

## **Biotecnologia vegetal – uma visão breve**

A utilização integrada das Ciências da Vida e dos processos de Engenharia possibilitou o desenvolvimento da Biotecnologia, a qual tem como finalidade a produção de bens e serviços a partir dos seres vivos ou dos seus componentes, de uma forma sustentável. A racionalização dos processos implica a sua predição, a precisão e previsibilidade, bem como a redução de custos de produção e dos impactos ambientais e a utilização sustentada dos recursos.

No que se refere às plantas, a Biotecnologia permite actualmente a obtenção de novas variedades com características adequadas a uma maior produtividade e com as qualidades exigidas aos diversos fins para os quais a humanidade destina os produtos vegetais: alimentação humana e animal, obtenção de fibras, madeira para habitação, móveis e produção de energia, pasta de papel, aromas e perfumes e fármacos, entre outros.

A biotecnologia de plantas moderna radica-se nos estudos desenvolvidos nos últimos 150 anos em cultura *in vitro* de plantas. A possibilidade de manipular os processos de diferenciação *in vitro* é essencial para a aplicação de técnicas que permitem acelerar a disponibilização de variedades utilizáveis na produção vegetal. Esta tecnologia é fundamental para a obtenção de plantas geneticamente modificadas, para a produção em larga escala de fármacos de origem vegetal, para a produção de proteínas recombinantes para uso terapêutico (“molecular farming”), para a multiplicação acelerada e homogénea de um determinado genótipo com características específicas, ou para a sua preservação através de processos como a crio-preservação. A cultura *in vitro* permite ainda a obtenção de haplo-diplontes (onde características recessivas se podem expressar) ou de variantes somaclonais, ou de híbridos inter-específicos zigóticos ou somáticos (por fusão e cultura de protoplastos).

As técnicas de cultura, nomeadamente a suplementação dos meios de cultura com fitoreguladores (auxinas, citocininas, giberelinas, etileno, ácido abscísico, jasmonatos ou poliaminas) permitem controlar os processos de diferenciação e crescimento, sendo possível decidir pela diferenciação de um órgão específico (raízes, caules, flores ou tubérculos, por exemplo), ou pela não diferenciação e obtenção de um *callus* e de uma cultura de células não diferenciadas em suspensão, ou pela diferenciação de embriões somáticos, que podem diferenciar-se de tecidos diplóides ou tecidos haplóides.

A associação da capacidade de diferenciação *in vitro* com métodos de engenharia genética e processos de transferência (directa – por exemplo por electroporação ou bombardeamento de partículas - ou mediada – por *Agrobacterium* ou vírus de DNA) de DNA permite a obtenção de plantas transgénicas com características genéticas

qualitativas distintas da linha original. Estas características podem conferir, por exemplo, resistência a um vírus (ex: “papaya ringspot vírus”) ou a um insecto (ex: broca do milho).

Para que seja possível a obtenção de plantas transgénicas é necessária a utilização de técnicas de biologia molecular que permitem a construção de vectores adequados à expressão em plantas de sequências codificantes provenientes de organismos de diferentes reinos. A utilização de promotores activos em plantas, constitutivos (como o promotor 35S do vírus do mosaico da couve flor) ou indutíveis, como o Rab17 do milho (respondendo ao stress hídrico), é assim necessária.

A verificação da integração das sequências é, regra geral, efectuada por amplificação por PCR, utilizando-se iniciadores de amplificação específicos para o efeito, sendo necessária a sua confirmação com outras técnicas, como por exemplo a utilização de uma sonda marcada para visualização citogenética do local de inserção e do número de cópias introduzidas. Esta verificação não confirma, no entanto, o êxito do processo, visto ser necessário confirmar a acumulação da proteína e a sua funcionalidade. A acumulação pode ser verificada ou por medição de uma actividade (caso se trate de uma enzima) ou por reacção anticorpo/antígeno, normalmente com recurso à técnica de ELISA.

A funcionalidade da modificação introduzida é a prova essencial em todo o processo. Esta verificação implica por um lado a confirmação da aquisição da modificação pretendida, observável através da avaliação fisiológica, agronómica ou industrial, e por outro a verificação da manutenção da característica nas gerações subsequentes (quando a planta não é perene e a sua propagação se faz por cruzamento).

A engenharia genética permite ainda a sobre-expressão ou a supressão da expressão de genes. Relativamente à supressão da expressão foi relevante o desenvolvimento da tecnologia “anti-sense” que se baseia na transcrição de sequências dispostas na direcção oposta à que normalmente o gene é transcrito, dando a origem a cadeias de RNA complementares das cadeias “sense”, capazes de hibridar com estas, induzindo a síntese de RNAses específicas capazes de degradar RNAs de cadeia dupla. O refinamento desta técnica deu origem à tecnologia de interferência, onde vectores transportam parte da sequência codificante nas duas direcções, separada por um espaçador, que quando transcritos originam a acumulação de RNA de cadeia dupla.

A adaptação de outras metodologias da biologia molecular como a aplicação de marcadores moleculares genéticos possibilita aumentar significativamente a eficácia e a velocidade dos programas de selecção e melhoramento de cereais, hortícolas e plantas florestais. Os marcadores moleculares (específicos ou aleatórios, dominantes

ou co-dominantes) permitem conhecer a diversidade genética disponível e desenvolver associações com características agronómicas importantes, por exemplo através da descoberta de locus de características quantitativas (Quantitative Trait Loci – QTL).

Os primeiros marcadores moleculares desenvolvidos basearam-se na identificação de polimorfismos em proteínas e isoenzimas, por diferenças de migração em electroforese desnaturante ou isoelectrofocagem. O desenvolvimento da biologia molecular permitiu o desenvolvimento de marcadores moleculares baseados no DNA. O número de técnicas descritas não cessa de aumentar, mas pode ser reunida em três grandes grupos: RFLP (polimorfismos de tamanho em fragmentos de restrição), MAAP (perfis múltiplos de amplificação arbitrária) e STS ou SSLP (polimorfismos de longitude em sequencias conhecidas). Os RFLP baseiam-se no desenvolvimento de perfis de fragmentos de DNA de diferentes pesos moleculares a partir da digestão do DNA total de um organismo com enzimas de restrição e a sua marcação com sondas de nucleotídicas. As restantes técnicas baseiam-se na ampliação de zonas do genoma com recurso à reacção de polimerase em cadeia (PCR) e à utilização de oligonucleótidos iniciadores de amplificação.

Os marcadores moleculares podem ser utilizados nos seguintes aspectos do melhoramento vegetal: estimação de distâncias genéticas entre populações, variedades, linhas puras e híbridos; identificação e distinção de variedades, linhas puras e híbridos para certificação; estabelecimento de relações de parentesco entre linhas e variedades, para estudos genéticos e assistir a cruzamentos; localização e identificação de genes com efeitos qualitativos; localização e identificação de QTL.

Muitas das características agronómicas importantes expressam-se numa descendência não através da sua distribuição em classes fenotípicas discretas (qualitativamente), mas sim através de uma variação contínua (quantitativamente), tornando impossível o uso directo da aproximação mendeliana para avaliar a sua transferência à descendência. Esta dificuldade tem vindo a ser ultrapassada com uso de marcadores moleculares. Sendo muito numerosos e fenotipicamente neutros, os marcadores moleculares têm permitido o desenvolvimento de mapas genéticos saturados. Estes mapas têm sido importantes na localização de *loci* genéticos que controlam características agronómicas como a produtividade e a tolerância ao stress hídrico e na selecção assistida por marcadores em programas de melhoramento.

A detecção de QTL baseia-se no estabelecimento de correlações entre a herança de uma característica em estudo e um ou mais marcadores genéticos. Para que seja possível a detecção de QTL é necessário que as marcas moleculares estejam em desequilíbrio de ligação com os alelos segregantes nos loci que influenciam as

características fenotípicas em estudo. Para este fim são utilizados cruzamentos entre linhas parentais isogénicas contrastantes quanto às características em estudo, para a produção de populações F2 segregantes onde as características e os marcadores são avaliados. Podem também ser utilizados retro-cruzamentos, populações homozigóticas de di-haplóides, e ainda a análise directa de um número elevado de linhas isogénicas. Finalmente, é necessário que a variação fenotípica avaliada seja independente dos efeitos ambientais.

Recentemente tem vindo a desenvolver-se técnicas de associação directa entre marcadores moleculares e características quantitativas que pretendem evitar a necessidade de populações segregantes (que podem ser difíceis de obter, pois implicam cruzamentos controlados). A utilização de uma nova classe de marcadores moleculares os “single nucleotide polymorphisms” (SNPs), sobretudo os localizados em regiões codificantes ou controladoras da expressão génica, permitirá o desenvolvimento de novas metodologias para o reconhecimento precoce das características de um determinado genótipo.

A biotecnologia de plantas aplica-se também à produção de fármacos, aromas e perfumes. As culturas de células indiferenciadas em suspensão e as culturas de raízes transgénicas (“hairy roots”), estas obtidas por modificação genética com *Agrobacterium ryzogenes*, têm sido desenvolvidas para serem cultivadas em larga escala, em fermentadores tradicionais (tipo “batch”) ou mais sofisticados (tipo tambor rotativo) ou ainda em reactores imobilizados, de forma a maximizar a produção e a recuperação de produtos específicos. Estas metodologias envolvem não só a selecção de linhas hiper-produtoras estáveis, mas também o desenho de meios de cultura que induzam a produção dos componentes desejados (na maioria dos casos metabolitos secundários, ou compostos que só se acumulam em situações de stress), e ainda o desenho de fermentadores com as características adequadas ao crescimento de células vegetais, cujas exigências em termos de necessidades em oxigénio e sensibilidade à tensão de corte são bem distintas das dos microorganismos.

Muitos acreditam que a utilização das técnicas da biologia molecular e da genómica são determinantes para ultrapassar o desafio de garantir a segurança e a qualidade alimentar no mundo actual. Estas tecnologias melhoram significativamente os processos existentes, alterando os métodos de selecção de probabilísticos para determinísticos com um aumento evidente na eficiência da selecção, permitindo uma predição estatística das melhorias a obter e a utilização de genes de interesse, aumentando a capacidade de sucesso de 1% para 10% com uma redução de 1 a 2 anos no processo global de melhoramento

No entanto a aplicação destes processos às plantas nem sempre tem sido visto como um progresso, e para alguns constitui mesmo uma séria ameaça, quer para a garantia da inocuidade dos alimentos e compostos produzidos, quer para a manutenção da biodiversidade vegetal, quer ainda para a manutenção da qualidade do ambiente. Na avaliação dos benefícios ou malefícios da utilização da biotecnologia vegetal cruzam-se diferentes perspectivas sócio-económicas, políticas e morais, que não podem ser ignoradas. O reconhecimento profundo das potencialidades e limitações técnicas e científicas desta tecnologia são fundamentais para uma avaliação cuidada dos seus impactos num futuro próximo.

Pedro Fevereiro