

Unidade 9 – Plantas Transgênicas

1. Introdução

Visando melhor qualidade de alimento e, muitas vezes, os barateamentos do custo de produção dos mesmos, cientistas estão desenvolvendo plantas transgênicas, ou seja, modificadas com genes de outras espécies, principalmente soja, milho, batata, arroz, algodão e canola. Na Alemanha, a soja utilizada para a produção do chocolate TOBLERONE é transgênica.

A transgenia, por alterar a natureza da planta gera dúvidas cruciais quanto à relação risco/benefício de seu consumo, produção, impacto biológico e ambiental. Transgênicos são quaisquer organismo alterado geneticamente por técnicas de engenharia genética, as quais permitem a introdução de genes (sequências específicas de DNA) de espécies alheias ou uma sequência modificada do DNA do próprio organismo e que sejam capazes de transmitir as novas características aos seus descendentes.

Através da biotecnologia, chegou-se aos transgênicos, conferindo-lhes peculiaridades, tal como o milho resistente ao ataque de insetos e lagartas, soja resistente a herbicidas, feijão com características nutricionais da castanha-do-pará.

Outra questão importante quando se trata de transgênicos (plantas e animais), é a nova relação econômica mundial estabelecida no panorama de fome global que se apresenta atualmente. Apenas um quinto da população do mundo (1,2 bilhão de pessoas) têm condições de consumir o alimento que deseja. Há um consenso na comunidade científica mundial de que a tecnologia convencional, sozinha, não permitirá que a produção de alimentos seja aumentada o suficiente para alimentar uma população de 9,37 bilhões de pessoas estimada para o ano 2050 (BONGAARTS, 1998).

O crescimento da população, que quase duplicará nos próximos 50 anos, não exigirá apenas maior quantidade de alimentos, mas também uma grande expansão das áreas ocupadas com moradias, locais de trabalho, educação, lazer. É imprescindível, portanto, um acentuado aumento na produtividade das culturas para que algumas regiões naturais possam continuar a serem preservadas.

Mesmo reconhecendo que o problema poderá ser minorado, em parte, com uma melhor distribuição dos alimentos, é importante salientar que para atender às necessidades futuras e permitir uma produção sustentável, a pesquisa agrícola deverá utilizar todas as tecnologias, incluindo as modernas biotecnologias, que vêm apresentando um desenvolvimento extremamente rápido. De particular importância é a engenharia genética, que envolve a produção e uso de plantas transgênicas.

Para se entender a tecnologia de ponta nunca se deve esquecer os conceitos básicos que levam a isso, sobretudo àqueles referentes às células, seus constituintes citoplasmáticos e todo seu funcionamento. Além disso, é necessário se conhecer o processo de fixação biológica de bactéria *Rhizobium* do solo as raízes das leguminosas para a absorção do nitrogênio, numa perfeita simbiose mutualística, pois ambas se beneficiam. Este conhecimento permitiu, inclusive, que as novas e mais rápidas tecnologias fossem desenvolvidas. Esses são pontos primeiramente abordados para, por último, entender-se o processo específico de transgenia.

2. A descoberta da célula

Em 1664 o inglês Robert Hooke descreveu a estrutura microscópica dos tecidos vegetais analisando cortiça, medula velha de cenoura e deu nome de *Célula* ao espaço delimitado, em forma de caixa por ele observado. Ainda no século XVII outros investigadores como Leeuwenhoek na Holanda, Malpighi na Itália e Grew na Inglaterra contribuíram com os estudos de Hooke com descrições celulares em outros organismos (HARRINSON, 1975).

Somente no século XIX é que o estudo da célula pode ter avanços. Isso devido aos fabricantes de microscópios Carl Zeiss e Ernest Leitz, de Westzlar, na Alemanha, que produziram equipamentos com alto poder de resolução. Johanne Muller, da Universidade de Berlim, que viveu entre 1801 e 1858 fundou a disciplina de fisiologia comparada, baseado em estudos celulares de várias espécies.

Em 1838, um dos seus alunos, Mathias Schleiden, publicou um tratado denominado de *Contribuição para a Fitogênese* demonstrando que a célula era um elemento comum em todos os tecidos das plantas. Theodor Schwann estendeu o trabalho de Schleiden para todo o reino animal. Em 1839, publicou seu livro intitulado *Pesquisas Microscópicas em Conformidade com a Estrutura e Crescimento de Plantas e Animais*. Harrinson (1975) descreve os itens dos escritos de Schleiden e Schwann relativo ao conceito de célula como disposto a seguir:

- I. Os organismos são constituídos por células microscópicas, que são unidades organizadas distintamente;
- II. Dentro de um organismo as células diferenciam-se por formarem tipos distintos, que têm propriedades características, próprias de determinados tecidos;
- III. O núcleo é uma característica comum a todas as células, embora nalgumas, tal como o floema e os glóbulos vermelhos dos mamíferos, o núcleo possa desaparecer durante a diferenciação;
- IV. O conteúdo vivo da célula ou protoplasma determina a atividade da célula e assim, coletivamente, de todo o organismo;
- V. O crescimento é atingido pelo aumento do número de células; só a divisão das células existentes pode dar origem a novas células;

Da descoberta ao aperfeiçoamento do conceito de célula e o resumo da Teoria Celular de Schleiden e Schwann é possível perceber-se pontos de importância capital. Segundo Virchow, 1855 (apud HARRINSON, 1975) as células derivam sempre de células pré-existentes; ocorre diferenciação entre as células para formarem tecidos também diferentes, dentro de um mesmo organismo. O núcleo é uma característica comum em todas as células, portanto torna-se o constituinte principal.

3. Os fatores mendelianos

Quase no final do século XVII, precisamente em 1865, Gregor Mendel elaborou as leis do comportamento gênico, em vegetais, sem entender como ocorriam as divisões celulares, principalmente a meiose, que possibilita a formação de gametas.

As plantas com suas características governadas pelos genes foram objetos de intensos estudos a partir de 1900. Os cruzamentos baseados no delineamento mendeliano permitiram o conhecimento das relações existentes entre os alelos dos genes e, portanto a seleção de características desejadas. As perguntas começaram a ser feitas em relação à constituição física dos fatores de Mendel. Como se chamaria o material genético onde eles, os fatores mendelianos se encontrariam?

4. A cromatina nas células

Em torno de 1873, Schleiden demonstrou a presença de corpos que se tingiam no interior da célula, enquanto Flemming (1843 – 1915) relatou que esses filamentos corados, a “cromatina”, se dividiam longitudinalmente durante a divisão celular indo para as células filhas em proporções iguais, de acordo com Van Beneden (1845 – 1910).

5. O Ácido Desoxirribonucleico – O DNA

Desde quando começou a selecionar plantas para utilizá-las e guardar suas sementes, o homem vem manipulando os genes dessas espécies. Como resultado da intervenção humana, foi possível produzir grande

número de variedades, que não ocorreriam na situação selvagem. As características de um organismo são determinadas pelo DNA (ácido desoxirribonucleico), que se encontra no núcleo de suas células (Figura 9.1). O DNA contém a informação genética que determina como as células individuais e, conseqüentemente, o organismo como um todo, será construído, como funcionará e se adaptará ao ambiente.

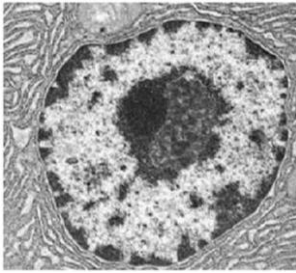


Figura 9.1 – Núcleo celular (Fonte:

http://albums.photoonweb.com/j/jersonrodriguezg/algum_de_la_celula/viewer.swf

O DNA é dividido em unidades funcionais, os genes, assim como uma sentença é formada por palavras. As características totais de uma planta dependerão de quais genes foram recebidos das plantas genitoras, da expressão (funcionamento) ou não destes genes e, também, de interações entre eles e os fatores ambientais. Descoberto em 1953 por James Watson e Francis Crick o ácido desoxirribonucleico foi o passo que interligou as gerações celulares ou de indivíduos, com referência as suas características. Células derivam de células, definiu Rudolf Virchow em 1855, portanto indivíduos derivam de indivíduos. Apesar de cada um ter características próprias a metade do soma é de origem paterna e outra metade de origem materna. “Ele(a) tem os olhos da mãe”; ou “ele(a) tem as mãos como as do avô, que era pianista”, são expressões bobas de pais e mães que demonstram a realidade da expressão do gene.

O DNA ligou, e cada vez mais aproxima os amplos campos da Biologia ao da Genética, não menos estreito. Mas a ciência não parou mais e mais perguntas surgiram, como:

- I. Os genes são fatores hereditários mendelianos associados a caracteres específicos, mas qual é a sua natureza física?
- II. A teoria “um gene, uma enzima” (Dogma Central da Genética) postula que os genes controlam as proteínas, como se dá esse processo?
- III. Os genes estão nos cromossomos, dispostos de que modo?
- IV. Descobriu-se que o DNA faz parte dos cromossomos, como se estrutura?

As pesquisas do DNA eram e são as mais financiadas, porque as perguntas tinham que ser respondidas e outras tantas surgiram como desafios à ciência. As experiências de Frederick Griffith e Oswald Avery em 1928 confirmaram o DNA como princípio transformante, e as suas descobertas levaram a conclusão de que os genes eram compostos de DNA o que equivaleria dizer que o gene da virulência R era passado para as bactérias que tinham o gene S, para não virulência, de *Streptococcus pneumoniae*, causando a morte dos ratos.

Alfred Hershey e Martha Chase ficaram consagrados na ciência por terem descoberto também o princípio transformante. Isso se deu em 1944, utilizando bacteriófago do tipo T2. O material detectado por radioatividade na bactéria *E. coli* e nos vírus dela resultante demonstrou que a molécula de DNA era a que tinha capacidade de multiplicar-se e recuperar novos vírus com as mesmas características que as anteriores, pela lise bacteriana.

Watson e Crick baseado nessas informações, em 1952, definiram a estrutura do DNA. A primeira pergunta estava respondida. O gene é constituído de DNA e ele está estruturado na forma de bases nucleotídicas do tipo purinas e pirimidinas, numa disposição não comum chamada “plectonêmica”.

Antes de responder a segunda questão, em 1958, Mathew Meselson e Franklin Stahl usando isótopo ¹⁵N conseguiram comprovar a duplicação semiconservativa da molécula de DNA; fios velhos e novos convivem juntos, numa única estrutura na nova célula formada; essa célula só se formava porque o DNA se duplicava. As funções do DNA estavam se esclarecendo. Genes codificados, em forma linear, constituindo o DNA. Mas para que eles se dispunham de tal maneira?

Para responder a segunda pergunta e a feita agora, George Beadle e Edward Tatum, em 1940, portanto antes da descoberta da estrutura do DNA, elucidaram como o fungo *Neurospora* podia produzir ornitina, citrulina e arginina em meios que não continham tais aminoácidos, que são essenciais para o crescimento do

fungo. Denominar-se-á de *arg-1* aos mutantes de *Neurospora* que cresciam ao receber suprimento de ornitina ou citrulina; de *arg-2* aos que recebiam somente arginina ou citrulina e *arg-3* aos que recebiam apenas arginina.

Tabela 9.1 – Crescimento de mutantes *arg* em respostas a suplementos.

| Mutante | Suplemento | | |
|--------------|------------|-----------|----------|
| | Ornitina | Citrulina | Arginina |
| <i>arg-1</i> | + | + | + |
| <i>arg-2</i> | - | + | + |
| <i>arg-3</i> | - | - | - |

(Fonte: Suzuki et al. p.231).

Sabendo que esses compostos fazem parte de rotas metabólicas e são interconvertidos pro enzimas, os autores propuseram o seguinte modelo:

Precursor >>> (Enz. X) >>> ornitina >>> (Enz. Y) >>> citrulina >>> (Enz. Z) >>> arginina

A enzima X sendo defeituosa não converteria o precursor em ornitina, porém o mutante converte porque recebe do meio externo o suprimento de ornitina, por isso na tabela 9.1 acima há o sinal de +, indicando crescimento normal do fungo. Se fosse a enzima Y a defeituosa, a ornitina não se converteria em citrulina, como no *arg-2*, porém o suprimento externo, de citrulina ou ornitina, lhe permitiria o desenvolvimento normal. Beadle e Tatum concluíram que as rotas metabólicas eram controladas por enzimas, porque o defeito numa delas provocaria alteração de fenótipo. Mais tarde os processos de transcrição e tradução das enzimas e proteínas foram elucidados complementando o trabalho de Beadle e Tatum.

Como os genes se dispõem no DNA? Se já é sabido que os genes determinam uma cadeia polipeptídica, na sua estrutura primária, qualquer modificação de uma das bases nucleotídicas pode alterar o aminoácido correspondente. Charles Yanofsky perscrutou a relação entre as proteínas alteradas devido a genes alterados, trabalhando com a enzima triptofano-sintetaze em *E. coli*. Para que a triptofano-sintetaze funcione na transformação do indolglicerol-fosfato em triptofano, dois genes, denominados *trpA* e *trpB* devem ser produzidos separadamente, para que após síntese, se combinem tornando a enzima ativa. Yanofsky analisou uma mutação na subunidade A, pela alteração em *trpA*. De posse do fenótipo mutado, montou um mapa de alterações correlacionando genes as proteínas. Baseado neste trabalho pode-se dizer que os genes estão dispostos no DNA de forma linear.

Para responder a última questão, no momento, sobre a correlação do DNA com cromossomos, basta que se analise seu comportamento ao longo da vida celular, num tecido meristemático. Em todo instante o núcleo da célula é corado por corantes básicos, como orceína acética, propiônico ou reativo de Schiff, provocando a mesma cor sempre pela reação DNA/corante. O que muda é a forma desde uma massa disforme, com pontos ligados a carioteca, até a forma de bastão constituindo os próprios cromossomos prontos para se dividirem.

DNA, genes, proteínas em bactérias, principalmente, e organismos superiores, por inferência, ficaram elucidados de forma que se vários organismos possuem o mesmo material genético, com diferenças próprias somente, é possível então que o DNA da bactéria pode funcionar nas células vegetais. Mas antes de se analisar esse processo, exclusivamente, é necessário se estudar a metodologia convencional de cruzamentos entre plantas.

6. Os cruzamentos entre plantas

Tão antigo quanto o ser humano, a agricultura foi o instrumento que permitiu ao homem sua fixação num território. Allard (1960) comenta que há evidência física do cultivo de plantas há cerca de 5.000 – 6.000 anos em torno dos lagos da Suíça, em ruínas das antigas civilizações Mesopotâmicas e Egípcia. É desse tempo à tentativa de buscar o ideotipo de planta. Em 1957, Harlan (apud ALLARD, 1960) cita que os tipos de cevada

não foram muito alterados desde a época de Moisés no Egito, e que o feijão-fava, encontrado nas ruínas de civilizações antigas do Peru, possuíam sementes cerca de 100 vezes maiores do que as selvagens da região.

Por esse breve comentário vê-se que o homem desde cedo se tornou um melhorista, embora tenha levado muitos anos para obter as características desejadas, descritas acima. Porém a natureza é melhorista por excelência, pois provoca, ao longo do tempo, variações fenotípicas que poderão ser adaptativas. Provavelmente antes da domesticação, sofrendo processo de seleção, as plantas já apresentavam grande variabilidade causada pela recombinação intercromossômica, que foi descoberta somente em 1902. As plantas usadas como alimentos estavam na natureza, portanto sofrendo o processo de mutação/recombinação/seleção. Os fenótipos se alteravam e os genes, ou permaneciam no ambiente ou se extinguíam. Sua manutenção era difícil, pois, no ambiente natural, a competitividade era grande.

Plantas sempre se cruzaram; tantas vezes quanto possibilitasse a distribuição espacial. É o caso do trigo em que houve a hibridação interespecífica entre *Triticum monococcum* e a gramínea *Aegilops speltoides*. Dessas duas plantas, gramíneas, que disputavam a mesma área de campos da Ásia, se formou um híbrido estéril, mas que a própria natureza transformou-o em fértil pelo dobramento do número de cromossomos, ao longo do tempo.

Quando o homem se deu conta de que as plantas também tinham órgãos sexuais e que os insetos visitavam suas flores transferindo o pólen, houve a possibilidade de fazer o cruzamento artificial e selecionar plantas que melhor lhe conviesse. Camerarius (Rudolph Jacob Camerarius Alemanha, 1665-1721), em 1694, publicou um resumo de suas descobertas que provaram, definitivamente, a existência dos órgãos sexuais em vegetais superiores. Demonstrou o caso de uma planta de milho da qual sendo extraída a flecha não haveria frutificação e que a eliminação das flores estaminadas do mamoeiro produziria o mesmo resultado (COSTA, 1939).

Com o avanço das descobertas das células em vegetais, da microscopia, dos cruzamentos, Sutton, em 1902 propôs, pela primeira vez, a relação entre fatores mendelianos e os cromossomos e, ainda, disse que o número de genes era significativamente maior do que o de cromossomos, concluindo que os genes, além de se disporem de forma independente, como os mendelianos, poderiam estar ligados, no mesmo cromossomo (STRICKBERGER, 1976). Mais tarde, em 1910, Morgan estabeleceu a recombinação dos genes, dando confirmação as conclusões de Sutton. Além disso, estabeleceu regras para se entender o comportamento de genes ligados. A primeira regra diz que nem todos os cromossomos trocam partes entre si; a segunda, corolário da primeira, diz que a frequência de recombinação é menor do que 50%; a terceira, que é a conclusão de seu trabalho, diz que a frequência de recombinação é diretamente proporcional a distância entre os genes.

A microscopia ótica demonstrou que havia uma relação com a troca de partes dos cromossomos de *Drosophila*, estudados por Morgan, e ao fenômeno que aparecia na subfase “diplóteno” na fase da prófase meiótica. Deu o nome de “quiasma” a configuração citogenética do pareamento de homólogos com a troca de partes. A consequência do entrecruzamento das cromátides dos cromossomos homólogos permitia o aparecimento de novas formas fenotípicas. O “*crossing-over*” produz variabilidade pela quebra e reunião das moléculas de DNA que estão engrossando-se para formar os cromossomos metafásicos.

7. A química do entrecruzamento das cromátides homólogas

Dois modelos de recombinação entre cromátides não irmãs foram propostas, o de *Whitehouse* e o de *Holliday*, que diferem apenas ao longo das etapas em que o fenômeno vai ocorrendo (JOHN e LEWIS, 1979). Entretanto, ambos têm ponto em comum que são a quebra das cromátides, síntese de DNA tardia e religação, sendo que a quebra e religação se dão por meio de endonucleases, que foram descobertas por Hotta e Stern, em 1971, utilizando células de *Lilium*.

Uma endonuclease produz a quebra e a transformação das terminações 3'-fosforil e 5'-hidroxil nos sítios de quebra, e os autores dizem que a produção desses sítios é estimuladora da síntese de DNA que ocorre posteriormente. Por fim, a enzima ligase promove a ligação entre as extremidades livres das cromátides,

porém de forma invertida. A recombinação, portanto está pronta (JOHN e LEWIS, 1971). Blocos de ligação podem, então, serem rearranjados dentro das células meióticas, possibilitando o aparecimento de novas formas fenotípicas mesmo com baixa frequência. Se blocos cromossômicos podem e são quebrados pelo pareamento de homólogos, então é possível transferir-se genes de uma planta para outra por meio de cruzamentos, por isso, em 1956 Sears (apud POEHLMAN, 1974) transferiu apenas um gene da gramínea *Aegilops umbellula* resistente à ferrugem da folha para *Triticum durum* variedade Emmer. Ao obter sucesso, nesse momento, criava-se o primeiro produto transgênico no mundo, embora o gene não tenha sido objeto de alteração no seu conteúdo.

8. O melhoramento convencional e a busca da variabilidade

No melhoramento convencional, novas combinações de genes são produzidas por cruzamentos de indivíduos escolhidos, buscando reunir, na descendência, características agronomicamente importantes, tais como: maior número de sementes, maior peso das sementes, resistência a doenças, tolerância a estresses ambientais. O melhoramento genético convencional teve muito sucesso e aumentou significativamente a produtividade das plantas. Hoje não existe no mercado um único produto agrícola que não tenha sido resultado de cruzamentos entre diferentes plantas, variedades e, espécies e, até mesmo, gêneros vegetais. Entretanto, o alcance de novos patamares de produtividade está sendo impedido pela restrição da variabilidade genética encontrada nas diferentes espécies cultivadas, como um resultado do próprio processo de melhoramento. Isto significa que não são encontradas, nas espécies cultivadas atualmente, as características desejáveis que pudessem ser incorporadas nas variedades para a obtenção de maior produtividade.

8.1. A variabilidade

Um caminho que tem sido utilizado é a busca de características agronomicamente importantes em espécies selvagens afins das espécies cultivadas

Este caminho, entretanto, nem sempre é viável, uma vez que barreiras de isolamento reprodutivo podem impedir o sucesso no cruzamento. Através de cruzamentos controlados, apoiados por técnicas de biotecnologia tais como, cultivo *in vitro* de embriões híbridos, muitas barreiras naturais podem ser superadas para a geração de híbridos interespecíficos. O cruzamento entre plantas escolhidas só é possível quando as mesmas são sexualmente compatíveis. O advento das modernas técnicas de engenharia genética tem permitido aos pesquisadores isolar genes individuais de uma espécie e inseri-los em outra, sem a necessidade de compatibilidade sexual. É importante salientar que, sempre que for utilizado o método de cruzamento, seja intraespecífico (entre plantas de uma mesma espécie), como interespecífico, 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. Por exemplo, quando nos alimentamos de tomates, estamos ingerindo material que porta genes de resistência a doenças que foram introduzidos nas variedades comerciais a partir de espécies selvagens aparentadas, juntamente com milhares de outros genes inevitavelmente transferidos ao mesmo tempo e que não eram encontrados na espécie cultivada.

Atualmente, há preocupação dos pesquisadores em dirigirem-se para os centros de origem das espécies ou aos centros de domesticação, que possuem germoplasmas das espécies afins as que os pesquisadores trabalham. Seguindo o trabalho de Nikolai Vavilov (1887 – 1943) os Centros de Origens das espécies cultivadas possuem sementes, plantas, partes de plantas e “bibliotecas genômicas” a disposição dos pesquisadores para poderem introduzir variabilidade em seus materiais de pesquisa.

As cultivares desenvolvidas antes do advento da cultura de tecidos de plantas foram frutos de anos, pelo menos, 12 anos, de cruzamentos e retrocruzamentos associados à tecnologia de uso dos fertilizantes e preparação do solo, produziram a chamada “revolução verde” nas décadas de 60 e 70, alcançando cerca de 70 milhões de toneladas de grãos na década de 80. Portanto, o melhoramento convencional, que muito contribuiu para a agricultura, ainda não foi ultrapassado, pois, apesar da agrobiotecnologia estar bastante avançada, ainda é necessário o trabalho do melhorista à nível de campo, porque segundo Pinto (1995) o melhoramento de plantas ainda se mantém, sobretudo por visar: (a) aumento no rendimento de grãos; (b) incremento na

produção de raízes, tubérculos, folhas, caules e frutos; (c) selecionar plantas e fixar características de tolerância a acidez do solo, além de obter cultivares resistentes a elementos tóxicos do solo e (d) obter plantas que suportem estresses ambientais.

Vieira (1997), explicando sobre a hibridação somática entre plantas, relata que cana-de-açúcar, algodão, tomate, batata não estariam sendo cultivadas hoje se não fosse à introgressão de genes para resistência a doenças e pragas advindos de germoplasmas exóticos. Muitos desses cruzamentos ainda são realizados, buscando plantas com variabilidade capazes de serem selecionadas no objetivo de obter-se material resistente, via melhoramento de plantas. Hoje esses genes estranhos poderão ser encorpados em vegetais cultivados via cultivados via cultura de protoplastos.

Outra alternativa bastante utilizada a partir de 1940, e ainda empregada no presente para o aumento de variabilidade, é a indução de mutações por radiações ou agentes químicos radiomiméticos (Unidade 4).

Como a mutação induzida não pode ser direcionada a genes específicos, não se tem controle dos genes que estão sendo alterados. Entre um grande número de indivíduos submetidos ao agente mutagênicos, faz-se a seleção daqueles que apresentem a característica desejada, porém outros genes podem ter sido modificados por mutação, sem efeitos aparentes. Como o melhoramento de plantas convencional prevê são transferidos blocos gênicos de uma planta para outra, por cruzamento artificial, levando, junto com o gene de interesse outros tantos não desejáveis e que só serão eliminados por outros cruzamentos múltiplos.

A biotecnologia de microrganismos descobriu enzimas capazes de cortar o DNA e facilitar o transporte de genes entre plantas com o uso dos próprios microrganismos.

9. As enzimas de restrição. Tesouras genéticas.

A tecnologia do DNA recombinante ou a chamada Engenharia Genética requer que a manipulação do DNA seja feita em pequenos pedaços, dada a inviabilidade de se usar toda a molécula num só tempo. Além disso, o uso de um pequeno fragmento possibilita que possa ser conhecido suas bases e, em laboratório, construído um DNA artificial de outra espécie para transferi-lo para a espécie estudada. Para que tal passo fosse dado, antes se deveria descobrir instrumentos, mesmo que químicos, que permitisse tal evento.

Em estudos com DNA de bactéria descobriram-se as endonucleases de restrição, que são enzimas que destroem DNA's estranhos que possam ter entrado na célula. Essas endonucleases reconhecem os DNA's exógenos, agem sobre eles clivando-os em pequenos pedaços. Cada espécie de bactéria possui suas próprias enzimas que destroem DNA's de fora. E, ainda, cada uma delas reconhece um sítio de ligação específico nesse DNA que são as chamadas regiões "palindrômicas". Essas são pontos no DNA cuja leitura de bases é a mesma em ambos os sentidos, como, por exemplo:

... G A A T T C ...
... C T T A A G ...

A grande vantagem das endonucleases de restrição é o seu uso ilimitado, pois ela reconhece as regiões de corte ao longo de todo DNA, independente de qual espécie. Num experimento, após cortar o DNA sua sequência de bases pode ser conhecida pela técnica de Southern (BURNS e BOTTINO, 1991).

Se agora o DNA dos organismos pode ser conhecido é possível, então, que se transfira de um organismo para outros fragmentos de DNA e/ou mesmo genes. A tabela 9.2 descreve as principais enzimas de restrição usadas em biotecnologia. Deve-se ressaltar que o nome da enzima é a abreviatura do microrganismo onde ela foi descoberta. Essa tabela contém o segmento palindrômico que as enzimas reconhecem no DNA e que efetua o corte. Onde houver, nesse segmento, as abreviaturas "Pi" e "Pu" significa que nesse ponto pode ter qualquer pirimidina ou qualquer purina.

Tabela 9.2 – As enzimas de restrição mais utilizadas e o segmento palindrômico reconhecido.

| Microrganismos | Nome da enzima | Segmento palindrômico |
|-----------------------------------|-----------------------|--|
| <i>Arthrobacter luter</i> | Alu I | 5' AGCT 3' 3' TCGA 5' |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | BamH I | 5' GGATCC 3' 3' CCTAGG 5' |
| <i>Escherichia coli</i> | EcoR I | 5' GAATTC 3' 3' CTTAAG 5' |
| <i>Haemophilus aegyptius</i> | Hae II | 5' Pu GCGC Pi 3' 3' Pi CGCG Pu 5' |
| <i>Haemophilus aegyptius</i> | Har III | 5' GGCC 3' 3' CCGG 5' |
| <i>Haemophilus haemolyticus</i> | Hha I | 5' GCGC 3' 3' CGCG 5' |
| <i>Haemophilus influenza</i> | Hind II | 5' GT Pi Pu AC 3' 3' CA Pu Pi TG 5' |
| <i>Haemophilus influenza</i> | Hind III | 5' AAGCTT 3' 3' TTGCAA 5' |
| <i>Haemophilus arainfluenzae</i> | Hpa I | 5' GTTAAC 3' 3' CAATTG 5' |
| <i>Haemophilus arainfluenzae</i> | Hpa II | 5' CCGG 3' 3' GGCC 5' |
| <i>Serratia marcescens</i> | Sma I | 5' GGGCCC 3' 3' CCCGGG 5' |
| <i>Streptomyces albus</i> | Sal I | 5' GTGCAC 3' 3' CACGTG 5' |
| <i>Xantomonas oryzae</i> | Xor II | 5' CGATCG 3' 3' GCTAGC 5' |

* Adaptado de Ramalho et al., 2008, p.355.

As enzimas de restrição cortam, portanto, DNA's das plantas de tal forma que é possível transferir material genético de uma planta para outra usando um vetor (bactéria ou vírus) capaz de infectar a planta e transferir o gene de interesse, ou mesmo diretamente, pelas técnicas que serão vistas mais adiante.

9.1. A transferência de DNA nas plantas.

De posse do conhecimento e manipulação do DNA das plantas, vírus e bactérias, é possível se conhecer de quais genes estão constituídos os trechos do DNA. A biotecnologia permitiu a extração do DNA, o seu corte pelo uso das enzimas de restrição e o sequenciamento via eletroforese das bases nucleotídicas.

Na área da agricultura se conhece a bactéria do gênero *Agrobacterium* que está no solo e que se fixa nas raízes das leguminosas, permitindo que a planta possa absorver, com mais eficiência, o nitrogênio que está entre as partículas do solo. São as chamadas "bactérias nitrificadoras" que causam tumores benéficos nas raízes.

Ao se fixarem nas células das raízes, introduzem seu DNA, portanto, transferem seus genes para o DNA dessas células, na forma de um segmento chamado "T-DNA". A célula vegetal permite que esses genes sejam expressos, sintetizando auxinas e citocininas, que beneficiam a planta, e, ao mesmo tempo, produzem opinas, que são aminoácidos modificados, para que a bactéria possa sobreviver.

10. A fixação do nitrogênio. Uma simbiose perfeita.

Cabe aqui analisar o ciclo do nitrogênio, de forma breve, para se entender a sua fixação biológica via bactéria. O nitrogênio na atmosfera está na forma de N₂, uma molécula formada por dois átomos de nitrogênio unidos por uma tríplex ligação extremamente estável que precisa de elevada taxa de energia de ativação para

reagir com outros elementos (ARAÚJO, 1997). Outra fonte é a decomposição contínua de resíduos orgânicos no solo e, por fim, a adubação química. Porém, não é na forma de N_2 que o nitrogênio é absorvido em nível das raízes, e sim na forma de nitratos. A indústria produz nitratos na forma de ureia, sulfato de amônia quebrando a molécula de N_2 numa temperatura de $5.000^\circ C$ e a 250 atm de pressão.

Nas leguminosas, que não dispensam adubação de bases e de cobertura, há um sistema microbiológico de fixação do nitrogênio. É o sistema mediado pela bactéria *Rhizobium* que fixa cerca de 20% de N da atmosfera (ARAÚJO e HENSON, 1998).

Outras bactérias como: *Azotobacter*, *Beijerinck*, *Derxia*, *Clostridium*, que vivem de forma livre nos solos; *Azospirillum*, que está nas superfícies das raízes e *Herbaspirillum* e *Frankia*, que estão nos caules e folhas de certas plantas, produzem a enzima chamada nitrogenase que cliva a molécula de N permitindo sua ligação ao hidrogênio, formando amônia.

Entre as bactérias nitrificadoras a *Rhizobium* e a *Bradyrhizobium* são as mais estudadas no campo da agricultura. Elas não têm a enzima nitrogenase, porém na simbiose com as leguminosas, após penetraram no tecido da raiz, provocam a formação de um nódulo (galha). Nesse nódulo formam-se bacterioides e há produção de compostos que nem a planta nem a bactéria têm, que são a leghemoglobina e nitrogenase. A leghemoglobina transporta oxigênio para o interior do nódulo e a nitrogenase quebra N_2 e promove sua ligação com o hidrogênio para formar amônia. Após ocorre várias oxidações do NH_3 até chegar a nitrato para poder ser absorvido pelas células das plantas e fazer parte das sínteses de aminoácidos.

Os nódulos que demonstram atividade são de cor vermelha ao corte, devido à leghemoglobina e eles se formam pela ação dos genes bacterianos denominados *nod* que, no *Rhizobium* estão localizados em plasmídios simbióticos que carregam também os genes *nif* e *fix*, que condicionam a fixação do N_2 . A formação do nódulo ou ativação do gene *nod* se dá pela indução de flavenóides secretados pelas raízes e com a participação da proteína transcricional ativadora regulatória expressa pelo gene *nodD* (VALARINI, 1998).

A *Agrobacterium tumefaciens* que causa galha de coroa, entre o tronco e a raiz é do tipo gram negativa sendo que nesse gênero são englobadas outras bactérias como: *A. rhizogenes*, que induz a multiplicação das raízes formando uma cabeleira; *A. rubi*, que infecta *Rubus sp* especificamente; *A. vitis*, que é específica para videira e *A. radiobacter*, que se apresenta como não patogênica (BRASILEIRO, 1995; BRASILEIRO, 2000).

A pesquisa de bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN) encontrou outras bactérias que vivem simbioticamente no interior de diversas plantas e foram chamadas de bactérias fixadoras de nitrogênio endofíticas (BFNE) (PAVAN e MOREIRA FILHO, 1998). Portanto, as leguminosas não têm mais a exclusividade da fixação do N_2 via bactéria, pois as BFNE foram encontradas em cana-de-açúcar (*Herbaspirillum spp*), em milho e sorgo (*Azospirillum spp*) que são colonizadoras da rizosfera e de outras partes das plantas, otimizando a fixação de nitrogênio. Outro tipo de bactéria (*Acetobacter*) também foi encontrado em tecidos de sorgo, cana-de-açúcar. Essas não conseguem se manter no solo e são transmitidas de um plantio para outro pelas partes vegetativas (toletes) ou pro sementes (DOBEREINER, 1997).

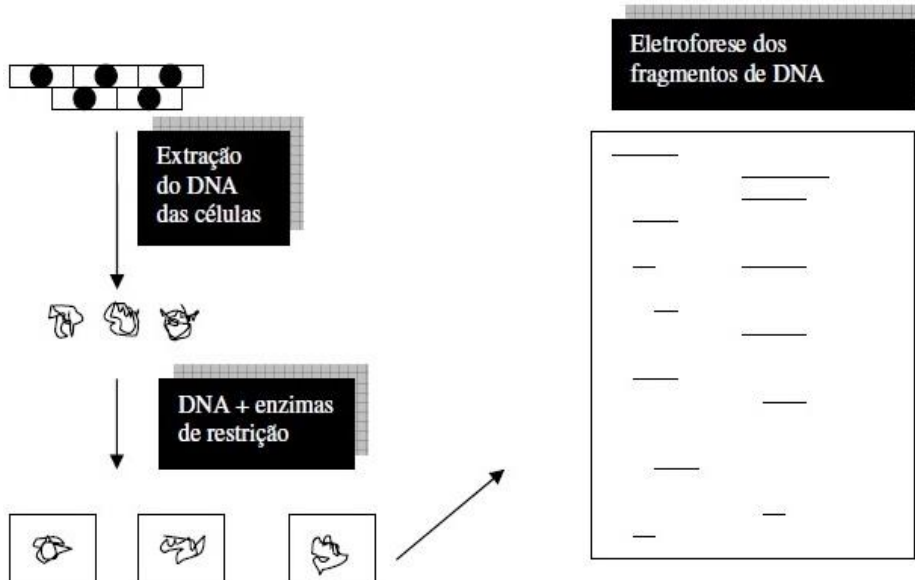
Com a descoberta da fixação do N_2 pelas bactérias a mais de um século e pela comprovação de transferência de genes delas para as plantas, a ciência pode desenvolver técnicas modernas de transferência de genes.

11. Técnicas modernas da engenharia genética

A revolução na ciência, nas últimas décadas, derivou do avanço no conhecimento de como as células e os organismos funcionam em níveis molecular, bioquímico e fisiológico, juntamente com o desenvolvimento de técnicas que permitem a transferência de genes específicos de um organismo para outro.

Independentemente do organismo e de sua complexidade, os genes são segmentos do mesmo tipo de molécula, o DNA. Esta característica permite que os genes de um organismo sejam potencialmente funcionais em outro.

As técnicas modernas abriram a possibilidade de isolar (Figura 9.2), e clonar genes de bactérias, vírus, plantas e animais, introduzi-los e expressá-los em plantas. Dessa forma, a barreira para a transferência de genes entre espécies e até entre diferentes reinos foi ultrapassada. Isto significa que podemos obter uma planta transgênica pela transferência de um ou poucos genes escolhidos, identificados com precisão e com função conhecida. Neste sentido, a produção de plantas transgênicas é um processo muito mais controlado e



conhecido, permitindo o desenvolvimento de novas cultivares mais rapidamente do que quando utilizados os métodos convencionais.

Figura 9.2 – Isolamento e eletroforese de DNA.

Visando melhor a qualidade do produto, a transformação genética tornou também possível a remoção ou a inatividade de genes indesejáveis, bem como a modificação de genes da própria planta que atuam em rotas metabólicas específicas. Como exemplo, o gene codificante da enzima poligalacturonidase foi inibido em tomates. Com menor quantidade desta enzima que degrada pectinas (um componente da parede celular), os frutos permanecem firmes por períodos mais longos. Igualmente, genes que controlam substâncias tóxicas ou alergizantes podem ser potencialmente inativados.

A grande maioria das plantas transgênicas podem ser obtidas por várias metodologias, porém o sistema *Agrobacterium* é o que vem sendo mais utilizado.

11.1. O sistema *Agrobacterium*

Na natureza há bactérias de solo, do gênero *Agrobacterium*, que se associam as plantas causando-lhes tumores. Isto ocorre porque a bactéria é capaz de inserir seus próprios genes no genoma da planta. A figura 9.5 mostra, esquematicamente, como se dá a fixação da bactéria nas raízes das plantas leguminosas.

Os genes transferidos estão codificados no DNA de um grande plasmídeo (molécula de DNA extracromossômico com capacidade de duplicação autônoma) presente no interior das agrobactérias.

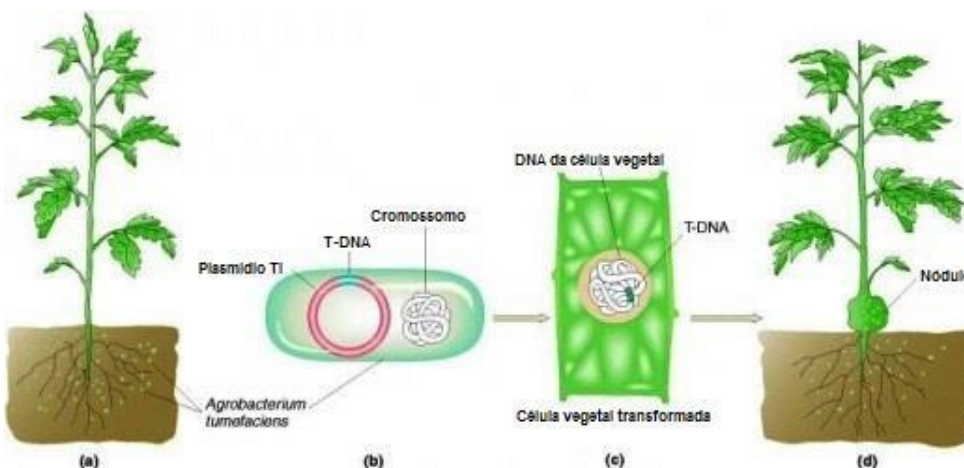


Figura 9.3 – Sistema *Agrobacterium* transferindo gene de uma planta para outra (Adaptado de <http://deenahere.hubpages.com/hub/Agrobacterium-Mediated-Gene-Transfer#slide76134488>).

O interesse pelo plasmídeo de *Agrobacterium* como instrumento potencial para transferência de genes iniciou por Jensen em 1910 e Smith et al. em 1911 (GANDER, 1985; BASILEIRO e LACORTE, 2000), pois ambos estudavam tumores em animais e plantas, comparativamente. Jensen, em particular, conheceu todos os tipos de tumores em vertebrados e propôs que a origem dos das plantas era o mesmo, e em 1913 realizou dois transplantes: um entre trevo vermelho e beterraba e outro entre dois animais. No primeiro, os nódulos radiculares do trevo foram inseridos em raízes de beterraba promovendo a infecção pós-transplante e o segundo houve desenvolvimento de carcinoma no pós-operatório.

No ano de 1918, Jensen descobriu que os tumores, que ele acreditava serem espontâneos, eram causados por *Bacterium tumefaciens*, chamada hoje de *Agrobacterium tumefaciens*. Em complemento, o pesquisador relatou que a bactéria não poderia ser isolada por si mesma do tumor da célula e que as células vegetais, devido ao agente bacteriano, se proliferariam de forma desordenada, a semelhança do carcinoma animal. Brasileiro (1995) relata que é possível manipular o T-DNA e dele retirar os genes das opinas (Figura 9.4). Como o DNA das bactérias é circular, no setor retirado, o das opinas, é possível se inserir qualquer gene que se quer transferir para a planta. As células das raízes com o T-DNA inserido pode ser recuperada via cultura de tecidos. Apenas um segmento desse plasmídeo, denominado T-DNA, é transferido da bactéria para as células da planta hospedeira, integrando-se ao seu genoma.

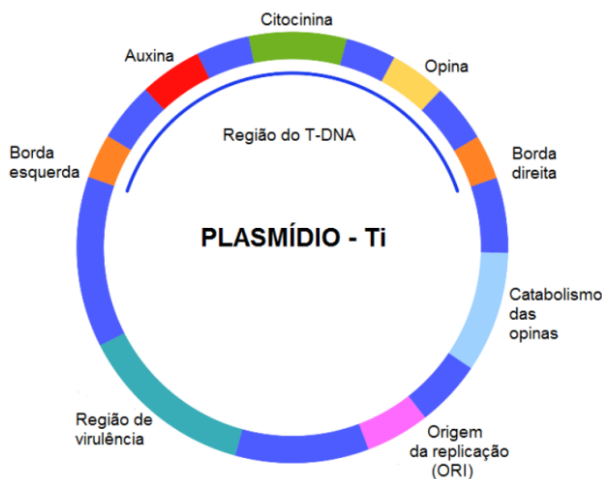


Figura 9.4 – Plasmídeo Ti do *Agrobacterium tumefaciens* (Adaptado de: www.wikipedia.com.br).

A expressão dos genes da bactéria na planta resulta na síntese de auxinas e citocininas (hormônios vegetais) que levam à formação dos tumores, e de aminoácidos modificados (opinas), substâncias necessárias para a sobrevivência da bactéria. Se os genes responsáveis pela formação de tumores forem removidos, qualquer gene de interesse poderá ser colocado em seu lugar e, através do sistema mediado pela bactéria, ser integrado ao genoma

da planta. Estudos devem ser feitos para se saber quais cepas de *Agrobacterium* terão maior eficiência na infecção. Em leguminosas o sistema *Agrobacterium tumefaciens* tem sido eficaz, pois outra questão de estudo é a quantidade de compostos fenólicos que a planta pode liberar para que haja interação planta/hospedeiro.

A primeira planta modificada, o fumo, desenvolve compostos fenólicos do tipo acetoseringona e alfa-hidroxiacetoseringona, pois eles ativam o gene *vir*, promovendo a transferência do T-DNA para o núcleo das células vegetais (HANDEL et al., 1997).

A tabela abaixo mostra as espécies de dicotiledôneas modificadas geneticamente pelo sistema descrito.

Tabela 9.3 – Espécies dicotiledôneas transgênicas obtidas por transformação via *A. tumefaciens*.

| Espécies | Referência |
|--------------------------------|--|
| <i>Apium graveolens</i> | Horsch et al, 1988 |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | Horsch et al, 1988 |
| <i>Brassica napus</i> | Horsch et al, 1988 |
| <i>Citrus paradisi</i> | Mogilner et al, 1993 |
| <i>Glycine max</i> | Horsch et al, 1988 |
| <i>Gossypium sp</i> | Horsch et al, 1988 |
| <i>Helianthus annuus</i> | Ursic et al, 1983 e Horsch et al, 1988 |
| <i>Lactuca sativa</i> | Horsch et al, 1988 |
| <i>Lycopersicon esculentum</i> | Horsch et al, 1988 |
| <i>Medicago varia</i> | Horsch et al, 1988 |

| | |
|--|----------------------|
| <i>Nicotiana plumbaginifolia</i> | Horsch et al, 1988 |
| <i>Nicotiana tabacum</i> | Horsch et al, 1988 |
| <i>Persea sp</i> | Mogilner et al, 1993 |
| <i>Petunia</i> | Horsch et al, 1988 |
| <i>Poncirus trifoliata x Citrus sinensis</i> | Mogilner et al, 1993 |
| <i>Solanum tuberosum</i> | Horsch et al, 1988 |

(Fonte: HANDEL, C.L. et al., 1997).

11.2. Outros sistemas de transferência de genes

A eletroporação é outro sistema de transferência de DNA. Esse sistema necessita da obtenção de protoplastos, que são células vegetais desprovidas de parede celular, obtidas pelo uso de enzimas digestivas do tipo celulases. Esses protoplastos são mantidos em meios de cultura com agitação permanente. São denominados protoplastos as células vegetais desprovidas de parede celular, definem Carneiro e Conroi (1990). Em 1892 foram obtidos protoplastos por meio mecânico de células de folha a partir de uma plasmólise e cortes subsequentes até atingir a parede celular. Como essa técnica era de baixa eficiência abandonou-se seu aprimoramento. Porém, em 1960 com o uso de enzimas pectocelulolíticas abriu-se um novo campo para a Biologia Vegetal e em 1970 foi estabelecido o protocolo de regeneração de protoplastos obtidos de células do mesofilo foliar de fumo (CARNEIRO e CONROI, 1990). A partir de então cresceu o seu interesse para o melhoramento de plantas, pois protoplastos de espécies diferentes podem se fundir, transferindo gene de uma planta para outra, formando híbridos somáticos e plantas geneticamente modificadas (PGM).

A eletroporação apresenta a vantagem de se manipular as sequências de DNA a serem incorporadas, antes da aplicação às células, entretanto como grande obstáculo está o fato de que poucas culturas, ainda, possuem protocolos de regeneração a partir de protoplastos, mesmo assim em milho e arroz já foram obtidas plantas regeneradas e transformadas a nível de laboratório.

Além desses dois sistemas, outro vem sendo usado com a mesma finalidade. É o bombardeamento de células com microprojéteis. É a Biolística, de mostrado na figura 9.5.

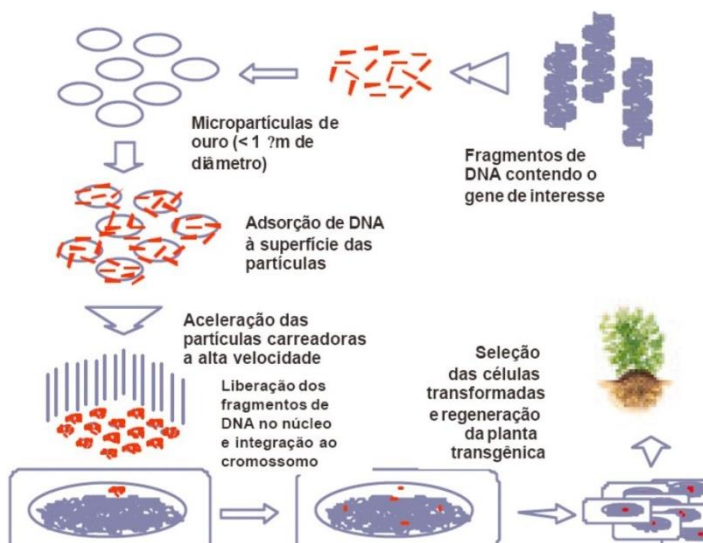


Figura 9.5 – Modelo de transformação de plantas via bombardeamento de projéteis (Fonte: PINTO, L.S. Disponível em http://images.slideplayer.com.br/1/288813/slides/slide_29.jpg).

Esse método requer a precipitação de moléculas de DNA selecionadas de outras plantas, bactérias ou vírus sobre microprojéteis de ouro ou tungstênio que, depois, por meio de um aparelho de pressão, são aceleradas para alta velocidade. Após essa aceleração, os microprojéteis são dirigidos contra o tecido vegetal alvo. As partículas são depositadas no interior da célula promovendo a transformação do explante, que posteriormente, deverá ser regenerado (BODANESE-ZANETTINI, 1995; BODANESE-ZANETTINI, 1990). As partículas penetram na parede celular e são depositadas dentro da célula, resultando na transformação de células individuais pela incorporação, no genoma da planta, dos genes introduzidos pelas micropartículas.

Para regenerar plantas as células transformadas são cultivadas *in vitro*, num meio contendo nutrientes e hormônios vegetais (Figura 9.6). Existem dois caminhos possíveis que as células podem seguir para originar as novas plantas: a embriogênese somática e a organogênese. Na embriogênese somática, a partir de uma

célula que se multiplica, organiza-se uma estrutura semelhante ao embrião que existe na semente normal. Na organogênese, várias células diferentes dão origem aos órgãos da planta, ou seja, o caule e as raízes, sem passar por um estágio de embrião.

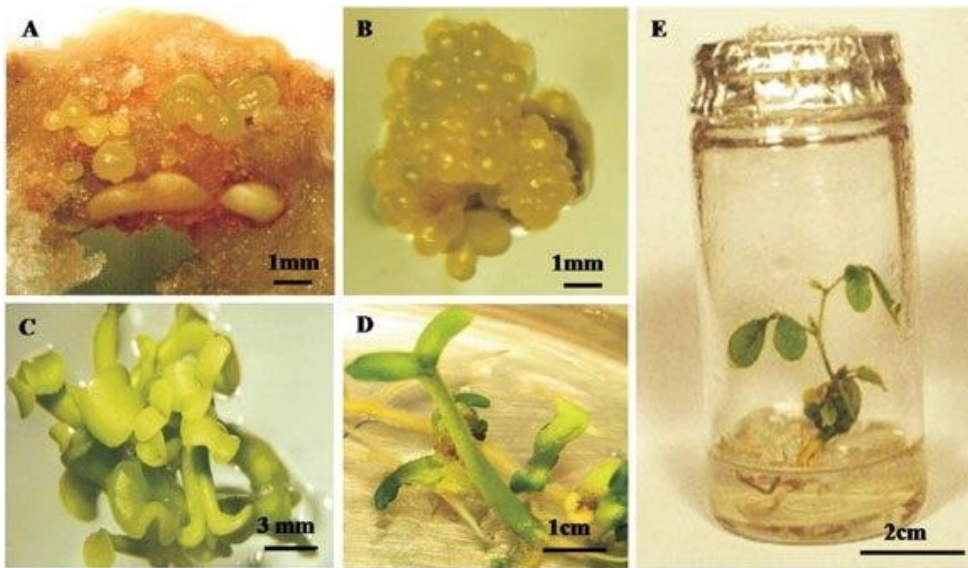


Figura 9.6 – Obtenção de plantas de soja *in vitro* (Adaptado de Droste et al., 2010).

(a) embrião somático primário a partir do cotilédone, (b) embrião globular em proliferação, (c) histodiferenciação somática, (d) germinação do embrião somático após 30 dias e (e) planta regenerada em meio de cultura.

Plantas geneticamente modificadas pela técnica descrita foram obtidas desde 1984, e uma das primeiras foi o fumo contendo o gene que lhe dá resistência ao antibiótico “canamicina”, como marcador da transgenia. O sucesso da técnica permitiu a sua expressão para plantas ornamentais, medicinais, frutíferas, florestais e forrageiras (Handel et al., 1997).

No processo de biobalística, a etapa de regeneração de plantas a partir da cultura *in vitro* é dispensável, visto que pode ser feita *in situ* usando o meristema apical, pois o sistema, pela velocidade da partícula (cerca de 1.500 Km/h) atinge todas as camadas de células, provocando sua transformação, portanto não há necessidade de uma regeneração “de novo”. Após a etapa de transformação pode ser colocado no tecido apical hormônio que promova a multiplicação das brotações (ARAGÃO et al., 1998). A capacidade de introduzir genes exógenos em plantas foi estendida para mais de 120 espécies em 35 famílias (BIRCH, 1997). O sucesso inclui as principais culturas de importância econômica, plantas ornamentais, medicinais, frutíferas, florestais e forrageiras. A maioria dos genes transferidos até o momento foi retirado de bactérias ou vírus, o que é explicado pela facilidade de isolá-los desses organismos, pois têm genomas menores.

Após realizar a técnica é preciso saber se o DNA exógeno realmente se inseriu no DNA celular vegetal. Pela técnica de hibridação de DNA (técnica de Southern) se consegue determinar o ponto de inserção. As plantas regeneradas deverão ter seu desempenho avaliado em casa de vegetação, tendo plantas não transformadas como testemunha. Ao passar para o campo a estabilidade da característica alterada será analisada conjuntamente a outras, que, por efeito pleiotrópico, poderão ser afetadas, pois não há controle da posição de inserção.

12. Algumas modificações realizadas e suas consequências

Droste et al (1994) estudaram quatro cultivares de soja para estabelecerem quais cepas da *Agrobacterium* teriam sucessos na infecção e em quais cultivares, para uso na transferência de genes. Os autores concluíram que entre as quatro cultivares, a Bragg foi a que melhor deixou-se infectar pelas cepas usadas. Romano e Monte-Neshich (1996) relataram uma estratégia para introdução de genoma de vírus em plantas, para transformá-las, com a finalidade de se obter resistência derivada do patógeno (RDP). Plantas de tabaco

modificadas expressando genes que produzem a capa proteica para o vírus do mosaico do tabaco (TMV) foram obtidas. Essas plantas mostraram resistência ao vírus na forma de um atraso no desenvolvimento dos sintomas. As células da planta produziram uma proteína que interferiu no estágio inicial da infecção viral, porém ao infectá-la, artificialmente, com DNA viral, essa resistência foi quebrada e ineficaz, portanto essa estratégia se tornou inviável, pelo menos para o tabaco.

Outra estratégia descrita pelos autores é a proteção mediada pela replicase. As replicases são enzimas que promovem a produção de RNAm a partir da informação no DNA. Em plantas de fumo com o gene de leitura aberta (*open reading framer* – OFR) com 54 Kb do vírus TMV mostraram-se altamente resistentes ao próprio vírus e ao seu RNA. Nesse caso a resistência seria obtida por uma competição entre a proteína de 54 Kb, agindo como uma replicase defectiva (defeituosa), com a replicase normal, natural do vírus, cujo tamanho é de 183 Kb.

As ligações entre células chamadas de plasmodesmos também são alvos dos pesquisadores na área de transgenia derivada de patógeno. Sabe-se que uma infecção sistêmica de um vírus nos vegetais avança da célula inicial para as adjacentes, pelas ligações plasmodesmáticas. Esse deslocamento é controlado pelo próprio vírus através das chamadas proteínas de movimento (MP's). Genes da proteína MP do vírus do mosaico da beterraba (BMV) transferidos para plantas de fumo determinaram a essa resistência parcial ao TMV e, recentemente, a proteína da MP do vírus X da batata (PVX) conferiu resistência ao vírus TMV em plantas de fumo. Os autores explicam que essa estratégia determina uma competição entre proteínas da MP naturais do vírus e as proteínas modificadas do hospedeiro (ROMANO e MONTE-NESHICH, 1996).

Harwood et al (1996) analisaram o comportamento de linhagens de cevada transformadas usando a técnica de inclusão de partículas de DNA, por bombardeamento em embriões imaturos. Os plasmídeos introduzidos promovem resistência a herbicidas. Os autores estudaram conjuntamente a altura das plantas e suas produções. Como resultado obtiveram plantas transformadas mais baixas e com florescimento tardio em relação à testemunha, porém as características de herança poligênica, como o peso de 100 sementes e número de sementes por planta, não mostraram diferenças significativas. Nobre et al (1996) obtiveram plantas de cevada transformadas através da técnica de protoplastos extraídos do escutelo de embriões imaturos. Dos 17 calos produzidos apenas três plantas transformadas foram obtidas sendo confirmada a integração do DNA exógeno, pelo teste de ELIZA e o de Southern. Os autores citaram o baixo nível de variação somaclonal nos calos obtidos do escutelo, sendo, portanto, uma nova metodologia para se obter plantas férteis transformadas. Aragão et al (1998) relatam a modificação do feijoeiro para resistir ao vírus do mosaico dourado (BGMV) que é uma doença disseminada por todo país e dizima a cultura. A técnica utilizada e descrita foi a do RNA anti-senso. Genes da infecção do vírus foram reconhecidos, clonados e produzidos seus RNA's anti-senso e introduzidos em células de feijão. Essas partículas de RNA anti-senso da planta se hibridizaram com as RNA's normais do vírus formando moléculas duplas e inativadas, impedindo a infecção. Das linhagens regeneradas as transgênicas forma incorporadas em programas de melhoramento de plantas da EMBRAPA. Esse sistema de transformação genética auxiliada pela técnica de Southern demonstrou que os genes inseridos nas plantas de feijão tiveram um comportamento monogênico do tipo mendeliano, facilitando a transferência para outras linhagens via cruzamento.

Desde 1986 é relatada a necessidade de se obter feijão com nível maior de metionina para atender as necessidades nutricionais dos países em desenvolvimento e subdesenvolvidos (CASTRO, 1986). A castanha do Pará possui em sua semente alto nível desse aminoácido, mas foi descartada a possibilidade de cruzamento interespecífico. Nessa época a moderna Biologia Molecular estava se desenvolvendo, mas ainda não tinha sido definido o vetor entre as plantas. O sistema *Agrobacterium* havia sido recentemente descoberto na Universidade de Gent, na Bélgica. Hoje Aragão et al (1998) relatam a obtenção de sementes de feijão com o gene da albumina 2S da castanha do Pará que é rico em metionina. As sementes de feijão transgênico maduras analisadas cerca de 25% de metionina a mais do que as sementes imaturas.

Borém (1999) cita que o tomate “Flavr-Savr” foi lançado nos EUA em 1996 como sendo o primeiro produto transgênico comercializado. O gene alterado foi o que produz, hoje, um amadurecimento mais lento, após colheita. Nesse tomate a estratégia empregada foi o uso de RNA's anti-sentido. Os RNA's anti-sentido (fita negativa) são RNA's complementares a RNA's que funcionam com RNA mensageiro (fita positiva). Funcionam como inibidores da expressão gênica altamente específica, em procariontes (Monte-Neshich,

1996). Entre outras culturas, cita o autor, o algodão “Ingard” e o milho que hoje possuem ambos, o gene *Bt* da bactéria *Bacillus thuringiensis*, conferindo à planta resistência a lagarta dos lepidópteros. Carneiro et al (2000) descrevem a transformação do milho com referencia a produção de proteínas do tipo zeínas. O objetivo do trabalho foi reunir num segmento só o gene de alta atividade que é o promotor a g-zeína (uma proteína abundante no grão, mas com baixa quantidade de aminoácidos essenciais) com o gene da d-zeína que é rica em aminoácidos essenciais principalmente a metionina (cerca de 23%) possibilitando a produção de plantas de milho geneticamente transformado com alto valor nutritivo. Os autores usaram a tecnologia da biobalística para a modificação genética.

13. Plantas transgênicas e relação com outras áreas da ciência

Plantas transgênicas são plantas obtidas por técnicas de biologia molecular. Através da incorporação, em um genoma, de genes de outras plantas que não se cruzam sexualmente, ou mesmo provenientes de organismos tão geneticamente diferentes, como vírus e bactérias.

A geração de plantas transgênicas anda lado a lado com vários outros avanços na ciência que tiveram um desenvolvimento acentuado nas últimas décadas, Através de técnicas de engenharia genética pode-se, por exemplo, obter bactérias com importância industrial e ecológica, como no caso da construção de uma bactéria marinha capaz de metabolizar petróleo, para utilização em casos desastrosos de derramamento de óleo nos oceanos. Pode-se também obter organismos que se especializam na produção em larga escala de drogas medicinais.

14. Referências bibliográficas

- ALLARD, R.W. **Princípios de melhoramento genético de plantas**. São Paulo: Edgar Blucher Ltda. 1960. p.381.
- ARAGÃO, F.J.L.; VIANNA, G.R.; RECH, E. Feijão transgênico. Um produto da engenharia. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.1, n.5, p.46-49, 1998.
- ARAÚJO, R.S.; HENSON, R.A. Fixação biológica do nitrogênio. In: ZIMMERMANN, M.J.O.; ROCHA, M.; YAMADA, T. (ed.) **Cultura do feijoeiro. Fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e Fosfato. 1988. p. 213-227.
- ARAÚJO, S.C Inoculação de leguminosas. Aumento da Produtividade com a fixação biológica do nitrogênio. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.1, n.3, p.8-10, 1997.
- BIRCH, R.G. Plant transformation: Problems and strategies for practical application. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Biol.** v.48, p.297-326, 1997.
- BODANESE-ZANETTINI, M.H. **Transferência de genes em plantas: Avanços e perspectivas**. Departamento de Genética. UFRGS. 1995.
- BODANESE-ZANETTINI, M.H. Plantas geneticamente modificadas: Histórico, técnicas e manejo de produtos de engenharia genética e suas aplicações. **Seminário Estadual de Biotecnologia e Produtos Transgênicos**. Anais, p.8-14, 1999.
- BODANESE-ZANETTINI, M.H.; PASQUALI, G. **Plantas Transgênicas: uma nova ferramenta para o melhoramento genético vegetal**. UFRGS/FARSUL/SENAR/BIERGS/CIERGS. 1999, p.1-17.
- BONGAARTS, J. Global population growth: Demographic consequences of declining fertility. *Science*, v.282, p.419-420. 1998.

- BORÉM, A. O melhoramento de plantas na virada do milênio. **Biociência**, v.7, p.68-72, 1999.
- BRASILEIRO, A.C.M. Transformação mediada por *Agrobacterium*. In: **Método de transferência e análise da expressão de genes em plantas**. CENARGEN. Brasília. 1995, p.7-22.
- BRASILEIRO, A.C.M.; LACORTE, C. *Agrobacterium*: um sistema natural de transferência de genes para plantas. **Biociência**, v.3, n.15, p.12-15, 2000.
- CARNEIRO, V.T.C.; CONTROI, T. Protoplastos de células vegetais. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (ed.) **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. ABCTP/EMBRAPA-CNPq, Brasília. 1990, p.171-200.
- COSTA, A.M. **Histórico até o período de Mendel**. Palestras do Curso de Mestrado em Agronomia. UNICAMP. Mimeog. 1939.
- CASTRO, L.A.S. Utilização da biologia molecular para melhoramento da qualidade nutritiva do feijão. In: **1º Simpósio Nacional de Cultura de Tecidos Vegetais**. Anais: Brasília. 1986, p.89-91.
- DOBEREINER, J. A importância da fixação biológica de nitrogênio para a agricultura sustentável. **Biociência**, v.1, n.1, p.28-32, 1997.
- DROSTE, A.; BODANESE-ZANETTINI, M.H.; MUNDSTOCK, E.; CHING-YEH-HU. Susceptibility of Brazilian soybean cultivars to *Agrobacterium tumefaciens*. **Revista Brasileira de Genética**. Ribeirão Preto, v.17, n.1, p.83-88, 1994.
- DROSTE, A.; SILVA, A.M.; SOUZA, I.F. et al. Screening of Brazilian soybean genotypes with high potential for somatic embryogenesis and plant regeneration. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, n.7, p.715-720, 2010.
- FLAWELL, R.B.; DART, E.; FUCHS, L. et al. Selectable marker gene: safe for plants? **Biotechnology**, New York, v.10: 141-144, 1992.
- GANDER, E.S. The use of Ti-plasmids in plant genetic engineers. In: EMBRAPA-CNPq. **1º Simpósio Nacional de cultura de Tecidos Vegetais**. Anais: Brasília, 1986, p.77-82.
- GRIFFITHS, A.J.F.; MILLER, J.H.; SUZUKI, D.T.; GELBART, W.M. **An introduction to genetic analysis**. New York: W.H. Freeman and Company. 6.ed. 1996, p.915.
- HANDEL, C.L.; MILACH, S.C.H.; FEDERIZZI, L.C. Riscos e Benefícios do uso das plantas transgênicas na agricultura. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.26, n.3, p.511-517, 1997.
- HANDEL, C.L.; WAGNER, C.M.; MILACH, S.C.H.; FEDERIZZI, L.C. Transformação genética de cereais via *Agrobacterium tumefaciens*. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.27, n.2, p.359-365, 1997.
- HARRINSON, D. **Biologia**. Lisboa: Ed. Presença, p. 15-46. 1975.
- HARWOOD, W.A.; HARDEN, J.; ROSS, S.M. et al. The performance of transgenic barley lines in a UK field trial. **Barley Genetics Newsletter**. Nottingham, v.29, p.16-20, 1996.
- JOHN, B.; LEWIS, K.R. **Hierarquia cromossômica: Introdução à biologia dos cromossomos**. São Paulo: EDUSP. 1979. P.170.
- NOBRE, J.; CANNELL, M.E.; DAVEY, M.R.; LAZZERI, P.A. Regeneration of fertile transgenic plants of barley via PEG-mediated transformation of scutellum protoplasts. **Barley Genetics Newsletter**. Nottingham, v.27, p. 16-18, 1996.

- PAUK, J.; STEFANOV, L.; FEKETE, S. et al. A study of different (caMV35AS and mas) promoter activities an risk assessment of field use in transgenic rapeseed plant. **Euphitica**, Wageningen, v.85, p. 411-416, 1995.
- PAVAN, C.; MOREIRA FILHO, C.A. Agronomia e biodiversidade. Bactérias fixadoras de nitrogênio na agronomia e na biodiversidade. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.1, n.4, p. 38-39, 1998.
- PINTO, R.J.B. **Introdução ao melhoramento genético de plantas**. Maringá: Ed. Universidade Estadual de Maringá. 1995, p.5.
- POEHLMAN, J.M. **Mejoramiento genético de las cosechas**. México: Limura. 1974, p. 451.
- ROMANO, E.; MONTE-NESHICH, D. Estratégia para introdução de resistência a vírus em plantas por engenharia genética. Online. Disponível em www.cenargem.com.br (Consultado em 26.10.1999).
- STRICKBERGER, M.W. **Genetics**. New York: Macmillan Publishing Co. Inc. 2.ed. 1976, p. 914.
- VALARINI, M.J. Base molecular da interação *Rhizobium*-leguminosa. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (ed.) **Ecologia microbiana**. EMBRAPA: Jaguariuna, 1998. Cap.12, p.311-325.
- VIEIRA, M.L.C. Híbridação somática em plantas A importância das espécies selvagens como fontes de genes. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.1, n.1, p.25-28,1997.