

Biotechnologia

Engenharia genética introduz novas características para melhorar plantas

Gustavo Dias Almeida e Alúzio Borém *



RODRIGO ALMEIDA

Campo de produção de sementes melhoradas pela engenharia genética

Desde o início da agricultura, as plantas vêm sendo modificadas geneticamente pelo homem. Até recentemente, a única forma para introdução de características de interesse em um indivíduo ou espécie era por meio de cruzamentos. No entanto, estes métodos convencionais possuem limitações, como as barreiras de isolamento filogenético entre e dentro de grupos gênicos e a ligação gênica, além do tempo necessário para a transferência dos caracteres de interesse. Com os avanços da biotecnologia, atualmente o melhoramento de plantas conta com importantes ferramentas para a introdução de novas características, como a engenharia genética e a transformação. Com o advento destas técnicas, os cientistas passaram a incorporar genes de diferentes espécies vegetais, animais ou microrganismos (Perani et al., 1986), de forma controlada, no genoma vegetal, independentemente de cruzamentos, eliminando as barreiras filogenéticas entre os organismos dos três grandes domínios (Eubactérias, Archaea e Eukarya).

A transformação genética de plantas pode ser definida como a introdução de uma sequência de DNA no genoma receptor, excluindo-se a inserção por fecundação. Apesar de existirem outras técnicas que também permitem a introdução de genes sem a fecundação, como a hibridação somática e a ciberização, a transformação gênica é a única técnica que permite inserir apenas genes específicos no genoma vegetal. Para que o processo de transformação seja efetivo, o DNA exógeno deve ser introduzido em células ou tecidos vegetais aptos a regenerar plantas completas. Tal processo é possível devido ao fenômeno de totipotência das células vegetais, que é a capacidade de elas se regenerarem em novas plantas, na presença de condições favoráveis, de nutrientes e de hormônios, o que torna a cultura de tecidos indispensável à transformação gênica. Um fator limitante na transformação gênica tem sido a baixa eficiência das técnicas de

cultura de tecidos vegetais *in vitro* para algumas espécies de plantas. Aliada a isso, em muitas situações a esterilidade total ou parcial (albinismo) pode consistir em barreira para a finalização deste processo (Santarem, 2000).

CLONAGEM MOLECULAR E ISOLAMENTO DE GENES

O primeiro procedimento realizado é a identificação do gene responsável pela expressão da característica de interesse. Se este gene for encontrado em espécies sexualmente compatíveis, técnicas de melhoramento genético clássico podem ser utilizadas. Considerando que um gene é apenas um pequeno fragmento do genoma de um indivíduo, o isolamento dos genes de interesse envolve a tecnologia do DNA recombinante. Após isolar os genes responsáveis pela característica de interesse, estes são sequenciados e engenheirados. Nesse processo, os genes são colocados sob a expressão de regiões promotoras e terminadoras conhecidas, a montante e a jusante do gene, respectivamente. Além dessas duas sequências, os genes recebem os genes marcadores de seleção. Os métodos mais comuns de transformação gênica são a mediada por *Agrobacterium* e a biobalística.

TRANSFORMAÇÃO POR AGROBACTERIUM

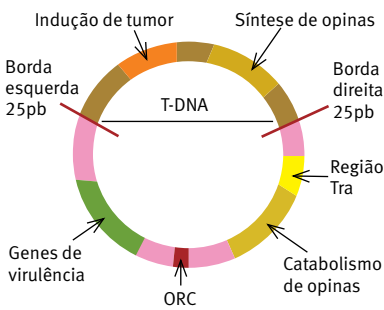
As agrobactérias são nativas do solo, aeróbicas Gram-positivas, em formas de bacilo, pertencentes à família das Rizobiaceae. O gênero *Agrobacterium* está subdividido em cinco espécies que se diferem entre si pela patogenicidade e modo de infecção a diferentes plantas. Tecidos vegetais podem crescer *in vitro*, sem a adição de reguladores de crescimento, que são conhecidos como tumores vegetais. Este fenômeno se deve à presença de opinas e, também, de um plasmídeo que infecta naturalmente essas bactérias, conhecido como plasmídeo Ti (indutor de tumor), capaz de introduzir parte de seu DNA no genoma da planta hospedeira.

O plasmídeo Ti possui genes que codificam para múltiplas funções, quase todas relacionadas com a transferência e integração de genes deste plasmídeo (T-DNA) no genoma da célula vegetal. Nesta região do T-DNA estão presentes os genes que codificam para os fitormônios, auxinas e citocininas, provocando o crescimento desordenado dos tecidos celulares vegetais. A região do T-DNA contém a porção do DNA que é transferida, com suas extremidades direita e esquerda, delimitada por uma região de 25 pb em repetições direitas e imperfeitas. Qualquer sequência de bases que for inserida entre essas duas extremidades será integralmente transferida para a planta, independentemente de seu tamanho.

Os genes de virulência (região *vir*) são responsáveis pela codificação de produtos gênicos que atuam no processo de exportação do T-DNA da bactéria para a planta. A região Tra é responsável pela expressão de genes que codificam produtos e governam a transferência conjugacional do plasmídeo Ti para outras espécies compatíveis de *Agrobacterium* (Figura 1).

O plasmídeo Ti transfere apenas a região do T-DNA, assim, é necessário retirar esses genes do plasmídeo e inserir os genes de interesse. Isso é realizado pela deleção de genes do T-DNA que codificam proteínas controladoras da síntese dos fito-oncogênicos. Além do mais, é necessário introduzir um gene que permita a seleção das células transformadas, como genes que conferem resistência a antibióticos (genes marcadores de seleção). Dessa forma, a primeira etapa no processo de transformação gênica por *Agrobacterium* é a obtenção do plasmídeo desarmado. A segunda etapa envolve a obtenção do plasmídeo Ti contendo os genes de interesse na região do T-DNA. Basicamente, dois sistemas têm sido utilizados: a cointegração e o sistema binário. Mais recentemente foi desenvolvida a técnica de desarmamento por recombinação entre plasmídeo de *A. tumefaciens* e *Escherichia coli*, descrita por Kiyokawa et al. (2009).

FIGURA 1 | MAPA GENÔMICO DO PLASMÍDEO TI MOSTRANDO AS REGIÕES MAIS IMPORTANTES



Adaptado de Andrade et al. 2003; Pacurar et al., 2011.

SISTEMA COINTEGRADO

As regiões responsáveis pela síntese de auxinas e citocininas localizadas entre as extremidades esquerda e direita do T-DNA são removidas por dupla recombinação e substituídas por sequências de DNA, geralmente derivadas dos vetores do vetor de expressão pBR322. Estas sequências fornecem a homologia necessária à recombinação simples e à formação do plasmídeo cointegrado. Fragmentos remanescentes de T-DNA, geralmente os responsáveis pela síntese de opinas, podem funcionar como região de homologia.

O sistema de cointegração exige a construção de um vetor intermediário, no qual é clonado o gene de interesse. O vetor intermediário é manipulado na bactéria *E. coli* e, posteriormente, introduzido em uma linhagem de *Agrobacterium*. Devido à incapacidade de replicação nas células da agrobactéria, este vetor se cointegra com o plasmídeo Ti por recombinação gênica ou *crossing-over*. Para isso, a região de homologia é introduzida nas extremidades de onde o gene de interesse está no plasmídeo da *E. coli*. A necessidade de homologia entre o plasmídeo e o vetor de clonagem, aliada à baixa frequência de recombinação, é limitante para essa técnica (Figura 2a).

SISTEMA BINÁRIO

Baseia-se no fato de que o T-DNA não precisar ser, necessariamente, ligado à

região *vir* para que ocorra transferência para célula vegetal. Neste caso, o gene de interesse é clonado e manipulado entre as extremidades do plasmídeo intermediário, independentemente do plasmídeo-Ti, que é chamado de vetor binário. O vetor binário possui baixo peso molecular (10 a 15 Kb), fácil manipulação e pode se replicar tanto em *E. coli* quanto em *Agrobacterium*. No entanto, neste sistema não ocorre recombinação gênica entre o plasmídeo-Ti e outro vetor, mas há necessidade de existir um plasmídeo-Ti desarmado na linhagem bactéria, onde se irá introduzir o vetor binário. Assim, as proteínas expressas pela região *vir* do plasmídeo-Ti desarmado promovem a transferência do T-DNA do vetor binário para o genoma vegetal. A princípio, um vetor binário pode ser inserido em qualquer linhagem de *Agrobacterium* com plasmídeo desarmado, uma vez que possui região *vir* intacta (Figura 2b).

Após a obtenção dos vetores binários, estes devem ser transferidos para *Agrobacterium*. Assim que os genes de interesse são inseridos em linhagens bacterianas desarmadas, devem ser transferidos o mais rápido possível para a espécie vegetal, sendo recomendado o sistema de cocultura, que combina o processo de regeneração com o de desinfecção do tecido contaminado pela bactéria e seleção das células que expressem os genes.

TRANSFORMAÇÃO POR BIOBALÍSTICA

O método denominado biobalística ou aceleração de micropartículas permite a inserção de genes exógenos no genoma nuclear e de organelas dos organismos. A biobalística consiste na aceleração de micropartículas de ouro ou tungstênio, que atravessam a parede celular e a membrana plasmática, carregando DNA para o interior da célula (Sanford, 1988). O método baseia-se no uso de um equipamento que produz força propulsora, gás e choques elétricos para acelerar micropartículas de ouro (1,0 a 3,0 µm) ou

tungstênio (0,2 a 3,0 µm), revestidas com o DNA (transgene) que será introduzido na espécie transformada, a velocidades superiores a 1.500 km/h, pelo acelerador de partículas.

Por este processo, podem-se bombardear embriões, hipocótilos, cotilédones, discos foliares, calos e suspensões celulares, apresentando eficiência de transformação de 1% a 5% dos transformantes transientes (Potrykus, 1990). Uma derivação desta técnica é a pistola genética, que consiste no disparo de micropartículas de ouro sobre o tecido vegetal *in vivo*. A grande vantagem do processo de transformação via biobalística é a possibilidade de introdução de DNA exógeno em qualquer tipo de célula, já que alguns organismos são recalcitrantes à transformação via *Agrobacterium* (Vidal et al., 2003).

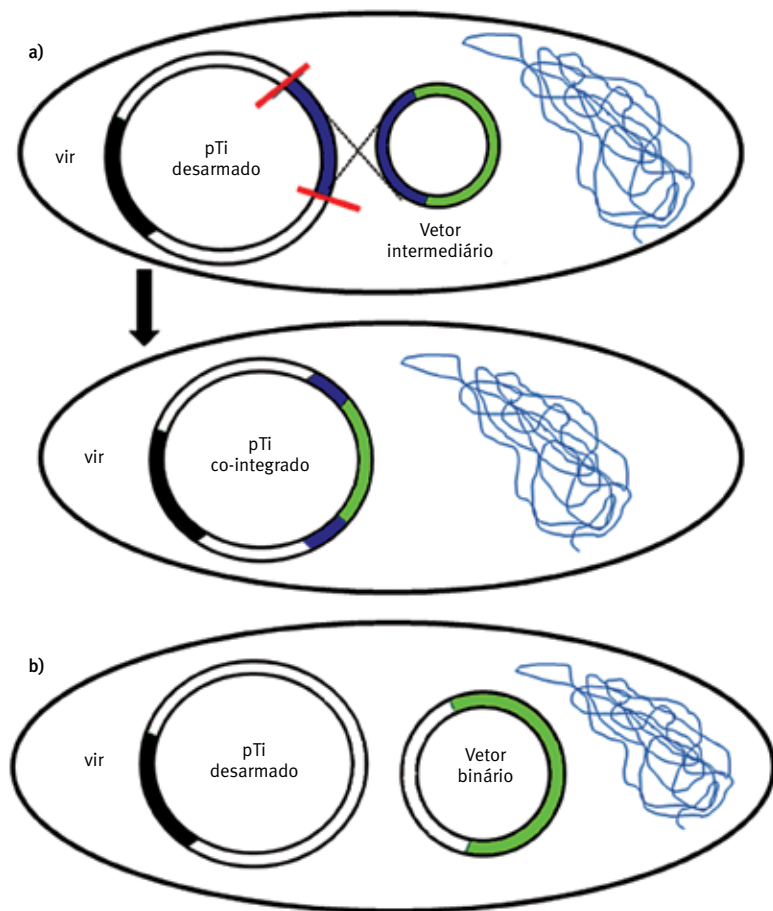
REGENERAÇÃO E SELEÇÃO

O sucesso da obtenção de plantas geneticamente modificadas (GM) depende da capacidade de regeneração de uma planta completa a partir da célula. Isso só é possível porque as células não diferenciadas possuem a totipotência, ou seja, a habilidade de se diferenciarem em todos os tecidos vegetais. No entanto, algumas espécies têm se mostrado recalcitrantes a este processo de regeneração.

OBTENÇÃO DE CULTIVAR COMERCIAL

Uma vez selecionados indivíduos T₀ que apresentam expressão adequada, eles são autofecundados para obtenção de progênies homozigóticas transgênicas. O melhor evento de transformação deve ser analisado conforme as exigências da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), atendendo às questões de biossegurança alimentar e ambiental. Com base nas análises realizadas e nas experimentações conduzidas com autorização da Comissão, a instituição requerente deve submeter à CTNBio o processo pleiteando a liberação comercial de sua cultivar geneticamente modificada.

FIGURA 2 | SISTEMAS DE VETORES PARA TRANSFORMAÇÃO POR AGROBACTERIUM: A) SISTEMA COINTEGRADO; B) SISTEMA BINÁRIO



Adaptado de Pacurar et al., 2011.

Após o evento transgene ter sido liberado em um país, ele então poderá ser transferido para quaisquer outros cultivares comerciais da mesma instituição ou de outras que tenham licenciado o transgene naquela geografia. Este processo de transferência do transgene para outras linhagens e cultivares pré-comerciais e/ou comerciais é realizado por meio do método de melhoramento dos retrocruzamentos e assistido por marcadores moleculares (Miki & McHugh, 2004). Os marcadores moleculares possibilitam a identificação, em nível genômico, dos indivíduos que possuem o transgene, bem como daqueles cujos genomas são mais similares ao genitor recorrente, o qual pode ser uma linhagem ou cultivar comercial, bem como linhagens que estão em processo de avanço em um programa

de melhoramento. Os programas de melhoramento geralmente iniciam o processo de seleção das melhores linhagens e à medida que elas alcançam estágios mais avançados se inicia o processo de conversão das mesmas, para que o lançamento do cultivar transgene ocorra ao mesmo tempo que o do convencional. Os novos cultivares GM deverão apresentar as mesmas características agrônomicas (rendimento, altura, ciclo, acamamento, tolerâncias a estresses bióticos e abióticos) da linhagem/cultivar convencional (Carneiro et al., 2009).

Gustavo Dias de Almeida é engenheiro agrônomo, M.S., D.S. e pesquisador da Monsanto Company (gustavo.d.almeida@monsanto.com); **Aluizio Borém** é engenheiro agrônomo, mestre, doutor e professor da Universidade Federal de Viçosa (UFV) (borem@ufv.br).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, G. M.; SARTORETTO, L. M.; BRASILEIRO, A. C. M. *Biologia molecular do processo de infecção por Agrobacterium spp. Fitopatologia Brasileira*. v. 28, n. 5, p. 465-476, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-41582003000500001&script=sci_arttext>. Acesso em: 2 dez.2015.
- BORÉM, A.; ALMEIDA, G. *Plantas Geneticamente Modificadas*. 1. ed. Visconde do Rio Branco: Editora Suprema, 2011. 390 p.
- CARNEIRO, A. A.; GUIMARÃES, C. T.; VALICENTE, F. H.; WAQUIL, J. M.; VASCONCELOS, M. J. V.; CARNEIRO, N. P.; MENDES, S. M. *Milho Bt: teoria e prática da produção de plantas transgênicas resistentes a insetos-praga*. Sete Lagoas: Embrapa, 2009. 26 p. (Embrapa Circular Técnica, 135).
- KIYOKAWA, K.; YAMAMOTO, S.; SAKUMA, K.; TANAKA, K.; MORIGUCHI, K.; SUZUKI, K. Construction of disarmed Ti-plasmids transferable between *Escherichia coli* and *Agrobacterium* species. *Applied And Environmental Microbiology*, Washington, v.75, n. 7, p. 1845-1851, 2009.
- MIKI, B.; MCHUGH, S. Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *Journal of Biotechnology*, n.107, p. 193-232, 2004.
- PACURAR, D. I.; CHRISTENSEN, H. T.; PACURAR, M.; PAMFIL, D.; BOTEZ, C.; BELLINI, C. *Agrobacterium tumefaciens: from crown gall tumors to genetic transformation. Physiological and Molecular Plant Pathology*, n.76, p.76-81, 2011.
- PERANI, L. Gene transfer methods of crop improvement: introduction of foreign DNA into plants. *Physiologia Plantarum*, n. 68, p. 566-570, 1986.
- POTRYKUS, I. Gene transfer to plants: assessment and perspectives. *Physiologia Plantarum*, n. 79, p.125-134, 1990.
- SABRI, N.; PELISSIER, B.; TEISSIE, J. Transient and stable electrotransformation of intact black mexican sweet maize cells are obtained after plasmolysis. *Plant Cell Reports*, n. 15, p. 924-928, 1996.
- SANFORD, J. C. The biolistic process. *Trends in Biotechnology*, n. 6, p. 299-302, 1988.
- VIDAL, J. R.; KICKERT, J. R.; WALLACE, P. G.; REISCH, B. I. High-efficiency biolistic co-transformation and regeneration of Chardonnay (*Vitis vinifera L.*) containing npt-II and antimicrobial peptide genes. *Genetic Transformation and Hybridization*, n.22, p.252-260, 2003.