

# Material Didáctico Multimédia de Genética e Biotecnologia Vegetal

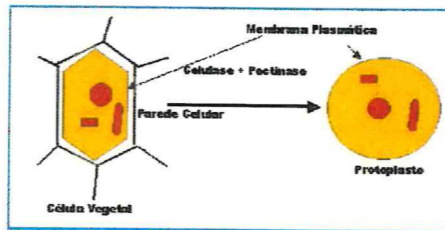
## Ficha temática n.º2 ABC da Engenharia Genética e Biotecnologia

O milho tal qual hoje o conhecemos resulta de inúmeros Programas de melhoramento. Eles foram desenvolvidos ao longo de muitos anos e incluíram a realização de cruzamentos de **hibridização sexual e selecção** (figura 1). Na sua história merece destaque o teosinto (*Zea mexicana*), dado ser a planta descrita como ancestral do milho (*Zea mays L.*, figura 2). Estão disponíveis para o agricultor diversos milhos híbridos, que diferem entre outros aspectos: na cor do grão (amarelo, branco ou laranja) ou no tipo de grão (dentado, redondo ou intermédio). Mais detalhes descritos no [Catálogo Nacional de Variedades](#).

As técnicas usadas no melhoramento agrícola tradicional, foram-se juntando técnicas que iam permitindo ultrapassar alguns obstáculos encontrados. Deste modo, as **técnicas de 'Melhoramento por indução de mutações'** permitiram obter novas variedades de plantas importantes na agricultura. Um exemplo de aplicação desta técnica são os cereais resistentes à acama devido à indução de mutação cujo efeito foi o encurtamento do caule.

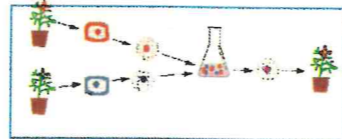
Com as técnicas de **'Fusão de Protoplastos'** (inglês: **Protoplast Fusion**), desenvolvidas em laboratórios de Biotecnologia Vegetal (figura 3) em meados de 1970, os investigadores tinham por objectivo conseguir obter plantas que reunissem características que resultassem de combinações entre plantas de géneros diferentes («intergenéricas»), sempre que elas fossem impossíveis de obter pelas convencionais hibridizações sexuais. Entre algumas destas combinações realçamos o cruzamento entre plantas de géneros diferentes como o de batata com tomate (*Solanum x Lycopersicon*), que em inglês ficou conhecido por 'pomato' (por resultar de cruzamento entre 'potato X tomate').

Observa no esquema 1, como é possível obter um protoplasto a partir de uma célula vegetal.



**Esquema 1** - Um protoplasto é uma célula "nua"; perdeu a parede, mantém a membrana e adquire aspecto circular. A perda da parede celular é conseguida pelo uso de enzimas capazes de a degradar (ex.: celulase).

O esquema 2 ilustra a Hibridização somática entre uma planta cuja flor é vermelha e outra cuja flor é azul. A planta híbrida resultante tem flor com coloração intermédia, lilás neste caso.



**Esquema 2** - Um híbrido somático, formado pela fusão de dois protoplastos de espécies distintas pode ser obtido num processo cujas fases são (de modo simples): obtenção de Protoplastos; indução da sua fusão (em 'balão Erlenmayer'); obtenção de linha celular híbrida e regeneração da planta - que é um «híbrido somático».

Mas os resultados destas experiências de fusão nem sempre eram **linhas celulares híbridas!** E mesmo quando elas se obtinham nem sempre delas se conseguia a regeneração de plantas... Por último, algumas destas plantas até mostravam ser estéreis (casos de infertilidade) ficando impedidas de integrar Programas de Melhoramento. Alguns casos de **híbridos somáticos** (plantas resultantes portanto de hibridização somática) foram registados em leguminosas (*Medicago sativa x Medicago falcata*).

Entretanto, e durante as décadas de 1950, 1960 e 1970, a grande maioria dos estudos de genética eram desenvolvidos em organismos simples: microorganismos, tais como bactérias (figura 4) e vírus. De facto esse caminho mostrou vir a ser de

Notas



**Figura 1** - Realização de hibridizações no campo.

Mais dados em: [www.dgpc.min-agricultura.pt/catalogo/catalogo\\_indice.htm](http://www.dgpc.min-agricultura.pt/catalogo/catalogo_indice.htm); com todas as informações de utilidade sobre as variedades de espécies agrícolas e hortícolas.

**Indução de mutações:** refere-se à possibilidade de provocar ou induzir, em laboratório, a mutação dos mais diversos caracteres (os trabalhos desenvolvidos por Müller, por volta de 1927, constituem um marco nesta investigação). Os agentes mutagénicos podem ser químicos (vários produtos) ou físicos (por ex.: raios gama). em inglês: **Mutation Breeding**, mais dados em: Agência Internacional de Energia Atómica em [www.iaea.org/worldatom/Periodicals/Bulletin/Bull381/tc3a.pdf](http://www.iaea.org/worldatom/Periodicals/Bulletin/Bull381/tc3a.pdf)



**Figura 2** - Aspecto de grãos de milho (*Zea mays*)

**Protoplasto** - célula vegetal desprovida de parede. A fusão de protoplastos pode obter-se de 2 modos: modo químico (uso de PEG - polietilenoglicol) ou modo eléctrico (uso de eléctrodos). Algumas das inúmeras combinações ensaiadas por fusão de protoplastos incluíram: salsa x cenoura; soja x tabaco; cenoura x petúnia.



**Figura 3** - Nos laboratórios de biotecnologia vegetal a 'matéria-prima' - plantas, ou porções delas - são geralmente trituradas com a ajuda de um almofariz.



**Figura 4** - Aspecto de cultura de células de bactéria *E. coli*, obtido por ampliação e método de coloração apropriado para uma boa visualização ao microscópio.

grande utilidade ao melhoramento de plantas. Começamos por conhecer a história duma bactéria que ficou célebre: A **Agrobacterium**.

Na natureza há bactérias que causam nas plantas hospedeiras umas galhas, nódulos, ou tumores - em inglês «crown gall» (figuras 5) sabendo-se que esta interacção bactéria/planta se faz através de feridas existentes na planta. Trata-se de uma relação de hóspede/hospedeiro nem sempre capaz de se estabelecer com igual facilidade: ocorre melhor em plantas dicotiledóneas do que em monocotiledóneas. Algumas destas bactérias vivem no solo e a sua capacidade de causar alterações no aspecto das plantas foi realçada em 1968, por Morel e colegas.

Tanto o isolamento como a identificação da bactéria que causava o aparecimento de nódulos ou tumores como sendo a **Agrobacterium tumefaciens**, terão ocorrido há já uns anos (ca. de 1900) e atribuem-se esses dados a dois investigadores dos EUA. Entretanto em diversos laboratórios os estudos prosseguiram. Em 1974, Schell e Van Montagu atribuíam um papel neste processo de formação de nódulos a um **plasmídeo** (anel de ADN da bactéria), pois nele existia essa informação essencial à indução dos nódulos ou tumores. Deram-lhe o nome de plasmídeo indutor de tumores ou '**plasmídeo Ti**' (do inglês 'Tumour inducing') e no seu ADN existiam então praticamente todos os genes necessários tanto à **associação** com as células vegetais como à **transferência** para elas de um pedaço de ADN o '**T-DNA**' (do inglês 'Transferred DNA').

### A transferência...

Quando a **Agrobacterium** contacta com um local de lesão duma planta susceptível, é iniciada, ao nível celular, uma série de reacções bioquímicas em cadeia com envio de múltiplos sinais, até que se formem as condições para que o **ADN** seja Transferido da **Agrobacterium** para a célula vegetal e daí então para o seu núcleo. Nesta interacção há um aspecto curioso: a bactéria dá instruções à célula da planta sobre a sua alimentação, dado que o T-DNA contém genes para que, nas células do nódulo causado na planta hospedeira, se dê a síntese ou fabrico de **opinas** ('alimento' da bactéria ou seja, a sua fonte de azoto, de carbono e de energia).

Esta colonização genética das plantas por infecção com **Agrobacterium** é uma situação que ocorre na natureza. A estratégia usada pela bactéria para transferir material genético foi depois aproveitada pelos investigadores nos protocolos laboratoriais de transformação genética (figuras 6). A história da **Agrobacterium** é assim a história de uma «Engenheira genética natural com vários hospedeiros».

### A Agrobacterium no laboratório

De um ponto de vista prático, a habilidade da **Agrobacterium** transferir T-ADN para o genoma da planta possibilitou introduzir novos genes nas plantas! Mas para isso contribuiu um facto: foi possível obter plasmídios nos quais estão ausentes as funções que provocam tumores, estando presentes os genes que nos interessa transferir para a planta a modificar. Estas estirpes de **Agrobacterium** úteis como «**veículo**» de genes apenas (dado serem incapazes de provocar nódulos) possuíam então plasmídios designados: '**plasmídios inofensivos**' ou '**plasmídios desarmados**'.

Nos protocolos experimentais de transgénese são usadas para transferir material genético técnicas que podem:

1. usar «**veículos de transporte**» de **material genético**:
  - 1.1. **vetores biológicos**: plasmídios de bactérias como a **Agrobacterium** (plasmídeo Ti de *A. tumefaciens* e plasmídeo Ri *A. rhizogenes*) e a **Escherichia** (*E. coli*). Aos plasmídios que são estáveis em **Agrobacterium** e em *E. coli* dá-se o nome de **vetores binários** (inglês 'binary vectors').
  - 1.2. **vetores não-biológicos**: micropartículas de metal (ouro ou tungsténio) revestidas com ADN são "disparadas" em direcção às células dum tecido vegetal alvo (técnicas de biolística ou de bombardeamento)
2. não usar veículos:
  - 2.1 **transferência directa**: por permeabilização da membrana celular por tratamentos químicos (uso de polietileno glicol) ou por tratamento eléctrico (designado por 'electroporação' e com recurso a choques eléctricos).

Também pode ocorrer introdução de material genético em protoplastos por micro-injecção e sabemos que diversas técnicas podem ser combinadas, como sucedeu até num protocolo de transformação genética de videiras: inicialmente o

Notas

**Plasmídeo** - pequena molécula de ADN extracromossómico duma bactéria, com aspecto circular e capaz de auto replicação. Pode ser descrito também como pequeno anel de ADN que existe na célula bacteriana.



**Figura 5a**



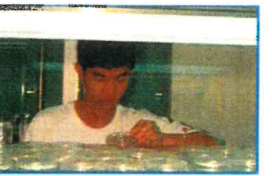
**Figura 5b**



**Figura 5c**

**Figuras 5 (a-c)** - Aspecto de 'galhas' causadas por **Agrobacterium tumefaciens**, em vários hospedeiros

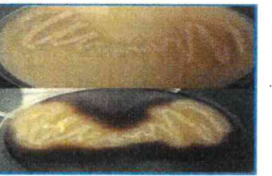
**Hospedeiros da Agrobacterium** - a associação da bactéria não se dá apenas com células vegetais pois foi observada, pelo menos no laboratório, com uma série de fungos incluindo *Saccharomyces*, *Agaricus* e *Aspergillus*. A **Agrobacterium** pode ter assim vários hospedeiros! Algumas estirpes são mais selectivas como a '**Agrobacterium vitis**' que na natureza causa nódulos apenas em videiras.



**Figura 6a**



**Figura 6b**



**Figura 6c**

**Figuras 6 (a-c)** - Em laboratório as bactérias são mantidas em caixas de Petri (ou balões Erlenmayer), sob condições de luz e temperatura controladas.

[www.institutovirtual.pt/edu-agri-biotech](http://www.institutovirtual.pt/edu-agri-biotech)



FUNDAÇÃO CALOUSTE GULBENKIAN

Projecto integrado no "Programa de Apoio a Projectos de Pesquisa no Domínio Educativo 2001", do Serviço de Educação e Bolsas da Fundação Calouste Gulbenkian.

«Um gene, um caracter, um grupo de caracteres não tem em si próprios, nenhum valor intrínseco, pois este depende, para cada indivíduo, de todos os seus outros genes e do meio particular em que ele vive: a longo prazo, tal valor é sancionado pelo êxito (sobrevivência e transmissão à descendência) ou pelo fracasso (eliminação pela selecção natural).» Beisson, J.(1973)

bombardamento causava ferimento de tecidos vegetais para facilitar posteriormente, a transferência - mediada por *Agrobacterium*-do(s) gene(s).

#### A integração... e a Modificação Genética

Foi depois constatado que o T-ADN era incorporado no núcleo da célula vegetal - ocorria integração nas células vegetais duma parte do genoma duma bactéria! Tinha ocorrido uma **alteração genética**.

Ao conhecimento sobre estes rearranjos no ADN juntou-se um dado importante: as sequências de ADN eram ajustáveis de modo surpreendente! De facto, verificava-se que as sequências de ADN podiam ser deslocadas dentro de um genoma, podiam ser modificadas, ou até perdidas, como um acontecimento normal; ou podiam ser introduzidas nas células por métodos experimentais.

As sequências de **ADN recombinante** têm assim os genes que possuíam mais os que vieram transferidos. Mas esta adição não é tão simples como uma adição matemática!! Nos casos mais simples os genes adicionados são inseridos nos cromossomas das células transformadas geneticamente. O conjunto de genes transferidos é, por vezes, referido como **cassete génica**. Mas o ADN recombinante pode resultar, não só duma adição de gene(s), mas também duma subtração ou remoção, ou duma interferência na sua expressão.

#### Não esquecer...

A **transformação genética** é um acontecimento ao nível de uma célula. Os episódios do acontecimento caso se trate de uma **'adição'** são:

**identificação e isolamento** de um gene dum ser vivo qualquer que tenha interesse (gene X, por exemplo);

**ligação** desse gene a material genético - geralmente o gene X é ligado a plasmídeo bacteriano;

**transferência** é um processo de transporte de um fragmento específico de ADN: geralmente -um gene X ligado a plasmídeo bacteriano- para protoplastos ou células vegetais;

**integração** que se refere a uma inserção estável do gene X no genoma da planta.

**expressão do gene** inserido, ou seja a sua manifestação! Dela depende o sucesso da transformação genética!

Depois, a partir desta célula geneticamente modificada e, através de técnicas de cultura *in vitro* pretende-se regenerar uma planta inteira. Estas técnicas existem descritas em manuais com protocolos laboratoriais (figura 7), comparáveis a livros de culinária, dado que em ambos os casos várias tarefas são cronometradas numa dada ordem, embora os «ingredientes» sejam outros (!), tais como soluções de **enzimas** variadas, culturas de bactérias, etc (figura 8).

Pela sua importante função destacamos as enzimas que mudam a estrutura do ADN, porque o cortam ou clivam (**enzimas de restrição**), ou então porque o colam ou ligam (**ligases**), funcionando as primeiras como tesouras e as últimas como colas do ADN, essenciais portanto às operações de 'corte e costura'.

As plantas provenientes de células geneticamente modificadas são designadas **plantas transgénicas** e são a face visível da moderna **biotecnologia vegetal**! O uso comercial das culturas geneticamente modificadas tem como **pré-requisitos** básicos: i) a **expressão estável** do transgene ii) a **transmissão hereditária do transgene** de modo 'fiel', ou seja, de acordo com leis mendelianas.

Tal ainda não sucede em todos os casos: alguns relatos evidenciam que o transgene tem uma expressão instável e a sua transmissão hereditária é não-mendeliana. Como se sabe que certas variações nas condições ambientais são capazes de influenciar a actividade dos genes e dos transgenes nas plantas (Recordemos: Fenótipo=Genótipo x Ambiente), os ensaios experimentais, a diferentes níveis (fitotróo, estufa, condições de campo) são de grande utilidade. Estes ensaios cumprem normas de segurança, de modo a evitar ou minimizar eventuais danos ecológicos. Os resultados destes ensaios irão permitir aperfeiçoamento de aspectos que ainda não estejam 'afinados', de modo a minimizar os **efeitos inesperados**: a ciência caminha... É por erro e tentativa que vai progredindo...

O lugar da biotecnologia vegetal na agricultura e horticultura modernas vai além da obtenção de plantas transgénicas pois envolve o uso de inúmeras técnicas de biologia molecular úteis por exemplo em processos de diagnóstico ou em processos de caracterizações genéticas.

**Cassete génica** - o gene X a transferir vai geralmente acompanhado: (i) dum promotor - gene P, por ex., que como o nome indica vai promover a manifestação das instruções do gene X, ou seja promove a sua expressão; (ii) dum marcador - gene M, por ex., cujas instruções se forem lidas na nova célula são detectáveis e marcam a sua presença, mas se não o forem, indicam ausência (função comparável à de um farol, que apenas com luz marca a sua presença funcional). O gene promotor mais usado tem sido o gene 'CaMV35S', que provem do vírus do mosaico da couve-flor, em inglês *Cauliflower Mosaic Virus*.



Figura 7 - A descrição de protocolos laboratoriais de biotecnologia vegetal existe em livros especializados.

A sequência desejada de nucleótidos do ADN (organismo dador) é clivada numa dada posição pelas **enzimas de restrição**. Conforme o local de clivagem, as enzimas de restrição são agrupadas e classificadas em mais de cem famílias.



Figura 8 - Aspecto de bancada de laboratório onde se manuseia um 'arsenal' de frascos, tubos e pipetas com soluções diversas, algumas das quais soluções de enzimas.

**Plantas Transgénicas** - A 1ª experiência de transgénese vegetal registou-se em 1983 com uma planta de tabaco. O 1º caso de comercialização de cultura transgénica foi o do tomate (FlavrSavr®) já depois de 1990!

**Efeitos inesperados**- na célula modificada geneticamente podem ocorrer alterações no seu metabolismo. Essas alterações, em certos casos, podem ter efeitos indesejáveis relacionados por exemplo com a biosíntese de proteínas potencialmente alergénicas e/ou tóxicas.

#### Fontes consultadas

Beisson, J. (1973). A genética (Trad. do original 'La Génétique', PUF, 1971). Coleção Saber, Ed. Europa América, nº 29, 117 pp.

Evans, D. A. (1983). Somatic hybrids for crop improvement and gene research. *Bio/Technology*(Dec.' 83): 856-858.

Evans, D. A. (1983). Agricultural applications of plant protoplast fusion. *Bio/Technology* Vol.1 (3), May.' 83): 253-261.

Nester, E.W.(2000). DNA and protein transfer from bacteria to eucaryotes-the agrobacterium story. *Mol. Plant Pathol.*1(1): 87-90 (2000).

Scorza, R., Cordts, J.M., Ramming, D.W. & Emérshad, R.L.(1995). Transformation of grape (*Vitis vinifera* L.) zygotic derived somatic embryos and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Reports* 14: 589-92.

#### Imagens:

[www.freefoto.com](http://www.freefoto.com)  
<http://bioidadac.bio.uottawa.ca>  
[www.webshots.com](http://www.webshots.com)  
[www.loats.com](http://www.loats.com)  
<http://helios.bto.ed.ac.uk/bto/microbes/crown/htm>  
[www.ars.usda.gov](http://www.ars.usda.gov)

#### Escolas Participantes

Escola Profissional de Desenvolvimento Rural de Serpa  
 Escola Profissional do Alto Minho Interior  
 Escola Profissional Agrícola do Rodo Régua  
 Escola de Viticultura e Enologia da Bairrada Anadia  
 Escola Profissional Agrícola de Torres Vedras Runa



Ministério da  
Agricultura,  
do Desenvolvimento  
Rural e das Pescas



instituto de soldadura  
e qualidade

#### Conteúdo Científico

Dr.ª Maria Alexandra Viegas Abreu Lima - Departamento de Protecção de Plantas EAN-INIA

#### Concepção Gráfica

Daniela Parchow Figueiredo - Centro de Edição - ISQ