



unesp

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"  
Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira  
Graduação em Agronomia – Departamento de Biologia e Zootecnia

FEIS  
Agronomia

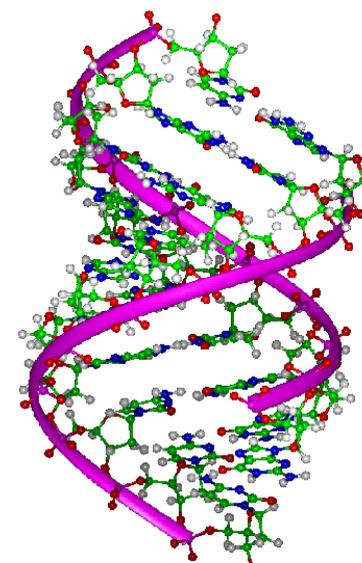
**Disciplina:**

# GENÉTICA

Curso: *Agronomia*

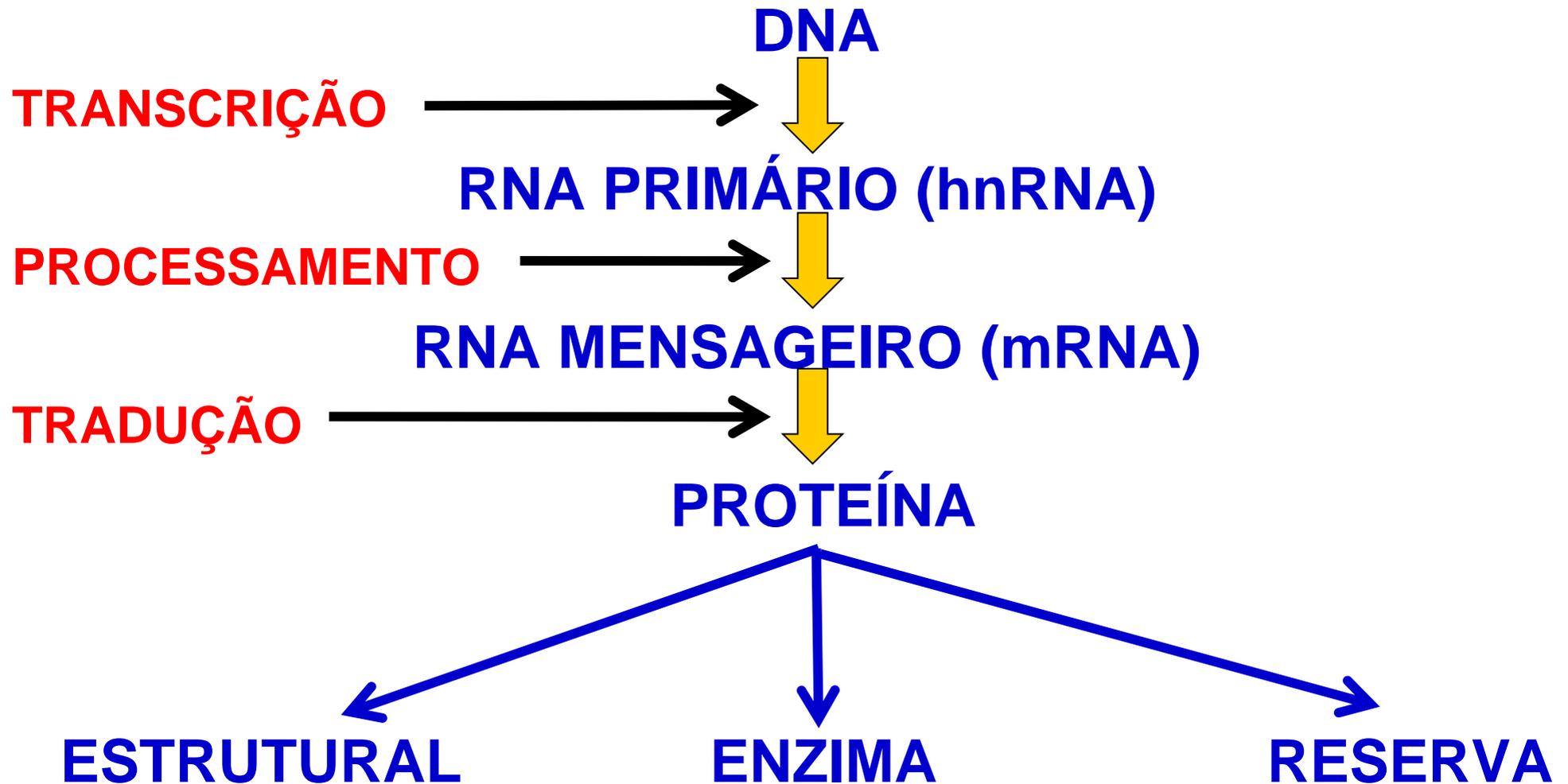
Docente: **João Antonio da Costa Andrade**

- **Engenheiro Agrônomo**
- **Melhoramento genético de milho**
- **Sala 08**





# ***REGULAÇÃO GÊNICA***



# Regulação gênica

**Genes estruturais** – codificam algum composto (proteína, tRNA, rRNA, RNA nuclear);

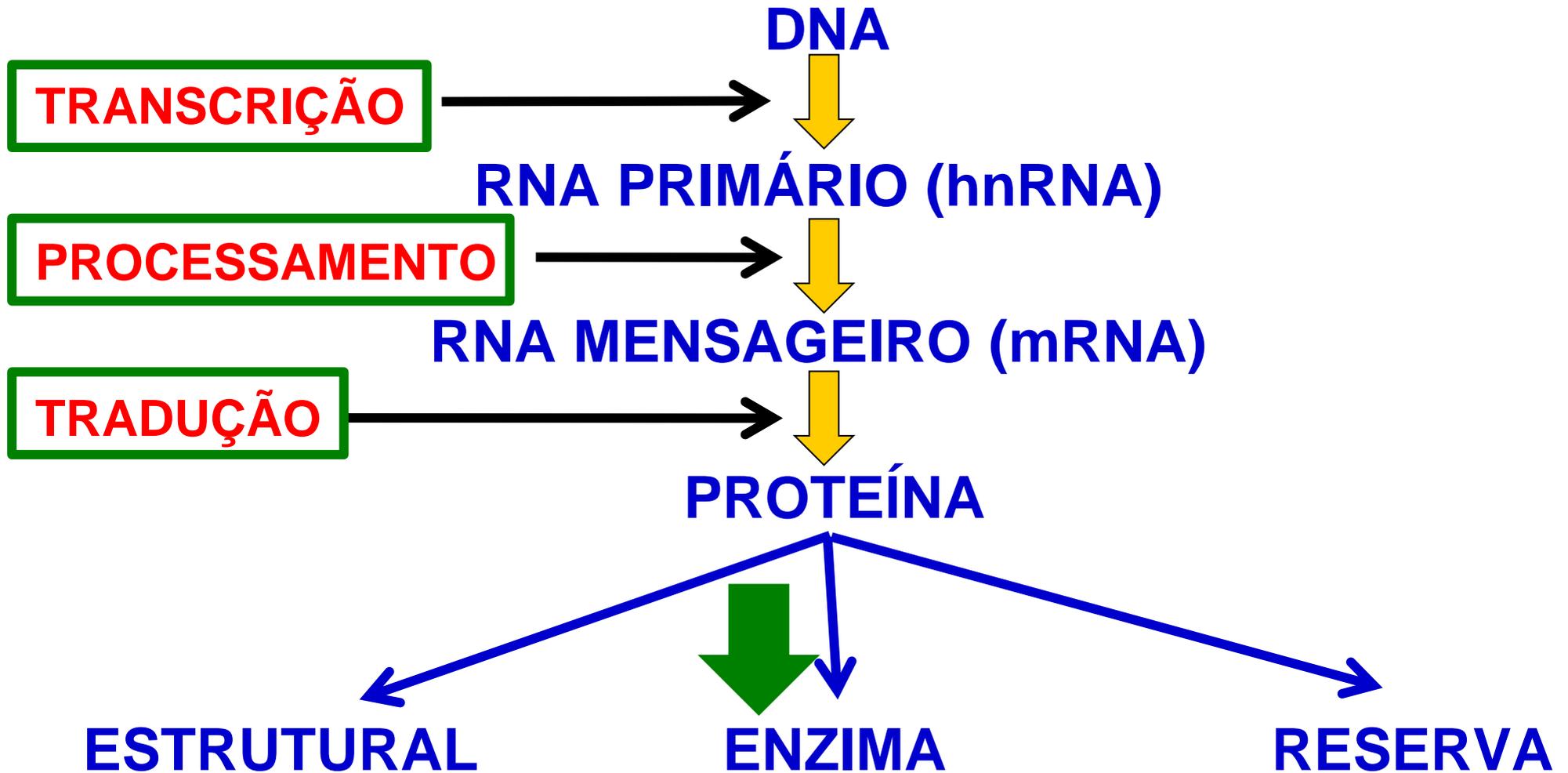
**Genes reguladores:** promotores, operadores, terminadores (não são transcritos);

**Operons:** sequência nucleotídica do DNA formada por regiões reguladoras e dois ou mais genes estruturais (somente em procariotos);

**Enzimas induzíveis:** produzidas apenas quando um indutor (substrato, hormônio, etc...) está presente;

**Enzimas constitutivas:** produzidas continuamente;

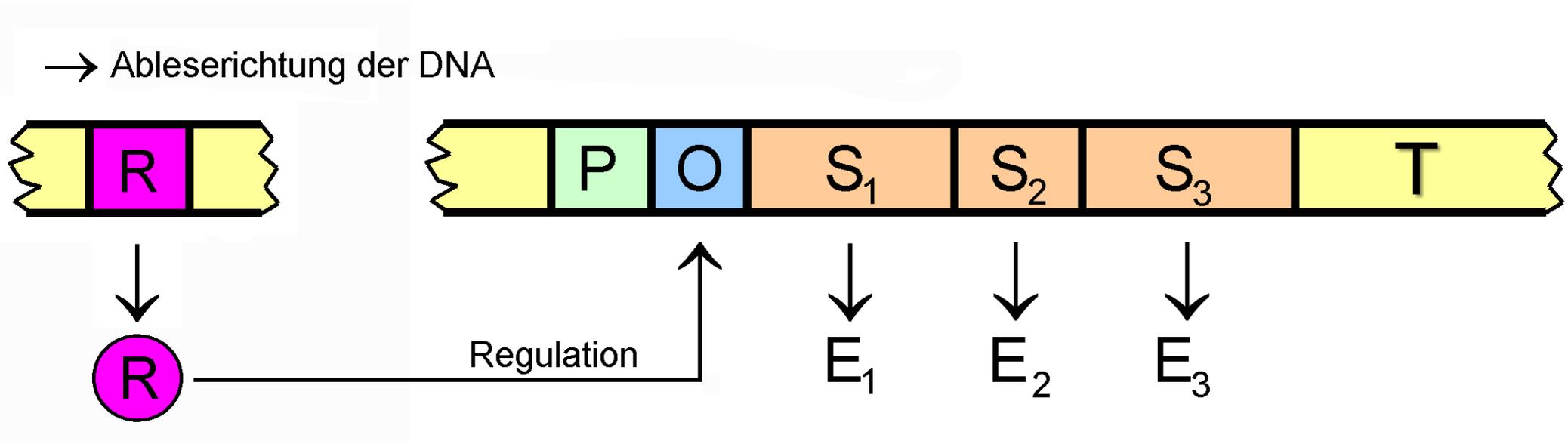
# Pontos de controle



# ***Controle transcricional***

***A ativação, desativação, aceleração ou desaceleração da expressão gênica ocorre na transcrição, evitando que todo o sistema seja acionado sem necessidade e fazendo funcionar nos locais e momentos necessários.***

# Modelo operon em procariotos



# Controles positivo e negativo

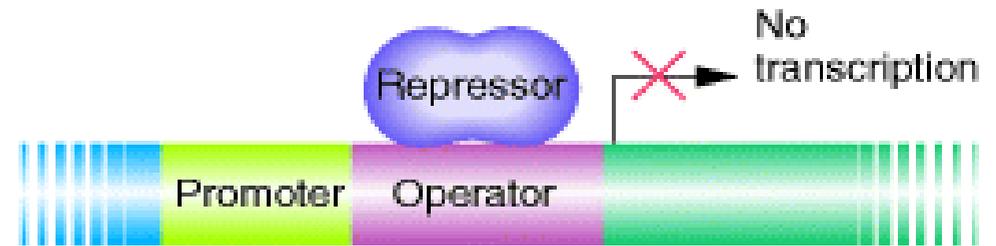
+

Positive regulation



-

Negative regulation



(No activator)



(No repressor)

# Tipos de Sistemas Reguladores da Transcrição

-Induzível

-Repressível



Tipo de proteína reguladora

-Positivo

-Negativo



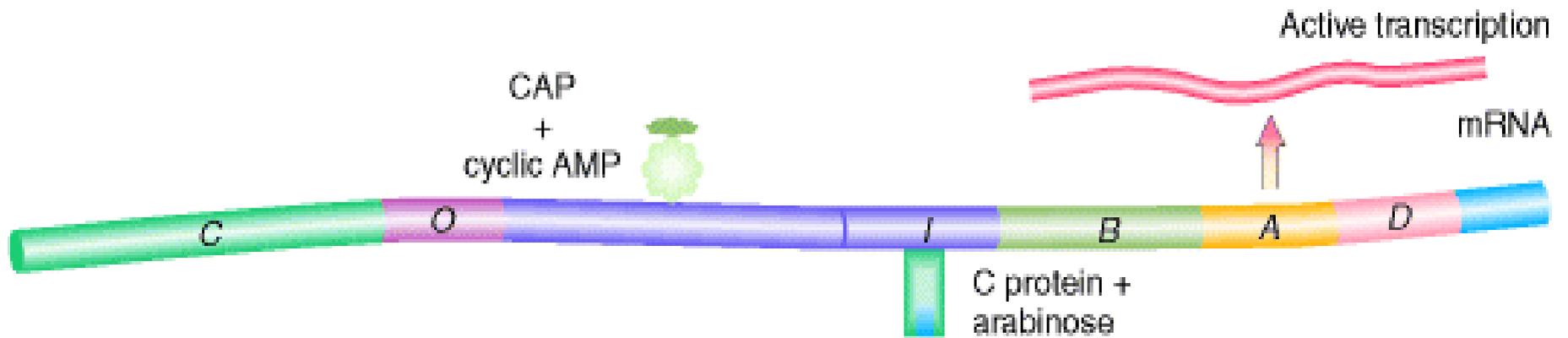
Inibir ou ativar

- 1. Operons com indução positiva**
- 2. Operons com indução negativa**
- 3. Operons com repressão positiva**
- 4. Operons com repressão negativa**

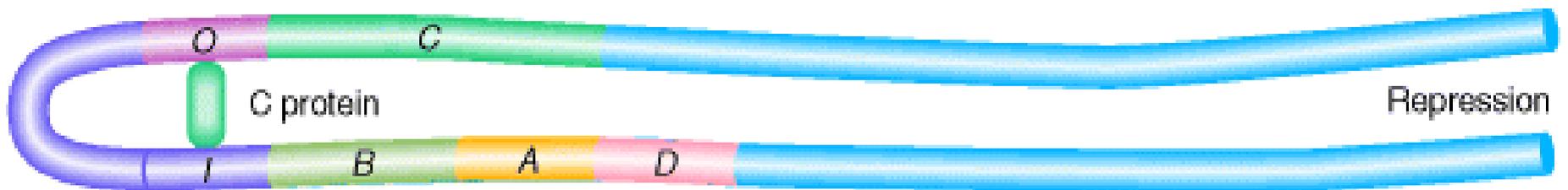
# OPERON *ara* → *E. coli* → metabolismo da arabinose

## Sistema Indução positiva

indutor → ARABINOSE

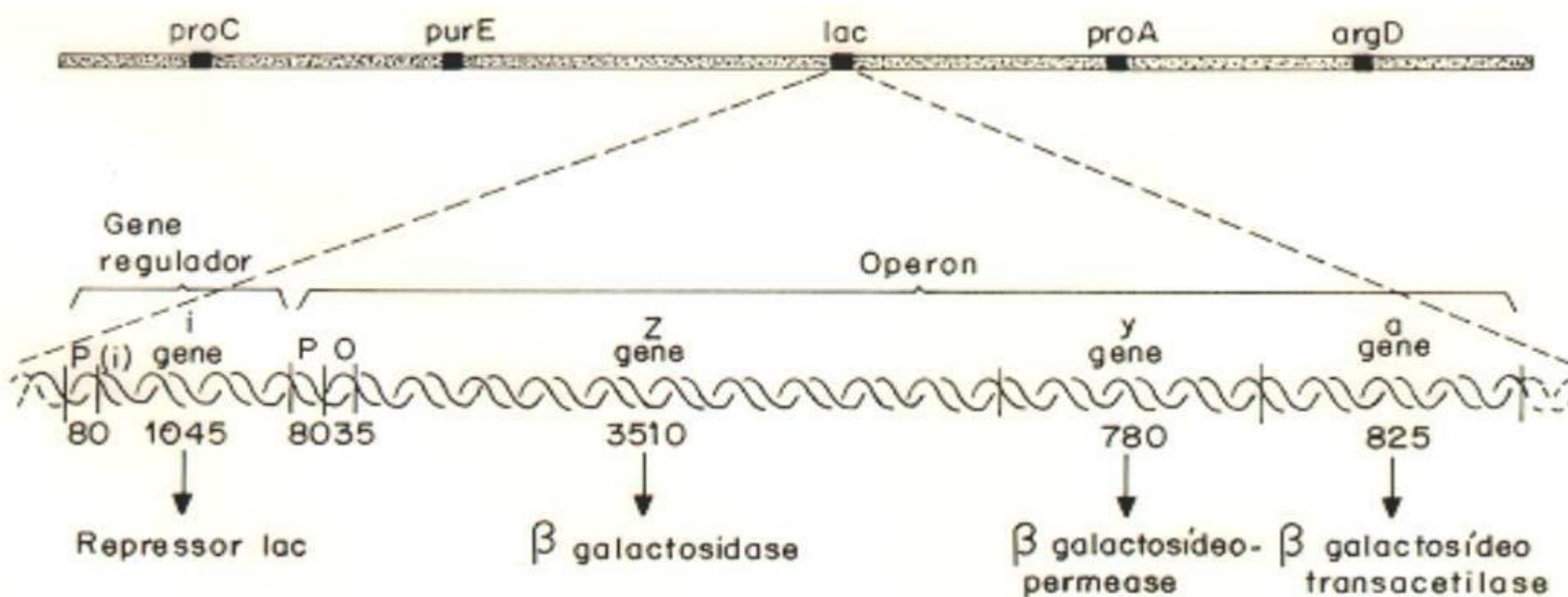


(a)

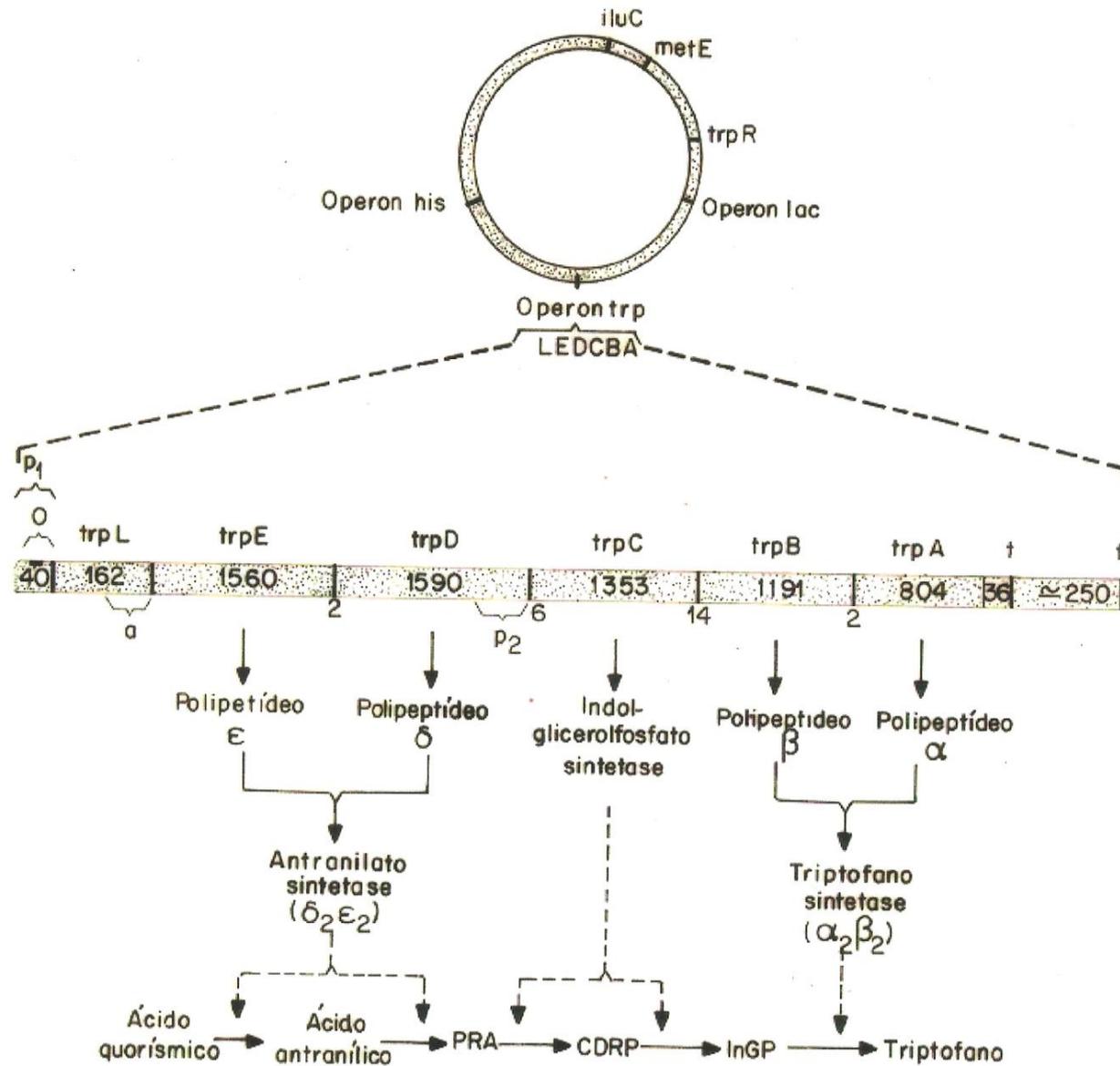


(b)

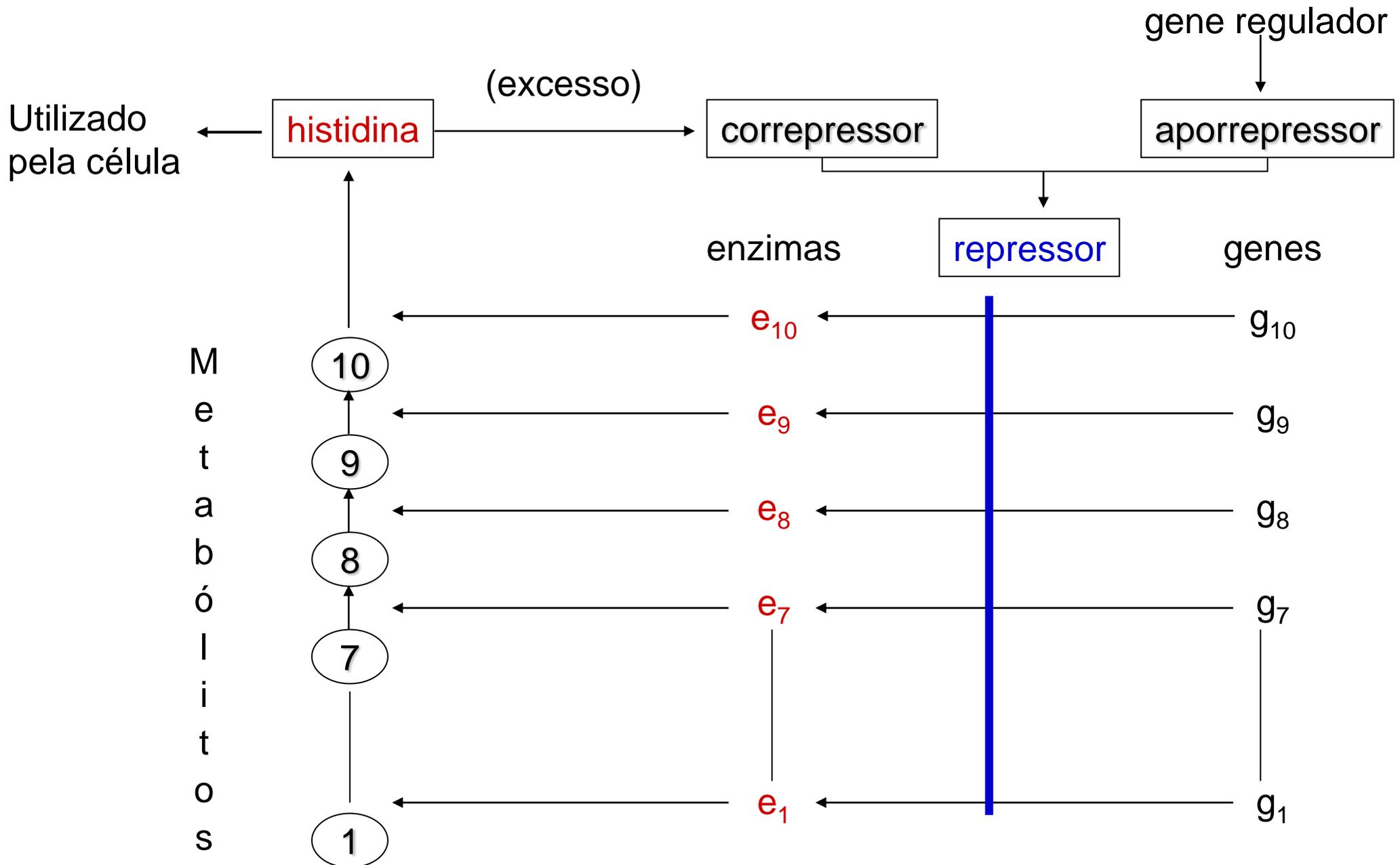
# Operon da lactose – *Indução negativa*



# Operon do Triptofano – *Repressão negativa*



# Regulação da síntese da histidina



## *Controle em outros níveis*

### *Regulação histoespecífica*

→ Mudanças somáticas em nível de estrutura do DNA ou no número de cópias do gene podem ser usadas para regular a atividade gênica;

→ A produção de uma proteína ativa pode ser regulada controlando-se o **processamento do RNA**.

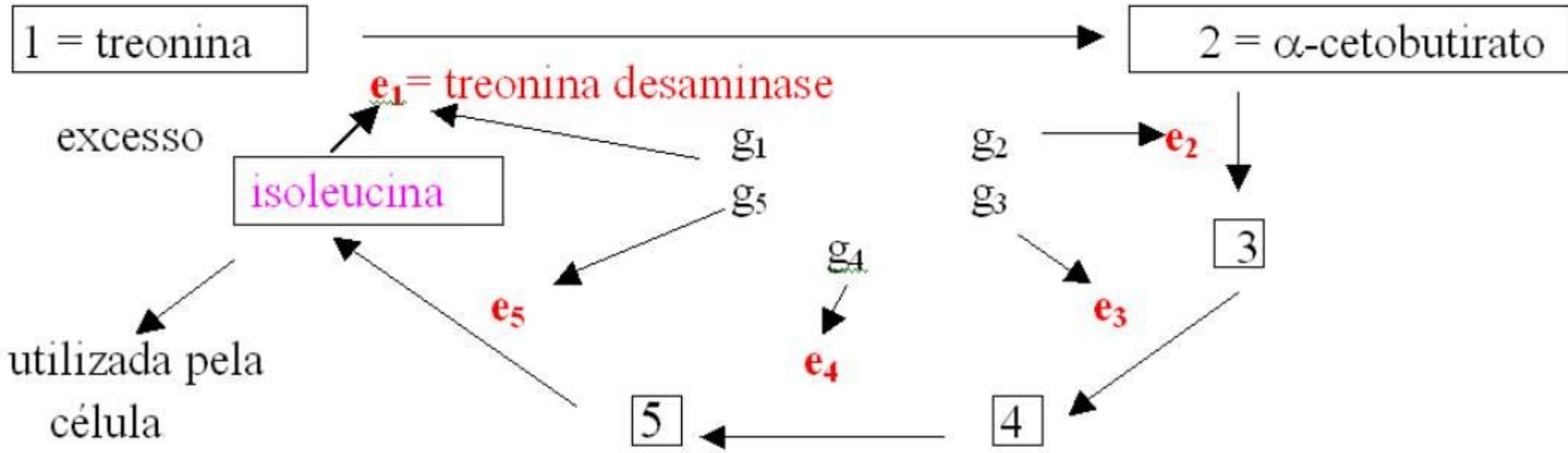
## **Controle em outros níveis**

### **Controle da tradução**

→ Instruções reguladoras também estão contidas dentro das **regiões não codificantes do mRNA**. Interação de moléculas reguladoras com sequências nas **extremidades** dos mRNAs, podem interferir na vida útil do mesmo (degradação) ou bloquear sua tradução;

→ Interferência na disponibilidade de ribossomos livres.

## Controle pós tradução (retroinibição)



## ***Regulação em eucariotos***

- Como o DNA está complexado com histonas, essas proteínas são as primeiras a estarem envolvidas no processo de regulação;
- A maioria dos genes eucarióticos é controlada no nível de transcrição;
- Os genes são maiores que dos procariontes e, às vezes, é necessária uma bateria de fatores reguladores para efetuar a regulação apropriada;

## ***Regulação em eucariotos***

→ Para que a RNA pol II realize a taxa máxima de transcrição é necessária a cooperação de inúmeras ***sequências de DNA de ação cis***, pois o promotor é incapaz de mediar uma transcrição eficiente por si mesmo;

→ Inúmeras sequências desse tipo estão próximas ao promotor e ligam-se a ***proteínas ativadoras*** que ajudam na ligação da RNA pol II ao mesmo;

## **Regulação em eucariotos**

- **Acentuadores** - sequências “*cis*” que se ligam a proteínas capazes de aumentar a taxa de transcrição;
- **Silenciadores** - sequências “*cis*” que se ligam a proteínas repressoras, inibindo as proteínas ativadoras da transcrição;
- Os **acentuadores** e **silenciadores** distam muitos milhares de pares de bases do operador e a maioria dos modelos inclui algum tipo de dobra do DNA;

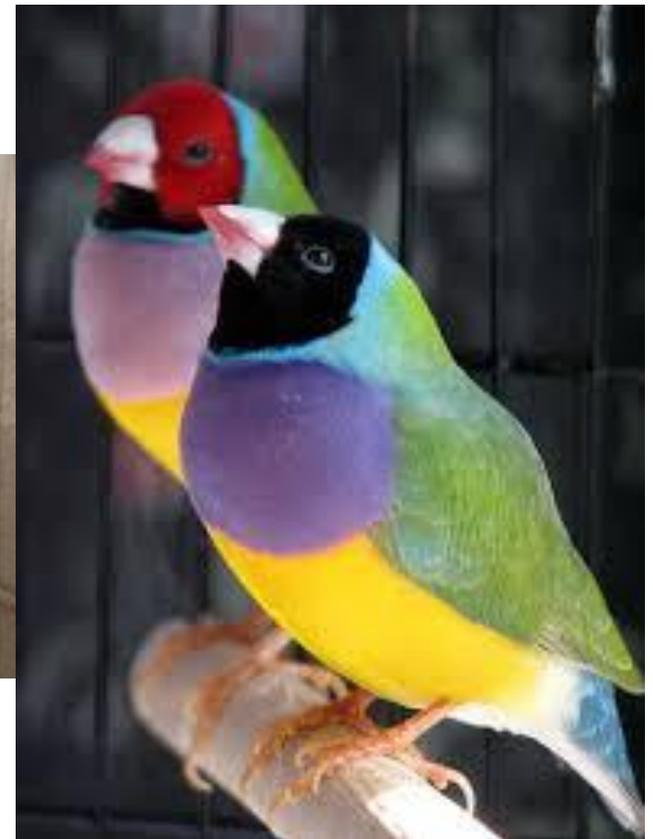


## ***Regulação em eucariotos (Exemplo)***

→ Em levedura a ***proteína HSTF*** (fator de transcrição) é fosforilada quando as células são expostas a altas temperaturas, passando à sua forma ativa, ligando-se à sequência de DNA adjacente aos promotores dos genes “***heat shock***”, promovendo sua transcrição.









# ***SEQUENCIAMENTO DO DNA***

# ***Sequenciamento do DNA***

⇒ Método de Fred Sanger – baseado na síntese de DNA na presença de didesoxirribonucleotídeos, que não possuem o grupo hidroxila no carbono 3’;

⇒ Os didesoxirribonucleotídeos terminam a síntese quando incorporados à cadeia crescente;

# Sequenciamento do DNA

Os passos são os seguintes:

1. Obtenção de uma população de fragmento unifilamentares (DNA desnaturado) definido;

5' **ATCGCCAAGGCCTTT** 3'

2. Marcação em uma ponta com um primer, com marcação radioativa ou fluorescente (emissor de cor diferente para cada reação);

5' **ATCGCCAAGGCCTTT** 3'  
AAA 5'

3. Estabelecimento de quatro tubos (recipientes) de reação gerando conjunto de moléculas que diferem em tamanho por uma base, que podem ser separadas por eletroforese;

# Sequenciamento do DNA

a)  $ddATP + A, G, C \text{ e } T$

3' **A**GCGGTTCCGGAAA 5'

3' **T**AGCGGTTCCGGAAA 5'

c)  $ddCTP + A, G, C \text{ e } T$

3' **C**GGAAA 5'

3' **C**CGGAAA 5'

3' **C**GGTTCCGGAAA 5'

b)  $ddTTP + A, G, C \text{ e } T$

3' **T**CCGGAAA 5'

3' **T**TCCGGAAA 5'

3' **T**AGCGGTTCCGGAAA 5'

d)  $ddGTP + A, G, C \text{ e } T$

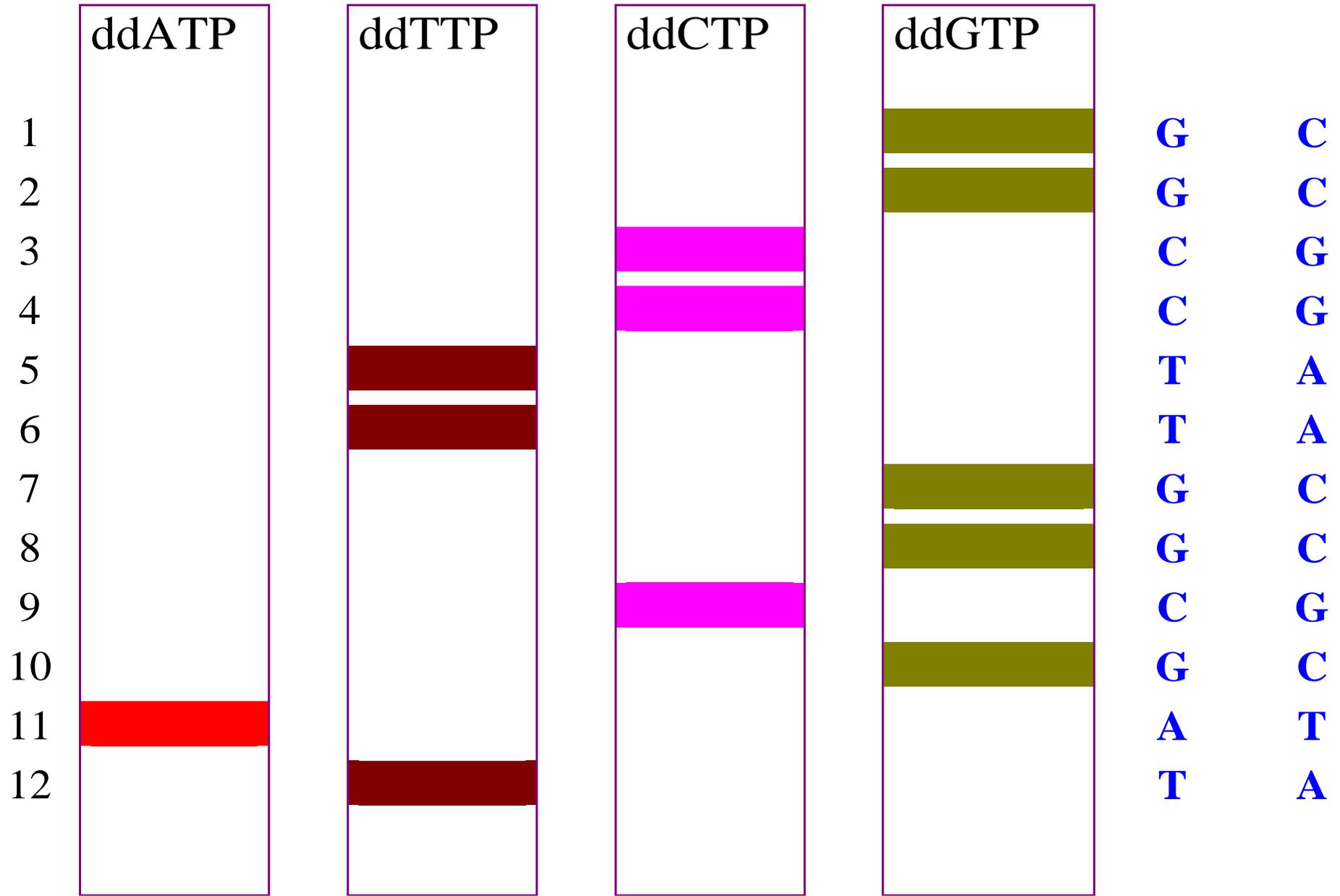
3' **G**AAA 5'

3' **G**GGAAA 5'

3' **G**TTCCGGAAA 5'

3' **G**GGTTCCGGAAA 5'

3' **G**CGGTTCCGGAAA 5'





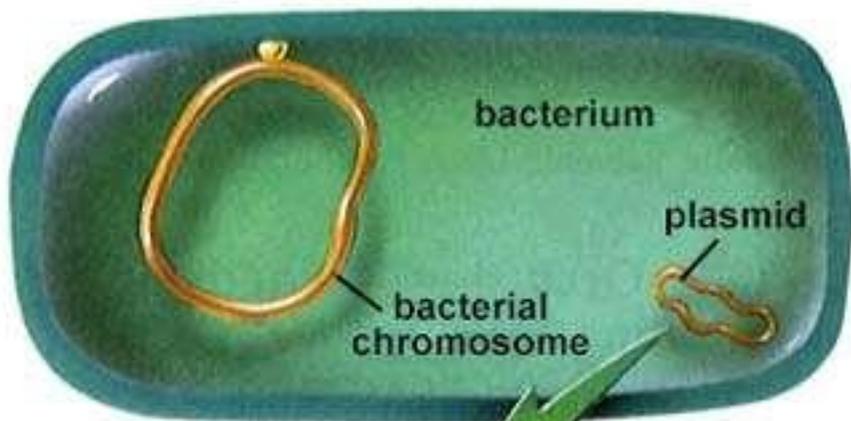
**RECOMBINAÇÃO**  
**EM**  
**MICROORGANISMOS**

# ***RECOMBINAÇÃO EM MICRORGANISMOS***

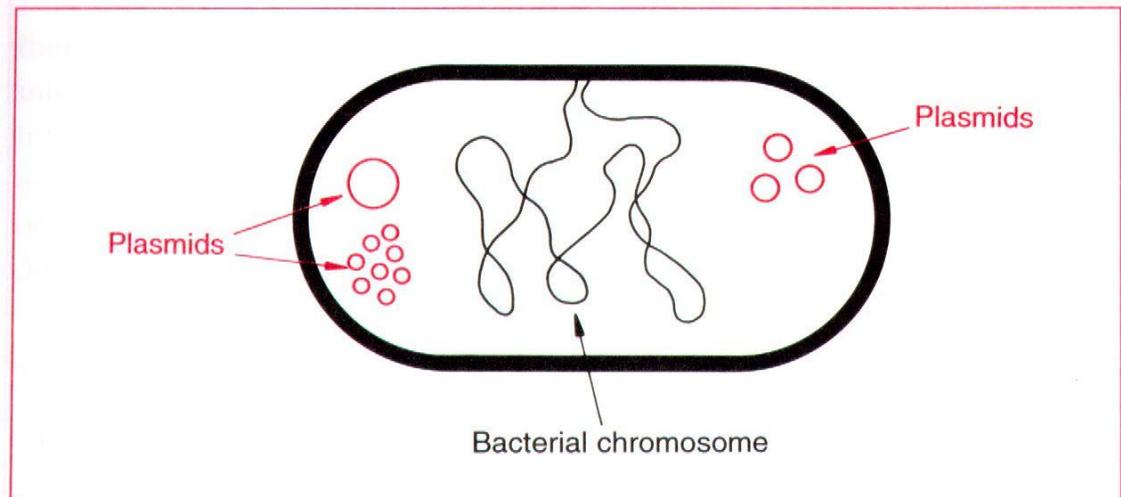
**-Organismos haplóides, alguns com duas fases de vida;**

***Bactérias, cianofíceas e bacteriófagos* → cromossomo simples não complexados por histonas e sem membrana nuclear;**

***Plasmídeo* → DNA bacteriano circular extra, capaz de se autoduplicar e se inserir no cromossomo bacteriano.**



1  $\mu$ m

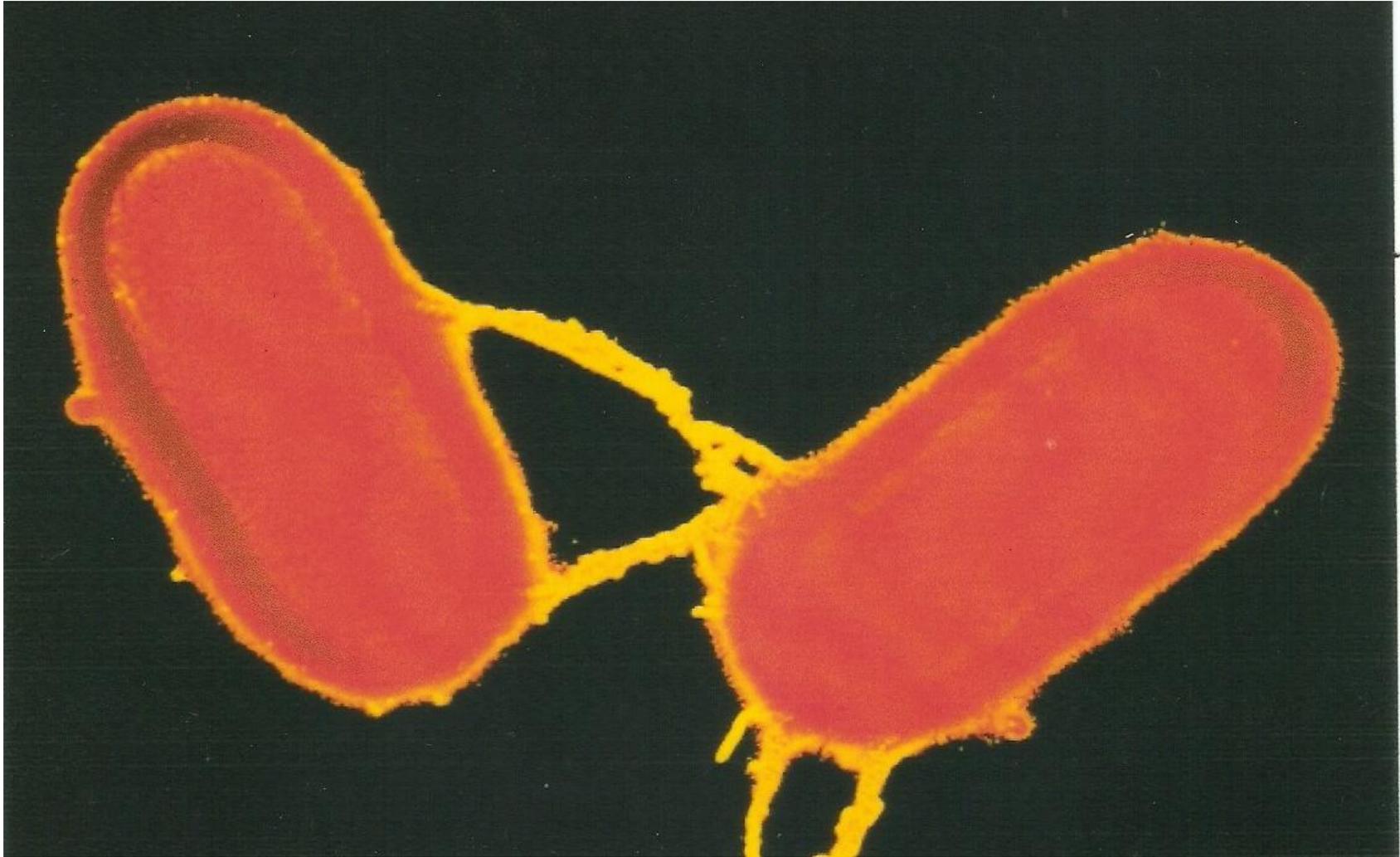


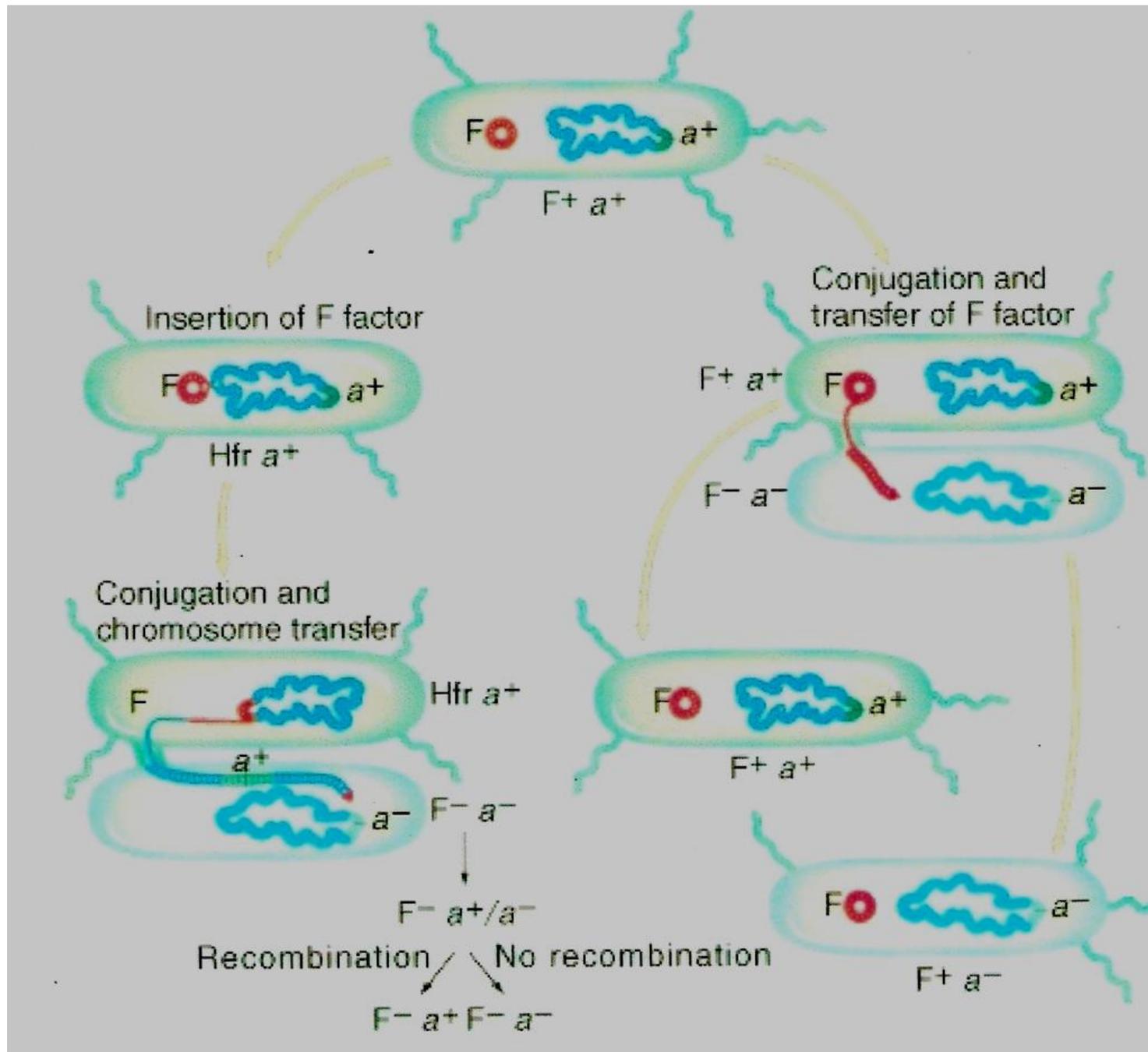
## *Recombinação em bactérias*

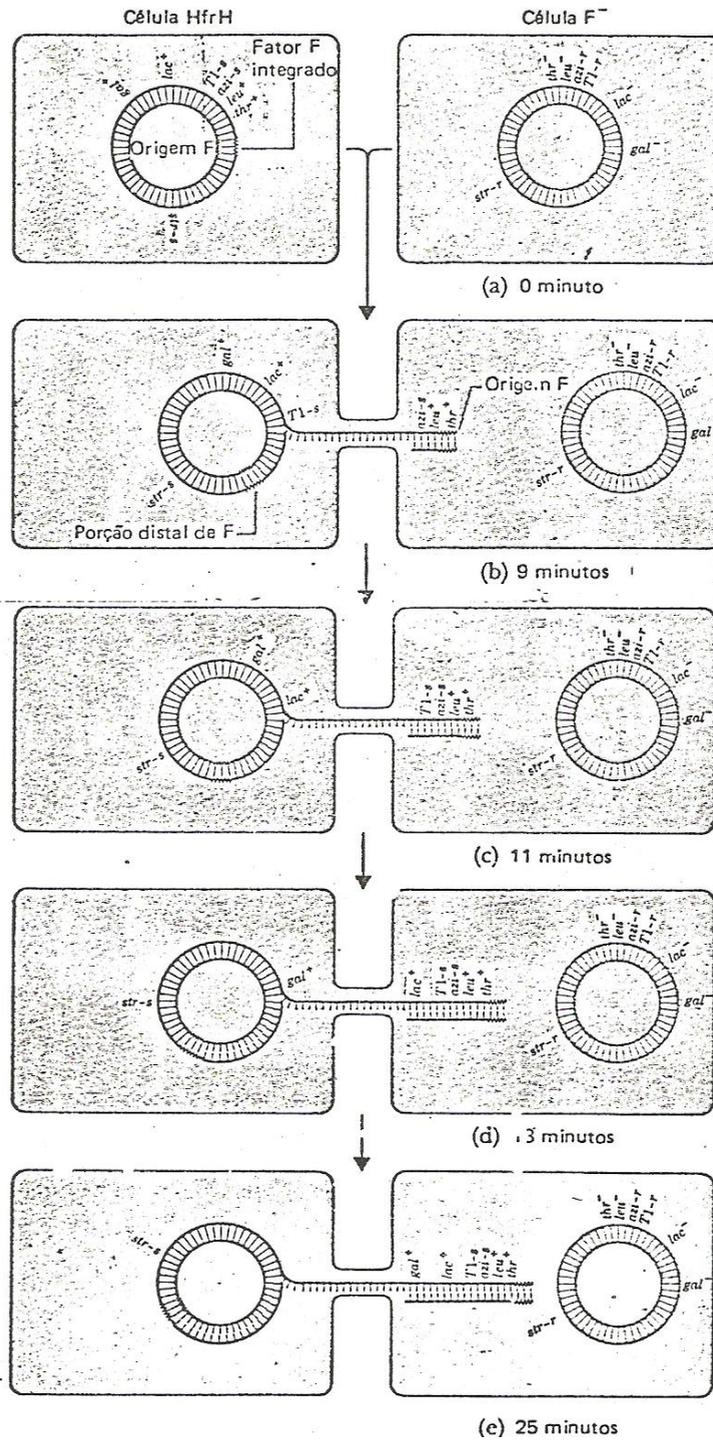
1. **Conjugação** : transferência unidirecional de material genético por contato celular;

→ Os passos são: contato celular, transferência, pareamento (merozigoto), integração;

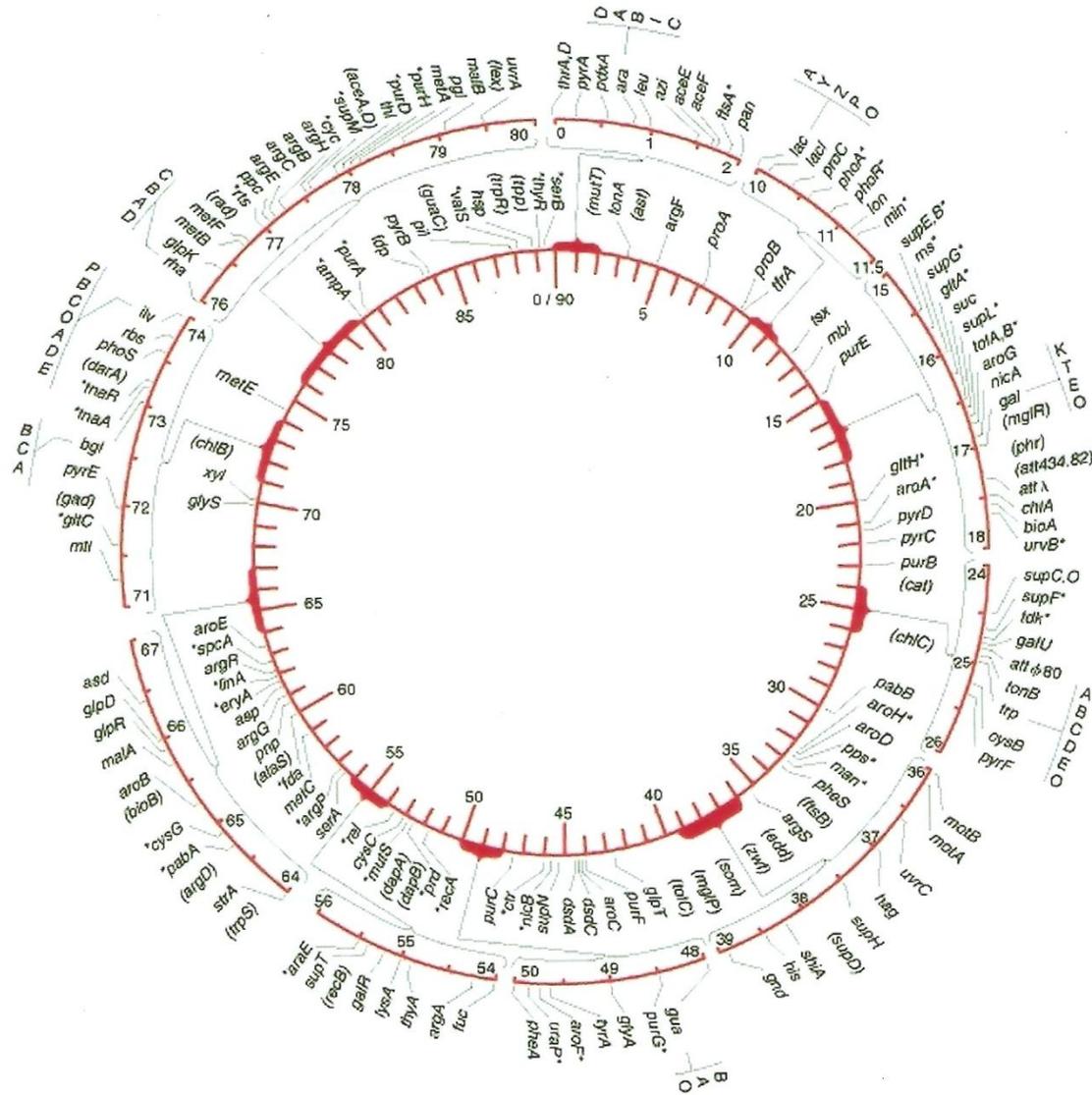








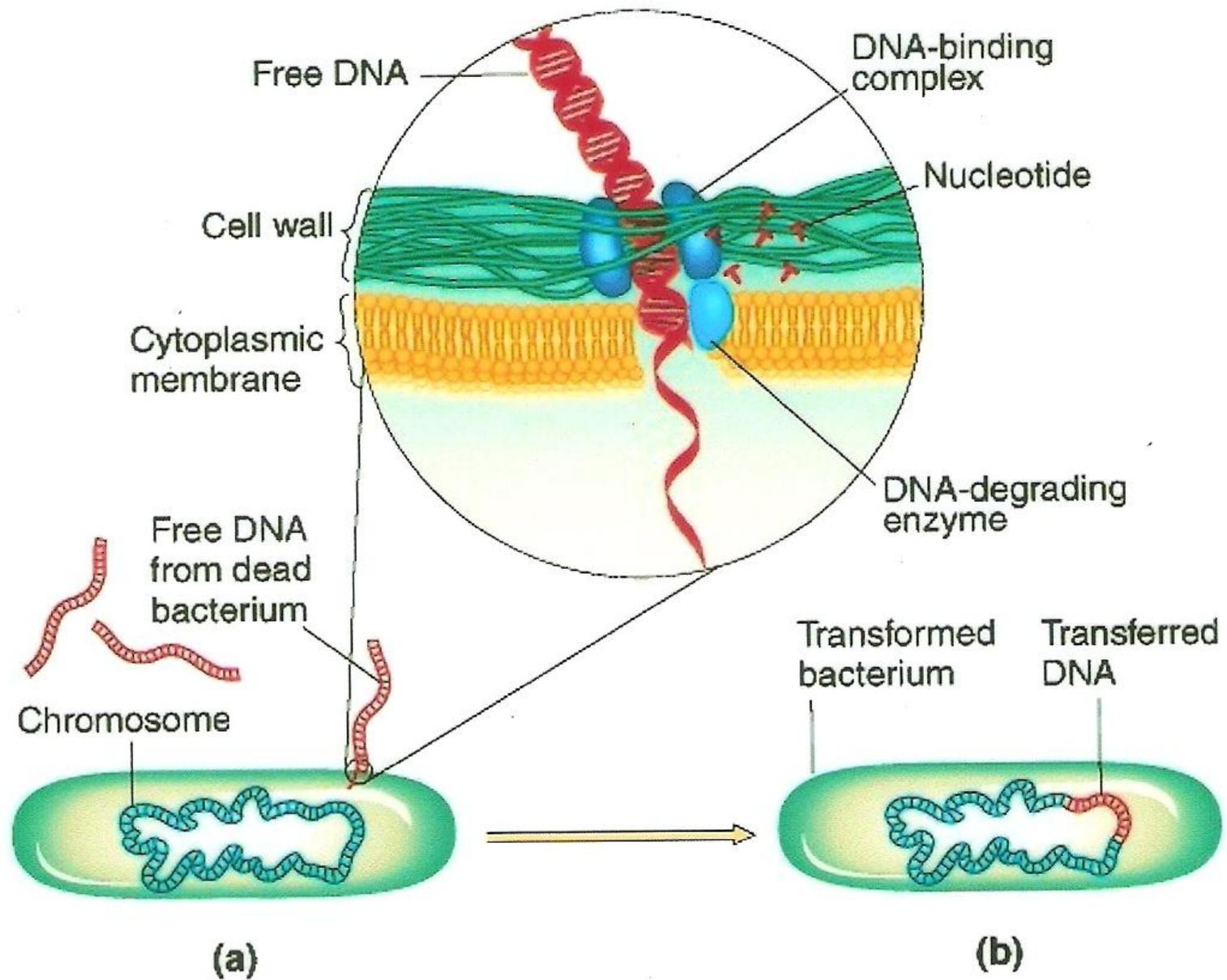
## MAPA GENÉTICO DE *E. coli* (1963) COM BASE EM CONJUGAÇÃO INTERROMPIDA

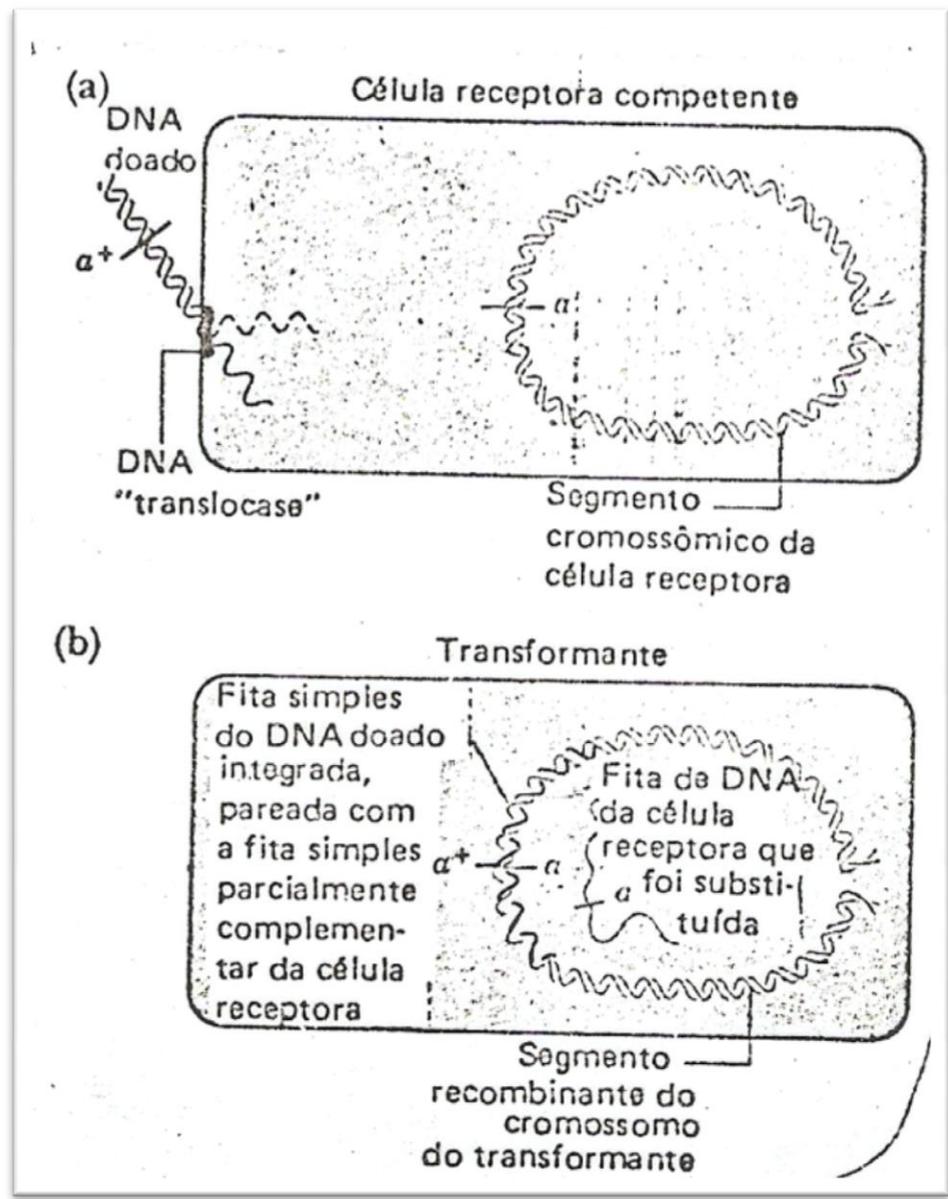




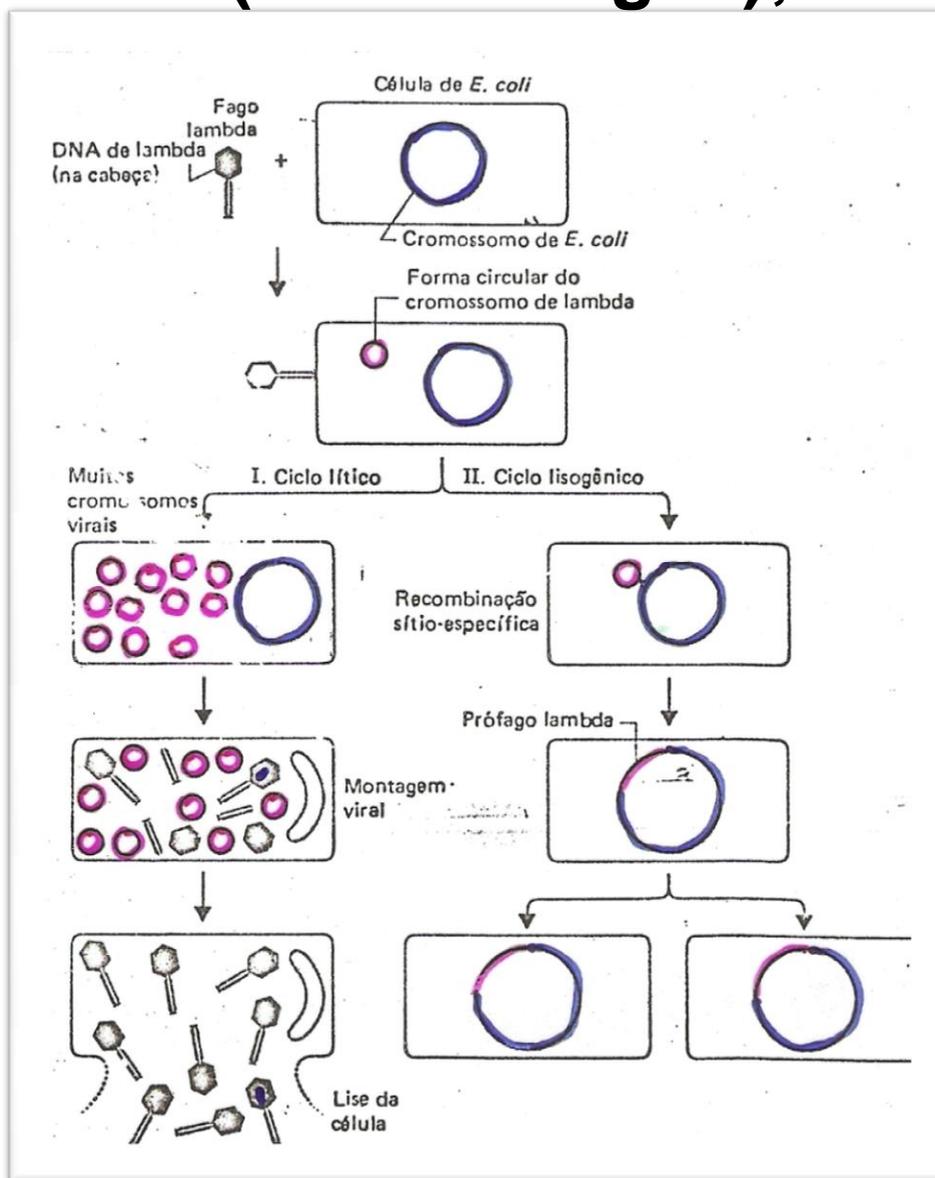
2. ***Transformação***: transferência de material genético exógeno livre (do meio);

- Os passos são: extração (liberação), contato, entrada, pareamento, integração;





### 3. **Transdução** : transferência de DNA de uma célula para outra por vírus (bacteriófagos);

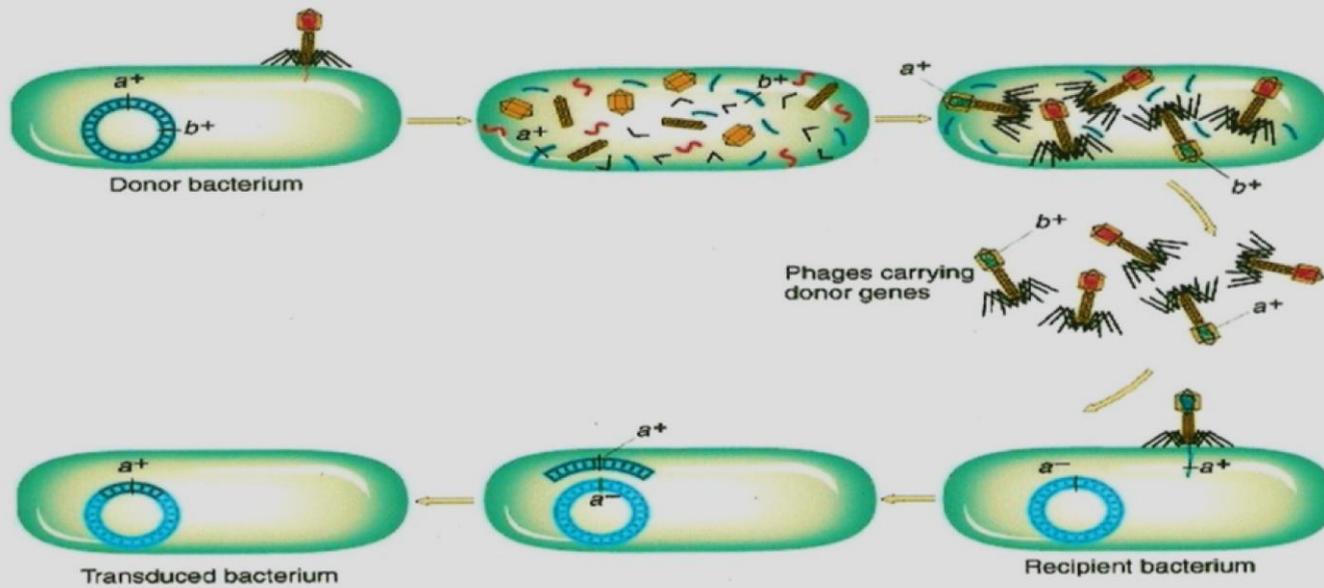




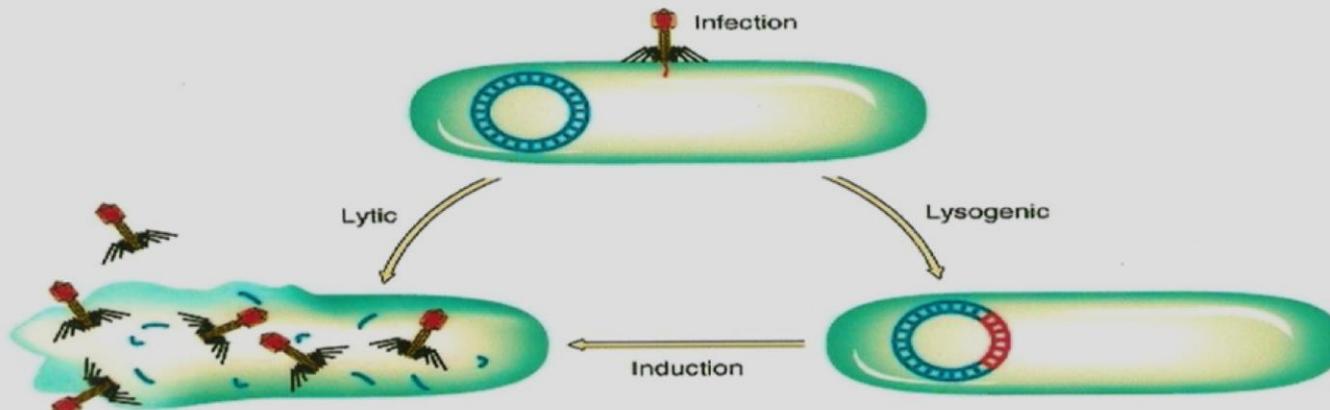
***Transdução generalizada*** – fragmentos cromossômicos aleatórios são incorporados às cabeças de alguns fagos e transferidos a outras células por infecção;

***Transdução especializada*** – genes específicos, próximos aos sítios de integração do fago no cromossomo bacteriano são erroneamente incorporados ao genoma do fago e transferidos para outras bactérias por infecção.

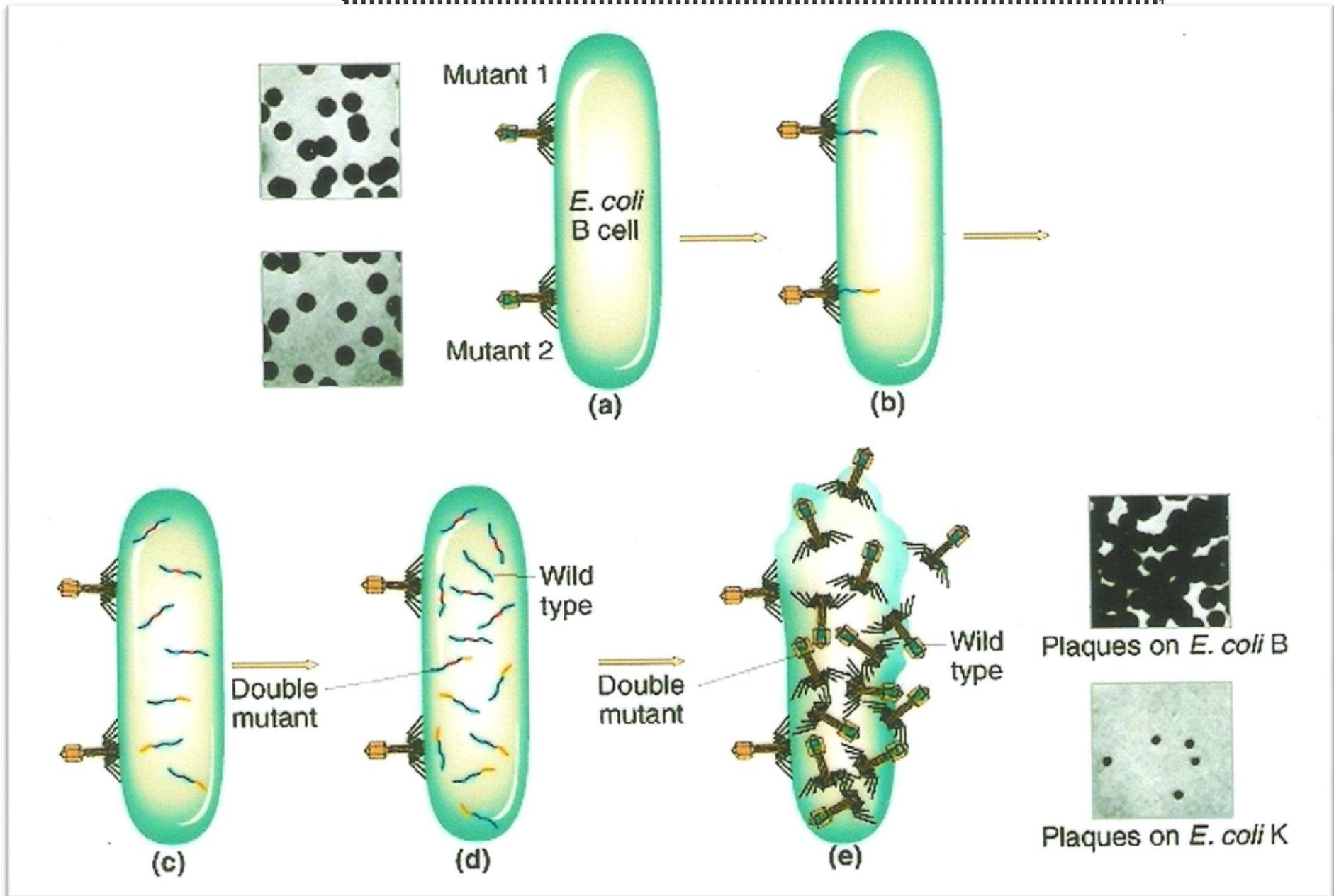
## TRANSDUÇÃO GENERALIZADA



## TRANSDUÇÃO ESPECIALIZADA



# Recombinação em virus

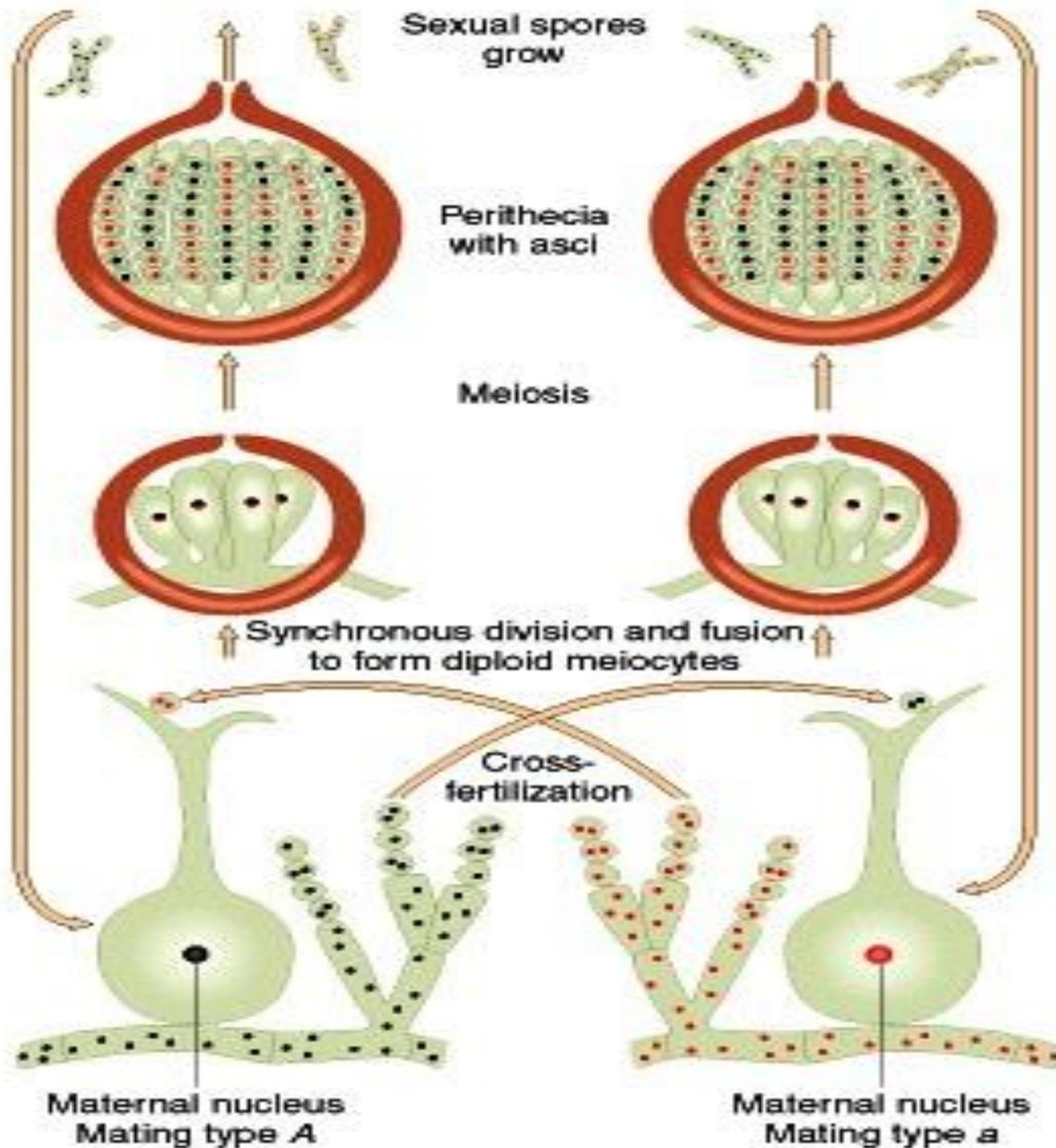


- **ciclo parassexual (heterocariose e haploidização);**
- **permuta mitótica.**
- **ciclo sexual;**

## *Ascosporos de Neurospora*



# Meiose inicial ou zigótica (Neurospora)





***NOÇÕES DE  
ENGENHARIA  
GENÉTICA***

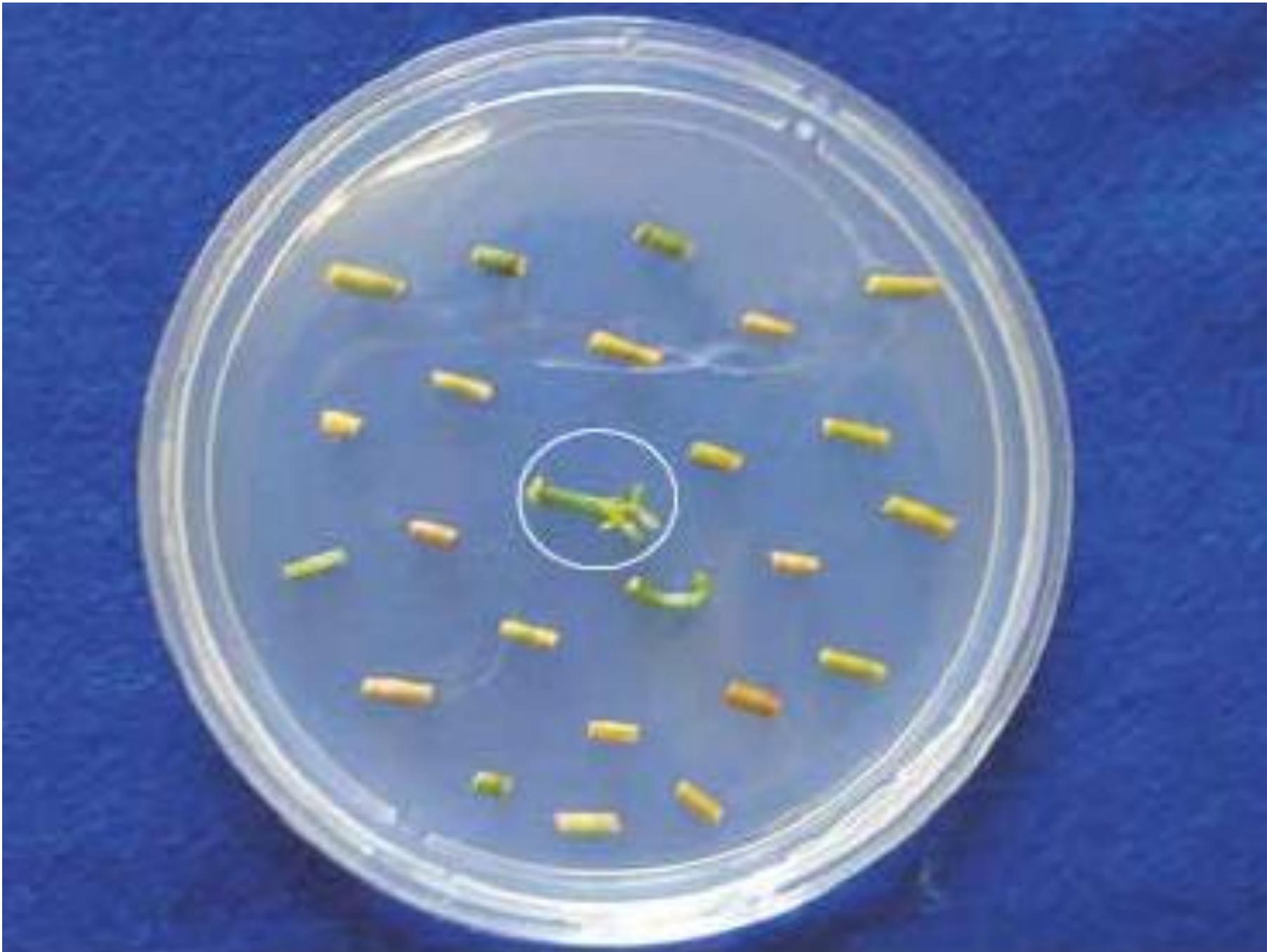
## ***Biotecnologia***

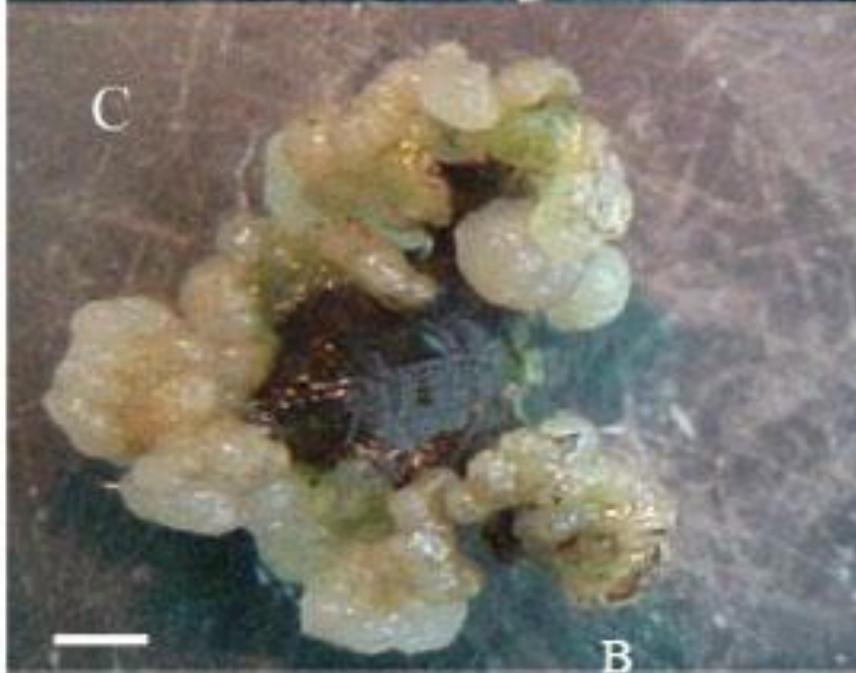
**Utilização de organismos no desenvolvimento de novos produtos e processos para a alimentação, saúde e preservação do ambiente.**

### ***Algumas técnicas biotecnológicas***

#### **Cultura de tecidos**

**Multiplicação celular a partir de um “pedaço de tecido” de um organismo.**





Bars = 0.25 cm.

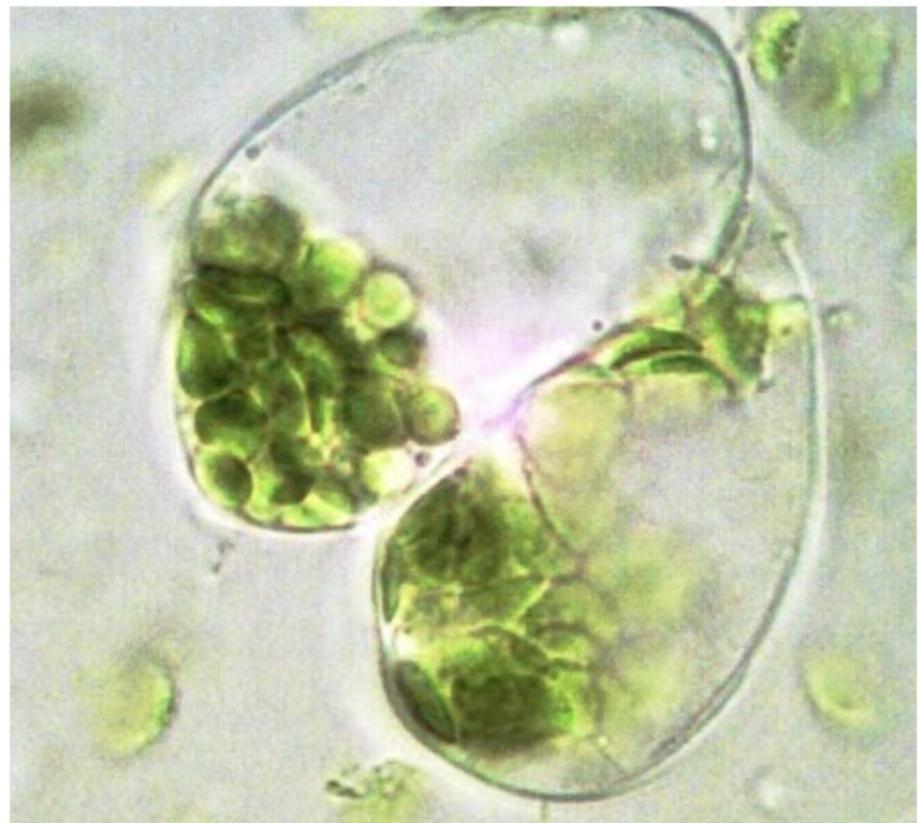
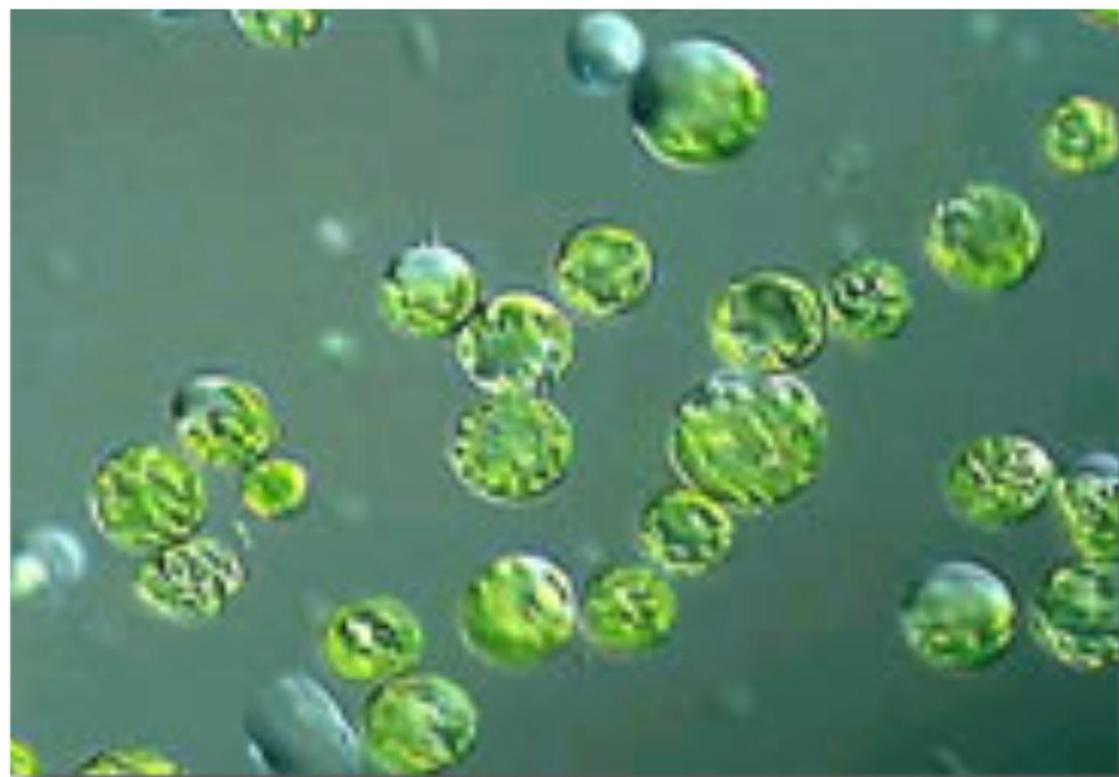




## ***Protoplastos***

**Células vegetais ou de microrganismos, sem a parede celular, que foi digerida enzimaticamente.**

## ***Cultura de protoplastos***



## ***Engenharia genética (Técnica do DNA recombinante)***

**Processo de criação de novas combinações gênicas pela manipulação direta do DNA;**

### ***Finalidades principais***

**Isolamento, modificação e construção de genes;**

**Introdução de genes em organismos;**

**Transferência de genes de uma espécie para outra (transformação);**

**Manipulação de genes e reintrodução na mesma espécie.**

## *Transgênicos (OGMs)*

Organismos que contenham material genético (DNA) construído artificialmente, modificado ou retirado de outra espécie, ou seja, que sofreu um processo de transformação.

### *Protocolo geral resumido para produzir um transgênico*

- Identificação do gene em um doador ou construção;
- *Clonagem* do gene em hospedeiro intermediário;
- Caracterização do gene no hospedeiro intermediário;
- Modificação do gene se for o caso;
- Introdução no hospedeiro alvo (transformação);

## *Clonagem de genes*

Obtenção do fragmento de DNA (gene desejado) e colocação em um hospedeiro intermediário.

## Ferramentas

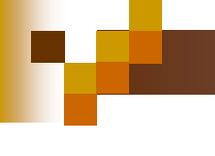
### *Enzimas de restrição*

Ferramenta cuja descoberta deu início a tudo;

*São enzimas que cortam o DNA em regiões específicas (normalmente sequências palindrômicas).*

.....CTGCAG.....

.....GACGTC.....



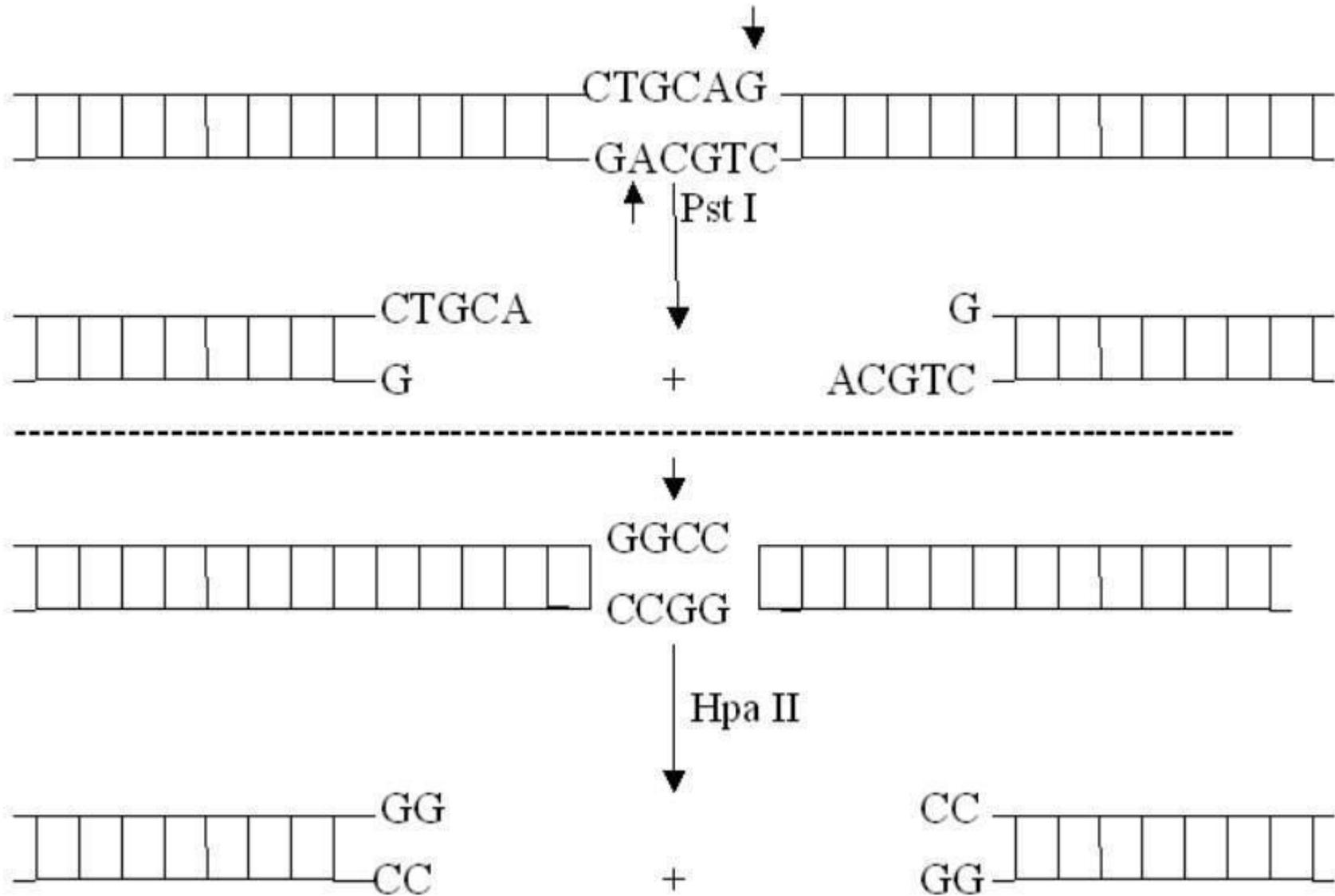
---

***Enzimas******Sítio de clivagem******Origem***

---

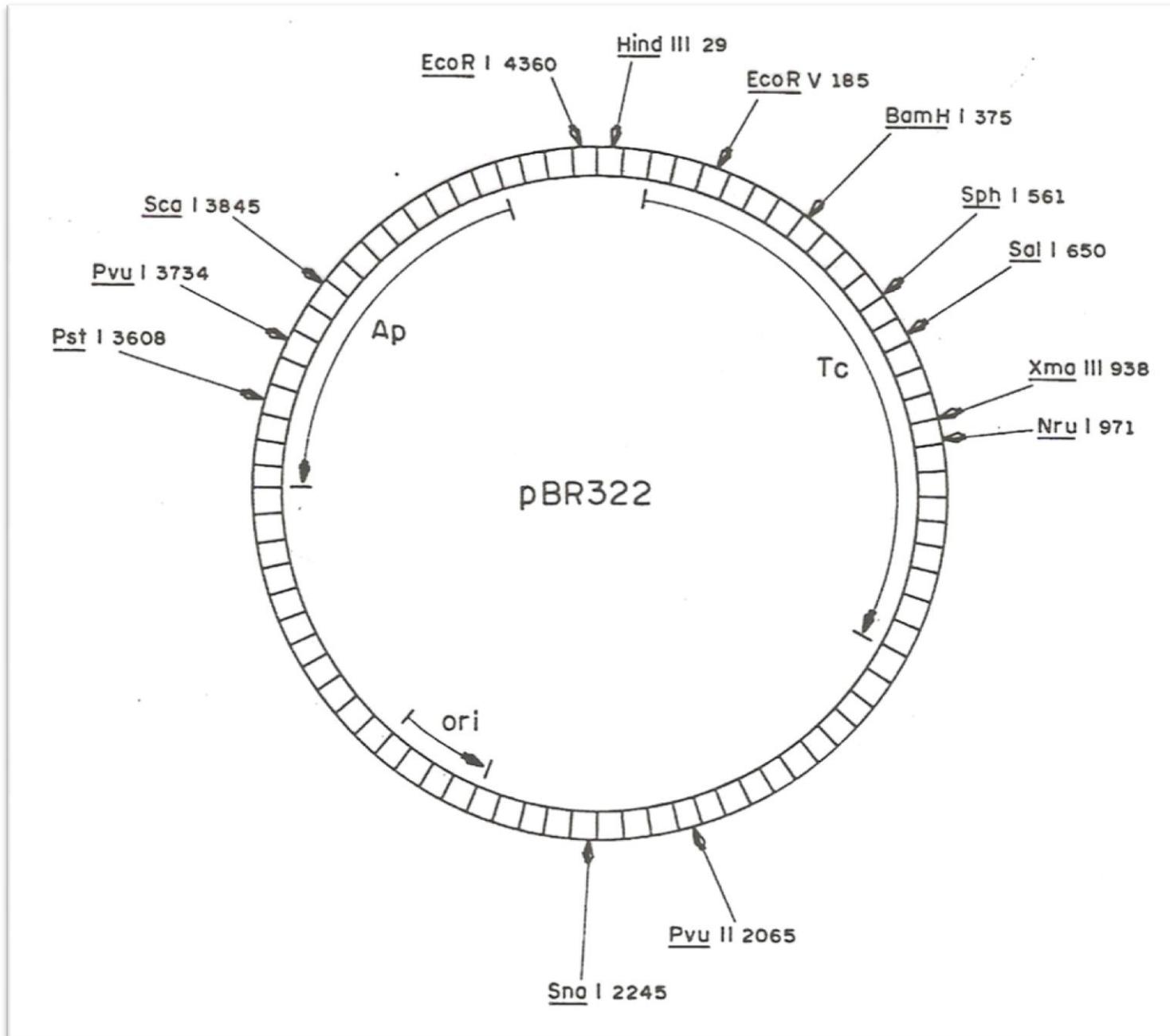
BAM HI	GGATCC	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Eco RI	GAATTC	<i>Escherichia coli</i>
Eco RII	GCCTGGC	<i>Escherichia coli</i>
Sal I	GTCGAC	<i>Streptomyces albus</i>
Pst I	CTGCAG	<i>Providência stuarti</i>
Hind III	AAGCTT	<i>Haemophilus influenzae</i>
Hae III	GGCC	<i>Haemophilus aegyptius</i>
Hpa II	CCGG	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>
Sma I	CCCGGG	<i>Serratia marcescens</i>
Bgl II	AGATCT	<i>Bacillus globiggi</i>

---



***Mapa de restrição*** – mapa de um trecho cromossômico ou de DNA, indicando os sítios de clivagem de uma ou mais enzimas de restrição.

# Mapa de restrição do Plasmídeo pBR 322



## ***Outras ferramentas***

- **DNA polimerase I**;
- **DNA ligase** – algumas podem ligar até DNAs de pontas retas;
- **Transcritase reversa** – faz DNA a partir de RNA;
- **Desoxinucleotidil transferase terminal** – adiciona desoxirribonucleotídeos nas extremidades do DNA;
- **Vetores** – moléculas de DNA de replicação autônoma, que levará o gene obtido para um hospedeiro intermediário e algumas vezes para o hospedeiro final. Normalmente são DNAs virais ou ***plasmídeos***;

## ***Plasmídeo pBR 322***

**Um dos vetores mais utilizados;**

**Possui genes para resistência à ampicilina e à tetraciclina que são usados como marcadores;**

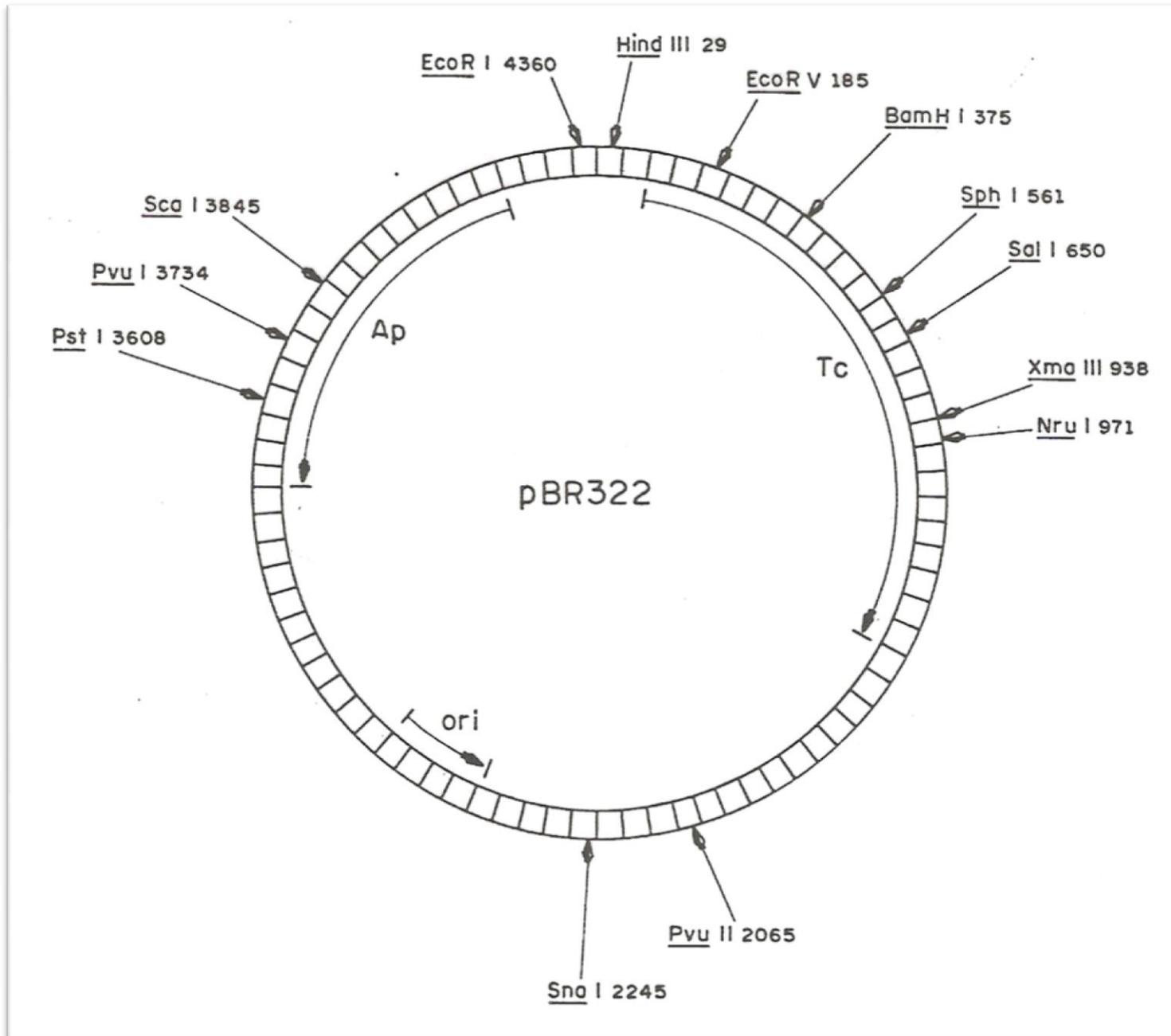
**Possui a região ori de *E. coli*;**

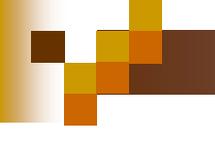
**Possui sítios de restrição bem conhecidos, muitos que cortam os genes da ampicilina e tetraciclina.**

## ***Plasmídeo Ti de Agrobacterium tumefaciens***

**Usado para transformação do hospedeiro alvo.**

# Plasmídeo pBR 322





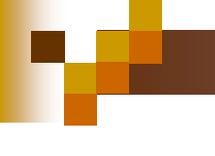
## ***Plasmídeo pUC***

**Possui uma parte do gene de  $\beta$ -galactosidase, cujo produto protéico converte o substrato x-gal em corante azul;**

**Possui um sítio de clonagem múltipla no meio desse gene;**

## ***Cosmídeos***

**Vetores híbridos de fago  $\lambda$  e plasmídeos, podendo se replicar na célula como um plasmídeo e também ser embalado como o de um fago. Podem levar DNA com até 45 kb;**



## ***Vetores de expressão***

**Maioria dos vetores não expressa o gene exógeno;**

**Para haver expressão o gene deve ser inserido próximo a sinais bacterianos apropriados de transcrição e tradução (região reguladora de *lac*, por exemplo);**

**Sequências devem ser livres de íntrons, que não são processados pelas bactérias**

## ***Hospedeiros intermediários***

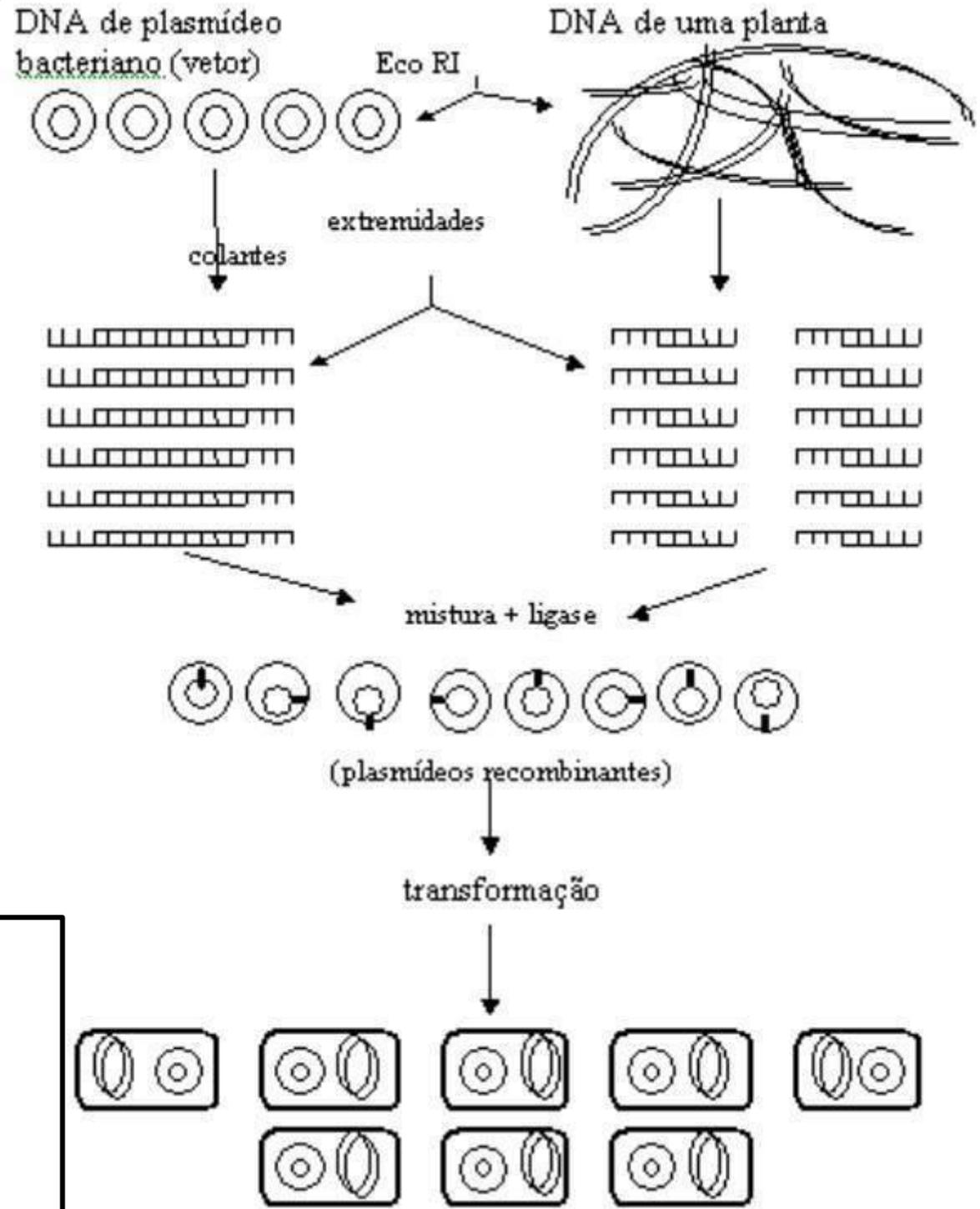
**Usados para multiplicar e armazenar o DNA clonado. Normalmente são **bactérias** ou **vírus**;**



## ***Obtenção do segmento de DNA (gene desejado)***

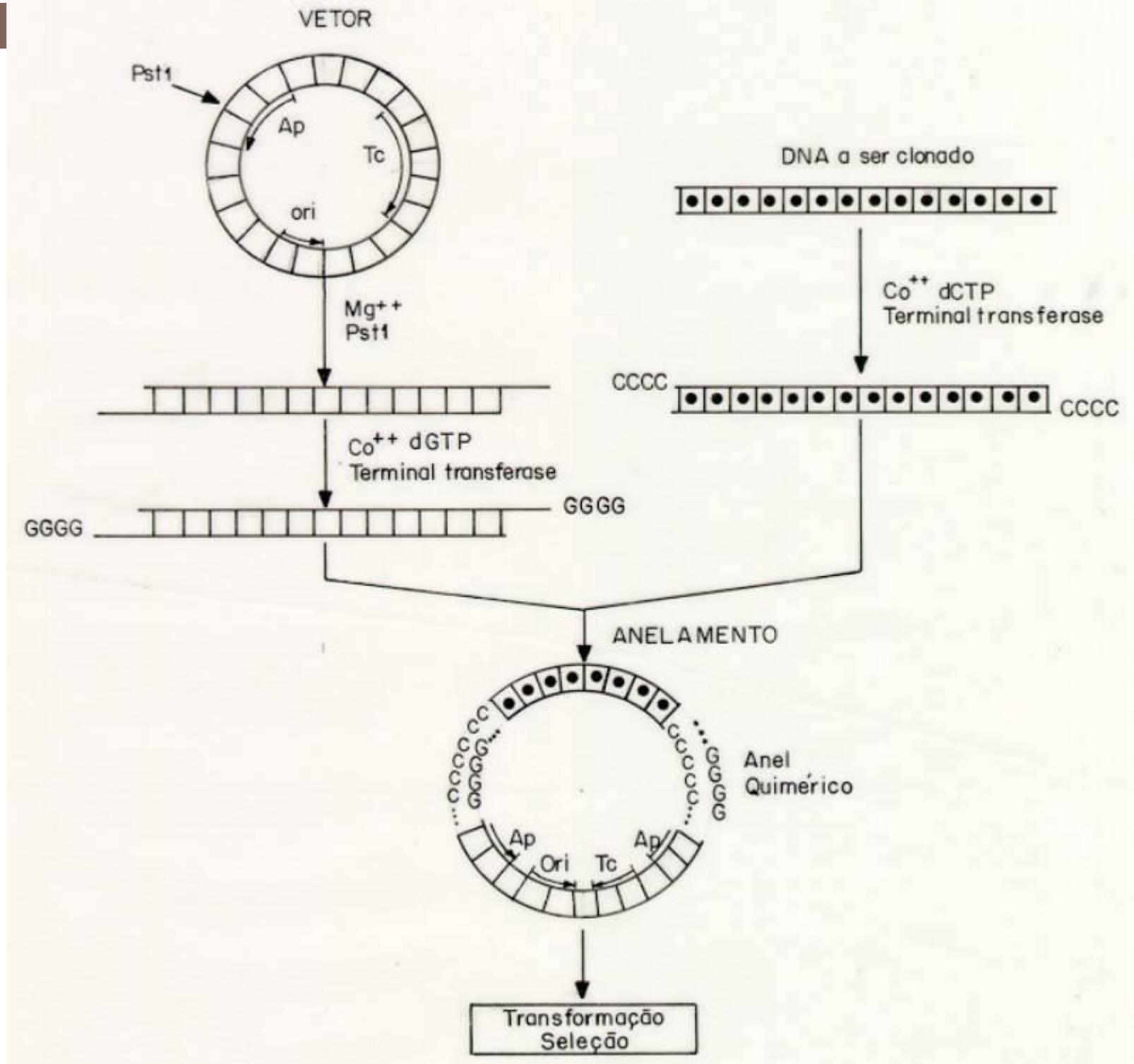
**Enzimas de restrição, Síntese química, Metodologia do cDNA (DNA complementar ao RNA).**

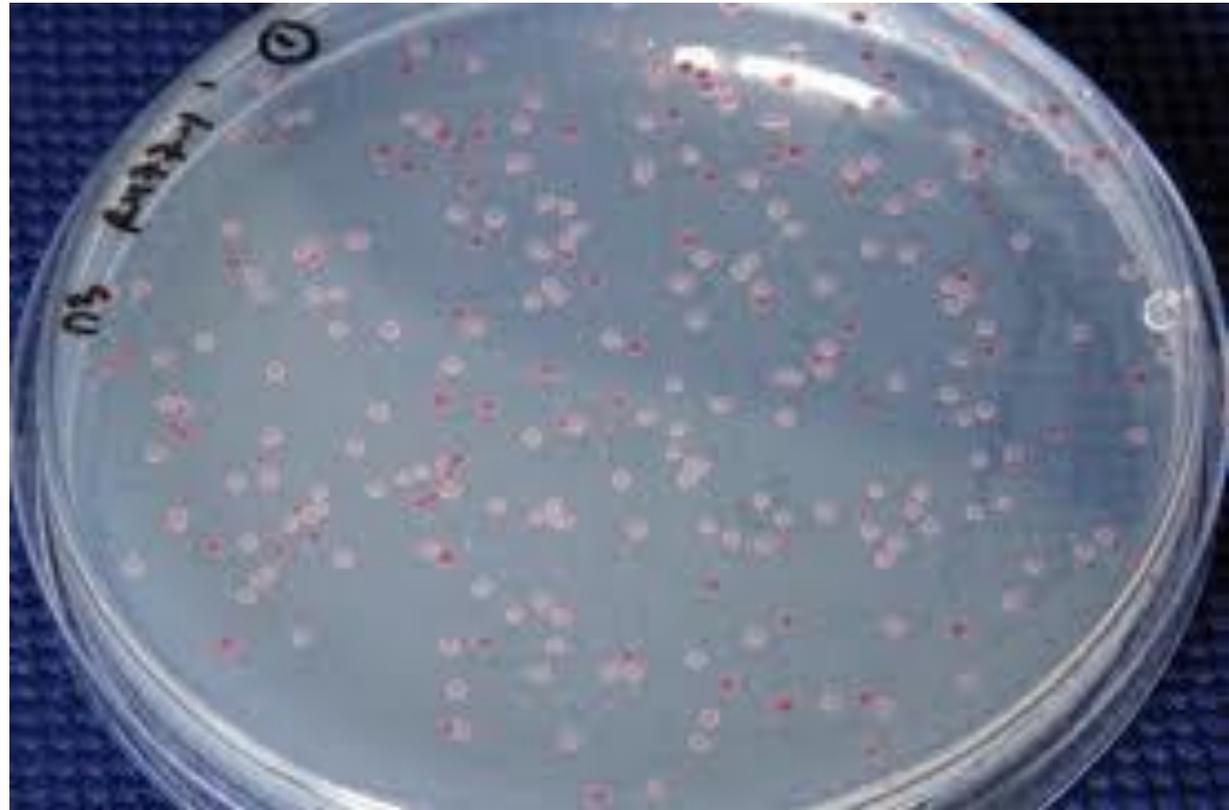
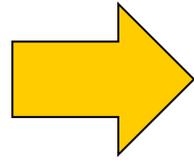
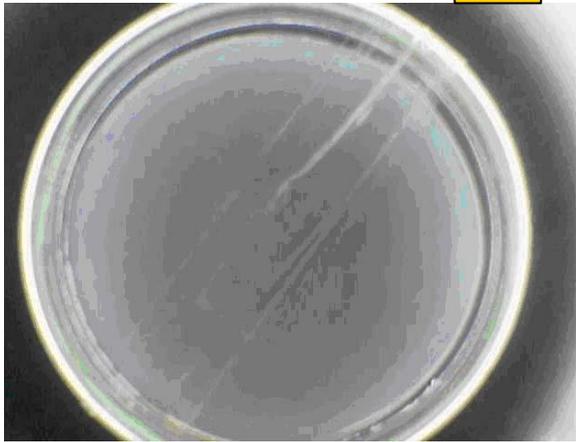
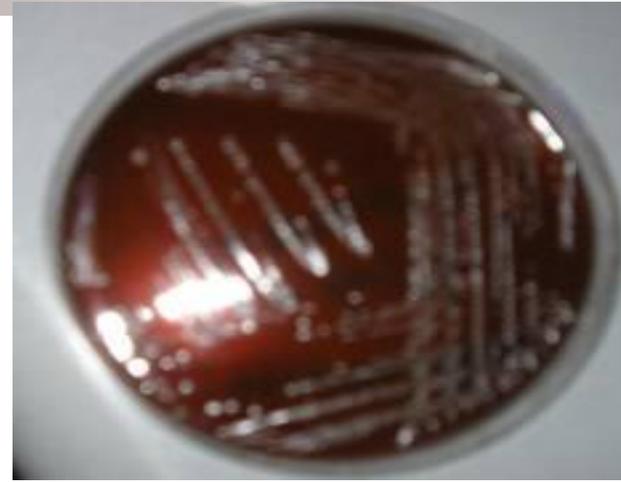
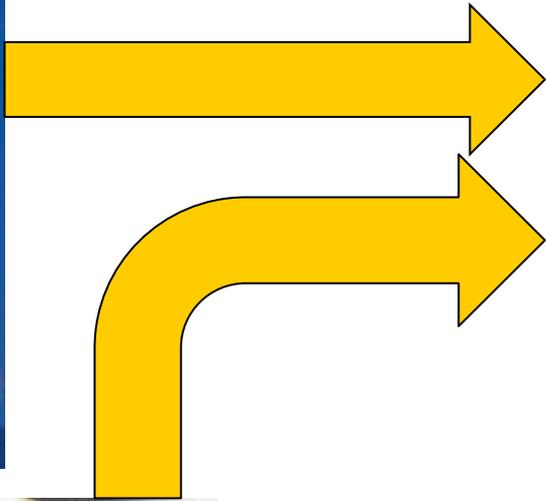
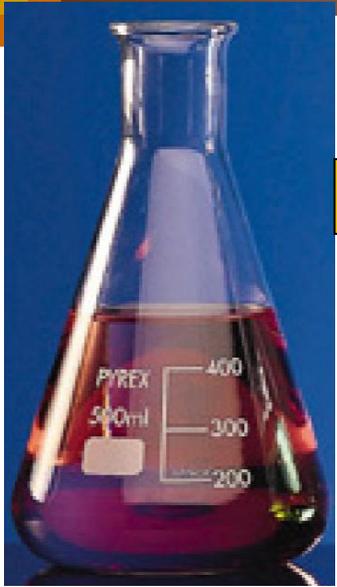
# Clonagem pelo método “Shut Gun”

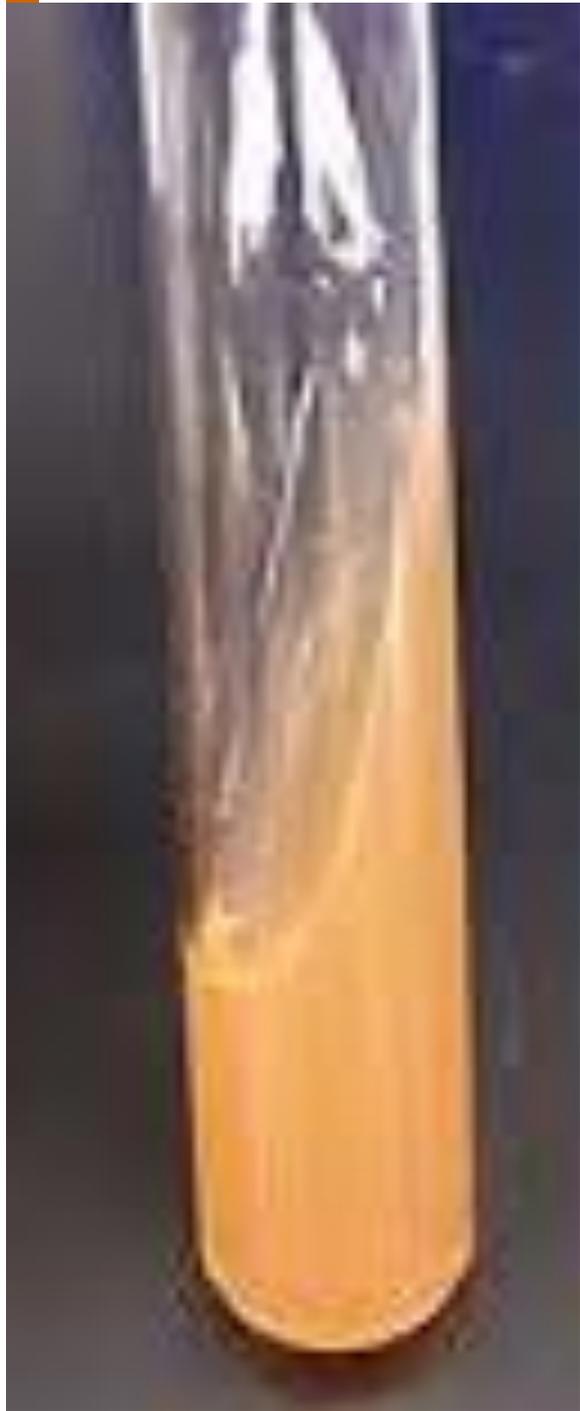


**“Banco ou biblioteca de genes”**

# Formação de molécula quimérica

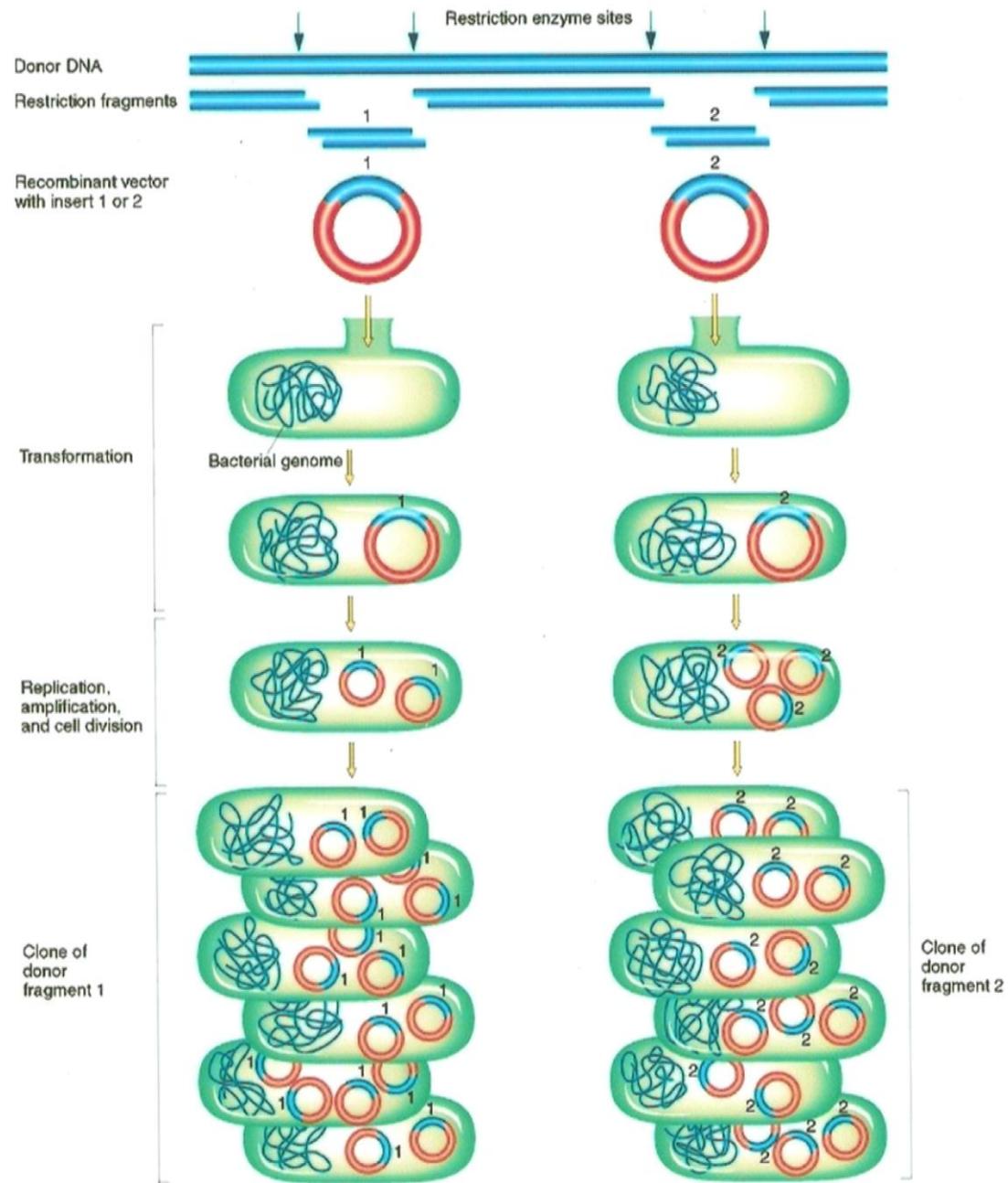




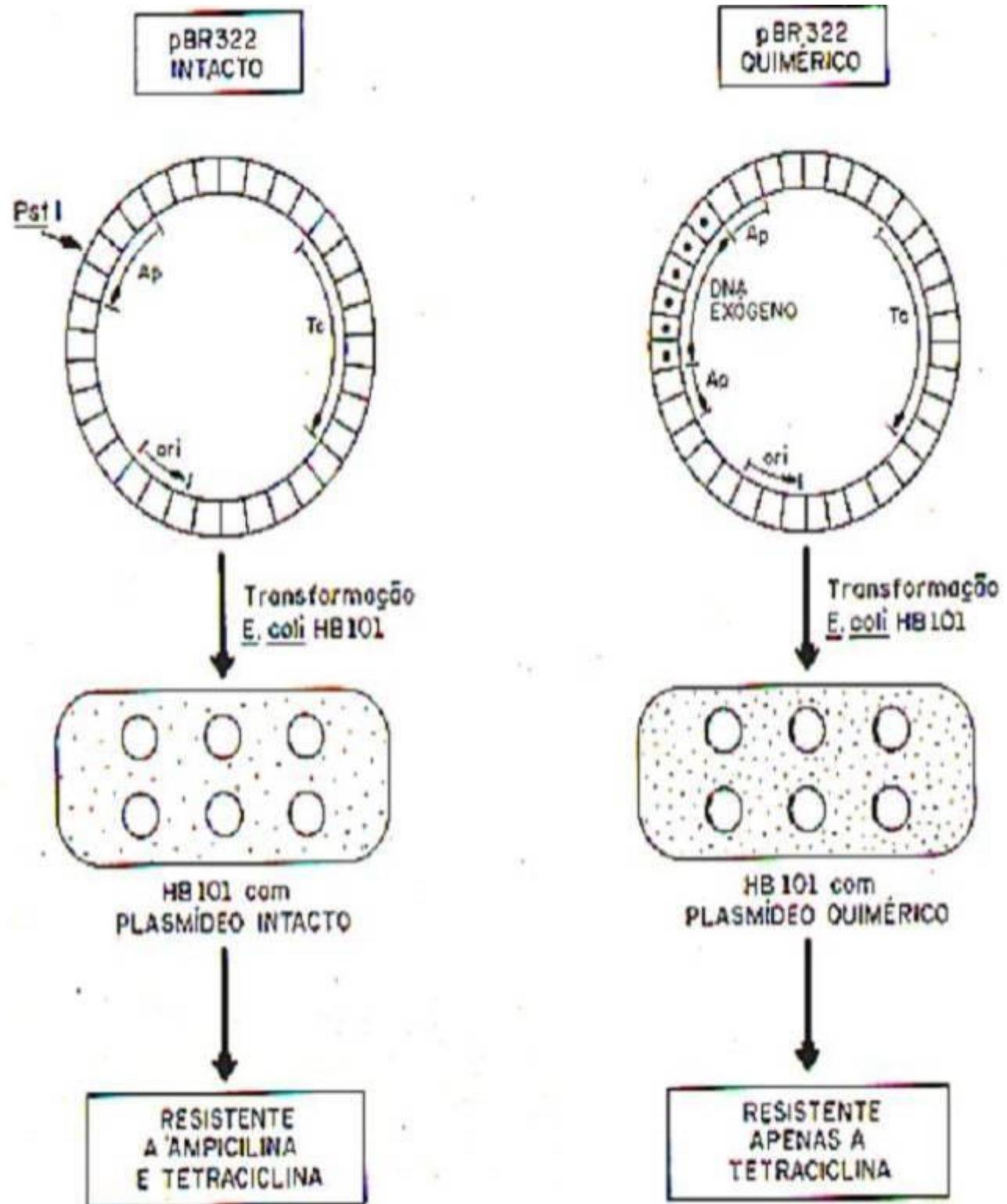




# CLONAGEM E AMPLIFICAÇÃO

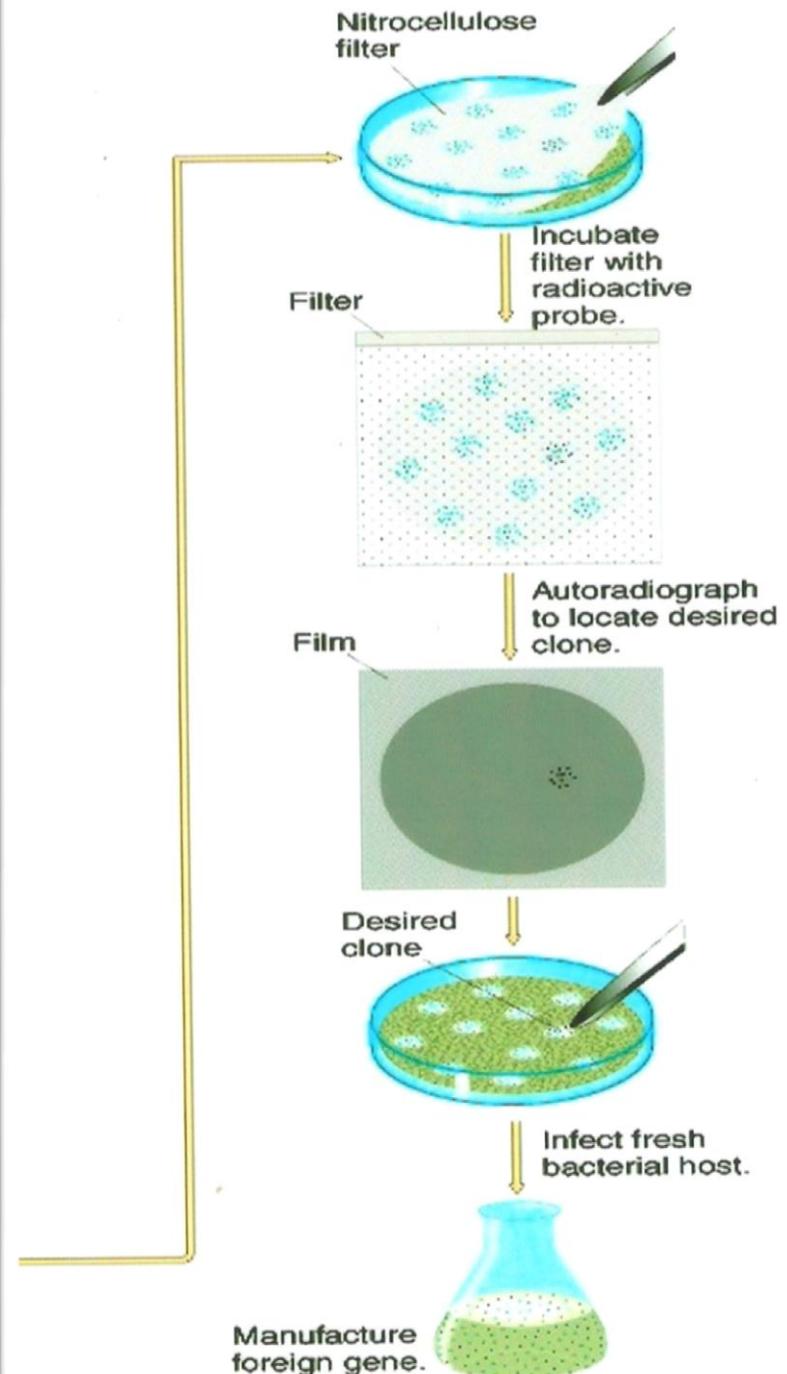
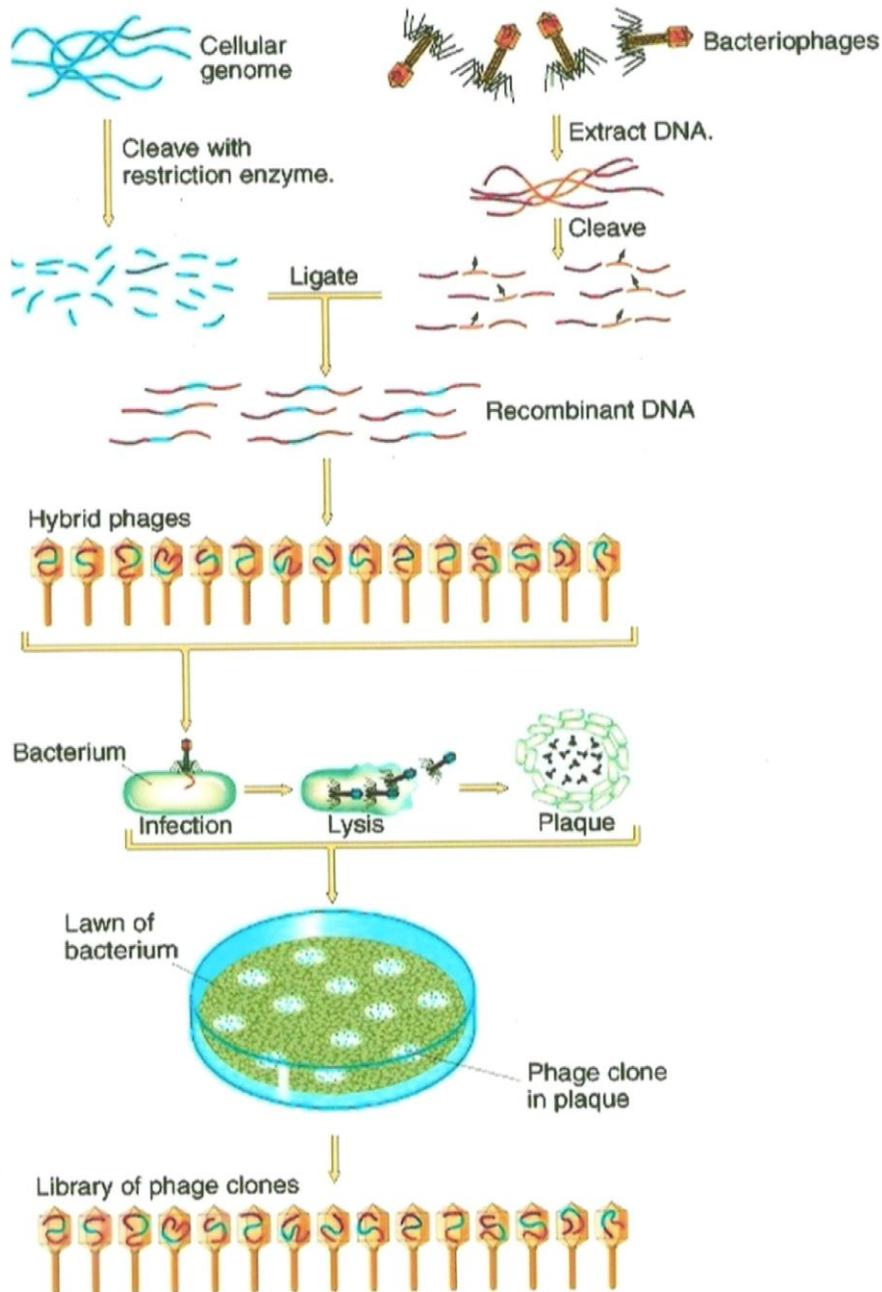


**Esquema de seleção de plasmídeos recombinantes**

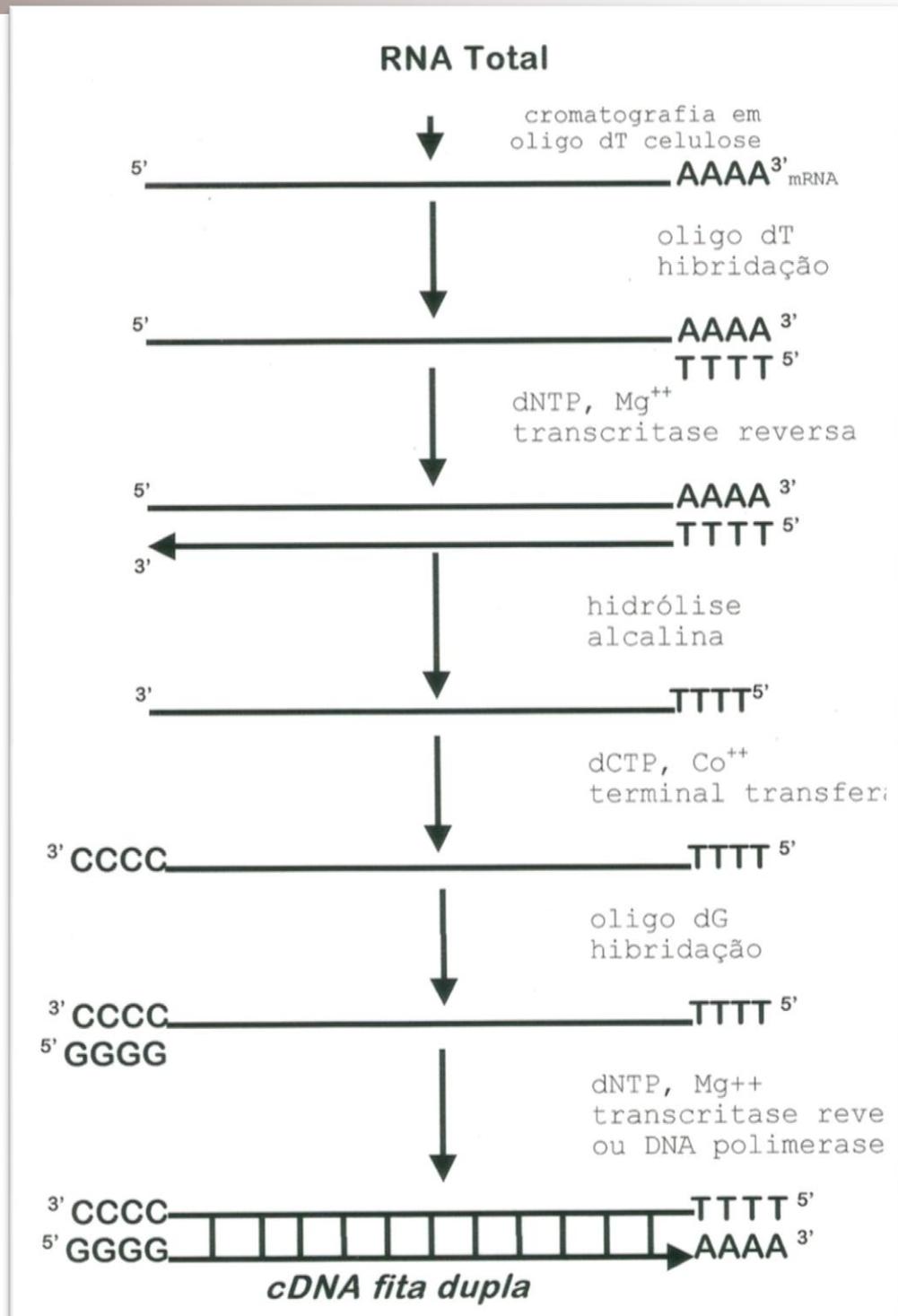




## CLONAGEM E AMPLIFICAÇÃO



# Obtenção do cDNA (DNA complementar ao RNA)

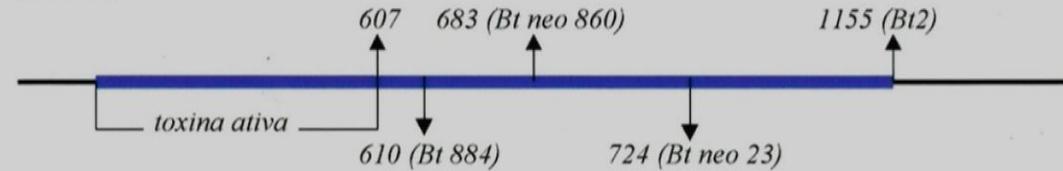


## Alguns promotores utilizados para expressão de genes

<b>PROMOTOR</b>	<b>ORIGEM</b>
$P_{lac}$	Operon lac de <i>Escherichia coli</i>
$P_L$	Operon N de bacteriófago $\lambda$
$P_{trp}$	Operon do triptofano de <i>Escherichia coli</i>
$P_{\beta\text{-lact}}$	Operon $\beta$ -lactamase do pBR 322 de <i>Escherichia coli</i>
$P_{sta}$	Operon 42 D da estafiloquinase de <i>Escherichia coli</i>
$P_{\alpha}$	Gene de $\alpha$ -amilase de <i>Bacillus subtilis</i>
$P_{pro}$	Gene da protease alcalina de <i>Bacillus amyloliquefasciens</i>
$P_{T7}$	Gene do fago T7
$P_{tac}$	$P_{trp} + P_{lac}$

## MONTAGEM DO GENE *Bt* PARA TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS DE FUMO

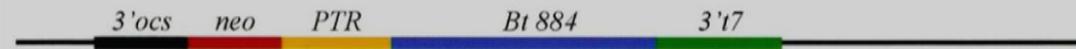
### Gene *Bt2*



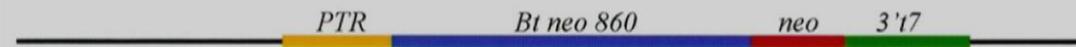
### pGS 1161



### pGS 1163



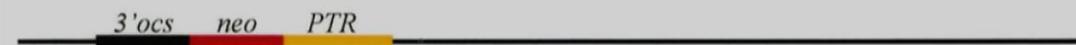
### pGS 1152



### pGS 1151



### pGS 1160



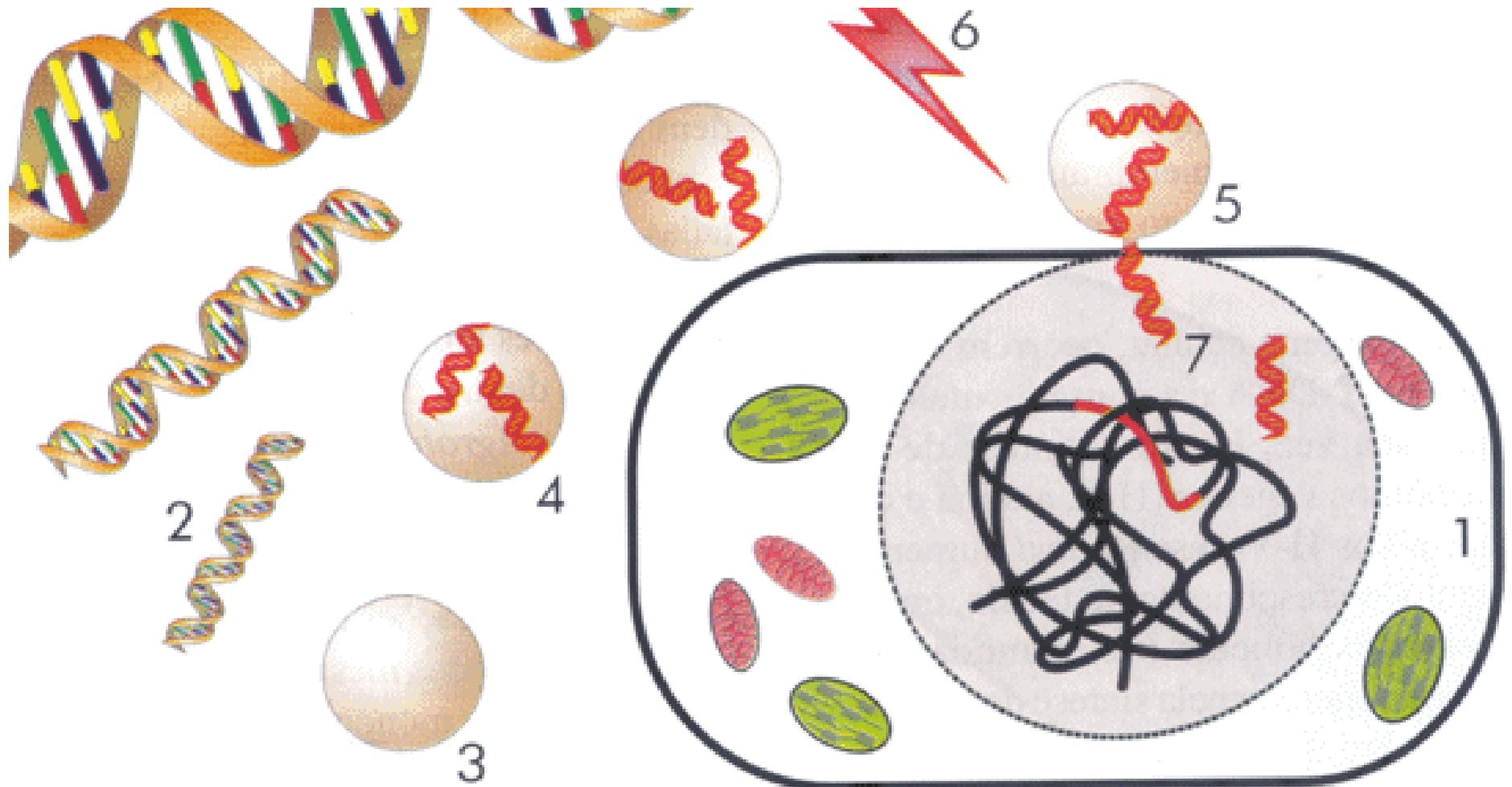
# Métodos de transformação

- **Microinjeção (animais)**



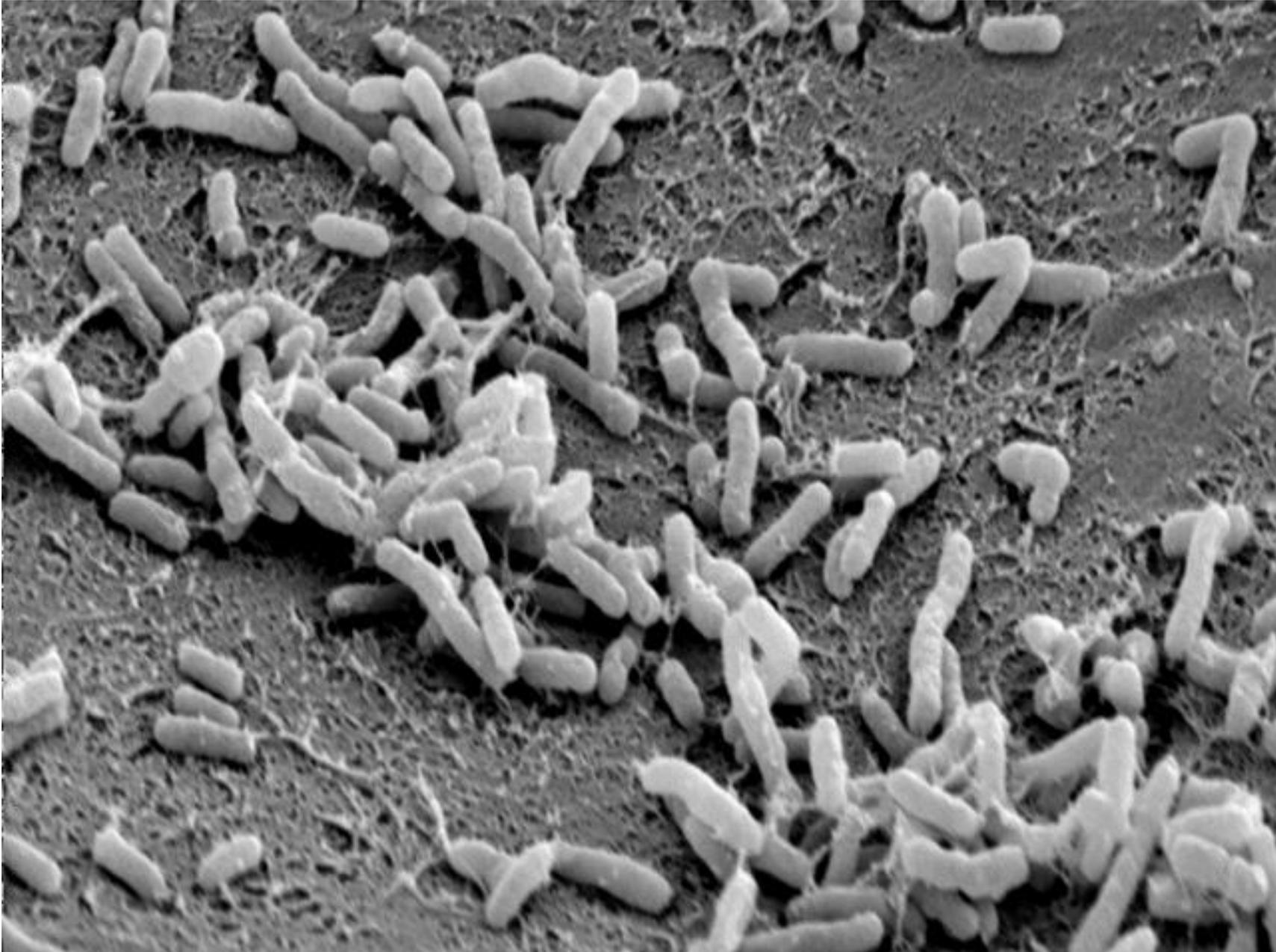
## Métodos de transformação

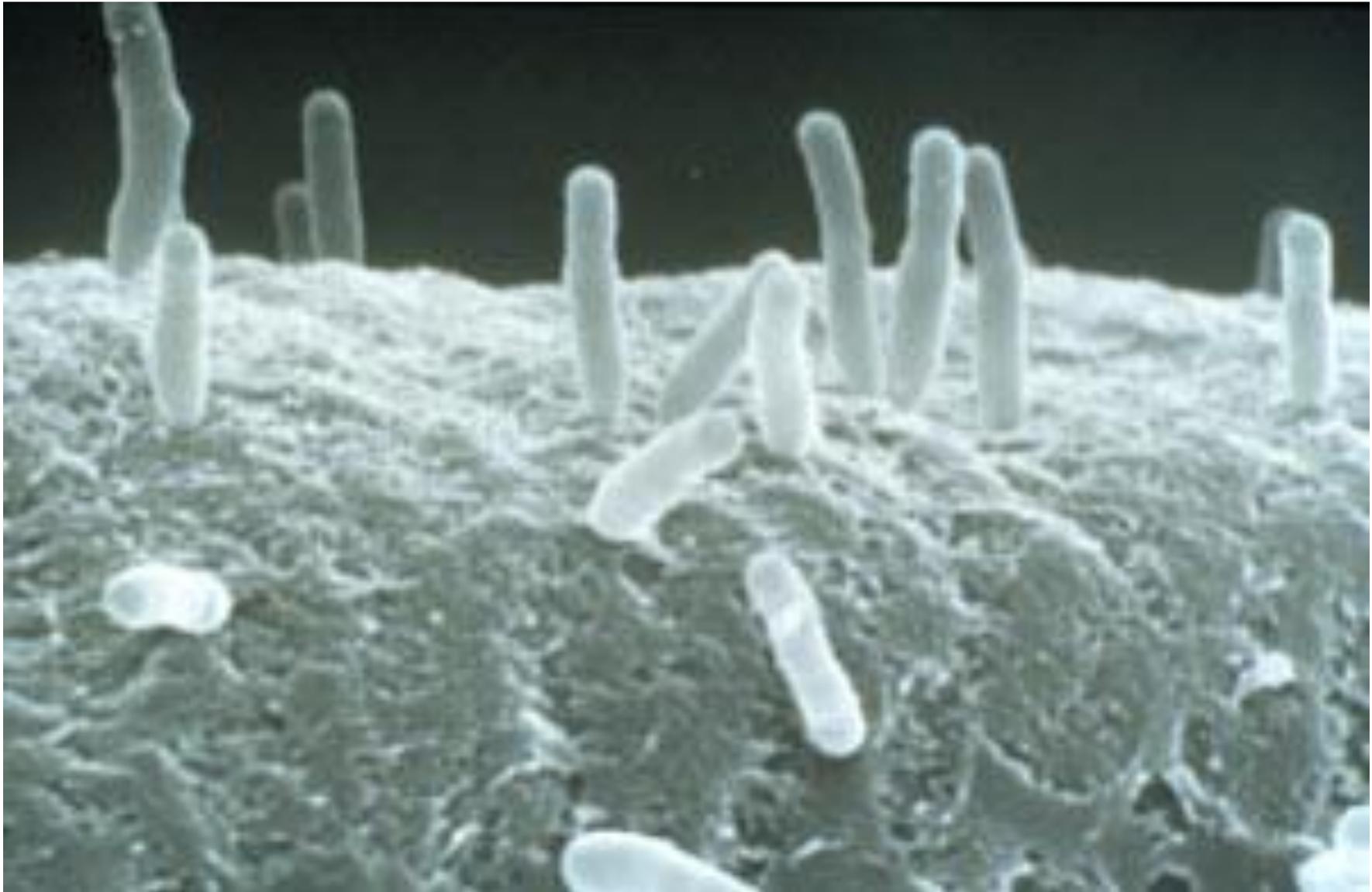
- Choque de calor (protoplastos);
- Irradiação com dose baixa (protoplastos);
- PEG (polietilenoglicol) (protoplastos);
- Ultrassom (protoplastos);
- Eletroporação (protoplastos e células intactas);
- *Agrobacterium tumefaciens*;
- Biolística, Biobalística ou “Gene gun”.



**Eletroporação:** Em uma cubeta, células vegetais sem a parede celular (1) são colocadas em contato com o DNA exógeno (2) e lipídios polares tipo lipofectina (3). Os lipídios, ao formarem micelas, engolfam moléculas de DNA (4). Essas micelas formam pontes com a membrana celular (5). A aplicação do choque elétrico leva o DNA a atravessar a ponte micela-membrana. Uma vez dentro da célula, o DNA exógeno pode se instalar no núcleo, e eventualmente integrar-se ao DNA nuclear da célula vegetal, por processos dependentes unicamente da bioquímica da célula. FONTE: Zanettini, Maria Helena e Pasquali, Giancarlo (2004), “Plantas Transgênicas”, in Mir, Luis (org.), Genômica. São Paulo: Atheneu, 721-736.

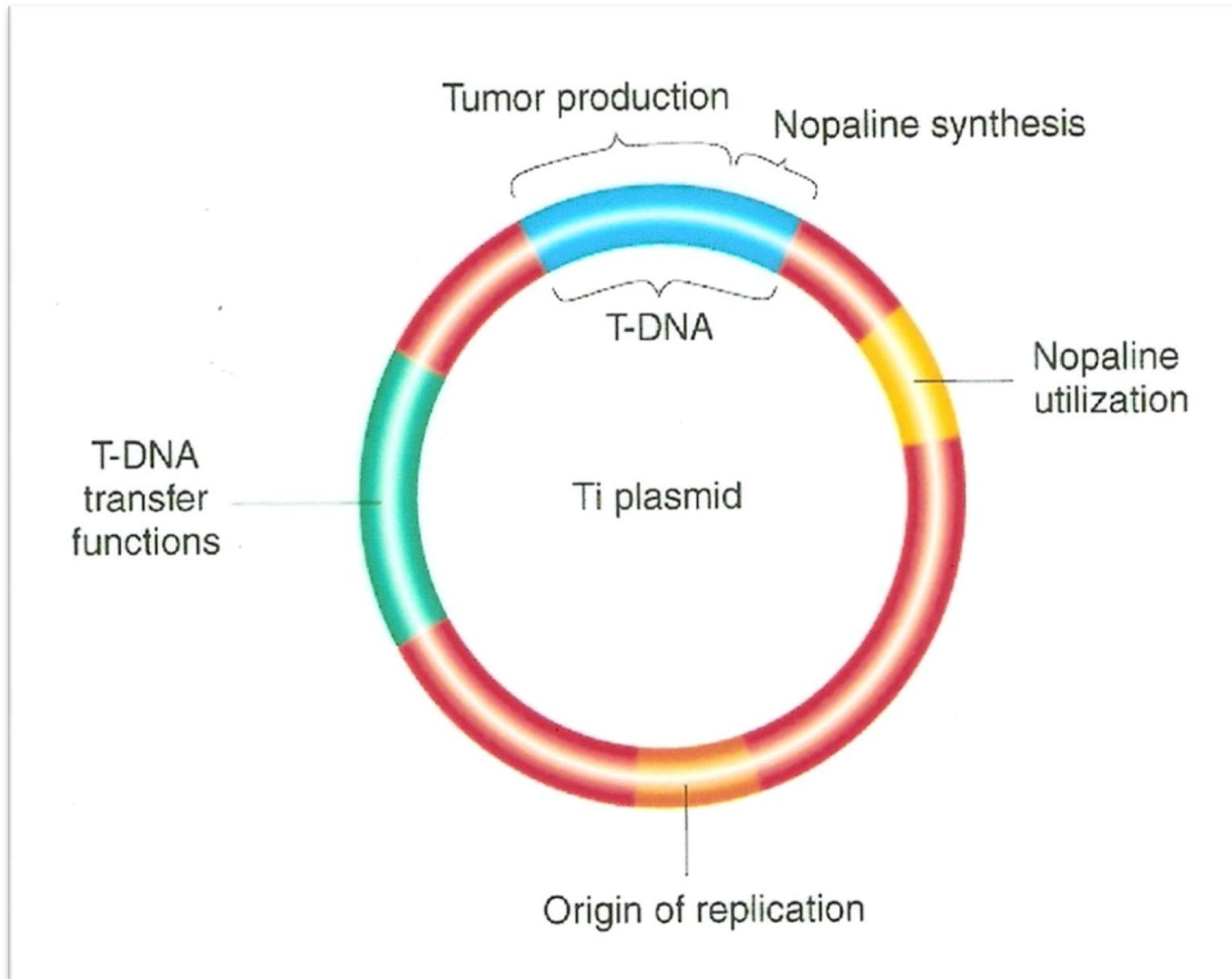
# *Agrobacterium tumefaciens*



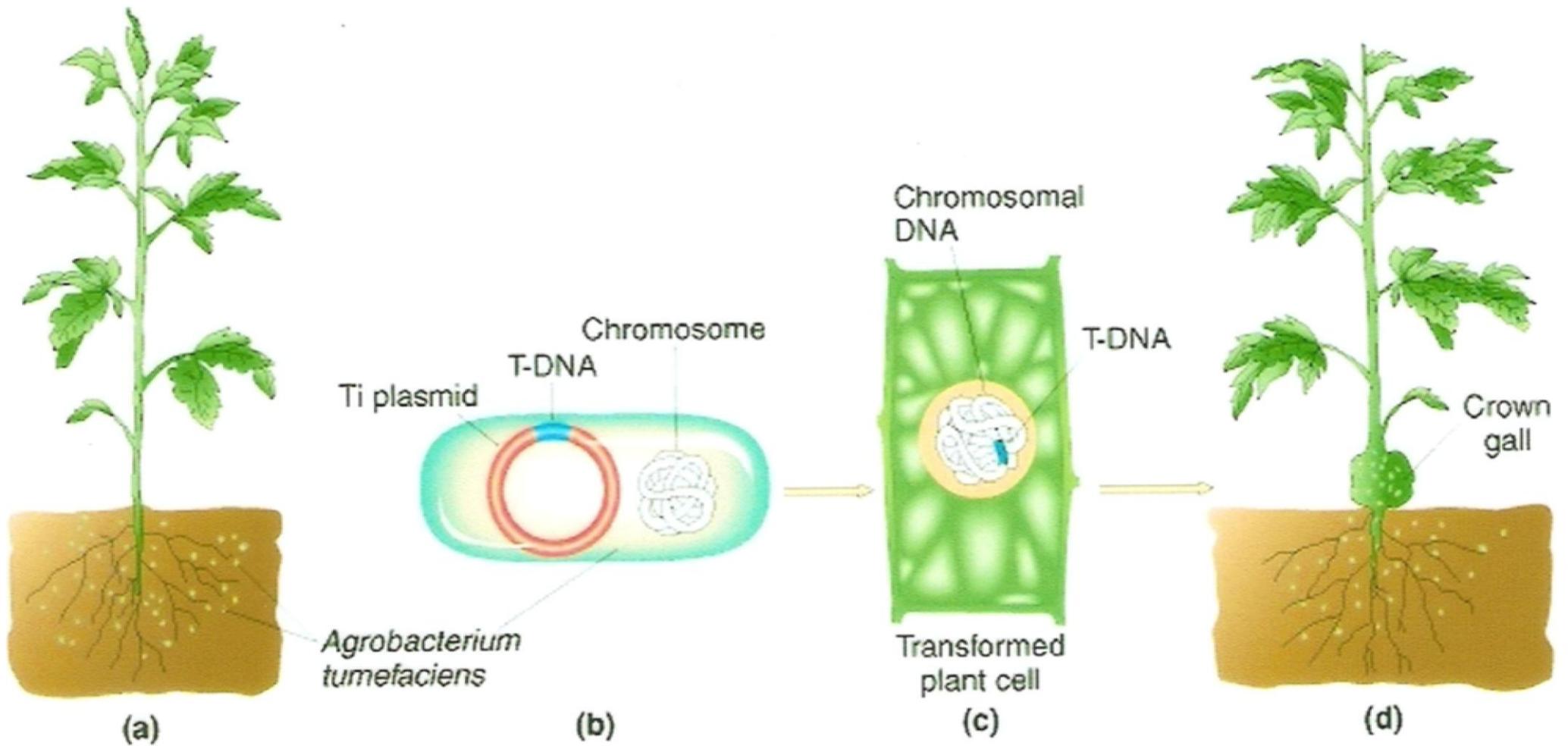




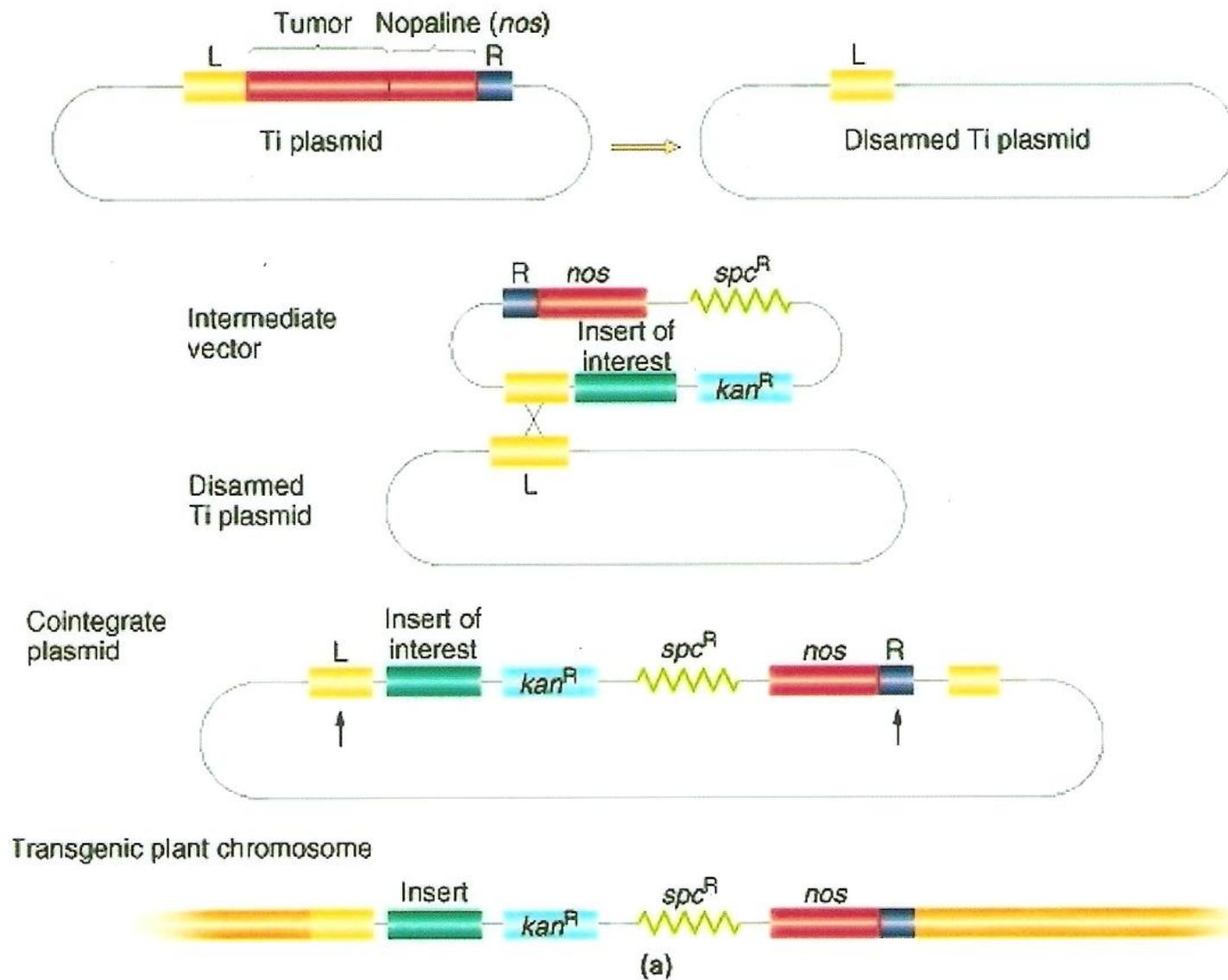
# **PLASMÍDEO Ti DE *Agrobacterium tumefaciens***

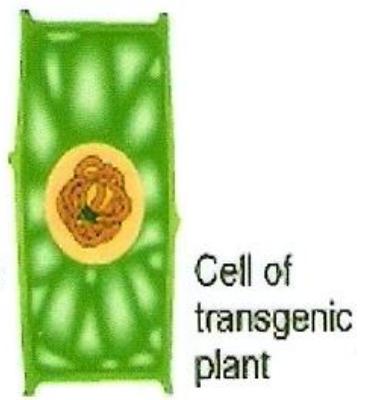
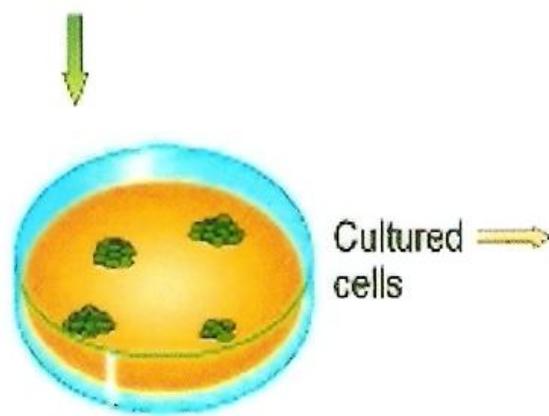
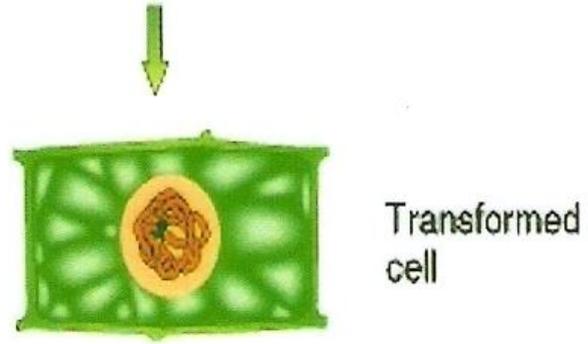
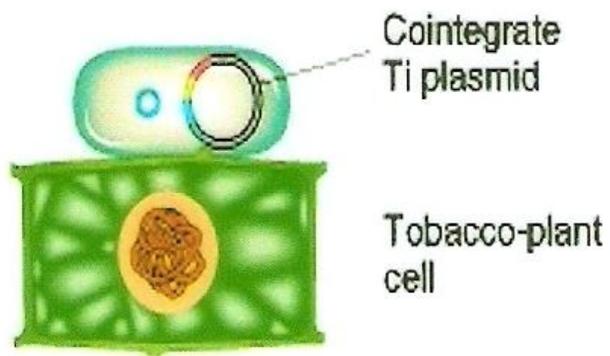


# PROCESSO DE INFECÇÃO NATURAL POR *Agrobacterium tumefaciens*



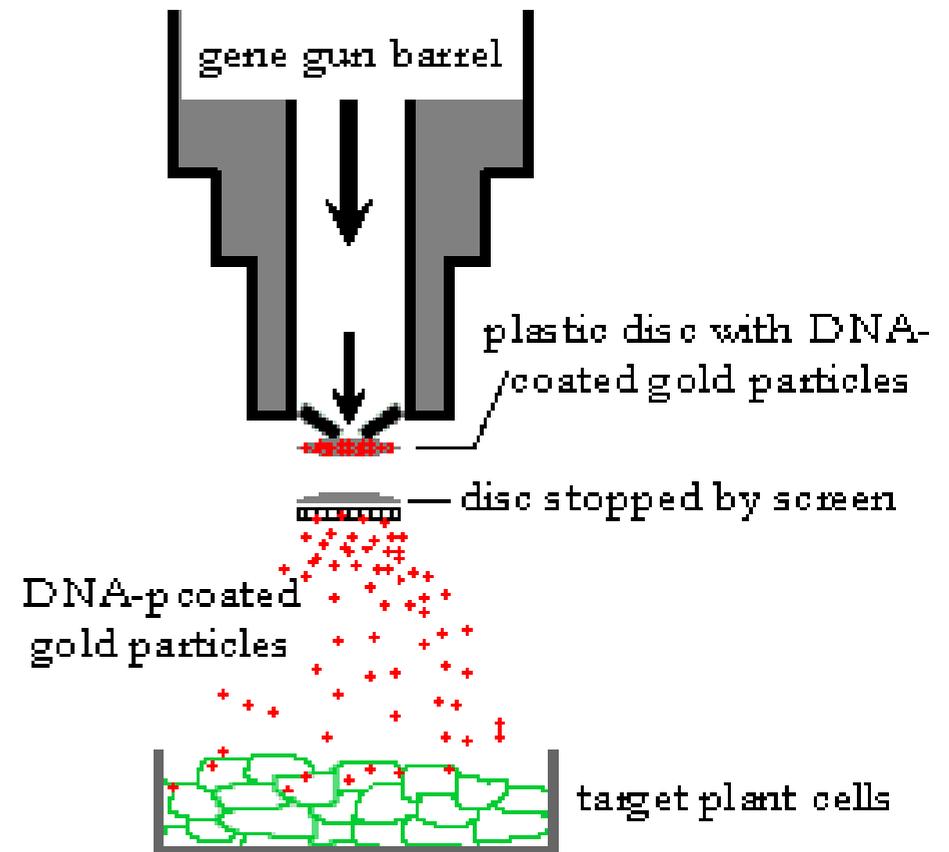
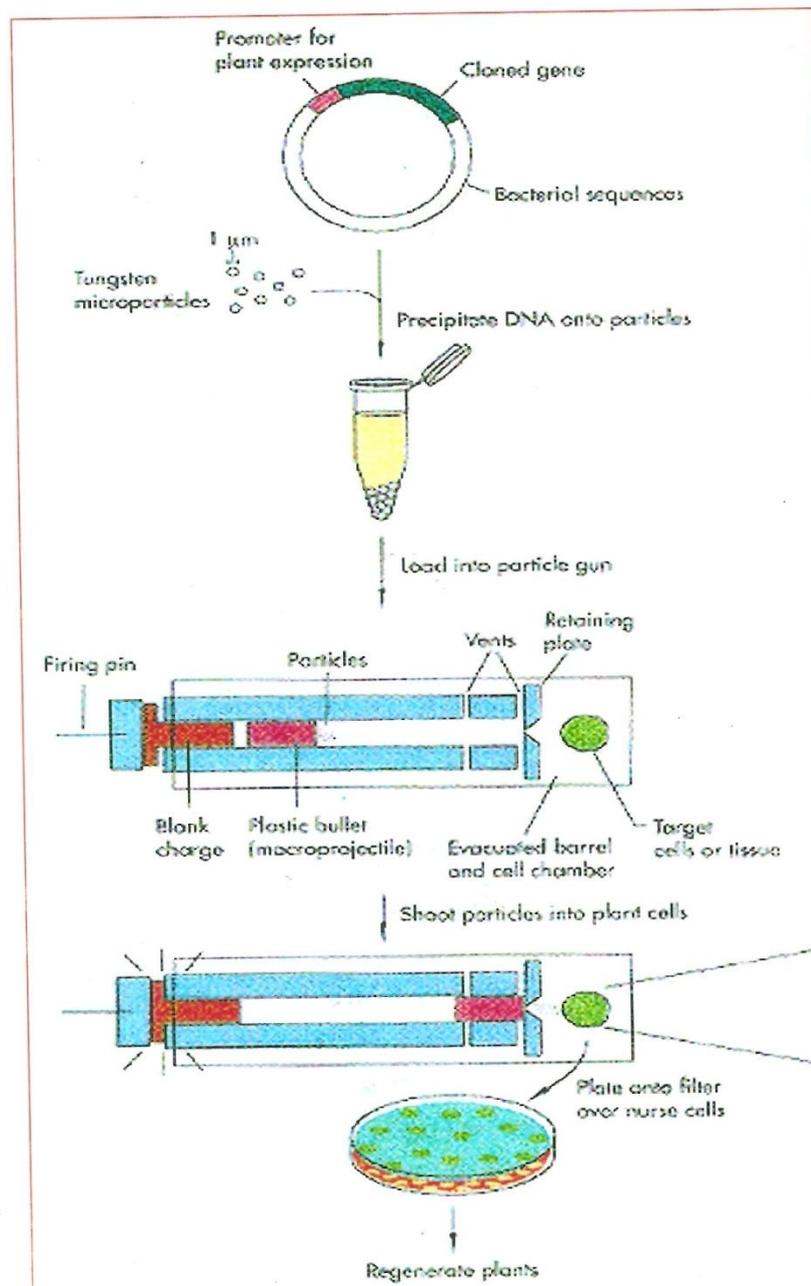
# TRANSFORMAÇÃO POR *Agrobacterium tumefaciens*





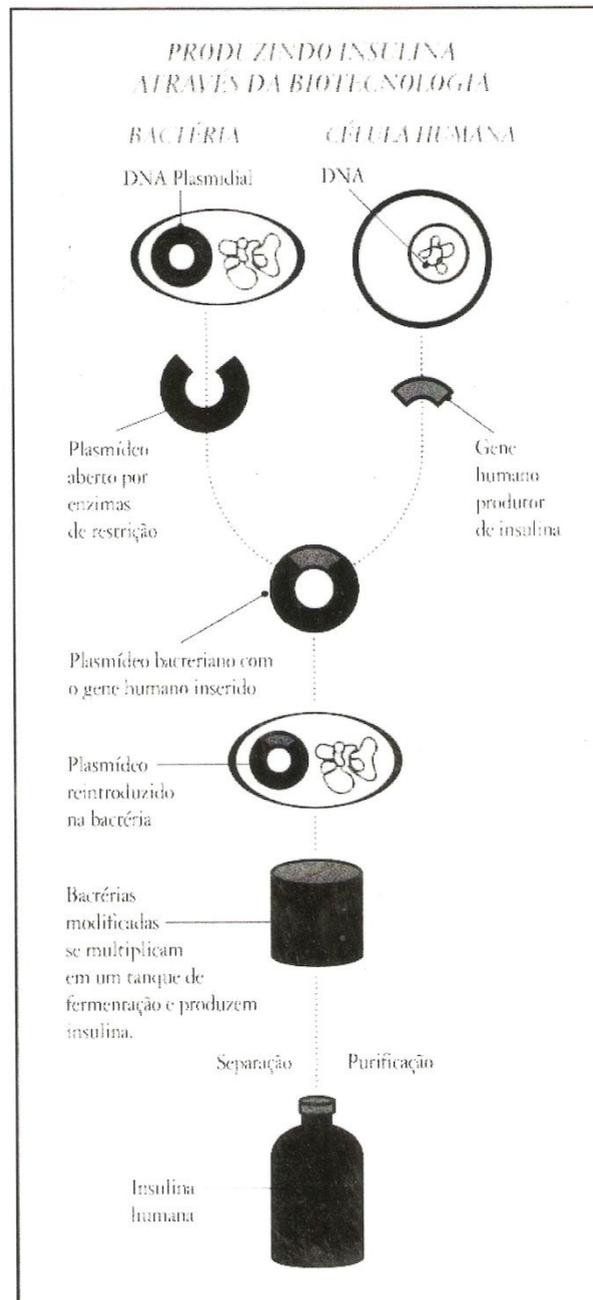
(b)

# TRANSFORMAÇÃO POR BIOLÍSTICA ("GENE GUN")

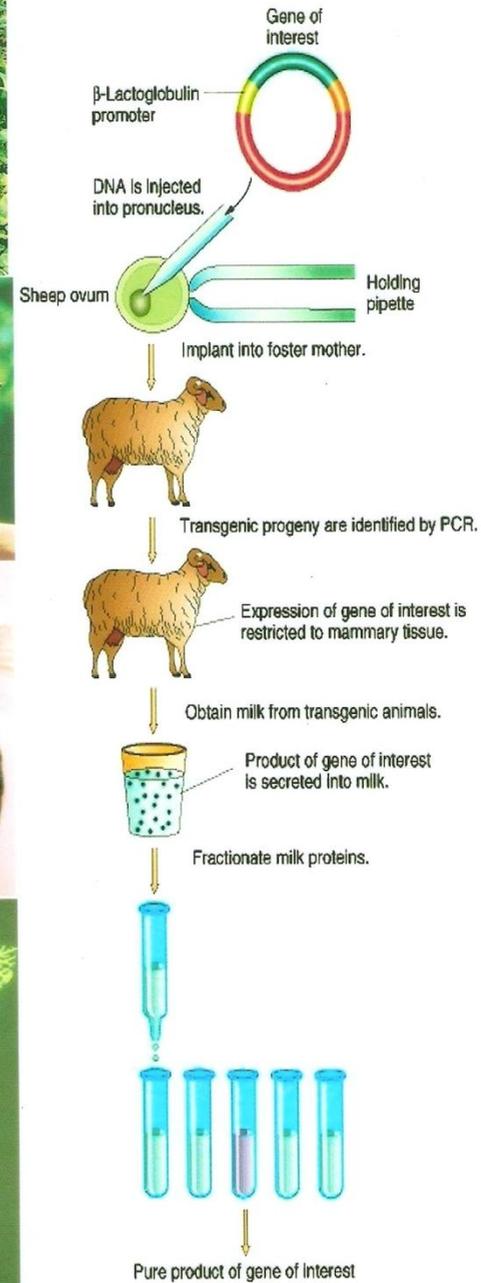
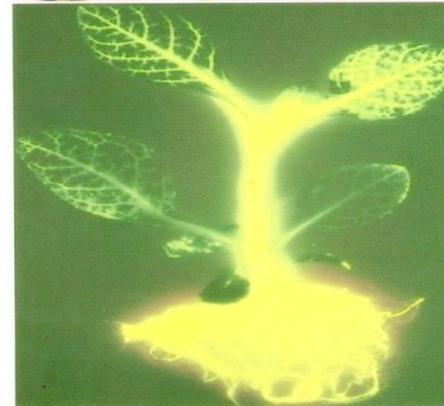




# Exemplos de transgênicos



# Exemplos de transgênicos



## Tomate longa vida

- Primeira cultura transgênica;
- Comercializado desde 1994;
- Gene “flavr savr” (Calgene);
- Inibição da produção de poligalacturonase ;
- Fruto mais resistente à murcha, impacto e amadurecimento;
- Dura 40 dias fora da geladeira.



# Milho resistente a herbicidas



## MECANISMO DE AÇÃO



Atividade da enzima CP4 EPSPS na planta geneticamente modificada tolerante ao herbicida glifosato

# Soja resistente a herbicida



# Milho resistente à lagarta do cartucho



## Arroz com maior conteúdo de ferro



- Gene da ferritina da soja;
- Quantidade de ferro três vezes maior que o convencional

## **Arroz com genes do milho**

- Genes da fotossíntese do milho;
- Até 35% mais produtivo;
- 30% mais extração de gás carbônico.

## **Gene “cab” em eucalipto**

- Retirado da ervilha;
- Expande espaço interno das células;
- Maior número de cloroplastos;

## **Canola com óleo de melhor qualidade**

- Gene do mangostão
- 55 a 68% mais gorduras benéficas

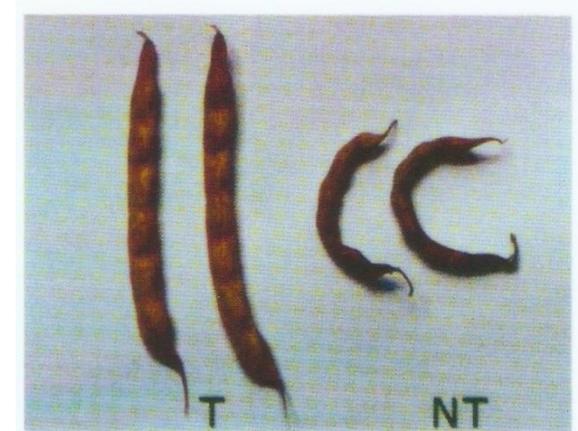
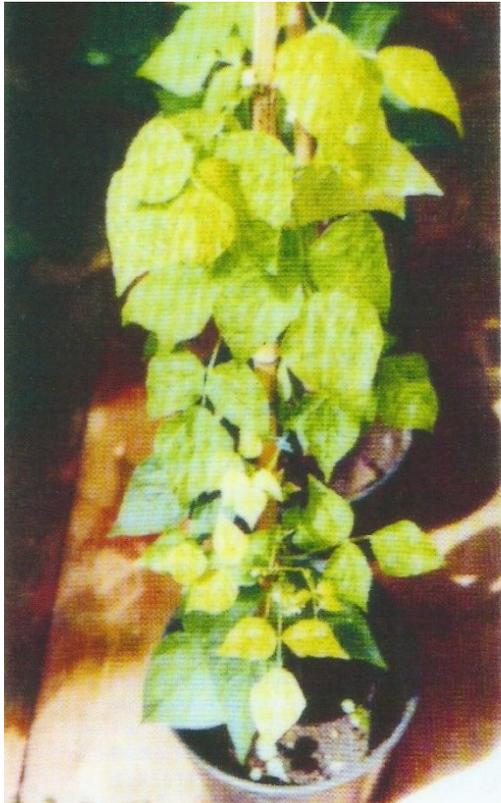
## Batatinha resistente a virus



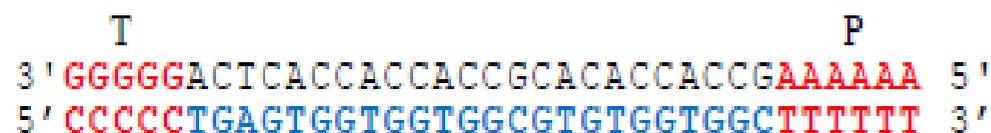
## Mamão resistente a vírus



# Feijão resistente ao mosaico dourado



Gene da capa proteica do vírus (normal).



Multiplicação do DNA →

Transcrição →

mRNA da proteína da capa proteica do vírus (normal)



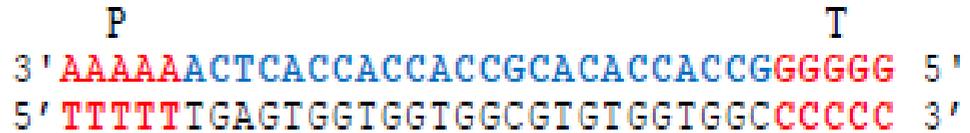
Tradução →

Proteína da capa proteica do vírus



Encapsulamento do DNA e destruição da célula vegetal

Gene da capa proteica do vírus, com promotor e terminador invertidos, colocado na planta transgênica.



Transcrição →

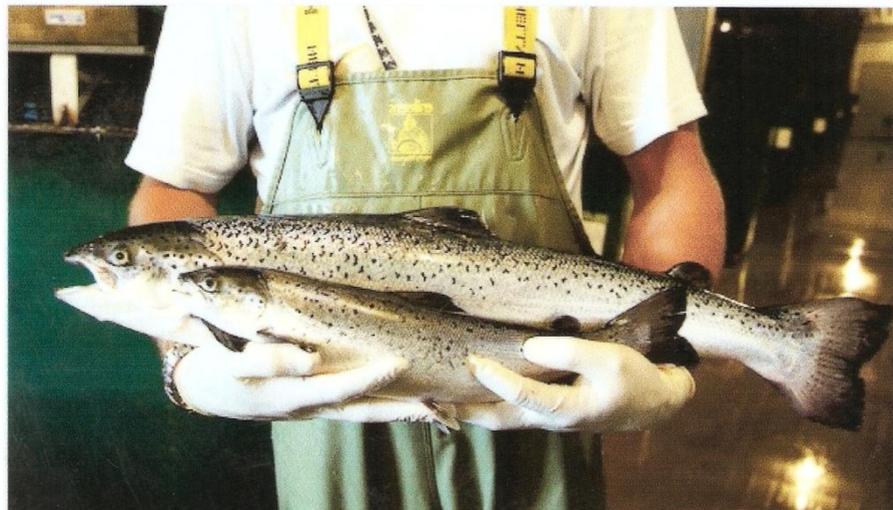
mRNA da fita complementar do gene da capa proteica do vírus (produzido na planta transgênica)



Pareamento do mRNA normal (transcrito do gene do vírus) com o mRNA da fita complementar do gene da capa proteica do vírus

Não haverá tradução, não haverá capa proteica e não haverá multiplicação do vírus na planta.

Planta resistente ao vírus.





***PROTEÍNA Bt, EM PARTES POR BILHÃO (ppb\*), EM PLANTA DE MILHO GENETICAMENTE MODIFICADA (EVENTO Bt 176)***

<i>PARTE DA PLANTA</i>	<i>ESTÁGIO DE DESENVOLVIMENTO</i>			
	<i>PLÂNTULA</i>	<i>FLORES-CIMENTO</i>	<i>MATURAÇÃO</i>	<i>SENESCÊNCIA</i>
FOLHAS	865	1440	460	126
RAÍZES	< 8	< 8	< 8	< 8
PÓLEN	-----	1835	-----	-----
GRÃOS	-----	-----	< 5	< 5

*\* - 1 ppb = 1 g por tonelada*

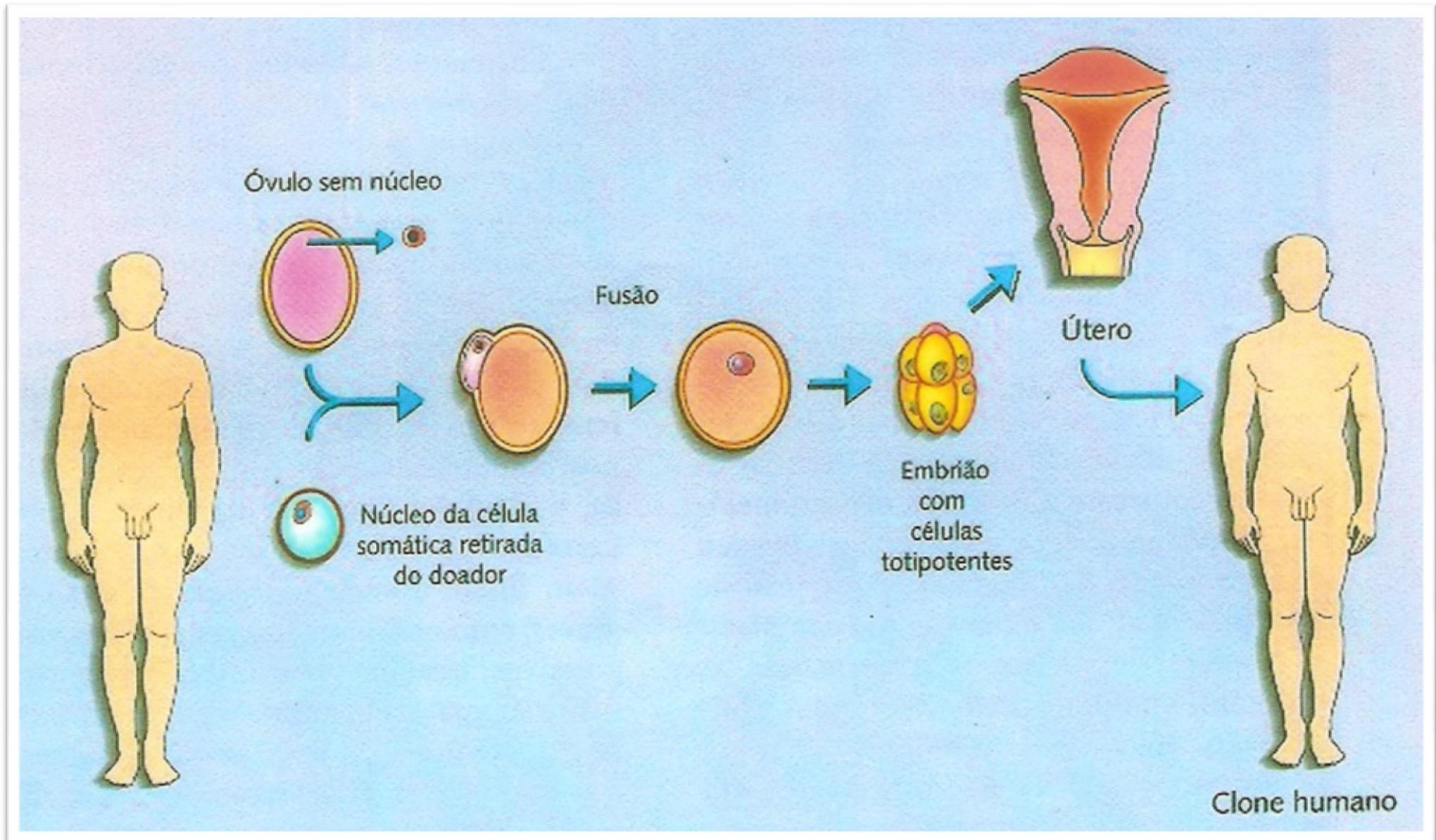
## *MILHO PARA SILAGEM*

- *SÃO UTILIZADAS PLANTAS MADURAS;*
- *4,7 g/ha DA PROTEÍNA Bt.*

## *ANIMAIS DE LABORATÓRIO*

- *5 g DE PROTEÍNA Bt POR kg DE PESO VIVO;*
- *SER HUMANO COM 60 kg DE PESO PODE INGERIR 40 t DE GRÃOS DE MILHO BT;*
- *VACAS PODEM INGERIR 1,5 T DE MILHO VERDE BT*

# Clonagem reprodutiva



# Clonagem terapêutica

