

# Ferramentas biotecnológicas para a engenharia genética

The logo for USP (Universidade de São Paulo) is displayed in a stylized, outlined font.

Prof. Igor Cesarino  
Departamento de Botânica  
IB/USP

The LigninLab logo features a green hexagonal shape with a small notch at the top, positioned above the text "LigninLab" in a dark grey sans-serif font.

# O que é Biotecnologia?

*“Aplicação de sistemas biológicos, organismos vivos ou derivados destes, para fazer ou modificar produtos ou processos, ou seja, produzir bens ou serviços.”*

Uso da biotecnologia data milhares de anos:  
agropecuária, medicina e produção de alimentos



Domesticação de animais, cultivo de plantas e seu  
melhoramento usando cruzamentos

# Biotecnologia Moderna

- Bases: Estrutura do DNA (Watson & Crick, 1953)
- A partir dos anos 70: manipulação do DNA
- Interdisciplinar: **genética, biologia molecular, bioquímica, biologia celular**, além de **engenharia química, tecnologia da informação, robótica, bioética e o biodireito**, etc





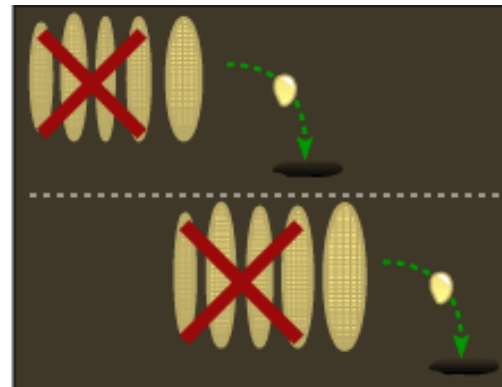
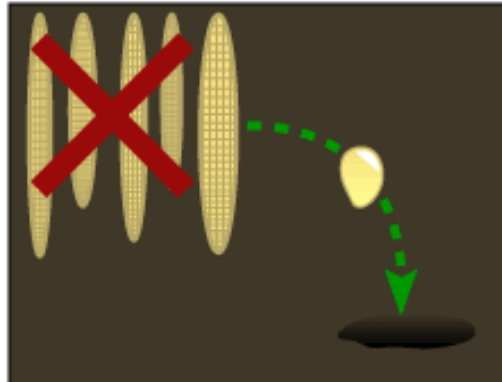
## Produtos de origem biotecnológica, por setor

Setores	Bens e serviços
Agricultura	adubo composto, pesticidas, silagem, mudas de plantas ou de árvores, plantas transgênicas, etc
Alimentação	pães, queijos, picles, cerveja, vinho, proteína unicelular, aditivos, etc.
Química	butanol, acetona, glicerol, ácidos, enzimas, metais, etc
Eletrônica	biosensores
Energia	etanol, biogás
Meio Ambiente	recuperação de petróleo, tratamento do lixo, purificação da água
Pecuária	embriões
Saúde	antibióticos, hormônios e outros produtos farmacêuticos, vacinas, reagentes e testes para diagnóstico, etc.

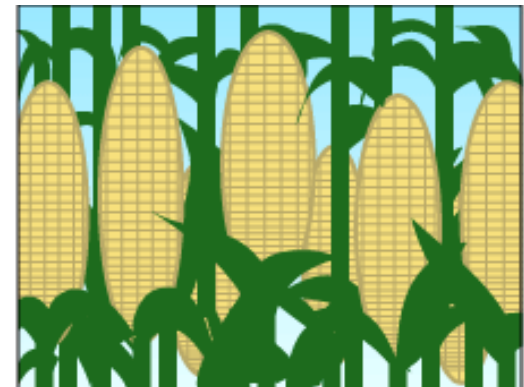
# Domesticação e Seleção Artificial



Variação natural  
dentro da  
população



Plantando sementes de plantas “boas” aumentou a sua frequência nas próximas gerações



# NATURAL "CORN", 7000 B.C.

PEEL IT BY HAMMERING  
REPEATEDLY WITH A  
HARD OBJECT

19 MM

5-10 VERY HARD KERNELS

TASTES LIKE VERY  
DRY, RAW POTATO



 8 KNOWN VARIETIES



ONLY FOUND  
IN CENTRAL  
AMERICA



75.0% WATER

1.9% SUGARS

23.1% OTHER  
MOSTLY STARCH

# ARTIFICIAL CORN, 2014

STEAM COOKS IN  
MINUTES

*Sweet,  
refreshing  
and juicy*



190 MM

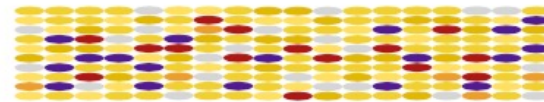
*~1000 Times Larger*

EASY TO PEEL

*No Hammer Required!*

AVAILABLE IN  
FIVE COLOURS:

-  WHITE
-  YELLOW
-  DARK RED
-  DEEP PURPLE
-  BLUE-BLACK



~200 VARIETIES

*25-Fold Increase*

*Annual Production:  
790 Million Tonnes*



*Grown in 69  
Countries*



73.2% WATER

6.6% SUGARS

20.2% OTHER

*2% Less Juicy*

*3.5x Sweeter*

*Still Rich in Starch!*



# NATURAL "WATERMELON" ~3000 B.C.

OPEN WITH A HAMMER  
OR SHARP OBJECT

EXTREMELY BITTER TASTE  
(SOME VARIETIES ARE BITTER-SWEET)

CAUSES INFLAMMATION



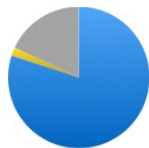
50 MM

18 SEEDS, VERY RICH IN FAT  
THEY TASTE NUTTY AND EXTREMELY BITTER

6 KNOWN VARIETIES



FOUND IN  
NAMIBIA &  
BOTSWANA



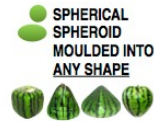
80.0% WATER

1.9% SUGARS

18.1% OTHER  
MOSTLY STARCH  
AND FAT

# ARTIFICIAL WATERMELON, 2014

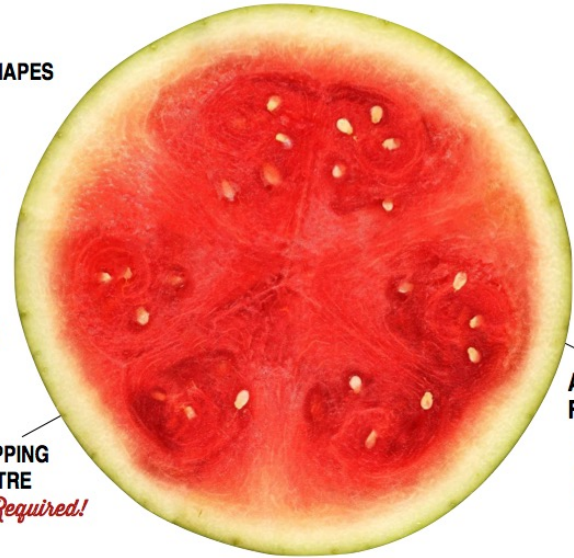
DIFFERENT SHAPES  
AVAILABLE:



*Reduces  
inflammation!*

*Seedless!*

OPEN BY DROPPING  
FROM ONE METRE  
*No Hammer Required!*



*Deliciously  
sweet & so  
juicy that it  
sometimes  
explodes  
when ripe*

AVAILABLE IN  
FOUR COLOURS:

- CREAM
- YELLOW
- LIME GREEN
- RED



~1200 VARIETIES  
*200-Fold Increase*

*Annual Production:  
95 Million Tonnes*



*Grown in 15  
Countries  
Most are grown in China*



91.5% WATER  
*14% Juicier*

6.2% SUGARS  
*3.3x Sweeter*

2.3% OTHER  
*Virtually Fat-Free  
and Starch-Free  
35x more Vitamin C*

# Como o Melhoramento Clássico é feito?



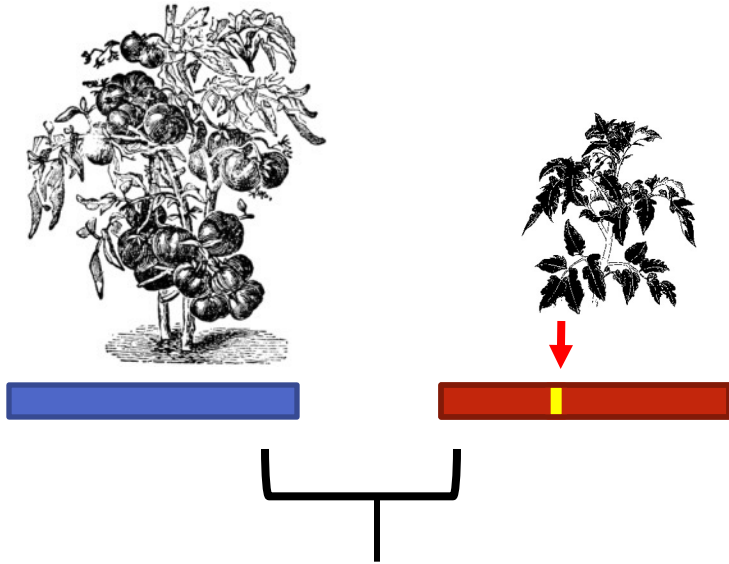
Tomate Elite

Objetivo: introduzir resistência à doença em um tomate elite.



Tomate pobre mas **resistente** (gene de resistência indicado)

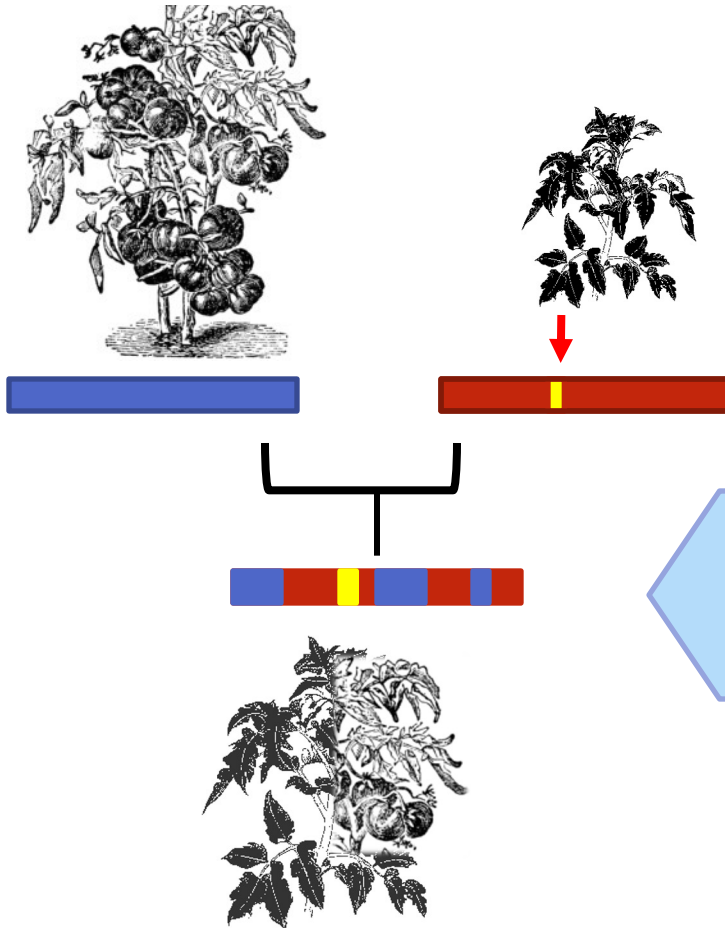
# Introgressão de um gene de resistência



Cruzamento das plantas. Algumas filhas herdam o caráter de resistência, outras não. Seleciona-se as resistentes para a próxima fase.

Photo by [Stephen Ausmus](#) USDA

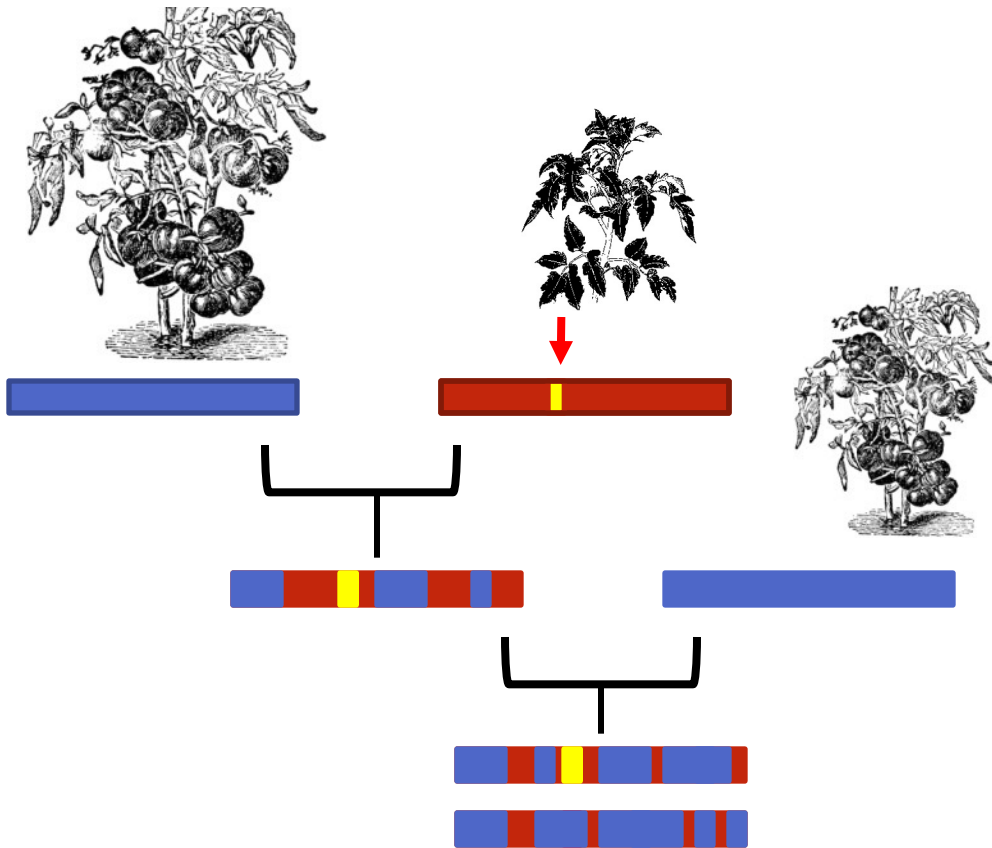
# Introgressão de um gene de resistência



Esta planta é um tomate elite?  
Não, metade dos seus genes  
são oriundos do tomate pobre

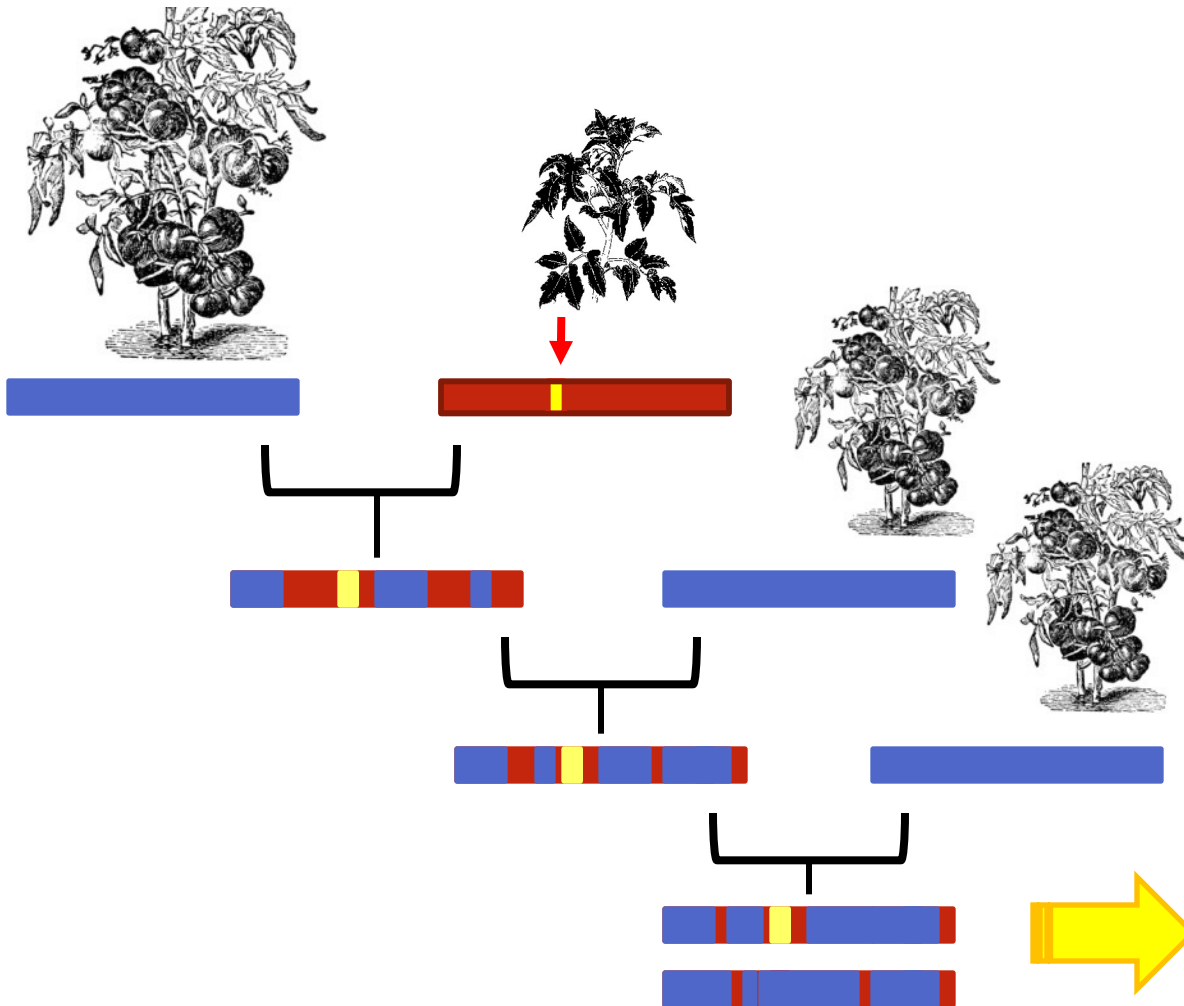


# Introgressão de um gene de resistência



Diversos rounds de retro-cruzamento com o genótipo elite são feitos para “limpar” o background do genótipo pobre.

# Introgressão de um gene de resistência



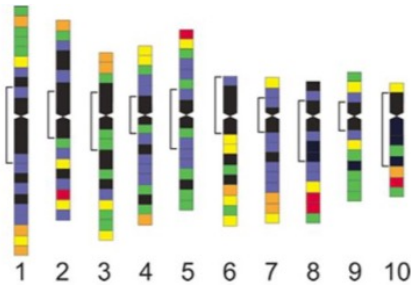
Após diversas gerações, gerou-se um tomate **elite** e **resistente**

# Limitações do Melhoramento Clássico

## Melhoramento Clássico



1. Característica no pool genético



2. Baixa especificidade (afeta vários genes)



3. Planta deve ser propagada sexualmente



4. Demorado

# Engenharia Genética (EG) é uma alternativa



EG permite a introdução de um **ÚNICO GENE** no genoma. Este método pode ser mais rápido que o melhoramento convencional.



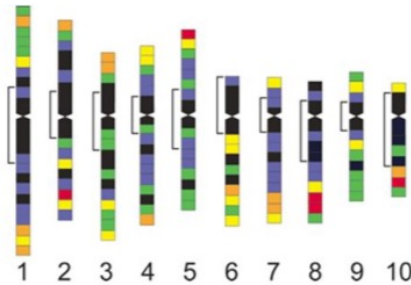
Tomate Elite

Planta **Resistente à Doença** (não precisa ser da mesma espécie)

Tomate Elite e **Resistente**

# Melhoramento x Engenharia

## Melhoramento Clássico



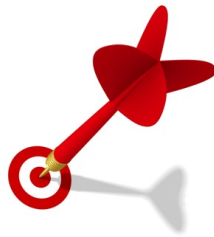
1. Característica no pool genético

2. Baixa especificidade (afeta vários genes)

3. Planta deve ser propagada sexualmente

4. Demorado

## Engenharia Genética




1. Gene pode vir de qualquer fonte

2. Altamente específico

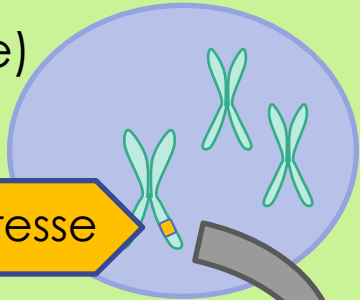
3. Planta pode ser propagada vegetativamente

4. Rápido

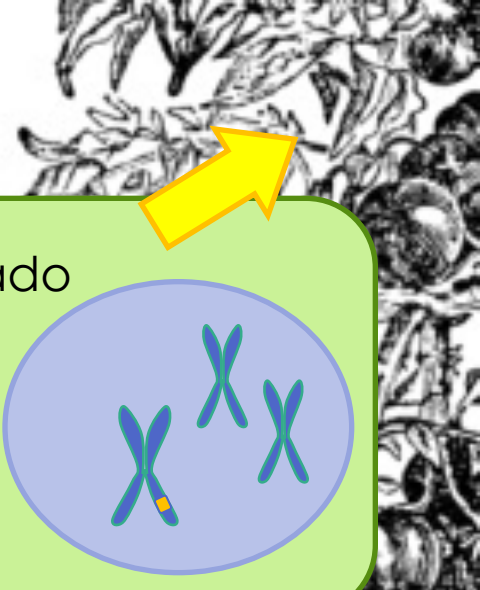


Fonte do gene  
(planta resistente)

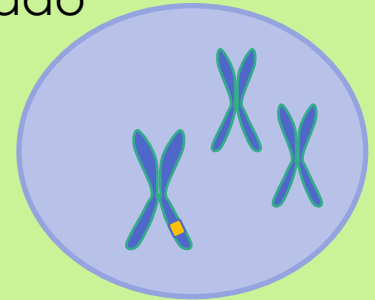
Gene de interesse



Isolamento do gene  
de interesse usando  
métodos de biologia  
molecular



Uma vez integrado  
no genoma da  
planta, o gene  
funciona como  
qualquer outro

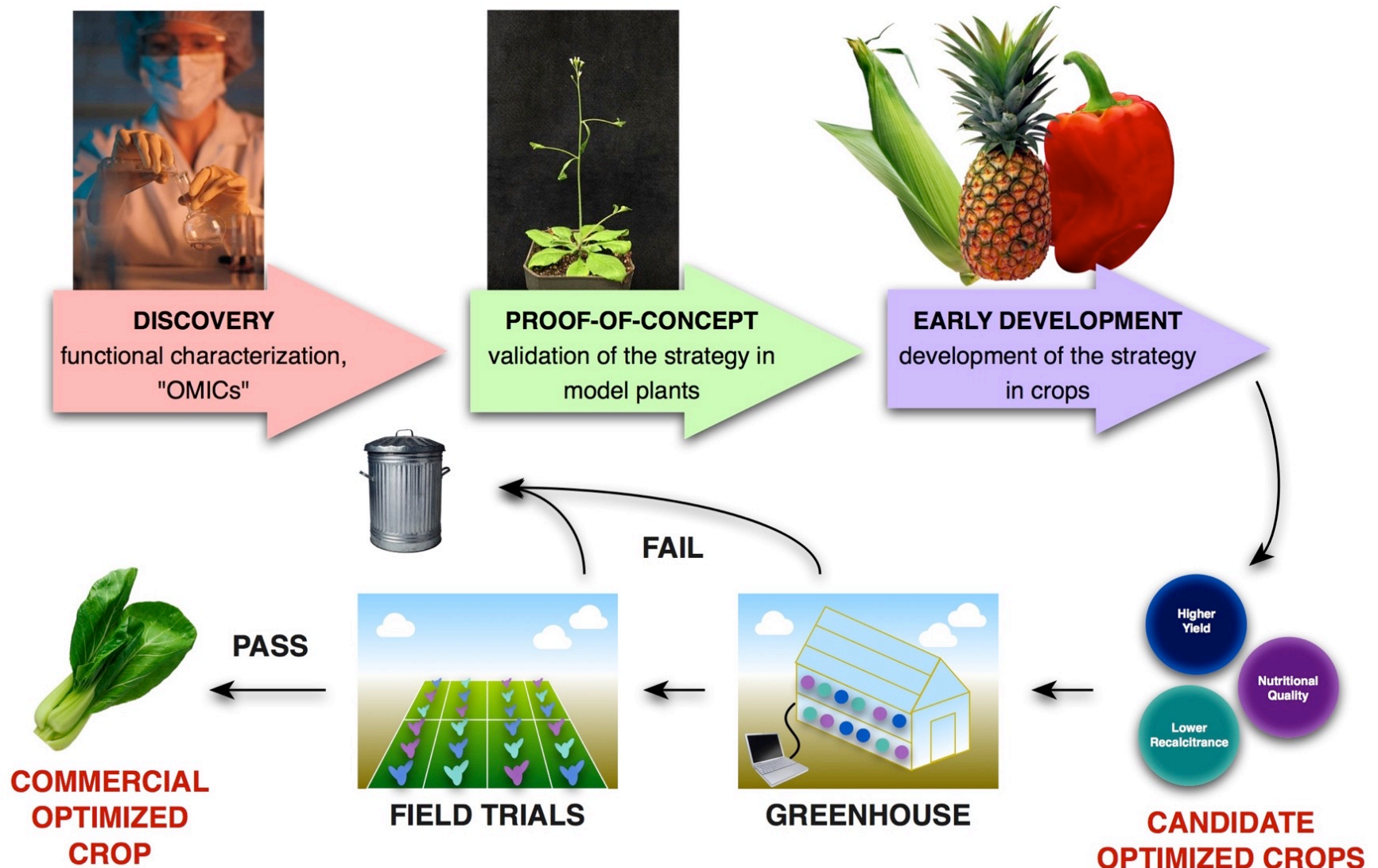


Recombinação  
no DNA da planta  
receptora



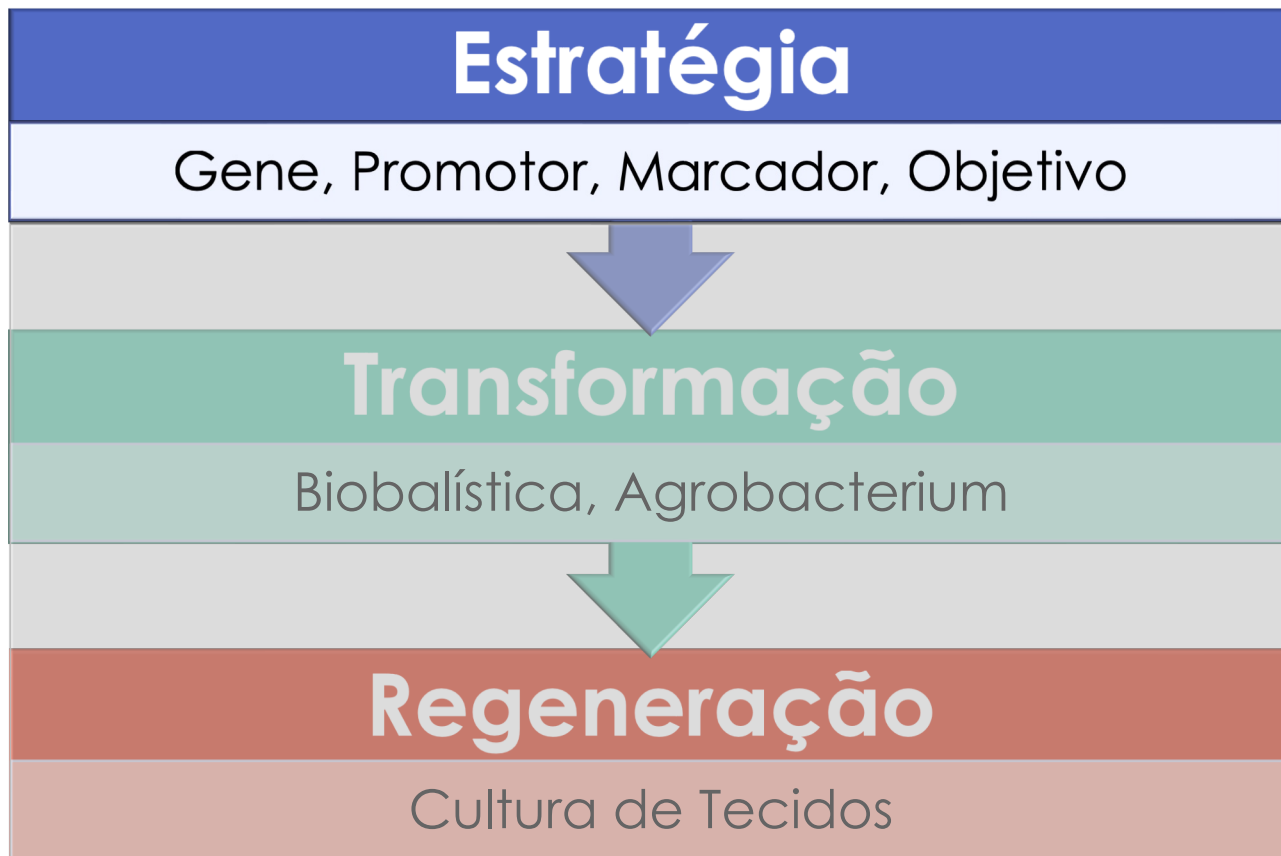


# Pipeline da Biotecnologia Vegetal



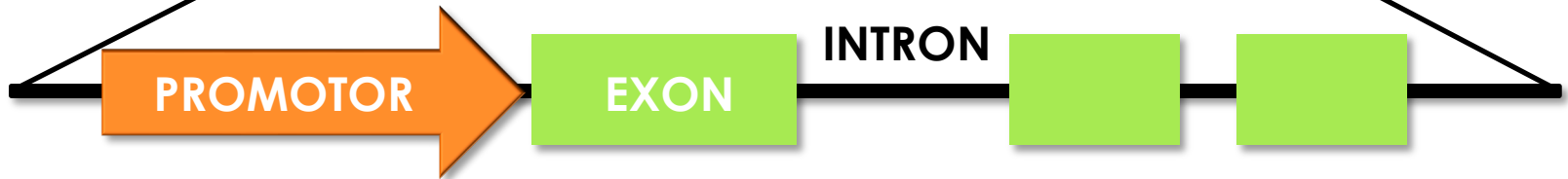
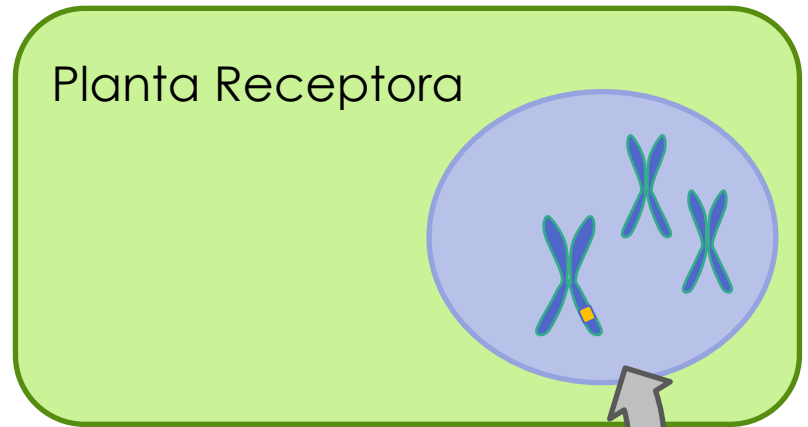
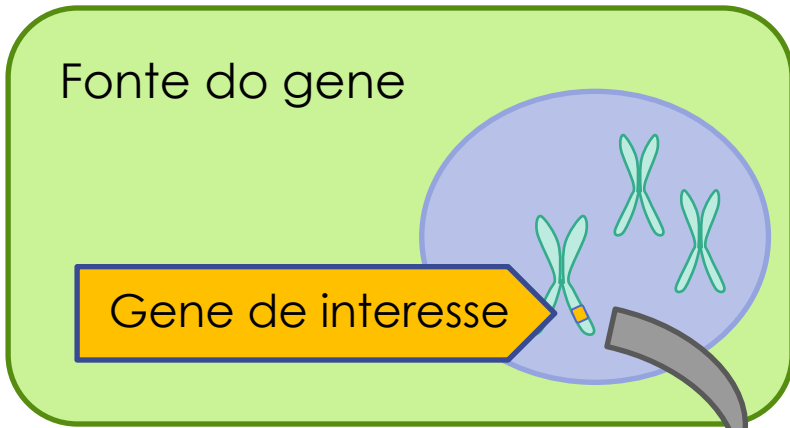


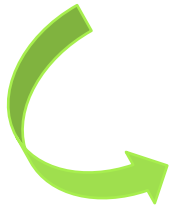
# Como funciona a Engenharia Genética de Plantas?





# 1. Estratégia: Qual o objetivo?

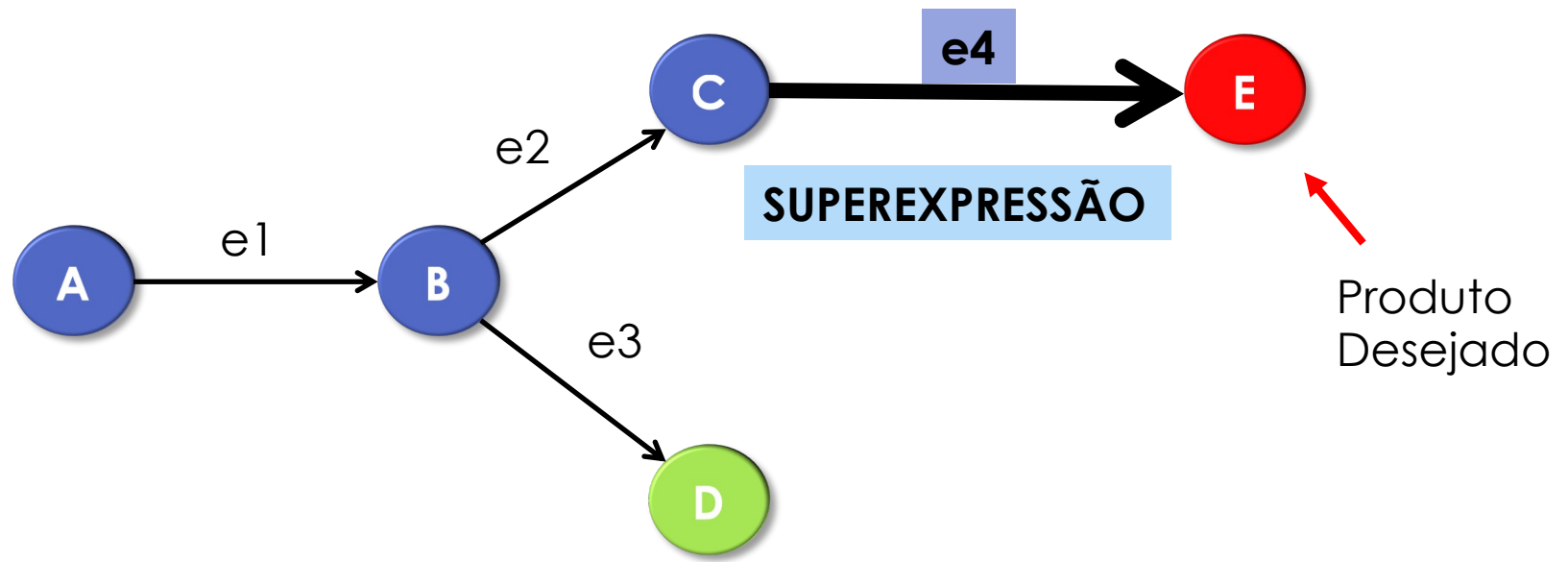
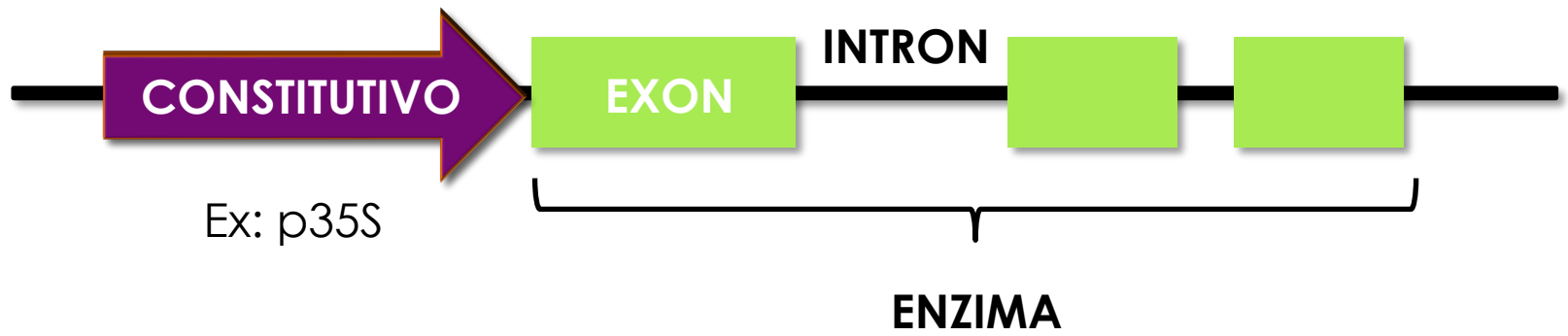






(b)

	Constitutive	Organ/Organelle Specific	Chemically Inducible	Environmentally Inducible
 <p><b>Dicot</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CaMV 35S</li> <li>• CaMV 35SS</li> <li>• Mac</li> <li>• MMV</li> <li>• Pact 2</li> <li>• tCUP4</li> </ul>	<p><i>Chloroplast</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tobacco Prn</li> <li>• PpsbA</li> </ul> <p><i>Leaf: Light-Inducible</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• RbcSK-1A</li> <li>• MRbcSK-1A</li> <li>• RbcS-3C</li> </ul>	<p><i>Ethanol</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• alcAmin35S</li> </ul> <p><i>β-estradiol</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• OlexA-46</li> </ul>	<p><i>Senescence</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• SAG12</li> </ul> <p><i>Heat Shock</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Soybean Heat Shock</li> </ul>
 <p><b>Monocot</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CaMV 35S</li> <li>• Maize Ubiquitin</li> <li>• Rice Actin (act1)</li> <li>• Rubi3</li> <li>• Ubiquitin</li> </ul>	<p><i>Bundle Sheath: Light-Inducible</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• RbcS1</li> </ul> <p><i>Mesophyll</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Maize PepC</li> </ul> <p><i>Embryo</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Glb1/Glb2</li> <li>• Zm-leg1A</li> </ul> <p><i>Endosperm</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Rice Glutelin/Gt1/Glub-4</li> <li>• Wheat Glutenin 1DX5</li> </ul>	<p><i>ABA (Embryo Specific)</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pr26</li> </ul>	<p><i>Senescence</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• LmSee1</li> <li>• Rice SGR</li> </ul> <p><i>Heat Shock</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Soybean Heat Shock</li> </ul>



**ENGENHARIA METABÓLICA**



# Resistência a insetos pela introdução do gene *Bt*

**Amendoim selvagem**



**Amendoim expressando gene *Bt***

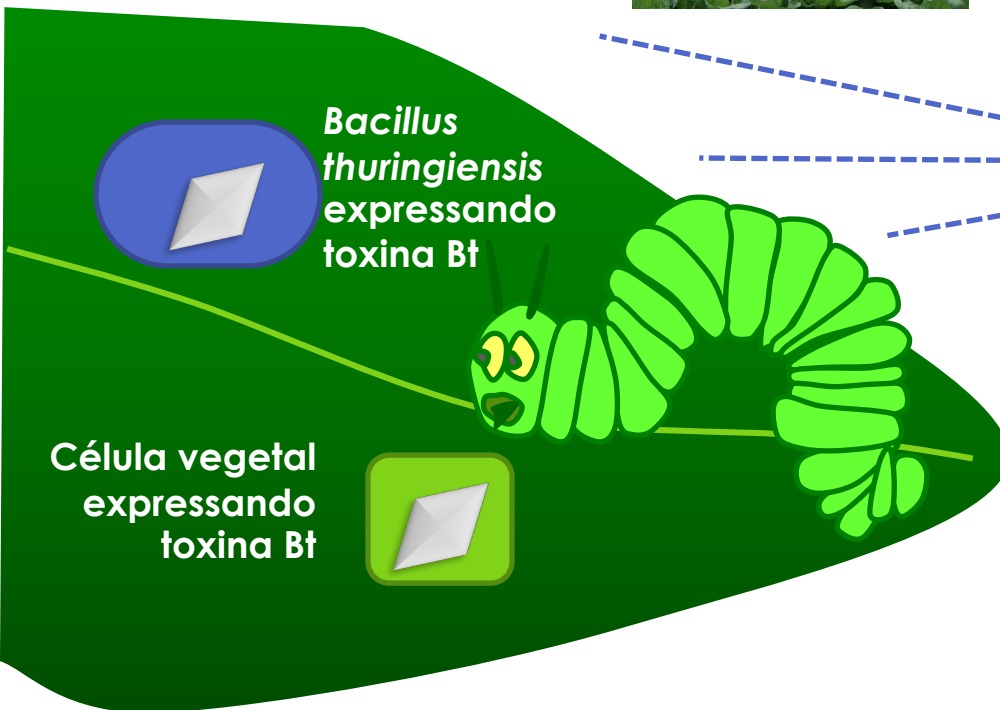


Photo by [Herb Pilcher](#) USDA

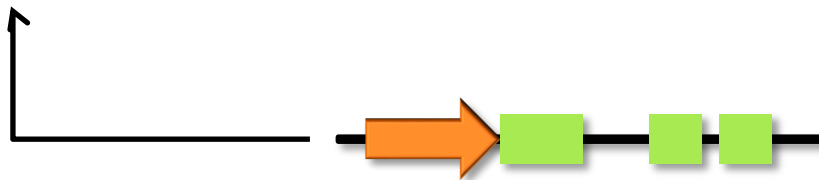
# Bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt) produz proteínas inseticidas



*Bacillus thuringiensis*  
expressando a toxina  
inseticida Bt toxin pode  
ser aplicada na planta



Ou a planta pode ser  
modificada para  
expressar o gene que  
codifica a toxina Bt

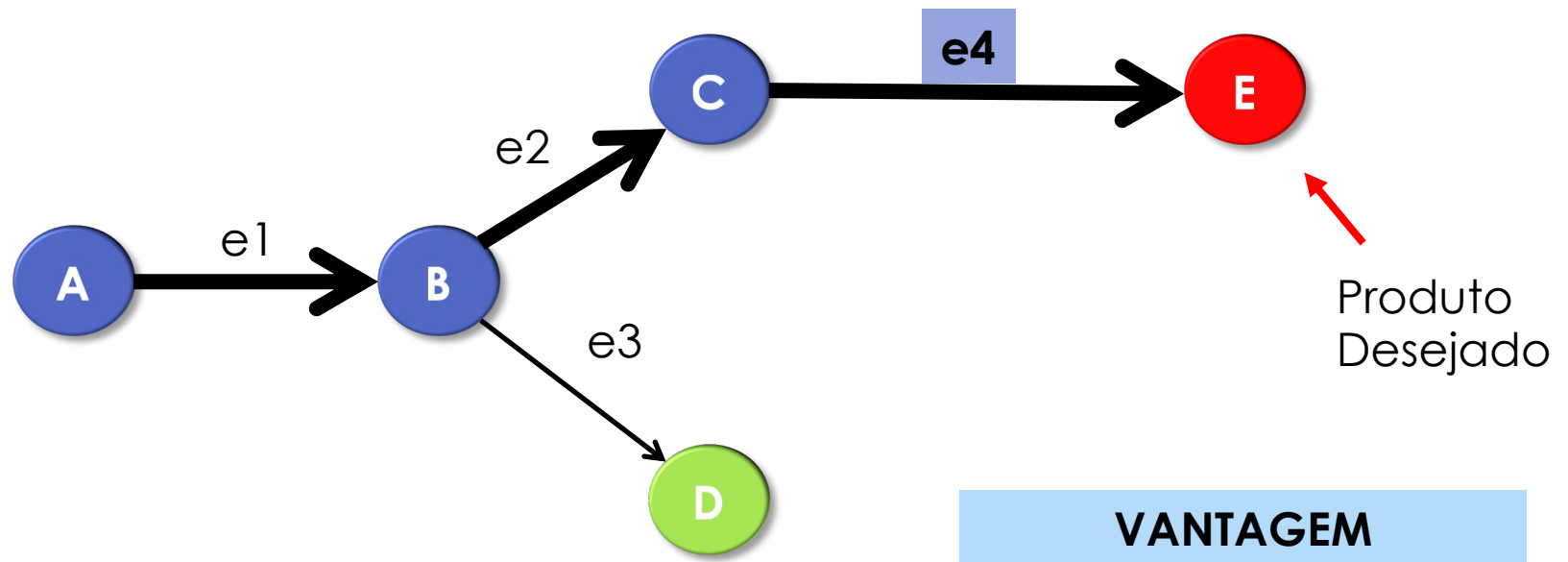
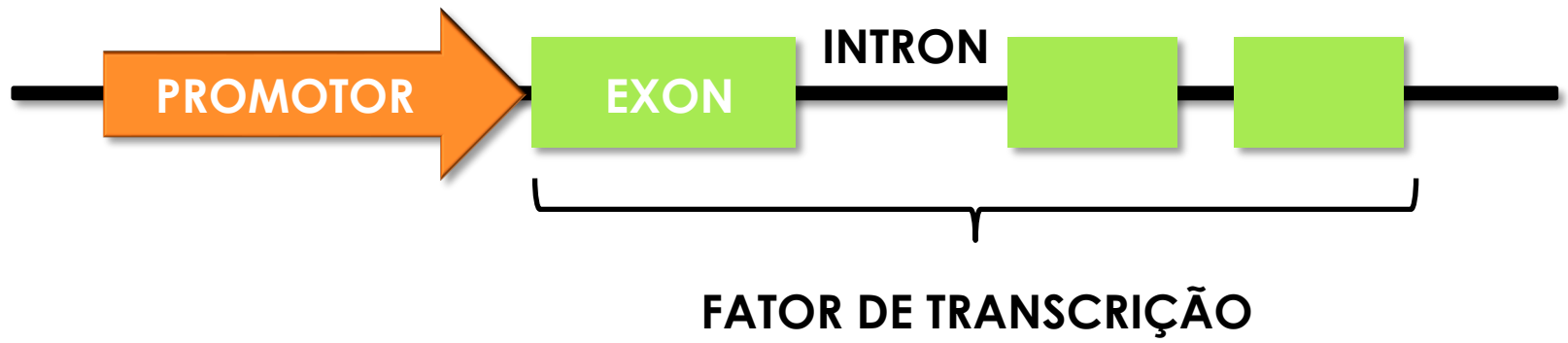




# Efeito da toxina Bt é altamente específico

**TABLE 1 | *Bt* Cry proteins in GM crops authorized for cultivation in one or more countries.**

<b>Protein</b>	<b>Insect type controlled</b>	<b>Crop species approved<sup>a</sup></b>	<b>Examples of products<sup>b</sup> (Registrant)</b>
Cry1Ab	Lepidoptera	Maize	YieldGard (Monsanto) Agrisure CB/LL (Syngenta)
Cry1Ac	Lepidoptera	Cotton Maize <sup>c</sup> Soy Brinjal	Bollgard (Monsanto) <i>Bt</i> Xtra (Monsanto) Intacta Roundup Ready 2 Pro (Monsanto) BARI <i>Bt</i> Begun-1, -2, -3, -4 (MAHYCO)
Cry1A.105 + Cry2Ab2	Lepidoptera	Maize	Genuity VT Double Pro (Monsanto)
Cry1Ac + Cry2Ab2	Lepidoptera	Cotton	Bollgard II (Monsanto)
Cry1Ac + Cry1F	Lepidoptera	Cotton Soy	WideStrike (Dow) DAS-81419-2 (Dow)
Cry1Fa2	Lepidoptera	Maize	Herculex I (Dow)
Cry1Ab + Cry2Ae	Lepidoptera	Cotton	TwinLink (Bayer)
mCry3A	Coleoptera	Maize	Agrisure RW (Syngenta)
Cry3Bb1	Coleoptera	Maize	YieldGard Rootworm RW (Monsanto)
eCry3.1Ab <sup>d</sup>	Multiple	Maize	Agrisure Duracade (Syngenta)
Cry34Ab1 + Cry35Ab1	Coleoptera	Maize	Herculex RW (Dow and DuPont)

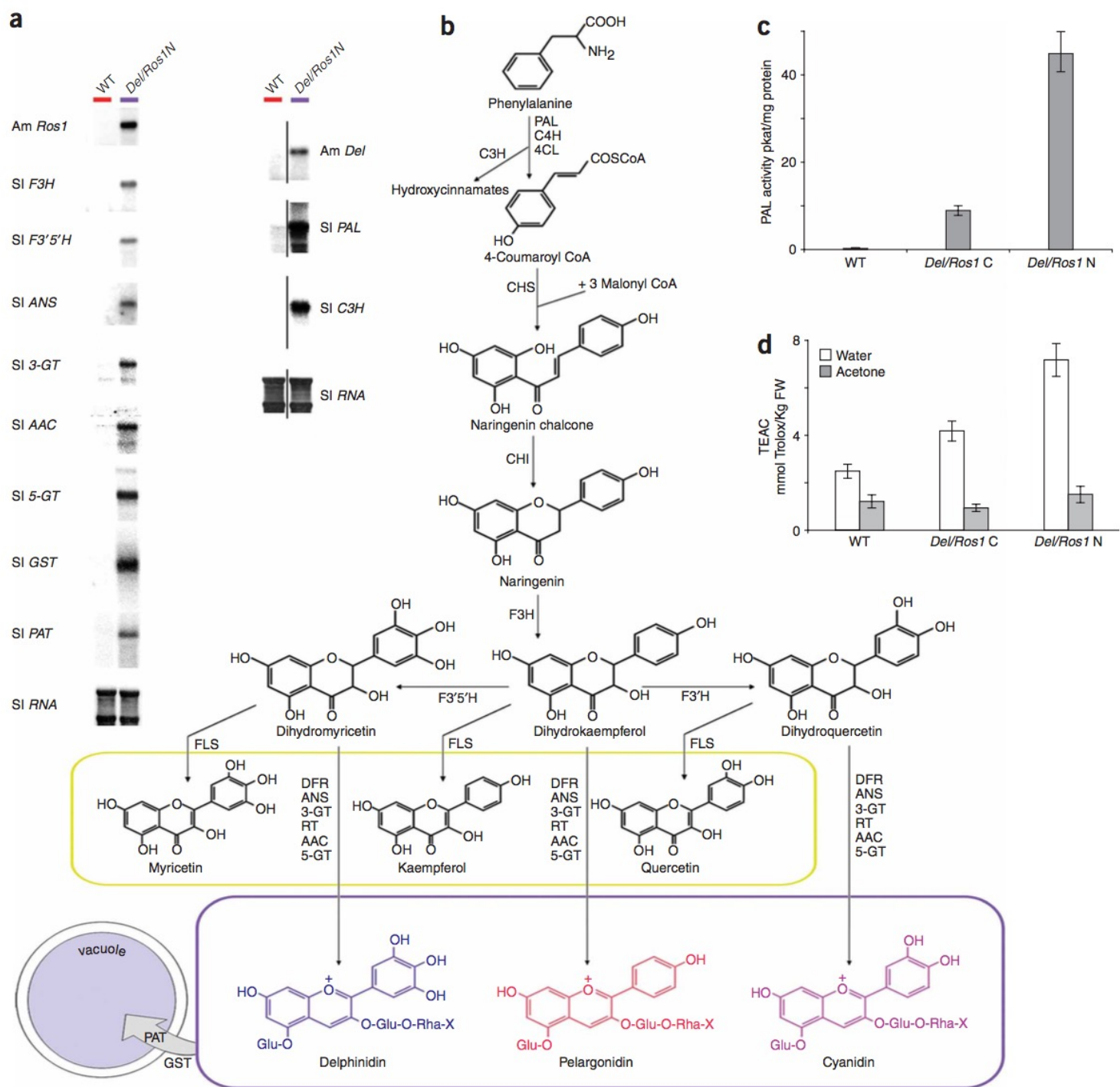


**ENGENHARIA METABÓLICA**

**VANTAGEM**  
vários genes ao mesmo tempo

# Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors

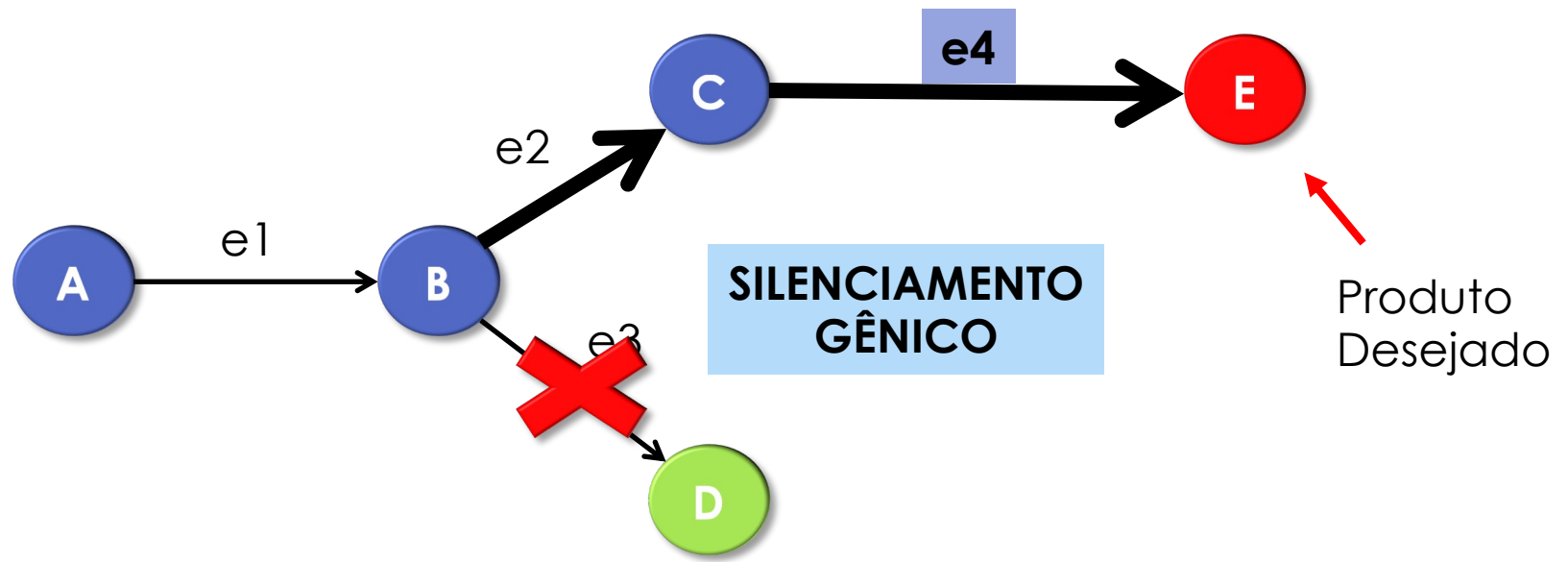
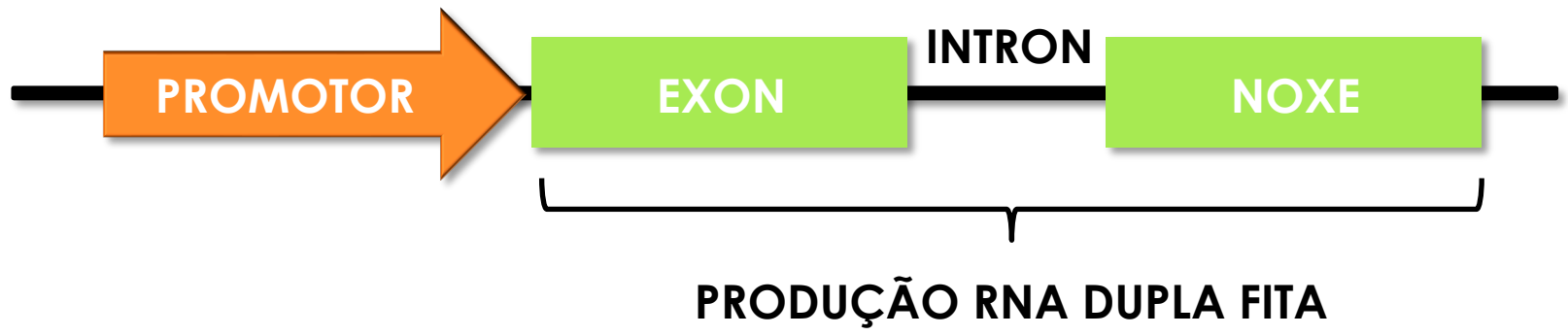
Eugenio Butelli<sup>1</sup>, Lucilla Titta<sup>2</sup>, Marco Giorgio<sup>2</sup>, Hans-Peter Mock<sup>3</sup>, Andrea Matros<sup>3</sup>, Silke Peterek<sup>3</sup>, Elio G W M Schijlen<sup>4</sup>, Robert D Hall<sup>5</sup>, Arnaud G Bovy<sup>4</sup>, Jie Luo<sup>1</sup> & Cathie Martin<sup>1</sup>



# Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors

Eugenio Butelli<sup>1</sup>, Lucilla Titta<sup>2</sup>, Marco Giorgio<sup>2</sup>, Hans-Peter Mock<sup>3</sup>, Andrea Matros<sup>3</sup>, Silke Peterek<sup>3</sup>, Elio G W M Schijlen<sup>4</sup>, Robert D Hall<sup>5</sup>, Arnaud G Bovy<sup>4</sup>, Jie Luo<sup>1</sup> & Cathie Martin<sup>1</sup>





ENGENHARIA METABÓLICA

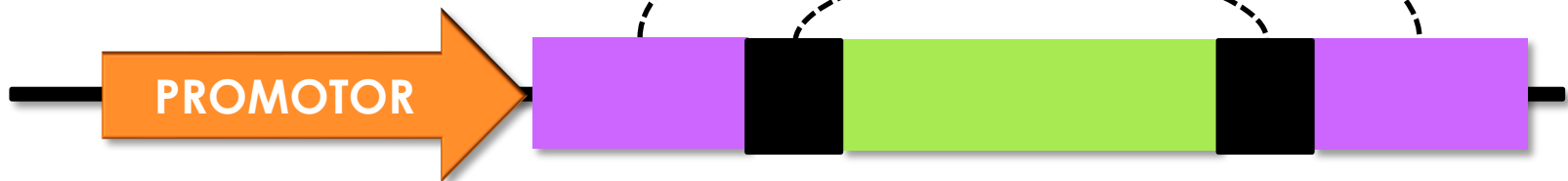
## ANTISENSO



## HAIRPIN



## amiRNA





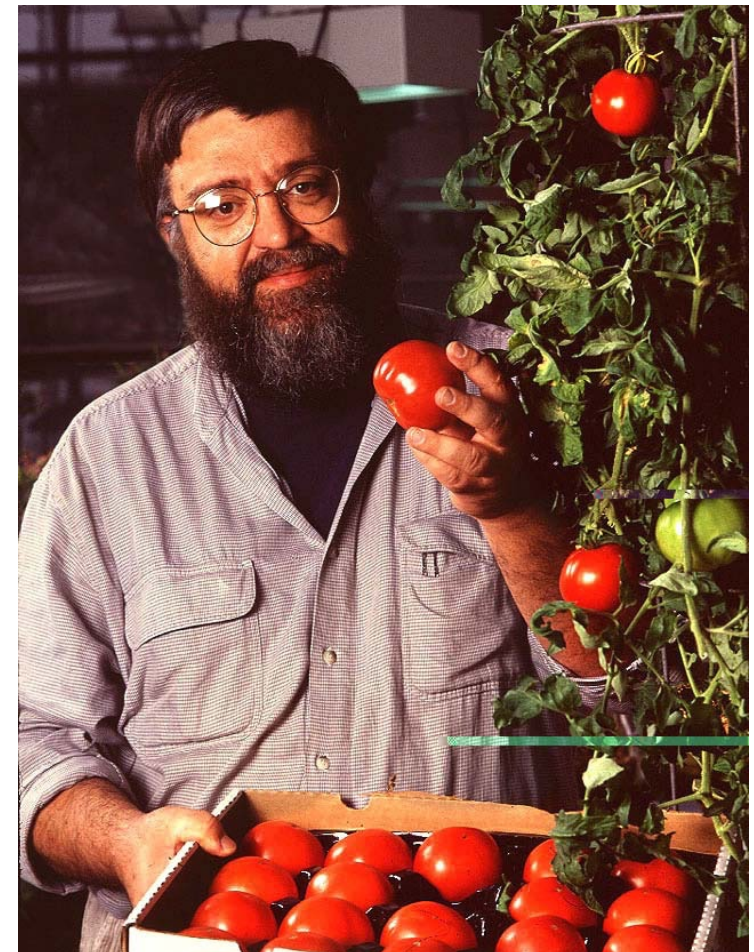
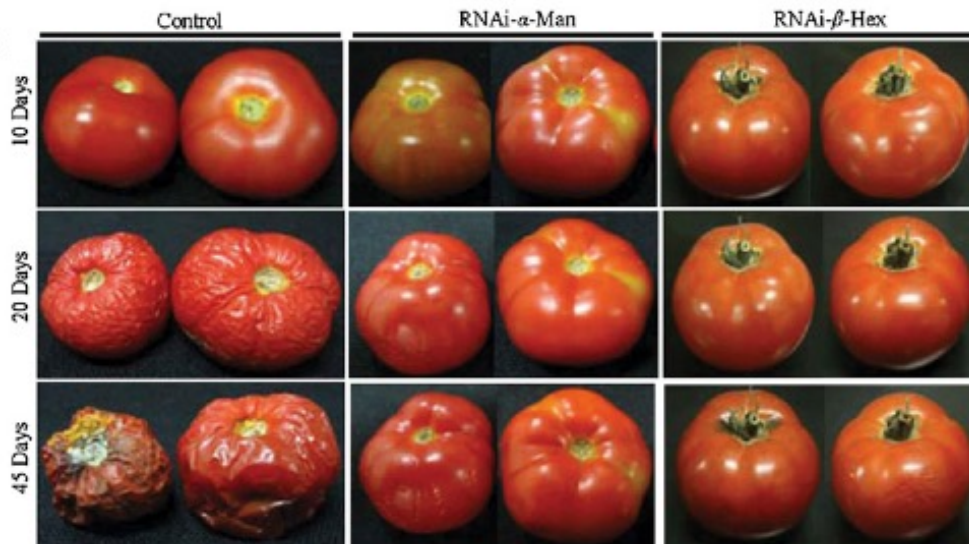
# Tomate FLAVR SAVR, o primeiro alimento transgênico comercializado (1992)

MONSANTO

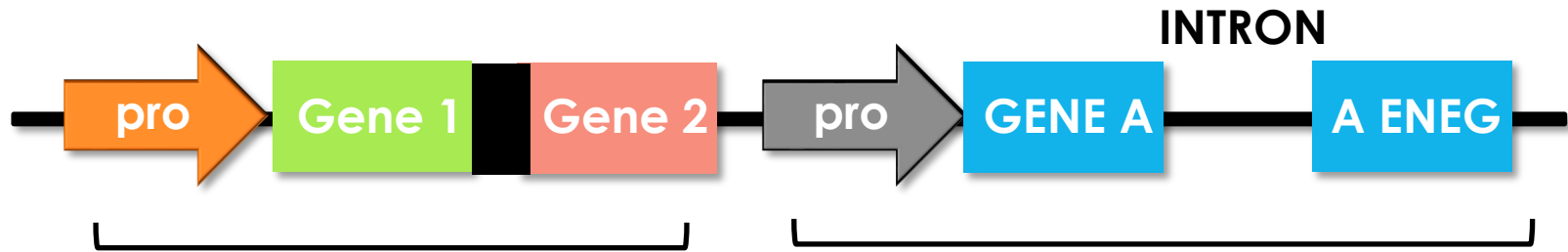


Tomate “Longa Vida”  
(amadurecimento retardado)

Silenciamento de enzimas de  
degradação de parede celular



# Combinação de Estratégias (Gene Stacking)

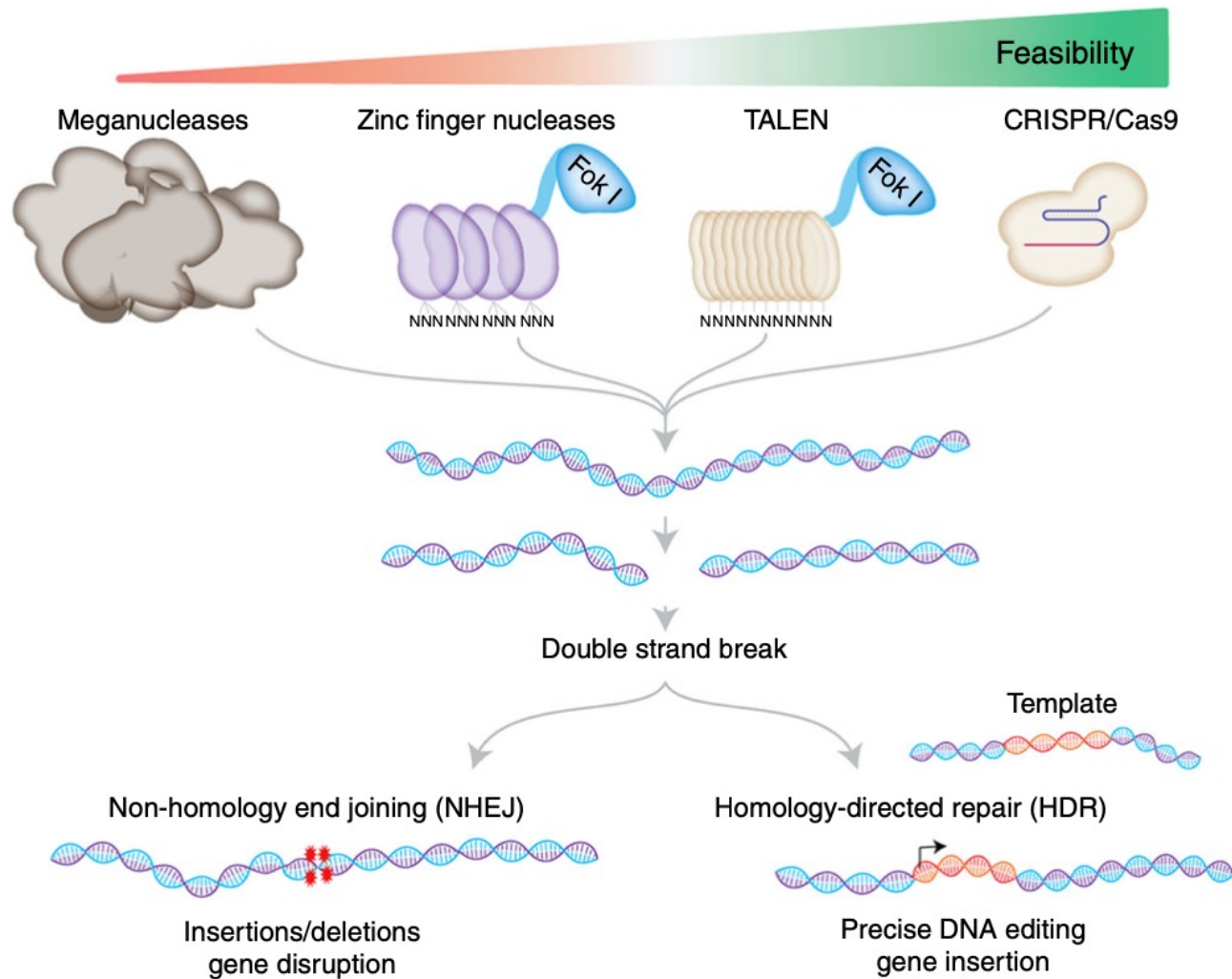


Produção de um  
metabólito de  
interesse

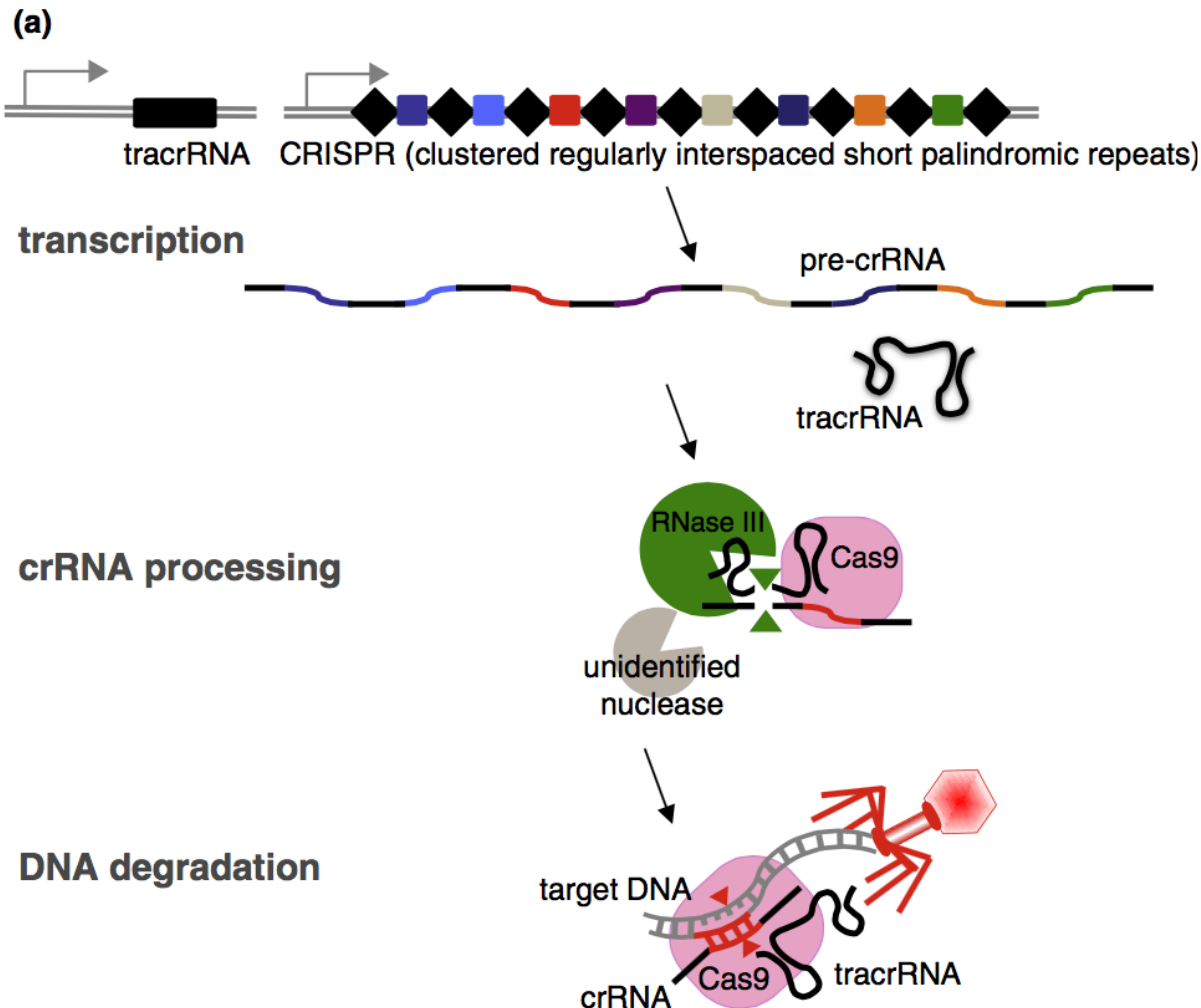
Silenciamento de  
uma via  
competidora

O avanço das técnicas de biologia molecular e biologia sintética oferece novas oportunidades para estratégias biotecnológicas

# Edição genômica: uma nova era na biologia molecular



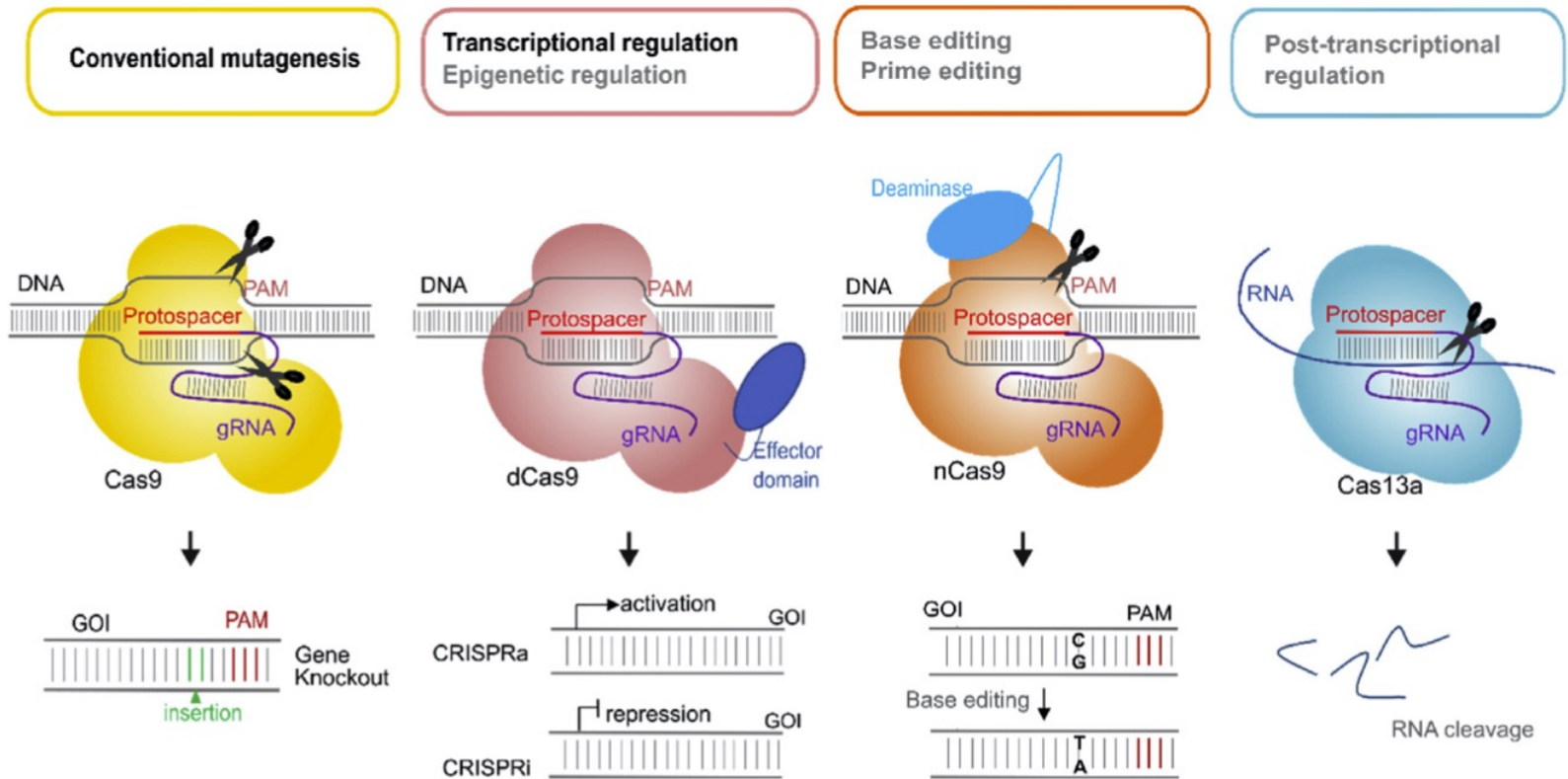
# CRISPR: parte do sistema imune de bactérias



# CRISPR: muito mais do que edição genômica

**b**

CRISPR/Cas tools and their applications



Current Opinion in Plant Biology



# CRISPR-TSKO: edição genômica tecido-específica

## CRISPR-TSKO: A Technique for Efficient Mutagenesis in Specific Cell Types, Tissues, or Organs in Arabidopsis<sup>[OPEN]</sup>

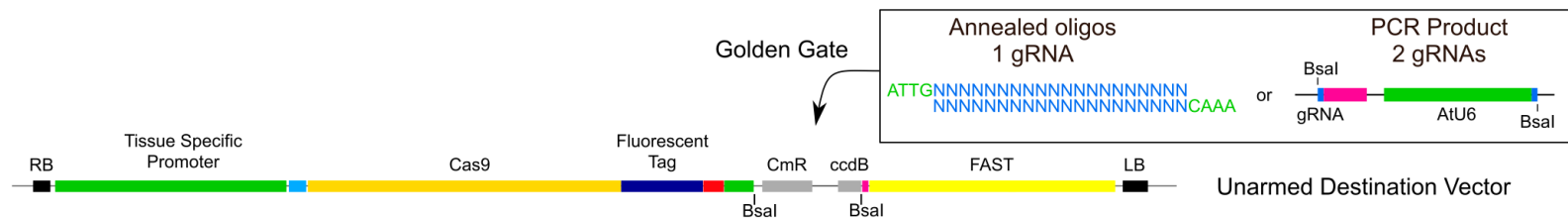
Ward Decaestecker,<sup>a,b,1</sup> Rafael Andrade Bueno,<sup>a,b,1</sup> Marie L. Pfeiffer,<sup>a,b</sup> Nick Vangheluwe,<sup>a,b</sup> Joris Jourquin,<sup>a,b</sup> Mansour Karimi,<sup>a,b</sup> Gert Van Isterdael,<sup>c,d</sup> Tom Beeckman,<sup>a,b</sup> Moritz K. Nowack,<sup>a,b,2</sup> and Thomas B. Jacobs<sup>a,b,2</sup>

<sup>a</sup>Department of Plant Biotechnology and Bioinformatics, Ghent University, Technologiepark 71, 9052 Ghent, Belgium

<sup>b</sup>VIB Center for Plant Systems Biology, Technologiepark 71, 9052 Ghent, Belgium

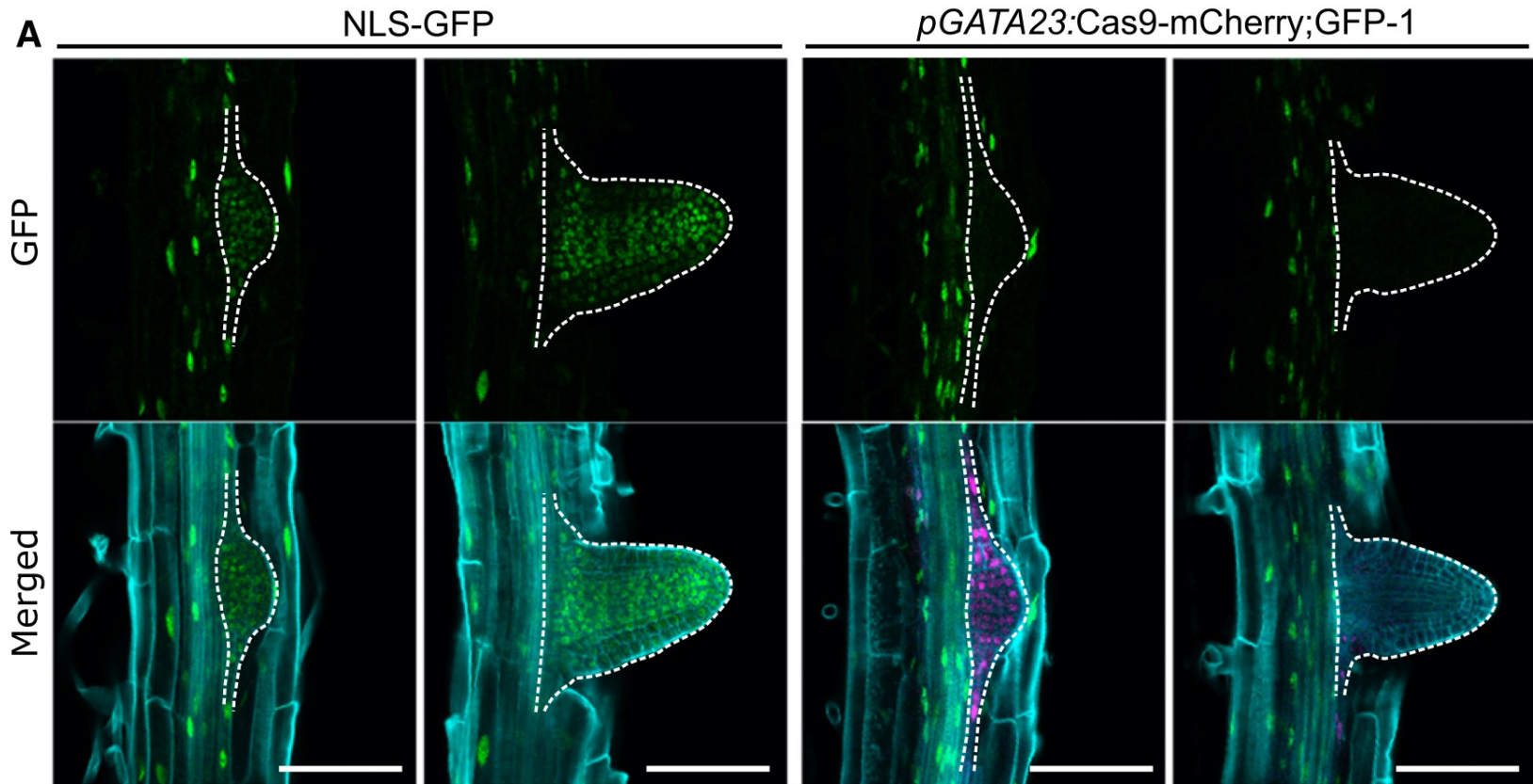
<sup>c</sup>VIB Flow Core, VIB Center for Inflammation Research, Technologiepark 71, B-9052 Ghent, Belgium

<sup>d</sup>Department of Biomedical Molecular Biology, Ghent University, Ghent, Belgium

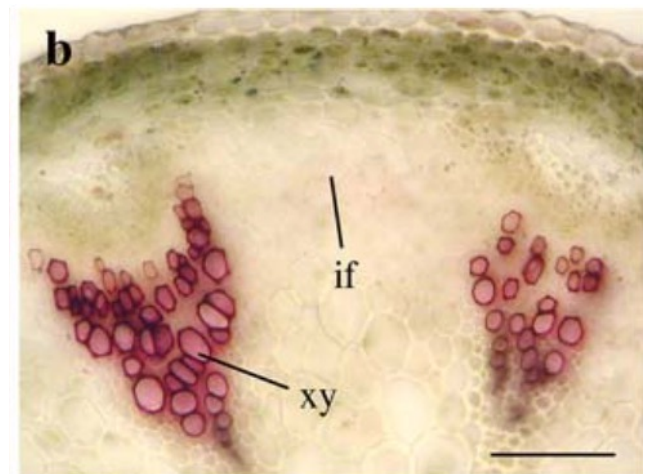
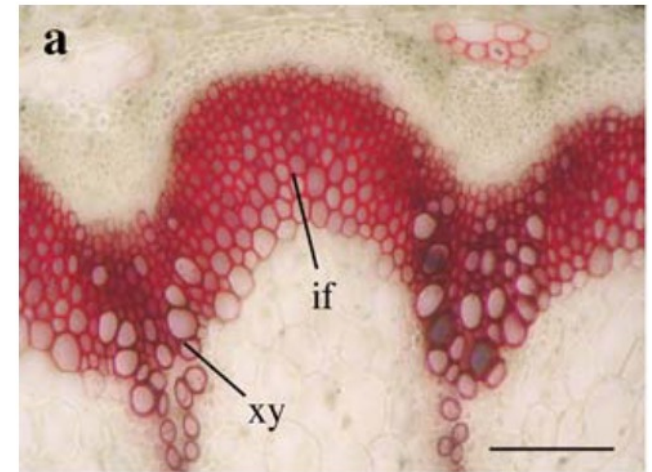
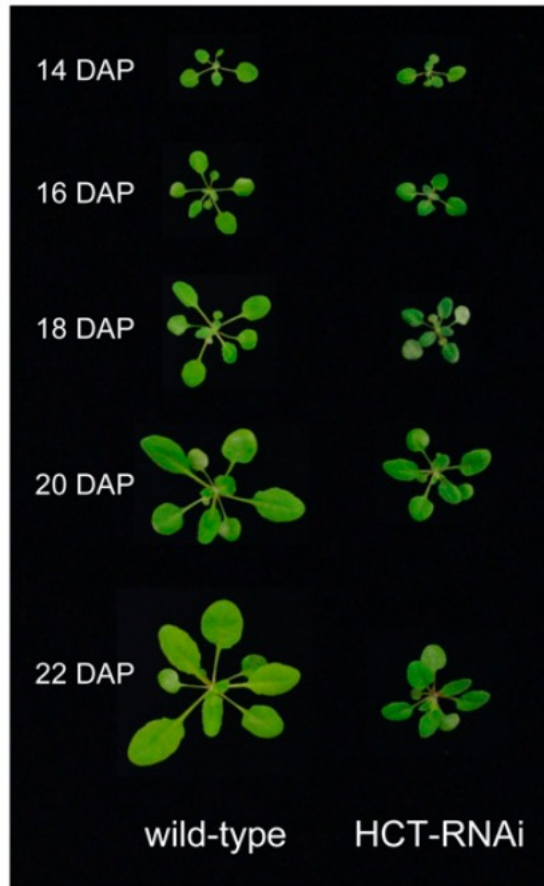




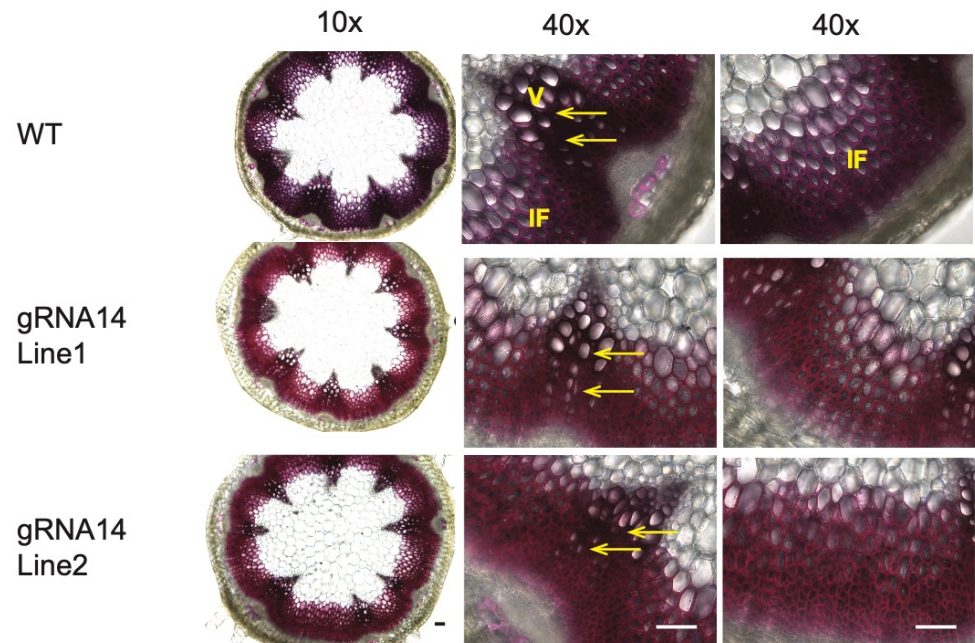
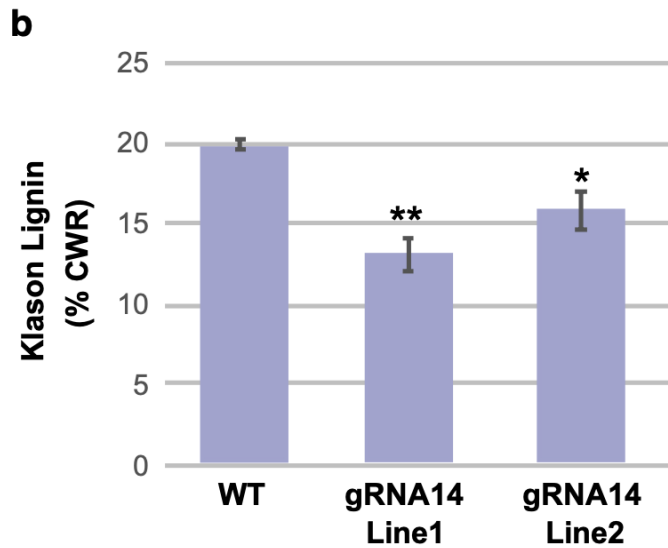
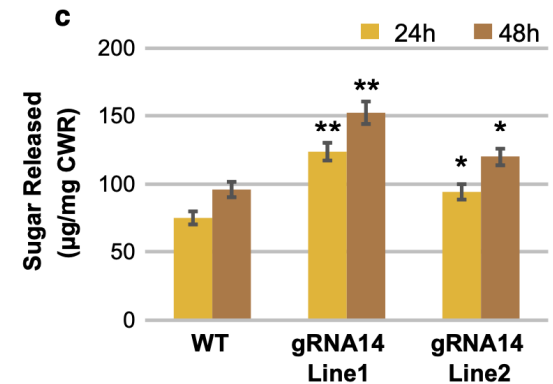
# Knockout de GFP especificamente em raízes laterais em desenvolvimento



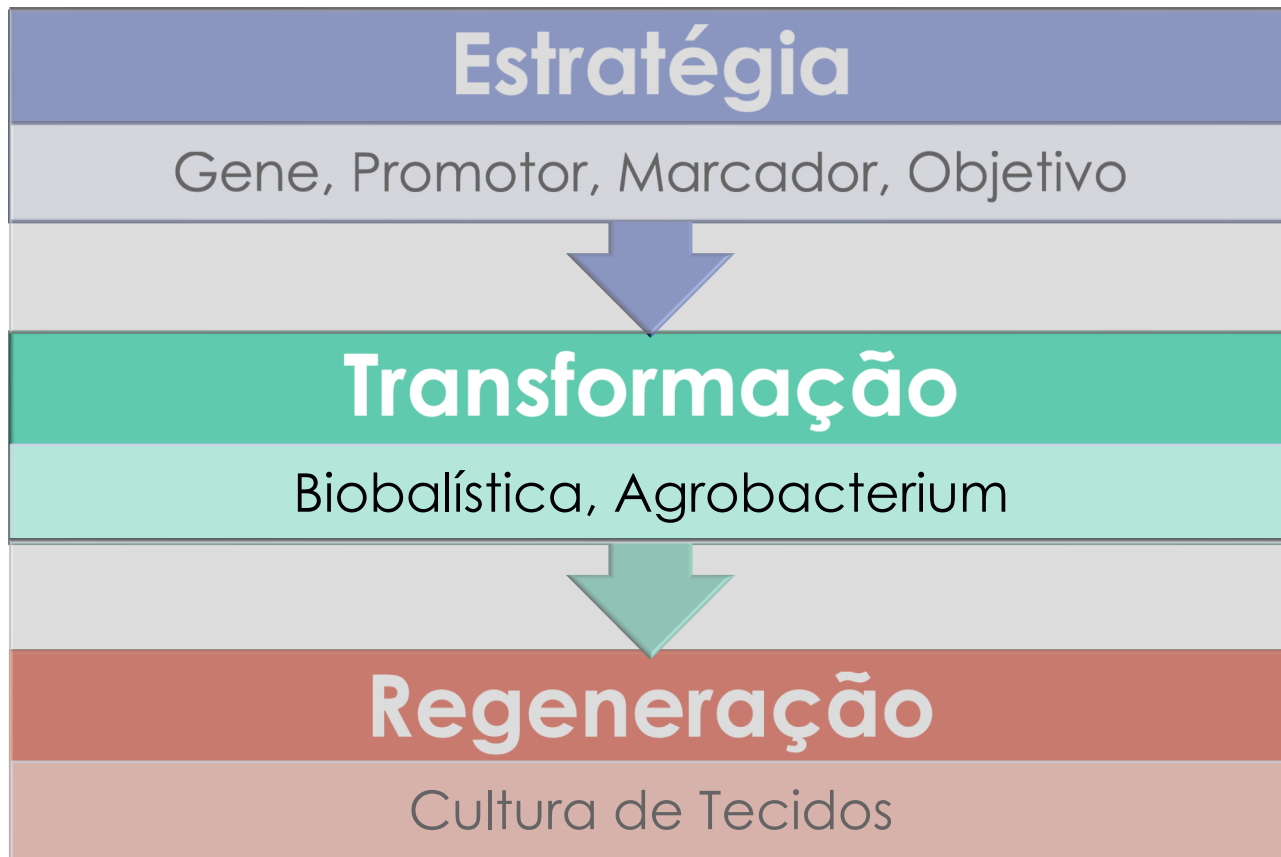
# Manipulação da deposição de lignina em fibras por meio de CRISPR-TSKO



# Manipulação da deposição de lignina em fibras por meio de CRISPR-TSKO



# Como funciona a Engenharia Genética de Plantas?

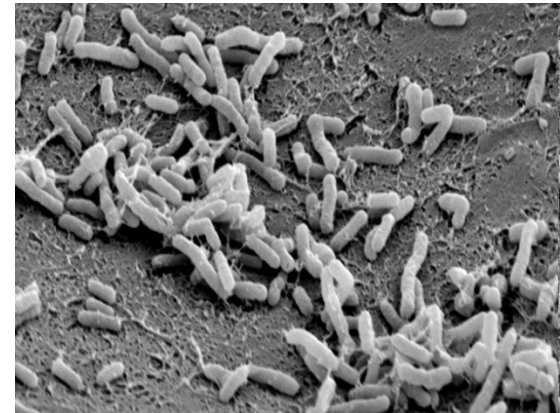




*Agrobacterium tumefaciens*:  
Bactéria que provoca uma doença nas plantas  
(tumor no caule)

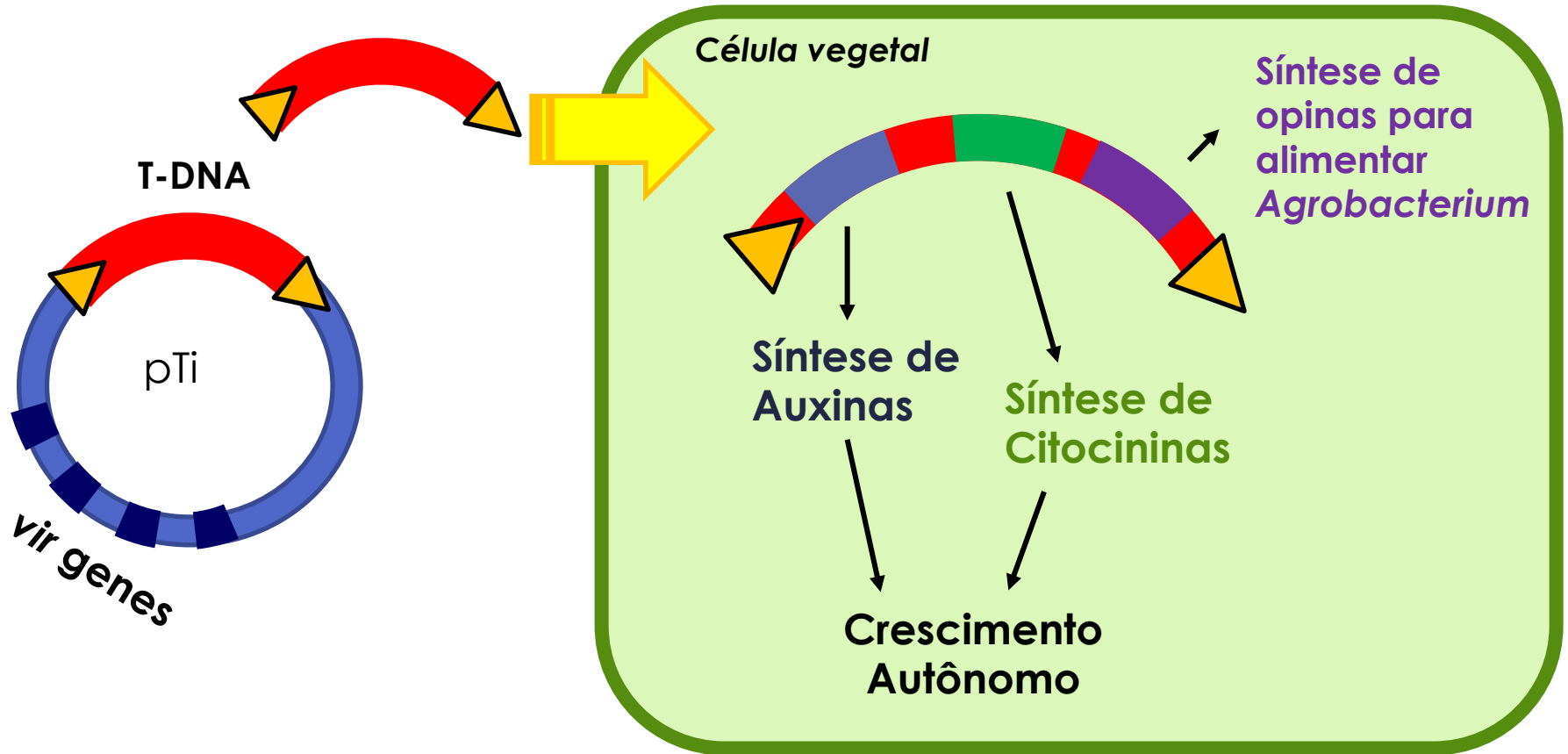


**galha-de-coroa**



*A. tumefaciens*

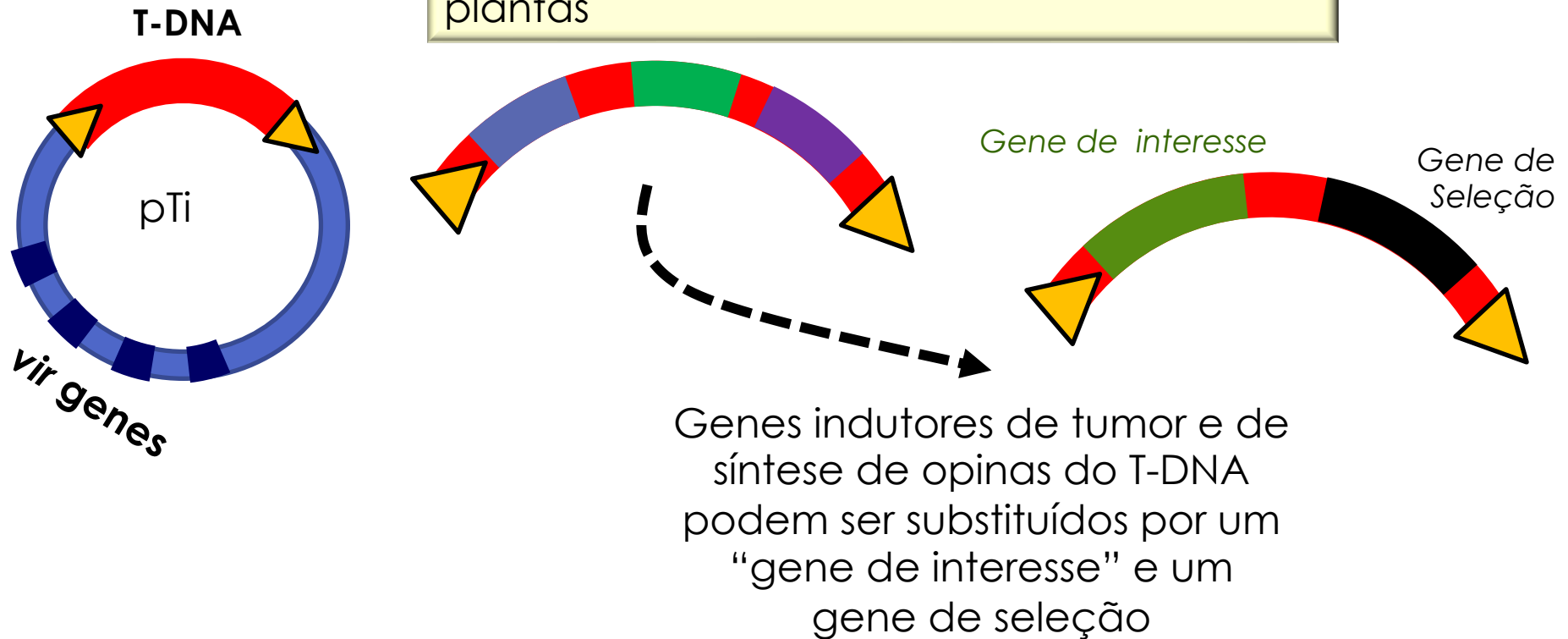
# T-DNA: genes indutores de tumor e da síntese de opinas





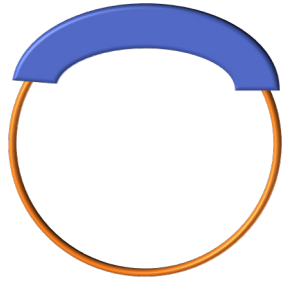
# Plasmídeo Ti pode ser usado para introduzir genes de interesse

A descoberta que o T-DNA era inserido no genoma da planta indicou a possibilidade de “qualquer gene” ser transferido para plantas

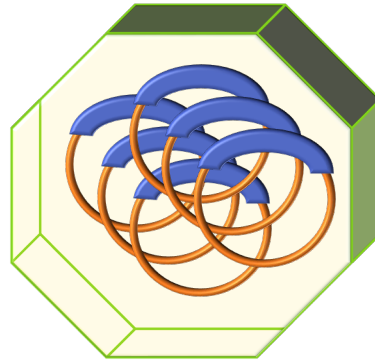


Genes indutores de tumor e de síntese de opinas do T-DNA podem ser substituídos por um “gene de interesse” e um gene de seleção

# Biobalística



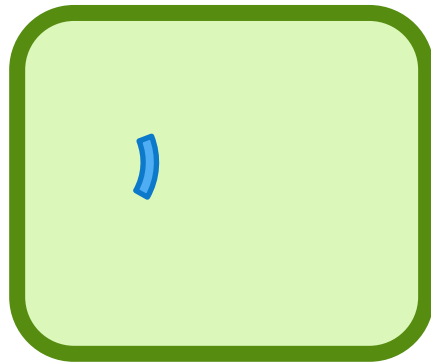
Preparação do Plasmídio



Encapsulamento com ouro/tungstênio



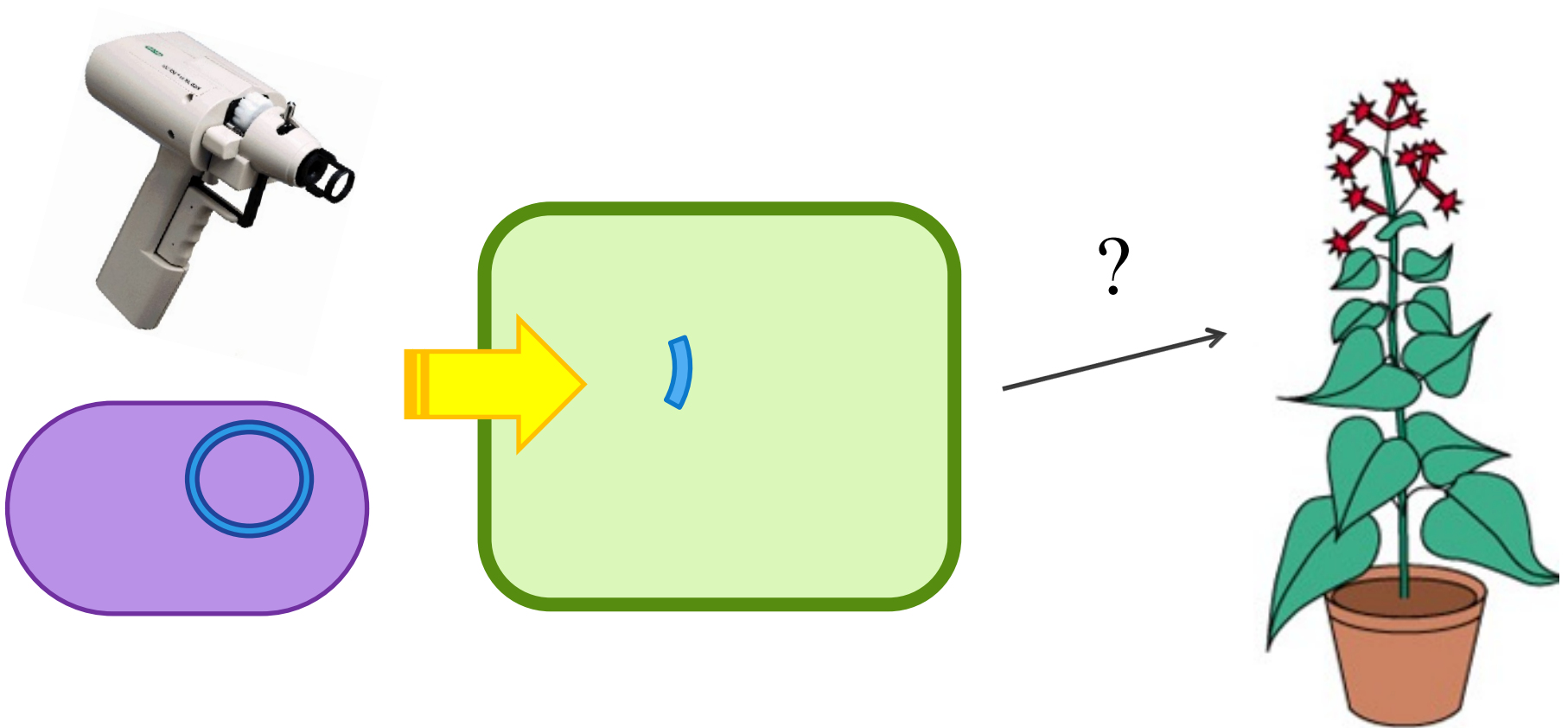
Gene gun



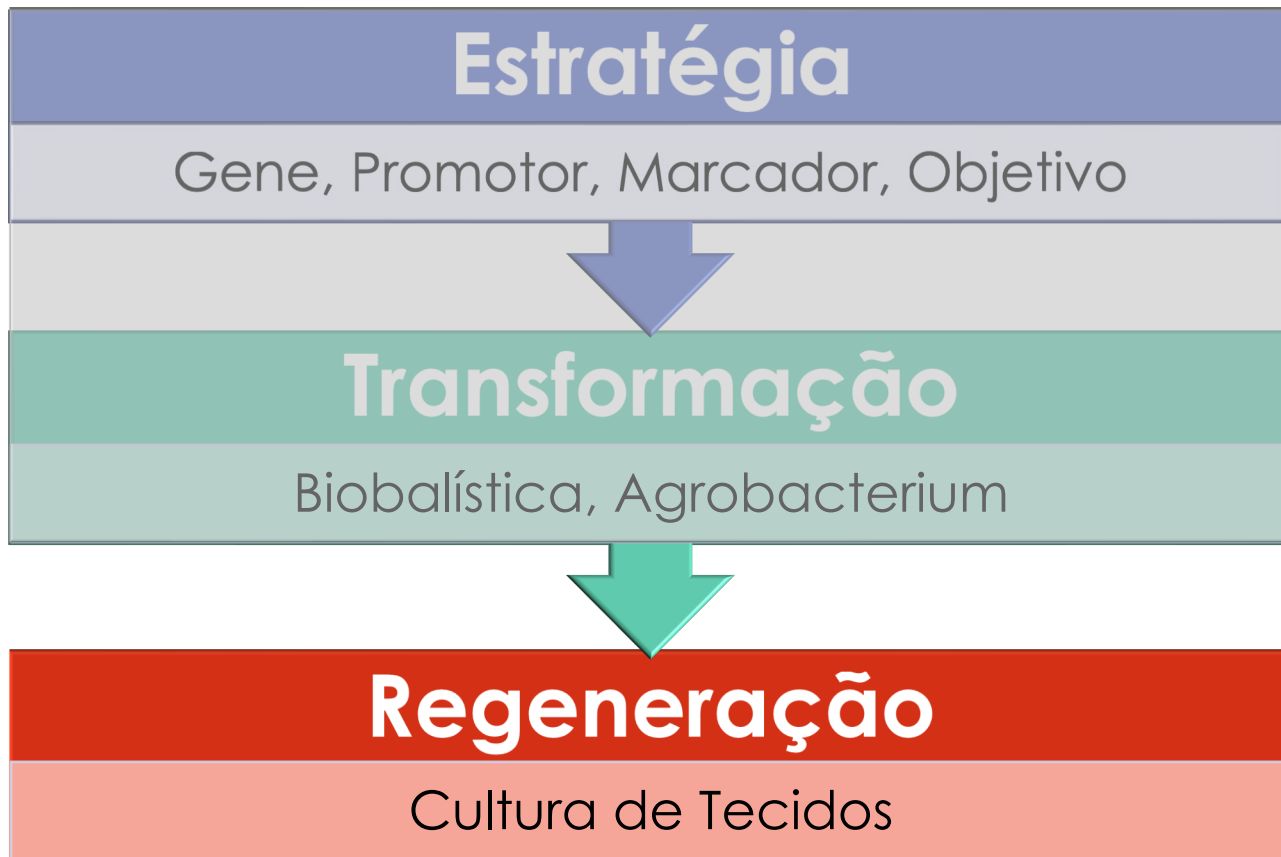
Integração do transgene no DNA nuclear



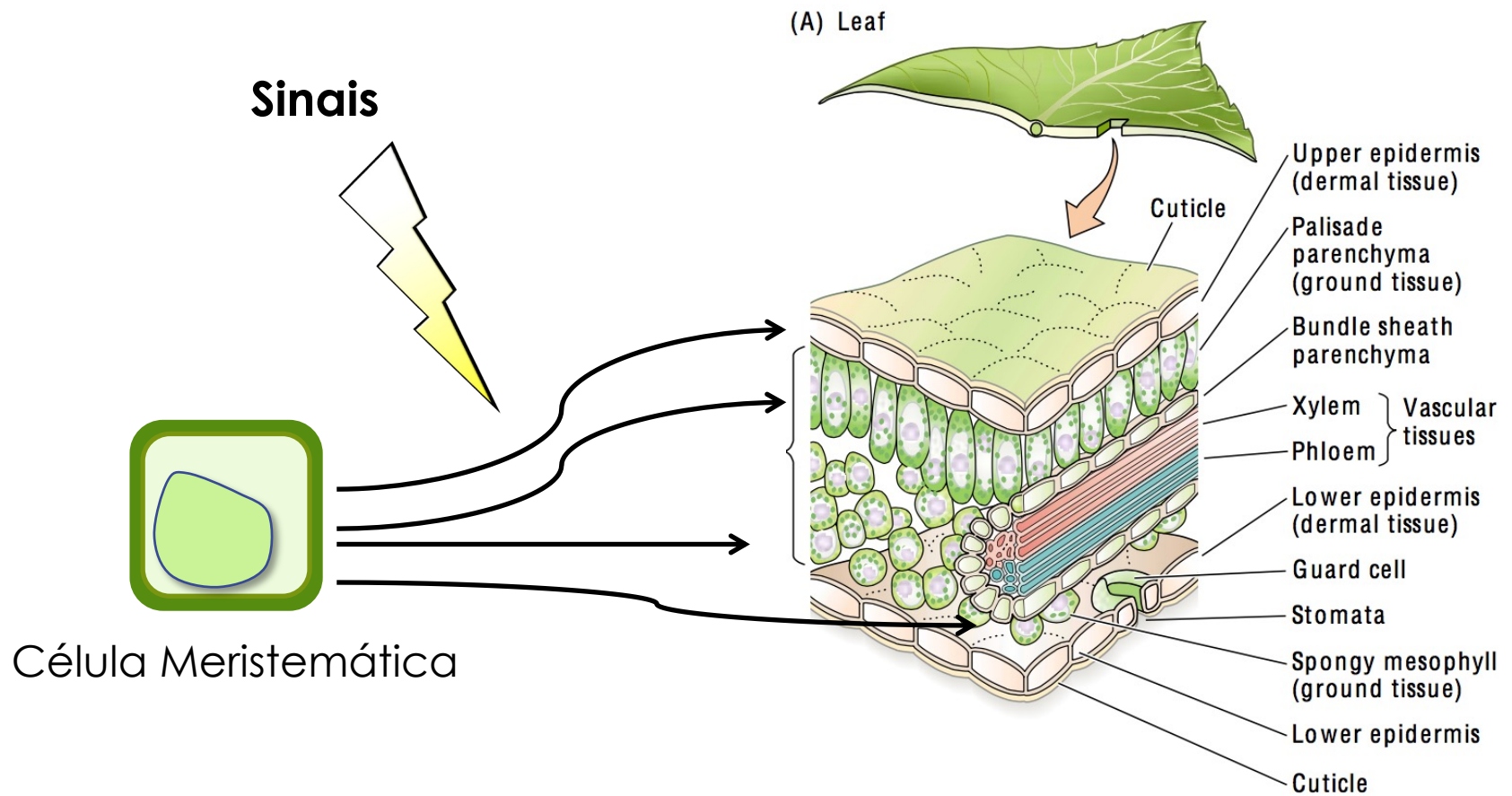
Alteramos o plasmídio, o introduzimos na bactéria, e a bactéria transforma a célula vegetal, mas.....



# Como funciona a Engenharia Genética de Plantas?

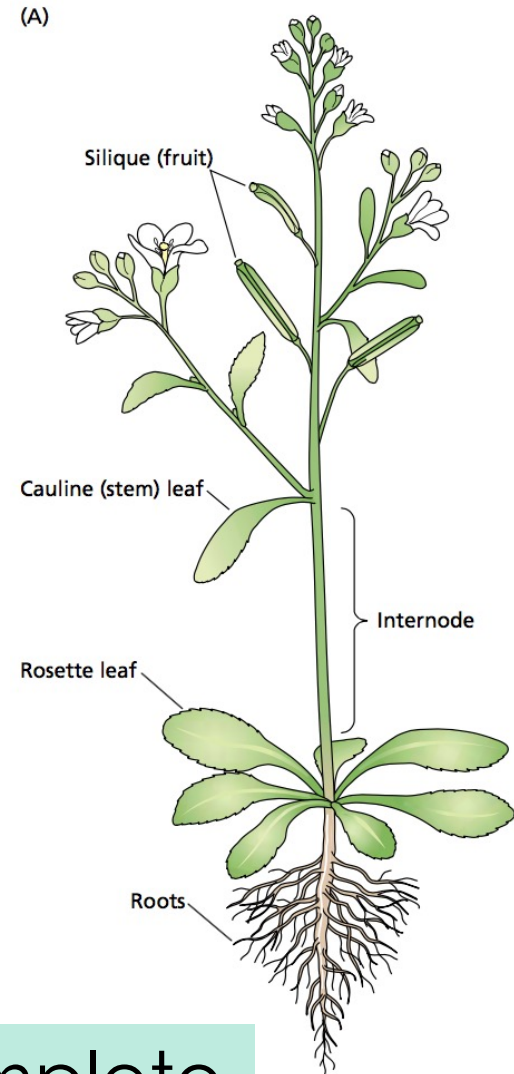
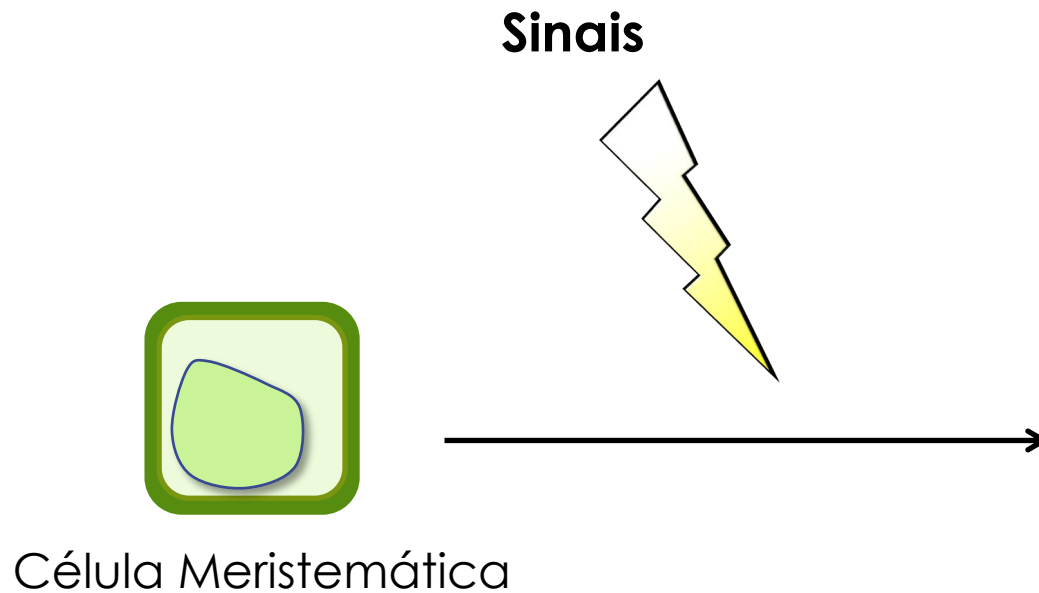


# Células vegetais são pluripotentes e totipotentes



**PLURIPOTÊNCIA**: vários tipos celulares

# Células vegetais são pluripotentes e totipotentes



**TOTIPOTÊNCIA**: indivíduo completo



# De célula à planta

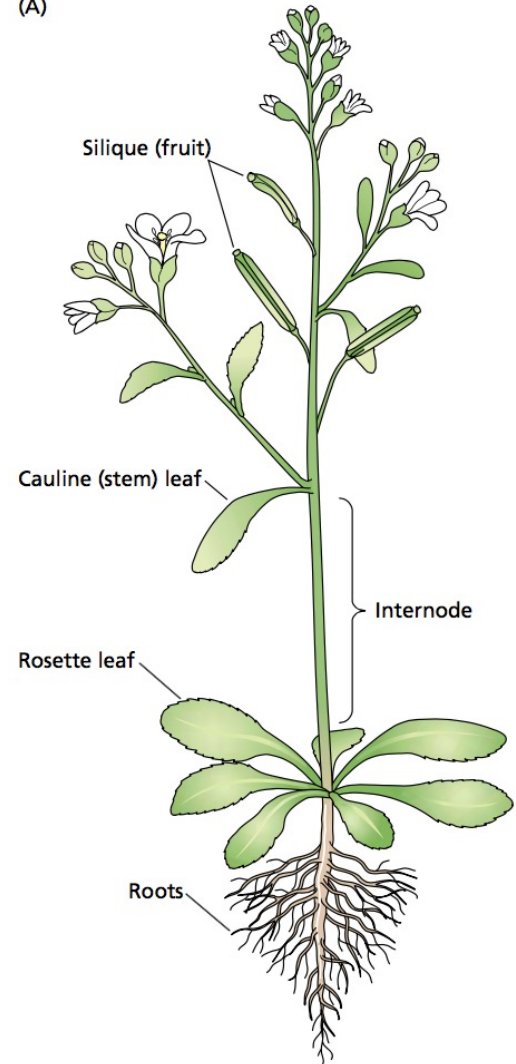


Célula Meristemática

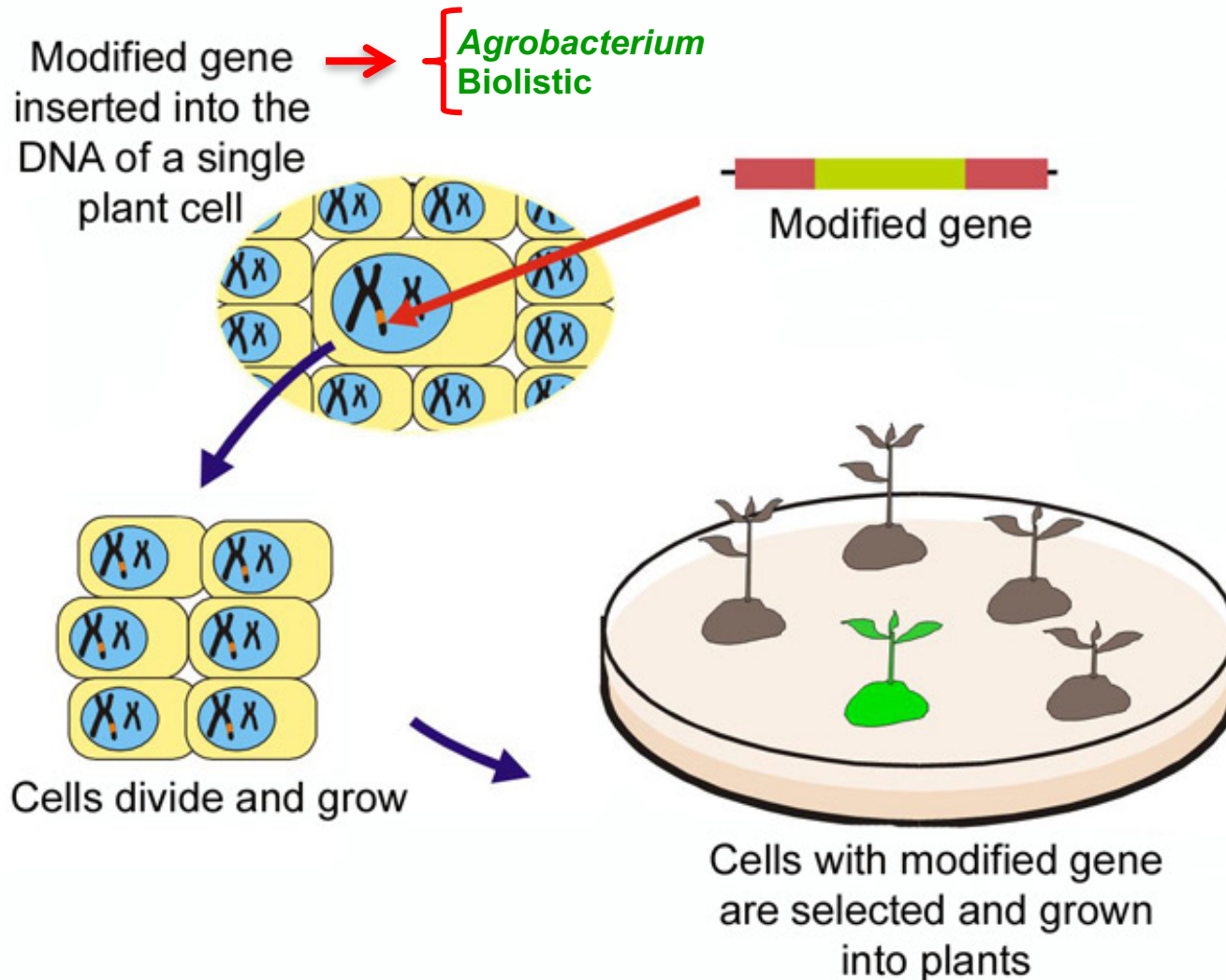
**CULTURA  
DE  
TECIDOS**



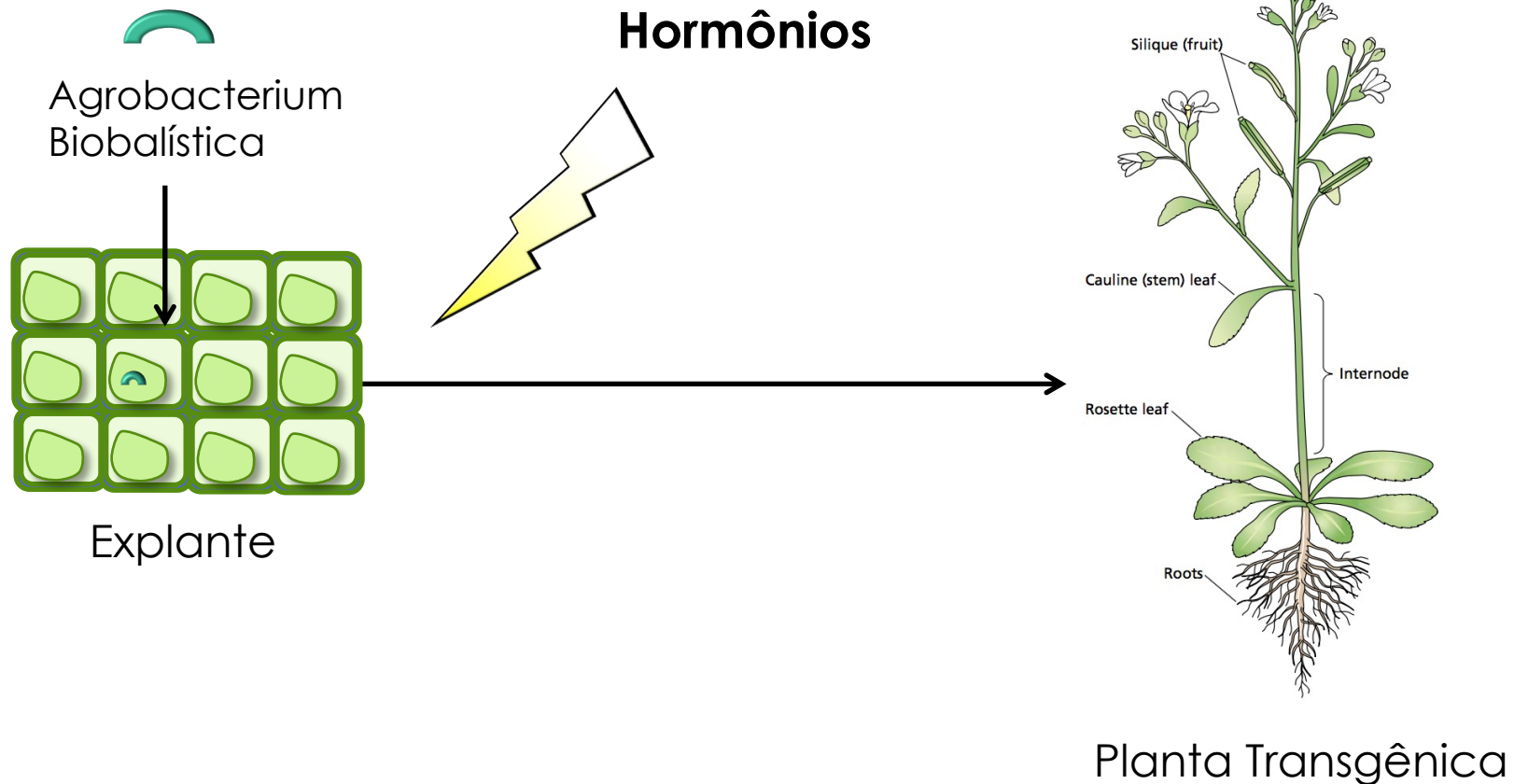
(A)



# PLANTAS TRANSGÊNICAS

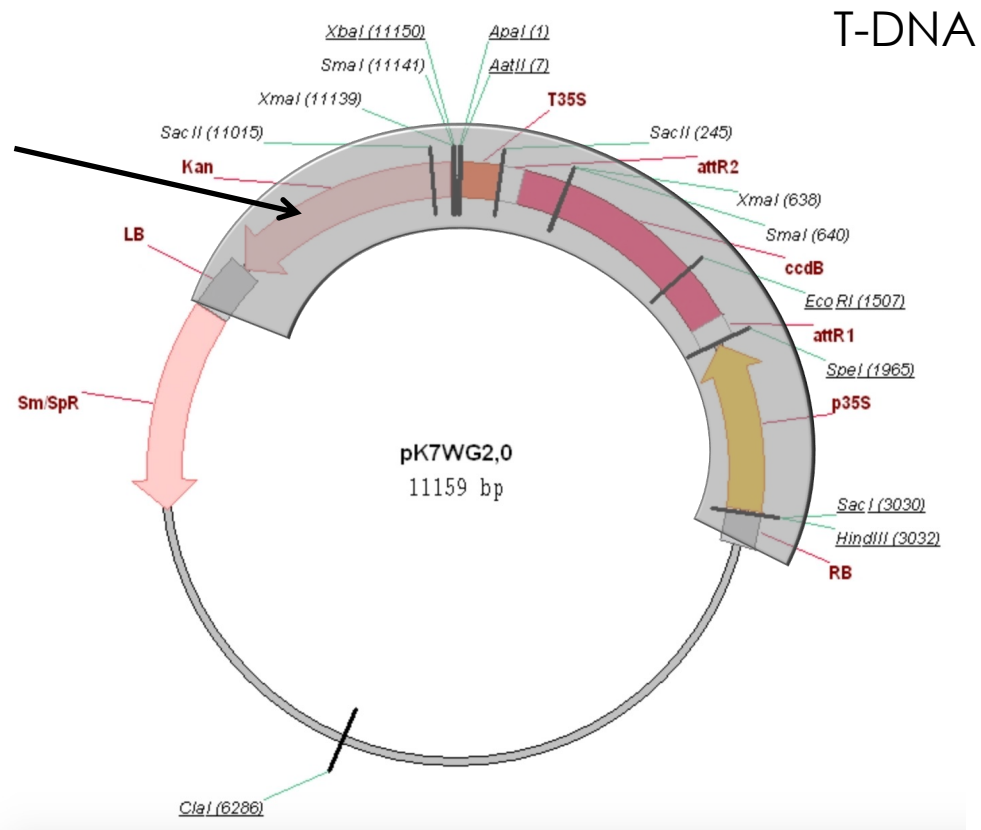


# Como são selecionadas somente as células transformadas?



# Plasmídeo contém um gene de seleção

Gene de Seleção

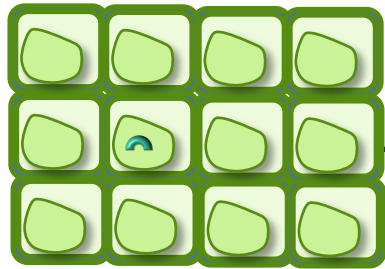


# Existem diversos tipos de genes de seleção

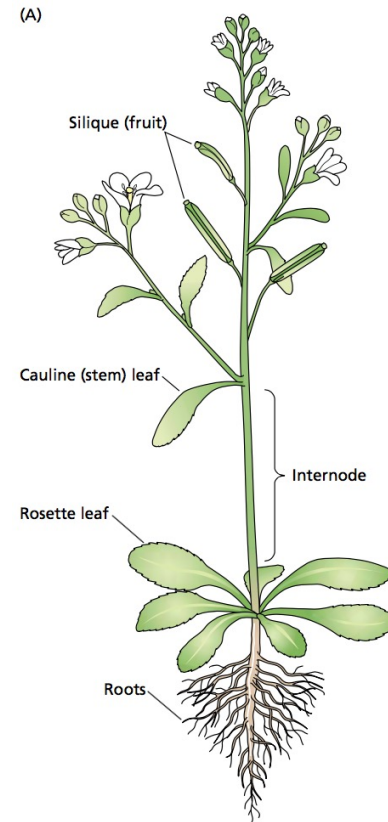
Tipo	Exemplos
Resistência Antibiótico	Kanamycin, Hygromycin, Streptomycin, Spectinomycin
Resistência Herbicida	Glifosato, Sulfoniluréias, Cianamida, Bromoxinil
Resistência Aminoácidos	Lisina, Treonina, Serina
Fonte Alternativa de Carbono	Manose, Xilose, Arabitol
Crescimento na ausência de citocininas exógenas	Isopentenil transferase de Agrobacterium
Screening Visual	GUS, GFP

# Seleção da Célula Transformada

**Hormônios**  
+  
**Agente de Seleção**



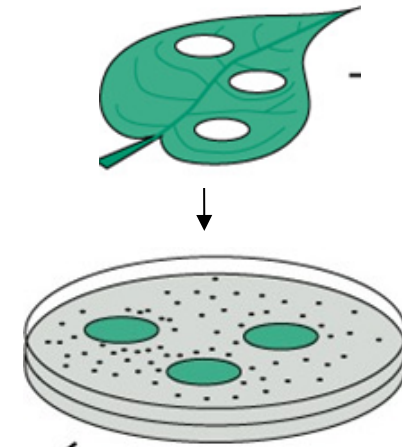
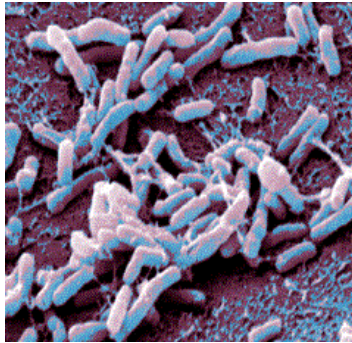
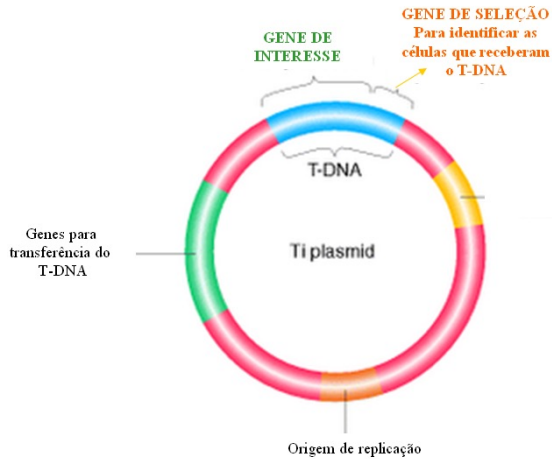
Explante



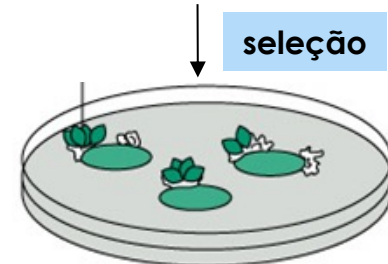
Planta Transgênica



# Transformação *via Agrobacterium*



Discos de folhas + bactérias



Diferenciação de brotos

seleção

regeneração

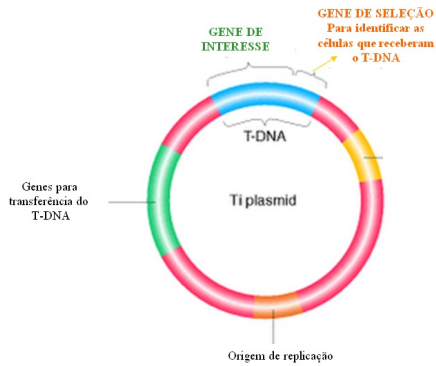


Diferenciação de raízes

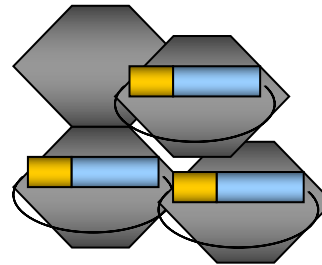
PLANTA TRANSGÊNICA



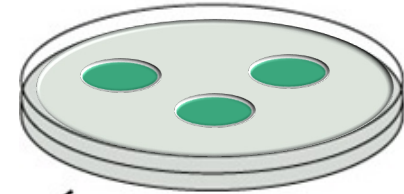
# Transformação via Biobalística



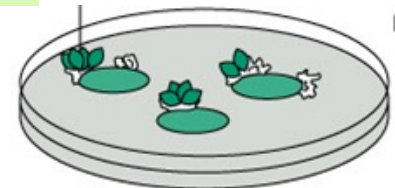
Partículas de tungstênio carregando DNA



NÃO PRECISA SER DE AGROBACTERIUM!!!!



seleção



Diferenciação de brotos

regeneração



Diferenciação de raízes

PLANTA  
TRANSGÊNICA





# LigninLab

Prof. Igor Cesarino  
Departamento de Botânica  
IB/USP

<http://www.ib.usp.br/botanica/ligninlab/>