

## PLANTAS TRANSGÊNICAS

# 5.2

---

A transformação genética é a transferência (introdução) de um ou vários genes em um organismo sem que haja a fecundação ou o cruzamento. Os organismos transformados geneticamente recebem o nome de transgênicos e os genes inseridos são denominados de transgenes. Estes organismos também são chamados de organismos geneticamente modificados (OGMs). Portanto, vegetais transformados geneticamente são chamados de plantas transgênicas.

A principal vantagem para o melhorista no uso da tecnologia dos transgênicos é a possibilidade de transferência de características (genes) de plantas não relacionadas (ou seja, sexualmente incompatíveis) ou mesmo de animais e microorganismos. No melhoramento convencional, a troca de genes está limitada somente a espécies que são sexualmente compatíveis.

Neste capítulo vamos estudar as técnicas utilizadas para a produção de uma planta transgênica, apresentar alguns exemplos

de plantas transgênicas e discutir os benefícios e riscos da utilização dessa tecnologia.

## **COMO FAZER UMA PLANTA TRANSGÊNICA**

Os passos necessários para a obtenção de uma planta transgênica podem ser resumidos em: (a) isolamento e clonagem de um gene útil; (b) transferência desse gene para dentro da célula vegetal; (c) integração desse gene ao genoma da planta; (d) regeneração de plantas a partir da célula transformada; (e) expressão do gene introduzido nas plantas regeneradas; (f) transmissão do gene introduzido de geração em geração.

A transformação genética em vegetais só foi possível a partir do desenvolvimento das técnicas de cultura de tecido vegetais. Essas técnicas possibilitam a obtenção (regeneração) de uma planta a partir de uma única célula vegetal. Por meio das diferentes técnicas que serão apresentadas neste capítulo, é possível introduzir uma seqüência de DNA (gene) em uma célula e então regenerar uma planta transgênica a partir dessa célula transformada.

Os métodos de transformação de plantas podem ser divididos em: indiretos (através do uso da *Agrobacterium tumefaciens*) e diretos (bombardeamento).

### **A. Uso de *Agrobacterium tumefaciens* como vetor**

A transferência de DNA por meio da *Agrobacterium tumefaciens* é o método mais usado na obtenção de plantas transgênicas de plantas dicotiledôneas.

A *Agrobacterium tumefaciens* é uma bactéria gran-negativa que possui um plasmídeo (DNA extracromossomal) chamado de plasmídeo Ti (indutor de tumor) que possui a habilidade de transferir

uma parte de seu DNA para a célula vegetal que está infectando. Esse DNA é chamado de T-DNA, e contém genes envolvidos na produção de reguladores de crescimento vegetais e opinas. Em condições naturais, quando o T-DNA é transferido para a célula vegetal essa produzirá substâncias que servirão de alimento (opinas) para o patógeno e levarão a célula vegetal a se multiplicar, formando tumores ou calos. FIGURA 5.1

Por meio da manipulação genética do plasmídeo Ti, foi possível a substituição das seqüências nativas na região de transferência do plasmídeo (T-DNA) por genes de interesse. Assim, quando o *Agrobacterium* contendo um plasmídeo Ti manipulado infecta uma célula vegetal, ele transferirá o gene de interesse para dentro da célula transformada.

A infecção com *Agrobacterium* geralmente é feita em tecidos vegetais tais como folhas. Em geral, coloca-se o *Agrobacterium* em co-cultivo com o tecido a ser transformado por 24-48 horas, sendo em seguida transferido para meio com antibióticos com a finalidade de matar a bactéria e selecionar as células transformadas, que serão então regeneradas. FIGURA 5.2

O número de espécies transformadas por *Agrobacterium* é muito grande, entre as quais estão incluídas as seguintes: tomate ( ), soja ( ) e algodão ( ). Uma limitação na utilização de *Agrobacterium* é que essa bactéria não consegue infectar de forma eficiente a maioria das monocotiledôneas. Pôr isso foram desenvolvidos métodos alternativos de transformação de plantas.

## **B. Bombardeamento**

A transformação por meio do bombardeamento de microprojéteis é um método mecânico de introdução de DNA que pode ser usado na maioria das espécies ou genótipos. Ela pode ser usada em espécies que não são infectadas de forma eficiente pelo *Agrobacterium*, tais

como os cereais.

Esse método de transformação é constituído de um acelerador (também chamado de canhão) que impeli microprojéteis metálicos (partículas) carregando DNA para dentro de células, tecidos ou órgãos vegetais intactos, que são posteriormente regenerados. Existem vários modelos de aceleradores, mas os mais utilizados atualmente utilizam o gás hélio comprimido para gerar a força necessária para a aceleração de partículas. Entre os protótipos mais utilizados temos o “*Biolistic™ PDS 1000/He*” da empresa BioRad que utiliza altas pressões de hélio. (FIGURA 5.3) As partículas metálicas mais utilizadas no bombardeamento são as de tungstênio e ouro.

As partículas são preparadas com a precipitação do DNA. O método mais utilizado para precipitação de DNA utiliza  $\text{CaCl}_2$  e espermidina associado com partículas de tungstênio. A transformação por bombardeamento ocorre sob vácuo, para aumentar a eficiência de penetração das partículas.

É necessária a calibração das condições de bombardeamento para cada espécie e material celular utilizado. Devem ser testadas várias alturas de disparo, um ou mais tiros, adição de osmóticos no meio, etc. Um bombardeamento muito forte pode levar à morte das células, enquanto um muito fraco leva a uma baixa ou nula transformação.

Por esse método foram transformadas várias espécies tais como soja ( ) e milho ( ). O bombardeamento de partículas também tem sido utilizado para a transformação de cloroplastos ( ) e mitocôndrias ( ).

### **C. Marcadores de Seleção**

Marcadores de seleção são necessários para aumentar a produção de células e plantas transgênicas. Um marcador de seleção permite o crescimento preferencial das células transformadas na presença do agente seletivo, evitando o crescimento das células não transformadas. Genes que conferem resistência a antibióticos ou

herbicidas podem ser usados como marcadores de seleção.

O agente de seleção mais usado na transformação vegetal é o gene NPT II (de neomicina fosfotransferase, tipo II), que confere resistência a antibióticos como canamicina e geneticina. Os meios de seleção são acrescidos de doses entre 15 e 100 mg/l de canamicina, que são tóxicas para células vegetais não transformadas.

Genes de resistência a herbicidas também tem sido usados com frequência como marcadores de seleção. Entre os mais usados, temos o gene BAR que confere resistência ao herbicida Basta ® (princípio ativo fosfonotricina ou PPT).

Para cada protocolo de transformação, é necessário determinar a dose do agente seletivo adequada para a espécie e tipo celular usados. Uma dosagem muito alta pode provocar a morte de todas as células e uma subdosagem pode levar ao aparecimento de escapes (plantas não transformadas).

### **III. EXEMPLOS DA APLICAÇÃO DA TRANSGENIA**

As características modificadas através da transformação genética podem ser divididas em: característica do tipo input e características do tipo output.

Características do tipo input são aquelas relacionadas com o processo produtivo. Esse tipo de característica visa principalmente a redução do custo de produção e abrangem por exemplo plantas transgênicas com resistência a herbicida, doenças e insetos. A maioria das plantas transgênicas já liberadas para plantio comercial contém transgenes para características do tipo input.

Características do tipo output são aquelas relacionadas com o consumidor, visando principalmente agregar valor ao produto final, através da melhoria nutricional ou melhor conservação pós-colheita.

## **A. Resistência a herbicidas**

Entre as características que tem causado maior impacto está a resistência aos herbicidas. A competição com plantas daninhas é um dos principais fatores que afetam a produtividade das culturas. Plantas transgênicas com resistência a herbicidas facilitam e tornam mais barato o controle de plantas daninhas.

A soja Round up Ready® da empresa Monsanto possui resistência ao herbicida glifosato (Round up™). Esta resistência foi obtida pela introdução do gene EPSPS clonado da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* estirpe CP4. A EMBRAPA possui um acordo comercial com a Monsanto e já lançou várias cultivares de soja resistentes ao herbicida glifosato. Nesse caso, a transferência do transgene foi feita através do método dos retrocruzamentos, utilizando a soja RR como pai doador e as cultivares da EMBRAPA como pai recorrente.

O milho Liberty link da empresa Aventis possui resistência ao herbicida glufosinato (Basta®). Esta resistência foi obtida através da introdução do gene PAT, que foi clonado da bactéria *Streptomyces hygroscopicus*.

## **B. Resistência a insetos**

O uso de inseticidas é a forma mais comum de controle de pragas nas plantas cultivadas. A utilização de plantas transgênicas com resistência a insetos pode reduzir a necessidade de aplicação desses agrotóxicos, com conseqüente redução dos custos de produção.

O genes cry (ou genes BT), que codificam a toxina da bactéria *Bacillus thuringiensis*, tem sido utilizados na obtenção de plantas transgênicas resistentes a insetos. Variedades transgênicas de algodão (Bollguard®) e milho (Yieldguard®) resistentes a insetos da ordem Lepidoptera foram obtidos pela introdução do gene Bt-Cry1A(b).

Grandes áreas variedades de algodão e milho Bt estão sendo plantadas nos Estados Unidos e outros países.

### **C. Resistência a doenças**

O controle genético de doenças através do uso de variedades resistentes é o método de controle preferido por ser mais barato e de fácil utilização ( ). A transgenia pode ser uma alternativa para a obtenção de cultivares resistentes a doenças quando fontes de resistência não forem encontradas no germoplasma da espécie.

A maior contribuição da transgenia na geração de plantas resistentes a doenças até o momento vem do desenvolvimento de estratégias contra doenças virais (Aragão, 200?) Essa resistência tem sido obtida principalmente através da introdução de seqüências genômicas dos próprios patógenos, estratégia que é denominada de resistência derivada do patógeno.

Entre as primeiras plantas transgênicas resistente a viroses liberadas para plantio comercial está o mamoeiro resistente ao vírus da mancha anelar (PRSV) no Havaí. Esse mamoeiro transgênico foi liberado em 1998, sendo que a resistência foi obtida através da introdução de partes do gene que codifica a capa protéica do vírus PRSV. No Brasil, a EMBRAPA está testando mamoeiros transgênicos contra o vírus da mancha anelar em Cruz das Almas (Bahia).

Nos Estados Unidos, além do mamoeiro, várias outras plantas já foram aprovadas para comercialização, como abóboras resistentes aos vírus WMV (watermelon mosaic vírus), ZYMV (zucchini yellow mosaic vírus) e CMV (cucumber mosaic vírus) e batatas resistentes aos vírus PLRV (potato leafroll vírus) e PVY (potato vírus Y) (Aragão, 200?)

### **D. Alteração do amadurecimento**

Diferentes estratégias podem ser usadas na obtenção de plantas transgênicas com maturação alterada. O processo de maturação pode ser alterado desligando genes responsáveis pela síntese do etileno, bloqueando a ação do etileno e desligando genes expressos durante a maturação.

A primeira planta transgênica liberada para o plantio comercial foi o tomate Flavr Savr™ da empresa Calgene, em 1994. Esse tomate possuía um gene antisense para a enzima poligalacturonase (degrada a pectina da parede durante o amadurecimento), possuindo uma vida de prateleira mais longa que um tomate convencional.

A estratégia antisense é utilizada quando se quer diminuir ou bloquear a ação de um gene. Nesse caso, a planta é transformada com um fragmento de DNA do gene alvo em orientação oposta à orientação normal. A transcrição do transgene gera um RNA (RNA antisense) que é complementar ao RNAm do gene que se quer alterar. O RNA antisense se liga ao RNAm do gene alvo, bloqueando sua tradução e a formação da proteína correspondente. FIGURA 5.4

## **E. Qualidade nutricional**

Um dos grandes objetivos do melhoramento de plantas é a obtenção de variedades com maior qualidade nutricional. Vários grupos de pesquisa estão desenvolvendo projetos visando a obtenção de variedades com maior valor nutritivo através da transgenia.

Milhões de pessoas nos países subdesenvolvidos sofrem de deficiência em vitamina A, que pode levar a problemas de visão principalmente em crianças. O arroz é a principal fonte de alimento no mundo, mas uma fonte muito pobre em vitamina A e seus precursores. Pela inserção de dois transgenes da planta Narcisso e um transgene da bactéria *Erwinia* foi possível obter arroz transgênico com capacidade de produzir cerca de 20 vezes mais beta caroteno (precursor da vitamina



A) que o arroz convencional. Esse arroz foi chamado de arroz dourado (golden rice).

#### **IV. CONSIDERAÇÕES SOBRE BENEFÍCIOS E RISCOS DO USO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS**

A produção e utilização de plantas transgênicas tem provocado um grande debate tanto na comunidade científica como na mídia. Geralmente pessoas com diferentes pontos de vista apresentam os benefícios e riscos do uso dessa tecnologia para o melhoramento, produtores, meio ambiente e consumidores.

##### **A. Pontos positivos**

Para o melhorista, a principal vantagem da utilização de transgênicos parece ser a possibilidade da utilização de genes que não poderiam ser obtidos pela hibridação. Outra vantagem é a possibilidade de introdução de um gene específico sem a necessidade de cruzamentos e retrocruzamentos. Com isto existe a possibilidade de diminuição no número de gerações e, conseqüentemente, do tempo necessário para o desenvolvimento de um novo cultivar. Este impacto deve ser mais evidente em espécies perenes que geralmente tem ciclo de vida longo.

O produtor pode ser beneficiado com o uso de plantas transgênicas principalmente pela diminuição do custo de produção e do uso de agrotóxicos. Plantas transformadas com resistência a insetos-pragas e doenças necessitam de menos aplicações de defensivos.

Para o meio ambiente, o uso de plantas transgênicas pode levar a um menor uso de defensivos, diminuindo a poluição ambiental.

O consumidor ainda não tem se beneficiado de forma expressiva da transgenia pois a grande maioria das plantas transgênicas liberadas são do tipo input. Entretanto, futuramente pode haver melhoria da qualidade dos alimentos e menor uso de defensivos químicos.

## **B. Pontos negativos**

A transgenia não aumenta a produtividade de modo direto, pois as técnicas de transformação genéticas só tem a capacidade de introduzir um ou pouco genes. A produtividade é um caráter quantitativo, governado por muitos genes.

A integração do transgene no genoma da planta é ao acaso e pode levar a alteração na expressão de outros genes da planta.

O uso da transgenia é limitado pela capacidade de regeneração das espécies. Espécies que não tem capacidade de serem regeneradas por cultura de tecidos não podem ser transformadas.

Para a utilização de variedades transgênicas os agricultores tem que pagar “royalties” para as empresas detentoras das patentes, o que pode acarretar na elevação do custo das sementes e a necessidade de compra de sementes a cada safra. Além disso, existe uma concentração da transgenia em poucas Empresas Multinacionais.

Em certos locais existem plantas daninhas que podem cruzar naturalmente com plantas cultivadas. Neste caso, deve ser considerado a possibilidade de fluxo gênico entre plantas transgênicas resistentes a herbicidas e essas plantas daninhas.

O uso de genes para resistência a insetos-pragas, principalmente em plantas perenes, pode levar ao aparecimento muito rápido de indivíduos resistentes. Por isso, o uso de plantas transgênicas com resistência a pragas deve ser utilizada dentro das estratégias do manejo integrado de pragas.

A introdução de novos genes (proteínas) pode levar ao aparecimento de alergias em pessoas suscetíveis. Por isso existe uma grande discussão da necessidade ou não de identificar nos rótulos os produtos que contenham plantas geneticamente modificadas.

## **V. CONCLUSÕES**

A produção de plantas transgênicas, apesar de trazer uma série de vantagens para o melhorista, não diminui a importância do melhoramento convencional. Na verdade, as técnicas de engenharia genética vieram apenas auxiliar o melhorista a fazer um trabalho mais eficiente.