Plantas transgênicas

Geraldo Magela de Almeida Cançado[1]
Ana Cristina Miranda Brasileiro[2]
Ana Paula Ribeiro[3]
Monique Carolina Nunes Fernandes[4]
Gustavo César Sant'Ana[5]
Bárbara Dantas Fontes-Soares[6]
Hermínio Souza Rocha[7]
Gustavo Faria Freitas[8]

Resumo - Com o advento da Engenharia Genética e os avanços da Biologia Molecular, já é possível, hoje, introduzir novas características genéticas em um determinado organismo pela manipulação direta dos genes. A transformação genética permite a troca de genes entre organismos filogeneticamente distantes e que não cruzam entre si, ampliando de forma espantosa a variabilidade genética disponível para os programas de melhoramento. Os métodos mais utilizados no momento, para a obtenção de plantas transgênicas, são a transformação via *Agrobacterium*, que faz uso de uma bactéria de solo capaz de promover naturalmente a transferência de genes exógenos para o genoma de plantas, a transformação via biobalística, que se baseia na transferência de genes para as células vegetais por intermédio de microprojéteis disparados diretamente para o interior da célula, e a transformação via eletroporação, que gera poros na membrana de protoplastos por pulsos elétricos, permitindo que o gene exógeno penetre no interior da célula e integre-se ao genoma. Existem, ainda, outros métodos de transformação de plantas, utilizados em menor escala. De maneira geral, não há um método de transformação melhor que o outro, visto que a eficiência está relacionada principalmente com o objetivo, o custo, a operacionalidade técnica e a espécie trabalhada.

Palavras-chave: Transformação de plantas. Construção gênica. *Agrobacterium*. Biobalística. Eletroporação.

INTRODUÇÃO

Há muitos anos, plantas cultivadas vêm sendo manipuladas geneticamente pelo homem, por meio de melhoramento clássico, em que características fenotípicas de interesse, determinadas por genes, são transferidas à progênie por meio de cruzamentos. No entanto, esses métodos de melhoramento esbarram em uma série de problemas, como redução da variabilidade genética, ligação gênica, seleção de características poligênicas, mutações

[1]*Engº Agrº, D.Sc., Pesq. U.R. EPAMIG SM-FECD, Caixa Postal 33, CEP 37780-000 Caldas-MG. Correio eletrônico: cancado@epamig.br*

[2]*Engª Florestal, Ph.D., Pesq. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, CEP 70770-900 Brasília-DF. Correio eletrônico: anacmb@cenargen.embrapa.br*

[3]*Biotecnologista, Bolsista FAPEMIG/U.R. EPAMIG SM-FECD, CEP 37780-000 Caldas-MG. Correio eletrônico: anapaula@epamigcaldas.gov.br*

[4]*Biotecnologista, Bolsista FAPEMIG/U.R. EPAMIG SM-FECD, CEP 37780-000 Caldas-MG. Correio eletrônico: moniquecarolinamg@yahoo.com.br*

[5]*Biólogo, Mestrando em Genética e Melhoramento, UFV, CEP 36570-000 Viçosa-MG. Correio eletrônico: gcsant@yahoo.com.br*

[6]*Engª Agrª, D.Sc., Pesq. U.R. EPAMIG SM-FECD, CEP 37780-000 Caldas-MG. Correio eletrônico: barbarafontes@epamig.br*

[7]*Engº Agrº, D.Sc., Bolsista FAPEMIG/U.R. EPAMIG SM-FECD, CEP 37780-000 Caldas-MG. Correio eletrônico: hsrocha2009@gmail.com*

[8]*Engº Agrº, Doutorando em Fitotecnia, UFLA, CEP 37200-000 Lavras-MG. Correio eletrônico: freitasgf@yahoo.com.br*

espontâneas e incompatibilidade sexual, além do longo tempo necessário para transferir características desejáveis para genótipos já melhorados. Atualmente, o melhoramento de plantas pode recorrer às modernas técnicas de Engenharia Genética para auxiliar na resolução de algumas dessas limitações. A combinação de técnicas de Biologia Molecular, de cultura de tecidos e de transferência de genes resultou no desenvolvimento da transformação genética de plantas. Prática que consiste na introdução controlada de um gene no genoma de uma planta e sua posterior expressão, conferindo a esta planta uma nova característica. Como esse gene pode ser oriundo de diferentes organismos (vegetais, animais, bactérias, vírus, fungos etc.), daí a denominação transgene ou gene exógeno.

A introdução do transgene no genoma vegetal receptor é feita de forma controlada e de modo independente da fecundação. Uma vez incorporado no genoma e expresso de maneira estável, o transgene passa a fazer parte do patrimônio genético da planta, não alterando sua constituição genética global. Assim, as plantas transgênicas constituem, hoje, fonte adicional de variabilidade genética para ser incorporada aos programas de melhoramento.

Atualmente, as plantas transgênicas têm grande importância na agricultura mundial, sendo grande parte da área cultivada com espécies de interesse agronômico ocupada por variedades transgênicas. Em 2008, cerca de 125 milhões de hectares foram cultivados com culturas transgênicas em 25 países, segundo relatório do International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications (ISAAA) (Quadro 1). A área é maior que o dobro do território da França ou cerca de quatro vezes e meia a do estado de São Paulo. A transgenia é uma ferramenta biotecnológica que tem gerado grandes benefícios para a humanidade, mas são necessárias avaliações minuciosas dos impactos da liberação do cultivo de plantas transgênicas sobre a saúde humana e animal, sobre o meio ambiente e sobre a sociedade.

COMO SÃO OBTIDAS AS PLANTAS TRANSGÊNICAS

Para obter uma planta transgênica, são necessárias três etapas básicas. A primeira, geralmente a mais limitante, é a identificação do gene que irá conferir a nova característica de interesse para a planta em estudo. A variabilidade genética existente na natureza torna-se potencialmente a fonte desses genes. Entretanto, para ser manipulado, o gene responsável pela característica de interesse deve ser localizado e isolado dos demais genes no genoma do organismo doador. De posse do gene, este será caracterizado, introduzido em vetores para transformação e, só então, transferido para o genoma da planta em estudo (ARAGÃO; RECH, 1998).

A segunda etapa consiste no desenvolvimento de uma metodologia eficiente de transformação da espécie vegetal de interesse. Atualmente, diferentes estratégias para a transferência de genes em plantas estão disponíveis, sendo as mais utilizadas as de transformações via *Agrobacterium*, biobalística e eletroporação. A última etapa para a transformação de uma planta é o estabelecimento de um sistema eficiente, simples e, principalmente, reproduzível de regeneração *in vitro* da espécie vegetal.

QUADRO 1 - Área cultivada com transgênicos no mundo, em 2008

Posição	País	Área (milhões de ha)
1º	EUA	62,5
2º	Argentina	21,0
3º	Brasil	15,8
4º	Índia	7,6
5º	Canadá	7,6
6º	China	3,8
7º	Paraguai	2,7
8º	África do Sul	1,8
9º	Uruguai	0,7
10º	Bolívia	0,6
11º	Filipinas	0,4
12º	Austrália	0,2
13º	México	0,1
14º	Espanha	0,1
15º	Chile	<0,1
16º	Colômbia	<0,1
17º	Honduras	<0,1
18º	Burquina Fasso	<0,1
19º	República Checa	<0,1
20º	Romênia	<0,1
21º	Portugal	<0,1
22º	Alemanha	<0,1
23º	Polônia	<0,1
24º	Eslováquia	<0,1
25º	Egito	<0,1

FONTE: Clive James (2008 apud INTERNATIONAL SERVICE FOR THE ACQUISITION OF AGRI-BIOTECH APPLICATIONS, 2008).

Durante o processo de regeneração, a célula inicialmente transformada multiplica-se e dá origem a uma planta inteira, na qual todas as células vão conter a nova informação introduzida. A regeneração dessa planta baseia-se no princípio da totipotência, isto é, a potencialidade que as células vegetais têm de diferenciar-se, originando um novo indivíduo.

Cada espécie vegetal ou diferentes genótipos dentro de uma mesma espécie têm exigências nutricionais e hormonais diferenciadas para a sua regeneração. Alguns apontam a dificuldade em cultivar determinadas espécies vegetais *in vitro* como o principal limitante à transformação de plantas no momento. No entanto, os grandes avanços obtidos na pesquisa com reguladores de crescimento de vegetais e cultura de tecidos fazem com que um número crescente de plantas possa ser regenerado via cultivo *in vitro*, permitindo a obtenção de um maior número de espécies vegetais capazes de ser geneticamente transformadas.

IDENTIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DE GENES DE INTERESSE

O genoma de uma bactéria contém, aproximadamente, 5 mil genes; o de plantas tem em torno de 40 mil a 60 mil, enquanto que o dos seres humanos, embora este dado ainda não seja conhecido com exatidão pelos cientistas, é estimado em 30 mil a 50 mil genes. Os genes de organismos vivos, independentemente de sua complexidade, são constituídos por segmentos de um mesmo tipo de molécula: o ácido desoxirribonucleico (DNA), exceto para alguns tipos de vírus, cujo material genético é o ácido ribonucleico (RNA). Esta característica é que permite que genes de um organismo sejam potencialmente funcionais em outro.

Uma forma de identificar e isolar genes de interesse é por meio da construção de uma biblioteca genômica. Para isso, o DNA do organismo que contenha o gene, que potencialmente for utilizado, será isolado e, em seguida, cortado em pequenos fragmentos com o auxílio de enzimas de restrição, que agem como tesouras moleculares. Esses fragmentos são, então, ligados em fragmentos circulares de DNA (plasmídeos), inseridos em bactérias e multiplicados pelo seu crescimento exponencial. A partir daí, é só selecionar a colônia de bactérias que contêm o fragmento de DNA correspondente ao gene de interesse (CORDOVAL, 2002). Uma forma de fazer isso é pelo sequenciamento de cada um dos fragmentos de DNA que constituem a biblioteca genômica. Dessa maneira, uma quantidade imensa de genes de vírus, bactérias, fungos, plantas, animais e humanos já foi isolada, identificada, caracterizada, e suas sequências de nucleotídeos disponibilizadas para a comunidade científica em bancos de dados gigantescos como o GenBank (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2009).

O isolamento, a identificação e a caracterização de genes assistem avanços contínuos e rápidos nas últimas duas décadas e, como exemplo de novas tecnologias, podem-se citar a bioinformática e a genômica funcional. Métodos que estudam padrão de expressão de genes e de biossíntese de proteínas em larga escala, tais como transcriptomas (microarranjos de DNA), proteomas e metabolomas, aceleram e facilitam a identificação de genes-alvo entre dezenas ou mesmo centenas de milhares de outros genes, além de possibilitar ao pesquisador, uma visão mais ampla dos processos metabólicos em nível molecular.

Diversos genes de interesse agronômico já foram isolados, tais como genes que codificam proteínas capazes de modificar herbicidas, inativando-os. Desse modo, culturas que contêm esse gene poderiam tornar-se resistentes ao herbicida, facilitando o controle de plantas daninhas. Há também, genes bacterianos que codificam proteínas com propriedades tóxicas para insetos. Os insetos ao se alimentarem de plantas que expressam esse gene morreriam ou se desenvolveriam com menor eficiência, reduzindo ou mesmo evitando seu controle por meio da aplicação de inseticidas químicos, que podem ser danosos à saúde e ao ambiente (LACERDA, 2006).

As características dos exemplos citados são monogênicas, ou seja, o fenótipo é determinado pela expressão de um único gene. Mas é necessário salientar que muitas características importantes para a agricultura são poligênicas ou multigênicas, ou seja, o fenótipo é determinado pela expressão e/ou repressão temporal e espacial de vários genes, simultaneamente ou em uma cascata coordenada de eventos. Resistência à seca, altura de planta e potencial de produção são exemplos de fenótipos controlados por vários genes. Diante da grande complexidade, a identificação de todos os componentes genéticos para características multigênicas ainda é um desafio para a ciência (LACERDA, 2006).

VETORES PARA TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS

Os vetores utilizados para a transfomação genética de plantas são, geralmente, plasmídeos bacterianos, nos quais o gene de interesse foi clonado. E o que vem a ser um plasmídeo? As bactérias são conhecidas por possuírem uma molécula de DNA dupla hélice, de maior tamanho, definida como DNA cromossômico e moléculas de DNA circular, de menor tamanho (2 mil a 15 mil pares de base), denominadas plasmídeos (ARAGÃO; RECH, 1998). Esses são independentes do DNA cromossômico, com replicação autônoma no interior da célula. Vários plasmídeos de bactérias foram manipulados pelo homem para ser utilizados como vetores para transformação de plantas (Fig. 1). Uma vez identificado o gene de interesse no genoma do organismo doador, sua sequência codificadora (posteriormente traduzida em uma proteína) deverá ser isolada e transferida para um cassete, onde será flanqueada por um promotor, que permite que o gene seja reconhecido por enzimas específicas e expresso corretamente em plantas, e um sinal de terminação, que promove o final da leitura do gene. Esse cassete, contendo o gene quimérico é então transferido para um plasmídeo que será utilizado como

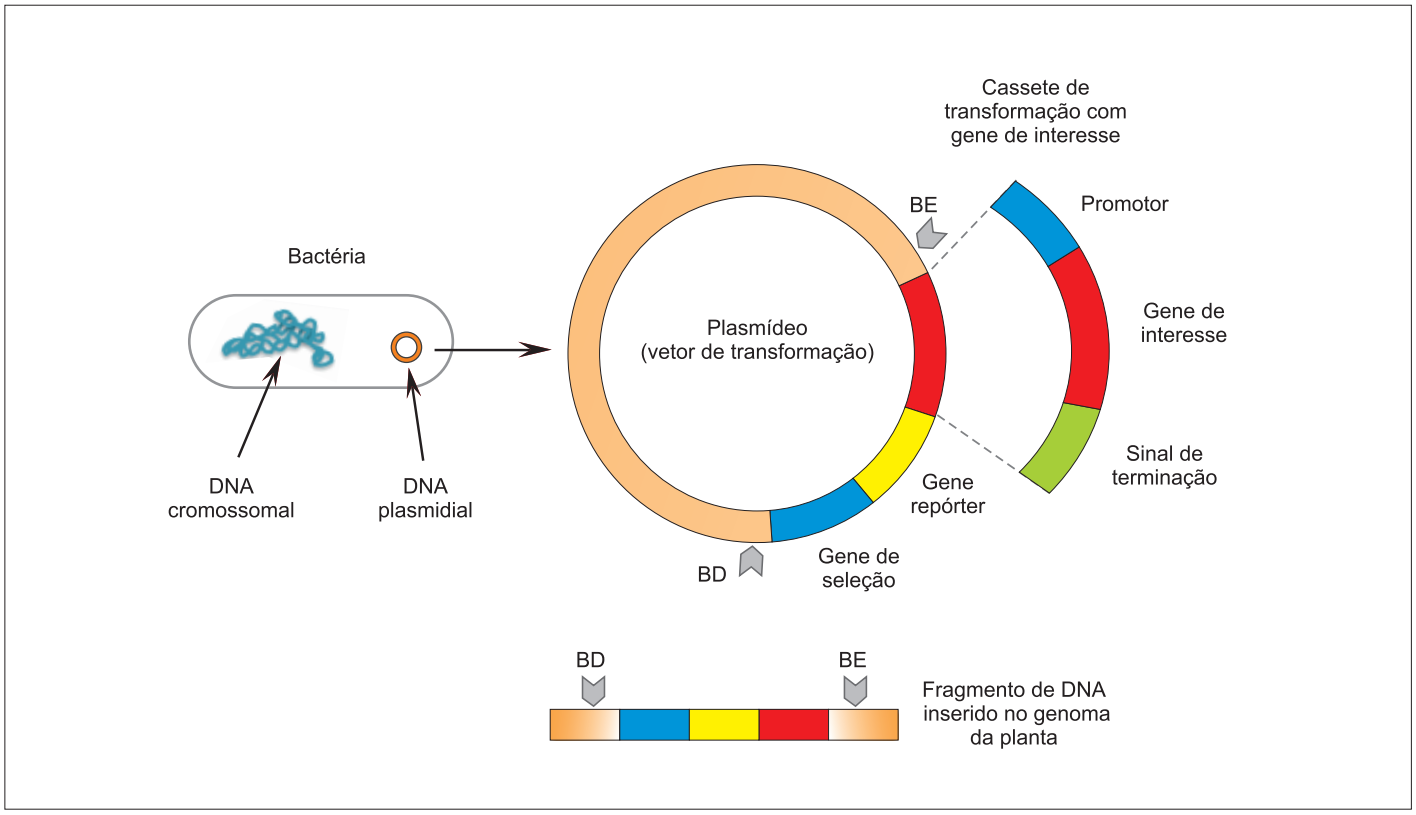

Figura 1 - DNA plasmidial contendo o cassete de transformação (plasmídeo Ti)

NOTA: O cassete de transformação é composto pelo gene de interesse e suas sequências regulatórias (promotor e região de terminação), associados aos genes marcadores e suas sequências regulatórias. As setas indicam os sítios de reconhecimento pelas enzimas de restrição (onde ocorre a clivagem do ácido desoxirribonucléico (DNA)) e que flanqueiam o cassete de transformação, em que, BD = borda direita e BE - borda esquerda.

vetor de transformação de plantas (Fig. 1). De forma geral, um vetor de transformação contém basicamente o gene de interesse, um gene de seleção e um gene repórter, necessários para a identificação das plantas que foram efetivamente transformadas. A esse conjunto de genes é dado o nome de DNA de transferência (T-DNA), que será transferido para o genoma da planta (DELÚ FILHO; CASCARDO; FONTES, 1999).

GENES MARCADORES DE SELEÇÃO E REPÓRTERES

Genes marcadores de seleção são aqueles que codificam para uma proteína com uma atividade enzimática ou para um produto, que irá conferir às células transformadas da planta resistência a um determinado substrato. A finalidade do uso de um gene marcador de seleção é permitir que apenas as células transformadas cresçam em detrimento às células não-transformadas. Assim, as plantas transformadas deverão possuir, além do gene de interesse, um gene marcador de seleção que irá conferir resistência a uma determinada substância tóxica ao desenvolvimento das plantas, geralmente um antibiótico ou um herbicida. Uma eficiente seleção é de grande importância para a obtenção de plantas transformadas, pois, na presença do agente seletivo, somente aquelas que foram efetivamente transformadas conseguem desenvolver-se, por causa da resistência conferida pelo gene de seleção. Por outro lado, genes repórteres são aqueles que codificam para uma proteína, geralmente com atividade enzimática, cujo produto é facilmente detectável.

Esses genes possibilitam a identificação ou marcação das células transformadas sem contudo eliminar as células não-transformadas. Assim, o gene repórter funciona de maneira complementar ao gene de seleção. Sua principal função na planta é indicar, por meio da expressão de um gene, a presença de células ou tecidos transformados, de maneira simples e rápida. O produto da expressão do gene repórter, assim como do gene de seleção, não pode estar presente nas células de plantas não-transformadas. Entretanto, muitas vezes, estas plantas podem-se desenvolver na presença do agente seletivo por motivos que vão desde concentrações insuficientes ou degradação dos agentes de seleção, até o surgimento de variações somaclonais (mutações) resistentes a estes. Esses eventos são conhecidos como escapes. Após o evento da transformação, as células transformadas e não-transformadas do explante são cultivadas em meios que contêm o agente seletivo. Como pode haver escapes nessa fase, faz-se necessária a presença do outro gene repórter para confirmação do estado transgênico do material.

O gene repórter seria então uma segunda confirmação indireta da transformação, pois, *a priori*, apenas as plantas que apresentam o cassete de transformação inserido em seu genoma seriam capazes de expressar o gene repórter. O gene repórter mais utilizado no momento é o gene *gus* que codifica para a enzima β-glucuronidase (GUS). Na presença da enzima GUS, um substrato cromogênico, o X-Glu, forma um precipitado de cor azul-intenso no tecido transformado (JEFFERSON, 1987). Assim, com apenas um pequeno pedaço de tecido metabolicamente ativo pode-se confirmar a transformação de forma rápida e simples.

No entanto, quando a transformação é via *Agrobacterium*, podem ocorrer falsos positivos para o teste do GUS, por causa da contaminação endógena das plantas com a própria bactéria utilizada para a transformação. Mesmo estando o gene *gus* sob o controle de sequências regulatórias de plantas, pode haver expressão de GUS em *Agrobacterium*. Como a eliminação completa da bactéria nos explantes transformados pode ser difícil e demorada, é comum o aparecimento de falsos-positivos. Este problema foi resolvido pelo desenvolvimento de vetores contendo um gene *gus* alterado, cuja expressão é nula ou não-detectável em *Agrobacterium*. Uma outra limitação do gene *gus* como repórter reside no fato de algumas plantas possuírem uma atividade endógena similar à de GUS, o que também pode gerar falsos-positivos. Esse problema pode ser contornado utilizando-se outras classes de genes repórteres, tais como o gene *gfp* (proteína verde fluorescente), que é traduzido em uma proteína fluorescente no comprimento de luz azul e que não existe naturalmente em plantas (CHALFIE et al., 1994).

A maior vantagem da utilização do gene *gfp* sobre outros genes repórteres é que a GFP não necessita de cofatores para fluorescer, podendo assim ser visualizada em células vivas. E por que não se poderia utilizar o produto do gene de interesse introduzido (proteína) ou o fenótipo da planta, para selecionar as plantas transformadas? Isso sem dúvida é feito, só que em uma etapa final do trabalho. Nos estádios iniciais de transformação, o número de explantes produzidos é bastante elevado. O uso de genes de seleção e genes repórteres permite o descarte precoce de todas as plantas que não foram efetivamente transformadas, evitando-se gastos desnecessários de espaço, tempo e recurso. Além do mais, na maioria dos casos, o produto do gene de interesse pode ser uma proteína ou enzima de difícil detecção ou que só pode ser detectada em estádios avançados do desenvolvimento das plantas.

MÉTODOS DE TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS

Vários métodos de obtenção de plantas transgênicas vêm sendo desenvolvidos. Alguns deles já estão bem estabelecidos, sendo utilizados de forma rotineira em laboratórios de transformação de plantas. Apesar de existirem inúmeros métodos de transformação, serão descritos aqueles via *Agrobacterium*, eletroporação de protoplastos e biobalística, por serem os mais usuais. Outros métodos de transformação apresentados pela literatura, tais como macroinjeção, microinjeção, lipossoma e polietilenoglicol (PEG) são utilizados para propostas mais específicas, por sua maior complexidade (BRASILEIRO; DUSI, 1999). Deve-se ter em mente que não existe um método de transformação ótimo ou ideal para todo o tipo de planta. Em função da espécie vegetal e do propósito do trabalho, pode-se optar por um método ou outro, segundo as vantagens que possa apresentar.

Transformação por *Agrobacterium*

As agrobactérias são microrganismos tipicamente do solo e possuem forma de bacilo, movendo-se por meio de um a seis flagelos. O gênero *Agrobacterium* (do grego *agros* = campo e *bakterion* = bastonete) pertence à mesma família das bactérias fixadoras de nitrogênio e está subdividido em cinco espécies que diferem entre si pela sintomatologia em diferentes plantas (KERSTERS; LEY, 1984). *Agrobacterium tumefaciens* é o agente etiológico da galha-da-coroa (*crown gall*), *A. rhizogenes* causa a raiz-em-cabeleira (*hairy root*), *A. rubi* induz tumores especificamente em *Rubus* spp. (*cane gall*), *A. vitis* induz tumores especificamente em videiras (*Vitis* spp.) e *A. radiobacter* é saprófita, isto é, não patogênica (BRASILEIRO, 1998).

Mais de 600 espécies vegetais são conhecidamente suscetíveis à infecção por *A. tumefaciens* e *A. rhizogenes*, pertencendo a maioria delas à classe das Angiospermas dicotiledôneas e Gymnospermas e, mais raramente, das Angiospermas monocotiledôneas (BRASILEIRO, 1998). Apesar de as doenças causadas por agrobactérias, principalmente a galha-da-coroa, serem muito sérias para algumas culturas, estas raramente têm causado danos econômicos para a agricultura no Brasil. A infecção de uma planta por *Agrobacterium* inicia-se pela penetração da bactéria no tecido vegetal por meio de uma lesão sofrida pela planta por tratos culturais, geadas, insetos ou outro agente. A lesão na planta exsuda moléculas, como compostos fenólicos, açúcares ou aminoácidos, que atraem as agrobactérias. Essas moléculas exsudadas são responsáveis por ativar genes presentes na agrobactéria e também pela transferência de parte do plasmídeo de virulência dessas bactérias, conhecido como plasmídeo Ti, para o genoma da planta.

Os genes presentes no fragmento do plasmídeo Ti da agrobactéria, que é transferido para a planta, conhecido como T-DNA, serão expressos nas células vegetais, produzindo enzimas que estão envolvidas com a síntese de hormônios vegetais e com a síntese de opinas (compostos sintetizados para a nutrição da bactéria). Dessa forma, as células vegetais que recebem o T-DNA proliferam desordenadamente, em consequência da síntese de hormônios, levando à formação de um tumor (BRASILEIRO; LACORTE, 1998). Este tumor é o principal sintoma da doença galha-da-coroa, causada por *A. tumefaciens*. Em *A. rhizogenes* a expressão dos genes do T-DNA induz à produção de raízes no local do ferimento, provocando

a doença denominada raiz-em-cabeleira. Por achar que se tratava de uma forma vegetal de câncer, as agrobactérias foram intensamente estudadas nos anos 80 na esperança de o modelo da doença vegetal ser semelhante ao câncer, que ocorre em células animais, auxiliando dessa forma na descoberta da cura.

Apesar de os pesquisadores terem-se frustrado em seu objetivo inicial, pois não havia nenhuma relação entre os tumores em vegetais e a doença em animais, logo se percebeu que o sistema de transferência de genes das agrobactérias para as plantas poderia ser um método extremamente eficaz para a transferência de genes de interesse para plantas. Assim, os plasmídeos Ti das agrobactérias foram intensamente estudados e manipulados, permitindo a troca de genes do T-DNA, não-essenciais para a transformação, por genes de interesse, ou seja, transformaram o plasmídeo Ti de agrobactérias em um vetor natural de transformação de plantas. As linhagens de *Agrobacterium* que perderam todo ou parte do seu T-DNA são denominadas linhagens desarmadas, pois são incapazes de produzir tumores nas plantas hospedeiras (ZAMBRYSKI et al., 1983).

Para transformar plantas, utilizando linhagens desarmadas de *Agrobacterium*, utilizam-se explantes com potencial regenerativo, como segmentos de folhas jovens (discos foliares), embriões zigóticos, entrenós, cotilédones etc. O explante é colocado na presença de meio líquido contendo as bactérias desarmadas com o vetor de transformação que contém o gene de interesse, em um processo denominado cocultura (Fig. 2). Durante este contato, as bactérias infectam o tecido vegetal e iniciam o processo de transferência do cassete de transformação para o genoma da planta. Após a cocultura, o tecido é cultivado em um meio de regeneração na presença de antibiótico, para eliminação da *Agrobacterium* e de um agente seletivo, para a seleção das células transformadas.

Numa etapa final, as plantas transformadas são regeneradas *in vitro* e transferidas para ambientes de aclimatação da mesma forma que se faz para outros trabalhos com cultura de tecidos (Fig. 2). Atualmente, para algumas espécies de plantas, tais como

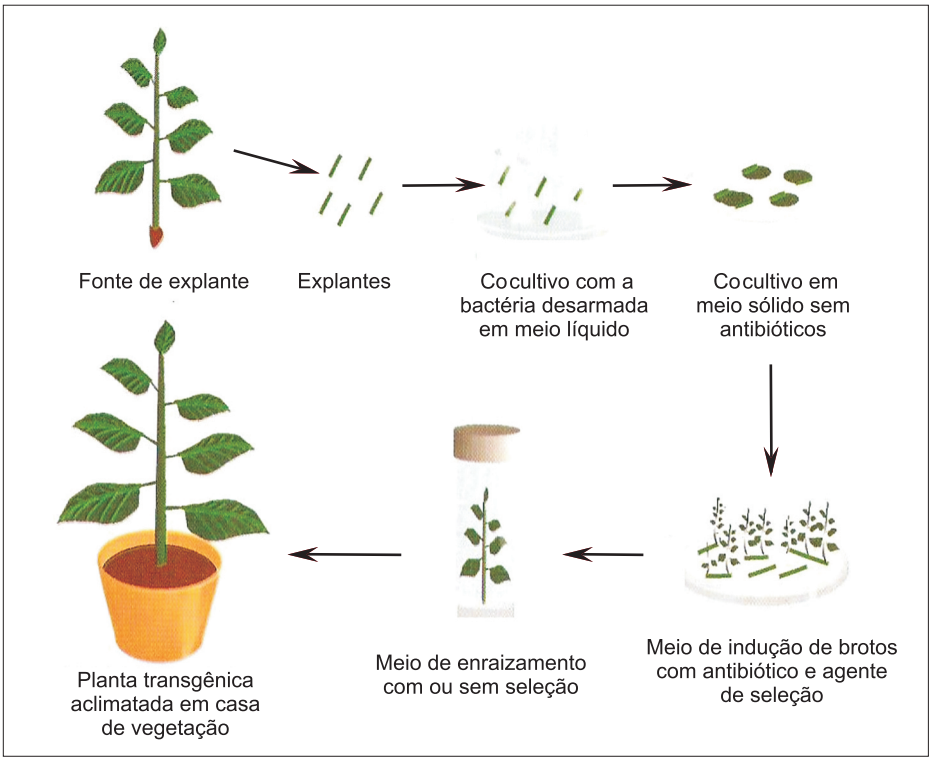

Figura 2 - Transformação de plantas por *Agrobacterium*

FONTE: Brasileiro e Dusi (1999).

NOTA: Segmentos foliares são retirados da folha da planta, a qual se quer transformar, e são submersos em solução na presença da bactéria que contém o vetor de transformação (plasmídeo Ti contendo o cassete de transformação). Algumas horas após, os segmentos foliares são transferidos para meio nutritivo sólido na presença de um antibiótico para a eliminação da bactéria e de um agente seletivo (antibiótico ou herbicida) para a seleção das células transformadas. Após regeneração das plântulas, estas são transferidas para novo meio, quando se faz a seleção das plântulas positivas, com auxílio do agente seletivo. As plantas que crescerem no meio com agente seletivo, são submetidas a novos testes para confirmação (testes histoquímicos para expressão do gene repórter, *polymerase chain reaction* (PCR), *Southern*, *northern* e *western blots*), e as plantas transformadas positivamente são enraizadas *in vitro* e transferidas para vasos com solo em casa de vegetação.

Arabidopsis thaliana, a transformação pode ser feita pelo contato direto de botões florais com a solução, contendo *Agrobacterium*. A taxa de sementes positivamente transformadas por este método pode alcançar até 5%. Dessa forma, as agrobactérias têm sido utilizadas como um eficiente vetor natural para a transformação genética de plantas, principalmente, de Angiospermas dicotiledôneas. A alta eficiência de transformação e o baixo custo operacional, assim como a simplicidade dos protocolos de transformação e de seleção, são as maiores razões para a universalidade do uso do sistema *Agrobacterium*.

Transformação por eletroporação de protoplastos

Protoplastos são células vegetais individualizadas e desprovidas de paredes celulares que foram eliminadas com o auxílio de enzimas pectocelulolíticas. Em condições adequadas de cultura de tecidos, os protoplastos podem reconstituir suas paredes celulares, regenerando um novo tecido que pode dar origem a uma nova planta (BOURGIN; CHUPEAU; MISSONIER, 1979). A eletroporação de protoplastos consiste na indução de poros na membrana celular de protoplastos por

meio de pulsos elétricos de alta voltagem. Esses poros permitem a entrada do vetor de transformação contendo o gene de interesse para o interior da célula e, como os poros são reversíveis, ou seja, fecham-se novamente após terminada a aplicação do pulso elétrico, os protoplastos contendo o vetor de transformação podem-se regenerar em novas plantas (FROMM; TAYLOR; WALBOT, 1985) (Fig. 3).

Os protoplastos, logo após terem sido isolados, são imediatamente colocados em um eletroporador na presença do vetor de transformação, contendo o gene de interesse. O pulso elétrico é muito rápido e, logo após, os protoplastos são transferidos para um meio de cultura, onde serão selecionados aqueles que forem transformados. A grande vantagem desse método em relação aos outros é que a transformação é feita em células individuais. Assim, todo o tecido regenerado será originado a partir de uma única célula, evitando dessa forma o surgimento de quimeras (tecido constituído de células transformadas e não-transformadas), problema observado com certa frequência, quando se realiza transformação em tecidos ou órgãos. A grande desvantagem desse método reside justamente na dificuldade de obtenção de uma nova planta a partir de um protoplasto. O processo é lento, exige mudanças constantes de meios de cultura e condições de cultivo e possui, geralmente, uma baixa eficiência. Para algumas espécies vegetais, o processo de regeneração do protoplasto pode ser um forte limitante ao uso desta técnica.

Por outro lado, a eletroporação tem sido extremamente útil em estudos de expressão transiente, que é a expressão do gene exógeno sem que ele tenha sido necessariamente incorporado ao genoma. Neste caso, o gene expressa-se transitoriamente na célula transformada, mas, à medida que as células dividem-se e multiplicam-se, a expressão do gene vai diminuindo até desaparecer por completo. A análise da expressão transiente após eletroporação permite testar rapidamente a funcionalidade de uma construção gênica, sem a necessidade de obter uma planta transgênica.

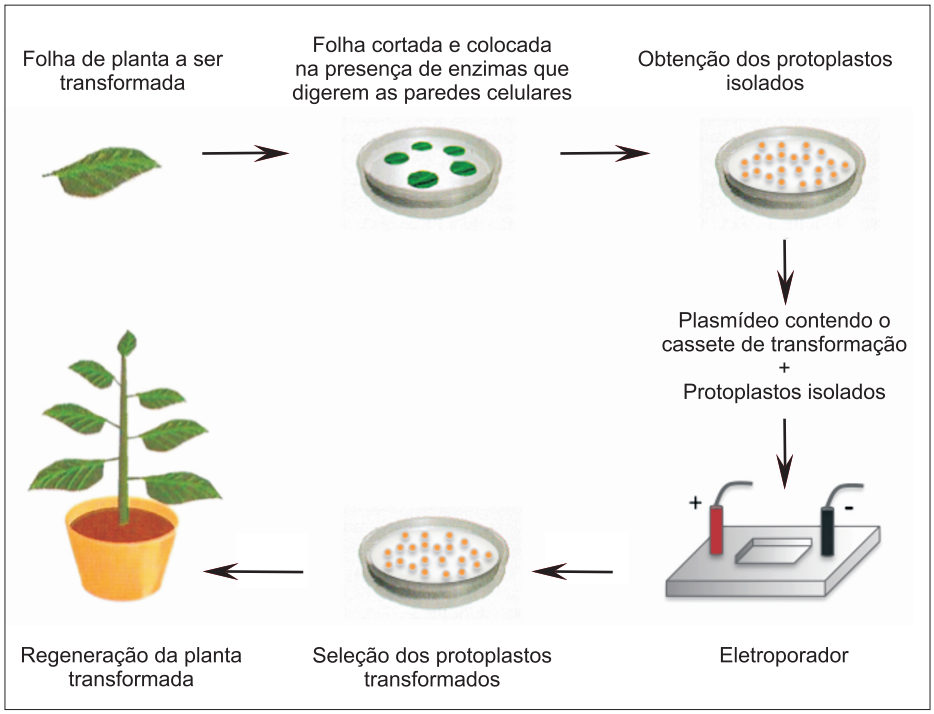

Figura 3 - Transformação de plantas por eletroporação

FONTE: Dados básicos: Brasileiro e Dusi (1999).

NOTA: Segmentos foliares da planta, a qual se quer transformar, são digeridos com enzimas que degradam as paredes celulares, para a liberação dos protoplastos. Os protoplastos são purificados e transferidos para a cuba de eletroporação com o ácido desoxirribonucléico (DNA) plasmidial, contendo o cassete de transformação, onde serão submetidos a pulsos elétricos para a formação dos poros na membrana celular. Após a eletroporação, os protoplastos são transferidos para meio de seleção, onde apenas os protoplastos transformados com a construção gênica serão multiplicados.

Transformação por biobalística

A biobalística, como o próprio nome indica, funciona de forma análoga a uma arma de fogo, onde micropartículas revestidas com o vetor de transformação são aceleradas em alta velocidade contra o tecido no qual se quer transferir o gene. Esse método de transformação também é conhecido como bombardeamento ou *gene gun* (arma de genes) e foi inicialmente proposto por Sanford et al. (1987). As micropartículas utilizadas pela biobalística são partículas microscópicas (de 0,2 a 4 µm de diâmetro) de ouro ou tungstênio, que possuem adsorvido à sua superfície o vetor de transformação, contendo o cassete com o gene de interesse. As micropartículas atravessam de forma não-letal a parede celular e a membrana plasmática, alojando-se de forma aleatória no interior das células. Uma vez na presença do líquido celular, o DNA adsorvido à superfície da micropartícula encontra condições para se tornar livre, podendo então ser incorporado ao genoma nuclear da célula vegetal (RECH; ARAGÃO, 1998; LACORTE et al., 1999). As micropartículas são aceleradas em direção ao tecido-alvo por meio de uma onda de choque que pode ser gerada de diversas formas, sendo que a mais utilizada atualmente é a de uma descarga de gás hélio à alta pressão.

O aparelho responsável por gerar a onda de choque é denominado acelerador de micropartículas ou bombardeador e está esquematizado na Figura 4. A onda de choque gerada pela liberação rápida do gás hélio lança a membrana carreadora (onde as micropartículas estão depositadas) a uma altíssima velocidade contra uma tela

de retenção que detém esta membrana e permite a passagem apenas das micropartículas. Estas, por sua vez, continuarão sua trajetória pela inércia e irão atingir diretamente o tecido que está posicionado logo abaixo da tela de retenção. Todo o processo ocorre no interior de uma câmara sob vácuo (Fig. 4), para evitar a desaceleração das partículas causada pelo atrito com o ar.

Essa técnica é bastante versátil, pois permite potencialmente a transformação de qualquer espécie vegetal ou genótipo, assim como qualquer tipo celular ou mesmo organelas, como mitocôndrias e cloroplastos. Além disso, a técnica de transformação por biobalística pode ser considerada relativamente simples, rápida e que não envolve maiores investimentos em infraestrutura e equipamentos. O próprio acelerador de partículas é um aparelho simples e de baixo custo. Uma outra vantagem da biobalística é a maior eficiência de transformação em Gymnospermas e Angiospermas monocotiledôneas, o que não é observado com a transformação por *Agrobacterium* (RECH; ARAGÃO, 1998). A biobalística também é bastante utilizada, à semelhança da eletroporação de protoplastos para estudar a funcionalidade de construções gênicas.

ANÁLISE DAS PLANTAS TRANSFORMADAS POR TÉCNICAS MOLECULARES

A expressão de um gene repórter ou a sobrevivência de um explante em meio seletivo é considerada apenas como evidência da transformação, não sendo suficiente como prova definitiva da integração e expressão do cassete no genoma da planta. Como foi frisado anteriormente, mesmo com o uso dos genes marcadores de seleção e repórter, pode ocorrer a presença de falsos-positivos. A reação em cadeia da polimerase – *polymerase chain reaction* (PCR) (MULLIS; FALOONA, 1987) e o *Southern blot* (SOUTHERN, 1975) são duas técnicas moleculares indispensáveis para a confirmação da presença e da integração do cassete de transformação no genoma das plantas transformadas. No caso do PCR (Fig. 5), o gene de interesse e/ou um dos genes marcadores são amplificados bilhões de vezes *in vitro* por enzimas que sintetizam novas fitas de DNA e com o auxílio de um termociclador, máquina que simula os ciclos de replicação do DNA. Estes bilhões de cópias do gene podem então ser facilmente visualizados na forma de uma banda em um gel de agarose. No caso do *Southern blot* (Fig. 6), o gene pode ser visualizado pela utilização de sondas marcadas radiotivamente (isótopo ^{32}P), que se ligam (hibridizam) especificamente

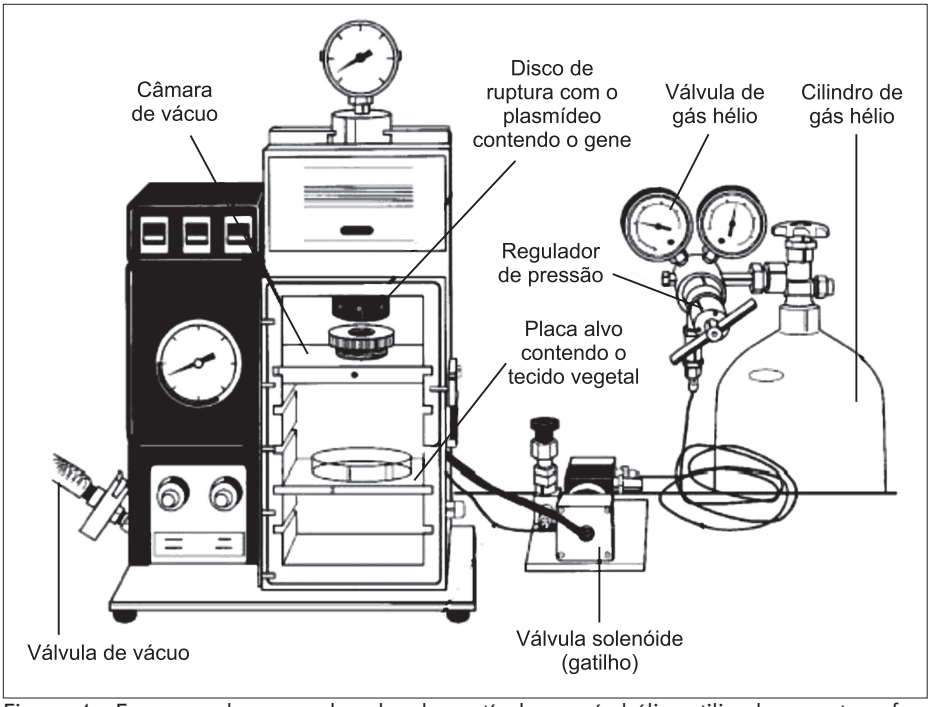

Figura 4 - Esquema de um acelerador de partículas a gás hélio, utilizado para transformação de plantas por biobalística

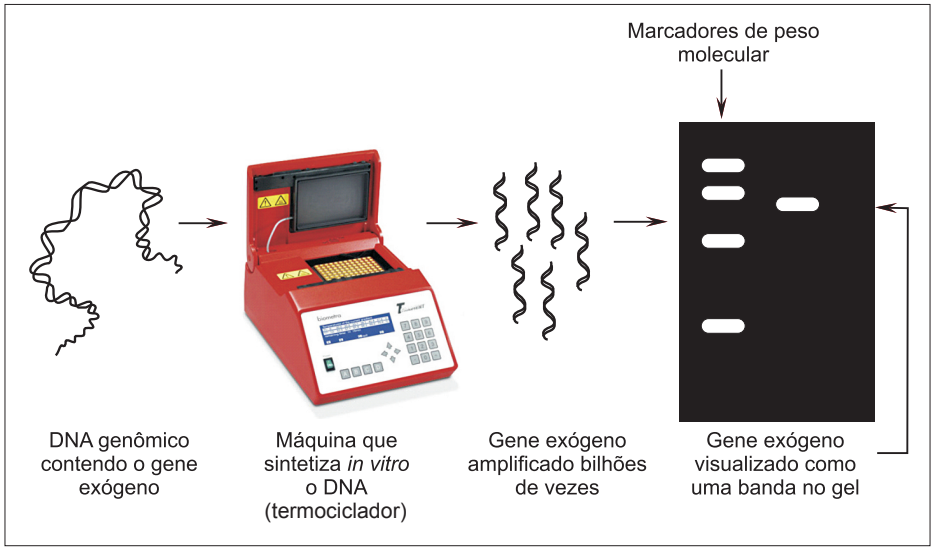

Figura 5 - Detecção do gene exógeno por meio da amplificação do DNA via PCR

NOTA: Nesta técnica, bilhões de cópias do gene exógeno são sintetizadas *in vitro*. O termociclador é a máquina que simula as condições necessárias para a síntese do ácido desoxirribonucléico (DNA) *in vitro*. Após a amplificação, o produto do *polymerase chain reaction* (PCR) é aplicado em gel de agarose, para visualização da banda correspondente ao DNA do gene exógeno.

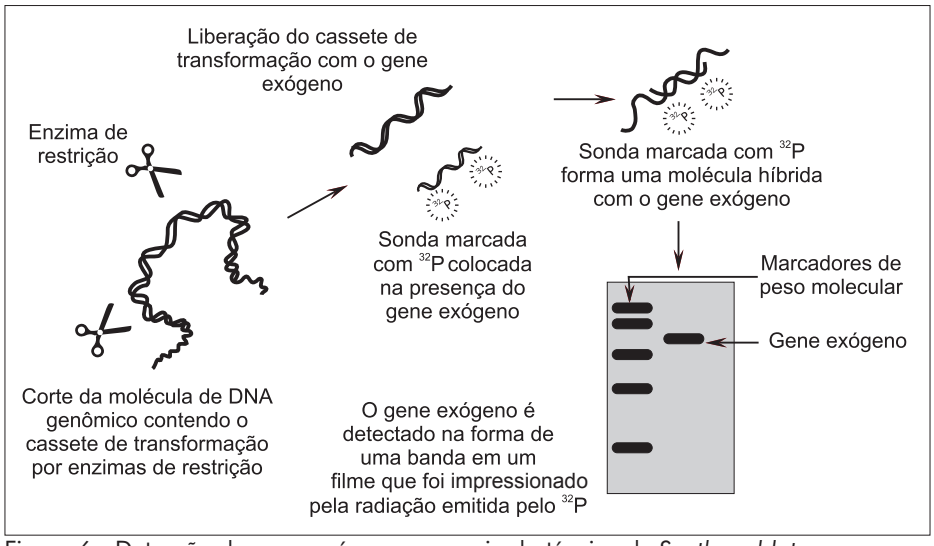

Figura 6 - Detecção do gene exógeno por meio da técnica de *Southern blot*

NOTA: Nesta técnica, o ácido desoxirribonucleico (DNA) genômico é clivado por enzimas de restrição e os fragmentos gerados são eluídos em gel de agarose e transferidos para membrana de náilon ou nitrocelulose, conservando sua posição de corrida no gel. O fragmento que contém o gene exógeno hibrida-se com uma sonda marcada, de sequência homóloga à sequência do gene exógeno. A molécula híbrida de DNA formada pela sonda e pelo fragmento de DNA, contendo o gene exógeno, emite radiação que impressiona filme de raios X ou *Image Plate*, gerando banda, que confirma a presença do gene.

ao gene de interesse ou a um dos genes marcadores.

O DNA total da planta é inicialmente extraído e clivado por enzimas de restrição em sítios específicos da molécula de DNA que flanqueiam o cassete de transformação. Dessa forma, o cassete é liberado do resto do genoma e transferido para uma membrana que, posteriormente, é colocada na presença da sonda radioativamente marcada, para que possa ocorrer a formação da molécula híbrida entre o gene exógeno presente no cassete de transformação e a sonda. Ou seja, uma fita simples de DNA do gene exógeno com uma fita simples de DNA da sonda unem-se, em consequência da formação de pontes de hidrogênio, formando novamente uma fita dupla de DNA. Quando exposto na presença de filme de raios X ou *Image Plate*, as sondas marcadas o impressionam, por causa da emissão de radiação, dando origem a uma banda que corresponde ao gene de interesse. Dependendo do tipo de clivagem realizado no DNA total da planta, o *Southern blot* pode permitir a estimativa do número de cópias do cassete no genoma receptor (ROMANO, 1998).

Muitas vezes, a integração do T-DNA no genoma da planta não significa necessariamente que o gene será expresso, ou seja, que vá produzir a proteína ou enzima de interesse. Isso é um problema muito comum observado em transformação de plantas e os motivos que levam a isso possuem inúmeras causas, sendo que muitas delas ainda não foram completamente desvendadas. A forma mais simples para checar se um gene está sendo expresso ou não é pela observação de seu fenótipo em uma planta completamente regenerada ou em sua progênie (descendentes), desde que o produto do gene em questão cause alterações que possam ser detectáveis visualmente ou por técnicas moleculares e bioquímicas.

Como foi dito anteriormente, a expressão de determinados genes pode ocorrer em níveis tão baixos, que mudanças no fenótipo da planta podem não ser perceptíveis ou, ainda, o produto do gene pode não causar nenhuma alteração expressiva no fenótipo final da planta. A purificação bioquímica da proteína ou da enzima produzida pelo gene exógeno pode ser difícil de ser realizada, exigindo pessoal e infraestrutura adequados, o que muitas vezes pode ser bastante complexo e caro. Existem técnicas moleculares que permitem observar a expressão dos genes de forma fácil e rápida. As mais utilizadas são o *northern blot* (ALWINE; KEMP; STARK, 1977) e o *western blot* (BURNETTE, 1981; TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1979) e, mais recentemente, uma nova técnica com base na detecção em tempo real da expressão diferencial de genes denominada por *quantitative reverse transcriptase – polymerase chain reaction* (qRT-PCR) ou transcrição reversa quantitativa – reação em cadeia da polimerase.

O *northern blot* permite detectar a quantidade e o tamanho do RNA mensageiro (mRNA) produzido pelo gene exógeno por meio de hibridização com sondas específicas marcadas radioativamente. Já na qRT-PCR, acompanha-se a evolução da replicação do DNA complementar (cDNA) do gene de interesse a cada ciclo da PCR pela emissão de fluorescência. No *western blot*, detecta-se a proteína ou enzima produzida por este mRNA, por meio da ligação com anticorpos específicos. Essas técnicas possuem sensibilidade suficiente para detectar pequenas quantidades de mRNA ou de proteínas produzidas pelo gene exógeno.

O interessante em utilizar o *northern blot, western blot* e a qRT-PCR é que estes permitem não só a detecção da expressão do gene, como também quantificar a intensidade dessa expressão pela intensidade das bandas e curvas de amplificação que são geradas. Isto é de grande importância para os pesquisadores, pois, além da integração do gene no genoma da planta, é muito importante saber se este se expressa em níveis adequados, para que ocorra a mudança fenotípica esperada.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O que era visto como uma possibilidade para o futuro, hoje já pode ser encarado como realidade. São inúmeras as espécies vegetais, assim como as características genéticas estudadas no campo da trans-

formação genética de plantas, com objetivos que vão desde a obtenção de plantas resistentes ou tolerantes a condições de estresses bióticos e abióticos, a plantas com melhor qualidade nutricional, capazes de produzir fármacos e biomoléculas de interesse industrial (biorreatores) e até mesmo na recuperação de ambientes degradados e contaminados (biorremediadores e biodegradadores). A tecnologia de introdução de genes exógenos via transformação genética de plantas tem disponibilizado, para os melhoristas, genes antes impossíveis de ser manipulados pelos métodos convencionais de melhoramento. Com a eliminação das barreiras que impediam o cruzamento interespecífico, é esperado um novo salto tecnológico para o setor agrícola, principalmente no que diz respeito ao lançamento de cultivares. O uso de organismos transgênicos como modelos de estudo também tem colaborado significativamente para elucidação de processos e fenômenos importantes nas áreas de Genética, Fisiologia, Biologia Celular e Biologia Molecular. No entanto, ainda há inúmeros desafios a serem vencidos, tais como a adequação do processo de cultivo e regeneração *in vitro* para várias espécies recalcitrantes, compreensão da função da grande maioria dos genes e a manipulação genética de características complexas, que são governadas pela ação de vários genes e que frequentemente estão associadas à produtividade.

REFERÊNCIAS

ALWINE, J.C.; KEMP, D.J.; STARK, G.R. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.74, n.12, p.5350-5354, Dec. 1977.

ARAGÃO, F.J.L.; RECH, E.L. Isolamento de vetores para transformação direta. In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T. de C. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. p.17-33.

BOURGIN, J.; CHUPEAU, Y.; MISSONIER, C. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of several *Nicotiana* species. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.45, n.2, p.288-292, Feb. 1979.

BRASILEIRO, A.C.M. Cultivo e conservação de *Agrobacterium*. In: _____; CARNEIRO, V.T. de C. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. p.65-74.

_____; DUSI, D.M. de A. Transformação genética de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI: EMBRAPA-CNPH, 1999. v.2, p.679-735.

_____; LACORTE, C. Interação *Agrobacterium*-hospedeiro. In: _____; CARNEIRO, V.T. de C. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. p.75-92.

BURNETTE, W.N. "Western blotting": eletrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radigraphic detection with antibody and radioiodinated protein A. **Analytical Biochemistry**, New York, v.112, n.2, p.195-203, Apr. 1981.

CHALFIE, M. et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**, New York, v.263, n.5148, p.802-805, Feb. 1994.

CORDOVAL, M.B. **Transgênicos**. Viçosa, MG: UFV, 2002. Disponível em: <http://www.ufv.br/dbg/trab2002/TRANSG/TRG003.htm>. Acesso em: 20 ago. 2009.

DELÚ FILHO, N.; CASCARDO, J.C. de M.; FONTES, E.P.B. Clonagem molecular e isolamento de genes de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI: EMBRAPA-CNPH, 1999. v.2, p.653-677.

FROMM, M.; TAYLOR, L.P.; WALBOT, V. Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.82, n.17, p.5824-5828, Sept. 1985.

INTERNATIONAL SERVICE FOR THE ACQUISITION OF AGRI-BIOTECH APPLICATIONS. **Global status of commercialized biotech/GM crops:** 2008 – the first thirteen years, 1996 to 2008. [S.l., 2008]. Disponível em: <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/39/executivesummary/default.html>. Acesso em: ago. 2009.

JEFFERSON, R.A. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.5, p.387-405, 1987.

KERSTERS, K.; LEY, J. Genus III: *Agrobacterium* Conn 1942. In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. (Ed.). **Bergey's manual of systemic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. v.1, p.244-254.

LACERDA, A.L. de S. **Plantas transgênicas**. [S.l.]: Infobibos, 2006. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2006_3/transgenicos/index.htm>. Acesso em: 20 ago. 2009.

LACORTE, C. et al. Biobalística. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI: EMBRAPA-CNPH, 1999. v.2, p.761-781.

MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A. A polymerase catalyzed chain reaction. In: WU, R. (Ed.). **Recombinante DNA:** part F. San Diego: Academic Press, 1987. p.335-350. (Methods in Enzimology, 155).

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **GenBank overview**. Bethesda, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nhm.nih.gov./Genbank/index.html>. Acesso em: 20 ago. 2009.

RECH, E.L.; ARAGÃO, F.J.L. Biobalística. In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T. de C. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. p.51-64.

ROMANO, E. Análise da integração do DNA pela técnica Southern blot. In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T. de C. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. p.205-222.

SANFORD, J.C. et al. Delivery of substances into cells tissues using a particle bombardment process. **Particle Science Technology**, v.5, p.27-37, 1987.

SOUTHERN, E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, London, v.98, n.3, p.503-517, Nov. 1975.

TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.76, n.9, p.4350-4354, Sept. 1979.

ZAMBRYSKI, P. et al. Ti Plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. **EMBO Journal**, Oxford, v.2, p.2143-2150, 1983.

View publication stats