

5 – Importantes no desenvolvimento de Engenharia Genética...

Clonagem de DNA

Infeção com Agrobacterium

... e utilizados em inúmeros processos Biotecnológicos

BioFIG

6 – Elevada importância para a agricultura

- como causadores de diferentes patologias

- como agentes de controlo biológico de agentes patogénicos e de pragas

Infecções bacterianas Infecções virais Infecções fungicas

BioFIG

4 – Elevada importância para a agricultura

- Pelo estabelecimento de associações simbióticas

Micorrizas (planta-fungo)

Nódulos (planta-bactéria)

Soybean Root Nodule Images

BioFIG

4 – Elevada importância para a agricultura

- Aumentam a disponibilidade de nutrientes

- Responsáveis pelo efeito supressor do solo

BioFIG

Como foram identificados os microrganismos?

1. Colheita de amostras
2. Cultura e isolamento em meios apropriados
3. Pesquisa de caracteres fenotípicos

BioFIG

Características culturais

Aspectos morfológicos

BioFIG

Estruturas reprodutoras

CONIDIA SHAPES

<http://sharon-taxonomy2009-p3.wikispaces.com/file/view/fungi/100274173/fungi>

http://i3.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9Gc:STV7V-adeN8zawTV37PCS2g3c_ow1G0cYSJ6zpkR0Zac_4

3. Pesquisa de caracteres fenotípicos

BioFIG

Ensaio bioquímico (testes de sensibilidade e metabolismo)

Utilização de meios selectivos

Teste API

Coloração Gram

BioFIG

Que problemas podem surgir na identificação "tradicional" da diversidade microbiana?

- Os indivíduos têm primeiro de ser isolados e cultivados em laboratório

Apenas 1% dos microrganismos unicelulares são cultiváveis

- Muitos ensaios bioquímicos só podem ser utilizados em microrganismos com crescimento rápido

- As características fenotípicas e bioquímicas dependem fortemente do ambiente (meio de cultura)

Os métodos moleculares ultrapassam muitas destas dificuldades

Fusarium oxysporum, em diferentes marcas de PDA

BioFIG

A técnica mais comum e simples é a amplificação de zonas variáveis do genoma, recorrendo às suas zonas estáveis

Procarionotas

Ribossomas 70S → Subunidade maior 50S → RNA 23S (2904 nt) → Pré-rRNA (30S)
 Ribossomas 70S → Subunidade menor 30S → RNA 5S (120 nt) → Pré-rRNA (30S)
 Ribossomas 70S → Subunidade menor 30S → RNA 16S (1541 nt) → Pré-rRNA (30S)

DNA → 16S rRNA, tRNA, 23S rRNA, 5S rRNA, tRNA

30S rRNA

Products → 16S rRNA, tRNA, 23S rRNA, 5S rRNA, tRNA

BioFIG

A técnica mais comum e simples é a amplificação de zonas variáveis do genoma, recorrendo às suas zonas estáveis

Procarionotas

Menos de 500 pb são hipervariáveis

1,542 pb

16S rRNA, tRNA, 23S rRNA

V4 - 106 bp Amplification primer, Sequencing primer

BioFIG

A técnica mais comum e simples é a amplificação de zonas variáveis do genoma, recorrendo às suas zonas estáveis

Eucariotas

Ribossomas 80S → Subunidade maior 60S → RNA 28S (4700 nt) → Pré-rRNA (45S)
 Ribossomas 80S → Subunidade maior 60S → RNA 5.8S (160 nt) → Pré-rRNA (45S)
 Ribossomas 80S → Subunidade menor 40S → RNA 18S (1900 nt) → Pré-rRNA (45S)
 Ribossomas 80S → Subunidade menor 40S → RNA 5S (120 nt) → Pré-rRNA (45S)

Human, ~13.7 kb (18S, 5.8S, 28S)

X. laevis (frog), ~7.9 kb (18S, 5.8S, 28S)

D. melanogaster (fruit fly), ~7.7 kb (18S, 5.8S, 28S)

S. cerevisiae (yeast), ~6.6 kb (18S, 5.8S, 28S)

Transcribed spacer, Region preserved in ribosomes

BioFIG

Existem vários tipos de diversidade...

Diversidade Ecológica	Diversidade Genética	Diversidade de Organismo
variedade de funções	variedade genética	variedade de espécies
<ul style="list-style-type: none"> Biomassa Bio-regiões Paisagem Ecosistema Habitat Nichos Populações 	<ul style="list-style-type: none"> Populações Indivíduos Cromossomos Genes Nucleotídeos 	<ul style="list-style-type: none"> Reino Filo Família Género Espécie População Indivíduo

A diversidade envolve dois componentes:

- Variedade (quem/quais são?)
- Abundância relativa (quantos são?)

Como pode ser avaliada a diversidade microbiana de um dado habitat?

Análise de múltiplos fragmentos (T-RFLP)

Recolha da amostra → Extração de DNA → PCR de 26S rDNA (primer fluorescente) → Digestão com enzima de restrição → Electroforese capilar

Como pode ser avaliada a diversidade microbiana de um dado habitat?

Análise de múltiplos fragmentos (DGGE/TGGE)

Recolha da amostra → Extração de DNA → PCR de 26S rDNA → Electroforese em condições desnaturantes

Análise de múltiplos fragmentos (DGGE/TGGE)

Redução da mobilidade electroforética de fragmentos parcialmente desnaturados

A amostra é aplicada em toda a extensão do gel

Electrophoresis

Este tipo de gel (gel perpendicular) permite determinar o tipo de gradiente a utilizar numa experiência

Os fragmentos desnaturam em diferentes locais do gel, parando a sua migração

Muzyer et al. (1993) Appl. Environ. Microbiol. 59: 695-700

Análise de múltiplos fragmentos (DGGE/TGGE)

A optimização do tempo de electroforese é efectuada pela aplicação regular da amostra num gel em gradiente

Zona de desnaturação

Os fragmentos desnaturam em diferentes locais do gel, parando a sua migração

Muzyer et al. (1993) Appl. Environ. Microbiol. 59: 695-700

Análise de múltiplos fragmentos (DGGE/TGGE)

Amostras contendo uma mistura de fragmentos de 26S rDNA, podem ser analisadas simultaneamente

Heuer et al. (1999) Appl. Environ. Microbiol. 65: 1045-1049.

Sequenciação tradicional

Sequenciação pelo método de Sanger

Sequenciação efectuada em sequenciadores capilares

BioFIG

Tecnologia de sequenciação de nova geração

- Utilização de técnicas de sequenciação massivas em paralelo (ex: plataforma 454, Solexa, SOLiD)
- Preparação mais directa das amostras a sequenciar

O DNA genómico é fragmentado (não há clonagem)

São ligados adaptadores

São seleccionados os fragmentos com ambos os adaptadores (A e B)

BioFIG

Tecnologia de sequenciação de nova geração

- Amplificação dos fragmentos a sequenciar por PCR de emulsão

É mantida uma proporção para que cada microesfera de agarose se ligue a uma única sequência de DNA

As microesferas são capturadas individualmente em micelas onde ocorre o PCR em emulsão

São seleccionados os fragmentos com ambos os adaptadores (A e B)

BioFIG

Tecnologia de sequenciação de nova geração

- Aplicação dos fragmentos nos poços da placa

Cada microesfera (28 µm) é capturada em poços (44 µm) na placa de sequenciação (PicoTiterPlate - PTP)

Pequenas esferas contendo os componentes da reacção são adicionados

BioFIG

Tecnologia de sequenciação de nova geração

- A polimerização ocorre no pirosequenciador (Roche/454 FLX)

Podem ser sequenciadas 400,000 sequências em paralelo

BioFIG

Tecnologia de sequenciação de nova geração

- O princípio da sequenciação

A sequenciação é realizada por ciclos TCAG

1 nt ligado = 1 PPI liberto

1 PPI liberto = 1 ATP produzido (acção da ATP sulfúrilase)

1 ATP produzido = 1 oxiluciferina (acção da luciferase)

Degradação de dNTP não-incorporado por apirase

1-2 million template beads loaded into FTP wells

Flow of single dNTP type across FTP wells

APS - adenosine 5' phosphosulfate

Light and oxyluciferin

BioFIG

Tecnologia de sequenciação de nova geração

• O princípio da sequenciação

Flow Order

Key sequence = TCAG for identifying wells and calibration

BioFIG

Como pode ser avaliada a diversidade microbiana de um dado habitat?

Sequência de todos os 26S rDNA presentes na população microbiana

BioFIG

Como pode ser avaliada a diversidade microbiana de um dado habitat?

Sequência de todos os 26S rDNA presentes na população microbiana

Bases de dados de sequências

Potencial identificação de todas as bactérias presentes no habitat

■ Gammaproteobacteria	■ Actinobacteria	■ Cyanobacteria	■ Deinococcus-Thermus
■ Betaproteobacteria	■ Bacillus/Clado	■ Chloroflexi	
■ Alphaproteobacteria	■ Spirochaetes	■ Acidobacteria	
■ Epsilonproteobacteria	■ Chlamydiae/Planctomycetes	■ Aquificae	
■ Firmicutes	■ Firmicutes	■ Thermotom	

BioFIG

A diversidade microbiana está actualmente a ser explorada em diferentes ambientes

BioFIG

A diversidade recentemente descoberta do picoplankton (< 2µm) nos oceanos, elevou de forma surpreendente as estimativas de diversidade dos microrganismos

Taxa	Espécies descritas (x1000)	Espécies desconhecidas (x1000)
others	~100	~100
Chordates	~100	~100
Molluscs	~100	~100
Insects	~100	~100
Arachnids	~100	~100
Nematodes	~100	~100
Seed plants	~100	~100
Bryophytes and Pteridophytes	~100	~100
Fungi	~100	~100
Plants	~100	~100
Vertebrates (Archaea and Bacteria)	~100	~100
Viruses	~100	~100

Convention Biological Diversity, Technical Series, n° 30 - 2007

BioFIG

A proporção dos organismos ainda poderá sofrer alterações

Organism Group	Proportion (%)
Invertebrates	68.5%
Vascular plants	16.8%
Non-Vascular plants	1%
Vertebrates	3.2%
Fungi/Yeast	4.5%
Protozoa	1.5%
Microalgae	2.5%
Bacteria/Archaea	0.5%

Convention Biological Diversity, Technical Series, n° 30 - 2007

BioFIG

Agradecimentos

Paula Baptista (ESAB - IPB)
Sandra Chaves (Fac. Ciências da Universidade de Lisboa)

Ivo Oliveira (ESAB - IPB)

PTDC/AGR-AAM/099556/2008

Universidade do Minho
Escola de Ciências

Fisiologia Molecular de Plantas

Biotecnologia e Bio-
Empreendedorismo em
Plantas Aromáticas e
Medicinais

Mestrado em **B**io**B**io**B**ologia Molecular, **B**iotecnologia
e **B**io**B**io**B**empreendedorismo em **B**io**B**io**B**Plantas

Mestrado **3BP**

Mestrado 3BP
Um mestrado – Dois perfis

UNIDADES CURRICULARES	ÁREA CIENTÍFICA	ECTS
Bioquímica e Fisiologia Molecular	BMP	6
Metabolismo Secundário e Compostos Bioactivos	BV	6
Biotecnologia Vegetal	BV	6
Engenharia Genética de Plantas e Bioinformática	BMP	6
Estratégia e Marketing de Biotecnologia	G	6
Biorreactores e Processos de Separação	ENGBIO	6
Bioempreendedorismo	G	6
Opção I /Cursos Avançados*	BMP/BV	6
Opção II /Cursos Avançados*	BMP/BV	6
Opção III /Cursos Avançados*	QA	6

* Pela frequência das opções, o aluno poderá escolher um percurso com um carácter mais biotecnológico e aplicado ou mais científico