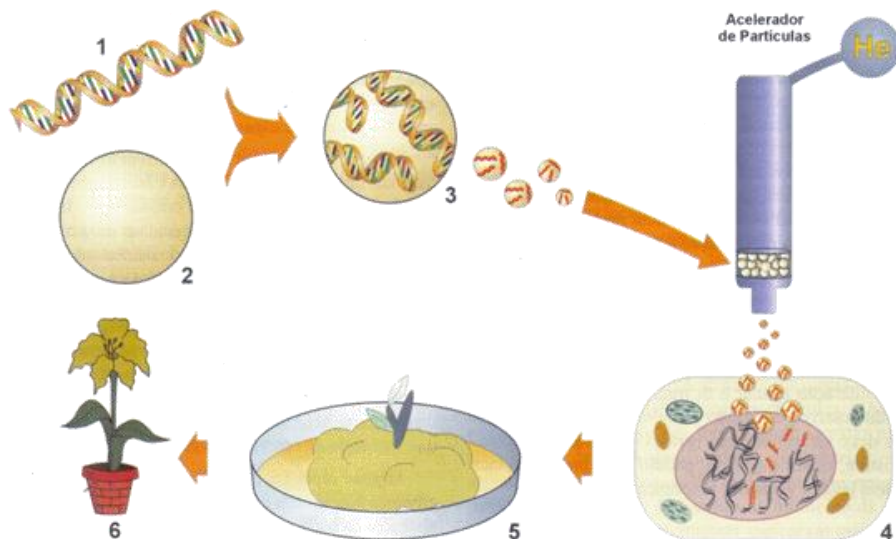


Obtenção de organismos geneticamente modificados

Aula 7

LGN0232 – Genética molecular



Emiliana Manesco Romagnoli
Departamento de Genética
emilianaromagnoli@usp.br

Avaliação

A avaliação da disciplina será composta por duas provas, um trabalho e os questionários, sendo pontuado da seguinte forma:

$$\text{Prova I} + \text{Prova II} + \text{Trabalho} + \text{Questionário} = \text{TOTAL}$$
$$0,3 + 0,3 + 0,3 + 0,1 = 10,0$$

Plantão

Toda as segundas-feiras, realizaremos plantões de dúvidas pelo **Google Meets**, das 13 às 14h.

NÃO TEM RECUPERAÇÃO!

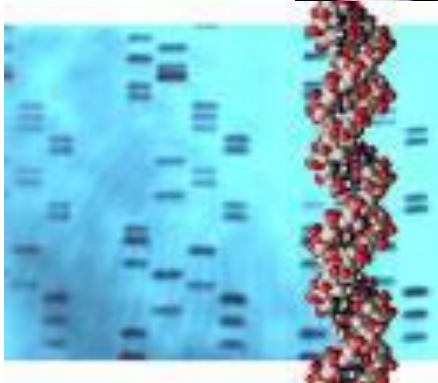
SACANAGEM É VOCÊ TIRAR 2,9
NA PROVA E SEU PROFESSOR NÃO
QUERER ARREDONDAR PRA 7.



O QUE CUSTA, GENTE?!?

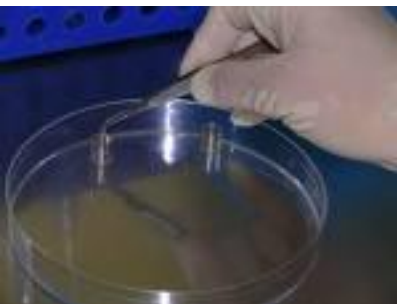
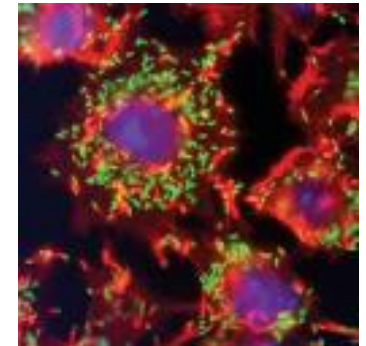
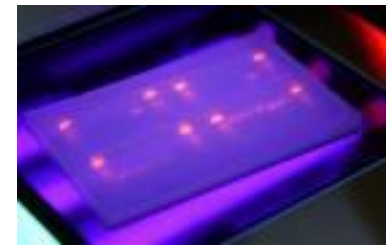
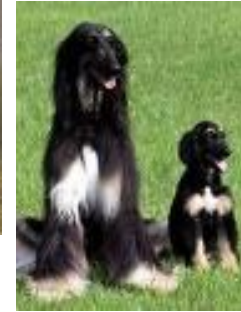
GENÉTICA MOLECULAR X BIOTECNOLOGIA

- ✓ **Bio – vivo, vida**
- ✓ **Tecnologia- a aplicação da ciência para alcançar objetivos industriais ou comerciais**



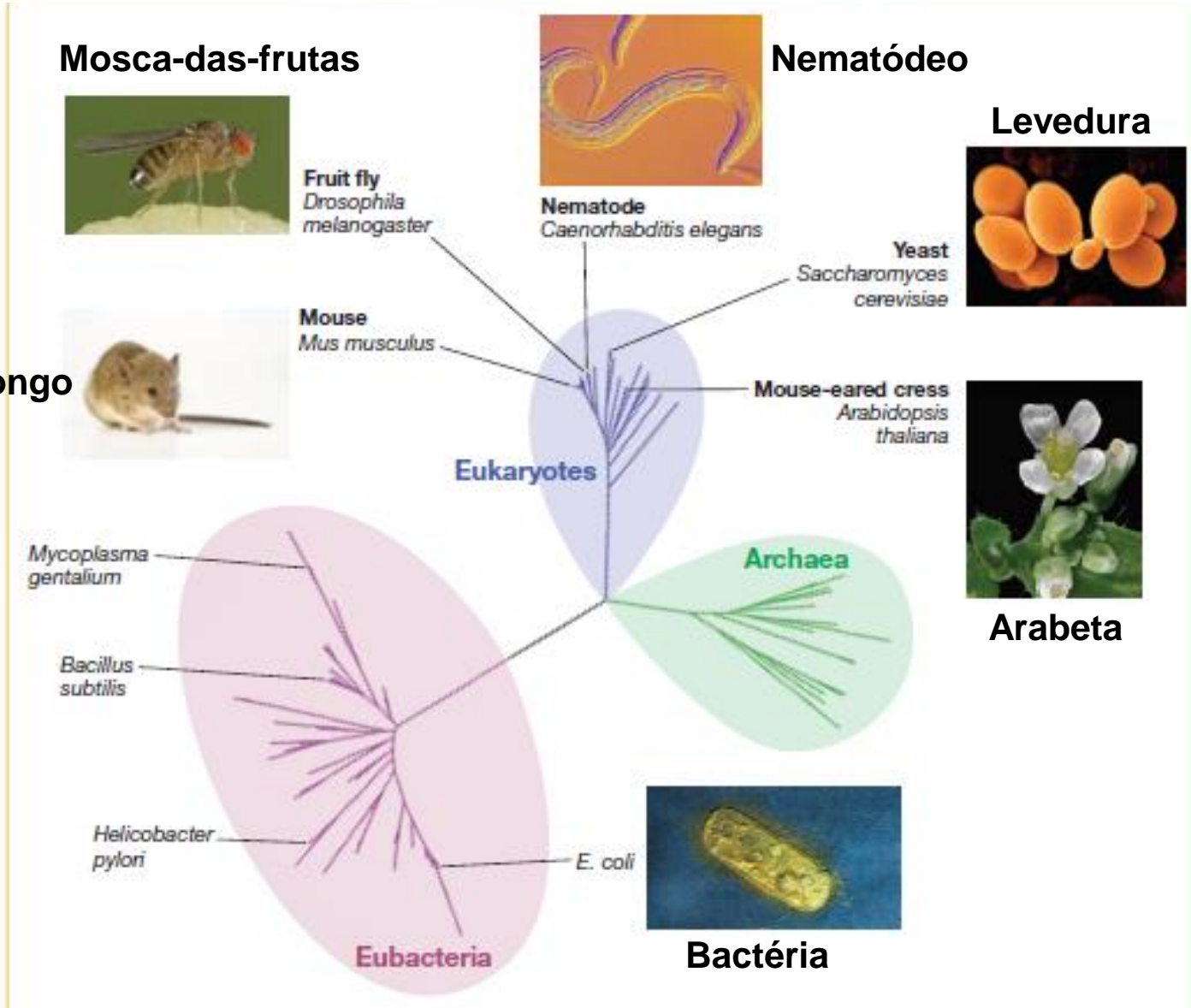
APLICAÇÕES MAIS RECENTES

- Clonagem;
- DNA *fingerprinting*;
- Bactérias modificadas geneticamente para produzir substâncias;
- Plantas geneticamente modificadas;
- Diagnóstico genético de doenças;
- Terapia gênica;
- Produção de medicamentos...



Os organismos-modelo estão dispersos pela árvore da vida

Camundongo



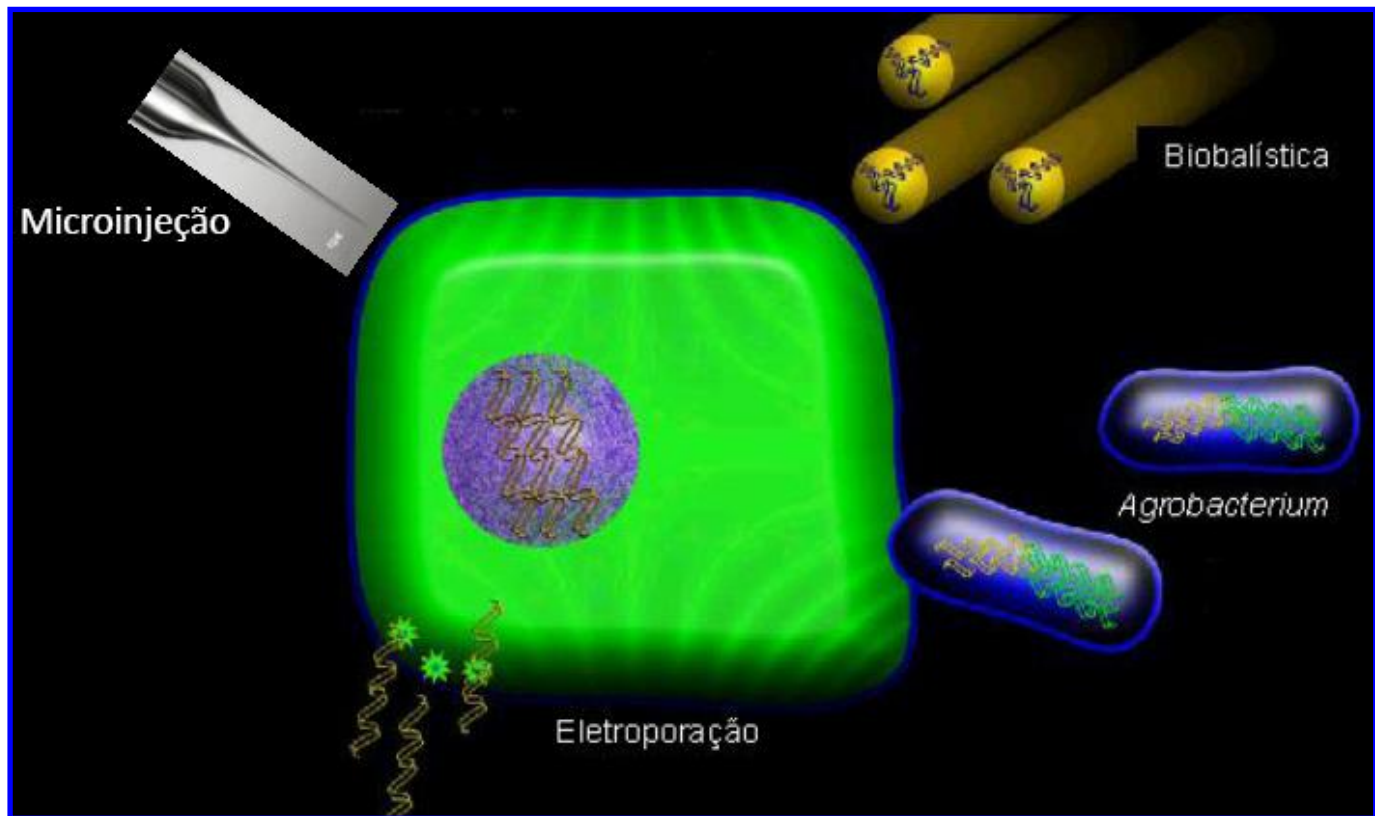


CONCEITOS IMPORTANTES

- 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 DNA NA CÉLULA



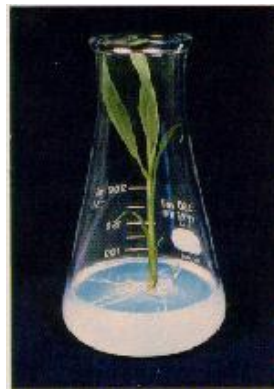
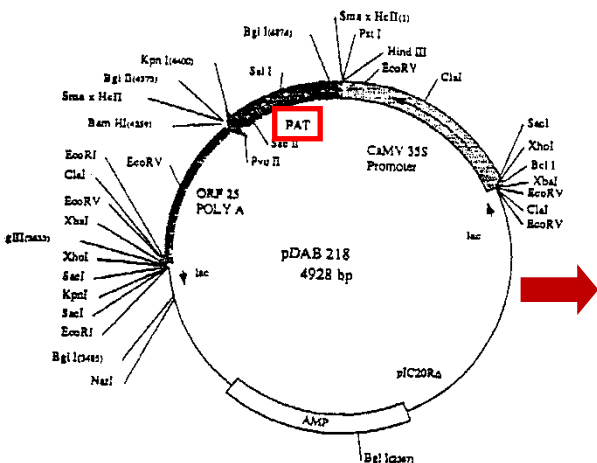
Altamente dependente do organismo!

Como eu faço a transformação de plantas?



ETAPAS PARA A TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE PLANTAS

- Seleção de tecido vegetal competente para propagação ou regeneração,
- Método de transferência do gene de interesse (biológico ou físico),
- Identificação de células transformadas por seleção,
- Regeneração de plantas a partir de células transformadas,
- Plantas transgênicas analisadas para confirmar presença do transgene - herança e estabilidade,
- Plantas transgênicas avaliadas para *performance* no campo.



EM SÍNTESE:

Construção sintética do transgene



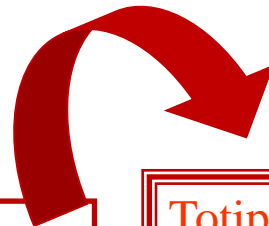
Introdução do DNA dentro da célula vegetal



Seleção



Regeneração da planta



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



Confirmação



Melhoramento



CONSTRUÇÃO SINTÉTICA DO TRANSGENE

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



Precisa conter no mínimo:

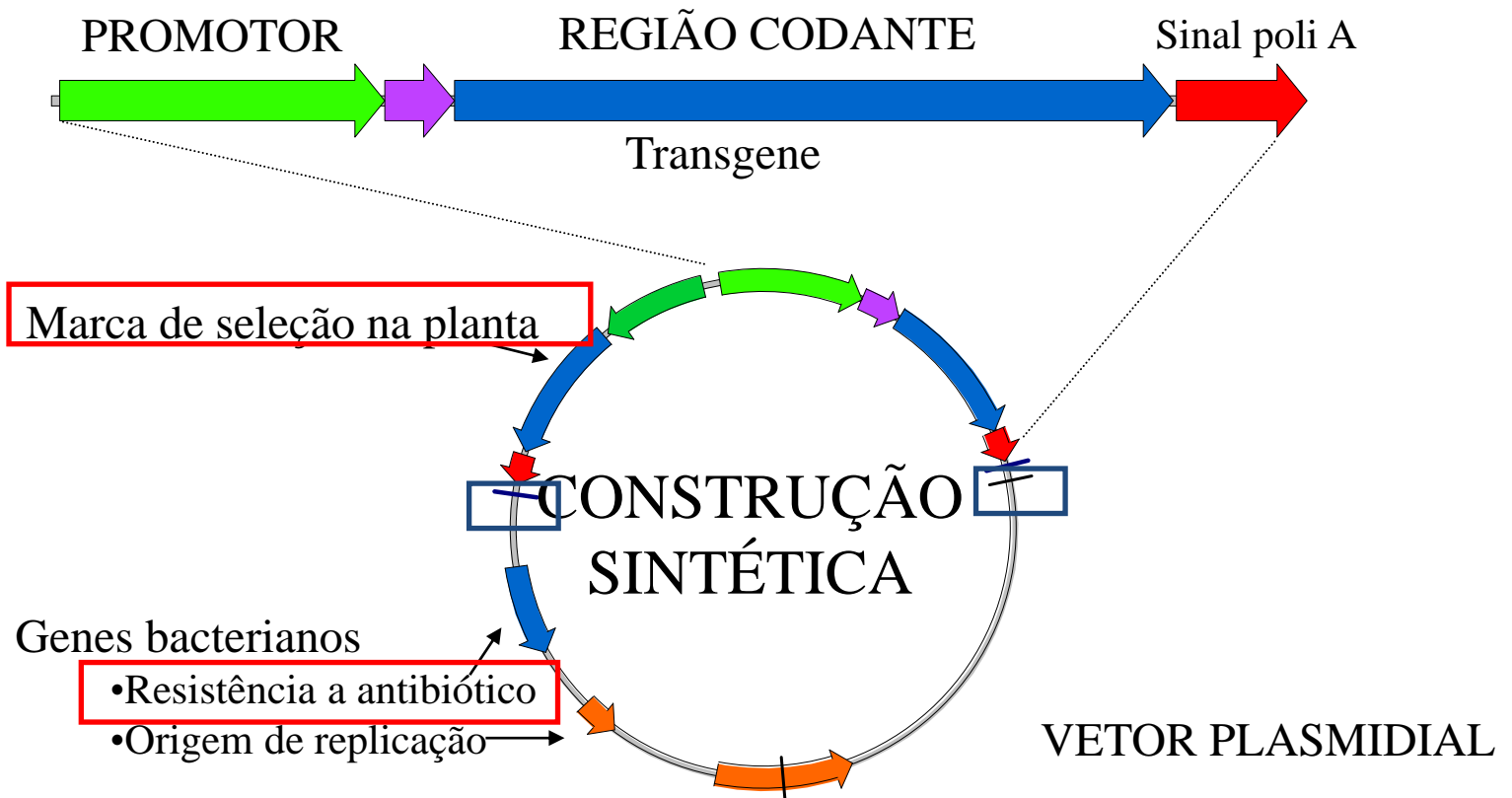
1. Gene de interesse

- A região de interesse e seus elementos controladores

2. Marca de seleção

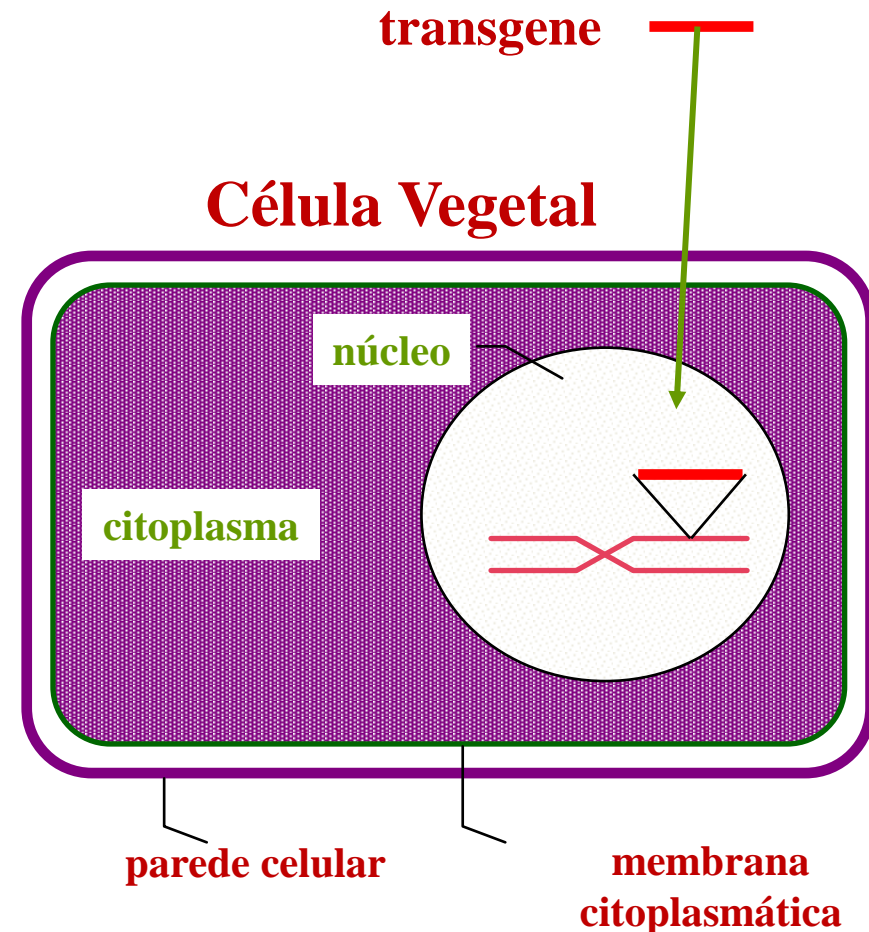
- Diferencia plantas transformadas e não transformadas

CONSTRUINDO O TRANSGENE



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

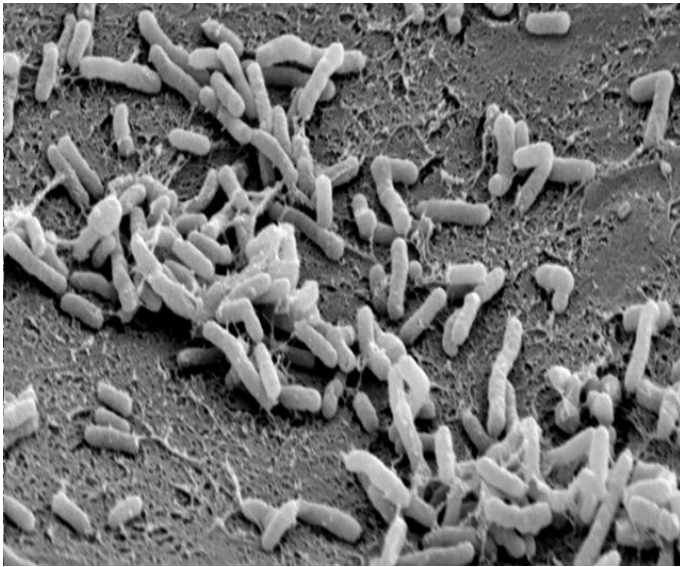
- Bactéria do solo que tem a capacidade de transferir parte do seu DNA para dentro da célula da planta;
- No laboratório, a bactéria é colocada em cultura junto com as células de plantas, ou inoculada no tecido da planta, transferindo parte do seu DNA para as células da planta;

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* - em monocotiledôneas.

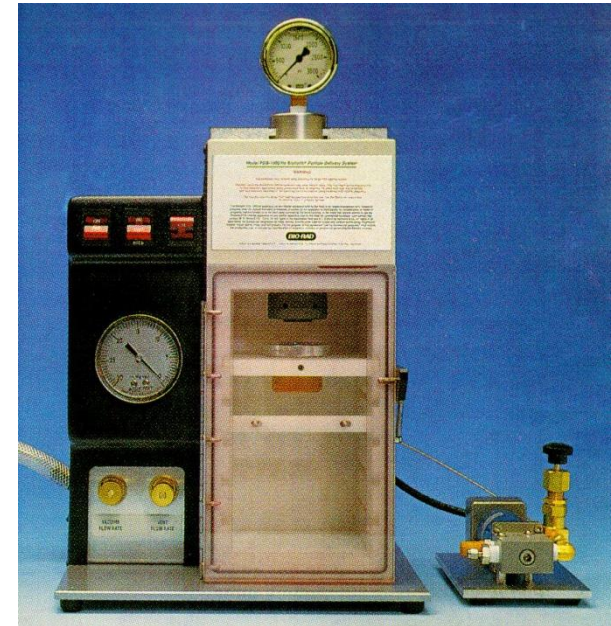
MÉTODO BIOLÓGICO X FÍSICO

Agrobacterium tumefaciens



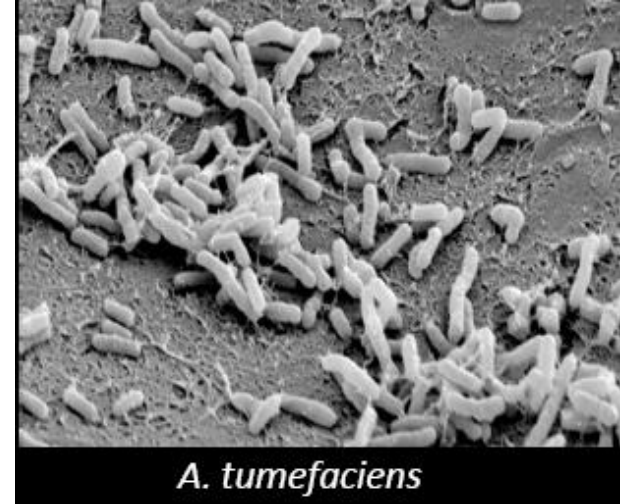
Propriedade natural da bactéria
Agrobacterium de transferir DNA para
dentro da célula da planta.

Bombardeamento de microprojéteis
“Biolística” ou “gene gun”



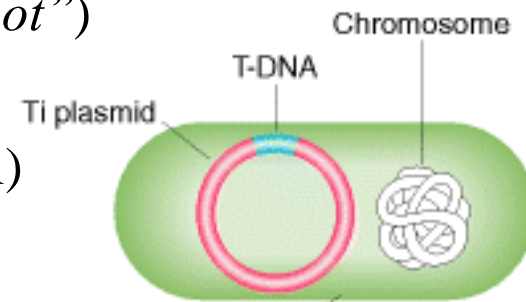
Partículas são cobertas de DNA e atiradas
para dentro da célula da planta.

Agrobacterium tumefaciens

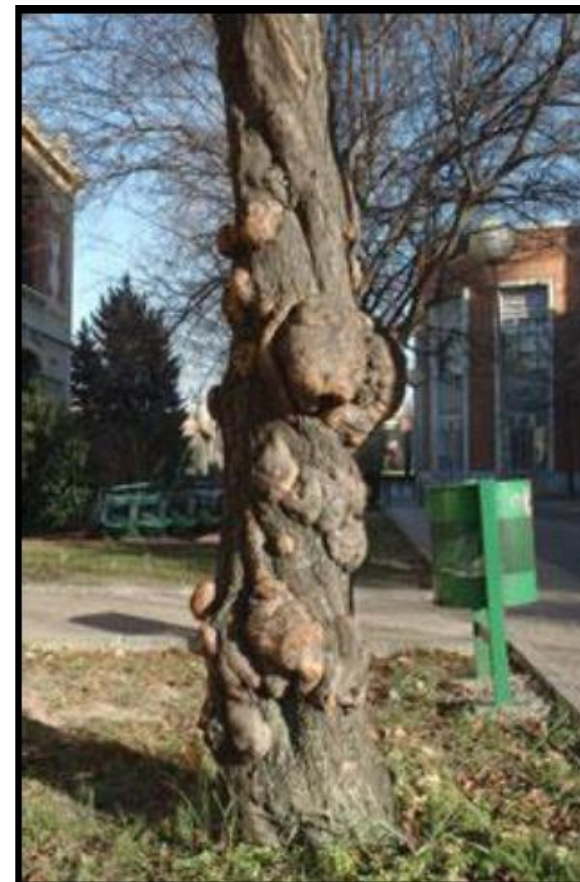


- Bactéria de solo Gram-negativa, tipo bacilo;
- Causa galha da coroa (“*crown gall*”): videira, maçã, etc.;
- Afeta mais dicotiledôneas e pouco monocotiledôneas;
- Família Rhizobiaceae.

- Outras espécies:
 - *Agrobacterium rhizogenes* -raiz em cabeleira (“*hairy root*”)
 - *Agrobacterium radiobacter* - não tumorogênica (sem Ti)



GALHA DA COROA



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

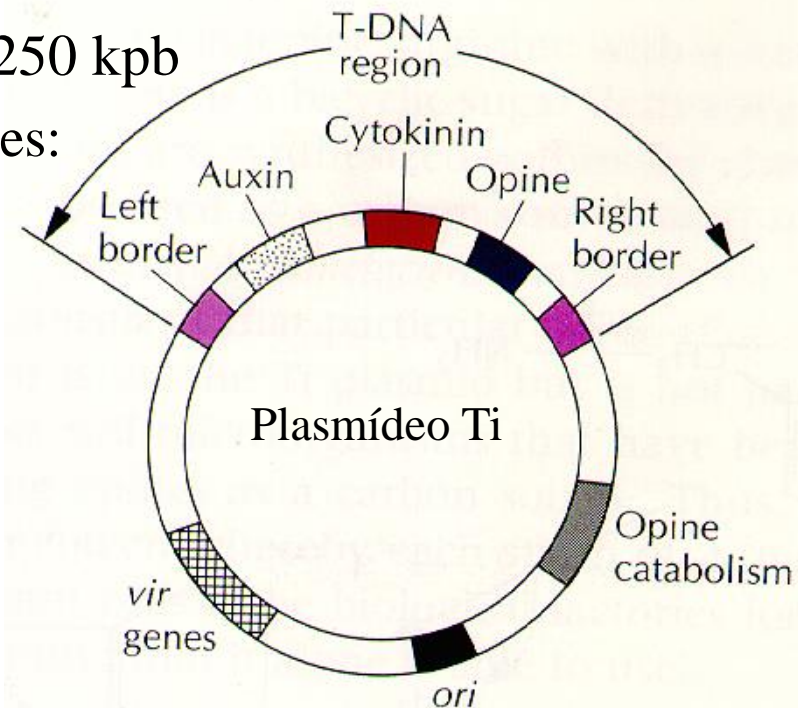
- o T-DNA integrado ao genoma vegetal é expresso de forma estável ;
- A síntese de auxinas e citocininas (oncogenes) levam a planta a um desbalanço hormonal;

Síntese de Opina

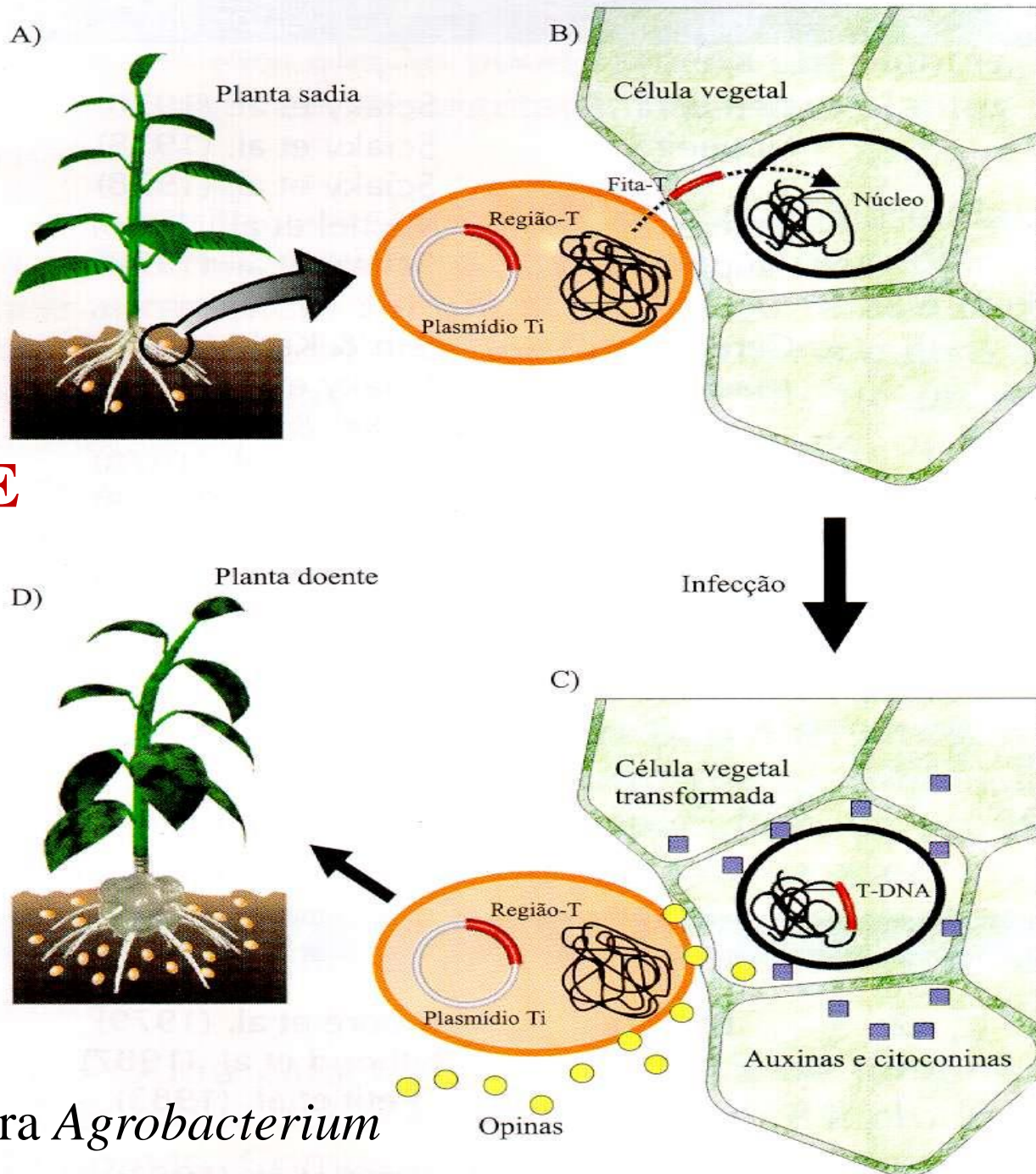
- Quanto mais a célula da planta se divide maior é a produção de opina e o nicho da agrobactéria se torna extremamente favorável;
- Somente a linhagem indutora é capaz de catabolizar a opina produzida como fonte de energia, carbono e nitrogênio;

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**

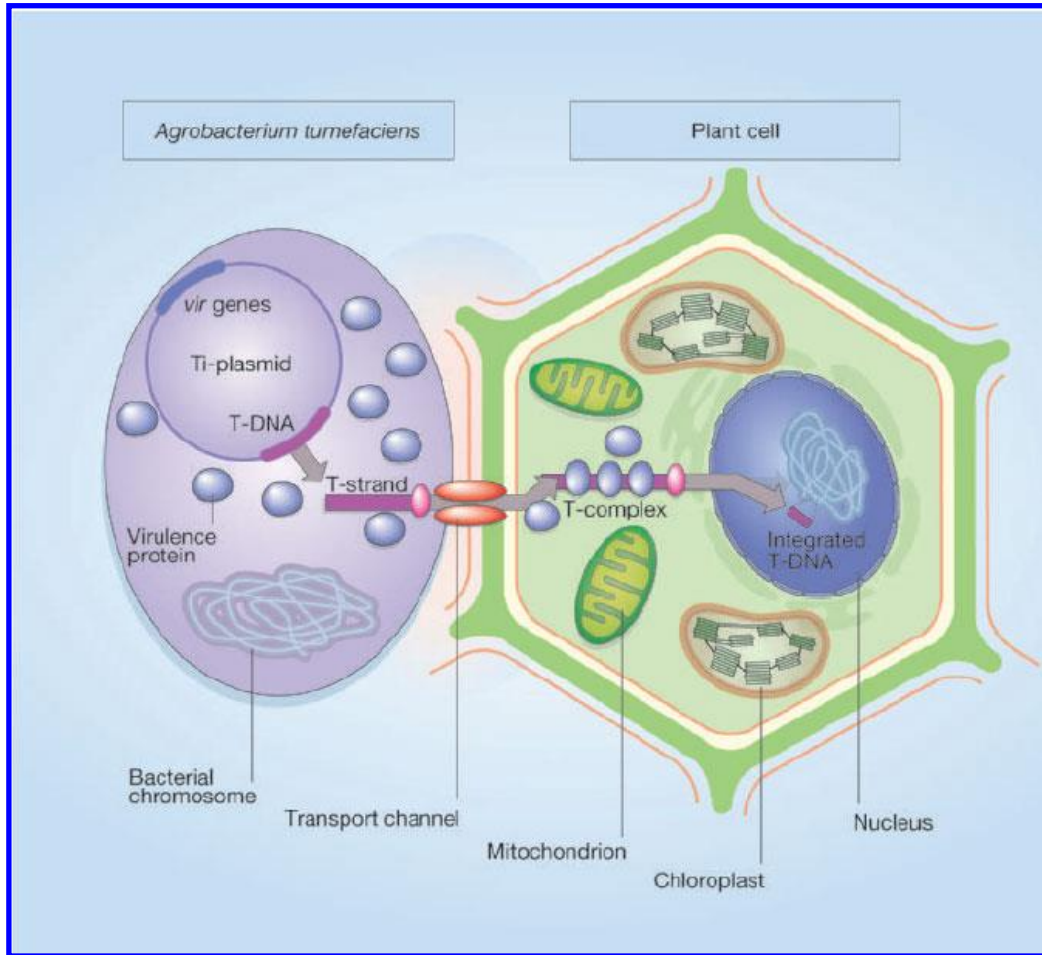


PATOGENICIDADE NATURAL DE *A. tumefaciens*



Opinas: fonte de C e N para *Agrobacterium*

PATOGENICIDADE NATURAL DE *A. tumefaciens*

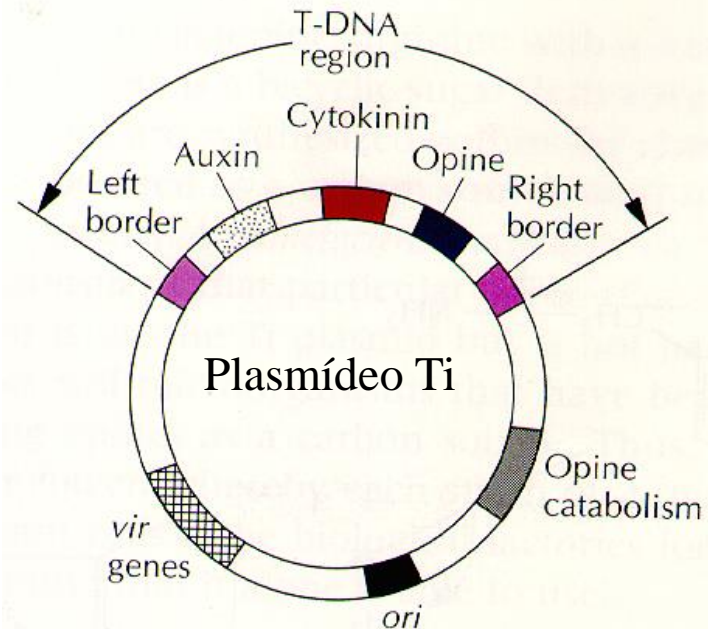


Agricultural biotechnology: Gene exchange by design (*Nature* 433, 583-584 (10 February 2005))

Agrobacterium

Região T-DNA

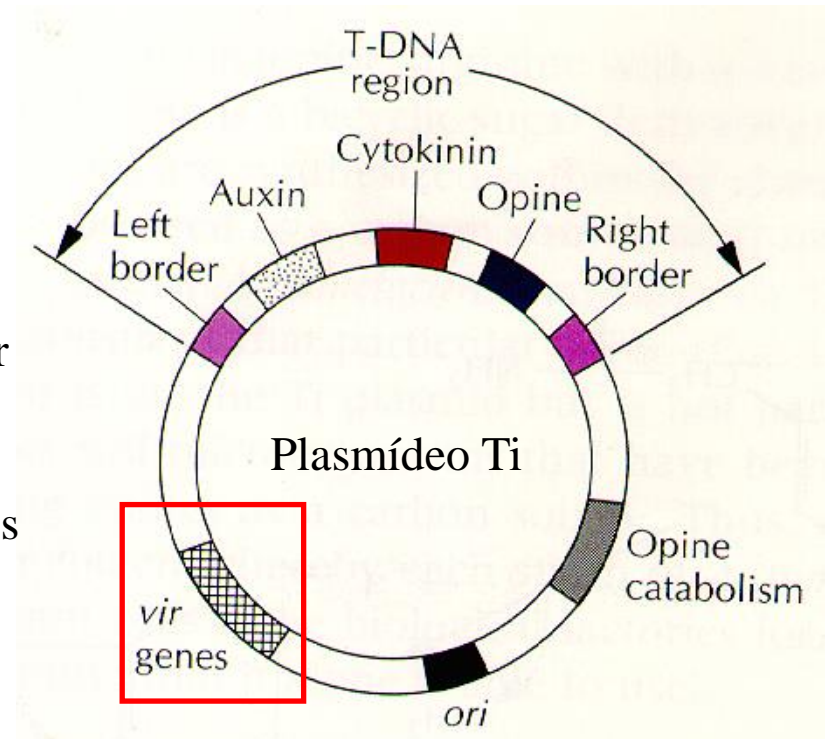
- Tamanho: de 12 a 24 kb
- Limitada por seqüências repetidas = bordas
 - bordas direita (RB) e esquerda (LB) - delimitam T-DNA
- Contém genes de síntese de reguladores de crescimento (hormônios vegetais) e de opinas
- Transferem genes para direcionar metabolismo para manutenção da *Agrobacterium*



Agrobacterium

Região *vir*

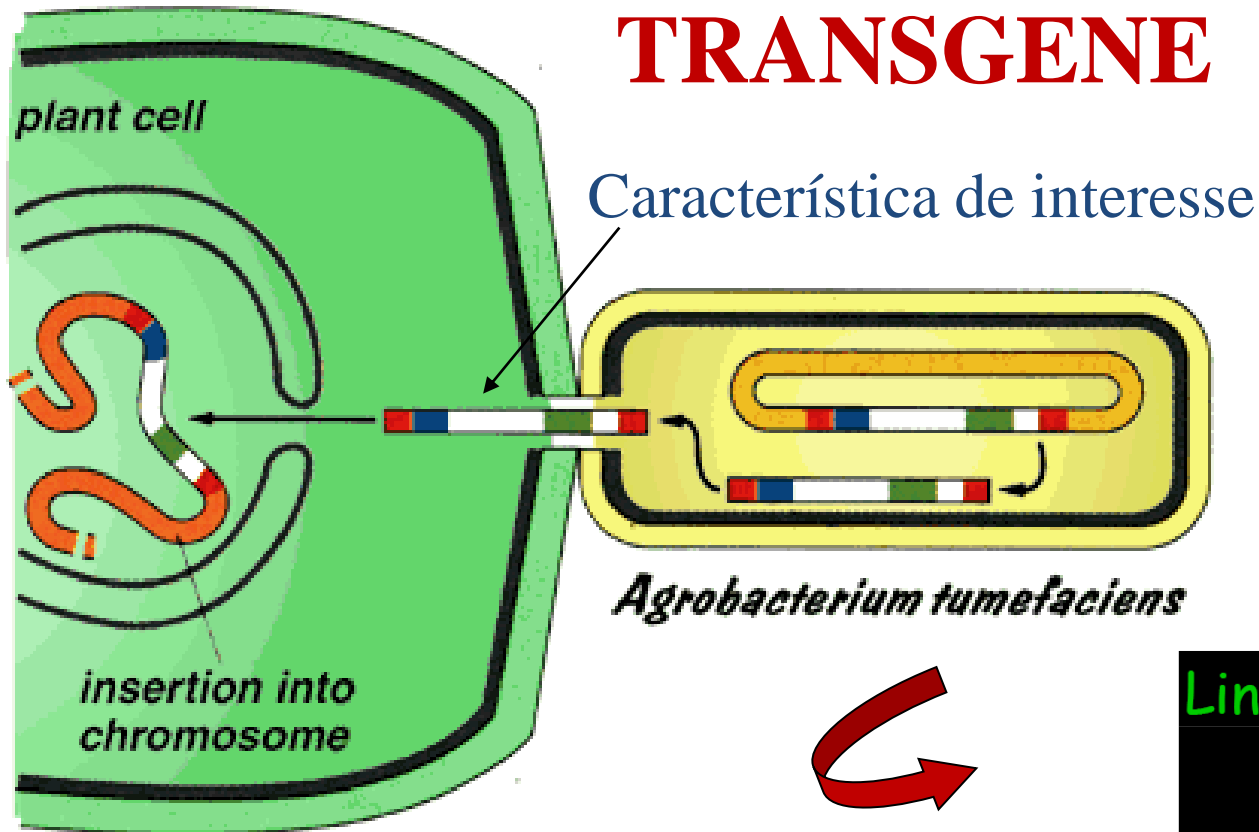
- genes responsáveis pela síntese de enzimas da transferência e integração do T-DNA



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

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

TRANSFERÊNCIA DO TRANSGENE



Elementos essenciais ao processo de transferência

Linhagem desarmada



Transgene de interesse

Bordas 25pb T-DNA

Região vir funcional

Marc Van Montagu



O descobridor dos mecanismos de patogenicidade de *Agrobacterium tumefaciens* e sua aplicação na transformação de plantas



ANNUAL REVIEWS **Further**

Click here for quick links to Annual Reviews content online, including:

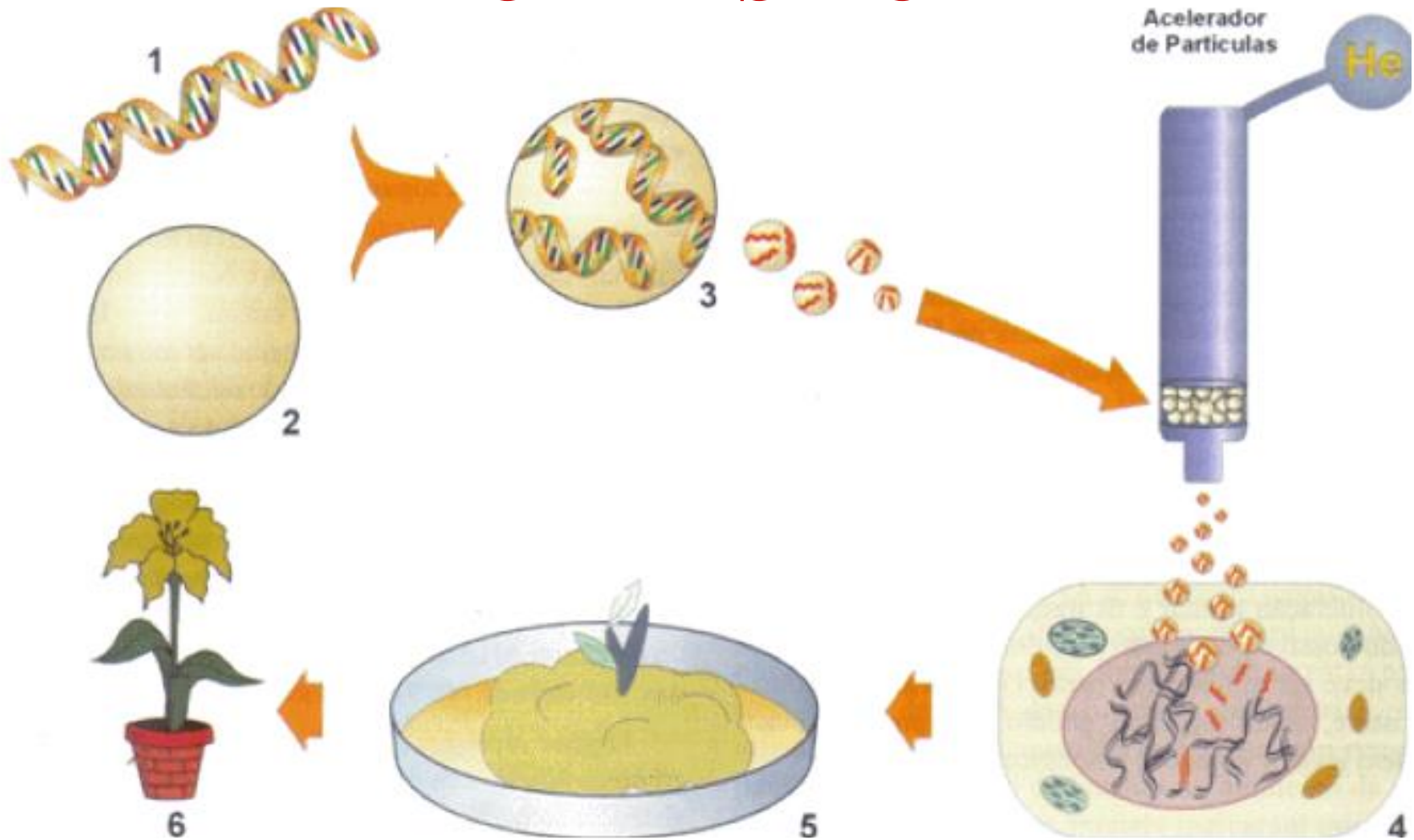
- Other articles in this volume
- Top cited articles
- Top downloaded articles
- Our comprehensive search

It Is a Long Way to GM Agriculture

Marc Van Montagu

Institute of Plant Biotechnology for Developing Countries, Department of Plant Biotechnology and Genetics, Ghent University, Ghent 9000, Belgium;
email: Marc.Van.Montagu@UGent.be

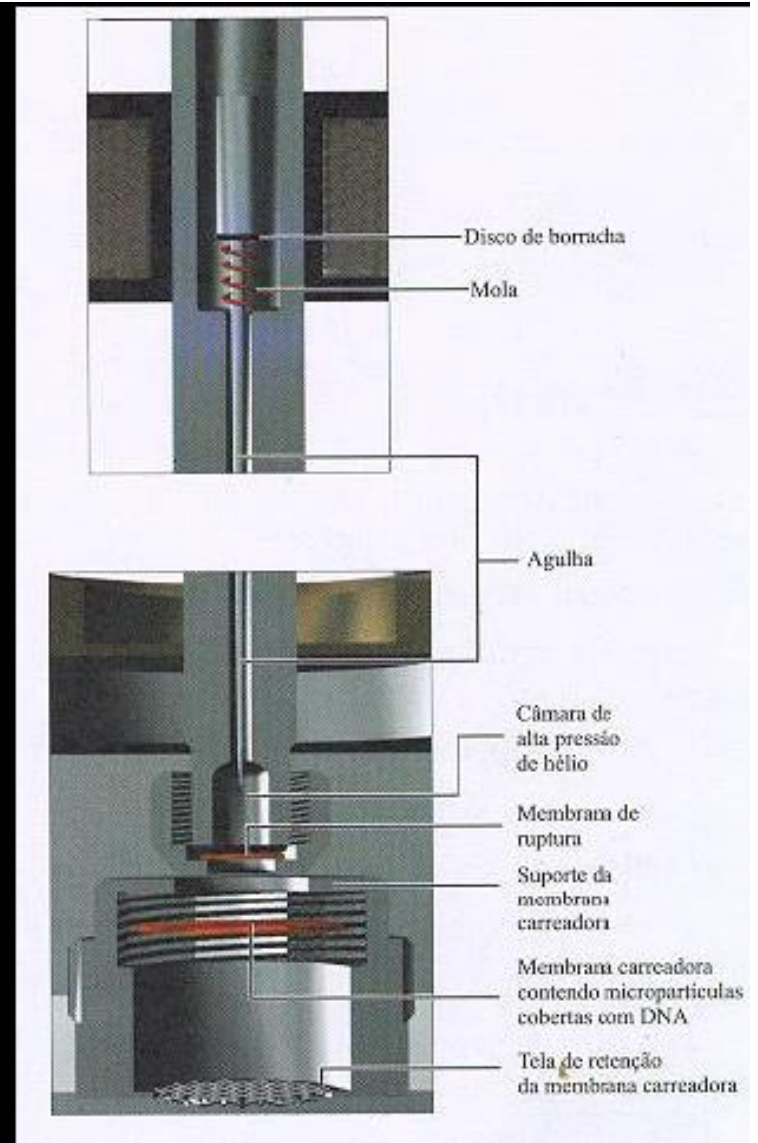
TRANSFORMAÇÃO VIA BIOBALÍSTICA



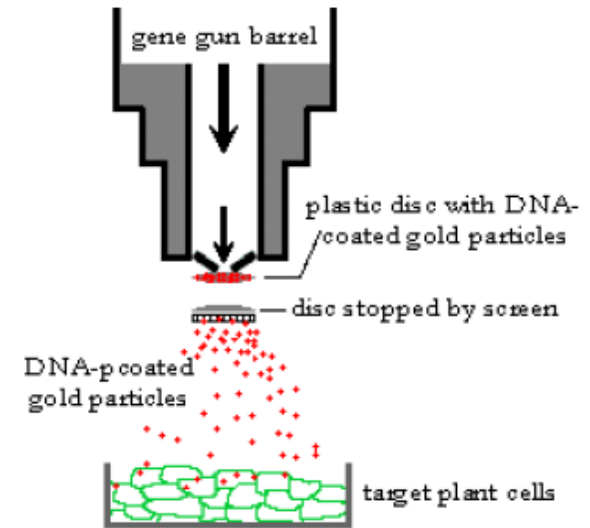
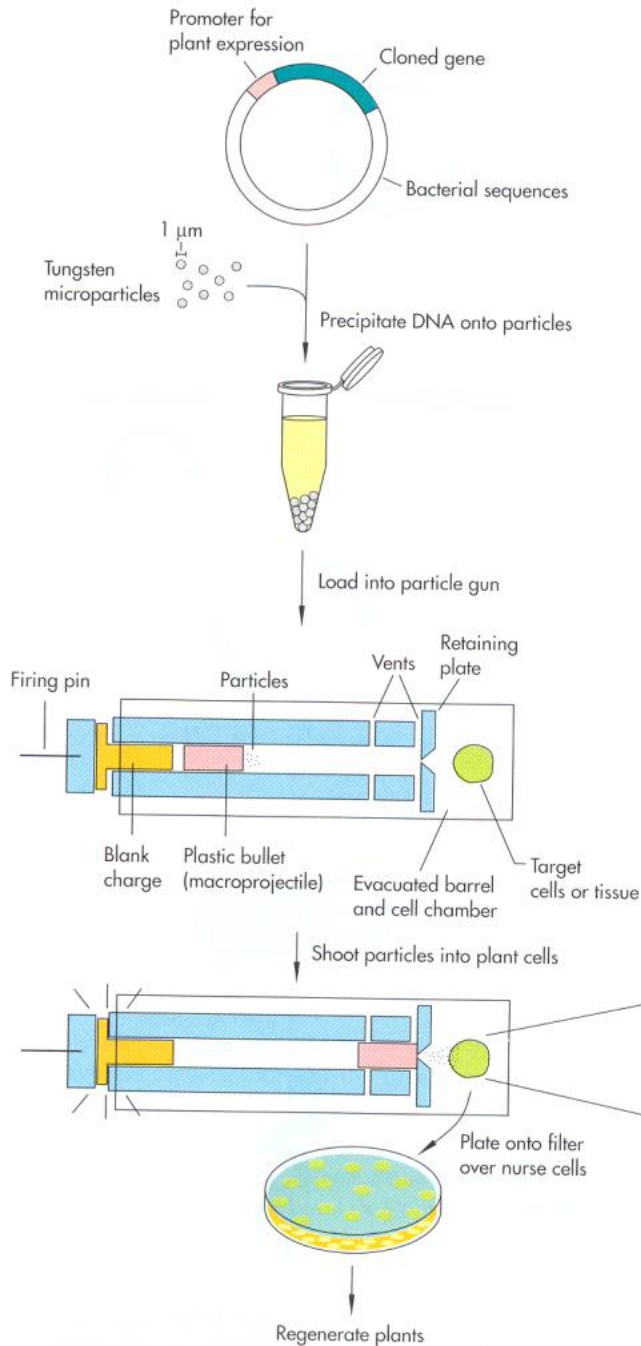
TRANSFORMAÇÃO VIA BIOBALÍSTICA



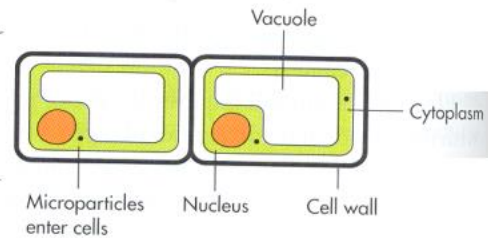
Bombardeador



TRANSFORMAÇÃO POR BOMBARDEAMENTO - BIOBALÍSTICA



Gene gun method



TRANSFORMAÇÃO – CÉLULA ALVO

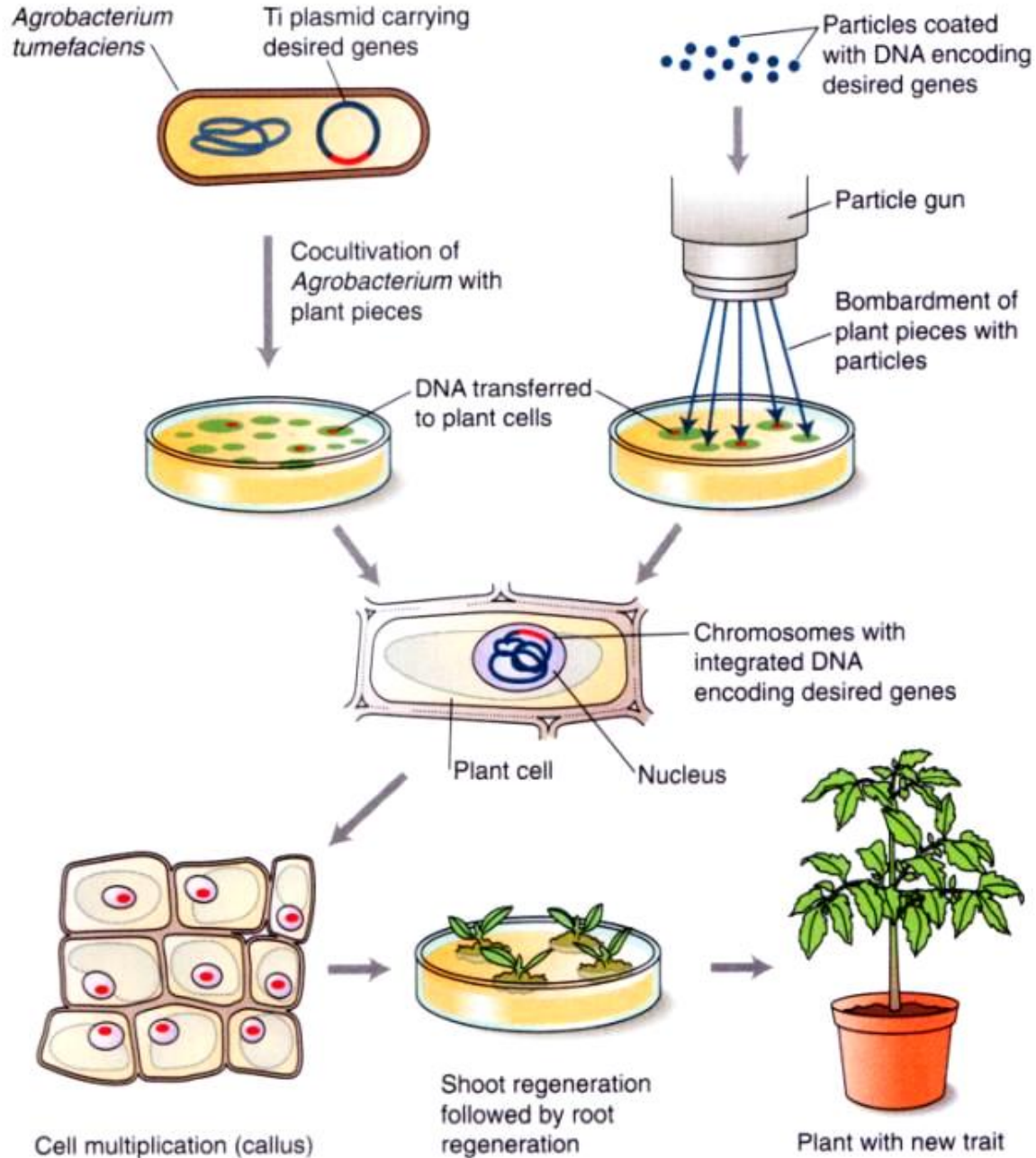
Todos os protocolos de transformação introduzem o DNA nas células de plantas em cultura de tecidos

- ✓ Cultura 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.



Agrobacterium method

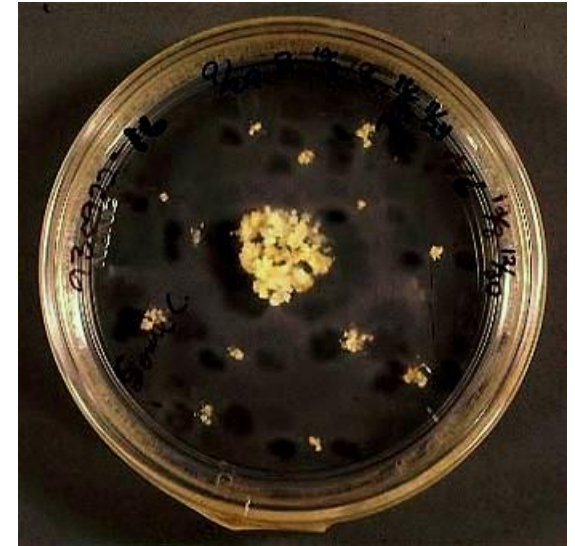
Particle gun method



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;
- ✓ 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 à herbicida
transgênico não-transgênico
Resistente Susceptível



TRANSFORMAÇÃO – SELEÇÃO E CONFIRMAÇÃO

Gene de seleção

Antibiótico:

Canamicina
Higromicina

Herbicida:

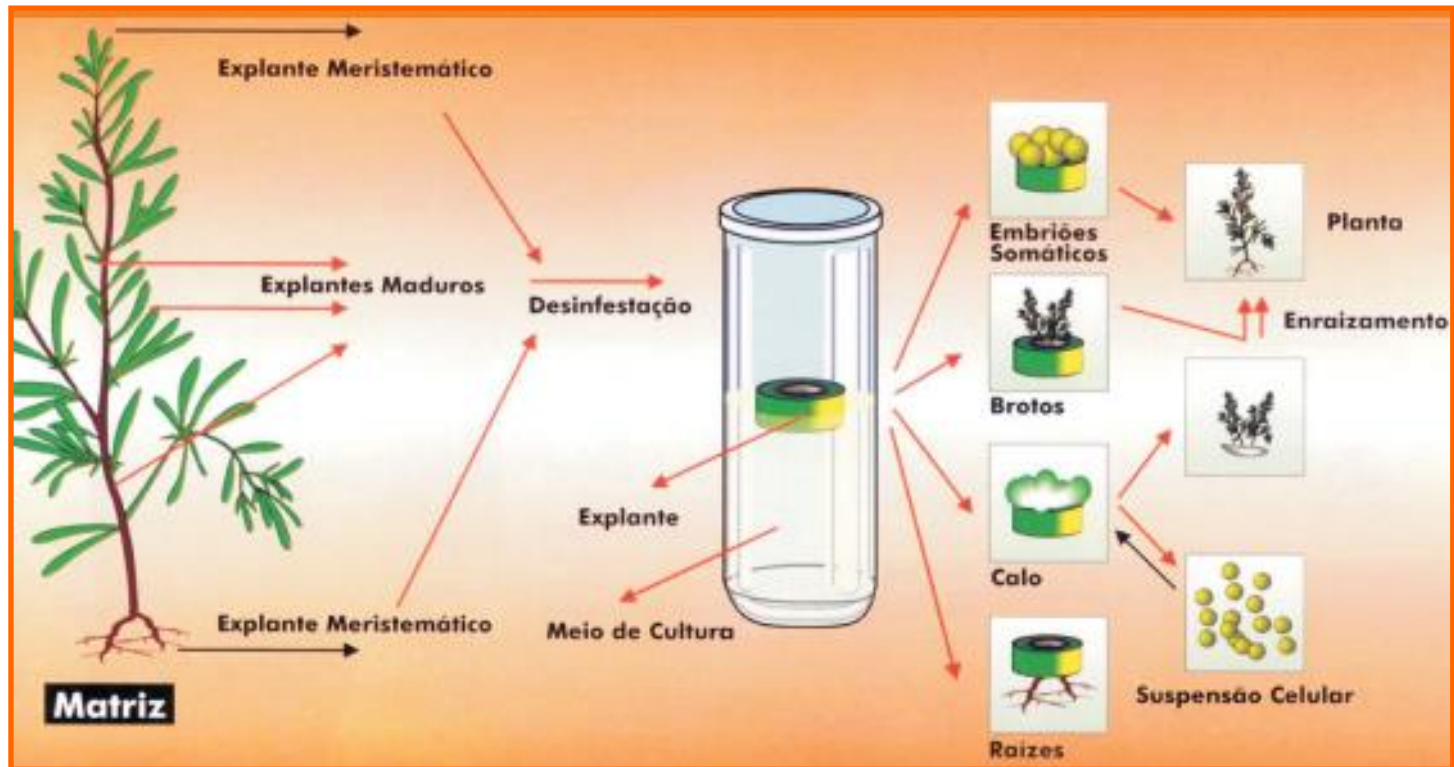
Glifosato

Genes repórters:

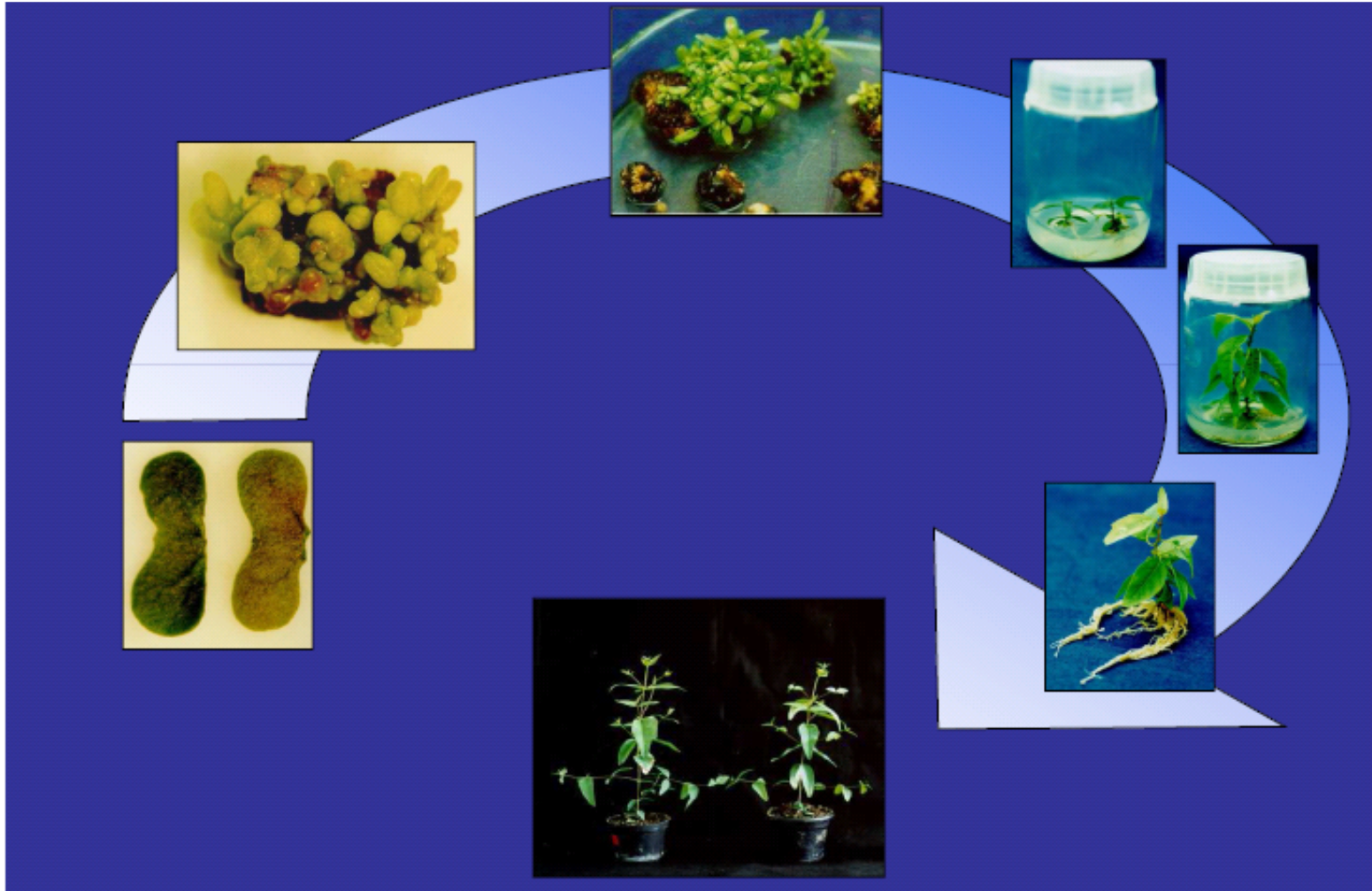
GFP, mRFP, CFP, YFP, mCherry etc
GUS
Luciferase



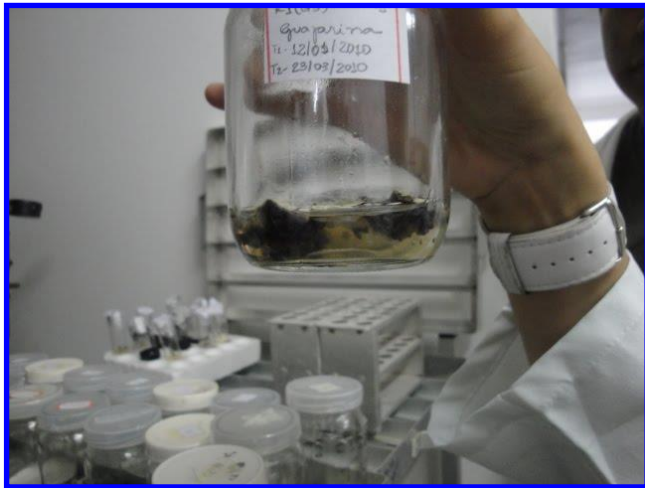
PRINCÍPIOS DA CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS



REGENERAÇÃO DEPENDE DO EXPLANTE...



ETAPAS NO LABORATÓRIO



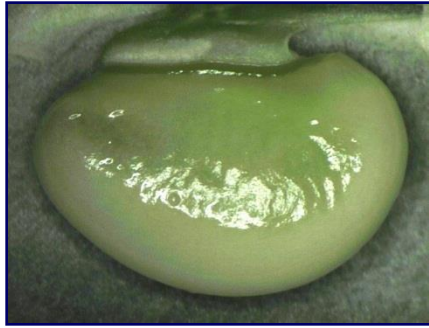
Planta regenerada



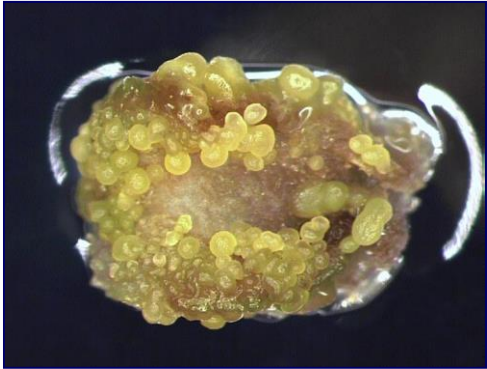
Germinação



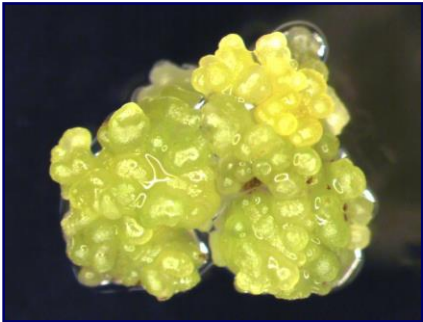
Cultura de tecidos de soja



Sementes imaturas



Proliferação



Indução



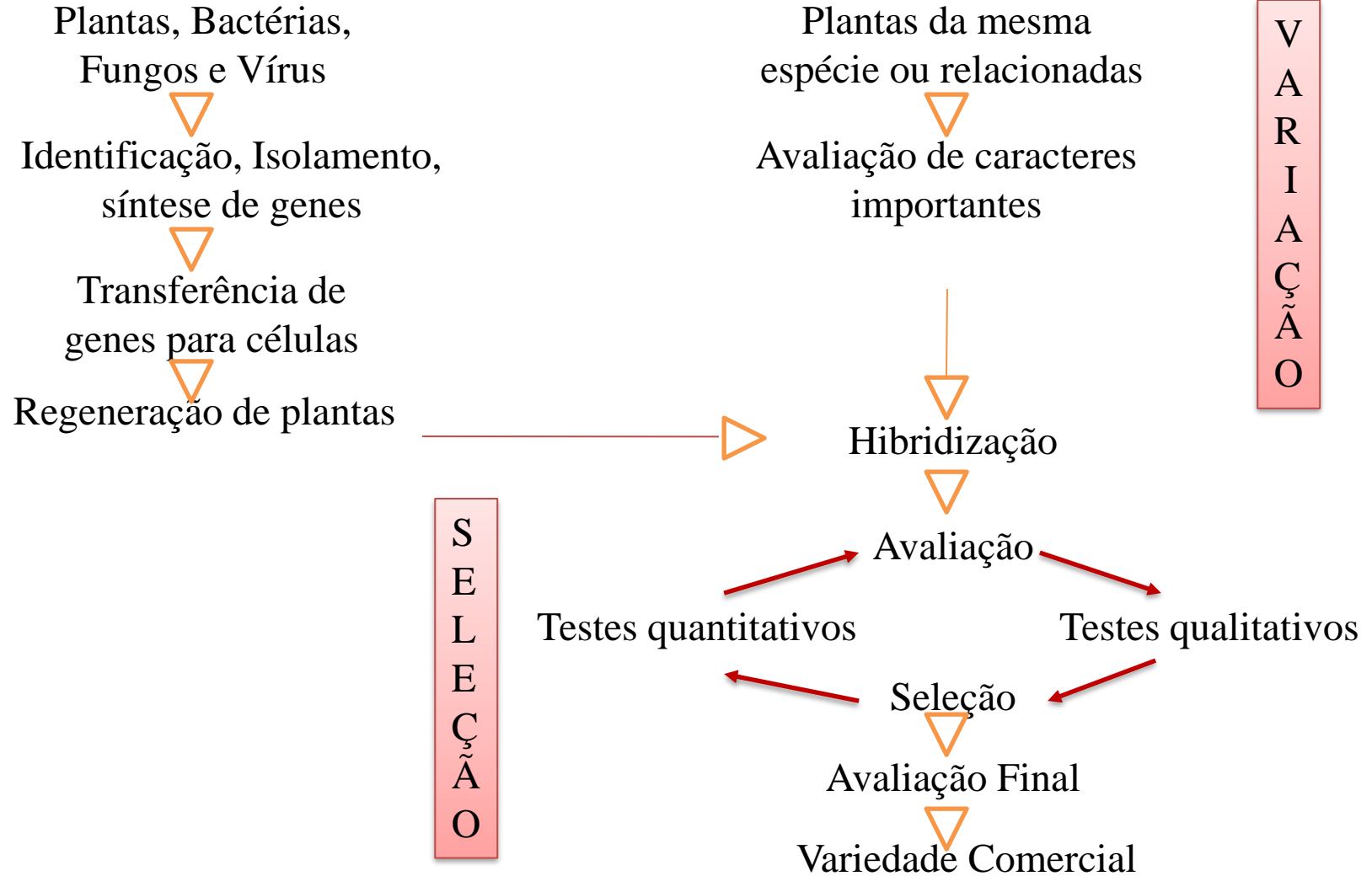
Desenvolvimento



Com o auxílio da
engenharia genética

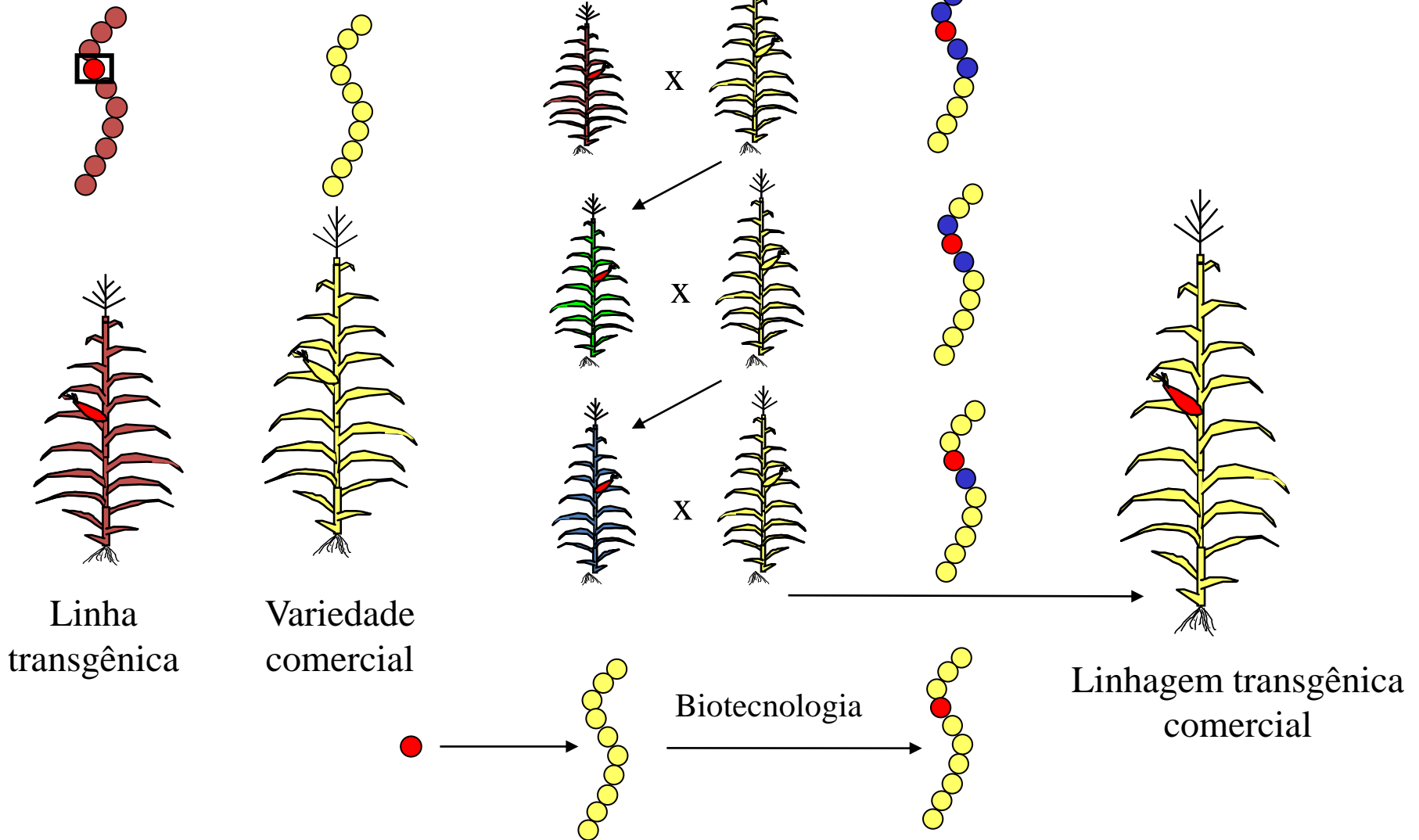
Pelos métodos
clássicos

Fonte de Genes



CONSTRUÇÃO DA VARIEDADE TRANSGÊNICA

Retrocruzamento e seleção (6 - 8 gerações)



Teste Final dos Transgêncios

Aceitação do consumidor!!!

Milho RoundUp Ready



Antes

Depois

Genetic Transformation of Forest Trees

Oswaldo A. Castellanos-Hernández¹, Araceli Rodríguez-Sahagún¹,
Gustavo J. Acevedo-Hernández² and Luis R. Herrera-Estrella³

¹Centro Universitario de la Ciénega-Universidad de Guadalajara

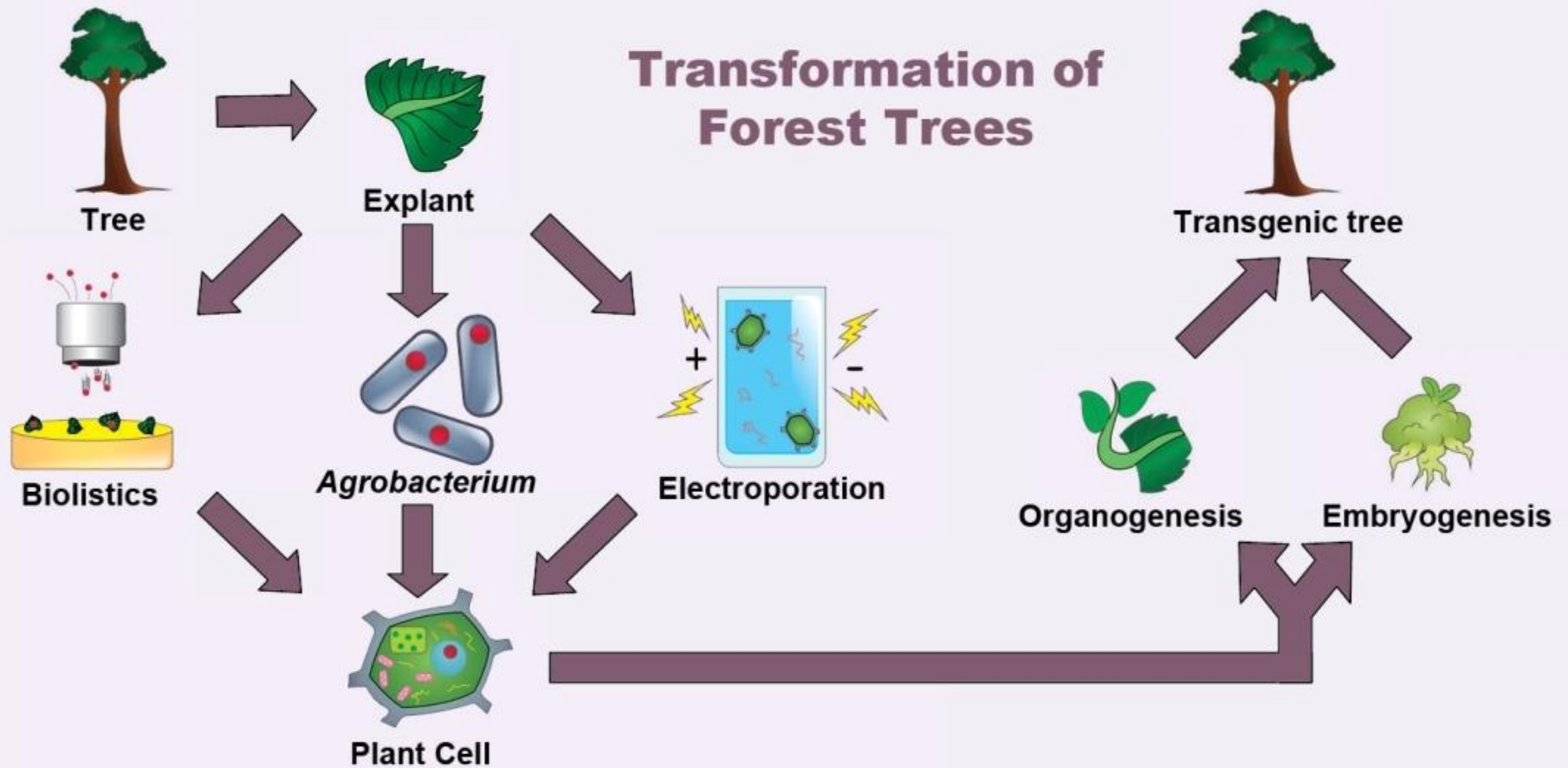
²The University of Western Ontario

³LANGEBIO

^{1,3}Mexico

²Canada

Species	Technique	Vector	Transgen	Plant regeneration	Reference
<i>Pinus radiata</i>	Biolistic transformation	pRC 101	<i>nptII</i> and <i>uidA</i> genes	Yes (Embryogenesis)	Walter <i>et al.</i> 1998
<i>Pinus radiata</i>	Biolistic transformation	pMYC3425+pRN2 or pMYC3425+pCW132 or pMYC3425+pAW16	<i>cry1Ac</i> and <i>nptII</i> or <i>cry1Ac</i> and <i>nptII</i> or <i>cry1Ac</i> , <i>nptII</i> and <i>uidA</i> genes respectively	Yes (Embryogenesis)	Grace <i>et al.</i> 2005
<i>Quercus suber</i> L.	Cocultivation with <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	pBINUbiGUSINT	<i>nptII</i> and <i>uidA</i> genes	Yes (Embryogenesis)	Álvarez & Ordás, 2007
<i>Picea abies</i> [L.] Karst	Biolistic transformation	pASCCR-BAR	<i>ccr</i> gen fused in antisense orientation	Yes (Embryogenesis)	Wadenbäck <i>et al.</i> , 2008
<i>Paulownia elongata</i> S.Y. Hu	Biolistic transformation	pBI121	<i>nptII</i> and <i>gus</i> genes	Yes (Organogenesis)	Castellanos-Hernández <i>et al.</i> 2009
<i>Castanea dentata</i>	Cocultivation with <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	pCAMBIA 2301	<i>nptII</i> and <i>uidA</i> genes	Yes (Embryogenesis)	Andrade <i>et al.</i> 2009
<i>Populus tremula</i> x <i>Populus tremuloides</i> <i>Populus tremula</i> x <i>Populus alba</i>	Cocultivation with <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	pG3KGB and pG3MKGB,	<i>nptII</i> , <i>gfp</i> and <i>bar</i> genes	Yes (Organogenesis)	Li J. <i>et al.</i> 2009
<i>Populus alba</i> x <i>Populus berolinensis</i>	Cocultivation with <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	pROK2	<i>nptII</i> and <i>JERFs</i> genes	Yes (Organogenesis)	Li. Y. <i>et al.</i> 2009
<i>Leucaena leucocephala</i>	Cocultivation with <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	pCAMBIA3201	<i>bar</i> and <i>uidA</i> genes	Yes (Zygotic immature embryos)	Jube & Borthakur 2009
<i>Prunus serotina</i>	Cocultivation with <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	PsAGRNAi	<i>nptII</i> and <i>PsAG</i> genes	Yes (Organogenesis)	Liu & Pijut 2010
<i>Betula platyphylla</i> Suk.	Cocultivation with <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	pCAMBIA-2301	<i>nptII</i> , <i>gus</i> , <i>bgt</i> genes	Yes (<i>In vitro</i> propagation)	Zeng <i>et al.</i> 2010



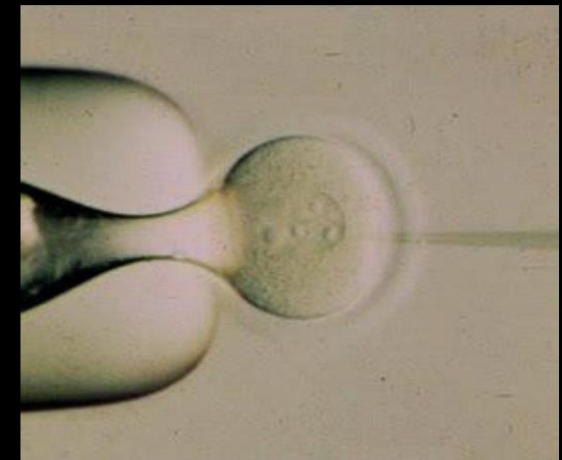
TRANSFORMAÇÃO DE ANIMAIS

Microinjeção

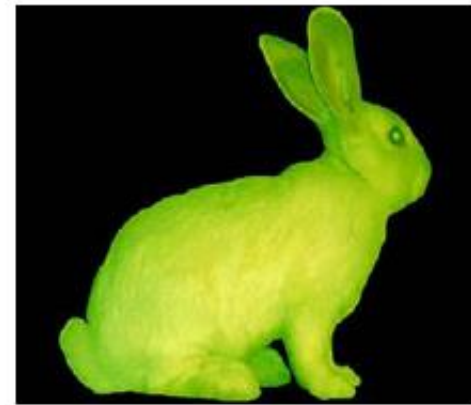
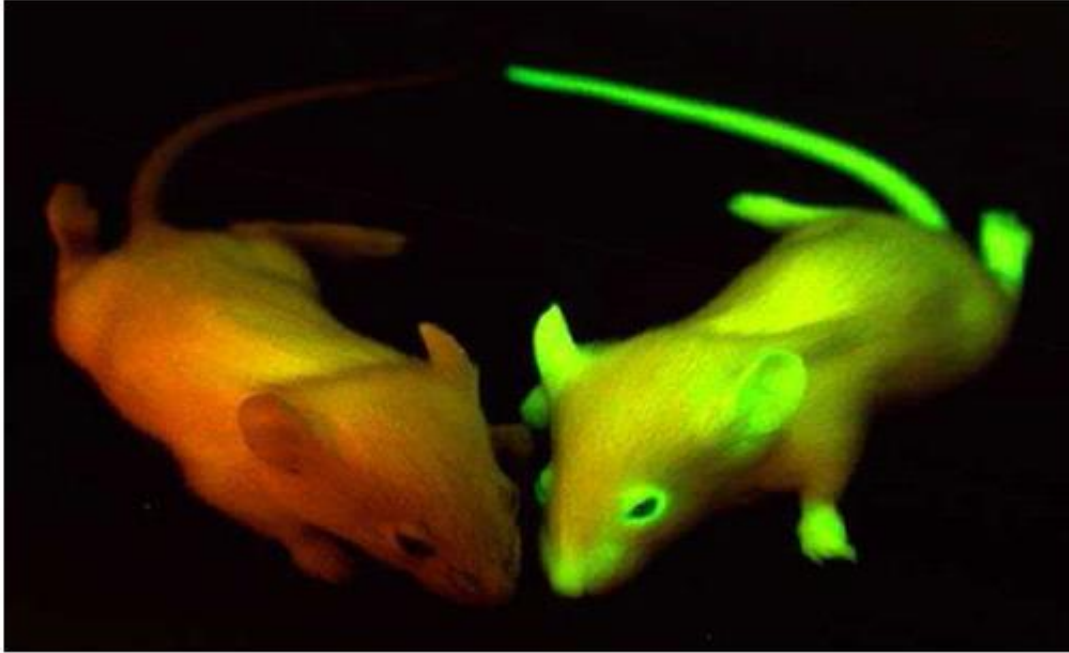
Por meio de agulhas microscópicas é injetado DNA no núcleo da célula alvo

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

Transformação via Microinjeção



EXPRESSION DO GENE DA GFP EM ANIMAIS



Coelho transgênico obtido por expressão do gene da GFP⁸

ANIMAIS TRANSGÊNICOS



Carne “light”- ômega 3

Salmão transgênico para alimentação humana

revistapesquisa.fapesp.br/2015/12/15/salmaa-transgenico-para-alimentacao-humana/

Depois de uma rigorosa averiguação científica, a Food and Drug Administration (FDA), a agência que regula o comércio de remédios e alimentos nos Estados Unidos, aprovou em novembro o primeiro animal transgênico para consumo humano daquele país. A empresa AquaBounty Technologies começou a desenvolver o peixe há 20 anos. É um salmão do Atlântico (*Salmo salar*) geneticamente modificado que cresce duas vezes mais rápido que os espécimes utilizados em criações de cativeiro. Em vez de três anos, o peixe chega ao tamanho para a comercialização em até 18 meses e consome de 20% a 25% menos ração. Em um comunicado, a FDA afirma ser o salmão geneticamente modificado tão seguro e nutritivo como o tradicional. A engenharia genética para tornar o salmão mais produtivo utilizou dois genes de dois outros peixes. Um, relativo ao hormônio de crescimento do salmão Chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*), do oceano Pacífico, que cresce bem mais que o do Atlântico, e outro gene – da enguia *Zoarces americanus*, dos mares do Noroeste Atlântico – que codifica um promotor de proteínas anticongelamento que deixa o salmão geneticamente modificado crescer no inverno.

Republish

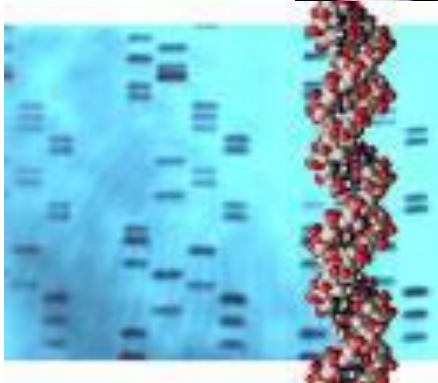
<https://revistapesquisa.fapesp.br/2015/12/15/salmaa-transgenico-para-alimentacao-humana/>



AquaBounty Technologies Empresa desenvolve peixe que cresce duas vezes mais rápido e consome menos ração AquaBounty Technologies

A transformação genética consiste basicamente de quatro passos:

Inserção, Integração, Expressão e Replicação do DNA exogeno dentro da célula hospedeira



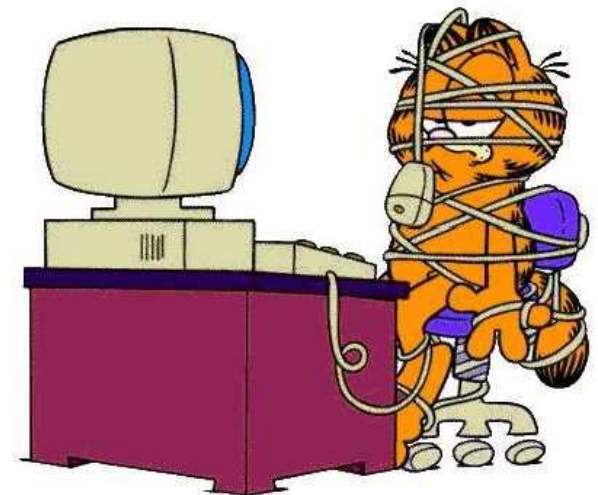
VISUALIZANDO O PROCESSO...

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

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

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

https://www.ted.com/talks/jennifer_doudna_we_can_now_edit_our_dna_but_let_s_do_it_wisely



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

Leitura recomendada

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

