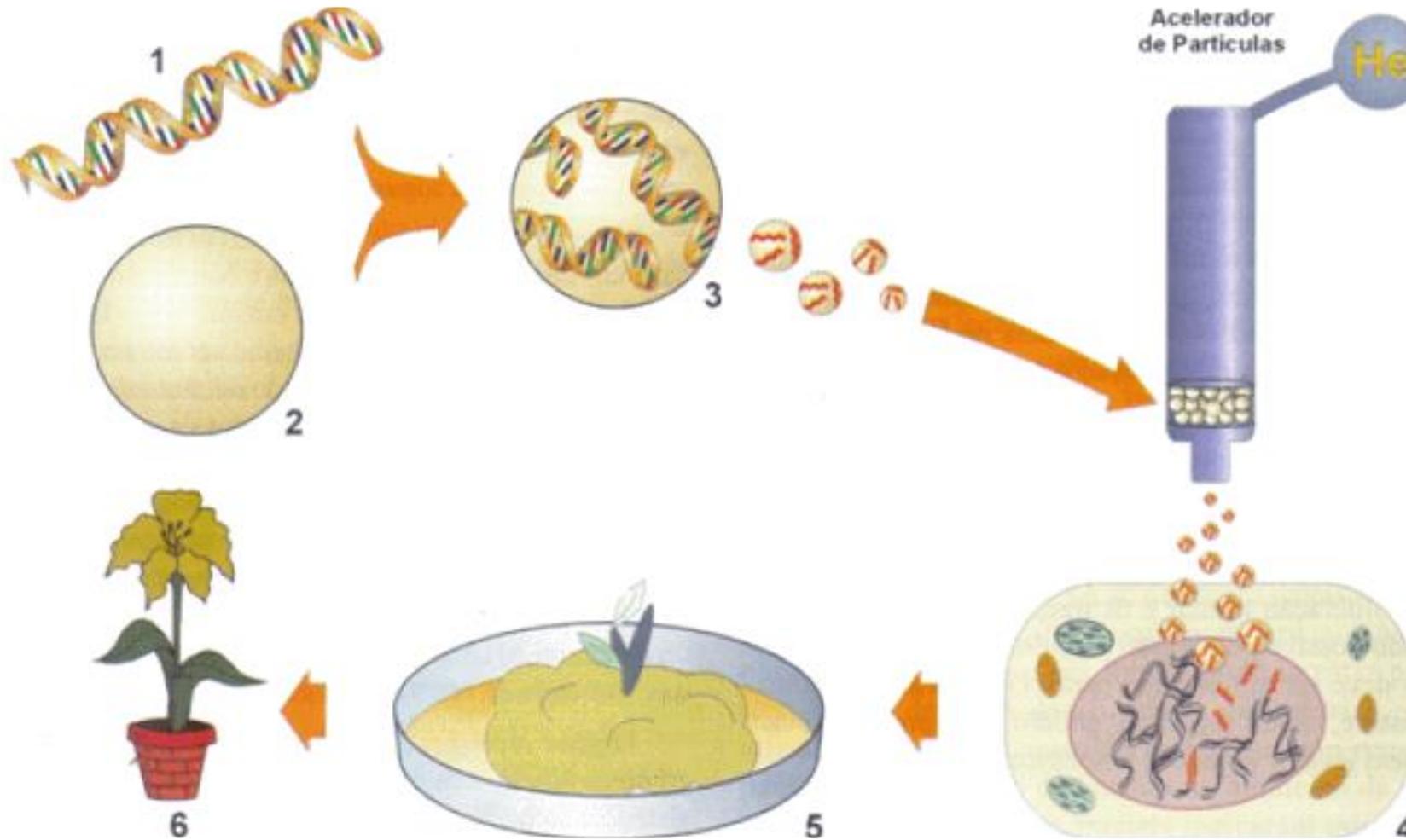
Glifosato

**Genes repórteres:**

GFP, mRFP, CFP, YFP, mCherry etc  
GUS  
Luciferase



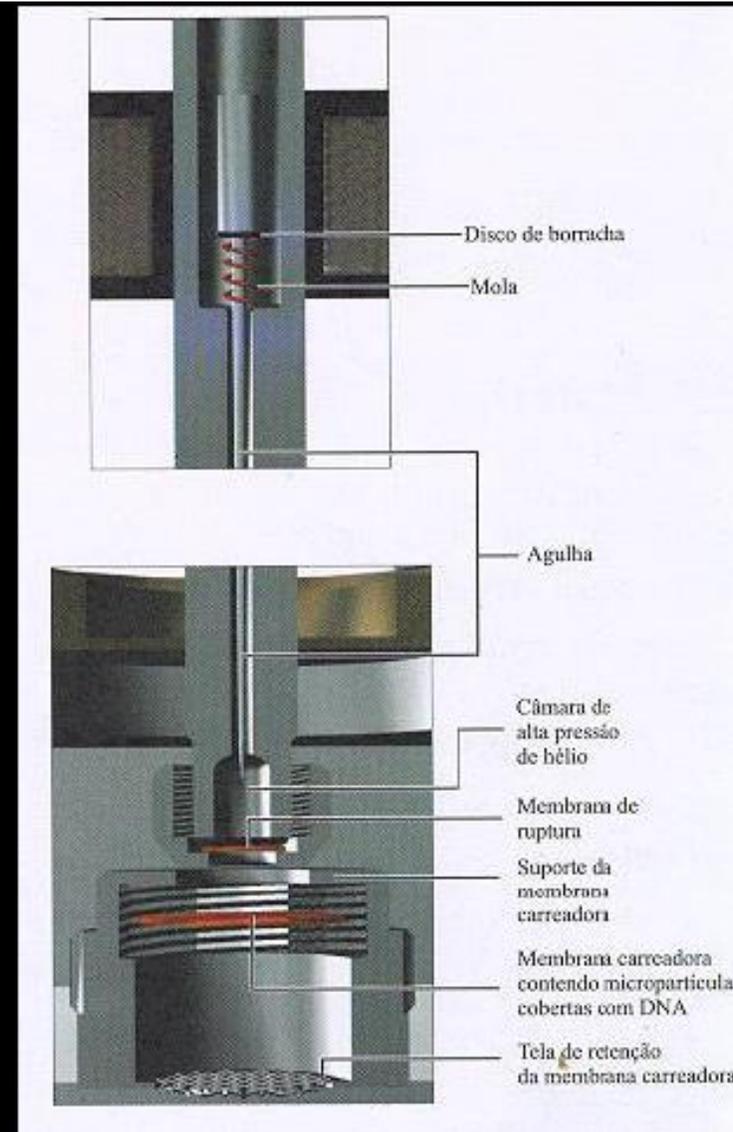
# Transformação via Biobalística



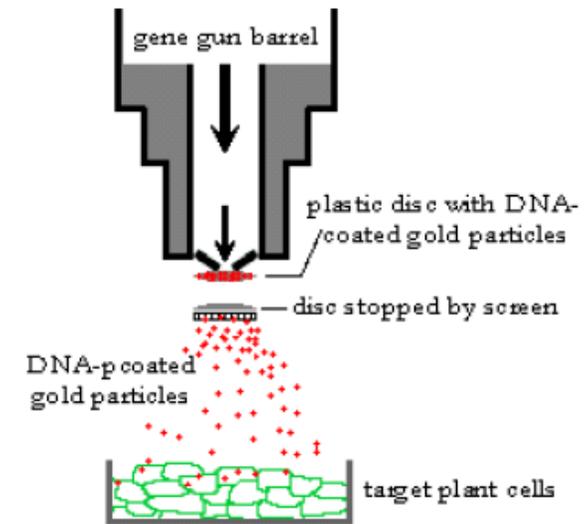
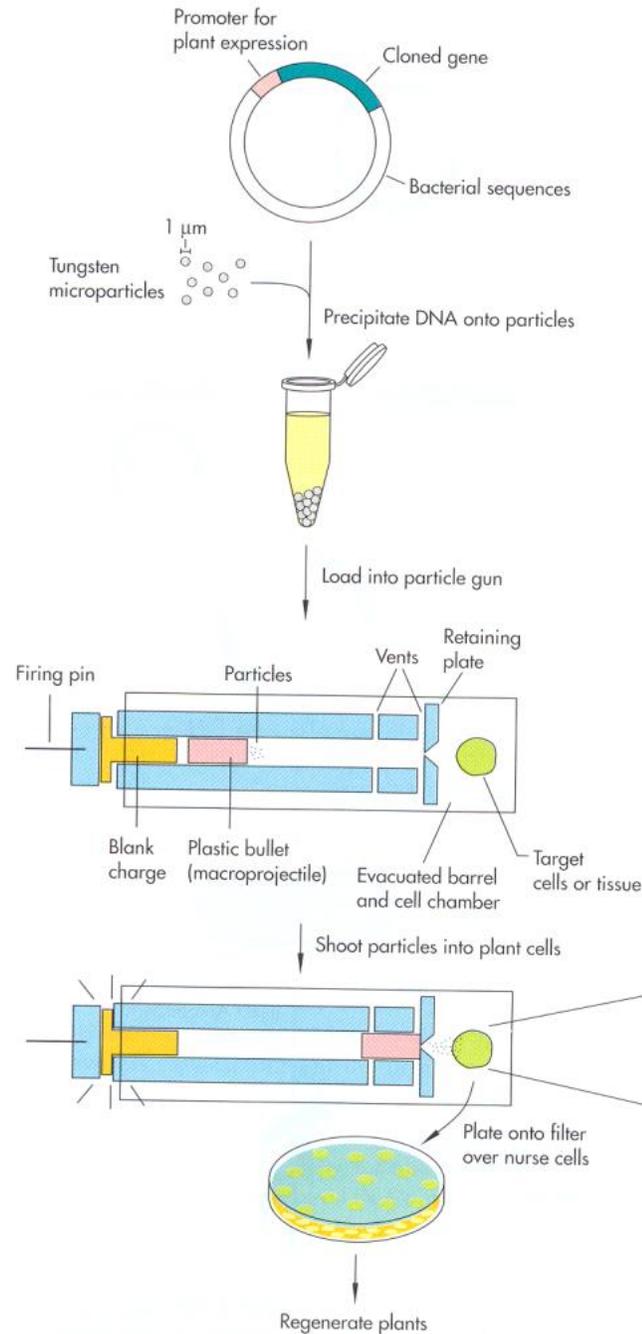
# Transformação via Biobalística



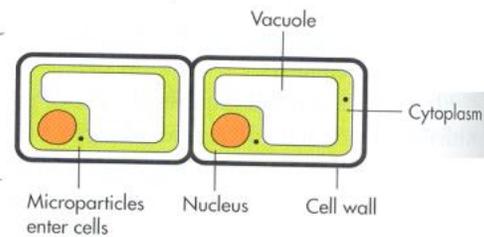
Bombardeador

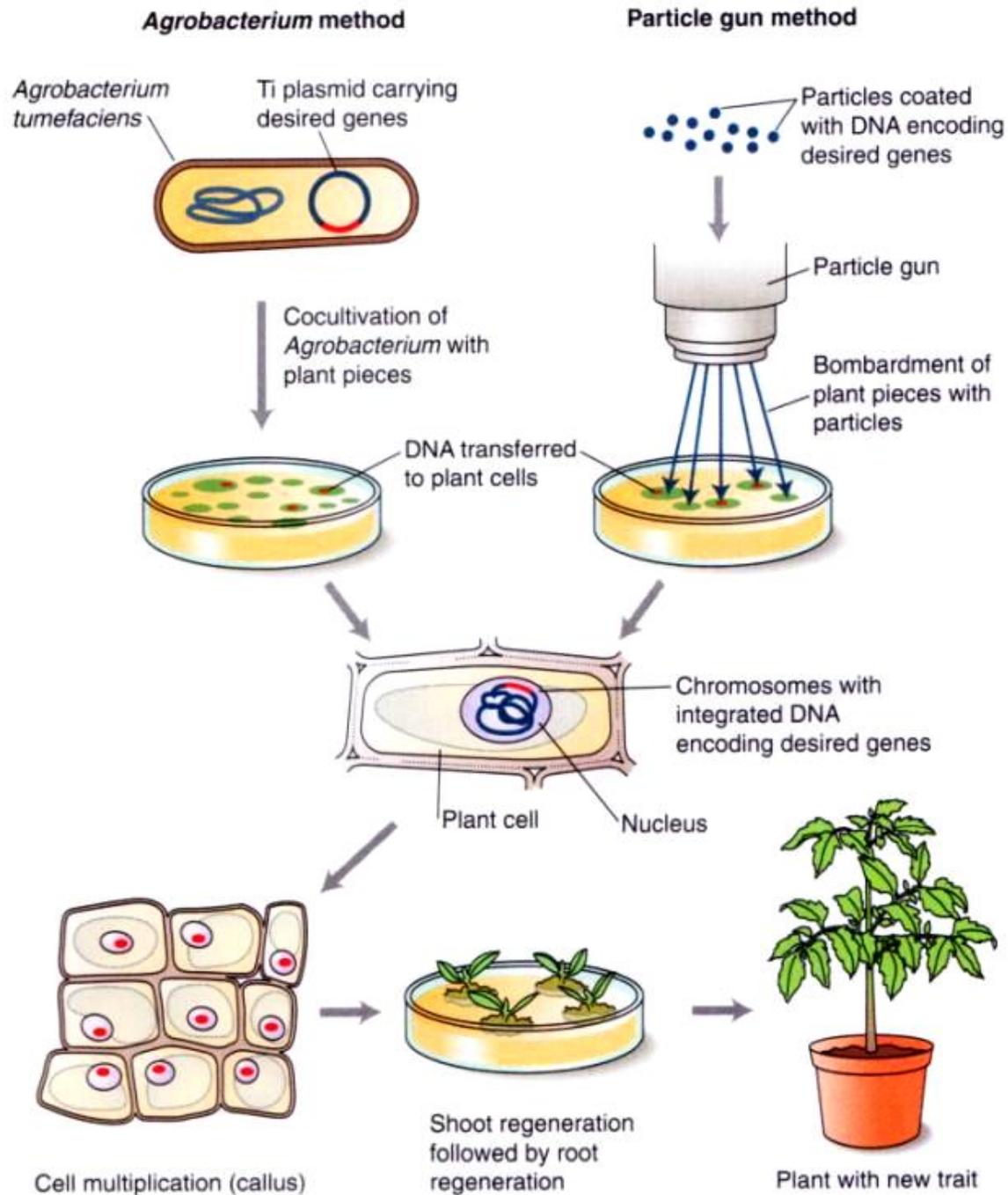


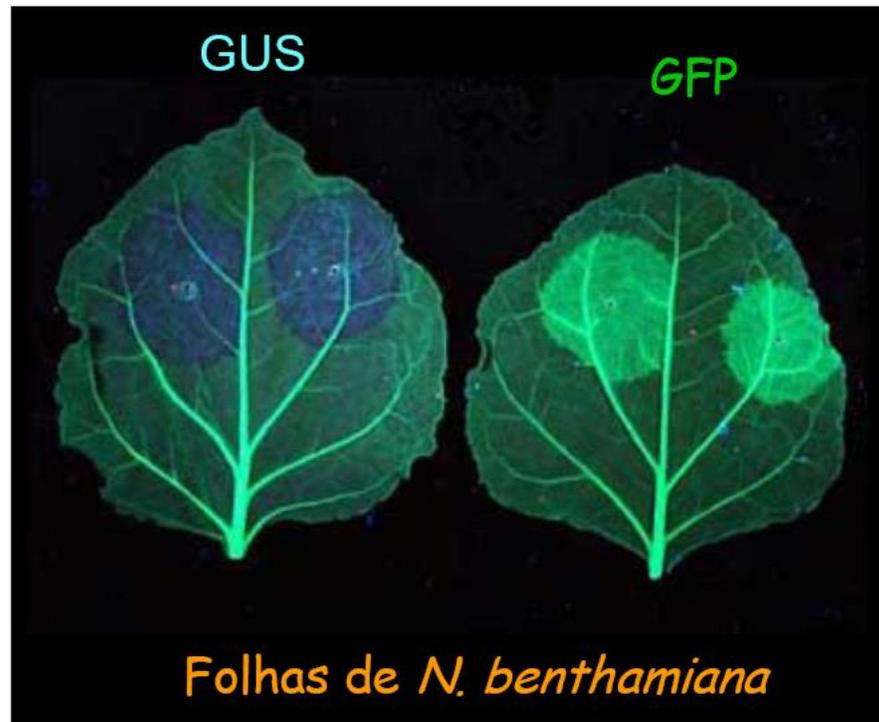
# Transformação via Bombardeamento Biobalística



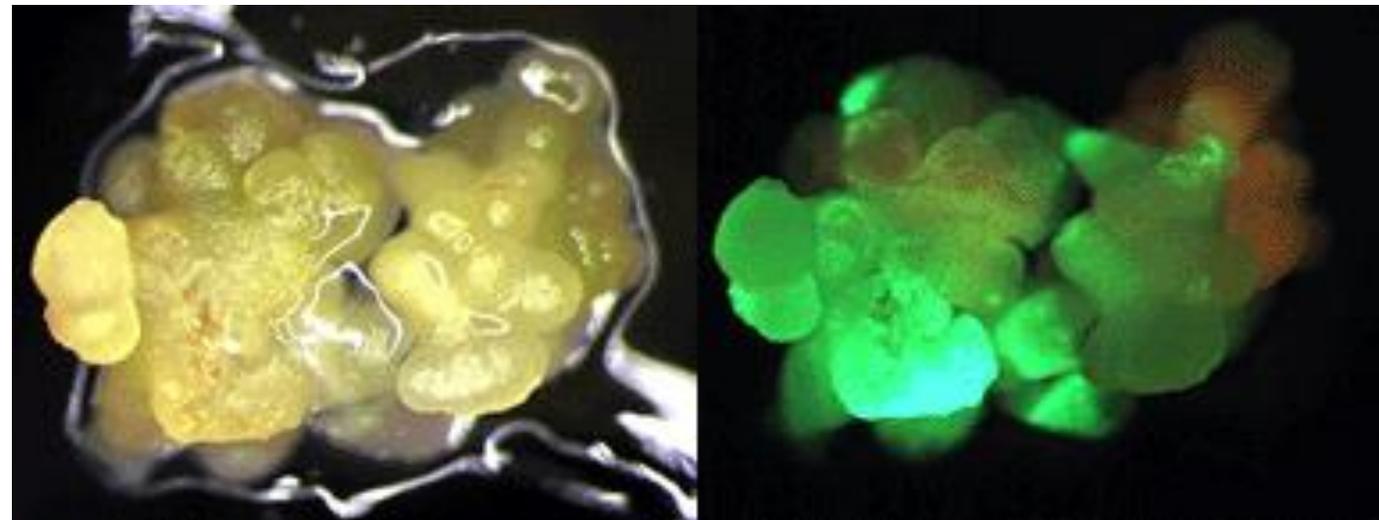
Gene gun method



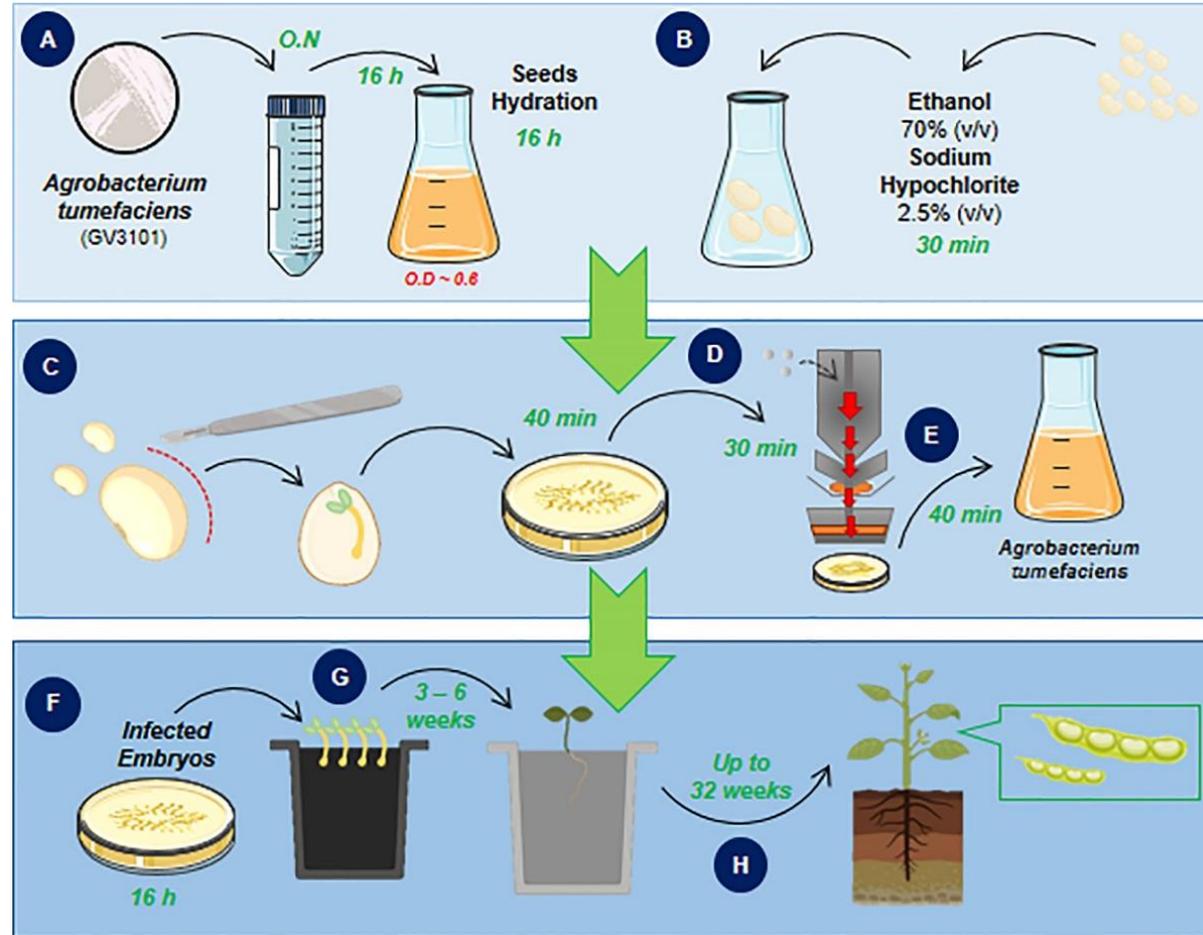


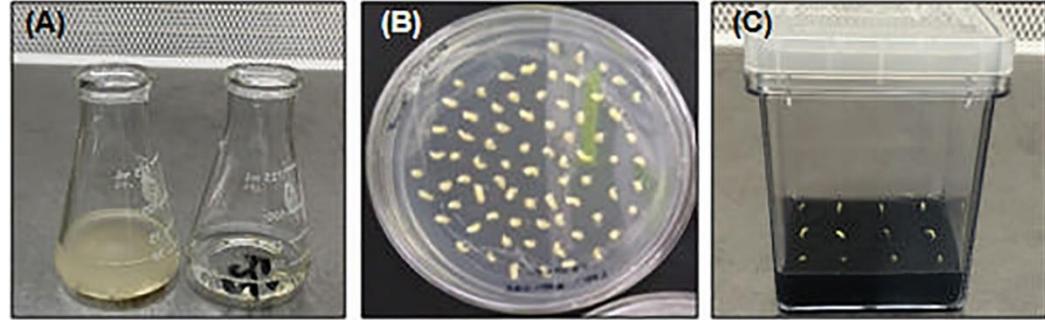
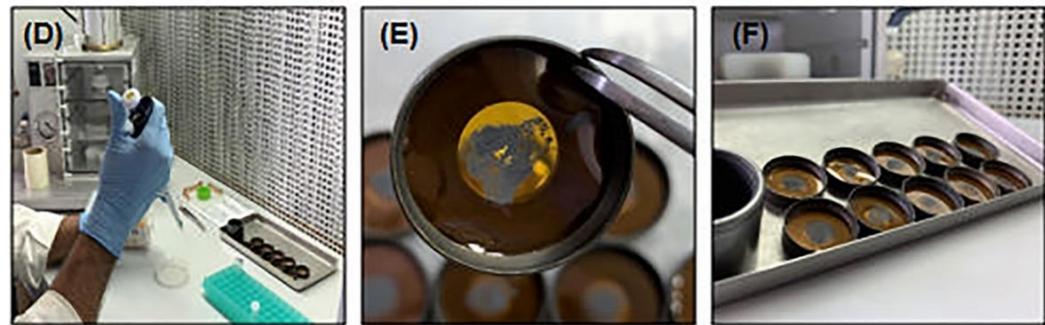
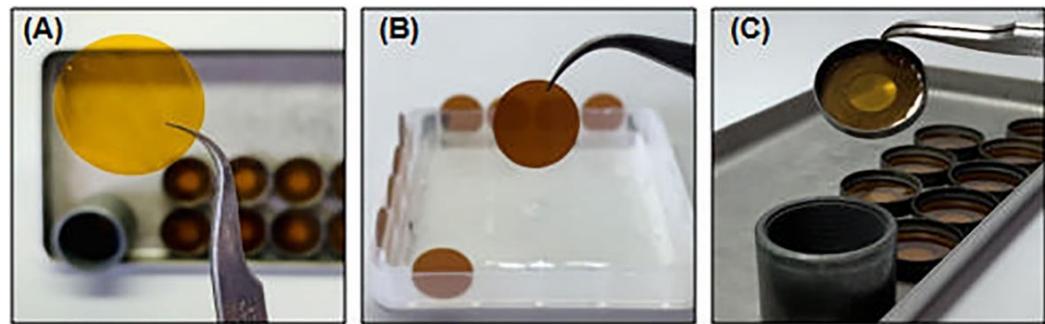
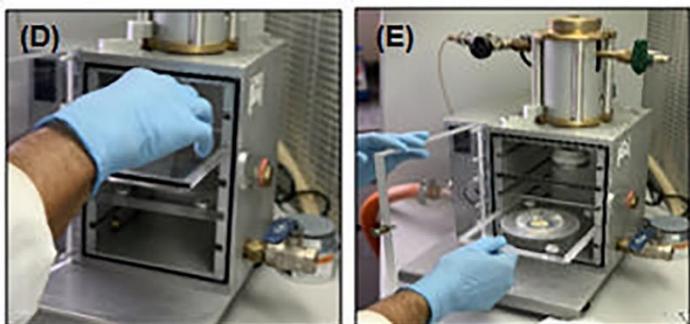
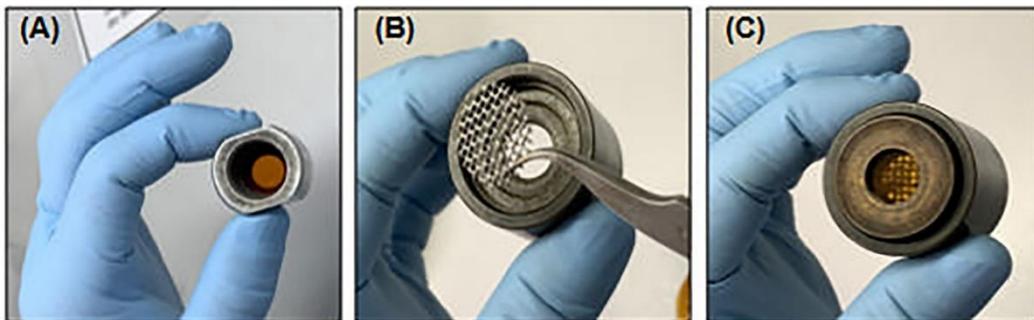
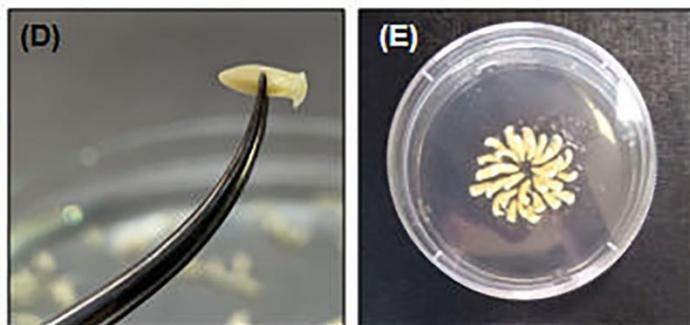
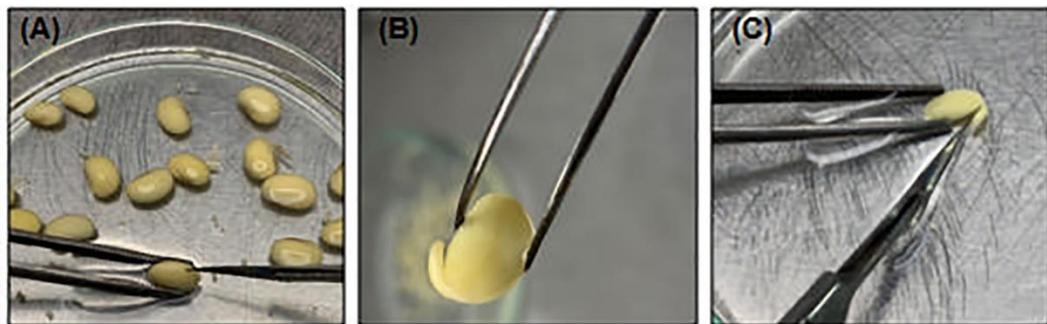


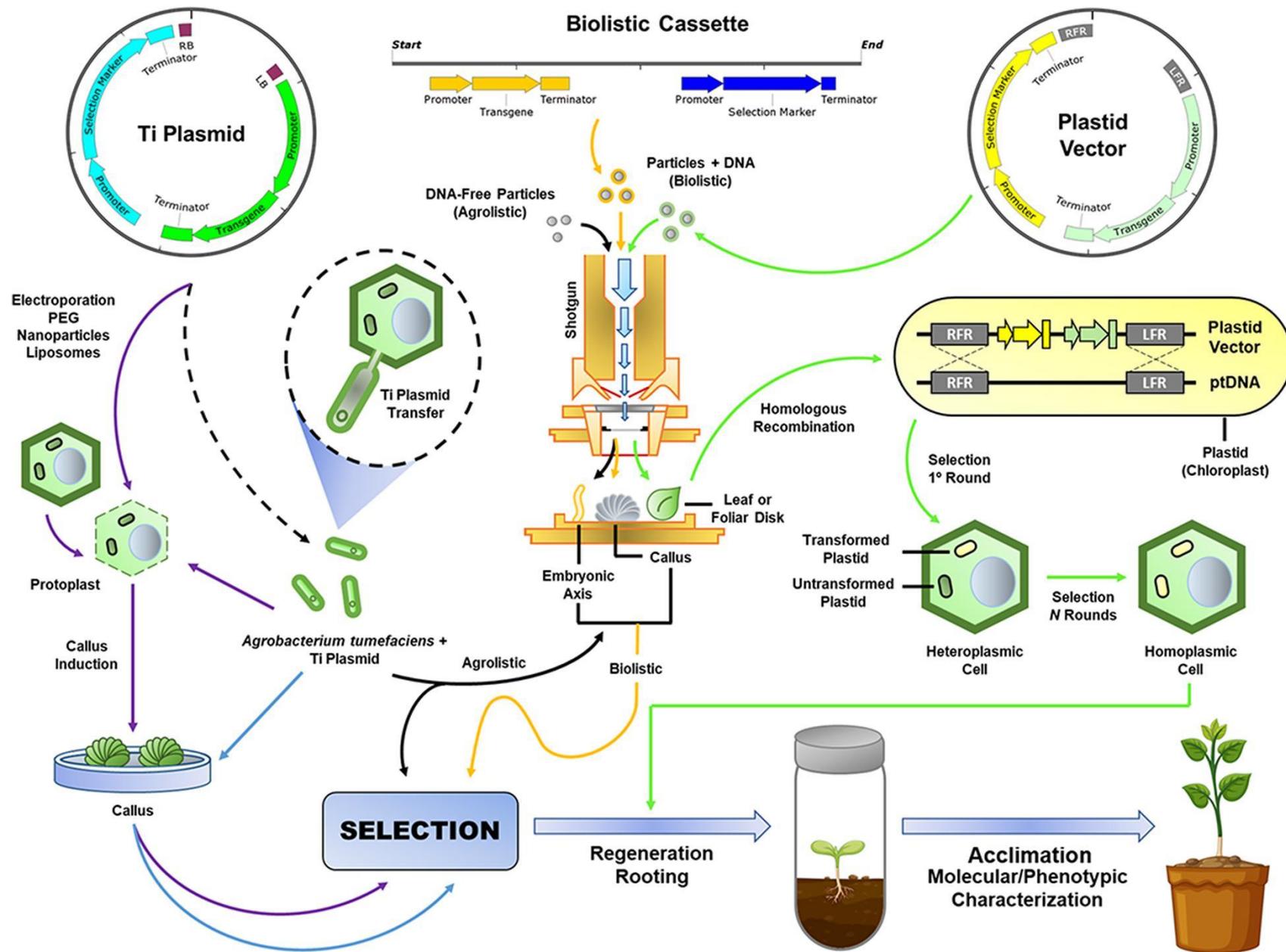
## Transformação - Confirmação



# Transformação de soja via Agro-balística

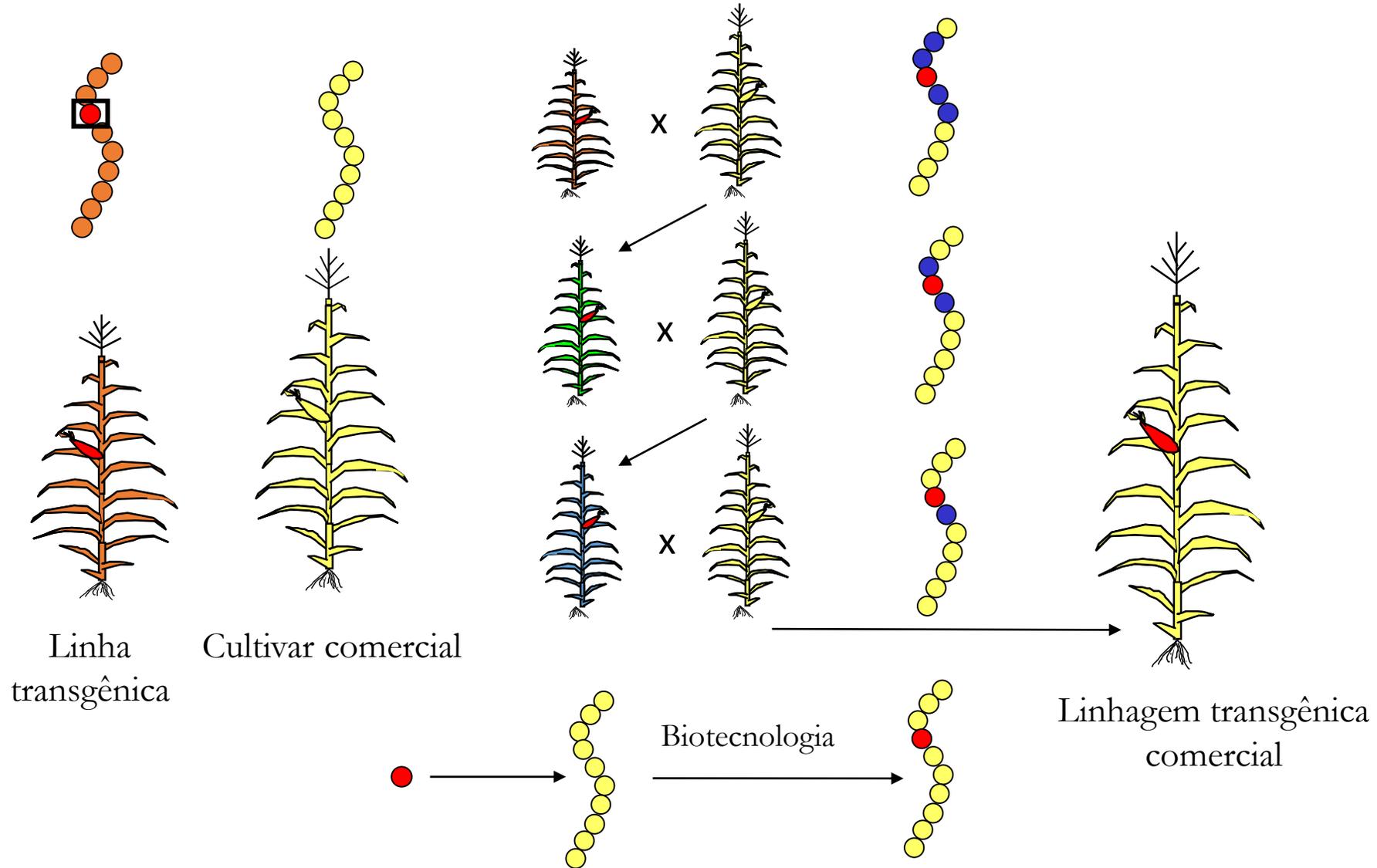




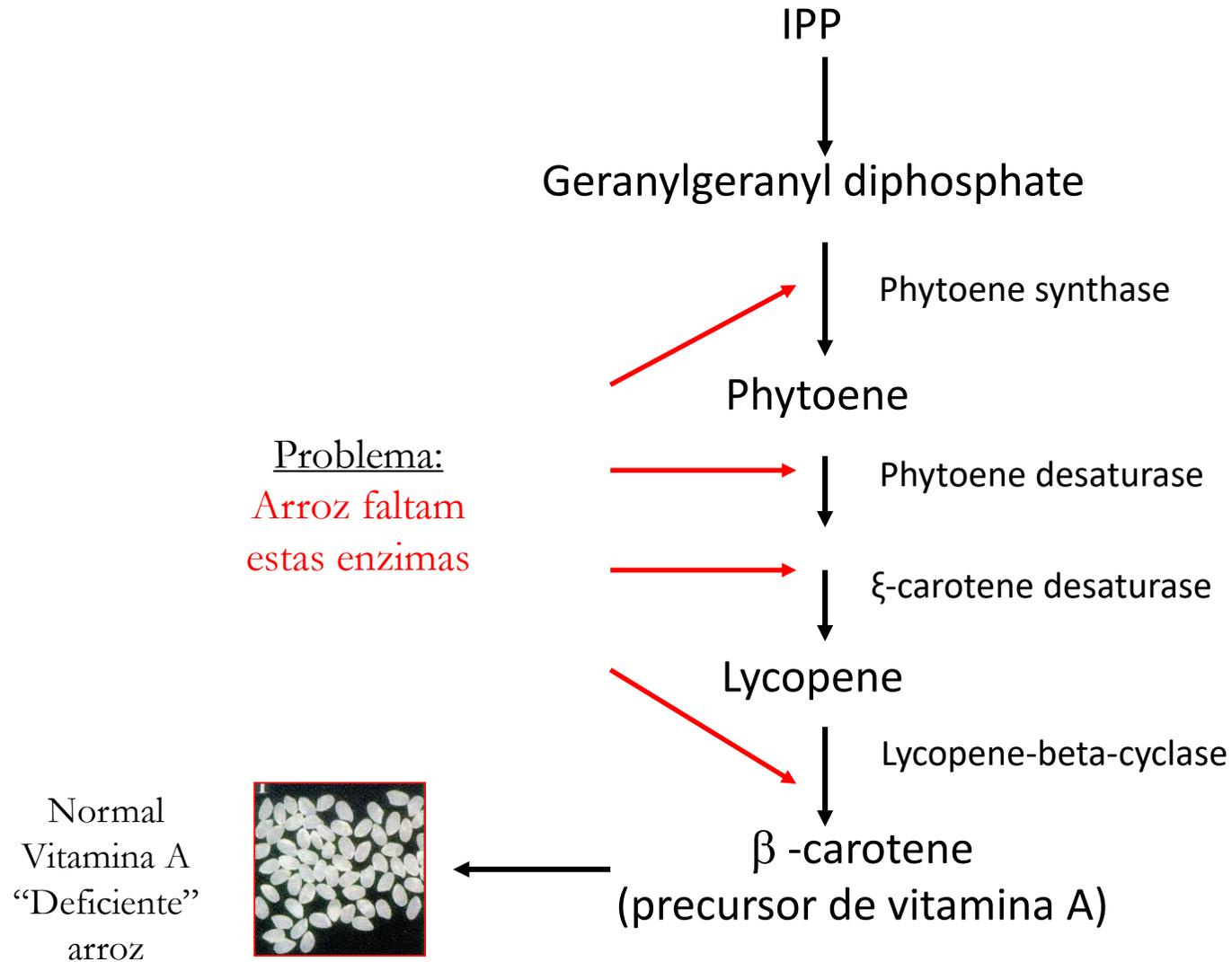


# Construção da Cultivar Transgênica

Retrocruzamento e seleção (6 - 8 gerações)

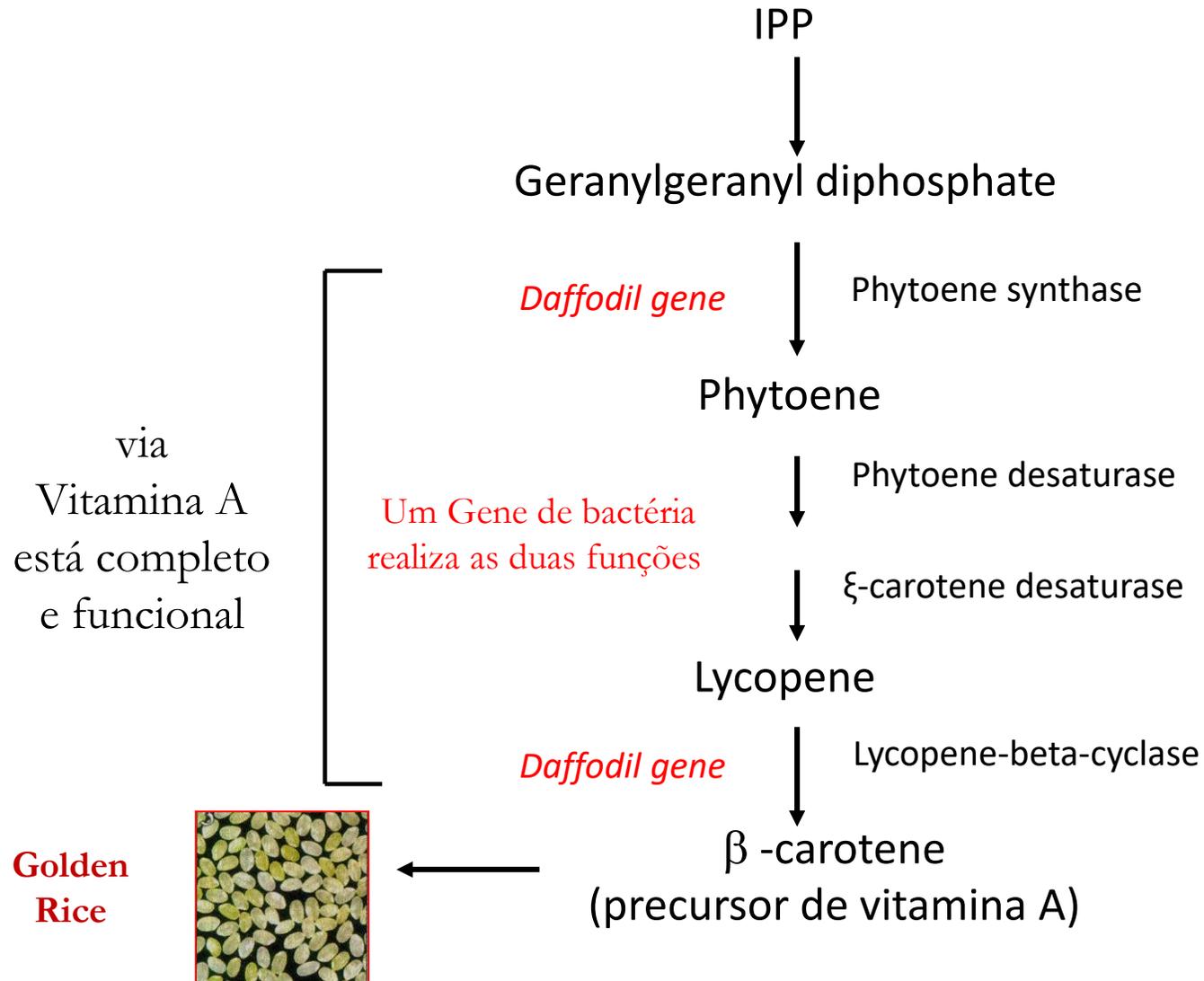


# Via do $\beta$ -Caroteno em Plantas



# The Golden Rice

Adicionar os genes da via do  $\beta$ -Caroteno



# Transformação de Animais

## Microinjeção

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

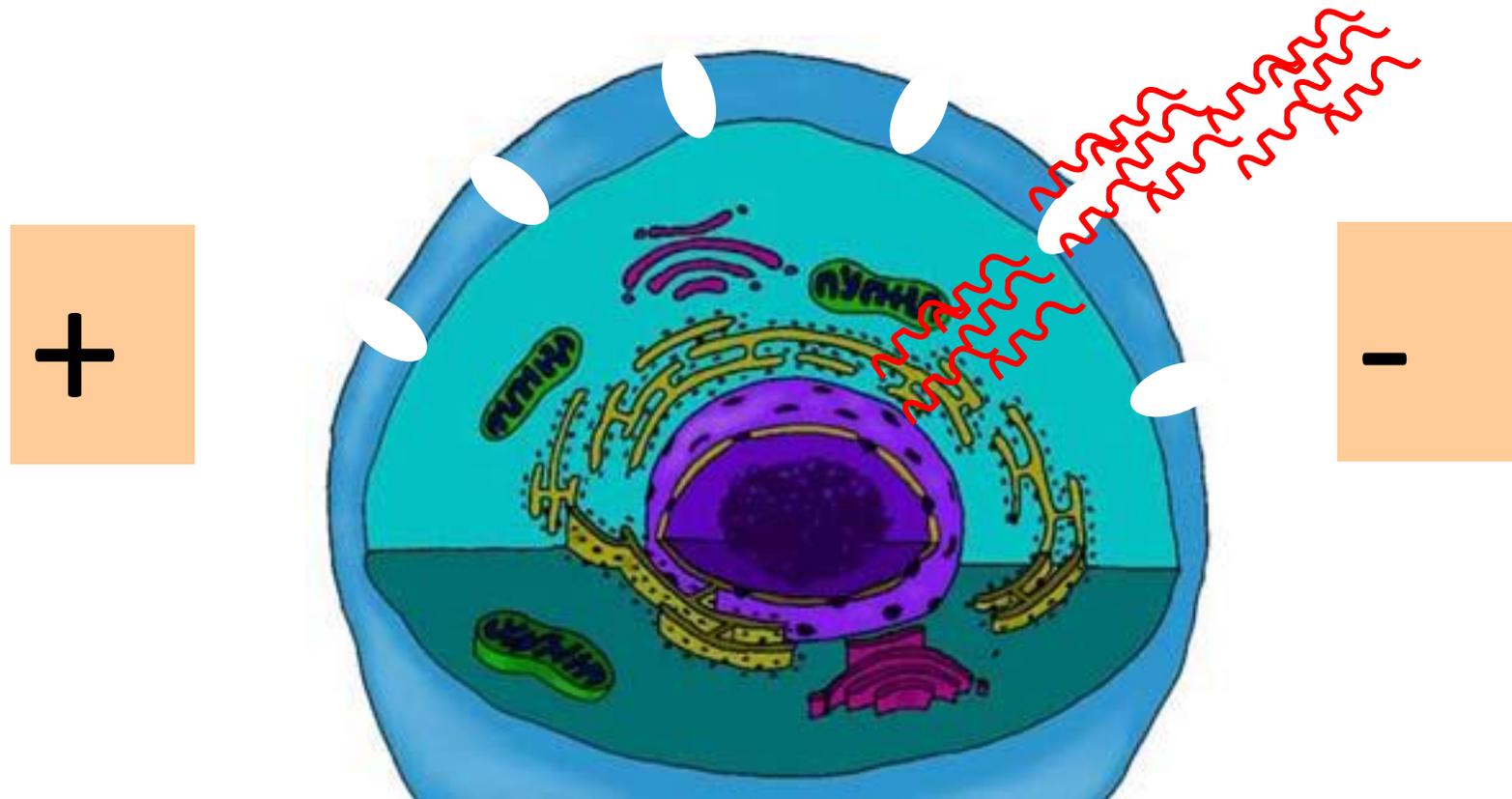
- rotina para transformação de célula animais
- utiliza micromanipulador
- complexo e demorado



# DNA recombinante + transgenia em embriões de frango

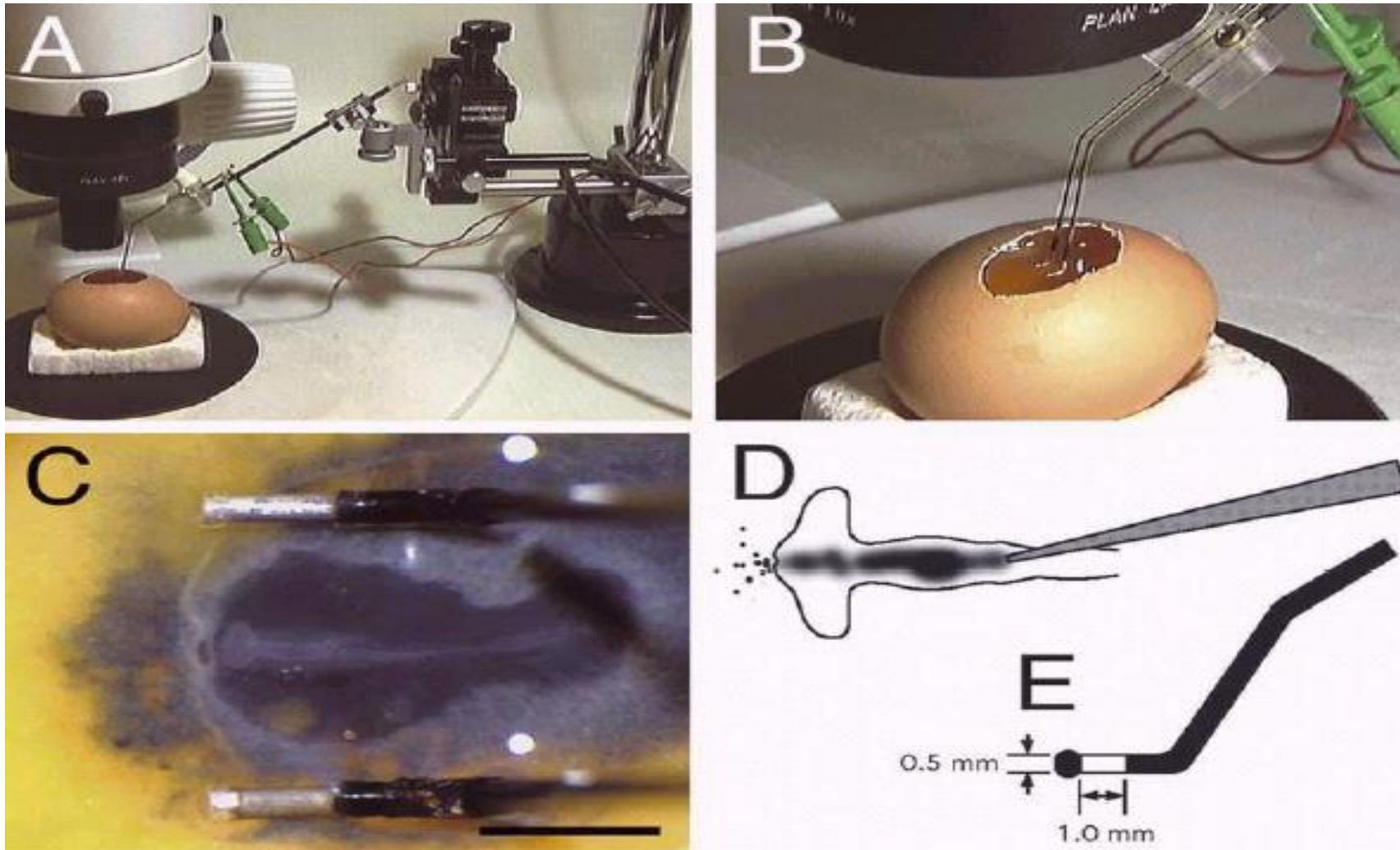
Muramatsu *et al.* (1997) – ELETROPORAÇÃO

DNA exógeno



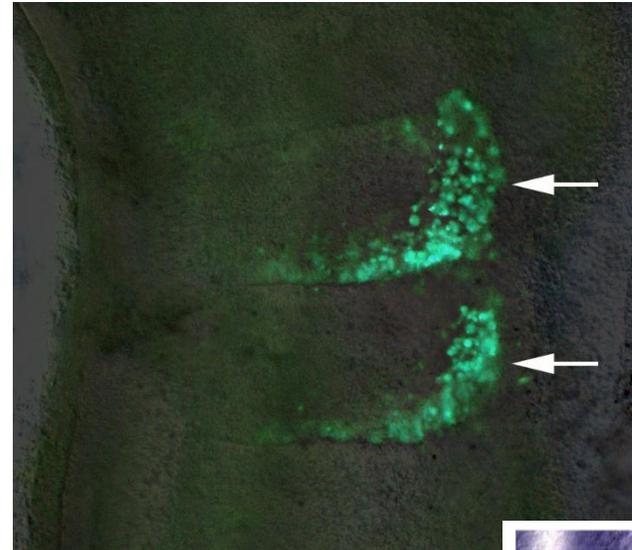
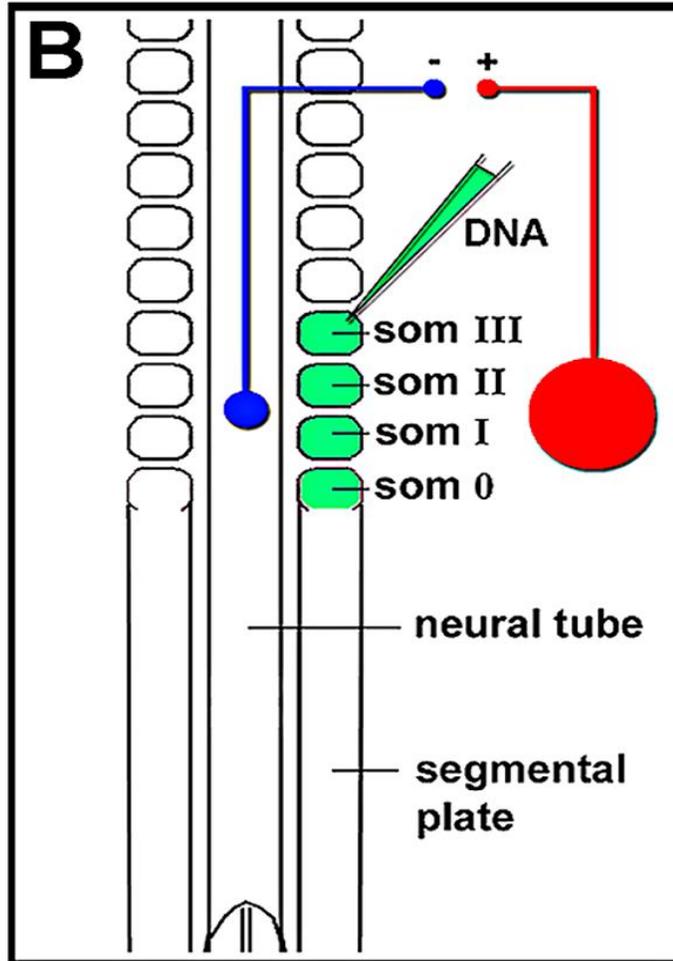
# Eletroporação *in ovo*

Eletroporação dos embriões – TUBO NEURAL



# Eletroporação *in ovo*

Eletroporação dos embriões - SOMITOS



# **Bibliografia Recomendada**

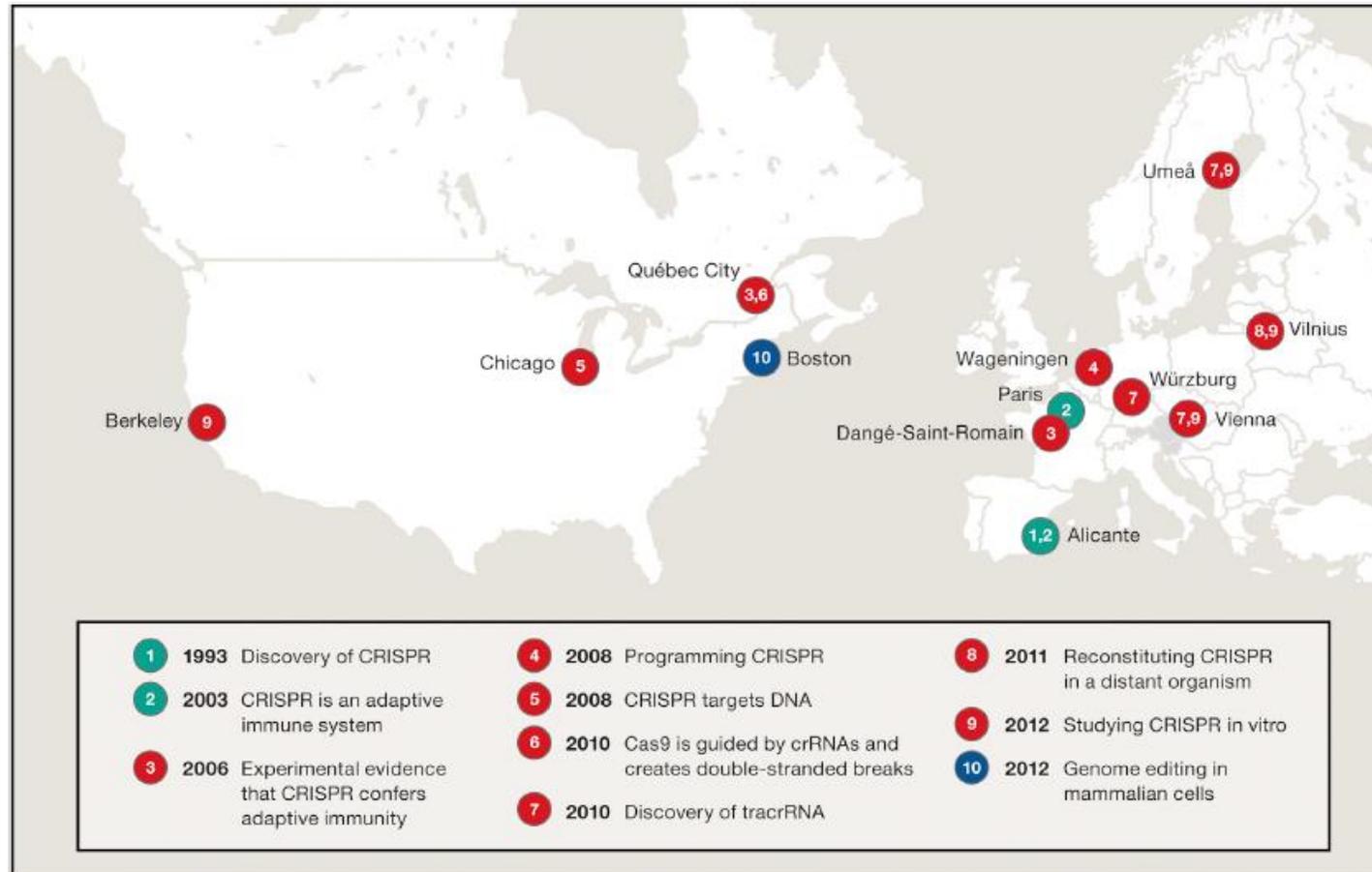
Biotecnologia Aplicada ao Melhoramento de Plantas  
Ed(s) Borém, A. Fritsche-Neto, R. (2013)  
Cap 7 – Plantas Transgênicas, pp. 229-266.

# ESTUDO DIRIGIDO

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



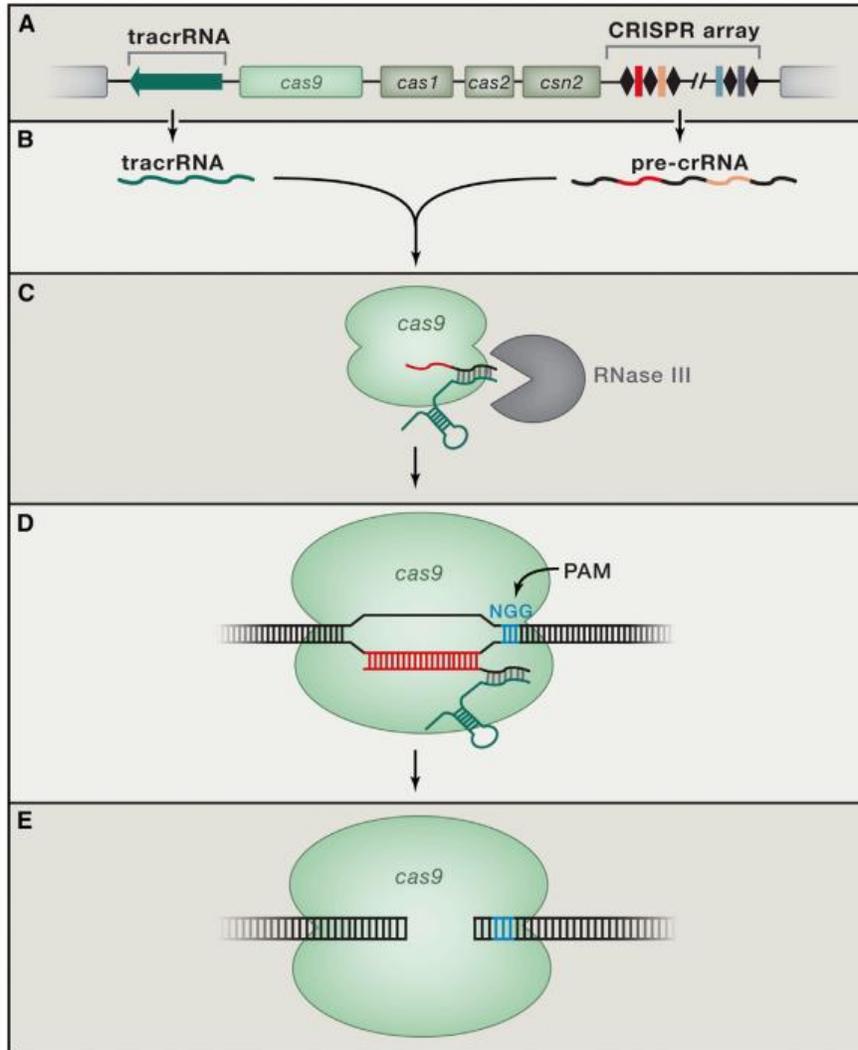
# CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) + Cas (CRISPR-associated)



[https://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674\(15\)01705-5.pdf](https://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674(15)01705-5.pdf)

# 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*.

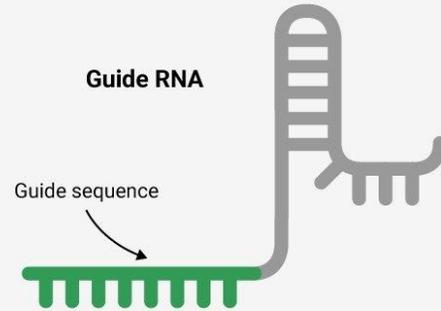
(C) These two RNAs hybridize via complementary sequences and are processed to shorter forms by Cas9 and RNase III.

(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.

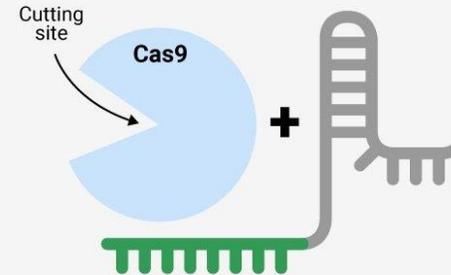
(E) Once Cas9 binds to a target site with a match between the *crRNA* and the target DNA, it cleaves the DNA three bases upstream of the PAM site. Cas9 contains two endonuclease domains, HNH and RuvC, which cleave, respectively, the complementary and non-complementary strands of the target DNA, creating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

# EDITING A GENE USING THE CRISPR/CAS9 TECHNIQUE

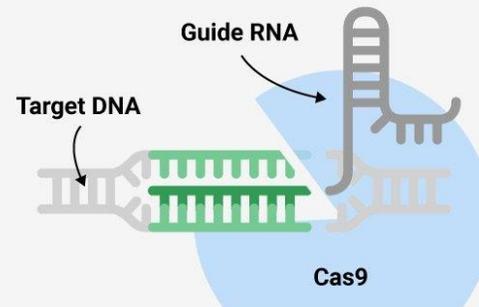
- 1** Scientists create a genetic sequence, called a "guide RNA," that matches the piece of DNA they want to modify.



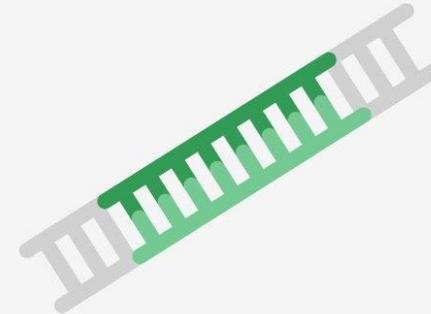
- 2** This sequence is added to a cell along with a protein called Cas9, which acts like a pair of scissors that cut DNA.



- 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

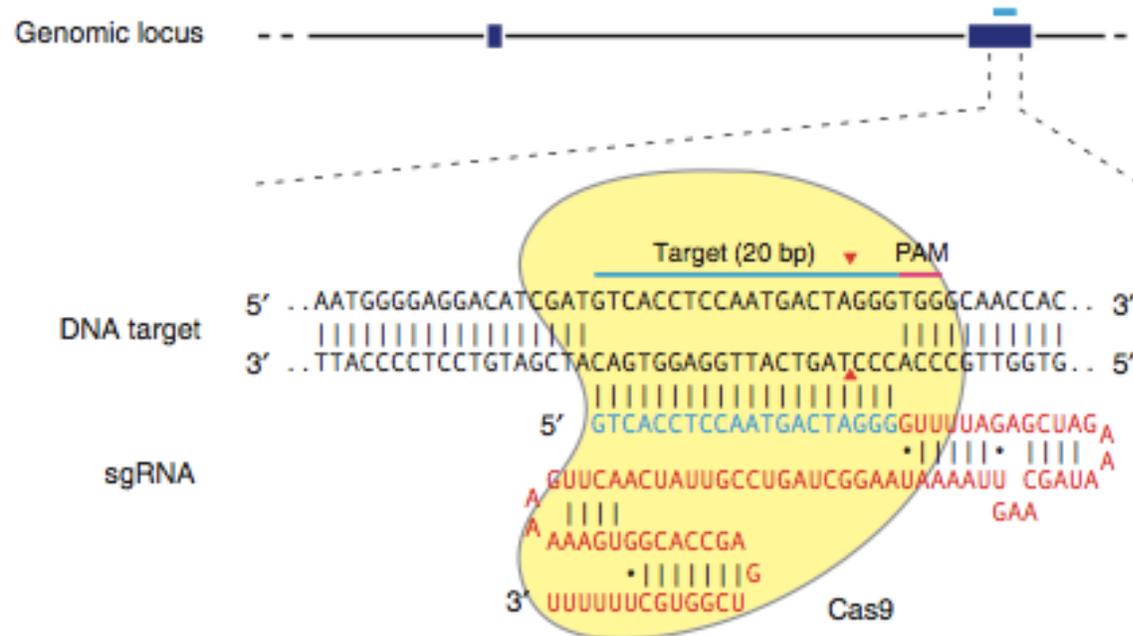
<https://www.youtube.com/watch?v=0Mkie4R7haA>

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

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

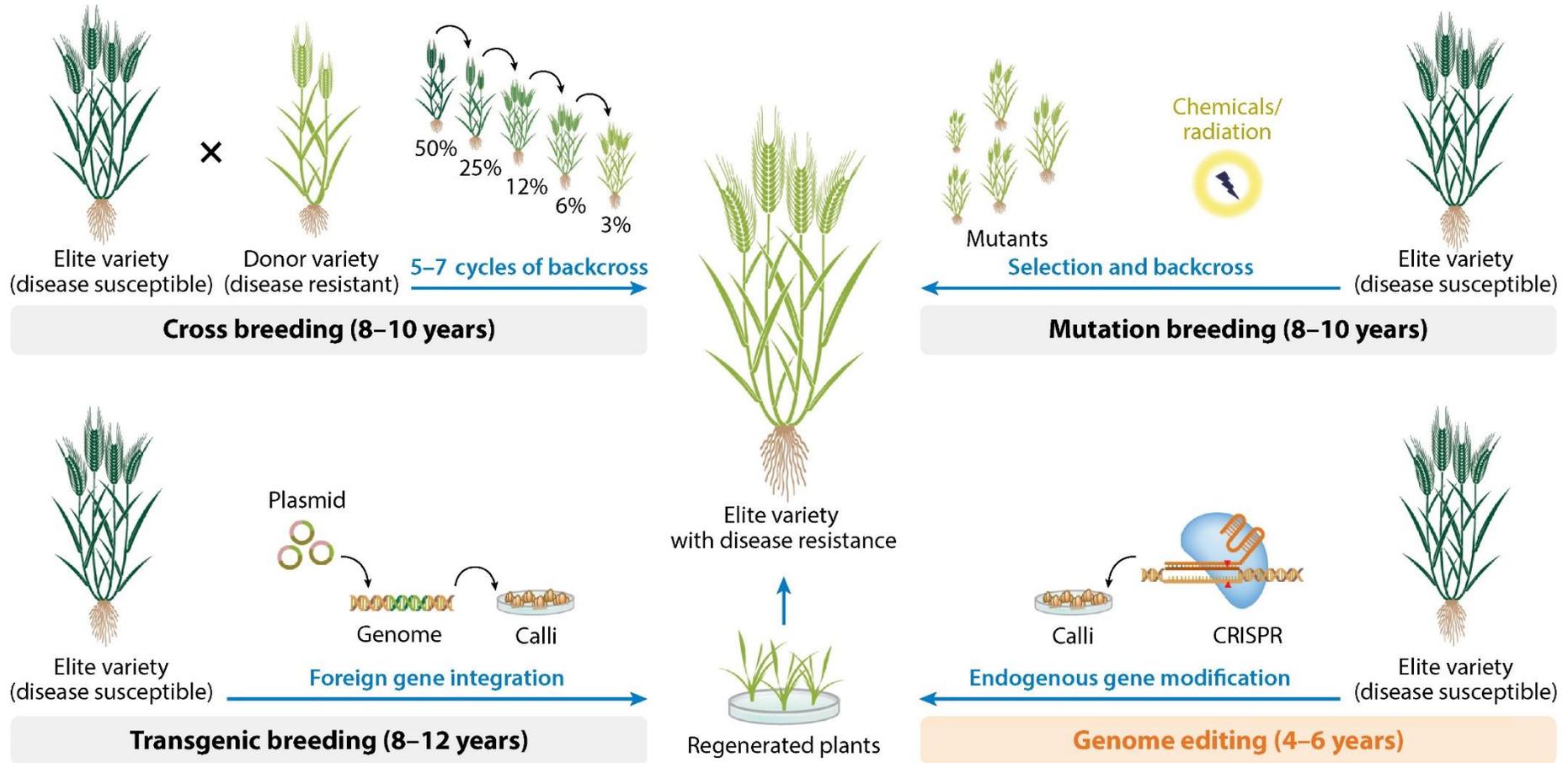
# CRISPR-Cas9

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>

# Comparação de Métodos de Melhoramento



AR Chen K, et al. 2019.  
Annu. Rev. Plant Biol. 70:667–97

# Animações

[https://www.youtube.com/watch?v=UfA\\_jAKV29g](https://www.youtube.com/watch?v=UfA_jAKV29g)

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

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

# ESTUDO DIRIGIDO

1. Conceitos referentes a transgênicos
2. A importância da cultura de tecido na transformação de plantas
3. Transformação por agrobactéria
4. Transformação por biobalística
5. Transformação animal
6. Técnica de CRISPR

