

PLANTAS TRANSGÊNICAS E AMBIENTE

Giancarlo Pasquali
Maria Helena Bodanese Zanettini

Muitas metodologias de transformação genética vegetal foram desenvolvidas nas últimas décadas. Entretanto, a maioria das plantas transgênicas até agora obtida foi produzida pela transformação mediada por agrobactérias, pela transferência direta de DNA para protoplastos ou pela aceleração de partículas (biobalística). O advento das práticas da engenharia genética de vegetais, animais e microrganismos e, sobretudo, a efetiva disponibilização comercial de produtos deles derivados, despertaram dúvidas na população quanto à segurança alimentar e ambiental. Sendo assim, torna-se relevante apresentar as técnicas mais utilizadas para a geração de plantas transgênicas, os transgenes e principais vegetais obtidos, além de discutir aspectos relacionados com a segurança destes produtos.

Introdução

O melhoramento genético vegetal antecede Mendel (1822-1884). De fato, o ser humano vem “melhorando” geneticamente os vegetais desde a prática da agricultura, há cerca de 10.000 anos. O hábito instintivo de escolher a maior ou mais atrativa fruta, ou os grãos mais panificáveis, levaram o ser humano a multiplicar os vegetais detentores destas características em áreas restritas e cada vez mais amplas, em detrimento do espaço destinado aos demais seres vivos com outras características menos apreciadas naquele momento. O advento da genética e da citogenética no século XX acelerou o processo de melhoramento tornando-o uma tecnologia baseada na ciência. O período destacado entre 1930 e 1970 testemunhou um fenomenal aumento na produtividade das culturas, particularmente as de cereais. Durante este mesmo período, os instrumentos da citogenética em muito facilitaram a prática da fecundação artificial entre indivíduos vegetais de espécies diferentes (hibridação ampla, interespecífica) e a transferência sexual de genes das espécies selvagens para as cultivadas. Este conjunto de metodologias, denominado de “engenharia cromossômica”, está baseado na manipulação dos mecanismos de pareamento cromossômico e permitiu a recombinação de genomas inteiros, partes de genomas ou segmentos cromossômicos que resultaram na produção de várias cultivares superiores.

Entretanto, a busca de características em espécies selvagens nem sempre é viável, uma vez que barreiras de isolamento reprodutivo (pré e pós-fertilização) podem impedir o sucesso no cruzamento. Por técnicas de cultura *in vitro* de embriões, muitas das barreiras naturais puderam ser superadas para a geração de híbridos interespecíficos. É importante salientar que, sempre que for utilizado o método de cruzamento, mesmo que o melhorista esteja interessado em uma ou poucas características, grandes blocos de genes são transferidos da planta doadora para a receptora, mesmo após várias gerações de seleção. Isto significa dizer que, além do(s) gene(s) de interesse, inúmeros outros segmentos de ácido desoxirribonucléico (DNA) mantêm-se na cultivar final, e estes segmentos não são conhecidos, exceto pelo fato de não interferirem no conjunto desejado de características (fenótipo).

Outra prática de melhoramento genético vegetal empregada ao longo dos últimos 50 anos, e amplamente explorada nos dias de hoje, é a indução de mutações pelo emprego de agentes químicos ou físicos (radiações).¹ As mutações

¹ SIDDIQUI, B. A. & KHAN, S. (eds.) *Breeding in Crop Plants – Mutations and In Vitro Mutation Breeding and mutagenesis*. Ludhiana, Índia: Rajinder Nagar, 1999. AHLOOWALIA, B. S. & MALUSZYNSKI, M. Induced mutations – a new paradigm in plant breeding. *Euphytica*, v. 118, p. 167-173, 2001.

consistem na eliminação, substituição, inversão ou adição aleatórias de segmentos de DNA, em número e locais absolutamente imprevisíveis dos cromossomos. Após o tratamento de centenas de sementes ou flores com agentes mutagênicos, os vegetais mutantes resultantes (ou não, pois nem sempre ocorrem mutações com os tratamentos) são avaliados, buscando-se selecionar aqueles indivíduos que mantenham as características já conhecidas e apreciadas dos vegetais originais somadas a um novo fenótipo desejado, promovido pelo rearranjo das seqüências de DNA. Com o emprego de agentes mutagênicos foram obtidas cultivares de maior produtividade ou qualidade nutricional, com maior resistência a insetos ou moléstias, ou com maior tolerância a estresses ambientais. Raramente as mutações foram caracterizadas em nível molecular (de DNA) e em nenhuma nova cultivar as mutações silenciosas, ocorridas em regiões cromossômicas não interferentes nos fenótipos desejáveis, foram mapeadas.

Nos últimos 20 anos, o desenvolvimento de novas ferramentas para a transferência de genes individualizados, coletivamente denominadas de “engenharia genética”, adicionou novas dimensões aos programas de melhoramento. A engenharia genética compreende um conjunto de instrumentos não convencionais com vistas à transferência de informação genética de um organismo, seja ele um microrganismo, um vegetal ou um animal, para outro. Tais instrumentos permitem a inserção de um gene bem caracterizado em células vegetais embriogênicas, meristemáticas, ou mesmo diferenciadas em tecidos adultos, e a subsequente regeneração de plantas férteis com o gene integrado em seus genomas. Este procedimento de transformação genética permite a obtenção das denominadas “plantas transgênicas”.²

Transformação genética vegetal mediada por agrobactérias

A evidência de que a bactéria do solo *Agrobacterium tumefaciens* era o agente etiológico dos tumores conhecidos como “galha-da-coroa” (*crown gall disease*) em certos vegetais foi obtida há quase 100 anos.³ O gênero *Agrobacterium* pertence à família Rhizobiaceae e inclui as espécies *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes*, *A. vitis*, *A. rubi* e *A. radiobacter*. *A. radiobacter* é a única espécie não patogênica. Enquanto *A. rhizogenes* leva à “síndrome de raízes em cabeleira” (*hairy root disease*), *A. vitis* e *A. rubi*, à semelhança de *A. tumefaciens*, produzem tumores em videiras e espécies dos

² BRASILEIRO, A. C. M. & CARNEIRO, V. T. C. (eds.) *Manual de Transformação Genética de Plantas*. Brasília: CENARGEN/EMBRAPA, 1998.

BRASILEIRO, A. C. M. & DUSI, D. M. A. Transformação genética de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. & BUSO, J. A. (eds.) *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. v. 2. Brasília: CBAB e EMBRAPA, 1999. p. 679-735.

³ STAFFORD, H. A. Crown gall disease and *Agrobacterium tumefaciens*: a study of the history, present knowledge, missing information, and impact on molecular genetics. *The Botanical Review*, v. 66, p. 99-118, 2000.

VAN SLUYS, M. A. *Agrobacterium*: um vetor natural para transformação em plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. & BUSO, J. A. (eds.) *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. v. 2. Brasília: CBAB e EMBRAPA, 1999. p. 737-759.

gêneros *Rubus* e *Kalanchoe*. Sob condições de laboratório, uma ampla variedade de espécies vegetais é transformável pelas agrobactérias. Além de *A. tumefaciens*, apenas *A. rhizogenes* tem sido utilizada por muitos laboratórios para a geração de plantas e tecidos transgênicos.

A transformação genética é consequência de um processo natural de transferência de DNA da bactéria para a célula vegetal, semelhante à conjugação bacteriana. Um fragmento de DNA plasmidial⁴, denominado de T-DNA (*Transferred DNA*), é transferido para a célula vegetal e integrado ao seu genoma. A expressão de genes do T-DNA nas células do hospedeiro leva à manifestação do fenótipo transformado que é caracterizado por um crescimento celular desordenado, levando à formação de tumores, e pela produção de aminoácidos modificados denominados de “opinas”.

O T-DNA corresponde a um segmento precisamente definido de um plasmídeo de alto peso molecular (média de 200.000 pares de bases – pb) denominado plasmídeo Ti (*tumour-inducing*) em *A. tumefaciens* e Ri (*root inducing*) em *A. rhizogenes*. O T-DNA é delimitado por seqüências diretamente repetidas de 25 pb, conhecidas como borda direita e borda esquerda. Três componentes genéticos são requeridos para a transferência do DNA das agrobactérias para a célula vegetal e incluem um conjunto de genes cromossômicos de virulência (*chv*), um conjunto de genes de virulência (*vir*) localizados no plasmídeo Ti e o próprio T-DNA. A proteína VirD2, uma endonuclease, reconhece e corta as bordas direita e esquerda que delimitam o T-DNA e liga-se à extremidade 5’ da molécula simples fita do T-DNA. A proteína VirE2 liga-se, então, à superfície da unidade T-DNA-VirD2, protegendo-a de nucleases e formando o chamado complexo T. A passagem do complexo T pela membrana bacteriana e parede celular da célula vegetal é garantida por proteínas codificadas pelo loco *virB*. O complexo-T é transferido para o núcleo através de um poro da membrana nuclear. No núcleo ocorre a integração do T-DNA ao genoma da célula vegetal. Várias outras proteínas bacterianas e vegetais participam do processo, e o papel de cada uma foi recentemente descrito em cuidadosa revisão.⁵

Embora existam sítios preferenciais, ou *hot spots*, para a integração do T-DNA, o local cromossômico e o número de cópias integradas são aleatórios. Uma vez integrados ao genoma celular, os genes presentes no T-DNA são transcritos e traduzidos em enzimas que, por sua vez, levam à síntese de fito-hormônios (auxina e citocinina)⁶ e opinas. A síntese dos fito-hormônios desencadeia numerosas divisões

⁴ DNA plasmidial ou plasmídeos são pequenas moléculas de DNA circular presentes em bactérias, com replicação independente do cromossomo bacteriano, e que servem como “vetores” para a manipulação de seqüências de DNA de interesse (genes).

⁵ TZVI TZFIRA, T. & CITOVSKY, V. Partners-in-infection: host proteins involved in the transformation of plant cells by *Agrobacterium*. *Trends in Cell Biology*, v. 12, p. 121-129, 2002.

⁶ Os fito-hormônios, ou reguladores do crescimento vegetal, são moléculas que, em quantidades ínfimas, alteram a multiplicação e expansão celulares, entre outros efeitos.

celulares levando à formação dos tumores vegetais. As opinas, formadas também como consequência da ativação de genes localizados no T-DNA, são secretadas para os espaços externos das células vegetais e servem de fonte nutricional para as bactérias. Os genes para o catabolismo das opinas também estão localizados no plasmídeo Ti. Assim, a cada divisão promovida pelos fito-hormônios, uma nova célula vegetal contendo a sua cópia de T-DNA passa a produzir opinas nutricionais às agrobactérias.

A construção de vetores derivados do plasmídeo Ti para introduzir genes exógenos em plantas só foi possível graças à observação de que nenhuma seqüência presente no T-DNA, exceto os 25 pb das suas bordas, é necessária para o processo de transferência e integração do T-DNA. Assim, pode-se retirar partes do T-DNA, incluindo os genes de síntese de fito-hormônios e opinas, sem que isto comprometa o processo de transferência. Em verdade, a síntese de auxina e citocinina pelas células vegetais transformadas com o T-DNA “selvagem” interfere no balanço hormonal endógeno e é incompatível para a regeneração de plantas normais. Portanto, a remoção destes genes é necessária para viabilizar a regeneração de plantas a partir das células transformadas. O desenvolvimento de vetores plasmidiais baseados no plasmídeo Ti de *Agrobacterium* requer a conservação das bordas do T-DNA e da região *vir*. A maioria dos vetores desenvolvidos possui estes componentes genéticos em plasmídeos independentes. O plasmídeo Ti “desarmado” contém apenas os genes *vir* e um segundo plasmídeo (binário), muito menor, compatível com a multiplicação em *Escherichia coli* e, portanto, mais facilmente manipulável, possui o T-DNA. Outras versões de plasmídeos Ti integrais ou reconstruídos por plasmídeos de co-integração também são amplamente utilizados. Independentemente do sistema, qualquer gene ou seqüência de DNA que for inserida entre as bordas do T-DNA presentes no plasmídeo binário (ou de co-integração) pode ser transferido e integrado no genoma de vegetais compatíveis com a infecção pelas agrobactérias.

A infecção por agrobactérias foi o primeiro método utilizado para gerar plantas transgênicas. Hoje, mais de uma centena de espécies de dicotiledôneas são transformadas geneticamente por esta metodologia. Por muito tempo, plantas monocotiledôneas foram consideradas inacessíveis à transformação por agrobactérias. No entanto, modificações realizadas nas seqüências de genes *vir*, e na combinação dos mesmos, possibilitaram que várias espécies transgênicas de monocotiledôneas fossem obtidas, incluindo os principais

cereais e outras espécies de interesse econômico como arroz, cevada, milho, trigo, aspargo, cana-de-açúcar, banana, tulipas, entre outras. No entanto, as espécies de plantas diferem grandemente em sua suscetibilidade à infecção por *A. tumefaciens*. Mesmo para uma única espécie, diferentes cultivares⁷ podem mostrar diferentes graus de suscetibilidade a linhagens específicas de *Agrobacterium*. Estas diferenças têm sido notadas em arroz, milho, várias leguminosas, espécies de *Pinus*, tomate, *Arabidopsis*, videira, entre outras. Várias investigações têm demonstrado, ainda, que tecidos, órgãos e tipos de células pertencentes a uma mesma planta podem diferir em sua suscetibilidade a *Agrobacterium*. Portanto, o sucesso na obtenção de vegetais geneticamente transformados por agrobactérias depende de uma série de estudos que definam não só o grau de compatibilidade entre células vegetal e bacteriana, mas também de um protocolo detalhado de procedimentos para a seleção dos tecidos transformados e livres das agrobactérias e da regeneração de vegetais completos.

Transformação de protoplastos

Os protoplastos vegetais são obtidos pela remoção química e enzimática das paredes celulares constituídas principalmente por celulose, hemicelulose e ligninas, deixando as células limitadas apenas pela membrana citoplasmática. Os protoplastos resultantes podem ser submetidos a tratamentos químicos ou elétricos para internalizar moléculas exógenas de DNA, sofrendo, assim, a transformação.⁸

O polietilenoglicol (PEG), usado em conjugação com cátions bivalentes (Ca^{2+} ou Mg^{2+}) e alto pH, promove a aderência do DNA à superfície dos protoplastos em virtude da oposição de cargas: tanto a membrana plasmática do protoplasto como o DNA exibem cargas negativas. O DNA é, então, incorporado pela célula provavelmente por endocitose⁹. O mecanismo preciso da permeabilização da membrana mediada por PEG não está totalmente esclarecido.

A transferência de DNA para protoplastos mediada por PEG foi primeiramente registrada para tabaco (*Nicotiana tabacum*). Além desta espécie, o método tem sido utilizado para a transformação genética de outras dicotiledôneas como canola (*Brassica napus*) e monocotiledôneas como azevém (*Lolium multiflorum* L.) e trigo (*Triticum monococcum* L.).

Outro método bastante empregado para a introdução de fragmentos de DNA em células é a eletroporação. Neste caso, os protoplastos são expostos a pulsos elétricos curtos

⁷ Cultivar refere-se a uma "variedade cultivada" (do inglês, *cultivated variety*), isto é, uma linhagem vegetal com características agrônômicas bem estabelecidas e utilizada em plantios comerciais.

⁸ BARROS, L. M. G. & CARNEIRO, V. T. C. Eletroporação de protoplastos. In: BRASILEIRO, A. C. M & CARNEIRO, V. T. C. (eds.) *Manual de Transformação Genética de Plantas*. Brasília: CENARGEN/EMBRAPA, 1998. p. 35-49.

⁹ Endocitose é a atividade de transporte de material para o interior da célula (importação) por meio de invaginações da membrana plasmática.

e de alta voltagem na presença de DNA exógeno. Os pulsos elétricos induzem a formação transitória de poros e a permeabilização reversível da membrana plasmática, permitindo a entrada do DNA na célula. A transformação por eletroporação é ainda mais efetiva quando, na mistura de protoplastos e DNA, são adicionados lipídeos polares capazes de formar lipossomos¹⁰. Entre estes lipídeos estão a lipofectina ou a lipofectamina. Os lipossomos são capazes de englobar moléculas de DNA e formar pontes com a membrana plasmática dos protoplastos, facilitando a incorporação do material genético após o pulso elétrico.

¹⁰ Os lipossomos são vesículas ou corpos esféricos mantidos por típicas membranas biológicas, isto é, constituídas por uma ou duas camadas de lipídeos polares como fosfolipídeos, esfingolipídeos, entre outros.

A aplicação da eletroporação para a transformação estável tem sido utilizada para um número limitado de espécies vegetais. Arroz (*Oryza sativa*) foi o primeiro cereal transgênico fértil gerado por eletroporação. Para tabaco e algumas outras espécies de dicotiledôneas, foi demonstrado que o tratamento prévio com PEG aumenta a eficiência de transformação estável por eletroporação.

Para que ocorra a transformação genética, as moléculas exógenas de DNA devem atravessar não só a membrana citoplasmática, mas também o envelope nuclear. Uma vez no núcleo, mecanismos e componentes típicos da célula vegetal realizam a integração do DNA exógeno no(s) cromossomo(s). Novamente, o número de cópias incorporadas e os locais de integração são imprevisíveis, exceto quando seqüências especiais de DNA são utilizadas (veja adiante). Os mesmos mecanismos e componentes podem, é claro, eliminar o DNA exógeno sem realizar a integração. Quando protoplastos são utilizados para a transformação de células vegetais, tanto por PEG como por eletroporação, o maior obstáculo para a recuperação de plantas transgênicas é a dificuldade de regenerá-las a partir das células transformadas. Com a retirada da parede celular, as células tornam-se muito frágeis e suscetíveis a danos. Os eventos de transformação estável somente poderão ser detectados se o protoplasto for capaz de regenerar a parede celular, continuar a crescer e iniciar a divisão celular, permitindo a regeneração de plantas completas.

Transformação genética por aceleração de partículas

A aceleração ou bombardeamento de partículas, também conhecida por biolística, biobalística, *particle gun* ou *gene gun*, é, atualmente, o método mais amplamente utilizado para a transformação genética de plantas e de outros organismos, sendo capaz de superar as restrições estabeleci-

- ¹¹ LACORTE, C.; ARAGÃO, F. J. L.; VAINSTEIN, M. H. & RECH, E. L. Biobalística. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. & BUSO, J. A. (eds.) *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. v. 2. Brasília: CBAB e EMBRAPA, 1999. p. 761-781.

das pela necessidade de compatibilidade hospedeiro-*Agrobacterium* e as dificuldades encontradas para a regeneração de plantas a partir de protoplastos.¹¹ A transformação de várias espécies recalcitrantes (“resistentes” à transformação) é agora possível devido a uma extensa variação de tecidos (explantes) e células em cultura que podem servir de alvo para a transferência de DNA por meio da biobalística.

Embora existam diferentes procedimentos e equipamentos para realizar a transformação genética por biobalística, o princípio é sempre o mesmo. Inicialmente, o DNA é adsorvido à superfície de partículas metálicas com diâmetros que variam de 0,4 a 2 mm. As micropartículas devem possuir um alto peso para manterem a velocidade de migração após a aceleração, sendo ouro ou tungstênio os metais mais utilizados para as suas confecções. A adsorção do DNA (de carga negativa) à superfície das partículas é promovida por cátions bivalentes (Ca^{2+}) e peptídeos ricos em aminoácidos básicos (com cargas positivas) como espermidina, que imantam positivamente os metais. As partículas são, então, aceleradas a altas velocidades em direção ao tecido-alvo sob vácuo parcial, de forma a reduzir a resistência do ar contra o avanço das mesmas. As partículas atravessam a parede celular, a membrana plasmática e membranas de organelas, alojando-se aleatoriamente nos diversos compartimentos celulares. Espera-se que algumas partículas atinjam as organelas celulares que contêm DNA como plastídeos (cloroplastos), mitocôndrias e especialmente o núcleo. Em virtude do pH levemente ácido da célula, o DNA é liberado das micropartículas e, pela intermediação de fatores celulares, é eventualmente integrado ao DNA celular. Uma vez incorporados aos cromossomos, os transgenes serão replicados e segregados como os demais genes, regenerando-se plantas transgênicas a partir das células e tecidos transformados sob condições específicas de seleção.

Os aparelhos para acelerar as micropartículas podem ter propulsão a ar comprimido ou a vapor d'água, a pólvora, a gás hélio ou a eletricidade. A velocidade ótima varia com a espessura da parede celular, a sensibilidade dos tecidos ao dano e a localização (profundidade) das células-alvo no tecido. Alguns dos fatores que afetam a frequência de transformação por este método incluem o tamanho, o número e a composição das partículas; o método de precipitação do DNA sobre as partículas antes do bombardeamento; a velocidade de impacto do complexo DNA-partícula; a distância de migração das partículas; e o dano causado ao tecido-alvo. Testes e adaptações destas diversas condições devem

ser realizados com vistas a encontrar a condição ótima de transformação para um determinado tecido-alvo e genótipo vegetal.

Virtualmente, toda espécie vegetal capaz de ser regenerada a partir de células individualizadas pode ser transformada por biobalística. Praticamente todos os vegetais de importância agrônômica incluindo arroz, algodão, feijão, soja, cana-de-açúcar, milho, trigo, cevada, aveia, eucalipto, entre outros, já foram transformados por este método, o que demonstra que o mesmo é adequado tanto para dicotiledôneas como para monocotiledôneas.

Integração do DNA nos cromossomos

Tanto na transformação mediada por agrobactérias como naquela dependente de um dos diversos métodos de introdução direta de DNA, espera-se que o DNA exógeno seja integrado no genoma receptor por recombinação ilegítima.¹² A recombinação ilegítima caracteriza-se por envolver o pareamento homólogo entre seqüências-alvo curtas (um ou poucos nucleotídeos), por pequenas eliminações de bases (13-73 pb) no local da inserção e pela ocorrência de síntese de DNA (reparo) em trechos curtos entre a seqüência transferida e a seqüência-alvo. Na transformação mediada pelas agrobactérias, o T-DNA é transferido para a célula vegetal e integrado a um cromossomo na forma de fita simples, enquanto na aceleração de partículas e demais métodos, um DNA de fita dupla é, normalmente, inserido na célula. Portanto, diferentes mecanismos de recombinação podem estar envolvidos, mas não existe evidência para tal conclusão.

Um dos temas de maior interesse na transgênese vegetal (e de outros organismos) é o controle do local de integração no genoma e do número de cópias integradas. Isto pode ser obtido pela inclusão, em regiões flanqueadoras dos transgenes de interesse, de segmentos de homologia com regiões cromossômicas. Assim, espera-se que uma recombinação homóloga ocorra entre o fragmento de DNA exógeno e a região genômica que apresenta homologia. As regiões escolhidas normalmente compreendem segmentos de DNA de transcrição ativa e, portanto, é esperada uma recombinação perfeita para que não haja alteração do padrão de expressão de genes endógenos do vegetal receptor.

O número de cópias do T-DNA integrado aos genomas de linhagens de plantas transformadas é usualmente baixo, variando de uma a poucas cópias, embora, raramente,

¹² KUMAR, S. & FLADUNG, M. Controlling transgene integration in plants. *Trends in Plant Sciences*, v. 6, p. 155-159, 2001.

linhagens com até 12 cópias tenham sido encontradas. Nos demais métodos de transformação, geralmente várias cópias são integradas ao genoma. Caso mais de uma cópia estiver presente, estas podem estar localizadas em diferentes locos no genoma da planta ou podem estar em um mesmo loco, onde ocorrem em orientação direta ou invertida. Frequentemente, moléculas de T-DNA co-transferidas integram-se no mesmo local no genoma da célula vegetal, formando cadeias ligadas (concatâmeros). Considerando-se o tamanho de um genoma vegetal, é difícil conceber que os T-DNAs encontram-se reunidos por acaso. Isto sugere que as moléculas de T-DNA deslocam-se juntas até o ponto de inserção ou que existam locais preferenciais (*hot spots*) para a integração. Nestes locais, poderia estar presente uma região de DNA danificado, o que criaria uma área ativada contendo enzimas de reparo que são necessárias para o preenchimento de lacunas no momento da integração do T-DNA. Estudos iniciais indicaram que os locais de integração do T-DNA seriam distribuídos ao acaso no genoma da planta. Estudos posteriores, envolvendo a marcação de fitas de T-DNA (*T-DNA tagging*), bem como investigações da estrutura cromatínica do T-DNA em plantas transgênicas, sugerem uma integração preferencial em regiões ativamente transcritas do genoma.

Seleção de células e tecidos transformados e regeneração de plantas

A cultura *in vitro* de tecidos não é um pré-requisito para a transformação de plantas.¹³ A transformação genética de *Arabidopsis thaliana*¹⁴, por exemplo, mediada por *Agrobacterium*, pode ser obtida pela direta inoculação de plântulas, sob vácuo, seguida do replantio das mesmas em solo, sem a necessidade de cultura de tecidos. A seleção (antibiótica ou por herbicidas) é realizada sobre as plântulas germinadas (T1) a partir das sementes geradas pelas plantas originalmente transformadas (T0). Entretanto, a eficiência do método tem sido restrita a esta espécie vegetal, havendo também diferenças de resposta entre ecotipos. Em vista disto, a cultura *in vitro* de tecidos é empregada na quase unanimidade dos procedimentos de transformação para se obter eficiência tanto na transferência do gene, quanto na seleção e na regeneração dos transgênicos.

Nas culturas de tecidos para a transformação de plantas, o mais importante é que um grande número de células compatíveis com a regeneração seja acessível ao procedimento de transferência do gene e que as mesmas retenham

¹³ TORRES, A. C.; CALDAS, L.S. & BUSO, J. A. (eds.) *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Brasília: CBAB e EMBRAPA, 1999.
BRASILEIRO, A. C. M & CARNEIRO, V. T. C. (eds.) *Manual de Transformação Genética de Plantas*. Brasília: CENARGEN/EMBRAPA, 1998.

¹⁴ Trata-se de um vegetal-modelo de estudo em genética e biologia molecular vegetais. Não possui nome comum em língua portuguesa.

a capacidade de regenerar durante o tempo necessário para a proliferação celular e os tratamentos de seleção. Na medida do possível, o período de cultura *in vitro* de tecidos vegetais deve ser minimizado para evitar variações somaclonais, isto é, modificações no padrão de expressão gênica que podem levar a variações fenotípicas indesejáveis.

Considerando que um pequeno número das células-alvo incorpore o(s) transgene(s) de forma estável nos seus genomas com o emprego de qualquer dos métodos de transformação genética vegetal, genes que conferem vantagem seletiva, além dos genes de interesse, são geralmente incluídos na maioria dos procedimentos de transformação. Exceção pode ser feita àqueles vegetais cujo procedimento de regeneração esteja tão otimizado que um grande número de regenerantes seja obtido após a transformação.

Os genes marcadores são aqueles que codificam enzimas ou outras proteínas capazes de conferir, às células transformadas, resistência ou tolerância a determinados agentes seletivos. Assim, uma vez ocorrido o evento de transformação e na presença do agente seletivo correspondente, apenas as células que contenham e expressem o gene marcador crescerão normalmente, enquanto aquelas não transformadas morrerão. Duas classes de genes marcadores têm sido mais utilizadas na modificação genética de plantas: aqueles que codificam proteínas que conferem resistência a antibióticos e aqueles cujos produtos conferem tolerância ou resistência a herbicidas.

O gene marcador mais freqüentemente utilizado é o *aphA2* ou *nptII*, isolado do transposon Tn5 de *Escherichia coli* e que codifica a enzima aminoglicosídeo-3-fosfotransferase II [APH(3)II]. Esta enzima, também conhecida como neomicina-fosfotransferase II (NPTII), inativa, por fosforilação, os antibióticos aminoglicosídicos como neomicina, canamicina, paromomicina e G418. Outro gene de resistência a antibióticos muito utilizado na seleção de tecidos vegetais transformados é o gene *hpt*, isolado de *E. coli* e que codifica a enzima higromicina-fosfotransferase (HPT). Esta proteína confere resistência à higromicina e derivados. Este gene é especialmente utilizado quando as células e tecidos vegetais possuem resistência natural aos antibióticos aminoglicosídicos, como é o caso de monocotiledôneas como cevada e aveia e de algumas leguminosas como a soja.

Os genes marcadores que conferem tolerância a herbicidas mais utilizados são *csr1*, *aroA* e *bar*. O gene *csr1* ou *ahas* codifica uma forma alterada da enzima ácido hidroxiaçético-sintase (AHAS), também conhecida como aceto-

lactato-sintase (ALS). Este gene foi isolado de mutantes de *A. thaliana* resistentes aos herbicidas derivados de sulfonilurêias e de imidazolinonas (nomes comerciais Imazapyr e Arsenal). Tais herbicidas inibem a enzima AHAS endógena da planta, essencial à biossíntese de aminoácidos ramificados (valina, leucina, isoleucina), levando a planta à morte. Assim, plantas transgênicas contendo um dos genes mutados *csr1* produzem uma enzima AHAS alterada, não reconhecida pelos herbicidas, tornando-as tolerantes a esses produtos.

O gene *aroA* foi primeiramente isolado de *Salmonella typhimurium* tratada com agente mutagênico e selecionada para resistência ao herbicida glifosato (também chamado de glufosato e com o nome comercial Roundup, entre outros). Este herbicida inibe a enzima 5-enolpiruvil-3-fosfochiquimato-sintase (EPSPS), codificada pelo gene *aroA* endógeno da planta. Esta enzima faz parte da rota de biossíntese de aminoácidos aromáticos como triptofano e fenilalanina. O gene *aroA* foi isolado de muitas plantas e de outros microrganismos, inclusive de *A. tumefaciens*, sendo ainda submetido a diferentes mutações. O gene mutado codifica uma proteína com menor afinidade ao glifosato, conferindo, assim, tolerância da planta transgênica ao herbicida. A tolerância ao glifosato também pode ser obtida pela superexpressão, em plantas transgênicas, do próprio gene que codifica a enzima-alvo (EPSPS).

O gene *bar* ou *pat*, isolado de *Streptomyces hygroscopicus*, codifica a enzima fosfinotricina-N-acetiltransferase (PAT) que inativa o herbicida fosfinotricina (PPT, com os nomes comerciais Basta e Finale, entre outros), prevenindo sua ligação à glutamina-sintetase (GS). O PPT é um análogo do glutamato e um inibidor da GS. A GS catalisa a reação que fixa amônia na molécula de glutamato, formando glutamina. Assim, a glutamina é o principal produto de assimilação da amônia em plantas, sendo importante na regulação do metabolismo nitrogenado. A inibição da GS resulta no acúmulo de amônia nas células provocando a morte da planta.

Portanto, o uso de genes marcadores e dos respectivos agentes seletivos permite a seleção das células e tecidos transformados, impedindo o crescimento ou eliminando as células vegetais que não integraram, de forma ativa, o transgene em pelo menos um de seus cromossomos. Sob condições estabelecidas de cultura *in vitro*, incluindo a composição dos meios, a combinação e a concentração de reguladores de crescimento, a temperatura e o fotoperíodo, os tecidos transformados são induzidos a regenerar plantas inteiras.

Genes de interesse e culturas comerciais de plantas transgênicas

Nas culturas transgênicas que atualmente estão sendo comercializadas, foram incorporadas características da chamada “primeira geração”, capazes de conferir vantagens agronômicas simples, ou seja, dependentes de genes únicos ou de alguns poucos genes, dirigidas para a solução de estresses ambientais. Estas incluem, em primeiro lugar, a tolerância a herbicidas, seguida pela resistência a insetos e alguns produtos resistentes a vírus. Neste grupo de plantas transgênicas incluem-se, ainda, aquelas que incorporaram vantagens como a tolerância a metais tóxicos do solo, ao frio e a outros estresses abióticos. A alta taxa de adoção de culturas com tais características reflete a satisfação dos agricultores com produtos que oferecem benefícios significativos, variando de manejo mais flexível, menor trabalho e mais alta produtividade, além de benefícios econômicos e ambientais, pelo conseqüente decréscimo no uso de agroquímicos.

A segunda geração de características introduzidas em plantas, capazes de conferir a melhoria na qualidade do produto, resulta em benefícios que serão mais evidentes para os consumidores. A primeira característica de qualidade introduzida numa cultura transgênica foi o amadurecimento retardado no tomate *Flavr Savr*, aprovado para comercialização nos Estados Unidos em 1994. Os produtos com características de qualidade que estarão disponíveis em curto prazo incluem os chamados nutracêuticos como produtos mais nutritivos e saudáveis para a alimentação humana e animal (por exemplo, soja com maior conteúdo de ácido oléico, um ácido graxo mais saudável); produtos que estão sendo desenvolvidos como remédios para deficiências em vitaminas, (*Golden Rice*, por exemplo, um arroz com altos níveis de b-caroteno, precursor da vitamina A); produtos para sanar deficiências em microelementos (ex. arroz com níveis elevados de ferro, para combater anemias causadas pela deficiência de tal microelemento); produtos com melhor sabor, aroma e/ou aumento na qualidade ou armazenamento de compostos como amido ou proteínas (por exemplo, batata com menor conteúdo de líquidos, que absorve menor quantidade de gordura na fritura); produtos com melhor qualidade em fibras (por exemplo, algodão com fibras mais longas e fortes, conferindo melhor qualidade ao produto têxtil).

No Brasil, a geração e análise, teste em laboratório e a campo, transporte, plantio comercial ou comercialização de organismos geneticamente modificados, incluindo plantas transgênicas, são regulamentados pelo Ministério da Ciência e Tecnologia, além de outros Ministérios, pela Lei nº 8.974, de 5 de janeiro de 1995, pelo Decreto nº 1.752, de 20 de dezembro de 1995, e por Instruções Normativas emitidas pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança.

Plantas transgênicas e segurança

A adoção comercial das culturas transgênicas é um dos casos de mais rápida difusão de uma nova tecnologia na história da agricultura. Num período de sete anos, a área global das culturas transgênicas aumentou mais de 35 vezes, passando de 1,7 milhões de hectares em 1996 para 58,7 milhões de hectares em 2002.¹⁵ Esta rápida adoção naturalmente levantou resistências ao redor do mundo, e um bom número de alegados riscos dos produtos transgênicos foram veiculados e difundidos na população. Nesta oportunidade, gostaríamos de abordar algumas críticas que, sob nosso entendimento, necessitam ser esclarecidas em virtude dos métodos e genes utilizados para a geração de plantas transgênicas, conforme acima relatados.

A presença de genes marcadores, especialmente aqueles capazes de conferir resistência a antibióticos de uso médico ou veterinário, é razão de fortes críticas às plantas transgênicas. Em geral, os genes marcadores estão fisicamente ligados aos genes de interesse, isto é, presentes na mesma cadeia de DNA exógeno utilizada na transformação (T-DNA, plasmídeo ou fragmento de plasmídeo). Exceto em raros casos de silenciamento gênico por eliminação física (*deleção*) do transgene marcador, isto é, a perda total da expressão do transgene, a remoção do gene de seleção é dificultada.

A principal preocupação com relação aos genes marcadores concentra-se na possibilidade da transferência horizontal do transgene das células vegetais transformadas para células bacterianas, gerando microrganismos resistentes a drogas. A transferência horizontal de genes ocorre naturalmente entre os organismos vivos, sejam eles transgênicos ou não transgênicos.¹⁶ A transferência horizontal de genes marcadores é teoricamente passível de ocorrer na flora intestinal humana e animal de indivíduos alimentados com vegetais transgênicos e sob tratamento antibiótico.

¹⁵ JAMES, C. Global status of commercialized transgenic crops: 2002. *ISAAA Briefs - Preview*, n. 27, 24 p., 2002.

¹⁶ SYVANEN, M. & KADO, C. I. *Horizontal Gene Transfer*. London: Academic Press, 2002.

Para que tal fenômeno ocorra é preciso a confluência de uma série de fatores. Entre eles, salienta-se: (i) a região codificadora da proteína de resistência deve ser absorvida de forma intacta pela bactéria e integrada no DNA cromossômico, plasmidial ou viral presente de forma estável na bactéria; (ii) o local da integração deve possuir regiões reguladoras para permitir que o transgene seja adequadamente transcrito e traduzido na proteína de resistência. Estas regiões devem ser diferentes do promotor e terminador¹⁷ originais do transgene que permitem o funcionamento do mesmo nas células vegetais. Finalmente, (iii) para que as células bacterianas transformadas por transferência horizontal sobrevivam, o ambiente de sua multiplicação deve estar sob a pressão do mesmo agente seletivo (antibiótico) para o qual o transgene confere resistência. Caso o antibiótico esteja ausente, o fato da bactéria possuir um gene inútil é razão de sua seleção negativa em relação às outras bactérias não transformadas, mais eficientes no aproveitamento de energia. Este ambiente é encontrado em pacientes humanos sob quimioterapia antibiótica ou em animais criados em confinamento (aves e suínos, principalmente) onde o permanente tratamento antibiótico é comum. Portanto, embora possa ocorrer a transferência horizontal do gene marcador, o evento é de uma raridade extrema. A possibilidade da transferência do gene marcador para células humanas ou animais é ainda mais remota. Mesmo que ocorra, não se espera que nossas próprias células (ou as de animais) sejam afetadas pelo antibiótico, já que os mesmos são utilizados para controlar a multiplicação de bactérias. As frequências e consequências da transferência de genes marcadores para nossas próprias células, dos pontos de vista genético ou molecular, seriam as mesmas de qualquer outro segmento de DNA presente no alimento.

A presença de genes marcadores em plantas transgênicas é inconveniente por uma razão técnica: a impossibilidade de se utilizar o mesmo gene marcador ou as mesmas regiões reguladoras para um novo evento de transformação genética da mesma planta. Assim, diferentes métodos foram apresentados para a eliminação de genes marcadores após a obtenção das plantas transgênicas. O mais simples deles utiliza a co-transformação de células vegetais, isto é, o emprego de duas cadeias distintas de DNA, uma contendo o gene de interesse e outra contendo o gene marcador.¹⁸ Após a co-transformação, os tecidos são multiplicados na presença do agente seletivo convencional e as plantas transgênicas regeneradas. Nesta fase é feita a confirmação

¹⁷ As seqüências promotoras e terminadoras dos genes são as seqüências de DNA responsáveis pela regulação dos mesmos, isto é, definem o tempo e a quantidade de mensagens (RNA mensageiro) produzidas para a síntese de proteínas.

¹⁸ EBINUMA, H.; SUGITA, K.; MATSUNAGA, E.; ENDO, S.; YAMADA, K. & KOMAMINE, A. Systems for the removal of a selection marker and their combination with positive marker. *Plant Cell Reports*, v. 20, p. 383-392, 2001.

da co-integração do gene de interesse e do gene marcador. Espera-se que a integração dos transgenes tenha ocorrido em locos cromossômicos distintos em alguns vegetais, de forma que permita a eliminação do gene marcador por simples (auto)fecundação e seleção de indivíduos da progênie. Outras metodologias mais complexas fazem uso de transgenes capazes de induzir a regeneração¹⁹ ou segmentos de DNA capazes de combinar o gene de interesse, o gene marcador e genes de endonucleases ou recombinases sob a regulação de promotores induzidos.²⁰ A planta transgênica regenerada é tratada com o agente indutor que, ativando o gene da endonuclease ou da recombinase, promove a remoção do segmento de DNA contendo os genes marcador e da própria endonuclease/recombinase, deixando somente o gene de interesse integrado ao cromossomo.

A soja com tolerância ao herbicida glifosato (Soja RR, de *Roundup Ready*) e o milho resistente à broca (*Ostrinia nubilalis*)²¹, também conhecido por milho *Bt* por conter um gene de *Bacillus thuringiensis* codificador de uma d-endo-toxina letal ao inseto, são as duas plantas transgênicas mais difundidas mundialmente. Embora nenhuma prova documental exista sobre efeitos nocivos à saúde humana e a de animais vertebrados, estas duas plantas são alvo das mais populares discussões dos últimos anos. A questão da segurança alimentar dos produtos derivados de transgênicos é relativamente fácil de ser abordada. Munidos dos devidos vegetais-controle, isto é, das plantas originais a partir das quais foram geradas as transgênicas, diversos ensaios toxicológicos e bromatológicos podem ser conduzidos, trazendo resultados óbvios sobre a saúde animal e humana.²² A questão ambiental é, sem dúvida, muito mais complexa de ser respondida. A principal razão disto é o fato de que muito pouco se conhece sobre o meio ambiente.²³

O principal risco ambiental oferecido pelas duas plantas transgênicas citadas, a soja RR e o milho *Bt*, é a transferência dos transgenes para espécies naturalmente ocorrentes nos locais de seus plantios. Isto poderia potencialmente gerar, no primeiro caso, novas plantas invasoras resistentes ao herbicida glifosato e, no segundo caso, plantas resistentes a insetos. No Brasil e, em particular, no Estado do Rio Grande do Sul, a geração de novas plantas invasoras contendo o transgene de tolerância ao glifosato dificilmente ocorreria por duas razões simples: a soja é uma espécie autógama, isto é, de autofecundação, com menos de 1% de eventos de polinização cruzada; e, em segundo lugar, não existem espécies sexualmente compatíveis com a soja. Mesmo

¹⁹ ZUO, J.; NIU, Q.-W.; IKEDA, Y. & CHUA, N.-H. Marker-free transformation: increasing transformation frequency by the use of regeneration-promoting genes. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 13, p. 173-180, 2002.

²⁰ PUCHTA, H. Removing selectable marker genes: taking the shortcut. *Trends in Plant Science*, v. 5, p. 273-274, 2000.

²¹ SEARS, M. K.; HELLMICH, R. L.; STANLEY-HORN, D. E.; OBERHAUSER, K. S.; PLEASANTS, J. M.; MATTILA, H. R.; SIEGFRIED, B. D. & DIVELY, G. P. Impact of *Bt* corn pollen on monarch butterfly populations: a risk assessment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v. 98, p. 11937-11942, 2001.

JAMES, C. Global status of commercialized transgenic crops: 2002. *ISAAA Briefs - Preview*, n. 27, 24 p, 2002.

²² CHASSY, B. M. Food Safety Evaluation of Crops Produced through Biotechnology. *Journal of the American College of Nutrition*, v. 21, p. 166S-173S, 2002.

²³ WOLFENBARGER, L. L. & PHIFER, P. R. The Ecological Risks and Benefits of Genetically Engineered Plants. *Science*, v. 290, p. 2088-2093, 2000.

que a transferência do transgene de tolerância ao glifosato ocorresse da soja RR para uma espécie nativa, isto não acarretaria um desequilíbrio ambiental porque, no ambiente nativo, não é aplicado o herbicida. Assim, sem função, o transgene seria perdido na população de plantas nativas. O risco, portanto, estaria restrito às áreas agriculturáveis onde é feito uso do herbicida glifosato e somente em plantas que, além da compatibilidade sexual com a soja, já tivessem uma “vocalização” para serem “ervas-daninhas”.

A situação seria bastante diferente caso tratássemos de, por exemplo, “arroz RR” e não da soja RR. O arroz é um vegetal de polinização aberta e cuja cultura tem, como um de seus maiores problemas, o arroz vermelho, sexualmente compatível com o arroz cultivado. Sem os cuidados agrônômicos necessários para a cultura do arroz (e controle do arroz vermelho), em poucas safras ou anos surgiria o “arroz vermelho RR”, e o transgene perderia a sua utilidade de facilitar o controle de plantas invasoras. O problema não é novidade e exclusividade do arroz ou de transgênicos em geral. Cultivares com resistência ou tolerância a herbicidas, geradas por métodos convencionais de melhoramento genético como o cruzamento controlado ou a mutação, por exemplo, ofereceriam o mesmo risco ambiental e à agricultura.

A transferência do transgene de resistência a insetos, presente no milho *Bt*, para espécies nativas sexualmente compatíveis poderia, potencialmente, provocar um desequilíbrio. Isto seria um problema real particularmente em regiões do México ou outros centros de origem do milho. A planta nativa, no ambiente natural, teria maior resistência a insetos predadores, passando a predominar no ambiente em detrimento de outros vegetais competidores também atacados pelo mesmo inseto. Novamente, esta situação não é exclusividade do milho *Bt* ou de plantas transgênicas como um todo e, sim, de qualquer cultivar melhorada geneticamente por métodos convencionais para a resistência a insetos, nematódeos, vírus, fungos e bactérias. Na área destinada à agricultura, no entanto, o uso extremamente reduzido de inseticidas químicos com o advento do milho *Bt* (ou outro vegetal “*Bt*”), é argumento econômico, ambiental e de saúde suficiente para se convencer da vantagem destes vegetais transgênicos em relação às demais cultivares convencionais não resistentes.²⁴

Em conclusão, a transgênese e os vegetais transgênicos oferecem riscos equivalentes aos demais métodos convencionais de melhoramento genético e seus produtos.

²⁴ JAMES, C. Global review of commercialized transgenic crops: 2001. Feature: Bt Cotton. *ISAAA Briefs*, n. 26, 184 p., 2002

Giancarlo Pasquali é farmacêutico, doutor em Biologia Molecular Vegetal, professor do Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e pesquisador responsável pelo Laboratório de Biologia Molecular Vegetal do Centro de Biotecnologia da mesma Universidade.

pasquali@dna.cbiot.ufrgs.br

Maria Helena Bodanese Zanettini é bióloga, doutora em Ciências (Genética), professora do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e responsável pelo Laboratório de Cultura de Tecidos, Citogenética e Transformação Genética Vegetal da mesma Universidade.

mariahbz@if1.if.ufrgs.br

Podemos afirmar que os riscos oferecidos pelos transgênicos são, em verdade, ainda menores, por se tratarem de eventos e moléculas de DNA muito melhor caracterizados do que, por exemplo, a indução de mutações ou a promoção de cruzamentos entre indivíduos que, dificilmente, encontrar-se-iam na natureza para gerar progênie e híbridos.

Em todas as práticas de melhoramento genético, um bom número de indivíduos são obtidos e todos são avaliados quanto à manutenção das melhores características originais somada à nova característica introduzida, seja por cruzamentos, mutações ou transgênese. Independentemente do método de melhoramento, a vasta maioria dos indivíduos da progênie é descartada em favor de alguns poucos indivíduos “melhores”, que são selecionados e multiplicados para caracterizar a nova cultivar. Para os produtos da transgênese, ensaios de segurança ambiental e alimentar são exigidos, e tais exigências são plenamente razoáveis, pertinentes, necessárias. Por que não são aplicadas as mesmas exigências aos demais produtos de melhoramento genético convencional?