

## Aplicações e Avanços na Área da Biotecnologia Vegetal

M. Margarida Oliveira<sup>(1,2)</sup>

(1) Dep. Biologia Vegetal,  
Fac. Ciências de Lisboa,  
Campo Grande,  
1700 Lisboa

(2) IBET/ITQB,  
Apartado 12,  
2781-901 Oeiras

Todas as formas de melhoramento de plantas envolvem a selecção. Desde há 10.000 anos que este processo se realiza, por meios progressivamente mais científicos, conduzindo a maiores ganhos em produtividade, qualidade e diversidade das plantas exploradas.

As plantas, porque não se podem deslocar, desenvolveram mecanismos sofisticados de defesa contra herbívoros, patogêneos e outros agentes de stress. Alguns produtos do metabolismo secundário das plantas têm forte acção tóxica e podem funcionar como defesas. Nestes produtos incluem-se, por exemplo, a amigdalina (existente na amêndoa amarga e que gera o cianeto - glicósido cianogénico que inibe a citocromo oxidase interrompendo a respiração celular), a nicotina (o sulfato de nicotina é um insecticida potente), cardenólidos (esteróides glicosilados, como a digitoxigenina, muito tóxicos por inibirem as bombas de  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ), a solanina (existente nas batateiras selvagens), psoralenos (existentes no aipo selvagem) e muitos outros compostos pouco recomendáveis na alimentação humana e animal.

As plantas cultivadas para uso alimentar são mais sensíveis às pestes que as selvagens porque foram seleccionadas para isso mesmo, para reduzir a sua toxicidade. Apesar disso, nos países industrializados, 99% de todas as substâncias carcinogénicas que o homem consome na sua dieta são compostos

do metabolismo secundário das plantas, embora o metabolismo humano forneça protecção suficiente contra essas substâncias naturais. Esta situação claramente evidencia que o que é natural não é bom por inerência.

Um processo levado a cabo pelos agricultores ao longo dos tempos, e de forma gradualmente mais eficiente, tem sido o tornar comestíveis plantas que o não eram.

Os princípios estabelecidos por Mendel, no séc. XIX, fundamentaram o melhoramento convencional por cruzamento e selecção, em que progenitores seleccionados são cruzados para permitir obter na descendência as melhores características de cada um. Neste processo são combinados milhares de genes e obtêm-se numerosas variações pelo que o desenvolvimento de uma variedade de sucesso pode demorar muitos anos (até 12 anos no caso dos cereais, ou largas dezenas de anos no caso de plantas de ciclo de vida mais longo).

Os conhecimentos adquiridos pelos melhoradores relativamente à polinização cruzada, combinados com métodos cada vez mais sofisticados de detecção das características de interesse, permitiram acelerar este processo.

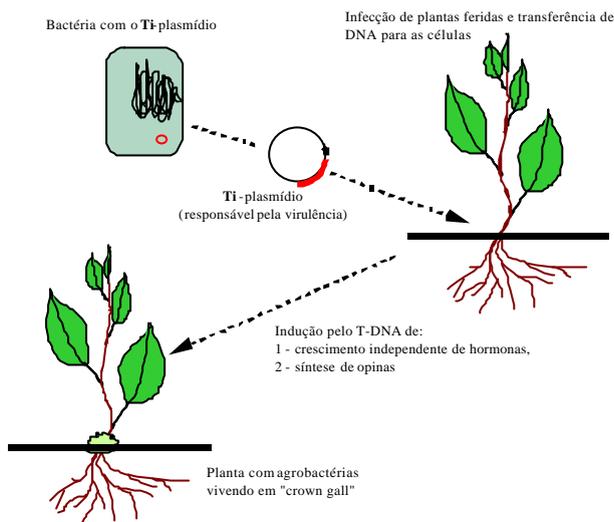
O mais recente estágio de desenvolvimento da tecnologia de melhoramento de plantas é a moderna biotecnologia. A biotecnologia envolve a manipulação

de processos biológicos para obter produtos úteis. A biotecnologia moderna explora, em grande parte, o conhecimento que adveio da descoberta da estrutura da dupla hélice de DNA (1950s) para actuar ao nível dos genes, seleccionando características de interesse e evitando as não desejáveis.

Os ganhos que se podem atingir pela biotecnologia de plantas têm reflexo sobre os agricultores, a indústria alimentar, os consumidores e, sobretudo, o meio ambiente. Por exemplo a produção de plantas recorrendo a menores gastos de energia, pesticidas, fertilizantes e água, ou a produção de plantas com níveis mais reduzidos de compostos alergénicos ou tóxicos, ou com melhores qualidades para armazenamento ou processamento, ou melhores qualidades nutricionais, são alguns dos numerosos exemplos de aplicações da biotecnologia vegetal.

Na biotecnologia vegetal, o domínio da cultura *in vitro* (ou cultura de tecidos) de plantas teve importância crucial. A cultura *in vitro* compreende a cultura de células, tecidos ou órgãos, em condições de assépsia e meios de cultura artificiais (contendo compostos como água, sais minerais, vitaminas, fonte de carbono e reguladores de crescimento).

Algumas das áreas de aplicação da cultura *in vitro* incluem a micropropagação, a cultura de meristemas (e produção de plantas isentas de doenças), a embriogénese somática, a variação somaclonal, a selecção *in vitro*, a cultura de protoplastos e a hibridação somática, de entre outras. Em termos gerais, estas tecnologias permitem por exemplo, propagar em larga escala plantas de qualidade superior (milhares, ou mesmo biliões), sem destruir a planta-mãe; obter plantas fáceis de transportar para diversos



**Figura 1** Exemplo da colonização genética de plantas pelo *Agrobacterium tumefaciens* na natureza.

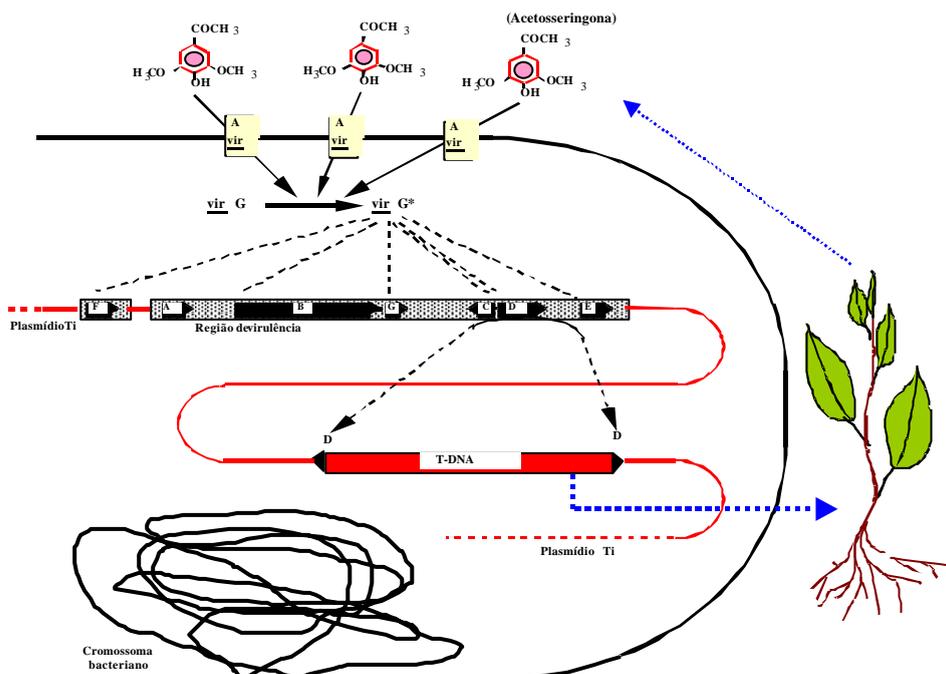
países, sem preocupações com introdução de novas doenças ou ainda, recuperar espécies em vias de extinção. As potencialidades da cultura de tecidos têm sido exploradas para criar variação genética (somaclonal) permitindo obter indivíduos resistentes a factores de stress, biótico ou abiótico, ou com características melhoradas (i.e.: aumento da produção de açúcar na cana-de-açúcar, resistência ao fungo *Fusarium* em tomateiro, resistência a

uma bacteriose em batateira...). Estas técnicas permitiram ainda regenerar indivíduos resultantes de cruzamentos com pouca viabilidade (por salvamento de embriões), obter híbridos somáticos, obter variação genética por mutagénese *in vitro* (por radiação X ou gama ou aplicação de químicos) ou introduzir, em variedades de elite, quantidades reduzidas de informação genética que permitiram importar uma ou outra característica de interesse sem

perturbar o resto do genoma. O último exemplo recorre a técnicas que hoje em dia se designam por técnicas de engenharia genética e permitem obter plantas transgénicas.

Embora as técnicas de hibridação convencional, associadas ou não a cultura de tecidos, também permitam regenerar indivíduos com combinações de genes que na natureza nunca ocorreriam, tem sido a obtenção de plantas transgénicas que tem gerado mais polémica.

Em termos sucintos, esta tecnologia recorreu, numa primeira fase, a um vector natural de transformação genética de plantas, o *Agrobacterium tumefaciens* (uma bactéria do solo, da família do *Rhizobium*). O *Agrobacterium* tem mecanismos que lhe permitem detectar uma ferida numa planta, aproximar-se dela e transferir para as células vegetais uma porção de DNA, em cadeia simples e protegida por proteínas bacterianas, que se integra no núcleo da célula vegetal, restaurando a dupla cadeia, e que vai comandar na planta uma série de acontecimentos proveitosos para a bactéria (Figura 1). As alterações verificadas são o crescimento de um tumor (causado pela produção de hormonas pelo



**Figura 2** Esquema da interacção molecular estabelecida entre a planta e o *Agrobacterium*, que resulta na activação dos genes de virulência e transferência do T-DNA, em cadeia simples, delimitado por sequências de extremidade ("borders") e protegido por proteínas de virulência.

tecido infectado) e a síntese de compostos dos quais a bactéria se alimenta (fontes de carbono e azoto) – as opinas.

A região que estas bactérias transferem às células vegetais é delimitada por sequências específicas de DNA. Se forem removidos todos os genes oncogénicos e de síntese das opinas e no seu lugar forem colocados genes de interesse (por exemplo genes de resistência a doenças ou outros) a bactéria continua a ser capaz de efectuar a transferência do DNA.

Assim, estas bactérias têm sido utilizadas como “escravas” no processo de engenharia genética de plantas, sendo eliminadas após a transferência do DNA. Os ensaios de transformação genética são desenvolvidos, regra geral, com culturas de plantas *in vitro* (crescendo em meios de cultura que lhes fornecem todos os nutrientes e reguladores de crescimento

necessários) e as bactérias são colocadas em contacto com feridas recentes criadas nas plantas. Após um período de co-cultura, as bactérias são eliminadas com antibióticos específicos e novos rebentos (ou embriões somáticos) são induzidos no material transformado, normalmente sujeito a pressão selectiva para eliminar os tecidos não transgénicos (Figura 3).

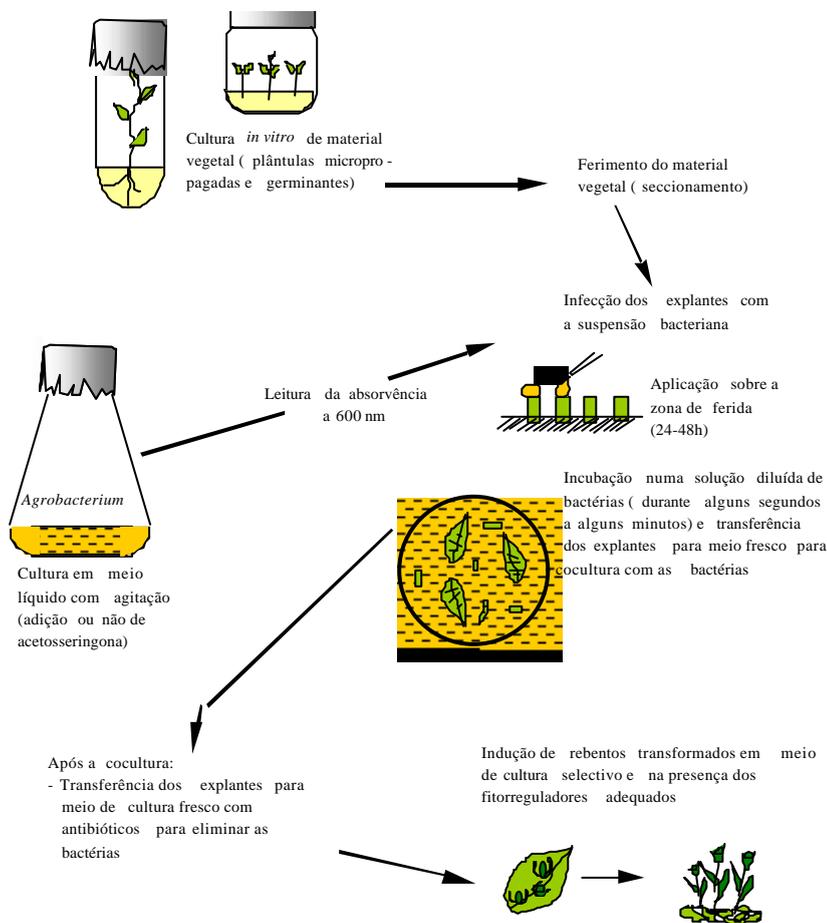
Este processo, no entanto, está dependente de uma interacção hóspede/hospedeiro, que nem sempre se estabelece.

Para obviar este problema alargando a gama de plantas transformáveis, foram desenvolvidos métodos alternativos com os quais foi possível efectuar transferência de DNA para plantas que não são hospedeiras do *Agrobacterium*. Alguns destes métodos são, por exemplo, o bombardeamento com micropartículas (normalmente de ouro e com cerca de 1 micrómetro de

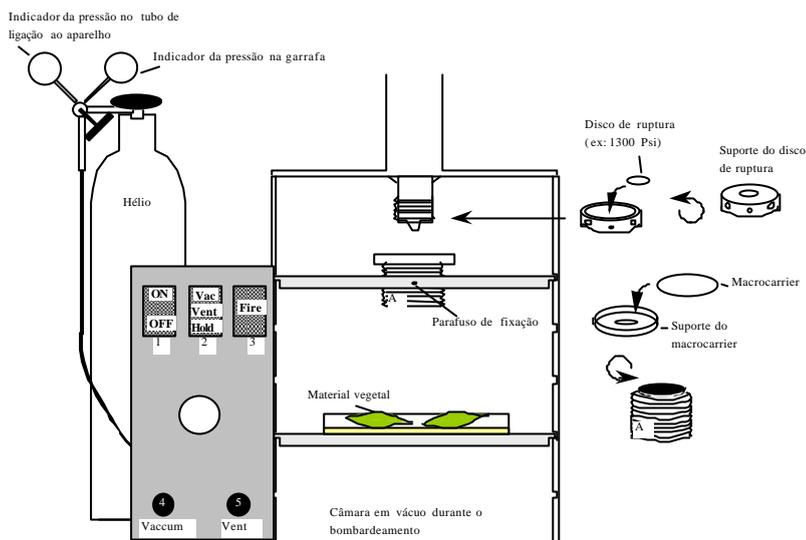
diâmetro), revestidas com o DNA e impulsionadas por pressão de gás ou descarga eléctrica, para entrarem no tecido vegetal.

A obtenção de protoplastos (células vegetais desprovidas da parede celular, por degradação enzimática da parede celulósica e lamela média pectínica) e a permeabilização química ou física da membrana plasmática também permite a entrada de DNA em solução e sua integração no genoma. Há muitos outros métodos como o microlaser, a microinjecção ou os vectores virais, que também podem ser utilizados, embora não sejam tão comuns como os anteriores.

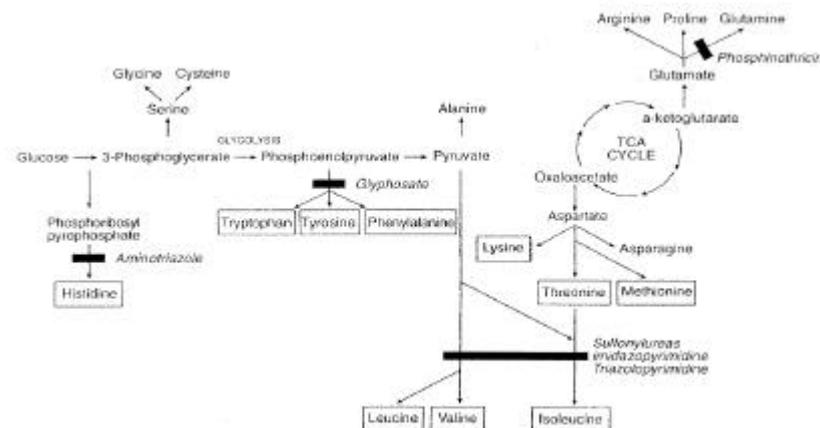
Os fragmentos de DNA que se inserem na célula vegetal têm de ser reconhecidos pela planta do ponto de vista molecular, ou seja, têm de ter sinais de expressão eucariotas, e devem também possibilitar formas de selecção das células transformadas e eliminação das não transformadas. É comum, por exemplo, a introdução de um gene marcador de resistência a um antibiótico ou herbicida. Os genes de resistência a antibióticos são, por norma, genes isolados de bactérias comuns na natureza (existentes no nosso intestino ou nos alimentos que consumimos), e que dispõem desses genes naturalmente. Os genes de resistência ou tolerância aos herbicidas são também isolados de bactérias do solo que degradam esses compostos (herbicidas biodegradáveis), embora outros possam provir de plantas selvagens naturalmente resistentes. Alguns destes genes codificam enzimas que degradam os herbicidas que bloqueiam a via de síntese de aminoácidos (i.e.: o caso da fosfotricina) ou codificam enzimas insensíveis ao herbicida, o que restabelece a síntese normal de produção de aminoácidos aromáticos (i.e.: gene de resistência ao glifosato) (Figura 5). A cultura do tecido transformado na presença do agente selectivo permite seleccionar as células transformadas e, a partir daí, em condições adequadas, regenerar as plantas transgénicas.



**Figura 3.** Como se modifica geneticamente uma planta (*in vitro*) via *Agrobacterium*.



**Figura 4.** Aspecto de um sistema de bombardeamento utilizado para transformação genética de plantas. As micropartículas revestidas pelo DNA são colocadas sobre o macrocarrier e disparadas sobre o material vegetal pela pressão do gás libertado aquando da ruptura do disco de ruptura. O macrocarrier é travado numa rede de paragem, não sendo assim projectado sobre o material.



**Figura 5.** Alguns herbicidas e locais de interferência na via de síntese de aminoácidos. O gene de resistência ao glifosato, introduzido em plantas por engenharia genética, cria uma via alternativa insensível ao composto. O gene de tolerância à fosfinitricina codifica uma enzima que degrada o composto.

A engenharia genética de plantas (EGP) forneceu, em 1984, a primeira planta geneticamente transformada por acção do homem. De então para cá, esta poderosa tecnologia tem sido largamente explorada e já permitiu obter resultados ainda há pouco tempo impensáveis. Como qualquer nova tecnologia de futuro promissor, a EGP foi agarrada por empresas, de dimensão gradualmente crescente, que investiram fortemente na investigação e que começaram a produzir produtos de interesse comercial cerca de 10 anos depois da primeira planta transgénica ter sido anunciada. Desta forma claramente

se percebe que um dos objectivos da EGP é atingir vantagem económica comparativamente às tecnologias convencionais (objectivo comercial). Contudo, como ferramenta poderosa que é, a EGP tem vindo a ser utilizada para estudar as funções *in vivo* dos genes das plantas e tem contribuído fortemente para o avanço do conhecimento do funcionamento vegetal (objectivo científico). As potencialidades da EGP e o avanço do conhecimento alargaram ainda o leque de aplicações, estendendo ao ambiente e à saúde e segurança alimentar dois outros grandes objectivos da sua aplicação (objectivos de natureza ecológica e

social). Assim, por exemplo, a modificação de plantas para melhorar o seu crescimento em condições adversas, reduzir os danos para o ambiente pela menor e melhor utilização de agroquímicos (pesticidas e fertilizantes), ou para rentabilizar o processamento de produtos reduzindo gastos energéticos, são de particular importância a nível ambiental.

No domínio da introdução de resistência a doenças, uma das estratégias de pesquisa de genes de interesse tem sido a procura de indivíduos naturalmente resistentes, a identificação das bases moleculares dessa resistência e o isolamento dos genes e sua transferência para plantas sensíveis. É o caso dos genes das endotoxinas do *Bacillus thuringiensis* (uma bactéria do solo que é utilizada como pesticida natural desde há várias dezenas de anos), que têm também sido transmitidos às plantas para lhes conferir a capacidade de se defenderem elas próprias dos ataques de alguns insectos. Estas toxinas acumulam-se normalmente na bactéria sob a forma de cristais, os quais, por ingestão pelo insecto, são degradados nas condições alcalinas do seu tracto digestivo libertando a toxina activa que se liga a receptores específicos e afecta a permeabilidade membranar das células epiteliais do mesentério. Desta forma as células afectadas rompem e a larva morre.

Com a vantagem sobre certos insecticidas tradicionais (i.e: organofosfatos) de atingirem uma gama de insectos bastante mais restrita (preservando, por exemplo abelhas e joaninhas, as toxinas Bt têm vindo a ser estudadas e modificadas no sentido de cada vez serem mais específicas. Há, por exemplo, toxinas Bt específicas para larvas de lepidópteros, coleópteros ou dípteros. Para além da identificação de toxinas Bt naturais de maior especificidade, tem-se investido no sentido da modelação da cadeia peptídica, por forma a utilizar apenas a porção de DNA que codifica a região activa do péptido, e

no sentido de aumentar a especificidade. Na Figura 6, é visível o aspecto de uma campo não tratado com pesticidas e plantado com algodão sensível (à esquerda) e resistente (à direita) ao insecto *Helicoverpa armigera*. As plantas resistentes expressam o gene da endotoxina do *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* (Novillo *et al.*, 1999). Para reduzir as hipóteses de aparecimento de insectos resistentes é importante cultivar sempre uma fracção de terreno com plantas sensíveis, os refúgios.



**Figura 6** Aspecto de campos de algodão sensível (à esquerda) e transgénico (à direita) ao insecto *Helicoverpa armigera* (Novillo *et al.*, 1999).

Como outras proteínas, as toxinas Bt são moléculas biodegradáveis, e além disso são também sensíveis à radiação ultra-violeta, pelo que não permanecem muito tempo no solo.

Existem diversas outras estratégias de introdução de resistência a insectos, baseadas em genes de plantas naturalmente resistentes. É o caso, por exemplo, de genes que codificam inibidores das proteínases dos insectos. Um destes genes, isolado de tomateiro, já foi introduzido em arroz conferindo-lhe resistência à broca do caule.

Outros agentes de stress biótico, como vírus, bactérias, fungos e nemátodes, também já foram ultrapassados em várias plantas por estratégias de engenharia genética

A modificação genética de plantas para obtenção de polímeros biodegradáveis que podem substituir os plásticos é também já uma realidade. Igualmente a expressão em plantas de genes que codificam proteínas terapêuticas (como a somatotropina) está a surgir como uma importante alternativa aos sistemas de produção de fármacos actualmente existentes, já que as plantas têm a vantagem adicional de minimizar os potenciais contaminantes virais.

Também o enriquecimento nutricional de produtos alimentares utilizados em larga escala em regiões de extrema pobreza (como a introdução da via de síntese da pró-vitamina A em arroz), a produção de

vacinas em alimentos para permitir proteger largas faixas de população em regiões de difícil acesso ou a produção de plantas de elevada qualidade e robustez para cultivo em zonas pobres são formas de permitir melhorar a qualidade de vida minorando os contínuos ataques à natureza para obter solos aráveis. De facto actualmente observamos as sistemáticas destruições de áreas de floresta natural e as explorações de terrenos marginais, que levam à contínua degradação e poluição do nosso planeta e a perdas anuais da ordem dos 22 biliões de toneladas de solo. A substituição dos pesticidas convencionais é também urgente, já que conduz à poluição de solos e cursos de água com substâncias de longa persistência, tóxicas para o Homem e outros animais.

Criar condições de segurança alimentar a nível mundial pode prevenir a guerra. Um povo com fome vai procurar alimento onde este existir.

Com as actuais taxas de crescimento populacional será necessário que, dentro de 3 ou 4 dezenas de anos, 85% da produção mundial de alimento seja assegurada pelos países pobres, situando-se um quarto dessa produção na China. A China vai precisar de cerca de 40% de aumento da produção de carne. Por alguma razão a China investe actualmente em larga escala na área da Biotecnologia.

Na Índia, um país em que 70% da população se dedica à agricultura, 400 milhões de pessoas vão para a cama com fome e os terceiros filhos de cada casal nascem com falta de peso por deficiências nutricionais. Prevê-se, por exemplo, que já em 2015, Bombaim seja uma cidade com mais de 26 milhões de pessoas e outras cidades dos países atinjam números próximos. Desde a década de 80 que, neste país, a biotecnologia tem vindo a ser encarada uma prioridade em áreas como a agricultura, saúde, ambiente, desenvolvimento de recursos humanos, indústria, segurança e assuntos éticos. Diversos genes de resistência a doenças de plantas foram já introduzidos em arroz e estão a ser testados no Punjab por populações locais.

Quando nos anos 50 foi necessário, para alimentar a população crescente, aumentar drasticamente a produção vegetal, num processo que é hoje referido como a revolução verde, recorreu-se à utilização massiva de agroquímicos que muitas empresas ainda hoje teimam em não abandonar. É urgente começar a aplicar as novas tecnologias que permitirão no futuro obter melhor qualidade e produtividade com menos consequências nefastas para o ambiente e para a saúde. A esta nova revolução chama-se já a segunda revolução verde ou a revolução

duplicamente verde (“Doubly-green Revolution”).

A engenharia genética de plantas não é, de forma alguma a solução única, mas é uma peça chave num programa mais vasto de educação social e ambiental para o melhoramento da alimentação, exploração agrícola sustentável e qualidade de vida.

### Algumas referências úteis

Arakawa T, Yun J, Chong DKX, Hough J, Engen PC, Langridge WHR (1998) A plant-based cholera toxin B subunit-insulin fusion protein protects against the development of autoimmune diabetes. *Nature Biotechnol.*, 16:934-938.

ASPP Public Affairs (United States Department of Agriculture) (1997) – Leading examples of basic plant research – Agriculture. [http://aspp.org/pubaff/usda\\_nri.html](http://aspp.org/pubaff/usda_nri.html)

Birch RG (1997) Plant transformation: problems and strategies for practical application. *Ann. Rev. Plant Mol. Biol.*, 48: 297-326.

Castañon S, Marín MS, Martin-Alonso JM, Boga JA, Casais R, Humara JM, Ordás RJ, Parra F (1999) Immunization with potato plants expressing VP60 protein protects against rabbit hemorrhagic disease virus. *J. Virol.* 73:4452-4455.

Chakraborty S, Chakraborty N, Datta A (2000) Increased nutritive value of transgenic potato by expressing a non-allergenic seedalbumin gene from *Amaranthus hypochondriacus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97:3724-3729.

Daniell H (1999) Environmentally friendly approaches to genetic engineering. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 35:361-368.

Daniell H (1999) The next generation of genetically engineered crops for herbicide and insect resistance: containment of gene pollution and resistant insects. *AgBiotechNet* 1999, Vol. 1. [http://www.agbios.com/articles/abn024\\_daniell.html](http://www.agbios.com/articles/abn024_daniell.html)

Daniell H, Guda C (1997) Biopolymer production in microorganisms and plants. *Chem. Ind.*, 14:555-560.

Dunwell JM (1998) “Novel food products from genetically modified crop

plants: methods and future prospects. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 33: 205-213.

Dunwell JM (2000) “Transgenic approaches to crop improvement”. *Journal of Experimental Botany*, 51: (*in press*).

Galun E, Breiman A (1997) “Transgenic Plants”. Imperial College Press.

Gould F (1998) Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. *Ann. Rev. Entomol.*, 43:701-726.

Guda C, Lee S-B, Daniell H (2000) Stable expression of a biodegradable protein based polymer in tobacco chloroplasts. *Plant Cell Rep.*, 19:257-262.

Hansen G & Wright MS (1999) Recent advances in the transformation of plants. *Trends in Plant Science*, 5: 226-231.

Henry RJ (1997) “Practical Applications of Plant Molecular Biology”. Chapman & Hall, London.

[http://www.csu.edu.au/learning/eubios/S\\_G7.html](http://www.csu.edu.au/learning/eubios/S_G7.html)

[http://www.rockfound.org/news/072699\\_rice.html](http://www.rockfound.org/news/072699_rice.html)

<http://www-saps.plantsci.cam.ac.uk/articles/biotecpb.html>

Hu W-J, Harding SA, Lung J, Popko JL, Ralph J, Stokke DD, Tsai C-J, Chiang VL (1999) Repression of lignin biosynthesis promotes cellulose accumulation and growth in transgenic trees. *Nature Biotechnol.*, 17:808-812.

Keller H, Pamboukdjian N, Ponchet M, Poupet M, Poupet A, Delon R, Verrier J-L, Roby D, Ricci P (1999) Pathogen-induced elicitor production in transgenic tobacco generates a hypersensitive response and non-specific disease resistance. *Plant Cell*, 11:223-235.

Lentz KE, Lambé P (1997) Review on the many applications of Plant Tissue Culture research. <http://www.orchidmall.com/CEVIE/cevtc-en.html>

Macer DRJ (1990) Shaping genes: ethics, law and science of using new genetic technology in Medicine and Agriculture. [http://www.csu.edu.au/learning/eubios/S\\_G7.html](http://www.csu.edu.au/learning/eubios/S_G7.html)

Mahendra HHS, Wang J, Sivanani E, Ong CA, Chen L, Kochko A, Beachy RN, Fauquet C (1999) Near immunity to rice Tungro spherical virus achieved in

rice by a replicase-mediated resistance strategy. *Phytopathol.*, 89:1022-1027.

May GD, Mason HS, Lyons PC (1996) Applications of transgenic plants as production systems for pharmaceuticals. In: Fuller C et al (eds.). *Am. Chem. Soc. Symposium Series*, 647:194-204.

McCalla AF, Brown LR (1999) Feeding the developing world in the next millennium: a question of science? In: Persley GJ, Lantin MM (eds.) “Agricultural Biotechnology and the Poor”. CGIAR, Proceedings of an International Conference, Washington, D.C. 21-22 Oct. 1999. Pp:32-42.

Novillo C, Soto J, Costa J (1999) Resultados en España con variedades de algodón, protegidas genéticamente contra las orugas de las cápsulas. *Bol. San. Veg. Plagas*, 25: 383-393.

Persley GJ, Lantin MM (1999) Agricultural biotechnology and the poor: promethean science. In: Persley GJ, Lantin MM (eds), “Agricultural Biotechnology and the Poor”. CGIAR, Proceedings of an International Conference, Washington, D.C. 21-22 Oct. 1999. Pp: 3-21.

Sasson A (1998) Plant Biotechnology-derived products: Market-value estimates and public acceptance. UNESCO - Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.

Sederoff R (1999) Building better trees with antisense. *Nature Biotechnol.*, 17:750-751.

Sharma M (1999) India: Biotechnology research and development. In: Persley GJ, Lantin MM (eds.) “Agricultural Biotechnology and the Poor”. CGIAR, Proceedings of an International Conference, Washington, D.C. 21-22 Oct. 1999. Pp: 51-57.

Staub JM, Garcia B, Graves J, Hajdukiewicz PTJ, Hunter P, Nehra N, Paradkar V, Sclitter M, Carroll JA, Spatola L, Ward D, Ye G, Russell DA (2000) High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nature Biotechnol.*, 18:333-338.

Sussman MR (1999) Pumping iron. *Nature Biotechnol.*, 17:230-231.