

Jorge M. Canhoto

Biotecnologia Vegetal

da Clonagem de Plantas
à Transformação Genética

(Página deixada propositadamente em branco)



E N S I N O

EDIÇÃO

Imprensa da Universidade de Coimbra
Email: imprensauc@ci.uc.pt
URL: http://www.uc.pt/imprensa_uc
Vendas online <http://www.livrariadaimprensa.com>

CONCEPÇÃO GRÁFICA

António Barros

INFOGRAFIA

Carlos Costa
Imprensa da Universidade de Coimbra

EXECUÇÃO GRÁFICA

Norprint

ISBN

978-989-26-0065-9

ISBN Digital

978-989-26-0404-6

DOI

<http://dx.doi.org/10.14195/978-989-26-0404-6>

DEPÓSITO LEGAL

317984/10

Jorge M. Canhoto

Biotecnologia Vegetal

da Clonagem de Plantas
à Transformação Genética

À Cristina e ao Diogo por serem a Cristina e o Diogo

AGRADECIMENTOS

Muito daquilo que aprendi como cientista e pessoa devo-o à Dra. Ludovina Lopes e ao Professor Doutor Gil Cruz que me ensinaram a dar os primeiros passos no laboratório. Num ambiente académico em que os fins justificam, muitas vezes, os meios a sua conduta foi sempre, para mim, um exemplo e inspiração. Para não falar nos almoços...Este manual tem muito daquilo que me ensinaram e não há maneira de lhes agradecer.

As experiências na área da biotecnologia envolvem a preparação de muitos meios de cultura e de recursos laboratoriais. Não consigo imaginar um laboratório sem a D. Eulália Rosa. Sem ela simplesmente o laboratório não funciona. Por mais de 20 anos de colaboração e amizade um agradecimento muito especial.

Aos meus alunos de doutoramento e mestrado agradeço a possibilidade que me dão de fazer investigação por interpostas pessoas. A carreira académica universitária envolve um rol infindável de burocracias, e reuniões entediantes que se traduzem em longos períodos de inutilidade absoluta. O contacto com os alunos compensa, em muito, esses momentos deprimentes. Vê-los crescer como pessoas e cientistas tem sido o mais gratificante da minha actividade como professor. A eles devo também muitos dos dados experimentais que suportam este trabalho e algumas das fotografias utilizadas.

Aos meus colegas do antigo Departamento de Botânica (actual Departamento de Ciências da Vida) e do Centro de Estudos Farmacêuticos agradeço

o apoio que me têm dado e a disponibilidade que sempre manifestaram para me ajudar. Ao meu colega Manuel Tomé agradeço muita da informação para a elaboração do capítulo relativo aos protoplastos bem como algumas das figuras que me permitiu utilizar.

Uma palavra de reconhecimento para os funcionários do antigo Departamento de Botânica. A sua ajuda tem excedido em muito as obrigações profissionais a que estão sujeitos e tem facilitado a minha vida muito para além do que seria imaginável.

Não poderia finalizar sem uma palavra de apreço ao Professor Doutor João Gouveia Monteiro e à sua equipa da Imprensa da Universidade de Coimbra pela confiança que em mim depositaram e pela interminável paciência que tiveram em tolerar os sucessivos atrasos na entrega do manuscrito. Prometo para a próxima ser mais cumpridor.

SUMÁRIO

Apresentação.....	13
Lista de abreviaturas.....	16
Capítulo 1 – Introdução Geral.....	19
1.1. O problema da alimentação à escala planetária.....	19
1.2. O conceito de Biotecnologia.....	27
1.3. A utilização das plantas e o aparecimento da agricultura	28
1.4. Perspectiva histórica e métodos de estudo em Biotecnologia Vegetal	34
Capítulo 2 – Cultura <i>in vitro</i> de plantas.....	43
2.1. Introdução	43
2.2. Totipotência da célula vegetal	44
2.3. Multiplicação vegetativa	49
2.4. Métodos convencionais de multiplicação vegetativa	50
2.5. A cultura <i>in vitro</i> de plantas.....	53
2.5.1. Condições de cultura.....	55
2.5.1.1. Os recipientes.....	55
2.5.1.2. Assepsia.....	55
2.5.1.3. Factores físicos	57
2.5.2. O meio de cultura	57
2.5.2.1. Elementos minerais.....	58
2.5.2.2. Vitaminas e aminoácidos	59
2.5.2.3. Outros compostos.....	60
2.5.2.4. Hidratos de carbono.....	62
2.5.2.5. Hormonas vegetais.....	62
Auxinas	64
Citocininas.....	66
Giberelinas	68
Ácido abscísico.....	70
Etileno	71

Capítulo 3 – Clonagem de plantas – proliferação de meristemas e organogénese.....	75
3.1. Introdução	75
3.2. Tipos de meristemas	76
3.2.1. Meristema apical da raiz	79
3.2.2. Meristema apical do caule	80
3.3. Objectivos da cultura de meristemas caulinares	82
3.3.1. Funcionamento do meristema	83
3.3.2. Propagação em larga escala	84
3.3.2.1. Preparação da planta mãe.....	85
3.3.2.2. Iniciação e estabelecimento das culturas.....	86
3.3.2.3. Multiplicação	88
3.3.2.4. Alongamento e enraizamento dos rebentos.....	90
3.3.2.5. Aclimatização das plantas regeneradas.....	94
3.3.3. Multiplicação de plantas isentas de vírus	96
3.3.4. Conservação de germoplasma.....	99
3.4. Vantagens da cultura de meristemas	100
3.5. Limitações da técnica.....	100
3.6. Indução de organogénese.....	103
Capítulo 4 – Embriogénese somática.....	109
4.1. Introdução	109
4.2. Embriogénese zigótica	110
4.3. Embriogénese não zigótica	116
4.4. Embriogénese somática.....	117
4.4.1. Tipos de embriogénese somática	120
4.4.2. Fases da regeneração de plantas por embriogénese somática	124
4.4.2.1. Indução	124
4.4.2.2. Desenvolvimento e maturação dos embriões somáticos.....	128
4.4.2.3. Germinação dos embriões somáticos e conversão em plantas	134
4.5. “Sementes artificiais”.....	138
4.6. Estudos genéticos, bioquímicos e moleculares.....	140

4.7. Considerações finais.....	148
Capítulo 5 – Embriogénese polínica e obtenção de haplóides.....	151
5.1. Introdução.....	151
5.2. Ocorrência natural de haplóides.....	153
5.3. Métodos de obtenção de haplóides.....	155
5.4. Embriogénese polínica.....	157
5.4.1. Desenvolvimento do pólen.....	159
5.4.2. Vias androgénicas.....	163
5.4.3. Dimorfismo polínico e culturas <i>ab initio</i>	167
5.4.4. Factores que afectam a indução de androgénese.....	169
5.5. Níveis de ploidia das plantas regeneradas.....	175
5.6. Duplicação do número de cromossomas dos haplóides.....	178
5.6.1. Utilização de colchicina.....	179
5.6.2. Duplicação via formação de um calo.....	179
5.7. Os haplóides e o melhoramento vegetal.....	181
5.8. Problemas e limitações.....	183
5.8.1. Albinismo.....	183
5.8.2. Variabilidade das plantas regeneradas.....	188
Capítulo 6 – Suspensões celulares e metabolitos secundários.....	191
6.1. Introdução.....	191
6.2. Obtenção de suspensões celulares.....	192
6.3. Medidas de viabilidade e crescimento celular.....	196
6.4. Suspensões celulares e produção de metabolitos secundários.....	198
6.5. Optimização de rendimentos.....	209
6.5.1. Adição de precursores.....	209
6.5.2. Biotransformação.....	209
6.5.3. Elicitação.....	211
6.5.4. Selecção de linhas celulares.....	212
6.6. Transformação genética de plantas e produção de metabolitos secundários.....	213
6.6.1. Produção de metabolitos em <i>hairy roots</i>	215
6.7. Produção de metabolitos noutros órgãos.....	217
6.8. Sistemas de cultura immobilizados.....	217
6.9. Considerações finais.....	219

Capítulo 7 – Protoplastos e hibridação somática	221
7.1. Introdução	221
7.2. Breve resenha histórica.....	224
7.3. Isolamento de protoplastos	225
7.4. Purificação de protoplastos.....	228
7.5. Contagem e determinação da viabilidade	230
7.6. Cultura de protoplastos.....	232
7.7. Evolução das culturas.....	234
7.8. Fusão de protoplastos	236
7.9. Produtos de fusão.....	239
7.10. Selecção dos produtos de fusão e caracterização das plantas obtidas	243
7.11. Aplicações e limitações da utilização de protoplastos.....	249
Capítulo 8 – Transformação genética de plantas	253
8.1. Introdução	253
8.2. Transferência de genes por cruzamento e selecção	255
8.3. Plantas geneticamente modificadas por engenharia genética	261
8.4. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	264
8.5. Mecanismo de infecção das células vegetais com <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	271
8.5.1. Ligação das bactérias às células vegetais	271
8.5.2. Indução dos genes <i>vir</i>	272
8.5.3. Processamento do T-DNA.....	274
8.5.4. Transporte e integração do T-DNA nas células vegetais ...	275
8.6. A utilização de <i>A. tumefaciens</i> na transformação experimental de plantas	279
8.7. Genes quiméricos.....	282
8.8. A transformação genética de plantas com <i>A. tumefaciens</i>	290
8.9. Outros métodos de transformação	293
8.10. Transformação de organitos citoplasmáticos.....	299
8.11. Expressão dos genes nas plantas	303
Capítulo 9 – Plantas com novas características obtidas por transformação genética	307
9.1. Introdução	307

9.2. Plantas tolerantes a herbicidas.....	309
9.3. Plantas resistentes a insectos	313
9.4. Plantas resistentes a agentes patogénicos.....	318
9.5. Plantas resistentes a factores abióticos.....	322
9.6. Produção de compostos de interesse.....	326
9.7. Alteração das propriedades dos alimentos.....	332
9.8. Alterações no amadurecimento dos frutos	339
9.9. Alterações na coloração das flores.....	344
9.10. Alterações nos teores de lenhina	348
9.11. Rendimento das culturas	350
9.12. Tecnologia <i>terminator</i>	352
9.13. Outras características.....	355
Capítulo 10 – Impacto das plantas geneticamente modificadas.....	359
10.1. Introdução	359
10.2. Eventuais impactos em termos de saúde	361
10.3. Eventuais impactos ambientais	370
10.4. Eventuais impactos sócio-económicos	377
Bibliografia.....	383
Endereços internet.....	405

(Página deixada propositadamente em branco)

APRESENTAÇÃO

Este livro tem uma história. A história começa em 1995 quando após a conclusão do doutoramento propus à comissão científica do então Departamento de Botânica a criação de uma disciplina de opção na área da Biotecnologia Vegetal. A proposta foi aceite e a disciplina foi incluída nos planos de curso das Licenciaturas em Biologia e Bioquímica Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra (FCTUC), com o nome de Introdução à Biotecnologia Vegetal tendo funcionado, pela primeira vez, no ano lectivo de 1996/97 e, com a excepção de uma interrupção no ano lectivo de 2002/03, de forma ininterrupta até ao presente. Na altura iniciavam-se as primeiras culturas de plantas geneticamente modificadas com alguma expressão em termos globais e a bibliografia disponível para os alunos era muito limitada. Para além disso, ela encontrava-se dispersa por diferentes livros e essencialmente disponível em língua inglesa. Este contexto levou-me a elaborar uma sebenta onde reuni um conjunto de informação sobre os diferentes temas abordados nas aulas.

Numa época em que a ciência evolui de forma tão acelerada a sebenta foi-se adaptando a novas realidades. A componente mais relacionada com a clonagem de plantas reduziu-se enquanto outros temas, como a obtenção de plantas haplóides e a engenharia genética de plantas ganharam protagonismo, muito em função do seu maior impacto em termos práticos no melhoramento das plantas. A minha inclusão no Centro de Estudos Farmacêuticos da Universidade de Coimbra permitiu-me contactar com outras realidades e realizar alguma investigação na área dos metabolitos secundários das plantas, actualmente mais designados como produtos naturais.

O grande potencial da biotecnologia nesta área começa agora a ser explorado de forma mais consistente. Como consequência esta área do conhecimento passou a ter um peso mais alargado no funcionamento da disciplina e foi também incorporada na sebenta.

O resultado desta evolução é o livro actual. No primeiro capítulo é feita uma introdução geral à biotecnologia e à sua importância no melhoramento de plantas. Os fundamentos da cultura *in vitro* de células, tecidos ou órgãos vegetais são analisados no capítulo 2. O capítulo 3 trata das técnicas de clonagem *in vitro* relacionadas com a proliferação e formação *de novo* de meristemas. A embriogénese somática, também um método de clonagem mas igualmente com uma importância determinante em estudos de desenvolvimento embrionário é tratada no capítulo 4. As técnicas de obtenção de plantas haplóides e a sua importância no desenvolvimento de novas variedades são analisadas no capítulo 5 com um destaque particular para o potencial embriogénico do pólen. O capítulo 6 é sobre a cultura de células e o seu potencial de produção de metabolitos secundários. O interesse industrial destes compostos é também analisado tal como o potencial das raízes na formação de metabolitos secundários. O capítulo 7 é sobre os métodos de obtenção de protoplastos e o potencial das células desprovidas de parede na obtenção de novas combinações genéticas, os chamados híbridos somáticos. As técnicas de transformação genética de células vegetais, com particular destaque para o mecanismo de transferência de genes utilizando *Agrobacterium tumefaciens* são tratadas no capítulo 8. Segue-se um capítulo onde são indicados vários exemplos de plantas com novas características obtidas por transformação genética. Essas novas características vão desde resistência a insectos ou herbicidas à produção de biofármacos. Finalmente, o último capítulo (10) tem como objectivo clarificar alguns conceitos que erroneamente têm sido divulgados na opinião pública lançando a confusão sobre as plantas geneticamente modificadas. No final é fornecida uma lista onde se discriminam os livros, artigos e teses que serviram de base para a elaboração deste livro bem como uma lista de endereços internet onde se pode obter informação complementar sobre os assuntos aqui abordados.

Os capítulos 2 a 9 são essencialmente técnicos. Nos capítulos 1 e 10 são referidos alguns assuntos mais ou menos controversos relacionados com

as plantas geneticamente modificadas e onde a minha opinião está expressa. Como é de esperar essa opinião apenas me compromete a mim.

O livro serve de suporte à actual disciplina de Biotecnologia Vegetal do curso de Biologia da FCTUC podendo ser usado em disciplinas similares de outras instituições do ensino superior. A sua preparação teve também o propósito de chegar a outros públicos alvo nomeadamente pessoal técnico ligado a empresas agrícolas, hortícolas ou florestais, professores do ensino secundário da área da biologia, pessoas cuja actividade profissional esteja de algum modo ligada ao melhoramento de plantas e mesmo o cidadão comum que apenas pretende manter-se informado sobre este assunto em particular. Nesta perspectiva optou-se, em algumas situações, por utilizar uma linguagem menos técnica que fosse de mais fácil acesso a pessoas sem grande formação específica na área.

Um livro científico é como um *gadget*. Quando se leva para casa já está desactualizado. O autor (jorgecan@ci.uc.pt) agradece antecipadamente todas as correcções e sugestões que possam melhorar futuras edições desta publicação.

LISTA DE ABREVIATURAS

- 16
- 2,4-D – Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
2iP - Isopenteniladenina
ABA – Ácido abscísico
ACC – Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
AFLP – *Amplified Fragment Length Polymorphism*
AGPs – Proteínas de arabinogalactano
atm – Atmosfera (unidade de pressão)
BA – Benziladenina
BY-2 – Cultivar de tabaco *Bright Yellow - 2*
CaMV 35S – Promotor do RNA ribossômico 35S do vírus da couve-flor
CIMMYT – *International Maize and Wheat Improvement Center*
CMS, cms – Esterilidade masculina do citoplasma
CRY – Proteínas produzidas por *Bacillus thuringiensis*
Da – Dalton
DFR – Dihidroflavonol-4-reductase
EFSA – *European Food and Safety Authority*
EP – Proteína extracelular
EPA – *Environmental Protection Agency*
EPSP – 5-enolpiruvil chiquimato-3-fosfato
EPSPS – 5-enolpiruvil chiquimato-3-fosfato sintetase
FAO – Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação
FDA – Diacetato de fluoresceína
FDA – *Food and Drug Administration*
GA – Giberelina
GA₃ – Ácido giberélico
GFP – *Green fluorescent protein*
GGPP – Geranyl geranyl difosfato
GUS – Gene da β-glucuronidase
h – Hora
ha – Hectare
HD – Haplóide duplo
Hz – Hertz
IAA – Ácido 3-indol acético
IBA – Ácido 3-indol butírico
KIN – cinetina
LCOs – Lipoquitoligossacarídeos

LEA – *Late embryogenesis abundant protein* (proteínas abundantes em fases tardias da embriogénese)

min. – Minuto

MS – Meio de cultura de Murashige & Skoog (1962)

NAA – Ácido 1-naftaleno acético

nptII – Gene da neomicina fosfotransferase II

°C – Grau Celsius

OGM – Organismo geneticamente modificado

PAA – Ácido fenil acético

PAL – Fenilalanina amónia liase

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PEG – Polietilenoglicol

PEP – Fosfoenolpiruvato

PG – Poligalacturonase

PGM – Planta geneticamente modificada

PPEC – Fosfoenolpiruvato carboxilase

PTT – Fosfinotricina

PVC – *Packed Cell Volume*

QTL – *Quantitative trait loci*

RAM – Meristema apical da raiz

RAPDs – *Random Amplified Polymorphic DNA*

RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RIP – Proteína inibidora dos ribossomas

RNAi – RNA de interferência

ROS – Espécies reactivas de oxigénio

rpm – Rotações por minuto

SAM – S-adenosil metionina ou meristema apical do caule

SEM – Etil metano sulfonato

SOD – Superóxido dismutase

T-DNA – DNA de transferência

USA – Estados Unidos da América

USDA – Departamento de Agricultura dos Estados Unidos

Nota: nesta lista foram incluídas apenas as abreviaturas utilizadas com mais frequência. Quando uma abreviatura foi utilizada uma única vez, o significado da abreviatura é dado no texto. Em algumas situações optou-se por manter a designação em inglês ou por dificuldades de tradução ou por ser a designação mais comum na comunidade científica.

(Página deixada propositadamente em branco)

CAP. 1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. O problema da alimentação à escala planetária

Abundance does not spread; famine does (Provérbio Zulu).

Segundo dados recentes da FAO (Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação), o número de pessoas com fome no nosso planeta ultrapassou, em 2009, os mil milhões de habitantes. Num planeta com os actuais 6700 milhões de pessoas isto reflecte uma sinistra realidade: uma em cada sete pessoas não consegue suprir as necessidades mais básicas de um ser humano, ou seja, ter uma alimentação condigna. Estes dados são ainda mais chocantes se nos lembrarmos que, em 2006, esse valor rondava os 800 milhões de pessoas, um número ainda assim aterrador, mas que se julgava com tendência para diminuir.

Por vivermos no chamado mundo ocidental, onde os problemas de alimentação são, na maior parte dos casos marginais, e muitas vezes têm mais a ver com o excesso ou com a qualidade dos alimentos do que com a sua falta, temos tendência a esquecer esta dura realidade. A este aumento do número de pessoas que vivem abaixo do limiar de subsistência não será alheia a crise do sistema financeiro e a conseqüente crise económica e social dos últimos anos que afectou, de forma mais dramática, os países menos desenvolvidos, em particular na Ásia e em África. O problema tem, no entanto, raízes mais profundas. Entre o final da segunda Guerra Mundial e o início dos anos 90 do século passado, a produção de alimentos e, em particular de cereais, cresceu de forma impressionante, especialmente na

América Latina e na Ásia. Para se ter uma ideia deste aumento da produção basta referir que, em 1950, a produção de cereais por pessoa rondava os 275 kg enquanto em 1980 esse valor tinha subido para 370 kg por pessoa, um aumento de cerca de 35%. Seguindo uma tendência semelhante, o índice de produção de alimentos passou de 84 para 107 entre 1960 e 2000 (Fig. 1).

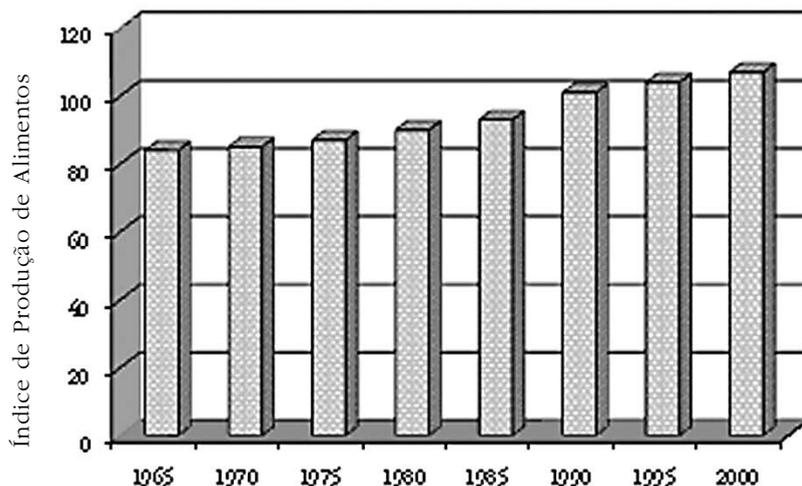


Figura 1. Evolução do índice de produção de alimentos nos últimos 40 anos do século XX. Este índice representa a produção de alimentos por pessoa. Fonte: FAO.

No mesmo período, a população mundial quase duplicou, passando de cerca de 3 mil milhões para próximo de 6 mil milhões no ano 2000, e situando-se actualmente perto dos 7 mil milhões de habitantes (Fig. 2), o que mostra o enorme esforço que foi feito em termos de produção alimentar. Este período de intenso crescimento da produção agrícola ficou conhecido como Revolução Verde e permitiu continuar a alimentar uma população que, entre o final da segunda Guerra Mundial e os nossos dias, quase triplicou. Em consequência deste aumento da produção, países que eram importadores de cereais tornaram-se auto-suficientes e, em muitos casos, passaram a exportar o excesso de produção. Pelo contrário,

em África, por razões várias e cuja análise escapa ao âmbito deste trabalho, a Revolução Verde não teve qualquer impacto e a agricultura permaneceu uma actividade pouco eficiente e de baixa produtividade sendo, com algumas excepções, praticada em pequena escala e manifestamente insuficiente para alimentar uma população em contínuo crescimento.

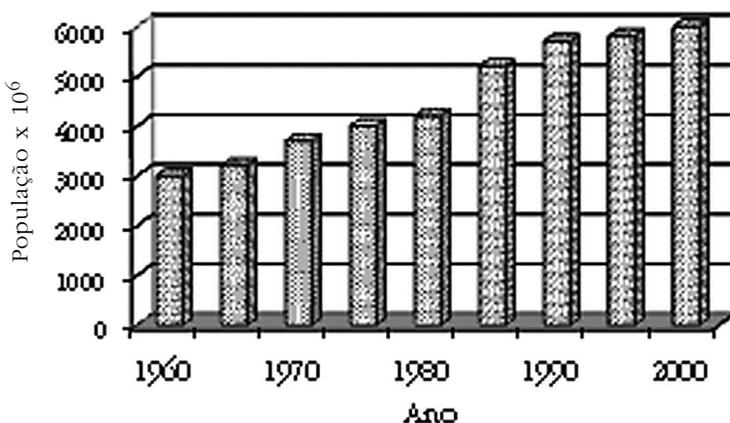


Figura 2. Evolução do número de habitantes no planeta entre 1960 e 2000.
Fonte: Nações Unidas.

O súbito e consistente aumento da produção agrícola ficou a dever-se essencialmente a três factores. Em primeiro lugar, a um aumento da área cultivada. Em alguns países este aumento foi conseguido à custa da destruição das florestas ou de outros ecossistemas com os consequentes impactos negativos na perda de diversidade biológica. Em segundo lugar houve uma considerável melhoria das técnicas agrícolas incluindo um aumento das áreas irrigadas. A utilização de fertilizantes, pesticidas e herbicidas associada a uma melhor qualidade da maquinaria agrícola permitiu uma agricultura mais eficaz. Finalmente, e certamente o factor não menos importante verificou-se um aumento da produtividade das plantas em particular daquelas espécies

que são mais utilizadas na alimentação. A criação de variedades semi-anãs, de variedades menos sensíveis ao fotoperíodo e com um maior quantidade de grãos, resultantes em grande parte dos trabalhos pioneiros de Norman Borlaug, um agrónomo americano prémio Nobel da Paz em 1970 recentemente falecido, e cujos trabalhos estiveram na base da Revolução Verde, permitiu ganhos de produtividade impressionantes. Por exemplo, em 1950 a área necessária para produzir uma tonelada de arroz era de 0,3 hectares. Meio século depois, em 2000, a mesma quantidade de arroz podia ser produzido em 0,08 hectares, uma área cerca de quatro vezes inferior (Fig. 3).

Esta consistente melhoria na produção agrícola parecia ter afastado definitivamente o fantasma de Malthus, o economista que inspirou Darwin a elaborar a teoria da evolução, e que preconizava que a produção alimentar, a crescer de forma aritmética seria incapaz de suportar o crescimento geométrico da população humana. Os receios de Malthus nunca se verificaram mas crises alimentares ocorreram frequentemente ao longo da história. Como exemplos podem citar-se a fome da batata, na Irlanda, e o *dust bowl*, nos Estados Unidos da América, nos anos trinta do século passado. A primeira resultante da destruição da cultura da batateira pelo fungo *Phytophthora infestans*, em meados do século XIX, causou a morte de milhares de Irlandeses e um fluxo migratório assinalável para os Estados Unidos com importantes implicações sócio-económicas. A segunda, que se fez sentir nas planícies centrais dos Estados Unidos e do Canadá foi o resultado de períodos alargados de seca que, associados a uma agricultura baseada numa forte componente tecnológica conduziram a uma rápida degradação dos solos que se tornaram impraticáveis em termos agrícolas. Estes exemplos são bem ilustrativos e constituem importantes ensinamentos para os dias de hoje. Uma agricultura demasiado dependente de uma única espécie, como aconteceu na Irlanda, ou que não promova uma gestão correcta dos solos e do ambiente envolvente é uma agricultura de risco.

Em meados de 2008 os preços dos alimentos e em particular dos cereais mais cultivados (trigo, milho e arroz), atingiram preços elevadíssimos nos mercados mundiais. Para além disso, ocorreram outras situações preocupantes. Assim, tem-se verificado um aumento acentuado do consumo de carne em parte derivado do aumento do nível de vida em países como

a China e a Índia. Como é conhecido, um aumento do consumo de carne tem como consequência um aumento do consumo de cereais uma vez que a alimentação animal está muito dependente da produção vegetal e, em média, a produção de 1 kg de carne implica a produção de 3 – 5 kg de cereais. Outro aspecto a reter resulta do facto de em sete dos últimos nove

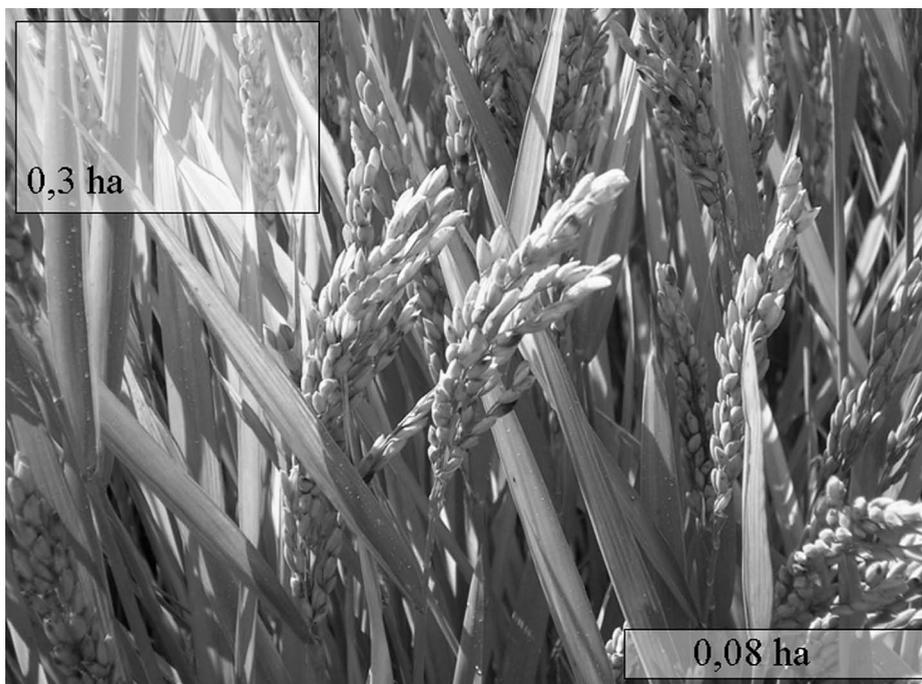


Figura 3. Área necessária para produzir uma tonelada de arroz. O rectângulo no canto superior esquerdo mostra a área necessária para produzir uma tonelada de arroz em 1950. No ano 2000 (canto inferior direito) a mesma quantidade de arroz podia ser produzida em 0,08 ha.
Nota: um ha são 10.000 m² uma área ligeiramente superior a um campo de futebol.

anos o consumo global de cereais ter ultrapassado a produção. Finalmente, deve referir-se que, de 2006 a 2008, as reservas alimentares atingiram os valores mais baixos de sempre o que significa que existem menos alimentos para fazer face a emergências resultantes de cheias, secas ou destruição das culturas por doenças em diferentes zonas do globo. Estes dados fizeram soar o alarme à escala global levando a um aumento na procura de alimentos e também à compra de terrenos por determinados países noutras regiões do globo de forma a assegurar a sua independência alimentar. Como seria

de esperar, a procura de alimentos nos mercados mundiais fez disparar os preços e causou distúrbios sociais em países mais pobres onde grande parte dos alimentos é importada. Outros factores contribuíram também, directa ou indirectamente, para o aumento dos preços verificado. Entre eles pode referir-se o aumento consistente do preço dos combustíveis fósseis, o desinvestimento dos governos na agricultura e no melhoramento de plantas, a utilização de plantas na produção de biocombustíveis, a existência de uma agricultura fortemente subsidiada na Europa e nos Estados Unidos dificultando o acesso a esses mercados de países terceiros e a diminuição das áreas potencialmente utilizadas na agricultura. Se juntarmos a estes factores a continuação do aumento da população, que se estima poder vir a atingir os 10.000 milhões em 2050, o aumento da esperança média de vida e a degradação de muitas áreas agrícolas com a consequente perda de produção pode afirmar-se que estamos perante uma equação de difícil resolução. De facto, ao contrário do que tem sido difundido de forma exaustiva nos últimos anos, o principal problema do nosso planeta não parece ser o aquecimento global mas sim como alimentar, com áreas de cultura cada vez mais reduzidas, uma população cujo crescimento, nos últimos 100 anos, teve mais de bacteriano do que de humano, como referiu o famoso biólogo E. O. Wilson. De acordo com as estimativas mais recentes, e a manter-se o crescimento do nível de vida em países como o Brasil, a China, a Índia e a Rússia será necessário que, em meados deste século, a produção de alimentos tenha aumentado cerca de 50% em relação àquilo que se verifica actualmente. Como resolver este problema? São possíveis diferentes abordagens. Alguns países como a China, têm seguido políticas demográficas restritivas que permitiram controlar o crescimento da população. No entanto, estamos ainda longe da taxa ideal de 2,1 filhos por casal, situando-se esse valor em cerca de 2,6. Uma mudança no consumo alimentar tem também sido fomentada por muitos governos no sentido de diminuir o consumo de carne animal mas essas políticas são de difícil implementação em países em desenvolvimento onde as populações aspiram a padrões de vida do tipo ocidental. Também é reconhecido que em muitas zonas do globo o problema da fome poderia ser resolvido através da criação de condições sociais, económicas e políticas que permitissem um mais fácil acesso

da população aos alimentos sem ser necessário um grande aumento da produção. Todavia, como todos os dias podemos constatar, não parece que esta realidade se vá alterar significativamente nos próximos anos. É também verdade, que a manter-se o actual crescimento da população, com a consequente diminuição das áreas de cultivo devido à erosão, ao crescimento urbano e à crescente escassez de recursos se torna imperioso, num futuro próximo, produzir cada vez mais, em menos terra e com menos água.

Torna-se assim prioritário apostar em tecnologias que promovam uma maior eficácia das produções agrícolas permitindo não apenas a criação de variedades mais produtivas mas que sejam também mais resistentes aos factores bióticos e abióticos que provocam danos consideráveis nas culturas. Foi a criação de génotipos cada vez mais eficientes que permitiu que a produção agrícola tivesse acompanhado o crescimento da produção. Mesmo que fosse possível aumentar as áreas de cultura sem os constrangimentos que o nosso planeta impõe, um aumento da produção baseado no aumento da área de cultura dificilmente seria conseguido e seria ambientalmente insustentável. Para se ter uma ideia do que isso implicaria basta referir que, de acordo com Chrispeels e Sadava (2003), com os rendimentos agrícolas de 1960 seriam necessários mais 300 milhões de hectares de terra arável para manter os níveis de produção actuais. Para além disso, desde os anos 60, estima-se que os ganhos de produção resultaram, em cerca de 95%, do aumento dos rendimentos e apenas em 5% do aumento das áreas de cultura. Talvez possa parecer um pouco estranho que uma actividade com profundas implicações ambientais, como é a actividade agrícola, possa contribuir para a redução da degradação ambiental mas estes dados mostram, como a situação ambiental seria certamente mais negativa que aquela que actualmente se verifica não fosse a consistente melhoria das variedades agrícolas.

É pois necessário recorrer a métodos mais eficazes de melhoramento de plantas capazes de permitir uma manipulação mais eficaz do genoma de forma a conseguir variedades cada vez mais produtivas e com um valor acrescentado em termos ambientais. A manipulação genética de plantas através das diferentes metodologias utilizadas no âmbito da Biotecnologia Vegetal pode contribuir não apenas para um aumento da produção através do desenvolvimento de plantas mais produtivas mas pode vir a ser também

uma maneira eficaz de reduzir os impactos ambientais relacionados com a actividade agrícola. Na realidade, a agricultura é responsável por cerca de 70% da água que a espécie humana utiliza nas suas diferentes actividades. Para além disso, a agricultura de irrigação ocupa cerca de 20% da área total dedicada à agricultura e é responsável por cerca de 42% da produção agrícola. O desenvolvimento de variedades mais tolerantes ao stresse hídrico ou ao stresse salino terá importantes reflexos na conservação dos recursos hídricos e poderá permitir a utilização de terras marginais na agricultura que actualmente, devido à reduzida produtividade que nelas se verifica, não podem ser utilizadas de forma eficaz. A actividade agrícola é também muito dependente da utilização de fertilizantes, herbicidas e pesticidas, qualquer deles, em maior ou menor grau, nocivo para o ambiente. Não sendo plausível antever a eliminação da utilização destes produtos sem prejuízos consideráveis em termos de produção, importa desenvolver mecanismos alternativos que permitam reduzir a sua aplicação. Também nesta perspectiva o desenvolvimento de genótipos mais eficazes na utilização de elementos minerais como o azoto e o fósforo e menos dependentes da aplicação de herbicidas e pesticidas como actualmente já se verifica, terá também o impacto assinalável na melhoria do ambiente.

O melhoramento de plantas, conseguido pelos métodos mais convencionais de cruzamento e selecção ou pelas modernas técnicas de Biotecnologia Vegetal não irá resolver todos os problemas sociais, económicos e ambientais resultantes da falta de alimentos. Esse é um assunto mais de natureza política do que biológica. No entanto, parece inquestionável que sem sistemas eficazes de produção agrícola o nosso futuro como espécie estará seriamente ameaçado e é nesta perspectiva que a Biotecnologia associada a sistemas integrados de protecção pode ajudar a criar um planeta mais justo e equilibrado, especialmente quando os países menos desenvolvidos tiverem acesso, de uma forma mais eficaz, a estas tecnologias tornando-se assim menos dependentes da ajuda humanitária externa. O potencial da Biotecnologia pode levar algumas pessoas a pensar que o engenho humano é capaz de superar todas as dificuldades que a nossa espécie e o planeta terão de enfrentar a médio e longo prazo. No entanto, não devemos ver a Biotecnologia como uma solução milagrosa que tudo irá resolver, pois

sendo ela uma tecnologia que depende dos seres vivos importa antes de tudo preservar o imenso potencial biológico que o nosso planeta nos oferece. Isto implica uma gestão cuidadosa e muito criteriosa dos recursos globais ou, para utilizar um figura de retórica muito do agrado dos políticos e dos burocratas de serviço, um desenvolvimento sustentável que permita um equilíbrio entre as necessidades básicas da população humana e a preservação da biosfera de forma a não comprometer as gerações futuras.

1.2. O conceito de Biotecnologia

De acordo com Chawla (2009), o termo Biotecnologia foi pela primeira vez utilizado por um engenheiro húngaro chamado Karl Ereky. No seu âmbito mais lato, a Biotecnologia pode ser definida como sendo o conjunto de tecnologias que permite a modificação ou a utilização dos organismos para a obtenção de novos produtos para fins práticos ou industriais. Deste modo, Biotecnologia Vegetal refere-se à manipulação das plantas para obtenção de novas características ou à sua utilização para obtenção de determinados produtos ou realização de determinadas funções. Dada a vasta gama de aplicações que a Biotecnologia pode ter, tem sido feita a sua divisão em diferentes ramos consoante os objectivos a alcançar. De facto, é ponto assente que nos próximos anos, o contributo da Biotecnologia Vegetal não se fará sentir apenas ao nível do aumento da produtividade agrícola, a chamada Biotecnologia Verde ou Biotecnologia Agrícola, uma espécie de ponte entre a Biologia e a Agricultura. Este tem sido o ramo da biotecnologia que mais desenvolvimento tem tido e cujos resultados são mais notórios. No entanto, a utilização de sistemas vegetais para a produção de metabolitos importantes para as indústrias farmacêutica ou a possibilidade de produção de anticorpos (planticorpos), hemoglobina e vacinas transgénicas, constituindo aquilo que recentemente se designou chamar por Biotecnologia Vermelha, terá também importantes repercussões no nosso modo de vida num futuro mais ou menos próximo. A aplicação da Biotecnologia a vários processos industriais, como sejam a produção de metabolitos secundários para as indústrias alimentares e de cosmética ou a utilização do potencial das plantas para a purificação de

solos e águas contaminadas (fitorremediação), são outras vertentes importantes do uso da biotecnologia, englobadas naquilo que se convencionou designar como Biotecnologia Branca. De referir ainda a chamada Biotecnologia Azul, para designar aplicações da Biotecnologia no âmbito dos recursos aquáticos, um tipo de aplicações mais relacionadas com a utilização de organismos animais ou de determinadas algas e que vai para além do âmbito desta disciplina.

Nos últimos anos, como consequência dos progressos da biologia molecular, e do interesse de políticos e da indústria farmacêutica por este campo do conhecimento, a Biotecnologia passou de uma área restrita de interesse académico direccionando-se, em grande parte, para a transformação genética de organismos ou para a modificação química da estrutura de determinadas moléculas, tornando-se numa tecnologia que movimentava anualmente muitos milhares de milhões de euros e que, em alguns países, deu origem a uma série de rentáveis empresas de base tecnológica. Para além disso, muitas empresas do sector agroquímico cedo se aperceberam do enorme potencial das técnicas biotecnológicas e têm vindo a investir fortemente nesta tecnologia com o objectivo de desenvolverem novos genótipos e produtos. Num mercado fortemente competitivo, e que começa a dar os primeiros passos, esperam-se muitos avanços nos próximos anos. Deste conglomerado de interesses surgiram importantes avanços com aplicações nos mais variados domínios, como sejam a produção de hormonas por bactérias (e.g. hormona do crescimento, insulina), o desenvolvimento de animais e plantas transgénicas (mais produtivas e/ou resistentes a doenças), o diagnóstico médico (isolamento de genes responsáveis por determinadas doenças, produção de anticorpos monoclonais, criação de sondas moleculares), a produção de vacinas (hepatite B), a produção de interferões, a produção de compostos vegetais de interesse farmacológico, agroalimentar ou de cosmética, a produção de energia por algas ou bactérias e a purificação de metais por microrganismos.

1.3. A utilização das plantas e o aparecimento da agricultura

As plantas, em conjunto com outros organismos produtores de energia constituem a base da vida na Terra tal como a conhecemos. Não surpreende

pois que os nossos antepassados se tenham apercebido do potencial das plantas não apenas como base da alimentação mas também para outras aplicações como o fabrico de utensílios, a produção de medicamentos (durante milhares de anos a medicina e a botânica foram ciências muito próximas) e a confecção de vestuário. Pode assim dizer-se que muito antes do aparecimento das primeiras sociedades agrícolas os seres humanos utilizavam as plantas para vários propósitos, sendo legítimo supor que possuíam conhecimentos botânicos empíricos, à semelhança do que se verifica com populações primitivas cujo conhecimento científico é muito limitado mas que manifestam conhecimentos práticos aprofundados sobre as características das espécies vegetais que utilizam.

Como facilmente podemos constatar no nosso dia-a-dia, a espécie humana é totalmente dependente das plantas para a sua sobrevivência. Esta fitodependência é notória não apenas nos actos mais banais do quotidiano, como respirar ou comer, mas igualmente em situações menos usuais (ou talvez não) como beber um chá, um café ou fumar um cigarro. No caso concreto da alimentação, estima-se que mais de 90% das calorias ingeridas pelos seres humanos e mais de 80% das proteínas consumidas são directamente de origem vegetal. As restantes, resultantes do consumo de produtos animais, são também, indirectamente, resultado da produção primária de plantas ou de outros organismos autotróficos. De referir ainda que uma grande parte destas proteínas e calorias resulta do consumo de um número muito limitado de espécies vegetais, com o milho, o trigo e o arroz a constituírem a base da alimentação humana. Das cerca de 400.000 espécies de plantas que se supõe existirem, apenas uma pequena percentagem (menos de 1%) foi ou é usada de forma consistente pelos humanos. Até há cerca de 10.000 anos atrás, a origem precisa é difícil de determinar, à semelhança de outros animais, os seres humanos obtinham os alimentos de que necessitavam da caça ou da recolha de sementes, frutos, tubérculos e rizomas. Devido em grande parte aos trabalhos do geneticista russo N. Vavilov, que estudou a variabilidade de plantas cultivadas em diferentes regiões da Terra, e do arqueólogo americano R. Braidwood, sabemos hoje que, por esta altura, em diferentes regiões do globo, mas primeiro no Próximo Oriente, numa zona designada por Crescente Fértil, se iniciou a domesticação de plantas

e de animais (Fig. 4). Um pouco depois, noutros locais do globo, nomeadamente na Ásia, nos vales dos rios Amarelo e Yangtzé, na África subsariana, e em diferentes regiões da América, iniciou-se um processo semelhante. As razões que levaram a esta modificação não estão bem determinadas. É provável que as alterações climáticas resultantes do final da última glaciação tenham proporcionado as condições ambientais para o aparecimento da agricultura. De facto, por esta altura, em virtude do recuo dos gelos, o clima tornou-se mais ameno e a espécie humana pôde ocupar territórios outrora inacessíveis.

O aparecimento da agricultura teve profundas implicações no modo de vida e na organização das populações da época. O primeiro resultado terá sido um aumento considerável da população que, como já foi referido, até aos nossos dias, não tem parado de crescer. Por outro lado, o melhoramento das práticas agrícolas, com o aparecimento de instrumentos como o arado ou de sistemas de rega e de diques para o controlo das águas, permitiu um aumento da produção e uma redução na mão-de-obra com a consequente libertação para outras actividades de uma parte considerável da população. Surgiram assim as primeiras cidades estado, na Mesopotâmia, entre os rios Tigre e Eufrates. Sociedades semelhantes desenvolveram-se, mais tarde, também ao longo de outras grandes vias fluviais como o Nilo, o Indo, o Yangtzé ou o Rio Amarelo.

Nestas primeiras sociedades, as plantas e os seus derivados começaram também a ser processadas para a obtenção de novos produtos. O vinho, a cerveja, o pão e o queijo são exemplos de como as sociedades primitivas eram capazes de produzir novos alimentos a partir de outros. Numa perspectiva mais lata, estes alimentos são os primeiros exemplos da utilização de organismos para a obtenção de novos produtos, constituindo por isso uma espécie de biotecnologias primitivas. Numa época em que os progressos tecnológicos não param de nos surpreender, dizer que o vinho, o queijo ou a cerveja são produtos biotecnológicos parece, no mínimo, quase caricato. No entanto, para a época, terão sido descobertas tão importantes como aquelas que actualmente consideramos como mais revolucionárias.

Apesar dos procedimentos empíricos usados por estas primeiras sociedades baseadas na agricultura e que durante milhares de anos continuaram

a ser aplicados, os resultados obtidos podem considerar-se surpreendentes. De facto, se pegarmos numa espiga dos modernos cultivares de milho e verificarmos as suas dimensões e número de grãos dificilmente acreditamos que estes cultivares são derivados de espécies selvagens de milho, como o teosinto, cuja espiga não possui mais que meia dúzia de grãos. Estas modificações conseguidas pela realização de cruzamentos e selecção das plantas mais interessantes, sem que até finais do século XIX houvesse um conhecimento generalizado das leis da hereditariedade, podem ser considerados manipulações genéticas grosseiras das plantas que, apesar de sustentadas por conhecimentos científicos limitados, tiveram forte impacto no aumento da produção agrícola. Para além disso, estas manipulações criaram uma importante variabilidade genética com a criação de cultivares adaptados a diferentes zonas do globo e que é hoje a base dos programas de melhoramento genético. Esta manipulação genética passiva, apesar dos resultados a que permitiu chegar tem, no entanto, as suas limitações – extrema morosidade, pouca precisão e limitada base genética, no sentido de que apenas se podem cruzar plantas pertencentes à mesma espécie ou a espécies filogeneticamente muito próximas.

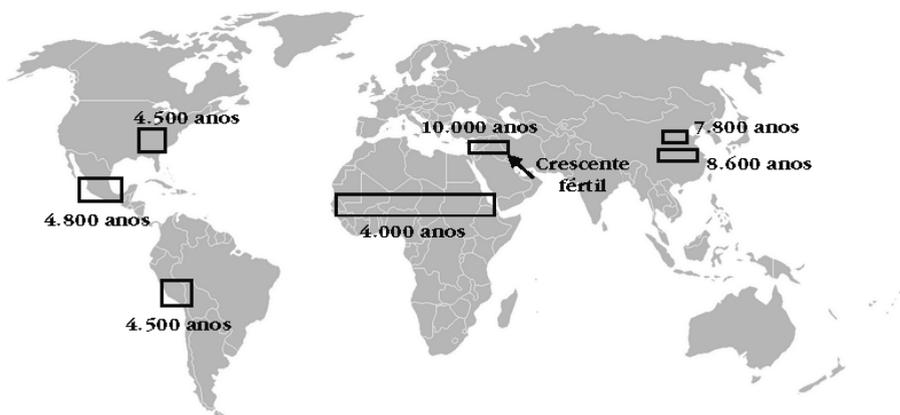


Figura 4. Principais centros de domesticação de plantas e respectivas datas. O centro mais antigo é o dos vales dos rios Tigre e Eufrates onde a agricultura terá surgido há cerca de 10.000 anos (adaptado de Smith, 1995).

A compreensão dos mecanismos genéticos e fisiológicos subjacentes ao desenvolvimento e à reprodução das plantas, a utilização de maquinaria agrícola cada vez mais funcional, o desenvolvimento de pesticidas e de adubos e a obtenção de cultivares cada vez mais produtivos, em particular as sementes híbridas permitiram, como anteriormente referido, um aumento considerável da produção de alimentos a nível mundial, entre meados dos anos 50 e finais dos anos 70. O lado positivo deste período foi o fim das deficiências alimentares em muitos locais onde esse problema era crónico, nomeadamente em vários países asiáticos.

O aumento global da produção teve também as suas consequências negativas. Destas salientam-se a erosão dos solos, a diminuição das áreas florestais e a libertação de uma série de compostos agressivos para o meio ambiente, resultantes de uma agricultura intensiva sem qualquer tipo de preocupações ambientais. A consequência geral foi a redução das áreas cultiváveis e a necessidade de produzir cada vez mais alimento numa área progressivamente mais limitada. Neste sentido, novos ganhos de produtividade necessários para alimentar uma população que não para de crescer, só podem ser conseguidos aumentando a eficiência das culturas, ou através de um aumento dos rendimentos por planta ou pela possibilidade de explorar culturas em zonas marginais cuja utilização agrícola estava até há pouco tempo posta de parte.

Nos últimos 20 anos, como consequência dos progressos da biologia molecular, em particular no que concerne à manipulação do DNA, tornou-se possível modificar geneticamente as plantas de forma mais precisa e eficaz. Tal possibilidade, associada à capacidade das plantas se poderem propagar em condições laboratoriais, permitiu a obtenção de plantas com novas características, em muitos casos através da incorporação de genes de outros organismos como bactérias, fungos ou animais.

Esta nova metodologia, que num período de tempo tão curto passou de uma mera curiosidade laboratorial (como eram as primeiras plantas de tabaco e petúnia geneticamente transformadas) para milhões de hectares de plantas geneticamente modificadas cultivadas pelo mundo inteiro teve, como não poderia deixar de ser, importantes repercussões na sociedade em que vivemos e constitui o exemplo de uma das mais rápidas difusões de uma tecnologia para fins práticos.

Embora, em termos concretos, a introdução de plantas geneticamente modificadas na agricultura tenha sido um sucesso, a cultura destas “novas” plantas tem gerado debates intensos, conflitos comerciais entre países, processos em tribunais e posições extremadas que têm conduzido, em casos limite, à destruição destas culturas, numa espécie de terrorismo biológico. Esta rejeição tem-se manifestado mais intensamente na Europa onde uma imprensa desfavorável e em geral deficientemente informada, uma série sucessiva de escândalos relacionados com produtos alimentares e com a saúde pública (transfusões com sangue contaminado, “vacas loucas”, dioxinas, febre aftosa), uma certa arrogância das empresas do sector agroquímico e movimentos ecologistas e antiglobalização pouco receptivos a novas ideias, conduziram a uma desconfiança generalizada nos consumidores relativamente às plantas geneticamente modificadas, aos produtos delas derivados e aos organismos públicos que regulam a segurança dos alimentos. Para além disso, numa região que produz alimentos em excesso, cujos agricultores são muitas vezes recompensados por não produzirem e em que a população pensa de estômago cheio e vive cada vez mais afastada das realidades agrícolas, é um pouco difícil fazer com que as pessoas entendam o quanto a Biotecnologia Vegetal pode ser importante para o nosso próprio futuro, não apenas em termos alimentares mas também na produção de outros produtos, medicamentos incluídos.

Qualquer tecnologia levanta novas questões e o temor perante novos desafios tecnológicos está ainda bem patente nas sociedades actuais. A este propósito convém recordar um episódio caricato que reflecte os receios das pessoas perante o avanço da tecnologia. Quando o caminho-de-ferro chegou à Suíça houve um certo temor entre a população de que o comboio causasse problemas de saúde. Mais concretamente, admitia-se que velocidades excessivas pudessem afectar o cérebro. Após aturados estudos realizados por uma comissão de especialistas, chegou-se à conclusão que de facto o comboio não era muito aconselhável para a manutenção de um cérebro saudável...

Numa época em que as pessoas tendem a acreditar mais nas pseudociências e nas mais variadas crendices do que no conhecimento científico e em que os jovens cada vez mais se afastam das disciplinas científicas

compete aos cientistas, através do ensino universitário, da realização de conferências e de outras acções de divulgação, afastar estes temores. Afinal de contas, qualquer tecnologia causa sempre algumas apreensões, e o facto de podermos hoje manipular aquilo que podemos considerar ser o símbolo da vida – o DNA – não é facilmente aceitável por uma larga faixa da população. Torna-se pois imperioso formar cientistas e professores que nas suas actividades profissionais futuras possam colocar os seus conhecimentos ao serviço da comunidade e afastar receios, na sua esmagadora maioria infundados, sobre a ciência e a tecnologia. Nesta perspectiva, uma disciplina como a Biotecnologia Vegetal, para além da sua função de divulgação do conhecimento e da tecnologia deve também ter essa função pedagógica.

1.4. Perspectiva histórica e métodos de estudo em Biotecnologia Vegetal

A Biotecnologia Vegetal é um conjunto de metodologias de base biológica que permite manipular as plantas com objectivos específicos. A utilização de qualquer tecnologia tem como base conhecimentos fundamentais e a Biotecnologia Vegetal não foge à regra valendo-se de uma gama de conhecimentos sobre o funcionamento das plantas que foi sendo elaborado ao longo dos anos por diferentes ramos do conhecimento biológico. De facto, a Biotecnologia Vegetal vai buscar ensinamentos a várias disciplinas como sejam a Biologia Celular, Biologia do Desenvolvimento, Biologia Molecular, Bioquímica, Genética, Fisiologia, Informática e Microbiologia e, embora tendo uma vertente tecnológica importante, essa tecnologia só pode ser eficaz com um conhecimento científico importante dos sistemas biológicos, mais concretamente dos mecanismos que controlam o desenvolvimento das plantas, desde os processos de reprodução até aos processos de desenvolvimento vegetativo.

Analisar numa perspectiva histórica o que tem sido a evolução da Biotecnologia Vegetal é uma tarefa problemática dado o número de descobertas importantes em muitos ramos do conhecimento que tiveram impacto no melhoramento de plantas. No entanto, podemos assinalar alguns marcos que, de forma inequívoca, contribuíram para avanços importantes em termos de Biotecnologia Vegetal. Desta forma, e por uma questão de simplificação,

podemos dividir esta breve retrospectiva histórica em três períodos, fortemente condicionados pela tecnologia e meios disponíveis em cada um deles.

O primeiro período vai desde o estabelecimento da teoria celular por Schwann e Schleiden (1838-1939) até à obtenção das primeiras culturas *in vitro* de forma indefinida por White, Gautheret e Nobécourt, em 1939. Durante este período de tempo, que poderemos designar por “período observacional”, realizaram-se importantes descobertas que se vieram a revelar fundamentais para o que hoje podemos chamar Biotecnologia Vegetal. Assim depois da teoria celular já referida, a próxima grande descoberta foi o estabelecimento das leis da hereditariedade por Mendel (1865) nos seus trabalhos na ervilheira. Embora estes estudos permanecessem ignorados durante algum tempo, eles permitiram compreender de que forma eram transmitidas aos descendentes as características das plantas, processo essencial em termos de melhoramento. No entanto, antes de Mendel, Darwin deu também um contributo importante com a sua teoria da evolução. Para além dos seus estudos sobre evolução, Darwin foi ainda um botânico ímpar, tendo-se dedicado ao estudo da floração, da selecção artificial e dos movimentos das plantas através dos seus ensaios sobre fototropismo. Outro cientista importante foi Haberlandt. Numa altura em que as culturas de células animais conheciam progressos assinaláveis, devido em grande parte aos trabalhos de Harrison e Carrel, Haberlandt tentou, nos primeiros anos do século xx, estabelecer culturas de tecidos vegetais em condições laboratoriais. Os seus trabalhos com tecidos de várias espécies, entre as quais tubérculos de batateira, fúcsia e *Tradescantia* deram alguns resultados interessantes, mas o facto de na altura ainda não serem conhecidas as hormonas vegetais, limitou de forma irremediável as suas experiências.

No seguimento dos trabalhos de Haberlandt, outros autores como Simon (1908) dedicaram-se também à cultura de tecidos vegetais. Este autor, utilizando culturas de segmentos caulinares de choupo observou, pela primeira vez, a formação de gemas e raízes em culturas de segmentos do caule. Até ao início da década de 30 muitos investigadores tentaram, sem grande sucesso, cultivar diferentes órgãos vegetais *in vitro*. Alguns conseguiram obter sucessos relativos, como aconteceu com as culturas de raízes de ervilheira e de milho realizadas por Kotte (1922) e que foram mantidas durante

períodos limitados de tempo ou com a formação de calos em culturas de cenoura obtidos por Blumenthal e Meyer (1924).

Em meados dos anos 20, uma descoberta veio alterar, de forma radical, os resultados até então conseguidos com culturas de células vegetais. Essa descoberta, realizada por Went (1926), foi o reconhecimento de que a auxina mais tarde identificada como ácido-3-indol acético (IAA), promovia divisões celulares em tecidos vegetais. Nessa época, o principal problema que se colocava aos investigadores que trabalhavam na área da cultura *in vitro* de plantas, resultava do facto das proliferações celulares obtidas entrarem em necrose muito rapidamente. Foi o que aconteceu com as culturas de *Acer*, *Populus*, *Salix* e *Ulmus* realizadas pelo francês Gautheret (1935). Para ultrapassar esta contrariedade Gautheret decidiu aplicar o IAA às suas culturas (cenoura), tendo verificado que esta hormona vegetal permitia a realização de um grande número de subculturas e um crescimento indefinido das células. Praticamente na mesma altura, foram obtidos resultados semelhantes por White (1939), nos Estados Unidos, utilizando tecidos provenientes de híbridos entre *Nicotiana langsdorffii* x *N. glauca* e por Nobécourt (1939), em França que, tal como Gautheret, utilizou culturas de cenoura.

O segundo período, que podemos designar por período da cultura *in vitro*, vai desde 1939 até meados dos anos 80 do século xx. Durante esta época foram realizados enormes progressos em vários aspectos da cultura *in vitro* de plantas. Foi nesta fase que se comprovou a importância de vários elementos minerais para as plantas tendo surgido formulações nutritivas que ainda hoje são bastante utilizadas na cultura de células vegetais, a mais conhecida foi elaborada por Murashige e Skoog (meio de cultura MS, 1962). Este período ficou marcado, numa fase inicial, pela propagação de plantas através da cultura de meristemas, uma técnica que tinha também a vantagem de permitir a regeneração de plantas isentas de vírus. Neste domínio, os trabalhos do francês Morel (década de 50), em orquídeas e noutras espécies (dálías e batateira) devem ser referenciados. No final da década de 50, dois grupos independentes, um a trabalhar nos Estados Unidos (Steward *et al.*, 1958) e outro na Alemanha (Reinert, 1958) conseguiram obter os primeiros embriões a partir da cultura de células somáticas de cenoura, demonstrando, de forma inequívoca a totipotência das células vegetais.

Na década de 60, duas importantes metodologias abriram novas perspectivas ao melhoramento vegetal. Uma delas foi a constatação, por Guha e Maheshwari, em *Datura innoxia*, de que os grãos de pólen, à semelhança das células somáticas, eram também totipotentes pois, em determinadas circunstâncias, dividiam de forma anômala e produziam plantas. O método em causa ficou conhecido como androgénese ou embriogénese polínica. Ao contrário de outras técnicas de cultura *in vitro*, neste caso, as plantas obtidas eram geneticamente diferentes da planta mãe e, além disso, eram haplóides. Por si só as plantas haplóides não são organismos particularmente interessantes. Todavia, a duplicação do seu número cromossómico, permite obter linhas puras num curto período de tempo. Mutações no estado homozigótico podem também ser conseguidas. Resultados similares foram posteriormente obtidos no tabaco por Bourgin e Nitsch (1967) e, poucos anos mais tarde, já na década de 70 foram realizadas, com sucesso, as primeiras culturas de pólen isolado no tomateiro e em *Datura innoxia*. A obtenção de plantas por androgénese foi, já na década seguinte, realizada em cereais, permitindo o desenvolvimento de novos cultivares com base na regeneração e duplicação de haplóides.

Um outro contributo assinalável para a cultura de células vegetais veio da obtenção de protoplastos. Embora o seu isolamento tivesse sido realizado ainda no século XIX por métodos mecânicos, só no início da década de 60 Cocking obteve protoplastos em grandes quantidades por métodos enzimáticos. Mais tarde, na década de 70, cientistas japoneses observaram divisões e regeneração da parede em protoplastos cultivados e a possibilidade de obter plantas a partir de protoplastos do tabaco.

Com a fusão de protoplastos, as barreiras de incompatibilidade nos cruzamentos entre espécies filogeneticamente distantes poderiam agora ser ultrapassadas e, a ausência de parede, associada à cultura de células isoladas, permitia manipular os vegetais de uma forma semelhante à utilizada para a transformação de bactérias e leveduras. No capítulo 7 é feita uma descrição mais detalhada dos sucessos conseguidos no isolamento e cultura de protoplastos.

Ao mesmo tempo que se registavam os avanços enumerados em termos de cultura *in vitro*, ocorreram também enormes progressos no que diz res-

peito à compreensão do funcionamento e manipulação do material genético. Foi durante este período que se determinou que o DNA era a molécula da hereditariedade e que Watson e Crick (1953) propuseram o seu modelo de dupla hélice para o DNA. Outros factos importantes foram a descoberta do código genético, das enzimas de restrição, do plasmídeo Ti como princípio indutor de tumores em infecções das plantas com *Agrobacterium tumefaciens*, a electroforese bidimensional, o estabelecimento de métodos para a sequenciação do DNA, a construção de moléculas de DNA recombinante e o desenvolvimento de marcadores moleculares (RAPDs, RFLPs...), entre muitos outros que seria fastidioso enumerar.

O terceiro período é o período da biologia molecular e vai desde meados dos anos 80 até à actualidade. O início deste período fica marcado pela obtenção de plantas geneticamente modificadas utilizando um veículo natural – a bactéria *Agrobacterium tumefaciens*. Esta bactéria, que provoca infecções em muitas dicotiledóneas, é capaz de transferir para as células vegetais um pequeno fragmento de DNA (T-DNA) do seu plasmídeo (plasmídeo Ti) provocando proliferações anormais de células (galha do colo). Ensaio realizados no tabaco mostraram que era possível a remoção dos genes responsáveis pela doença, e a sua substituição por outros, permitindo assim regenerar plantas que expressavam as características conferidas por estes genes. Em 1983 as primeiras plantas transgénicas foram obtidas por 4 grupos de investigação distintos, nomeadamente um grupo da Universidade de Washington liderado por M.-D. Chilton que produziu plantas de *Nicotiana glauca* resistentes ao antibiótico canamicina, o grupo de J. Schell e M. van Montagu (Universidade de Gent, Bélgica) que regenerou plantas de tabaco resistentes à canamicina e ao metotrexato, o grupo da empresa Monsanto (R. Fraley, S. Rogers e R. Horsch) que obteve plantas de petúnia resistentes à canamicina e o grupo da Universidade de Wisconsin, liderado por J. Kemp e T. Hall que transformaram plantas de girassol (ver capítulo 8).

No seguimento destes ensaios pioneiros foram desenvolvidos métodos para a transformação genética de muitas outras espécies. No entanto, devido ao facto da bactéria utilizada ter uma capacidade de infecção limitada em monocotiledóneas, a transformação genética de espécies deste grupo estava condicionada. Este problema foi ultrapassado pelo aparecimento de

uma técnica que ficou conhecida como biolística e que permite transferir genes para as células vegetais sem intervenção de *Agrobacterium tumefaciens*. Com esta técnica foi possível a transformação genética de cereais, as plantas mais cultivadas a nível mundial e das quais depende, em grande parte, a alimentação humana.

No decurso dos anos de 1986 e 1987 foram realizados os primeiros ensaios de plantas transgênicas no campo, experiências realizadas nos Estados Unidos e na Bélgica. Já na década de 90 foram comercializados os primeiros produtos resultantes da aplicação dos métodos de modificação genética. Tratou-se da comercialização, pela empresa Calgene (Estados Unidos) de uma variedade (“Favr Savr”) de tomate geneticamente modificada cujo amadurecimento era retardado através da produção de um RNA antisense.

Desde estes ensaios pioneiros até à actualidade os avanços científicos e técnicos obtidos no âmbito da produção de plantas geneticamente modificadas são inúmeros. Esses progressos vão desde a utilização de promotores mais eficientes até ao desenvolvimento de protocolos mais eficazes que permitem obter plantas transgênicas livres dos genes de selecção que conferem resistência a antibióticos ou herbicidas. Tais progressos têm também permitido o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas muito mais elaboradas que as produzidas numa primeira fase e que poderão ser utilizadas não apenas para aumentar a produção, mas igualmente para o desenvolvimento de novos produtos com aplicações em termos de saúde pública. O arroz dourado, enriquecido em provitamina A, e produzido pelo grupo de I. Potrykus, na Suíça, constitui um marco assinalável.

Actualmente (dados de 2008), a nível mundial, a área cultivada com cultivares geneticamente modificados aproxima-se dos 140.000.000 de ha (Fig. 5), uma área equivalente a cerca de 13 vezes a superfície de Portugal. Dessa área, cerca de 70% correspondem a culturas realizadas nos Estados Unidos e 23% na Argentina. A tendência das culturas transgênicas deve manter-se a um ritmo de crescimento elevado durante os próximos anos, sendo previsível que para além das culturas transgênicas mais tradicionais (milho, soja, algodoeiro e colza) outras espécies assumam uma relevância muito maior, nomeadamente o trigo, o arroz bem como algumas espécies produtoras de frutos ou tubérculos.

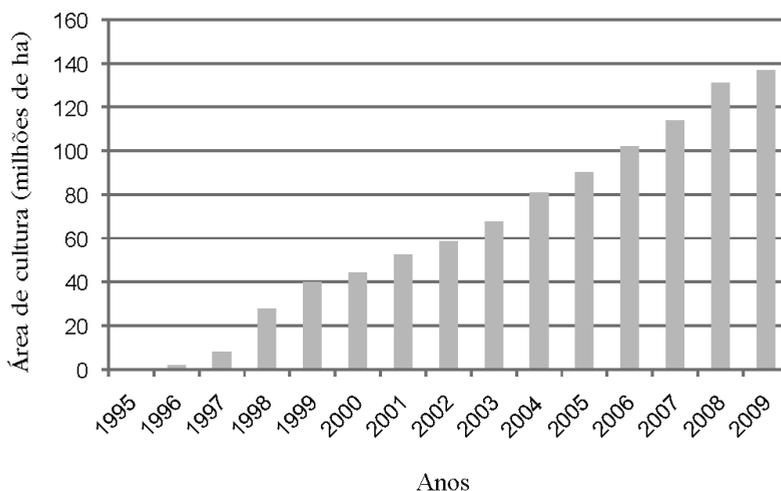


Figura 5. Área cultivada com plantas geneticamente modificadas a nível global.
 Fonte: ISAAA – “International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications”.

Durante este terceiro período houve avanços consideráveis na compreensão do funcionamento do genoma quer em organismos procaríotas quer em eucariotas. Muitos desses avanços estão directamente relacionados com a utilização de novos métodos dos quais se podem destacar a reacção de PCR desenvolvida por K. Mullis em 1983, a aplicação dos *microarrays* ao estudo da expressão genética e o desenvolvimento de métodos de sequenciação automática do DNA extremamente eficazes. Estes conhecimentos só foram possíveis graças ao desenvolvimento de processos de tratamento de dados cada vez mais objectivos e que permitem armazenar quantidades enormes de informação. Esta associação, entre a análise dos genomas e o desenvolvimento de sistemas de tratamento de dados conduziu àquilo a que vulgarmente se chama genómica. No entanto, o conhecimento do genoma é apenas a ponta do iceberg. Uma vez caracterizado o genoma torna-se necessário determinar quais as funções dos produtos dele resultantes, nomeadamente RNAs e proteínas. A descoberta recente de RNAs capazes de inactivar outros RNAs mostra-nos o quão pouco ainda sabemos sobre o controlo da informação genética e de que forma os estudos de proteómica (análise das proteínas) e transcriptómica (análise de RNAs) são fundamentais.

Os anos mais recentes ficam marcados pela sequenciação (em 2000) do genoma de *Arabidopsis thaliana*, uma discreta erva que se tem revelado essencial para a compreensão do modo de funcionamento das plantas e da qual têm sido obtidos importantes conhecimentos que uma vez extrapolados para espécies de interesse económico permitiram importantes avanços em termos de melhoramento vegetal. Seguiu-se a sequenciação dos genomas de outras espécies como o arroz, choupo, cafeeiro soja, milho e vários outros estão em vista de ser obtidos. Espera-se que a sequenciação destes genomas permita uma mais fácil identificação de genes relacionados com o desenvolvimento das plantas, em particular aqueles que estão relacionados com situações de stress e cuja manipulação permitiria a obtenção de plantas resistentes aos mais variados factores bióticos e abióticos.

Apesar dos progressos registados em termos biotecnológicos, os métodos convencionais de melhoramento continuam ainda a ser aplicados com bastante sucesso. A explicação para isto é que as técnicas de engenharia genética são muito recentes não se tendo ainda vulgarizado. Para além disso, exigem aprofundados conhecimentos científicos e um forte investimento financeiro em termos de equipamento e de formação de mão-de-obra. É pois natural que durante os anos mais próximos, os métodos clássicos continuem a desempenhar um papel importante surgindo a Biotecnologia Vegetal mais como um complemento desses métodos do que como uma alternativa.

Nos próximos capítulos são abordadas algumas das metodologias utilizadas no âmbito da biotecnologia vegetal, com particular incidência na clonagem de plantas e no seu melhoramento genético.

(Página deixada propositadamente em branco)

CAP. 2. CULTURA *IN VITRO* DE PLANTAS

2.1. Introdução

Como foi referido no capítulo anterior, a cultura *in vitro* de plantas iniciou-se, de forma metódica, com os trabalhos de Haberlandt e sofreu um forte impulso com a descoberta das auxinas, a que se seguiu a descoberta de outros grupos de hormonas vegetais. Na realidade, antes da descoberta das auxinas e das citocininas, a manutenção de células em cultura era bastante difícil uma vez que o crescimento indefinido de células não podia ser conseguido e as culturas acabavam por morrer. Por cultura *in vitro* entende-se o estabelecimento e manutenção, em condições laboratoriais, de células, tecidos, órgãos vegetais, plantas ou massas de células, vulgarmente designadas por calos (*callus*). Estas culturas são mantidas em condições assépticas de forma a evitar a contaminação por microrganismos e podem ser utilizadas com finalidades diversas. Entre os objectivos principais destacam-se a clonagem de plantas, a produção de metabolitos secundários, a transformação genética, a fusão de protoplastos ou a obtenção de plantas haplóides. Cada um destes objectivos requer condições particulares em termos da composição dos meios de cultura pelo que as condições utilizadas, por exemplo, para a clonagem de plantas são diferentes daquelas utilizadas na produção de plantas haplóides. Nas secções seguintes são analisadas as potencialidades das células vegetais em termos de regeneração *in vitro* bem como as principais características dos meios e condições de cultura.

2.2. Totipotência da célula vegetal

44

As células de um organismo provêm todas de uma mesma célula ovo ou zigoto. Neste sentido, pode afirmar-se que o corpo de uma planta, à exceção dos gametófitos, é um clone do zigoto. No decurso da ontogénese a edificação dos diferentes tecidos implica um aumento do número e dimensões das células mas também uma especialização devida ao funcionamento de determinados genes e ao silenciamento de outros. Assim, nas plantas, algumas células especializam-se no transporte (xilema e floema), outras na fotossíntese (parênquima) e outros no revestimento (células epidérmicas), só para citar alguns exemplos (Fig. 6). Este processo é denominado diferenciação.

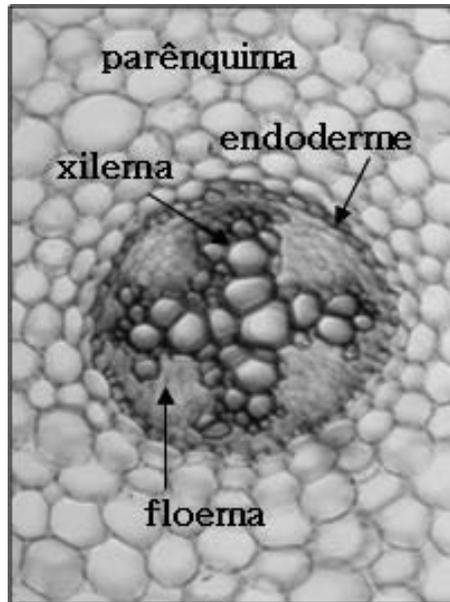


Figura 6. Corte anatômico de uma raiz primária de dicotiledónea mostrando diferentes tipos de tecidos.

No entanto, se procedermos à cultura de um fragmento de uma folha ou de outro tipo de órgão vegetal num meio de cultura e se as condições foram as mais adequadas, poder-se-á verificar que a estrutura organizada da folha é modificada devido ao facto de determinadas células sofrerem

um processo de certa forma inverso da diferenciação, e poderem reverter a um estado meristemático sofrendo mitoses sucessivas. Este processo conduz à formação de um calo em que as células são relativamente uniformes em termos morfológicos dividindo-se mais ou menos activamente (Fig. 7). Este processo é denominado desdiferenciação. Ulteriormente, e se mais uma vez as condições de cultura foram as ideais, a partir desta massa celular poder-se-ão formar embriões ou rebentos caulinares que, uma vez germinados ou enraizados originam uma nova planta. A capacidade que as células vegetais possuem de, quando em cultura, darem origem a novas plantas sem a intervenção de um processo de reprodução sexuada é designada por totipotência e constitui a base da reprodução assexuada nas plantas. Deste modo, tecidos já diferenciados podem desdiferenciar-se ou seja, recuperar características e potencialidades de células embrionárias podendo expressar um potencial genético e comportar-se como um zigoto. Esta constatação não exclui, no entanto, que o genoma de certas células vegetais possa conduzir a uma diferenciação irreversível no decurso dos processos de desenvolvimento, como sucede nas células animais. Nas plantas, as células mais susceptíveis de sofrer processos de desdiferenciação são aquelas filogeneticamente e ontogenicamente mais primitivas, ou seja, as células de parênquima.



Figura 7. Caixa de Petri com vários calos de tabaco (*Nicotiana tabacum*, linha BY-2).

Em algumas espécies pode mesmo acontecer que estes processos de desdiferenciação ocorram em condições naturais *in vivo*, tal como se verifica em espécies do género *Bryophyllum* onde, nas margens das folhas, se diferenciam novas plantas a partir de meristemas pré-existentes (Fig. 8). Este tipo de resposta tem, como veremos detalhadamente em capítulos seguintes, importantes aplicações práticas. Ao mesmo tempo levanta inúmeras interrogações ao nível da biologia do desenvolvimento. De facto, compreender os mecanismos pelos quais uma célula dá origem a um organismo com a complexa organização de uma planta superior ou de um mamífero é, afinal, um dos problemas centrais da biologia.



Figura 8. Planta de *Bryophyllum tubiflorum* onde são visíveis novos propágulos nas extremidades das folhas (setas).

Em contraste com o que se verifica nas plantas, um processo deste tipo (desdiferenciação celular e ulterior regeneração *in vitro*) não foi ainda conseguido nos animais. No entanto, durante as fases iniciais do desenvolvimento embrionário dos animais, as células manifestam ainda totipotência. Alguns animais, como os tritões, são capazes de regenerar membros que foram danificados. Também as células estaminais possuem o potencial de se diferenciar em diferentes tipos celulares, sendo objecto de intensas

investigações com vista a explorar a possível regeneração de órgãos ou de tipos celulares particulares (e.g. células nervosas). Todavia, ao contrário de muitas células vegetais, os exemplos que foram referidos relativamente aos animais, exceptuando as células embrionárias, não devem ser considerados exemplos de células totipotentes mas sim de células pluripotentes, uma vez que a sua capacidade de diferenciação de encontra limitada a tipos celulares particulares.

O facto das células animais, quando cultivadas *in vitro*, não originarem novos organismos, contrariamente ao que se verifica nas plantas, não deixa de ser surpreendente se atendermos a que experiências realizadas em rãs e mais recentemente em vários mamíferos mostraram que núcleos de células epidérmicas ou de outros tecidos, introduzidas em óvulos aos quais o núcleo foi removido, são capazes de originar novos organismos. Esta experiência mostra que as células epidérmicas possuem no seu núcleo a totalidade da informação genética característica do genótipo como aliás se verifica com todas as outras células.

Que características distintivas entre as células animais e vegetais podem explicar esta diferença de comportamento? Não existe actualmente uma resposta definitiva a esta questão mas entre os animais e as plantas existem diferenças fundamentais quer ao nível da organização celular quer ao nível do desenvolvimento que podem ajudar a compreender esta disparidade na resposta relativamente à expressão da totipotência.

As células animais e vegetais apresentam algumas diferenças fundamentais. As mais importantes são a existência de uma parede celular e de um tipo particular de organelos, os cloroplastos, responsáveis pela realização da fotossíntese, nas células vegetais. A parede celular, que condiciona a forma das células, impede as células vegetais de se deslocarem ao contrário do que se verifica nas células animais onde, durante o desenvolvimento embrionário, ocorre migração celular. Estas características têm como consequência uma organização do corpo diferente bem como a existência de mecanismos de desenvolvimento mais plásticos nas plantas de forma a poderem adaptar-se a variações das condições ambientais. Dada a imobilidade das células vegetais a orientação do crescimento é essencialmente condicionada pelos planos de divisão celular e pela informação posicional.

Ao contrário dos animais, que rapidamente se podem deslocar para condições ambientais mais favoráveis, a resposta das plantas a modificações do habitat tem que ocorrer *in situ* e os mecanismos de adaptação envolvem, muitas vezes, alterações nos padrões de desenvolvimento. A sua estratégia é oportunista. Um exemplo é a reduzida actividade metabólica e cambial que ocorre na estação fria em plantas das zonas temperadas, actividade essa que é recuperada quando se inicia a Primavera.

Uma planta adulta é tipicamente constituída por muitas cópias de um pequeno grupo de módulos. Cada módulo consiste num pedaço de caule, folhas e uma gema onde se localiza um meristema caulinar. Cada uma destas unidades é designada por fitómero. Se o meristema apical for danificado, um dos meristemas axilares pode substituí-lo e continuar o crescimento. Podemos, pois, afirmar que as plantas apresentam um crescimento contínuo ou seja, desde a fecundação e durante toda a ontogénese, originam novos órgãos. Uma situação completamente diferente verifica-se nos animais onde se pode afirmar, ainda que de forma grosseira, que o embrião um mamífero é uma miniatura reduzida à escala do organismo adulto. Os detalhes da estrutura do corpo definem-se à medida que o organismo cresce.

Talvez a ausência de expressão da totipotência em células animais diferenciadas seja devida a repressores que muito cedo, durante o desenvolvimento embrionário condicionam, de forma irreversível, a expressão de determinados genes. A recente descoberta dos RNAs de interferência (RNAi) e o seu papel no controlo da expressão de determinados genes é mais um indicador de que muito há ainda a descobrir sobre a expressão e coordenação genética. Apesar da sequenciação do genoma de vários organismos os mecanismos moleculares, bioquímicos e fisiológicos responsáveis, nas células animais, pela repressão da totipotência e nas células vegetais pela sua expressão, estão longe de estar elucidados. A possibilidade de, num futuro mais ou menos próximo, o avanço do conhecimento poder vir a permitir a expressão da totipotência de células animais não deve, no entanto, ser excluída. Trabalhos recentes mostram que células animais já diferenciadas podem reverter a um estado estaminal, sugerindo que o caminho para uma verdadeira clonagem em animais está aberto com todas as consequências daí decorrentes.

2.3. Multiplicação vegetativa

No decurso de milhares de milhões de anos de evolução biológica foram-se desenvolvendo as mais variadas estratégias reprodutivas entre os diferentes grupos de organismos. Todavia, e apesar de diferenças mais ou menos assinaláveis entre os vários *taxa*, existem apenas dois tipos de reprodução. Por um lado, a reprodução assexuada, que foi, sem dúvida, a primeira a surgir na escala evolutiva e que é, ainda hoje, largamente utilizada por muitos organismos. Neste tipo de reprodução intervém o mecanismo da mitose, possuindo as células resultantes deste processo de divisão a mesma constituição genética da célula original. Um outro tipo de reprodução, denominado reprodução sexuada, e que é actualmente o processo reprodutivo utilizado por cerca de 95% das espécies existentes, surgiu mais tarde e tornou-se o mecanismo de reprodução dos seres vivos mais complexos.

Nos procariotas, a reprodução assexuada é o método exclusivo de reprodução e, embora a meiose não ocorra neste grupo de organismos, a variabilidade genética é assegurada por diversos mecanismos de recombinação genética (transformação, transdução e conjugação). Nos fungos e nas algas os dois tipos de reprodução ocorrem simultaneamente. O reino animal engloba, quase exclusivamente, espécies que utilizam a reprodução sexuada para se perpetuarem. São excepções certos grupos de invertebrados como corais, esponjas e alguns vermes em que pode ocorrer cissiparidade ou gemiparidade. Também, em algumas ordens de insectos e várias espécies de ácaros, os indivíduos provenientes da reprodução sexuada coexistem com outros da mesma espécie originados por partenogénese, a partir de óvulos não fecundados. Nos vertebrados, algumas espécies de peixes e certos répteis podem, igualmente, reproduzir-se por via assexuada.

Nas plantas superiores, a reprodução por via seminal é o principal método de propagação. Todavia, a totipotência das células vegetais está na base de várias estratégias que as plantas utilizam para se reproduzirem sem recorrer à mistura de genes, processo que é vulgarmente conhecido como propagação vegetativa. Os exemplos de mecanismos que asseguram a reprodução assexuada são tão numerosos e variados nas plantas que uma

outra designação por que é conhecido este mecanismo – multiplicação vegetativa – é, por vezes, aplicada a outras espécies que não se incluem no reino vegetal. São inúmeros os exemplos de plantas que possuem órgãos especializados para a multiplicação vegetativa, como sejam os estolhos dos morangueiros, os bolbos das tulipas, os pseudobolbos das orquídeas, os bolbilhos de certas espécies de *Allium*, os pimpolhos do choupo e da framboesa, os hibernáculos da elodea, os cormos do *Crocus*, os rizomas das gramíneas ou os tão bem conhecidos tubérculos da batateira. Em certas espécies, como nos bambus, em que a floração ocorre apenas uma vez durante a vida dos indivíduos e com intervalos de dezenas de anos, a multiplicação vegetativa é quase o método exclusivo de propagação. Noutras situações, a reprodução assexuada é favorecida pelas condições em que os organismos se desenvolvem, como no caso da elodea do Canadá, uma espécie dióica da qual foram importados para a Europa apenas pés femininos.

Segundo alguns autores, como Margara (1984), a multiplicação vegetativa em condições naturais terá essencialmente um papel benéfico a curto prazo, permitindo a colonização acelerada de novos habitats. É o que se verifica nas áreas devastadas por incêndios em que as gramíneas podem rapidamente ocupar esses territórios, em competição com outras espécies que se reproduzam essencialmente por via sexuada. No entanto, e numa perspectiva evolutiva, a multiplicação vegetativa não deve ser minimizada, pois uma propagação em massa significa, igualmente, que a probabilidade de ocorrência de mutações é maior, favorecendo assim a existência de uma certa variabilidade genética.

2.4. Métodos convencionais de multiplicação vegetativa

Desde tempos remotos que o objectivo dos agricultores tem oscilado entre duas finalidades bem distintas. Por um lado, a obtenção de novos cultivares com características superiores aos existentes no que se refere à resistência a doenças ou a determinados factores ambientais ou, mais directamente, a uma maior produtividade. O outro objectivo é a fixação das características mais vantajosas que ocorrem nos produtos de segregação, através da sua

transmissão aos descendentes. Até recentemente, o primeiro objectivo só podia ser alcançado pela realização de cruzamentos entre diferentes espécies ou cultivares, enquanto a manutenção das características previamente seleccionadas ia sendo conseguida com recurso à reprodução assexuada, vulgar, como se referiu, em muitas plantas superiores. As técnicas convencionais de multiplicação vegetativa, usadas desde há milhares de anos, continuam a ser importantes na propagação dos genótipos mais interessantes e a sua aplicação conduz à obtenção de populações uniformes, geneticamente idênticas e com origem comum, às quais se dá o nome de clones.

Estes métodos utilizam-se para a propagação de espécies difíceis ou impossíveis de multiplicar por reprodução sexuada devido à existência de esterilidade, ao número reduzido de sementes formadas ou a dificuldades na germinação.

Destes métodos tradicionais a reprodução por estaca e a enxertia são, sem dúvida, os mais utilizados na propagação vegetativa. O primeiro consiste no enraizamento de um segmento de caule ou de folha acompanhado pelo desenvolvimento simultâneo de um meristema caulinar pré-existente ou de outros que se venham a formar. Em algumas espécies, como no caso do choupo, o enraizamento é espontâneo sem necessidade de recurso a reguladores de crescimento. Noutras são necessários tratamentos com reguladores de crescimento vegetal, geralmente auxinas (e.g. IBA – ácido-3-indol butírico). No caso da enxertia, trata-se de associar uma porção de caule ou um ramo de uma planta que interessa multiplicar (enxerto) a um porta-enxertos (ou cavalo) que possua um sistema radicular eficaz. A enxertia é geralmente aplicada quando o primeiro método mencionado é de difícil utilização ou quando se pretende substituir um clone por outro. Por exemplo, quando uma doença que ataca as raízes das videiras, conhecida por filoxera, dizimou as cepas europeias no final do séc. XIX foi necessário enxertar as videiras europeias em porta-enxertos de origem americana resistentes à doença. No caso da enxertia não há neoformação de meristemas: os meristemas caulinares já existem na planta e as raízes são fornecidas pelo porta-enxertos. A utilização desta técnica de forma extensiva torna-se problemática em virtude de requerer mão-de-obra especializada, cada vez mais escassa. De salientar que a enxertia não conduz à formação de um híbrido, ou seja, de um novo organismo que possua uma

mistura de genes do enxerto e do porta-enxerto. De facto, a reprodução de uma planta enxertada origina plantas iguais (no caso da propagação vegetativa) ou semelhantes (no caso da reprodução sexuada) ao enxerto.

Algumas árvores têm a particularidade de emitir, a uma certa distância do tronco, novos rebentos que têm uma origem radicular e que progressivamente se libertam da raiz original para levar uma vida autónoma. Trata-se normalmente de árvores dotadas de um sistema radicular muito vasto como os ulmeiros, carvalhos e lódãos (*Celtis* sp.). Para fins de cultura podem perfeitamente separar-se estes pimpolhos e utilizá-los na propagação das espécies em questão.

Em certas espécies, um ramo flexível pode curvar-se até ao solo e adquirir uma raiz no ponto de contacto, originando uma nova árvore que futuramente se destacará da planta mãe. Este processo é vulgar em epíceas e árvores ornamentais como bordos e salgueiros e designa-se por mergulhia, que não é mais do que um caso particular de alporquia. Nesta técnica, um ramo ao qual, num segmento do caule, foi removida a casca, é rodeado por solo e vedado com um plástico escuro. Ao fim de algum tempo, formam-se na zona de corte várias raízes. A separação do ramo do resto da planta permite a sua cultura em solo e a multiplicação (clonagem) da planta mãe.

Finalmente, certas árvores apresentam a faculdade de renovar o cepo, produzindo rebentos a partir de gemas que subsistem no cepo. Estes gomos existem em estado dormente sob a casca dos cepos e são frequentes em folhosas mas muito raros em resinosas. Normalmente, as árvores originadas de renovos têm uma vida mais breve que as provenientes de sementes. Em muitas árvores, como por exemplo no eucalipto, tira-se partido desta técnica cortando-se os troncos todos os 15-20 anos e depois os renovos 10-15 anos mais tarde. Uma variante desta técnica é utilizada no sobreiro. Neste caso, a árvore a clonar é cortada rente ao solo sendo numa fase ulterior a toija coberta uma ligeira camada de terra. Os rebentos que se formam são depois enraizados.

Estes métodos, embora de grande interesse, apresentam algumas limitações. Assim, nem todas as espécies são fáceis de enraizar e, em muitos casos, verifica-se uma rejeição à enxertia sem que se conheçam as causas que estão na sua origem. Noutras situações, a propagação vegetativa só pode

ser realizada em fases juvenis, numa altura em que as características que permitem realizar a selecção não são ainda conhecidas. Outras dificuldades residem no número reduzido de plantas que são obtidas, na morosidade do processo e na disponibilidade de meios necessários para a concretização destas técnicas. Para além disso, muitas das plantas regeneradas por estaca não mostram sinais de rejuvenescimento sendo caracterizadas por um crescimento muito lento que pode ser, com alguma frequência, do tipo plagiotrópico (crescimento horizontal). Para contornar estes problemas recorre-se cada vez mais à cultura *in vitro* como uma metodologia alternativa para a clonagem de plantas, como será referido nos capítulos 3 e 4.

2.5. A cultura *in vitro* de plantas

A cultura *in vitro* de plantas (Fig. 9) é uma tecnologia com evidentes repercussões quer ao nível prático quer da ciência fundamental. Sob o ponto de vista das aplicações práticas podem indicar-se a multiplicação de plantas em larga escala ou a obtenção de plantas geneticamente transformadas. No aspecto da investigação fundamental a cultura *in vitro* permite uma abordagem aos processos de morfogénese em plantas em condições controladas, contribuindo para o estudo e compreensão dos mecanismos moleculares, bioquímicos, e fisiológicos subjacentes ao desenvolvimento dos diferentes órgãos e tecidos.

A propagação ou manutenção de células ou plantas em condições laboratoriais é fundamental em muitos aspectos da biotecnologia vegetal contribuindo para isso as seguintes potencialidades desta metodologia:

i) permite obter um número elevado de plantas para ensaios na agricultura num curto espaço de tempo partindo de um explante (material que é colocado em cultura) diminuto.

ii) Possibilita a propagação de espécies difíceis de clonar por técnicas convencionais.

iii) Permite a produção de clones ou de novas variedades.

iv) É essencial na regeneração de plantas a partir de células geneticamente modificadas.

v) Pode ser utilizada para o estabelecimento de bancos de germoplasma.

vi) Permite uma rápida troca de material vegetal pois o estado fitossanitário dos propágulos mantidos em condições assépticas reduz significativamente o período de quarentena ou elimina-o totalmente.

A cultura de tecidos vegetais é uma metodologia com algumas dezenas de anos de existência. No entanto, só nas duas últimas décadas se começou a generalizar e a ser encarada não como uma simples curiosidade científica (uma espécie de culinária realizada em laboratório), mas sim como um poderoso instrumento de estudo dos mecanismos de morfogénese vegetal e de propagação em larga escala. Apesar da multiplicação *in vitro* ter vindo a assumir um destaque cada vez mais acentuado, com importantes aplicações na agricultura, floricultura, silvicultura e na transformação genética de plantas, esta metodologia, deve ser visto não como um substituto dos métodos tradicionais de multiplicação vegetativa mas sim como uma técnica alternativa ou complementar desses mesmos métodos. Para se ter uma ideia da importância que a propagação *in vitro* tem em termos económicos, basta referir que os Estados Unidos e a Europa, em conjunto, produzem mais de 500 milhões de plantas por ano com base nesta tecnologia, constituindo um mercado de vários milhões de euros. Em alguns países orientais como a China, a Índia e o Japão esta metodologia tem vindo também a assumir um papel determinante no melhoramento das espécies vegetais com maior impacto na economia. De facto, a cultura de tecidos vegetais é, na actualidade, uma espécie de ponte entre a manipulação genética ou a clonagem e a agricultura.

Em muitos aspectos, a cultura *in vitro* pode ser considerada uma extensão dos métodos da microbiologia. Assim, deve ser realizada em condições assépticas o que implica a esterilização dos tecidos a cultivar e a manutenção das culturas ao abrigo da contaminação por fungos e/ou bactérias. Além disso, o ambiente de cultura deve ser controlado, nomeadamente a humidade, temperatura, intensidade da luz e o fotoperíodo. Um problema essencial diz respeito às características do meio de cultura e, em particular, à sua composição.



Figura 9. Cultura *in vitro* de segmentos foliares de *Bryophyllum tubiflorum* e regeneração de vários rebentos caulinares.

2.5.1. Condições de Cultura

2.5.1.1. Os Recipientes

Os recipientes utilizados para a realização das culturas podem ser tubos de ensaio, *Erlenmeyers*, caixas de Petri, ou frascos, sendo as dimensões dos recipientes função do tamanho e do número de explantes a utilizar. Os recipientes devem ser fechados de forma a assegurar a assepsia. Um aspecto importante a considerar é as trocas gasosas entre o explante e o exterior. Em muitos casos usam-se tampas de plástico ou metálicas mas o uso de tubos de ensaio tapados com rolhas de algodão cardado e gaze é muito frequente, tendo a vantagem de permitir as trocas gasosas evitando a acumulação de gases como o etileno que podem condicionar a resposta em cultura.

2.5.1.2. Assepsia

A assepsia não apresenta dificuldades particulares quando a planta mãe está pouco contaminada ou quando os tecidos do explante se encontram

bem protegidos. É o caso de plantas mantidas em estufa ou quando se utilizam meristemas envolvidos pelos primórdios foliares. Inversamente, torna-se muito difícil, por vezes mesmo impossível, eliminar completamente as bactérias do solo que existem à superfície de raízes, tubérculos ou rizomas e que muitas vezes penetram nos tecidos.

A esterilização do material vegetal é normalmente feita numa solução de hipoclorito de cálcio $[Ca(OCl)_2]$ de concentração variável (3 – 7,5%), seguida de lavagens em água esterilizada. Uma gota de um detergente (e.g. Tween 20) adicionam-se por vezes à solução de hipoclorito. Alternativamente, pode-se usar hipoclorito de sódio (NaOCl) ou, em casos em que os explantes se encontram mais contaminados, cloreto de mercúrio ($HgCl_2$, 0,25% durante 6h ou 0,5% durante 2-3h). O mercúrio é um elemento bastante tóxico pelo que a sua utilização deve ser feita com as devidas precauções. A imersão do material vegetal numa solução de antibióticos (penicilina ou estreptomicina, 1mg/l) durante 2h, após tratamento com hipoclorito, tem sido também utilizada. No entanto, este tipo de procedimento deve ser, tanto quanto possível evitado, pois alguns antibióticos parecem condicionar a resposta morfogénica, alterando assim os resultados esperados.

O material de vidro é normalmente esterilizado no autoclave a $121^{\circ}C$ (pressão de 1,2 atm.) durante 45 minutos ou, alternativamente, numa estufa a $200^{\circ}C$ durante pelo menos 2h. Os instrumentos usados para manipular os explantes devem estar mergulhados em álcool e serem, com frequência, passados pela chama. Para evitar o uso de etanol pode recorrer-se a esterilizadores que possuem um recipiente com pequenas esferas de vidro mantidas a elevadas temperaturas e que podem operar a temperaturas superiores a $270^{\circ}C$.

Os meios de cultura são esterilizados por autoclavagem também a $121^{\circ}C$, durante 20 minutos (temperatura a que os endósporos de algumas bactérias são destruídos). Quando se trata de compostos que podem ser inactivados ou alterados por autoclavagem deve realizar-se uma esterilização por filtração das substâncias em causa e juntá-las aos restantes componentes esterilizados por autoclavagem.

Finalmente, a realização das culturas deve ser feita, sempre que possível, em câmaras de fluxo onde o ar é filtrado assegurando assim a supressão de microrganismos vindos do exterior.

2.5.1.3. Factores Físicos

As culturas devem ser realizadas em câmaras que permitam o controlo da temperatura, luz e humidade embora, no último caso, a obliteração dos recipientes assegure uma humedificação suficiente da atmosfera que envolve os explantes.

A temperatura de cultura anda à volta dos 22-25°C podendo ser mais elevada (27-28°C) para as plantas tropicais ou, pelo contrário, mais baixa para outras espécies. Noutros casos, uma alternância de temperaturas (por exemplo 23°C de dia e 18°C à noite) pode ser favorável. Em casos em que se pretende reduzir o crescimento de forma a evitar subculturas frequentes, as culturas podem ser mantidas a temperaturas mais baixas.

A iluminação das câmaras de cultura é geralmente feita por tubos fluorescentes. Em algumas espécies, a neoformação de gemas exige luz enquanto noutros casos, por exemplo para a indução de embriogénese somática (capítulo 5), a resposta é, por norma, favorecida pela obscuridade. A influência do fotoperíodo nas culturas tem sido pouco estudada utilizando-se com frequência fotoperíodos relativamente largos (14 ou 16h).

2.5.2. O Meio de Cultura

As culturas podem ser realizadas em meio sólido (gelificado) ou em meio líquido. No primeiro caso adiciona-se ao meio agar (6-10 g/l), composto que para além de solidificar o meio forma um complexo coloidal que facilmente liberta os iões. O agar pode ser substituído por outros produtos como agarose, gelrite ou fitagel. O principal inconveniente do agar relaciona-se com o facto de ser uma substância variável e de composição pouco definida, desconhecendo-se até que ponto pode influenciar a resposta dos tecidos em cultura. No entanto, é ainda um composto bastante utilizado.

Os meios líquidos apresentam uma composição química idêntica aos sólidos mas o agar não está presente. Estes meios são usados na propagação de plantas dos ecossistemas aquáticos (Fig. 10) mas a cultura de outras espécies nestes meios pode revelar-se vantajosa, se algumas limitações deste sistema

forem ultrapassadas. O principal problema relacionado com a cultura em meio líquido é o arejamento das culturas que pode ser realizado por agitação ou pelo emprego de dispositivos que permitam a entrada de ar esterilizado por filtração. Sistemas de cultura de imersão temporária (vulgarmente designados por RITA[®]) ou biorreactores são cada vez mais utilizados para a cultura em meio líquido. Outra contrariedade reside no facto de terem que se realizar repicagens frequentes. Nas culturas em meio líquido os explantes estão em estreito contacto com a solução envolvente e não se criam gradientes de compostos no meio como pode acontecer com as culturas em agar.

O pH dos meios é normalmente de 5,6-5,8. A razão para o emprego destes valores reside no facto de nestas condições todos os iões estarem em solução e facilmente disponíveis para as células. Por outro lado, é um valor de pH próximo daquele que em condições naturais envolve as células vegetais.

2.5.2.1. Elementos Minerais

O desenvolvimento normal das plantas requer uma série de elementos minerais que se dividem em macroelementos e microelementos (oligoelementos). Em condições normais as plantas retiram estes minerais da solução do solo. Quando as culturas são realizadas *in vitro* estes elementos necessitam de ser adicionados ao meio de cultura.

Para além do carbono, oxigénio e hidrogénio, os outros 6 macroelementos são o azoto, o fósforo, o enxofre o potássio, o magnésio e o cálcio. Os três primeiros são constituintes fundamentais dos vegetais (e.g. proteínas, ácidos nucleicos) enquanto os restantes intervêm no equilíbrio entre catiões e aniões sendo determinantes no equilíbrio osmótico das células.

Os microelementos têm um papel essencial nos mecanismos enzimáticos como activadores ou constituintes de coenzimas. Os principais são: B, Cu, Fe, Mn, Mo e Zn.

As exigências nestes compostos variam com as diferentes espécies e com o estado fisiológico dos tecidos. Por exemplo, os meristemas e os tecidos com uma intensa actividade metabólica podem ter necessidades importantes de potássio.



Figura 10. Cultura *in vitro* de uma planta aquática (*Myriophyllum spicatum*).

2.5.2.2. Vitaminas e aminoácidos

Diversas vitaminas favorecem o crescimento dos tecidos em cultura, e a ausência de algumas delas pode ser um factor limitante da morfogénese. De entre as diferentes vitaminas que são incluídas no meio de cultura a tiamina (vitamina B1), normalmente usada em concentrações de 0,1 - 1,0 mg/l, parece ter um papel essencial. Outras vitaminas utilizadas são o ácido nicotínico (niacina), a riboflavina e a piridoxina (vitamina B6). O *mio*-inositol (*meso*-inositol), um estereoisómero do inositol, também considerado uma vitamina do complexo B, parece ser particularmente importante nos meios de cultura. A sua inclusão nos meios retarda a senescência provavelmente devido à sua interacção com as auxinas e citocininas. Para além disso, este composto é incorporado em fosfatidilinositol, um importante composto membranar cuja fosforilação conduz à formação de fosfatidilinositol 4,5-difosfato, um precursor dos segundos mensageiros diacilglicerol e inositol trifosfato. A participação do *mio*-inositol na via de síntese das pectinas e hemiceluloses da parede celular bem como na formação de ácido fítico e da ligação deste a diferentes catiões são outros aspectos que podem condicionar a resposta dos tecidos a este composto.

Embora os tecidos vegetais sejam capazes de produzir compostos orgânicos azotados a partir de nitratos e de azoto amoniacal, tem sido por vezes observado que a adição de aminoácidos (compostos ricos em azoto) favorece a proliferação celular e a regeneração *in vitro*. O aminoácido mais vulgarmente utilizado é a glicina, embora alguns tipos de meios possuam na sua composição misturas de vários aminoácidos (Tabela 1). Em alguns ensaios tem-se verificado que determinados aminoácidos como, triptofano e fenilalanina podem condicionar a resposta morfogénica, o que não é surpreendente se atendermos a que o triptofano é um precursor da auxina IAA e a fenilalanina é um substrato para a formação de compostos fenólicos e da auxina PAA (ácido fenil acético).

2.5.2.3. Outros Compostos

Em casos em que os explantes utilizados segregam para o meio compostos fenólicos, que após oxidação dão uma cor castanha ao meio de cultura, como acontece vulgarmente com culturas de espécies lenhosas, é habitual adicionarem-se ao meio compostos antioxidantes. Os mais utilizados são o ácido ascórbico, a cisteína o ditiotreitol e a polivinilpolipirrolidona. A eliminação dos fenóis pode também ser feita pela realização de repicagens sucessivas ou pela manutenção das culturas no escuro.

Numerosos produtos ou extractos naturais de composição mal definida são por vezes utilizados com resultados muito variáveis. São exemplos o extracto de levedura (0,5 - 1g/l), o hidrolisado de caseína (0,5-3g/l) e o leite de coco (5-20%). Destes, o mais utilizado é o leite de coco cuja composição compreende vitaminas, aminoácidos, açúcares e reguladores de crescimento, particularmente citocininas.

Um hidrato de carbono, vulgarmente a sacarose, é incluído nos meios em concentrações que variam entre 2 - 4% (w/v).

Tabela 1. Composição de alguns meios base utilizados na cultura de tecidos vegetais.

Nutrientes (mg/l)	AE	B5	MC	MS	NN6	RT	SH
Macronutrientes							
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O			386				
CaCl ₂			72,5		166		
CaCl ₂ .2H ₂ O	180	150		440		440	200
K ₂ SO ₄			990				
KH ₂ PO ₄	340		170	170	68	510	
KNO ₃	1900	3000		1900	950	950	2500
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	500	250	370	185	370	400
Na ₂ SO ₄							
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O		150					
NH ₄ H ₂ PO ₄							300
NH ₄ NO ₃	1200		400	1650	720	1650	
(NH ₄) ₂ SO ₄		134					
Micronutrientes							
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0025	0,025		0,025			0,1
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0025	0,025	0,25	0,025	0,025	0,025	0,2
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	27,8	27,8	27,8	27,8	27,8	15
H ₃ BO ₃	0,63	3	6,2	6,2	10	12	5
KI	0,75			0,83			1
MnSO ₄ .4H ₂ O	2,2	10		22,3	25	10	10
MnSO ₄ .H ₂ O			22,3				
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,3	37,3	37,3	37,3	37,3	37,2	20
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,025	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,1
NiCl ₂ .6H ₂ O							
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	2	8,6	8,6	10	8,6	1
Orgânicos							
Ácido fólico						1	
Ácido nicotínico		1	0,5	0,5	5	0,5	0,5
Alanina	0,05						
Arabinose	150						
Arginina	0,01						
Biotina					0,05		
Cisteína	0,01						
Cisteína-HCl	0,02						
Fenilalanina	0,01						
Glicina	2		2	2	2	2	
Glucose	180						
Glutamina	0,4						
Mio-inositol		100	100	100	100		1000
Leucina	0,01						
Piridoxina-HCl		1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Tiamina-HCl		10	0,1	0,1	0,5	0,5	5
Tirosina	0,01						
Xilose	150						

2.5.2.4. Hidratos de carbono

62

Os tecidos em cultura *in vitro* são, em grande parte heterotróficos, sendo por isso necessário adicionar açúcares ao meio de cultura. Os açúcares mais utilizados são a sacarose (dissacarídeo) e a glucose (monossacarídeo). Para além do seu efeito como fonte de carbono os açúcares são muitas vezes aplicados como agentes osmóticos nomeadamente nos meios utilizados para a maturação de embriões somáticos. Se os açúcares têm ou não um efeito na morfogénese *in vitro*, através de uma acção indirecta sobre o metabolismo das hormonas vegetais, é um factor de controvérsia.

Para além dos compostos que referimos, os meios de cultura devem ter ainda na sua composição hormonas ou reguladores de crescimento cuja composição e concentração variam consoante os objectivos a atingir.

2.5.2.5. Hormonas vegetais

A clarificação do papel das hormonas na regulação nos mecanismos de desenvolvimento das plantas beneficiou muito dos ensaios de cultura *in vitro*, em particular no que diz respeito às citocininas. De maneira inversa, pode também dizer-se que os sucessos obtidos com a regeneração de plantas *in vitro* ficam a dever-se, em grande parte, à incorporação das hormonas vegetais nos meios de cultura.

De acordo com Moore (1989) o termo hormona (derivado do grego e que significa estimular) foi primeiro aplicado em fisiologia animal para designar compostos químicos que, sendo produzidos em determinados locais, em concentrações muito baixas ($< 1\text{mM}$, frequentemente $1\ \mu\text{M}$) são transportados até um tecido alvo onde desencadeiam uma determinada resposta. Este conceito de hormona foi depois aplicado aos compostos que nos tecidos vegetais são também responsáveis pelo desencadear de respostas fisiológicas, como se verificou inicialmente no caso das auxinas e no seu papel no controlo dos tropismos. Todavia, o conceito de hormona vegetal não é comparável ao de hormona animal pois, algumas das características das hormonas vegetais não se enquadram bem na definição de hormona

conforme ela foi estabelecida para os animais. De facto, embora as hormonas possam ser transportadas nas plantas e ter uma acção à distância como acontece com as citocininas, isso nem sempre se verifica. Elas podem actuar no tecido em que são sintetizadas e até na mesma célula como acontece frequentemente com o etileno. Também, ao contrário das hormonas animais, as hormonas vegetais não são normalmente produzidas em tecidos específicos, análogos às glândulas dos animais. Alguns autores, como Trewavas, sugerem ainda que, no caso das hormonas vegetais, o controlo é realizado não por modificações na concentração de hormonas mas sim por alterações na sensibilidade dos tecidos aos diferentes tipos de hormonas. Outras diferenças existem entre os conceitos de hormona animal e vegetal como seja a natureza química dos compostos, essencialmente peptídeos e compostos de natureza lípida nos animais, e compostos de natureza química diversa e de baixo peso molecular nas plantas. No entanto, o que importa reter é que, em virtude das plantas não possuírem um sistema nervoso, o controlo dos processos de desenvolvimento é essencialmente um controlo químico baseado nas hormonas vegetais.

As hormonas vegetais são componentes essenciais dos meios de cultura pois são elas que permitem obter as respostas desejadas. Com frequência as hormonas vegetais são substituídas por compostos que, embora não existindo nos tecidos vegetais provocam, quando aplicados às plantas, respostas análogas às induzidas pelas hormonas. Para distinguir estes compostos das hormonas eles são normalmente designados como reguladores de crescimento. Como exemplo pode citar-se o efeito auxínico do ácido 1-naftaleno acético (NAA) que quando aplicado aos tecidos vegetais induz respostas similares à auxina endógena IAA (ácido 3-indol acético). Em alguns tipos de cultura *in vitro* a incorporação de reguladores de crescimento vegetal pode não ser necessária. É o caso, por exemplo, da cultura de embriões ou em alguns sistemas de cultura de anteras para produção de plantas haplóides. No entanto, de uma maneira geral, um ou mais tipos de hormonas estão presentes nos meios.

A designação de hormona é normalmente aplicada a 5 tipos diferentes de compostos químicos designados por auxinas, citocininas, giberelinas, etileno e ácido abscísico. Outros compostos descobertos mais recentemente têm também papéis importantes no controlo de diferentes processos de

desenvolvimento. É o caso dos brassinosteróides, do ácido salicílico, dos jasmonatos e de alguns compostos de natureza peptídica. Para além destes, as poliaminas, são também compostos envolvidos em vários tipos de resposta das plantas. No entanto, as concentrações a que actuam são normalmente mais elevadas que aquelas a que as hormonas exercem os seus efeitos e, por isso, alguns autores não as consideram como hormonas. Destes 5 grupos mais estudados de hormonas vegetais, as auxinas e as citocininas são aquelas mais vulgarmente utilizadas em culturas *in vitro*. O ácido giberélico ou outras giberelinas e o ácido abscísico têm uma utilização mais restrita enquanto o etileno, em virtude de ser um gás, é de manipulação complexa pelo que a sua utilização para efeitos de cultura *in vitro* é muito limitada. Nas secções seguintes apresentam-se as principais características dos grupos mais representativos de hormonas vegetais realçando o papel dos diferentes tipos em termos de aplicações na cultura *in vitro* de plantas.

Auxinas

As auxinas foram as primeiras hormonas a serem descobertas. São compostos de natureza química simples sendo o IAA (Fig. 11) a auxina mais comum nas plantas. Para além das plantas outros organismos, como bactérias, são também capazes de sintetizar auxinas. Existem várias vias de síntese para as auxinas umas tendo como precursor o aminoácido triptofano e, pelo menos uma outra, em que este aminoácido não é o precursor da formação do IAA. Em bactérias patogénicas como *Agrobacterium tumefaciens* e *Pseudomonas savastanoi*, a síntese de IAA pode também ser independente do triptofano. O IAA pode ocorrer na forma livre ou conjugado com aminoácidos ou glucanos que podem constituir um meio de armazenamento da auxina ou representar intermediários metabólicos das vias de degradação (oxidação) que tal como no caso da síntese envolvem mais que um mecanismo. Para além do IAA, existem outros compostos endógenos, estruturalmente semelhantes ao IAA, e que provocam respostas equivalentes. Todavia, estes compostos são muito menos abundantes que o IAA. É o caso do IBA (Fig. 11), do ácido 4-cloroindol acético (4-CloroIAA), e do ácido fenilacético (PAA).

As auxinas controlam vários aspectos do desenvolvimento das plantas, normalmente em interação com outras hormonas como o etileno ou as citocininas. A nível celular estimulam o alongamento e conseqüente aumento do volume celular através da activação de um mecanismo quimiosmótico que promove a extrusão de protões, com a conseqüente acidificação do apoplasto e activação de expansinas responsáveis pelo alongamento da parede celular. A nível da planta as auxinas estão envolvidas nos tropismos, na regulação da dominância apical, na formação dos meristemas florais e no estabelecimento dos padrões de filotaxia, na formação de raízes laterais, na diferenciação dos tecidos vasculares e no desenvolvimento dos frutos, entre muitos outros aspectos do desenvolvimento em que parecem participar.

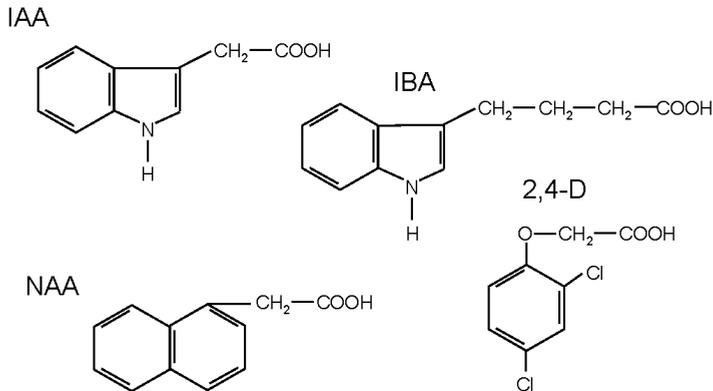


Figura 11. Estrutura química de várias auxinas. IAA: ácido 3-indol acético, IBA: ácido 3-indol butírico, NAA: ácido 1-naftaleno acético, 2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

As auxinas podem ser transportadas no sistema vascular, nomeadamente no floema, mas são, tanto quanto se sabe, o único tipo de hormonas a mostrar um tipo de transporte polarizado desde as regiões de síntese até outros locais da planta. Este movimento, designado transporte polar envolve transportadores específicos e é feito célula a célula. O transporte polar é extremamente importante pois permite a acumulação de auxinas em determinados locais, estando relacionado com a diferenciação dos cotilédones durante o desenvolvimento embrionário e das folhas durante o desenvolvimento vegetativo.

Em termos de cultura *in vitro* as auxinas são utilizadas com diferentes objectivos. Entre eles destacam-se a formação e manutenção de calos ou suspensões celulares, a indução de enraizamento, a formação de embriões somáticos e a formação de meristemas caulinares adventícios nos processos de organogénese. O tipo de auxina utilizado também é variável em função dos objectivos pretendidos com a cultura *in vitro*. Assim, o IAA ou o NAA (Fig. 11) são com frequência usados na indução de organogénese enquanto o IBA é mais utilizado na indução de raízes adventícias. Por seu lado, reguladores de crescimento como o 2,4-D ou o picloram são aplicados na indução de embriogénese somática. Auxinas sintéticas como o 2,4-D (Fig. 11) e o NAA são também normalmente usadas para reprogramar geneticamente as células e promover a desdiferenciação e conseqüente formação de calos.

Citocininas

A descoberta das citocininas está estreitamente associada com a cultura *in vitro* de tecidos. A descoberta deste tipo de hormonas resultou em grande parte dos trabalhos de F. Skoog, nos Estados Unidos, utilizando como sistema experimental a medula da planta do tabaco. Skoog e o seu grupo analisaram o efeito de várias substâncias na proliferação celular deste tecido tendo verificado que a adenina tinha um efeito promotor na indução de divisões celulares. Testaram então substâncias ricas em adenina entre elas o esperma autoclavado de arenque que se verificou ser um indutor bastante eficaz de divisões celulares. Uma vez que o esperma não autoclavado não mostrava o mesmo efeito promotor, os investigadores concluíram que a substância activa resultava de alterações provocadas pela autoclavagem. Isolaram, assim, a primeira citocinina sintética, designada cinetina (6-furfurilaminopurina, Fig. 12) e derivada da purina adenina. Na sequência destes trabalhos foram ulteriormente identificadas citocininas naturais a primeira das quais foi a zeatina (Fig. 12) – trans-6-(4-hidroxi-3-metilbut-2-anilamino) purina – no endosperma de cariopses imaturas de milho (*Zea mays*) e, mais tarde no endosperma líquido das sementes de coco (leite de coco), uma substância há muito conhecida pela sua capacidade de promover divisões celulares em cultura *in vitro*. A análise de uma vasta gama de compostos naturais

e sintéticos mostra que praticamente todos os compostos activos do tipo das citocininas são aminopurinas substituídas. Exceptuam-se compostos como a difenilureia e o tidiazurão, que são fenilureias substituídas e que têm um efeito idêntico ao de outras citocininas.

Nos tecidos vegetais as citocininas surgem normalmente na forma de ribósidos, ribótidos ou glicosiladas. Um aspecto interessante é que as citocininas existem também nos RNAs de transferência de vários organismos, incluindo o RNAt humano. As citocininas não são moléculas exclusivas das plantas, ocorrendo noutros organismos como algas e bactérias embora com vias de síntese diferentes.

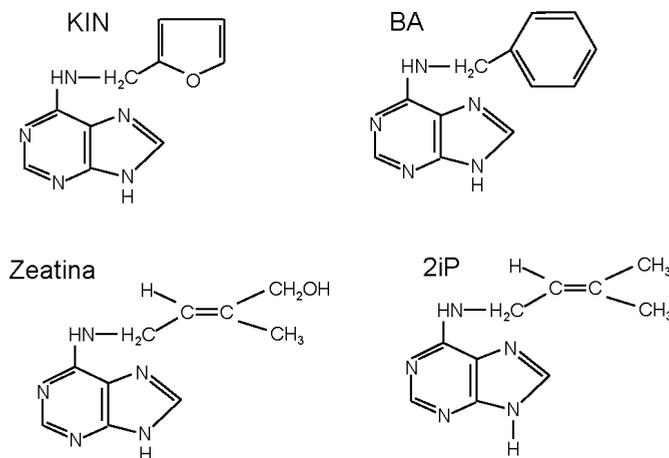


Figura 12. Estrutura química de várias citocininas. BA: benziladenina, KIN: cinetina, 2iP: isopentenil adenina.

A síntese de citocininas ocorre nos ápices radiculares das plantas sendo depois transportadas através do xilema para outros locais da planta. Como ficou estabelecido desde os ensaios pioneiros que levaram à sua descoberta, as citocininas são compostos promotores da divisão celular. Nas plantas elas controlam genes envolvidos na regulação do funcionamento dos meristemas. Para além disso, estão envolvidas na dominância apical e nos processos de

senescência, sendo conhecido o seu efeito como retardadores da senescência. Outros mecanismos em que estão envolvidas são a diferenciação dos cloroplastos e a expansão de folhas e cotilédones.

No que diz respeito à cultura *in vitro*, as citocininas, tal como as auxinas são moléculas essenciais no controlo da resposta podendo ser usadas citocininas naturais ou sintéticas. Para além das citocininas já referidas, a benziladenina (BA) e a isopenteniladenina (ZiP) são outras citocininas muito utilizadas nos ensaios de cultura *in vitro* (Fig. 12). Em virtude do seu efeito na divisão celular as citocininas são muitas vezes utilizadas em conjunto com as auxinas para promover a formação de calos. Dado o seu efeito na dominância apical, usam-se para promover o desenvolvimento de meristemas axilares em sistemas de micropropagação. Um balanço entre citocininas e auxinas é também responsável pela formação de meristemas adventícios nos tecidos em cultura. Finalmente, em alguns casos, elas parecem também estimular a formação de embriões somáticos.

Giberelinas

As giberelinas constituem um vasto conjunto de compostos naturais sendo conhecidas actualmente perto de 140. Isoladas inicialmente de um fungo, *Gibberella fujikuroi*, que provocava o alongamento excessivo do caule de plantas de arroz, foram depois identificadas em plantas, primeiro em *Phaseolus coccineus*, uma espécie de feijoeiro e, depois, em muitas outras espécies. São vulgarmente designadas pela abreviatura GA seguida de um número de acordo com a ordem em que foram descobertas e com o sistema proposto por MacMillan and Takahashi em 1967.

Todas as giberelinas possuem em comum o esqueleto do *ent*-giberelano formado por 4 anéis (Fig. 13) e a sua variabilidade resulta da existência de um esqueleto com 19 ou 20 átomos de carbono e da existência e posicionamento de grupos funcionais (e.g. grupos hidroxilo).

Nas plantas, a síntese de giberelinas ocorre através da via de síntese dos terpenóides, uma via complexa que se divide entre os plastídeos e o citoplasma e que se inicia com a síntese de geranyl geranyl difosfato (GGPP) a partir de unidades isoprenóides. Este tipo de hormonas é sintetizado

em sementes e em tecidos jovens do caule ocorrendo o transporte através do sistema vascular.

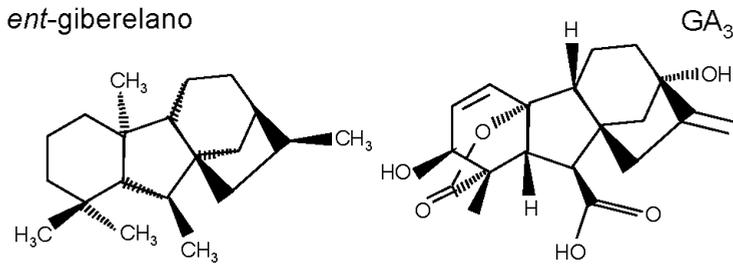


Figura 13 – Fórmula estrutural do *ent*-giberelano, estrutura base de todas as giberelinas e de uma das giberelinas mais utilizadas em ensaios experimentais, o ácido giberélico (GA₃).

As giberelinas desempenham vários papéis nas plantas, como sejam a estimulação do alongamento celular, a síntese de enzimas envolvidas na digestão de compostos de reserva nas sementes, como é o caso da α -amilase na digestão do amido, estando também envolvidas na floração e na germinação de sementes. Além disso, trata-se de compostos com um importante interesse comercial pois são utilizados para promover, de forma indirecta o crescimento de alguns frutos (uvas), na indústria cervejeira e no aumento de rendimentos da cultura de cana-do-açúcar (*Saccharum officinarum*). Inibidores da síntese de giberelinas (AMO-1618, paclobutrazol) são utilizados para reduzir o tamanho de algumas plantas quando essa situação se revela problemática, como acontece nos cereais e em algumas espécies usadas na indústria da floricultura.

Em relação à cultura *in vitro*, verifica-se que as giberelinas têm uma utilização muito mais restrita que as auxinas ou as citocininas. A giberelina mais vulgarmente utilizada em ensaios de cultura *in vitro* é o ácido giberélico (Fig. 13, GA₃). A sua aplicação está normalmente associada com a necessidade de promover o alongamento de rebentos caulinares formados *in vitro* ou com a quebra de dormência que se verifica nos embriões somáticos de algumas espécies lenhosas.

Ácido abscísico

70

Devido ao seu papel em promover a dormência de gemas e sementes e a abscisão foliar o ácido abscísico (ABA, Fig. 14) foi inicialmente visto como uma hormona com efeitos inibitórios. Embora o seu efeito na abscisão seja ainda hoje controverso, e se tenha verificado que o ABA tem efeitos promotores em vários processos fisiológicos, o papel inibidor deste composto continua a ser salientado.

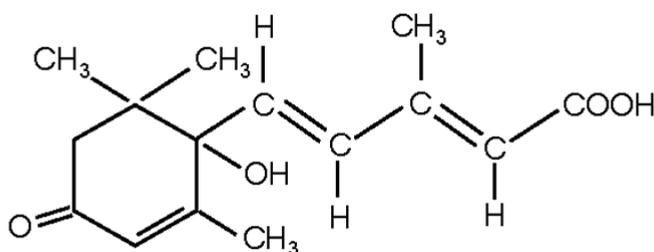


Figura 14 – Fórmula estrutural de um dos isómeros do ácido abscísico: 2-trans-ácido-abscísico.

O ABA está presente em todos os órgãos da planta e é sintetizado em todas as células que possuam cloroplastos ou amiloplastos processando-se o seu transporte no sistema vascular. Para além das plantas tem sido detectado em alguns fungos embora as funções nestes organismos não sejam conhecidas.

Trata-se de um produto da via de síntese dos carotenóides formado por 15 átomos de carbono que pode existir na forma *cis* ou *trans* (Fig. 14) sendo as formas comerciais uma mistura dos diferentes (4) isómeros. A sua inactivação ocorre por oxidação ou conjugação com monossacarídeos.

Esta hormona é essencial no controlo dos mecanismos de abertura e fecho dos estomas sendo essencial na regulação dos níveis hídricos da planta. Para além disso, inibe a germinação precoce e a viviparidade. Este processo, que consiste na germinação dos embriões ainda ligados

à planta mãe (Fig. 15), e que é muito comum em mutantes de algumas espécies (milho) resulta de deficiências na síntese ou na sensibilidade ao ABA. O ácido abscísico promove também uma correcta maturação dos embriões através da estimulação da síntese de proteínas de reserva e uma tolerância à dessecação necessária nos estados mais avançados do desenvolvimento embrionário quando o teor em água passa a ser mais reduzido e que está relacionada com a produção das chamadas proteínas LEA (“late embryogenesis abundant”).

À semelhança do que se verifica com as giberelinas, a utilização de ABA em culturas *in vitro* é restrita. Em ensaios de embriogénese somática o ABA é incorporado com alguma frequência nos meios de forma a promover uma maturação eficaz evitando a germinação precoce dos embriões somáticos.

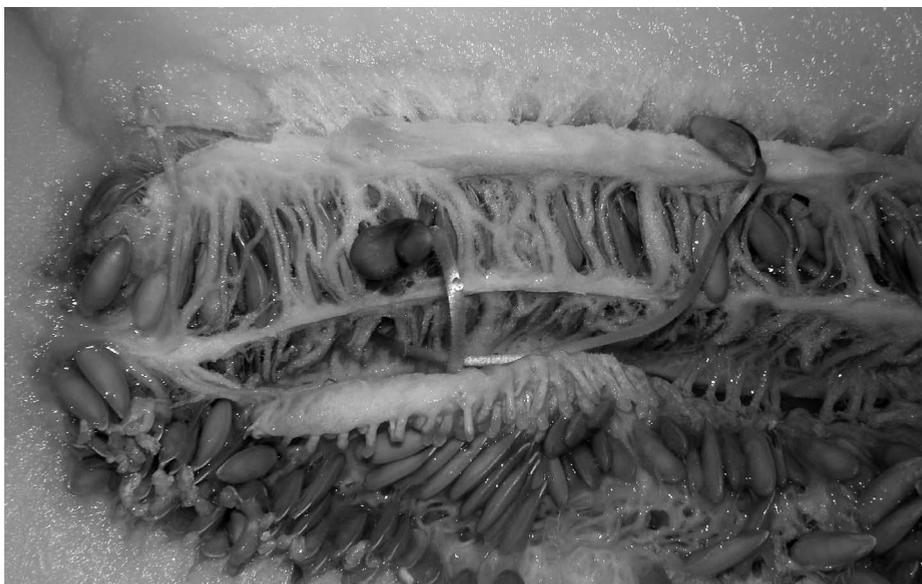


Figura 15 – Germinação de sementes de meloeiro (*Cucumis melo*) no interior do fruto.

Etileno

O etileno é um composto estruturalmente muito simples constituído por dois átomos de carbono e quatro átomos de hidrogénio – C_2H_4 .

Esta simplicidade não tem, no entanto, correspondência na importância que o etileno tem no controle de uma vasta gama de processos fisiológicos e de desenvolvimento. Através de uma via de síntese relativamente simples é produzido a partir do aminoácido metionina com a formação dos intermediários metabólicos S-adenosilmetionina (SAM) e do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) em diferentes órgãos das plantas (ver capítulo 9). Tal como acontece com outras hormonas vegetais, a sua síntese não é exclusiva das plantas sendo igualmente produzido em bactérias e fungos. De todas as hormonas vegetais, o etileno é a mais peculiar uma vez que se trata de um gás.

O etileno está envolvido em alguns processos de desenvolvimento das plantas. Assim, em algumas espécies o etileno quebra a dormência de sementes enquanto em plantas aquáticas submersas promove o seu alongamento. A diferenciação dos pêlos radiculares, a promoção da floração em bromeliáceas (família à qual pertence o ananaseiro) e a sua acção em mecanismos de defesa das plantas são outros processos em que o etileno está envolvido. O etileno é ainda essencial no mecanismo de amadurecimento em frutos climatéricos – frutos que apresentam um pico de actividade respiratória antecedido de uma elevada libertação de etileno (tomates, bananas, ameixas, entre outros). De referir ainda que muitos dos efeitos do etileno resultam de interacções com outras hormonas como auxinas e citocininas como acontece nos processos de abscisão foliar e senescência.

Dada a sua natureza gasosa o etileno é difícil de manipular em culturas *in vitro*. No entanto, têm sido realizados ensaios com compostos que promovem a libertação de etileno, como o etefon (ácido 2-cloroetanofosfónico) ou com compostos que inibem a produção (cloreto de cobalto) ou a acção (nitrato de prata) do etileno. Esses ensaios têm mostrado que o etileno promove a formação de calos em algumas espécies enquanto a organogénese e a embriogénese somática são inibidas provavelmente devido aos seus efeitos inibitórios no transporte polar de auxinas. No que diz respeito ao enraizamento os dados são contraditórios tendo sido referidos efeitos positivos e negativos em função das diferentes espécies. Em alguns tipos particulares de organogénese, como sejam a formação de bolbos o etileno parece ter um efeito promotor.

Como é óbvio, para cada espécie ou mesmo para cada tipo de explante existem necessidades nutricionais e hormonais diferentes. Testar variações num conjunto tão vasto de compostos torna-se bastante problemático mas, por norma, a cultura de células isoladas, como protoplastos ou grãos de pólen, ou de células em suspensão requer meios mais complexos que os utilizados para a cultura de outro tipo de explantes como fragmentos de folhas ou raízes. O procedimento habitual consiste em testar, numa fase inicial, os chamados meios base e depois, consoante as necessidades específicas de cada cultura, aqueles são otimizados. Na tabela 1 está representada a composição de alguns meios base sendo o meio MS (Murashige e Skoog, 1962) o mais vulgarmente usado, tendo sido inicialmente preparado para o crescimento de calos da medula do tabaco.

(Página deixada propositadamente em branco)

CAP. 3. CLONAGEM DE PLANTAS - PROLIFERAÇÃO DE MERISTEMAS E ORGANOGÊNESE

3.1. Introdução

A clonagem é um método de propagação vulgarmente utilizado na multiplicação das mais variadas espécies de plantas. Ela pode ocorrer naturalmente ou, como foi referido no capítulo anterior, fazer-se com recurso a métodos como a enxertia ou a estacaria. Desde os anos 50 do século passado, a clonagem de plantas passou também a poder ser realizada em condições laboratoriais através de um processo conhecido como micropropagação, em virtude de, ao contrário do que acontece nas técnicas tradicionais de multiplicação, o material utilizado na propagação ser de dimensões reduzidas. Os métodos de micropropagação de plantas podem dividir-se em três tipos diferentes, consoante o material inicial e o tipo de resposta obtida. Esses tipos são a proliferação de meristemas existentes no explante original, a indução de organogênese e a formação de embriões somáticos. Neste capítulo serão analisados os dois primeiros enquanto a embriogênese somática será examinada no capítulo seguinte.

A cultura de meristemas caulinares, isolados ou inseridos em ápices ou segmentos nodais, é o tipo mais simples de micropropagação, pois não ocorre indução de novos meristemas mas apenas o desenvolvimento de meristemas já existentes no explante e o ulterior enraizamento dos rebentos caulinares deles resultantes. Esta técnica foi a primeira a ser utilizada para fins comerciais e é, ainda hoje, vulgarmente aplicada à propagação de espécies com elevado valor comercial, como é o caso das orquídeas

e de outras ornamentais ou hortícolas. Em sentido restrito, a cultura de meristemas envolve apenas o meristema propriamente dito. Todavia, devido à dificuldade que muitas vezes se verifica em isolar unicamente o meristema, dadas as suas reduzidas dimensões, o termo cultura de meristemas é frequentemente aplicado à cultura de meristemas associados com primórdios foliares, à cultura de extremidades apicais do caule (0,5-2 cm) ou de segmentos nodais - zona do caule onde se insere uma ou mais folhas.

Muitos dos meristemas caulinares (axilares) encontram-se na planta em estado dormente. Uma vez em cultura, num meio adequado e livres da acção inibidora do meristema apical (dominância apical), eles podem desenvolver-se. O efeito da dominância apical é variável segundo as espécies. Por exemplo, no linho, a dominância apical é absoluta enquanto nas gramíneas ela é reduzida.

A cultura de ápices de raízes pode também ser realizada *in vitro*. No entanto, a sua cultura, não permite a regeneração de plantas mas apenas o alongamento das raízes. Este tipo de culturas é mais utilizado para determinar as necessidades nutricionais e hormonais das raízes durante o seu crescimento ou para a obtenção de culturas de raízes a partir das quais podem ser isolados metabolitos secundários de interesse (capítulo 7). Alguns autores têm assinalado a conversão do ápice radicular em rebentos caulinares mas os dois tipos de meristemas não parecem poder converter-se um no outro tratando-se nesses casos, provavelmente, da neoformação lateral de um meristema radicular em virtude de uma desdiferenciação celular localizada. Embora este assunto seja objecto de discussão, é geralmente aceite que nas angiospérmicas não há possibilidade de conversão entre os dois tipos de meristemas.

Uma vez que a técnica de micropropagação estudada neste capítulo se baseia na cultura de meristemas é importante lembrar que tipo de meristemas existem nas plantas, qual a sua distribuição e a forma como se encontram organizados.

3.2. Tipos de Meristemas

Durante o desenvolvimento embrionário são formados os meristemas apicais do caule e da raiz. Por serem os primeiros surgir, e permanecerem

activos durante toda a vida da planta, são vulgarmente conhecidos como meristemas primários. Estes meristemas são formados por células mais ou menos isodiamétricas, de paredes finas e pouco vacuolizadas, e que manifestam uma intensa actividade mitótica. Os meristemas apicais são responsáveis pelo alongamento de caules ou raízes e, em muitas plantas, todos os tecidos ou órgãos existentes resultam da sua actividade. As zonas meristemáticas têm não só a capacidade de originar novas estruturas mas também de se perpetuarem. Para além disso, são locais de percepção de estímulos ambientais. É ainda na sequência da actividade dos meristemas apicais do caule que se formam os meristemas axilares situados, como o nome indica, na axila das folhas. Para além disso, durante a fase reprodutora são os meristemas caulinares que evoluem para meristemas florais ou inflorescenciais os quais estão na origem da formação das flores ou inflorescências.

Muitas plantas, em particular as árvores e os arbustos, possuem ainda meristemas responsáveis pelo engrossamento dos órgãos em que se localizam, normalmente os caules e as raízes. Estes meristemas, formados durante uma fase mais adiantada do desenvolvimento vegetativo, têm uma posição lateral e originam novos tecidos. São por estas razões designados secundários, laterais ou histogénicos. Ao contrário dos meristemas apicais, as células dos meristemas secundários são em regra muito vacuolizadas e alongadas segundo o eixo longitudinal. Os meristemas secundários, comuns em gimnospermas e angiospermas lenhosas são de dois tipos: câmbio vascular e felogénio (Fig. 16). O primeiro dá origem aos tecidos condutores (xilema e floema) enquanto o felogénio é responsável pela formação de súber e feloderme que juntamente com o câmbio que lhes deu origem constituem a periderme, um tecido de protecção em órgãos com crescimento secundário. Em termos de clonagem de plantas estes meristemas não têm muito interesse. No entanto, em determinadas espécies a cultura de segmentos caulinares ou radiculares onde estes meristemas estejam presentes pode levar à proliferação de células das zonas meristemáticas com a ulterior regeneração de plantas a partir das células dos calos.

Algumas plantas possuem ainda os chamados meristemas intercalares. Estes meristemas correspondem a zonas em que as células dividem activa-

mente, sendo responsáveis pelo alongamento de órgãos já formados, por exemplo folhas, caules ou hastes florais. Tal como os anteriores, também estes não são particularmente interessantes em termos de micropropagação mas, tal como se verifica com o câmbio e felogénio, a cultura de explantes em que eles estejam presentes pode conduzir à obtenção de calos com potencial de regenerar plantas.

É o conjunto da actividade dos diferentes meristemas o responsável pela arquitectura de uma determinada planta que embora seguindo modelos gerais é característica de cada espécie.

Do ponto de vista da micropropagação os meristemas mais interessantes são os meristemas apicais do caule e os meristemas axilares. Quer se trate da proliferação de meristemas ou da indução de organogénese, ocorre primeiro o desenvolvimento (no caso da organogénese, a formação) de um meristema caulinar sendo necessário numa fase ulterior proceder ao enraizamento dos rebentos caulinares.

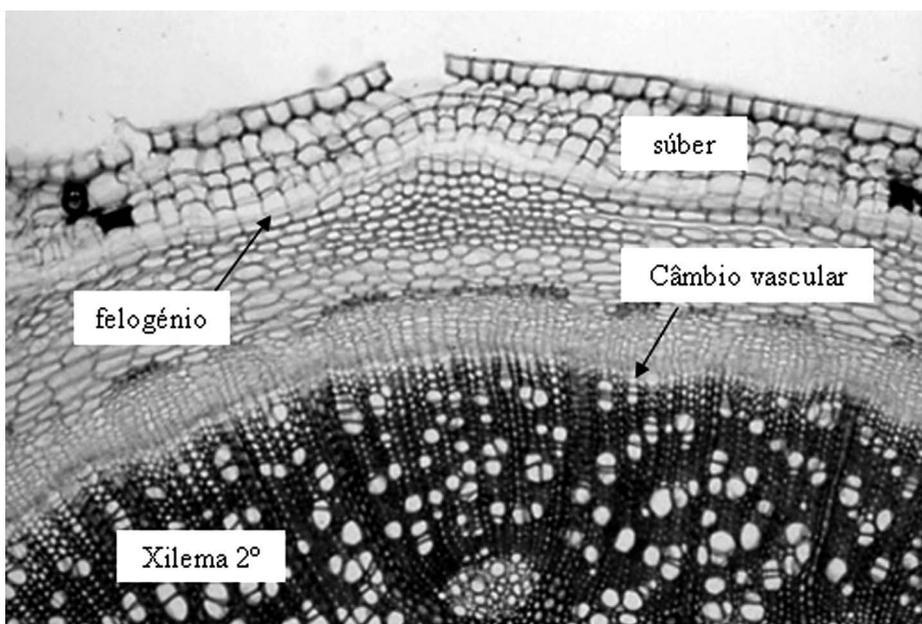


Figura 16 – Secção transversal de um caule onde se podem observar os meristemas secundários câmbio vascular e felogénio bem como alguns dos tecidos resultantes da sua actividade.

3.2.1. Meristema apical da raiz

Os meristemas primários da raiz (Fig. 17) apresentam, geralmente, uma organização mais simples que os do caule. A envolvê-los existe a coifa, uma estrutura protectora constituída por células que continuamente morrem e se separam, sendo substituídas por novas células. Para além da função protectora a coifa segrega compostos mucilaginosos que facilitam o crescimento da raiz no solo e é também o local onde são detectados os estímulos gravitropicos. Imediatamente abaixo da coifa existe um grupo de células denominado centro quiescente. As células desta zona apresentam uma actividade mitótica mais reduzida que as células envolventes, designadas por células estaminais e que são responsáveis pela edificação dos diferentes tecidos da raiz. O meristema radicular é um eixo que produz fiadas longitudinais de células que progressivamente se vão diferenciando à medida que nos afastamos da extremidade apical. Normalmente, este eixo, não apresenta expansões laterais e as raízes laterais são formadas a uma curta distância do meristema apical. As raízes assim originadas têm, quase sempre, uma origem profunda a partir do periciclo e não a partir de meristemas axilares como acontece no caule.

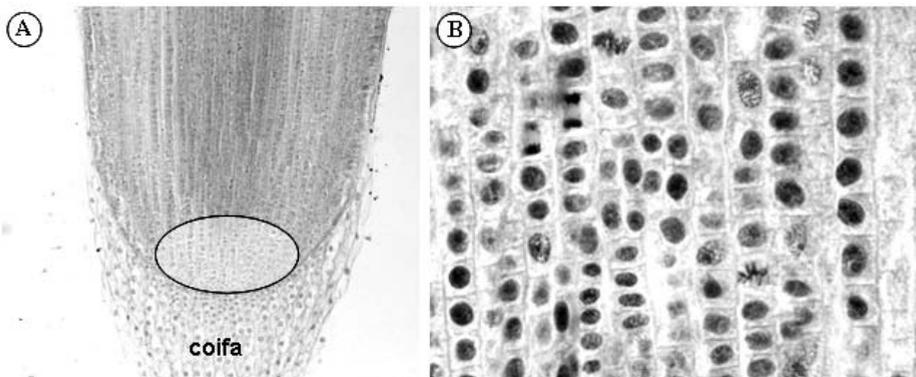


Figura 17 – Secção longitudinal da extremidade apical de uma raiz. Na figura A, a zona destacada corresponde ao meristema apical da raiz o qual se encontra protegido pela coifa. Na zona meristemática as figuras de mitose são comuns e a divisão das células estaminais do meristema origina fiadas longitudinais de células (B) que, à medida que se afastam do ápice, se vão especializando.

3.2.2. Meristema apical do caule

80

O caule é um órgão complexo que compreende um eixo caulinar propriamente dito e as folhas (Fig. 18). Estas são expansões laterais de crescimento limitado e simetria dorsi-ventral. As zonas de inserção das folhas no caule são chamadas nós e os segmentos do caule entre os nós designam-se por entrenós. Como já foi referido, na axila de cada folha existe uma gema axilar com o respectivo meristema (Fig. 18). Estes meristemas, em determinadas circunstâncias podem desenvolver-se e formar ramos laterais. Em muitas espécies, é notória uma repetição de unidades ao longo do caule, formadas por um nó, uma ou mais folhas e um meristema axilar. Tais unidades são chamadas fitómeros. Cada fitómero é, potencialmente, uma planta, uma vez que apenas lhe falta uma raiz para que assim se possa considerar. É nesta repetição de subunidades que se baseia em grande parte o processo de clonagem de plantas, como veremos nas secções seguintes.

O meristema apical caulinar é tipicamente um grupo de 800-1200 células em forma de cúpula de aproximadamente 100 µm de diâmetro (Fig. 19). Todavia, quer o tamanho quer a forma do meristema, nas plantas superiores, são muito variáveis. Além disso, estes meristemas evoluem no decurso do crescimento vegetativo e alteram completamente a sua organização durante a fase de reprodução (evocação floral). Por exemplo, enquanto no tabaco o meristema apical tem cerca de 100 µm de diâmetro em *Arabidopsis* é de cerca de 35-55 µm e contém aproximadamente 50-70 células. Para além da zona meristemática, os outros tecidos e órgãos da parte distal de um rebento constituem o ápice caulinar (Fig. 18). O meristema apical do caule contribui para a edificação da planta através das seguintes funções: iniciação de órgãos, iniciação de tecidos, sinais de comunicação e através da sua própria manutenção.

Dois conceitos diferentes têm sido utilizados para definir diferentes regiões do meristema apical. Um conceito é o da organização em camadas. Em virtude de na maioria das angiospérmicas três camadas celulares serem responsáveis pela formação dos tecidos, o meristema apical foi definido como possuindo 3 camadas designadas por L1, L2 e L3 (L do inglês "layer"). A camada L1 é a mais periférica e as divisões celulares neste local restringem-se ao plano

anticlinal (perpendicular à superfície). Esta camada origina a epiderme nos órgãos diferenciados. As células da segunda camada ou L2 dividem predominantemente no plano anticlinal mas também podem dividir no plano periclinal (paralelo à superfície do órgão) quando os órgãos estão em formação. As células da camada mais interna ou L3 dividem anticlinal e periclinalmente e fornecem células para as partes internas dos órgãos. As camadas L1 e L2 constituem aquilo que vulgarmente se chama tunica enquanto as células da camada L3 e outras localizadas mais internamente formam o corpo.

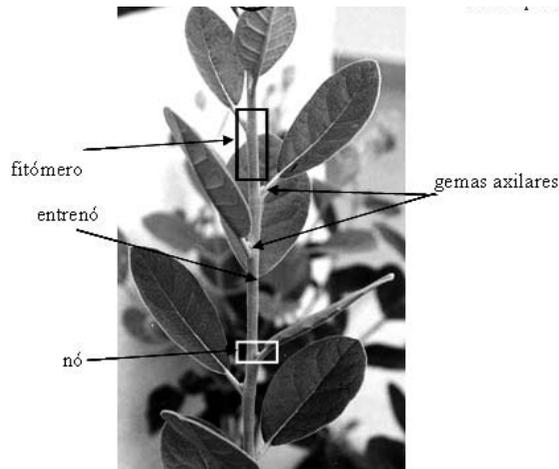


Figura 18 – Extremidade de um caule de feijoa (*Feijoa sellowiana*) mostrando as gemas axilares e a organização do caule em fitómeros.

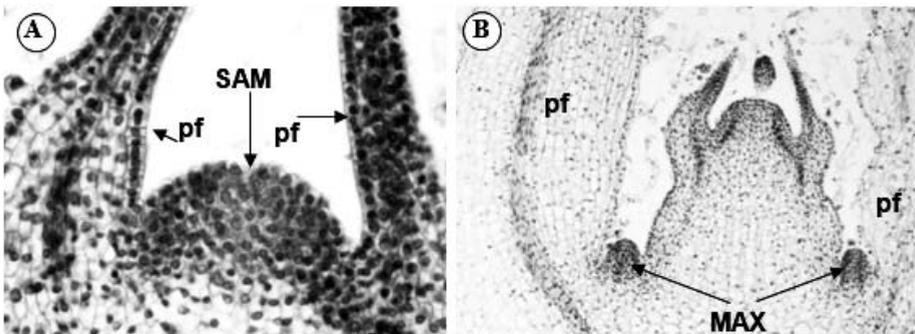


Figura 19 – Zona apical caulinar de *Coleus* sp. Na figura A é visível o meristema apical do caule (SAM) e dois primórdios foliares (pf). A figura B representa uma zona mais alargada do ápice onde se podem observar dois meristemas axilares (MAX).

Um segundo tipo de organização para o meristema apical do caule baseia-se numa divisão em zonas. Neste caso, considera-se o meristema dividido em três zonas: a zona central, a zona periférica e a zona da nervura. A zona central é um grupo de células localizado na parte distal do meristema e inclui células de todas as camadas acima referidas. As células da zona central dividem menos frequentemente e possuem núcleos mais proeminentes que as da zona periférica. As células da zona central comportam-se como iniciais das outras regiões do meristema apical e, deste modo, do próprio rebento. As células da zona periférica originam-se a partir de células da zona central. A zona periférica envolve toda a zona central e a sua principal função é a formação dos primórdios foliares.

Na base do meristema, e actuando como uma zona de transição entre o meristema e as primeiras zonas diferenciadas do rebento, existem as células da nervura. Em virtude disto, a zona da nervura é por vezes considerada como sendo distinta do meristema apical. As células desta zona encontram-se dispostas em fiadas longitudinais e contribuem para a formação dos tecidos na parte central dos rebentos e derivam também de células da zona central. A zona da nervura tem duas possíveis funções: formar os tecidos internos do caule e actuar como centro organizador do caule. A segunda função requer que sinais que entram ou saem do meristema sejam transmitidos, via plasmodesmos, ou por via apoplástica pois não existem conexões vasculares entre o meristema e o resto da planta.

Esta evolução na interpretação da organização dos meristemas tem a ver com o tipo de estudos que se foram realizando ao longo do tempo. De facto, enquanto as primeiras interpretações eram resultado de particularidades das diferentes células, os últimos dados têm mais em consideração as características fisiológicas e genéticas das células, nomeadamente a expressão de determinados genes.

3.3. Objectivos da cultura de meristemas caulinares

Embora a cultura de meristemas seja vulgarmente utilizada para a propagação de plantas em larga escala, ela pode também ser utilizada para

outros objectivos como sejam o estudo do funcionamento do meristema, a conservação de germoplasma e a obtenção de plantas isentas de vírus a partir de material vegetal contaminado.

Em algumas espécies (e.g. *Acacia senegal*) utiliza-se também a cultura de meristemas em processos de microenxertia ou seja, uma enxertia realizada *in vitro*. Nesta situação, o ápice de uma planta adulta é isolado após desinfecção e colocado numa fenda aberta na zona superior do hipocótilo de uma planta jovem obtida por germinação de semente e à qual foi retirado o ápice para evitar o efeito da dominância apical. A gema enxertada desenvolve-se e dá um rebento em que as gemas axilares podem vir a ser utilizadas para uma nova fase de enxertia ou para clonagem *in vitro*. No caso da *Acacia senegal*, o ápice provém desta espécie enquanto o porta-enxertos (planta germinada) é de *Acacia seyal*. Como esta última espécie possui uma repartição ecológica mais vasta que a primeira e utiliza terrenos menos explorados para fins agrícolas, a utilização em plantações de *A. senegal* enxertadas em *A. seyal* poderá permitir uma extensão das zonas de produção de goma arábica (produzida por *A. senegal*).

3.3.1. Funcionamento do meristema

O estudo dos meristemas *in vitro* é uma boa alternativa ao estudo *in vivo* pois aí torna-se difícil isolar os factores específicos envolvidos na manutenção e diferenciação das células meristemáticas. Esta técnica oferece a possibilidade de estudar os mecanismos que controlam o crescimento, a dormência, a expressão de genes homeóticos ou de outros genes, os ciclos reprodutivos e outros processos fisiológicos que ocorrem naquela zona. Estes aspectos, embora de grande interesse, saem do âmbito desta disciplina, pelo que não serão aqui focados. O problema com esta metodologia é que, em muitos casos torna-se difícil isolar apenas o meristema e, noutros casos, a sua manutenção e crescimento *in vitro*, são problemáticos.

3.3.2. Propagação em larga escala

84

É talvez a aplicação mais importante da cultura de meristemas. A cultura de meristemas para a propagação de plantas em larga escala utiliza-se particularmente quando uma espécie é difícil de multiplicar pelos métodos tradicionais ou aquando da produção de novos híbridos em programas de melhoramento vegetal, quando aqueles são necessários em grandes quantidades para ensaios de campo ou para comercialização. Trata-se ainda de uma técnica com interesse na multiplicação de plantas ornamentais que atingem elevados preços no mercado.

Quando um meristema apical (isolado ou englobado na extremidade apical de um caule) é cultivado *in vitro*, num meio de cultura adequado, ele prolifera e dá origem a um novo rebento caulinar (Fig. 20) formado por vários fitómeros. Como estes rebentos desenvolvem gemas ao longo do seu eixo, estas podem ser novamente cultivadas e o processo ser repetido indefinidamente, seguindo a taxa de multiplicação uma progressão geométrica. Pode também acontecer que o meristema em cultura dê origem a inúmeros rebentos que se alongam pouco formando agregados que podem ser divididos em pequenos grupos e subcultivados de forma a obter novas proliferações caulinares (Fig. 20). Em qualquer dos casos, o resultado é a obtenção de um clone a partir do material original.

Desde a cultura do meristema (isolado ou inserido no segmento nodal ou no ápice) até à regeneração completa de plantas existem vários procedimentos que devem ser adoptados e que se podem dividir em 3 fases de acordo com o proposto inicialmente por Murashige (1974): estabelecimento dos explantes *in vitro*, multiplicação e enraizamento. No entanto, e uma vez que a obtenção do material vegetal é um passo crítico neste tipo de micropropagação, e que a transferência das plantas da cultura *in vitro* para solo é também um processo problemático, acrescentam-se às três fases anteriormente referidas uma fase inicial de preparação da planta mãe e uma fase final de aclimatização. Nas secções seguintes são caracterizadas as diferentes fases do processo.

3.3.2.1. Preparação da planta mãe

Esta fase é de grande importância e determina o sucesso das fases subsequentes. Nesta fase seleccionam-se as plantas que vão ser propagadas e englobam-se aqui todos os procedimentos efectuados antes da iniciação das culturas. Estes procedimentos incluem tratamentos que visam evitar futuras contaminações das culturas por fungos e/ou bactérias e condicionamentos ambientais e hormonais da planta mãe ou de partes dela, que a possam tornar mais susceptível à propagação *in vitro*. Assim, a planta mãe deve ser mantida em estufa sob condições de crescimento controlado. Isto evita a forte contaminação que existe em plantas crescidas no campo e, por outro lado, permite à planta manter-se nas suas condições óptimas de crescimento (luz, temperatura e fotoperíodo). A fase de preparação é de grande importância em plantas lenhosas. Nestas espécies, dadas as dificuldades práticas que muitas vezes existem em mantê-las em estufa, removem-se estacas da planta mãe e, sob condições controladas, em estufa, promove-se o desenvolvimento das gemas axilares (Fig. 21, abrolhamento). Estas gemas dão origem a rebentos que podem ser utilizados para extrair os explantes (ápices caulinares ou segmentos nodais) usados na fase de estabelecimento.

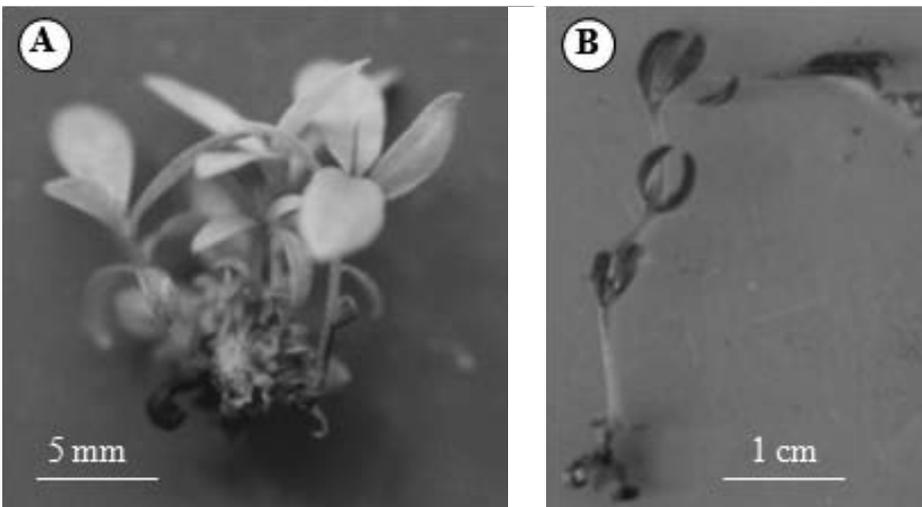


Figura 20 – Dois tipos de resposta obtidos pela cultura de segmentos nodais.

A – Formação de vários rebentos caulinares com alongamento reduzido.

B – Formação de um único rebento com vários nós.

3.3.2.2. Iniciação e estabelecimento das culturas

86

O objectivo desta fase consiste na obtenção de um número considerável de explantes não contaminados e em condições de iniciarem a fase seguinte de multiplicação. Como é óbvio, quanto mais eficaz for esta fase maior o número de explantes disponíveis para as fases seguintes e maior o sucesso do processo de micropropagação. Um grave problema que deve ser considerado durante o estabelecimento *in vitro* de lenhosas é a exsudação de pigmentos castanho-arroxeados, compostos principalmente por taninos e polifenóis oxidados. As plantas concentram quantidades abundantes de fenóis, em especial nas células em crescimento activo. Estes compostos, quando oxidados pelo ar, por peroxidases ou por polifenoloxidases, conduzem ao acastanhamento dos explantes e do meio de cultura. Por oxidação, dão origem a quinonas, as quais podem polimerizar com proteínas levando à necrose dos tecidos. Para ultrapassar esta dificuldade podem adicionar-se ao meio de cultura agentes anti-oxidantes como cisteína, carvão activado, ácido ascórbico, polivinilpirrolidona ou ditiotreitól. A iniciação das culturas no escuro ou a realização de subculturas frequentes são também utilizadas para ultrapassar este obstáculo.



Figura 21 – Desenvolvimento de rebentos numa estaca de medronheiro (*Arbutus unedo*) colocada em estufa a 25°C. Os ápices e os nós destes rebentos servem de base para o estabelecimento de culturas desta espécie.

Nesta fase, deve também ter-se em consideração o tipo de explante utilizado, pois este determina o eventual sucesso ou não da cultura. Em geral, quanto maior for o explante, maiores são as hipóteses de sucesso e menos complexos podem ser os meios de cultura. No entanto, deve também salientar-se que, explantes de maiores dimensões podem levar à proliferação de outras células que não as meristemáticas originando-se um tecido caloso que pode sofrer organogénese. Esta situação deve ser evitada pois com alguma frequência as plantas com origem em calos apresentam modificações que podem comprometer a clonagem do material vegetal seleccionado. Por outro lado, explantes de maiores dimensões são mais susceptíveis de contaminação com microrganismos. Neste tipo de micropropagação podem utilizar-se como já vimos, meristemas, ápices (meristema envolvido por alguns primórdios foliares), zonas apicais (0,5 a 1 cm da extremidade caulinar) ou nós. A fraca capacidade do meristema propriamente dito para ser mantido em cultura está relacionada com a sua separação dos tecidos foliares e do caule subjacente, os quais lhe fornecem as hormonas e outros factores de crescimento de que necessita. Deste modo, é vulgar incluir nos meios de cultura uma citocinina ou, menos vulgarmente, uma combinação de citocinina e auxina. Em virtude do reduzido tamanho do meristema, o seu isolamento é problemático e infringe, com frequência, danos ao meristema que condicionam o seu crescimento ulterior.

Para além da oxidação de compostos fenólicos, a contaminação dos explantes por microrganismos como fungos e bactérias é outro dos principais problemas desta fase. Deste modo, a desinfectação dos explantes de forma eficaz é um passo crítico. Os procedimentos que devem ser adoptados para obstar a esta dificuldade foram já referidos anteriormente. Em algumas espécies lenhosas o problema da infecção é particularmente grave e, apesar dos esforços para esterilizar os explantes, é muitas vezes impossível eliminar os organismos contaminantes, pois alguns deles crescem muito lentamente e são endógenos pelo que a esterilização superficial não os afecta podendo manifestar-se repentinamente em fases mais adiantadas do processo de micropropagação.

Um outro aspecto a considerar é a posição dos explantes na planta mãe. Explantes retirados do ápice estão num estado de desenvolvimento mais

jovem que explantes obtidos na base da planta. Um estado de desenvolvimento mais jovem tem sido considerado como óptimo para a regeneração e, presumivelmente, ápices têm um potencial de regeneração maior que as gemas laterais. Todavia, e uma vez que existe apenas uma gema terminal por planta, muitos investigadores utilizam também meristemas axilares. Explantes mais próximos do ápice estão, normalmente, sujeitos a uma dominância apical mais acentuada enquanto os que se encontram mais afastados com maior facilidade podem ultrapassar essa dominância. Com frequência são utilizados ápices de plantas obtidas por germinação de sementes. Embora nestes casos haja a vantagem das culturas dificilmente sofrerem contaminação, e de se tratar de explantes jovens com grande capacidade morfogénica, há a desvantagem dos genótipos das plantas regeneradas não serem conhecidos e de não haver uma uniformidade no conjunto das plantas regeneradas.

Como já foi referido, durante esta fase, as citocininas são componentes fundamentais dos meios de cultura. Embora uma reduzida quantidade de citocininas possa ser sintetizada pelos rebentos *in vitro* as raízes são o principal sítio para a sua biossíntese. Tendo em consideração que os explantes utilizados nesta técnica não possuem sistema radicular, a taxa de síntese de citocininas deve ser reduzida, pelo que a sua inclusão no meio é recomendada. As citocininas têm essencialmente duas funções: quebram a dominância apical e promovem o desenvolvimento dos meristemas. Para além disso, podem retardar a senescência dos tecidos evitando assim a sua necrose e eventuais danos resultantes nas zonas meristemáticas. As zonas meristemáticas são locais activos na síntese de auxinas pelo que a necessidade de incluir auxinas no meio não parece ser tão premente como no caso das citocininas. Dada a capacidade que as auxinas têm de promover a formação de calos com os problemas que daí podem surgir, a inclusão de auxina pode revelar-se mesmo desaconselhável.

3.3.2.3. Multiplicação

A fase de multiplicação está muito dependente da forma com os explantes inoculados *in vitro* se comportam na fase de estabelecimento. Assim, pode acontecer, que o ápice ou os segmentos nodais colocados *in vitro*

originem um rebento caulinar o qual, ao fim de um determinado tempo, por exemplo, um mês, irá possuir vários fitómeros. Supondo que esse explante forma um rebento com 6 fitómeros (Fig. 22) após o primeiro mês, e se estes forem isolados e colocados de novo *in vitro*, no segundo mês teremos 36 fitómeros (6 por cada um dos inicialmente formados). A manter-se esta taxa de propagação potencial, em cada mês o número de novos fitómeros seria multiplicado por 6 segundo a fórmula F^s em que F representa o número de fitómeros após a primeira cultura e s o número de subculturas. Como é fácil de compreender a taxa de propagação vai depender da frequência com que novos fitómeros são formados a qual depende, por sua vez, do meio de cultura e da actividade do meristema, em particular do seu plastocrono ou seja do período de tempo que medeia entre a formação de dois primórdios foliares consecutivos (ou dito de outra maneira, de dois novos meristemas axilares consecutivos). Sendo assim, quanto mais reduzido for o plastocrono maior será a taxa de multiplicação. Daquilo que acabou de ser exposto facilmente se compreende que o número de plantas que potencialmente se pode obter é muito elevado. De acordo com as condições acima referidas, no final de 12 meses seriam obtidas mais de 2000 milhões de plantas a partir de um único explante. Na realidade, laboratórios de investigação ou laboratórios de pequena ou média dimensão dificilmente podem manipular um tão grande número de propágulos pelos que estes valores devem ser vistos apenas como valores potenciais.

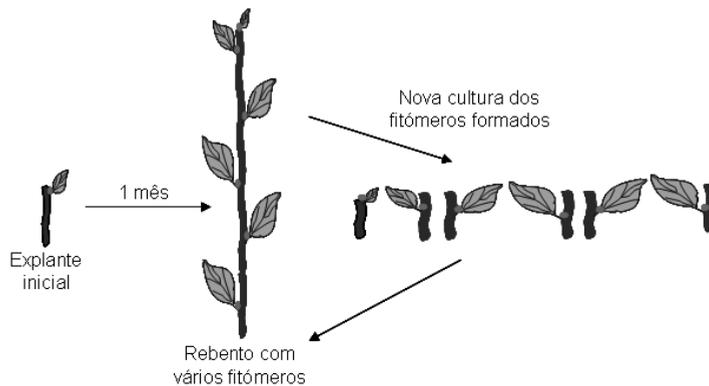


Figura 22 – Esquema ilustrativo do processo de micropropagação através da cultura de segmentos nodais.

Como já foi referido outras espécies, em vez de formar um rebento inicial com vários fitómeros dão origem a massas de rebentos com reduzido alongamento. Este comportamento é muito vulgar em plantas com hábito em roseta mas pode também surgir noutras espécies. Nestes casos, a propagação pode ser obtida através da fragmentação de uma massa em massas mais pequenas voltando a realizar novas culturas. Obtêm-se assim novos aglomerados de rebentos que podem também ser propagados periodicamente originando igualmente um grande número potencial de rebentos caulinares. O problema nestes casos é conseguir o seu enraizamento devendo ser criadas condições, através da manipulação do meio de cultura, que permitam o alongamento dos rebentos caulinares, por exemplo aplicando ácido giberélico às culturas.

Em qualquer dos tipos de resposta referidos a fase de multiplicação requer, por regra, a presença de citocininas embora algumas espécies possam ser propagadas sem recurso a reguladores de crescimento. O tipo mais adequado de citocinina bem como a respectiva concentração deve ser determinado para cada espécie, já que os níveis endógenos e os mecanismos de inactivação podem também ser diferentes de espécie para espécie.

O principal objectivo desta fase é produzir o maior número possível de propágulos geneticamente uniformes que possam vir a ser enraizados na fase seguinte. Deste modo, e à semelhança do que foi referido na secção precedente, a formação de calos deve ser evitada e, por essa razão, os meios de multiplicação não devem conter auxinas. Alguns compostos com actividade de citocininas, como o tidiazurão, promovem também a formação de calos pelo que a sua aplicação deve ser cuidadosamente escrutinada.

3.3.2.4. Alongamento e enraizamento dos rebentos

No decurso desta fase procede-se ao enraizamento dos rebentos caulinares formados nas fases anteriores de forma a obter plântulas que possam ser transferidas para solo. Em alguns casos, quando os rebentos formados não possuem as dimensões adequadas ($< 1\text{cm}$), é necessário proceder ao seu alongamento, se necessário sob o efeito promotor de giberelinas.

No entanto, em alguns casos, tem sido referido que o contacto dos explantes com giberelinas pode afectar negativamente o seu enraizamento posterior.

Em algumas espécies, o enraizamento pode ser conseguido pela simples passagem dos rebentos do meio de multiplicação para um meio sem reguladores de crescimento, como acontece em herbáceas. É também frequente reduzir-se a força iónica do meio baixando para metade a concentração dos macronutrientes utilizados o que pode ser acompanhado pela redução simultânea da concentração de sacarose. O mesmo já não se verifica quando se trata de espécies lenhosas, onde a maturação é acompanhada por uma diminuição da capacidade rizogénica. Nestas espécies, este passo é talvez o mais difícil de conseguir sendo frequentemente um factor limitante da clonagem. Um dilema com que muitas vezes os investigadores se deparam em espécies lenhosas é que, quando as plantas estão suficientemente desenvolvidas para avaliar os traços superiores, torna-se difícil (ou mesmo impossível) propagá-las devido à sua fraca capacidade de enraizamento.

O enraizamento pode também ser provocado *ex vitro*. Neste caso, os rebentos são directamente enraizados no substrato de aclimação após imersão rápida numa solução ou num gel muito concentrados de auxina (choque auxínico). Esta metodologia é simples e quando a ela se pode recorrer reduz consideravelmente os custos do processo.

Consideram-se normalmente 3 fases no enraizamento: indução, iniciação e alongamento. Uma vez que as duas primeiras fases são difíceis de distinguir uma da outra reduz-se, em regra, o processo a duas fases: a iniciação e o alongamento.

Para a iniciação de raízes adventícias uma auxina é geralmente aplicada. As auxinas mais usadas são o NAA e o IBA sendo esta última, normalmente, mais eficaz. Todavia, após a formação das raízes, a presença de auxina inibe o crescimento ulterior pelo que os rebentos, já com as raízes iniciadas, devem ser transferidos para meios sem auxina de forma a promover o crescimento radicular (Fig. 23). As concentrações e os tempos de exposição às auxinas variam de espécie para espécie. Concentrações muito elevadas de auxina ou períodos de exposição alargados podem conduzir à formação de calos na base dos rebentos caulinares (Fig. 23) só depois ocorrendo a formação de raízes. Nestas situações, a conexão entre o sistema vascular

do caule e das raízes adventícias é, muitas vezes, deficiente, impedindo a conclusão do processo de micropropagação.

Em alguns casos, tem sido referido que compostos fenólicos podem promover o enraizamento devido à sua interação com auxinas. Grande atenção tem sido dada ao composto florazina e a um seu subproduto o floroglucinol. Estudos anatómicos e citológicos mostraram que o floroglucinol promove a diferenciação de xilema e de cloroplastos. Foi também observado que níveis elevados de floroglucinol endógeno favorecem o enraizamento. Esta acção é explicada pelo papel protector deste composto na auxina pois ele é um substrato alternativo para a IAA-oxidase ou peroxidases levando a um aumento dos níveis de IAA. Fenóis simples podem ainda ser importantes no enraizamento pois eles são substrato para a lenhificação das paredes celulares.

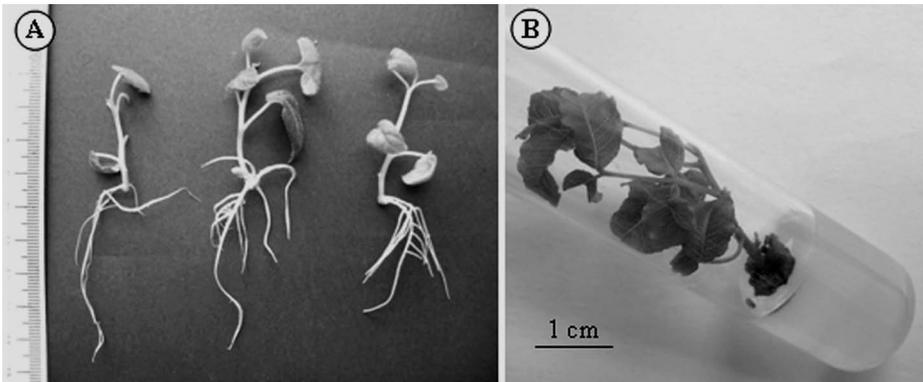


Figura 23 – Enraizamento de rebentos caulinares. A – Plântulas de tamarilho (*Cybomandra betacea*) enraizadas após tratamento com IBA. B – Calo na base de rebentos caulinares de alfarrobeira (*Ceratonia siliqua*).

A neoformação de meristemas da raiz num rebento resulta sempre de uma diferenciação celular que leva à produção de células meristemáticas e à organização de um esboço meristemático (Fig. 24). As raízes assim produzidas têm geralmente uma origem profunda. Frequentemente, elas são formadas a partir de zonas próximas dos tecidos vasculares (Fig. 24). Em alguns casos, e como já foi referido, elas podem também ser formadas na base de um calo. Podem ainda ser iniciadas a partir de células epidérmicas.

Nesta última situação dizem-se exógenas enquanto as de origem profunda são denominadas endógenas. A origem das raízes não é indiferente e a formação de raízes com origem em tecidos periféricos pode também reduzir o sucesso da micropropagação pois estas são incapazes de estabelecer ligações eficazes com o sistema vascular do caule. Deste modo, o processo de enraizamento deve ser monitorizado por estudos histológicos que permitam verificar a origem das raízes.

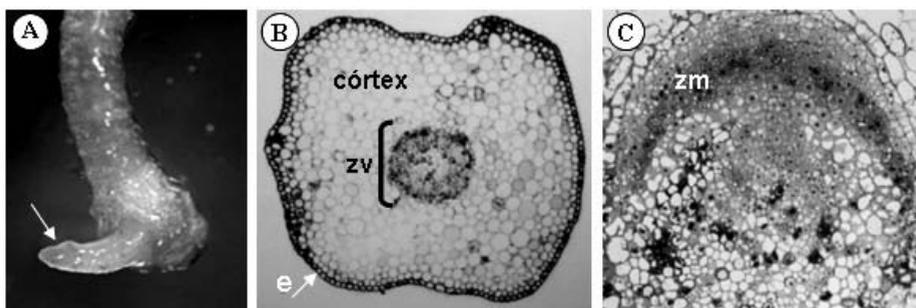


Figura 24 – Origem das raízes adventícias. A – Zona basal de um rebento caulinar de feijoa onde se pode observar uma raiz (seta) em crescimento. B – Corte anatómico do caule antes da indução de enraizamento. C – Início da diferenciação de uma raiz. Notar a organização de uma zona meristemática (zm). e – epiderme, zv –zona dos tecidos vasculares.

Para além de factores hormonais (fisiológicos) outros factores intervêm no processo de enraizamento. Várias experiências têm mostrado que a capacidade de formação de raízes parece estar sob controlo genético. O facto de existirem diferenças na resposta entre espécies de um mesmo género e mesmo entre variedades ou cultivares de uma mesma espécie indica que determinadas combinações genéticas são mais favoráveis que outras para o enraizamento. Outros dados experimentais mostram que existem mutações que podem limitar a capacidade de enraizamento e, finalmente, em algumas espécies, a formação de raízes é espontânea não necessitando de condições especiais.

Outros factores fisiológicos como a idade da planta mãe (plantas na altura da floração são difíceis de enraizar), a estação do ano, o tamanho dos rebentos (variações na presença de hormonas), a presença de gemas ou folhas (locais de síntese de auxinas) e o facto das raízes serem sempre

formadas no pólo fisiológico basal do rebento sugerem o envolvimento de hormonas no processo.

Factores físicos como o stresse hídrico através do seu efeito no metabolismo hormonal e, altas temperaturas, através de um aumento da actividade metabólica, promovem também o enraizamento.

A diminuição da concentração de sais no meio (1/2 - 1/4 dos sais do meio MS) ou a inclusão de carvão activado, um composto que adsorve compostos deletérios presentes no meio de cultura, têm também sido apontados como factores que promovem o enraizamento.

Embora se saiba que as auxinas são factores essenciais ao enraizamento dos rebentos o mecanismo de acção subjacente a este processo não é conhecido. Um aumento da actividade peroxidásica em algumas espécies parece estar associado à diferenciação de raízes adventícias. As auxinas, utilizadas como agentes indutores do enraizamento, promovem a extensibilidade da parede celular e, por outro lado, induzem síntese proteica e de DNA e RNA o que parece indicar uma acção ao nível dos genes. Todavia, que gene ou genes estão envolvidos neste tipo de morfogénese e a razão porque o desenvolvimento posterior de um grupo de células meristemáticas é orientado no sentido da formação de raízes e não nouro tipo de morfogénese permanece obscuro.

3.3.2.5. Aclimatização das plantas regeneradas

Durante esta fase as plantas produzidas *in vitro* passam de condições heterotróficas para condições autotróficas ficando sujeitas a condições de stresse muito severas, nomeadamente no que diz respeito à humidade, temperatura, luz e contaminações, sendo frequente a ocorrência de taxas de mortalidade elevadas.

Os problemas mais importantes são, todavia, a dessecação e infecções. A perda de água acentuada por estas plantas é devida a uma elevada relação entre a taxa de transpiração e a taxa de absorção, situação que pode ser explicada por vários factores. Assim, muitas das plantas regeneradas *in vitro* apresentam quantidades reduzidas de cêras epicuticulares, grandes espaços intercelulares, e deficiências na resposta dos estomas ao stresse

hídrico. Além disso, as raízes recém formadas nos rebentos apresentam, por vezes, uma fraca conexão vascular com os restantes órgãos, dificultando o transporte de água e nutrientes às regiões em crescimento activo. Deste modo, um período de aclimação (Fig. 25), variável segundo as espécies, e em que gradualmente se vai reduzindo o teor de humidade, é normalmente adoptado. Durante este período espera-se que as plantas sofram modificações fisiológicas e anatómicas que lhes permitam adaptar-se ao ambiente natural.

A micorrização das plantas produzidas *in vitro* (Fig. 25), ou seja, a associação das suas raízes com hifas fúngicas que lhes fornecem nutrientes e água necessárias ao seu desenvolvimento pode facilitar a aclimação como acontece, por exemplo, no sobreiro ou no medronheiro. Ensaios de micorrização têm mostrado que após transferência para solo as plantas micorrizadas apresentam taxas de crescimento mais elevadas que as plantas não micorrizadas. Também interessante é a possibilidade de alguns dos fungos utilizados na micorrização poderem vir a produzir cogumelos, constituindo uma possível fonte suplementar de rendimento para os agricultores.

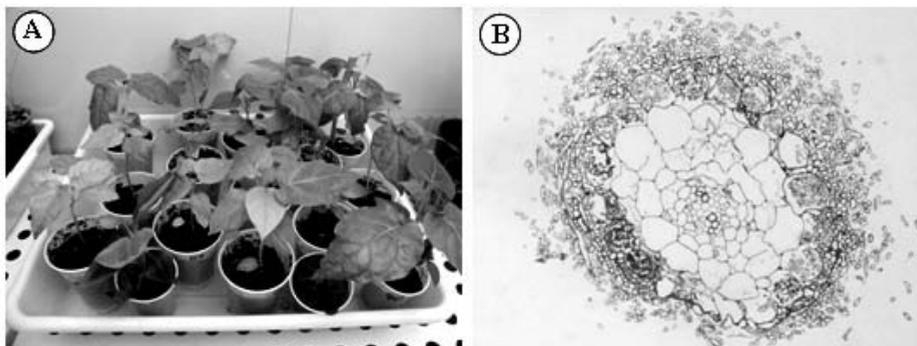


Figura 25 – Aclimação de plantas produzidas *in vitro*. A- plantas de tamarillo em estufa antes da passagem para solo. B- Corte transversal de uma raiz de uma planta de medronheiro micorrizada.

O solo para o qual as plantas são transferidas deve também estar esterilizado de forma a evitar contaminações que nesta fase do crescimento teriam consequências muito graves.

De uma maneira geral, é necessário realizar um grande número de ensaios testando muitas variáveis em cada fase da cultura de forma a otimizar

o processo de regeneração da espécie que pretendemos multiplicar. A figura 26 resume o processo de obtenção de plantas por proliferação de meristemas.

3.3.3. Multiplicação de plantas isentas de vírus

A eliminação de vírus vegetais é difícil. As plantas não possuem um sistema imunitário que lhes permita defenderem-se de ataques por vírus embora, como veremos mais adiante, tenha sido possível, em algumas espécies, “vacinar” plantas por transformação genética (capítulo 9). Além disso, alguns inibidores da multiplicação de vírus são tóxicos para as plantas e quando o tratamento cessa os vírus voltam a proliferar. Uma alternativa pode ser o ataque aos vectores responsáveis pela dispersão dos vírus como insectos ou nemátodes. No entanto, muitos destes vectores são difíceis de controlar com pesticidas e estes são nocivos para o meio ambiente. Como solucionar este problema? Felizmente, a maioria dos vírus conhecidos não são transmitidos através da semente e as sementes de plantas infectadas originam plantas saudáveis. Todavia, em muitas espécies em que é necessário manter um determinado genótipo para fins comerciais ou de melhoramento, como acontece por exemplo nas videiras, a multiplicação tem que ser realizada por intermédio de multiplicação vegetativa pelo que os vírus vão sendo transmitidos pondo em perigo determinados clones.

Uma forma de evitar esta situação é fazendo uso da cultura *in vitro* de meristemas. Esta técnica é um resultado das observações de White (1934) no tabaco que cultivando raízes de plantas desta espécie infectadas com o vírus do mosaico do tabaco conseguia obter linhas isentas de vírus. Também Limasset e Cornuet (1949) observaram que em plantas do tabaco infectadas com vírus a quantidade de vírus decrescia à medida que a distância ao ápice diminuía. No ápice propriamente dito não se detectaram vírus. Isto levou Morel e Martin (1952) a postularem que seria possível isolar o meristema apical de uma planta infectada, cultivá-lo *in vitro*, e obter plantas isentas de vírus que eram uma réplica perfeita da planta mãe. Este postulado foi comprovado inicialmente em dalias, mais tarde na batateira e ulteriormente em inúmeras espécies (e.g. *Musa*, *Ipomoea*,

Gladiolus, Malus, Liliun, Cymbidium, Dianthus, Brassica, Fragaria). Obviamente, a regeneração de plantas isentas de vírus, não implica imunidade a uma posterior infecção viral.

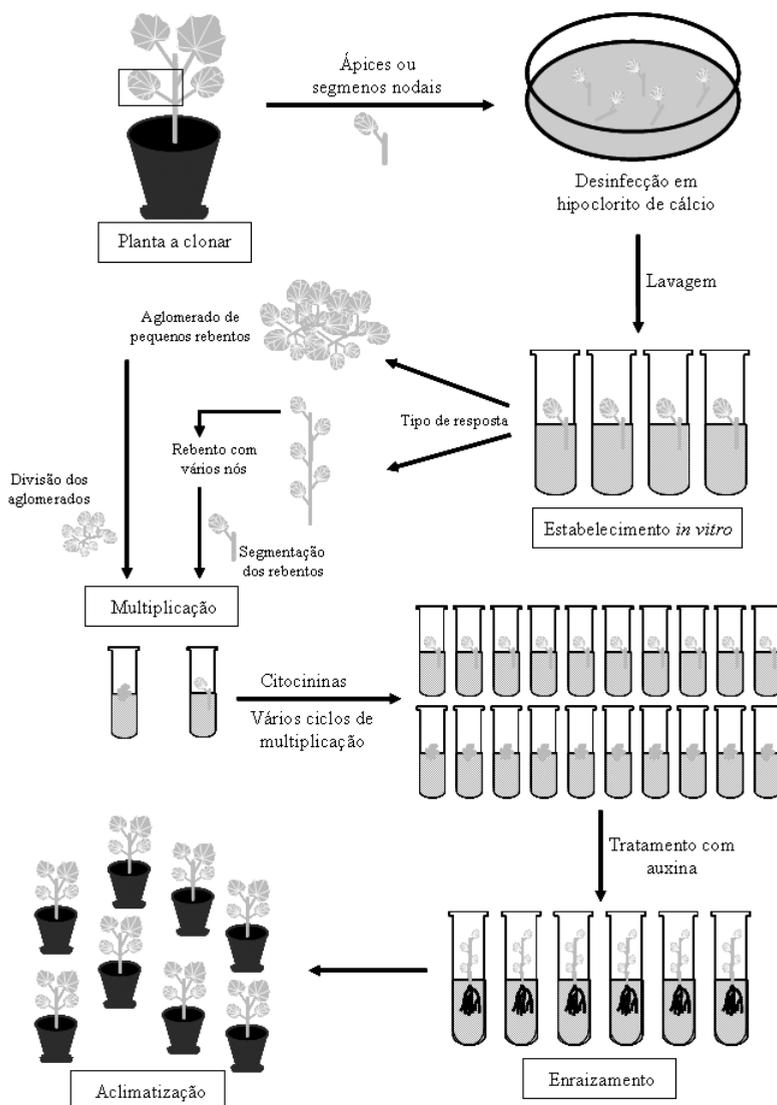


Figura 26 – Representação esquemática do processo de propagação de plantas *in vitro* através da proliferação de meristemas.

Ao contrário do que acontece quando a cultura de meristemas é utilizada com o objectivo da propagação em massa, neste caso devem isolar-se explantes tão pequenos quanto possível. De facto, como foi referido anteriormente, quanto maior for o explante maior será a possibilidade de ele se encontrar infectado. Normalmente são utilizados meristemas com um ou dois primórdios foliares dada a dificuldade em isolar e manter o meristema propriamente dito. A presença de primórdios foliares parece ser mais importante que o volume do tecido utilizado dada a síntese de hormonas vegetais que deve ocorrer nestas estruturas.

Para além de permitir a regeneração de plantas isentas de vírus esta metodologia permite ainda estudar as interacções entre vírus e meristemas e manter reservas de material isento de vírus que em caso de necessidade possa rapidamente substituir o material de campo.

De forma a obter melhores resultados a cultura de meristemas é muitas vezes associada a uma termoterapia, em que se utilizam temperaturas relativamente elevadas. Normalmente o tratamento pelo calor é aplicado à planta mãe antes da excisão do meristema, embora em alguns casos o tratamento possa ser simultâneo, ou seja, aplicado ao meristema já em cultura. As temperaturas utilizadas e os períodos de tratamento são variáveis segundo as espécies. Temperaturas de 30-35 °C são usadas com frequência por períodos de 4-12 semanas. Por norma, quanto maior for a temperatura, menor deverá ser o período de exposição. Como o calor pode afectar o metabolismo e diminuir o crescimento, são necessários testes para determinar quanto tempo e que temperaturas os meristemas conseguem suportar sem serem afectados. Em algumas situações, como em *Pelargonium*, tem-se verificado que a aplicação de temperaturas elevadas conduz ao aparecimento de variantes situação que interfere com a uniformidade genética dos clones.

A razão pela qual os vírus não ocorrem nas regiões meristemáticas de algumas espécies ou, embora existindo não se multiplicam de forma activa, não está esclarecida. Nos anos 50 sugeriu-se que uma elevada concentração de reguladores de crescimento nas zonas meristemáticas seria responsável por esta situação mas esta hipótese nunca foi provada. Experiências realizadas com suspensões celulares de tabaco sugeriram a existência de competição entre a divisão celular e a taxa de multiplicação dos vírus.

Em suspensões dividindo activamente a quantidade de vírus era menor. Deste modo, em locais dividindo activamente, a maquinaria celular responsável pela divisão celular sobrepor-se-ia às vias necessárias para a produção de novos vírus, enquanto em fases de menor divisão celular seriam as proteínas virais a serem predominantemente sintetizadas. Outras observações mostraram, em ápices radiculares, uma estreita relação entre zonas sem vírus e uma maior actividade mitótica através da inclusão de um inibidor no meio de crescimento das raízes. Verificou-se que à medida que a zona em que as células dividiam activamente diminuía aumentavam as zonas onde os vírus de encontravam. Uma outra hipótese para o reduzido número de vírus observado nas zonas meristemáticas está relacionada com o facto das células meristemáticas com um intenso metabolismo poderem segregar algum composto que impeça a multiplicação dos vírus. Todavia, nenhum composto com essas propriedades foi ainda isolado.

3.3.4. Conservação de germoplasma

A preservação de germoplasma é um meio de assegurar a disponibilidade de materiais genéticos quando as necessidades se manifestam. Uma vez que a maioria das sementes e órgãos vegetativos têm uma capacidade de sobrevivência limitada, a investigação tem sido centrada no desenvolvimento de procedimentos que permitam aumentar a esperança de vida. Para muitas espécies, a semente é o meio mais adequado para a preservação dada a sua reduzida quantidade de água que permite que as células sobrevivam a baixas temperaturas. No entanto, em alguns casos, é difícil obter sementes ou torna-se complicado fazê-las germinar. Nesses casos, a manutenção de ápices cujas células possuem um citoplasma denso com um reduzido volume vacuolar, a baixas temperaturas (4-9 °C) ou criopreservados (-196 °C em azoto líquido) pode ser um método alternativo para a preservação.

A cultura de meristemas tem também sido aplicada à conservação de espécies em risco de extinção. De facto, em muitas espécies têm sido desenvolvidos protocolos que permitem a obtenção de um grande número de plantas que se encontram ameaçadas. Estas plantas podem depois ser

reintroduzidas na natureza ou mantidas *in vitro* por períodos alargados de tempo. Vários jardins botânicos, como o de Kew, em Londres, ou o de S. Louis no Missouri, têm projectos deste tipo.

3.4. Vantagens da cultura de meristemas

Relativamente a outras técnicas de clonagem de plantas *in vitro*, a principal vantagem da cultura de meristemas é que não é necessária a indução de novos meristemas pois eles já existem no explante. Noutros métodos de regeneração é necessário induzir a formação de gemas ou de embriões como veremos adiante. Isto reduz consideravelmente o tempo de regeneração. Além disso, como não ocorre formação de calo, não há perigo de se obterem variantes e todas as plantas regeneradas são genética e fenotipicamente idênticas à planta mãe. Noutros tipos de regeneração, em que a formação de um calo é frequente, podem ocorrer anomalias cromossómicas ou genéticas que conduzem à regeneração de variantes (plantas diferentes da original). Este assunto será abordado com maior profundidade em capítulos seguintes.

Uma terceira vantagem desta técnica é que a multiplicação de plantas é exponencial, sendo multiplicada por um determinado factor em cada geração. Pelo contrário, na indução de organogénese ou de embriogénese somática o processo é inverso, embora existam excepções. De facto enquanto numa fase inicial o número de plantas regeneradas pode ser maior que o obtido por cultura de meristemas, à medida que as culturas envelhecem elas perdem a capacidade de regeneração e a taxa de multiplicação decai rapidamente.

3.5. Limitações da técnica

Apesar das vantagens que referimos na secção anterior esta técnica, como todas as outras, não é perfeita apresentando algumas limitações que se devem ponderar.

A primeira limitação é o elevado custo das plantas regeneradas. Deste modo, esta técnica é essencialmente utilizada com espécies de elevado valor comercial como se verifica com as orquídeas e outras espécies ornamentais. O custo resulta essencialmente da mão-de-obra e da manutenção do

equipamento embora o preço dos reagentes seja também um importante factor a considerar. A utilização de sistemas automatizados para a realização das culturas e o estabelecimento de protocolos mais eficazes de propagação são aspectos que podem contribuir para uma redução dos custos de produção. Apesar disso, muitas companhias utilizam esta metodologia ou outras técnicas de clonagem *in vitro* para a propagação em larga escala.

Esta técnica também não é a ideal para a regeneração de plantas a partir de células geneticamente transformadas. De facto, para obter plantas geneticamente transformadas é necessário introduzir um determinado gene numa célula e, numa fase ulterior, obter uma planta a partir dessa célula. Isto significa que as plantas devem ter uma origem unicelular. Tendo em consideração que num meristema existe um número muito elevado de células, e que em caso de transformação genética apenas algumas delas incorporariam o gene de interesse, as plantas regeneradas apresentariam sectores transformados e sectores não transformados, sendo portanto quimeras.

Algumas espécies, especialmente as lenhosas são difíceis de multiplicar por este método, pelas razões que vimos anteriormente. Para além disso, sempre que é necessário incorporar uma auxina no meio de cultura, pode acontecer que alguns dos rebentos surjam, não de meristemas axilares, mas de pequenos calos incipientes e dificilmente visíveis a olho nú. Neste caso, tal como referimos anteriormente, pode haver a produção de variantes, colocando em risco o processo de clonagem.

Outro problema relaciona-se com o facto de quando se utilizam explantes de plantas adultas, o crescimento destes explantes pode ser muito lento e manter o mesmo tipo que observado na planta mãe (plagiotropismo). Além disso, e de uma maneira geral, os rebentos originados de plantas adultas são mais difíceis de enraizar. Deste modo, em muitos casos torna-se necessário rejuvenescer as culturas ou seja fazer com que os ápices dessas plantas em cultura apresentem um crescimento vigoroso semelhante ao de explantes de plantas jovens. A recuperação pelo ápex de caracteres morfológicos e fisiológicos juvenis parece ser favorecida por factores como a eliminação das correlações entre o meristema e a planta mãe o que corresponde, na prática a utilizar explantes tão pequenos quanto possível, e à realização de subculturas frequentes. Por outro lado, a reversão a um estado juvenil

apresenta desvantagens como sejam, por exemplo, o retardar da floração. Todas as plantas têm um período juvenil no seu ciclo de vida, durante o qual são incapazes de produzir flores. Este período varia de forma acentuada entre as diferentes espécies. Algumas espécies anuais são capazes de florir alguns dias ou semanas após a germinação enquanto algumas lenhosas, como as faias, não florescem antes dos 30 anos. Além disso, em algumas espécies, como acontece no género *Episcia* existe um dimorfismo foliar e as folhas no estado juvenil são pouco apreciadas e têm pouco valor comercial.

A reversão dos meristemas ao estado floral é também um factor limitante desta técnica embora este processo não seja muito frequente. Apesar do aspecto negativo em termos de micropropagação a floração *in vitro* pode ser utilizada para estudo dos mecanismos responsáveis pela indução e desenvolvimento dos órgãos florais ou para ensaios de fertilização *in vitro*.

Em alguns casos tem sido também assinalada uma habituação às citocininas. Essa habituação manifesta-se quando os explantes são submetidos durante longos períodos de tempo à acção de citocininas ou então durante períodos mais curtos mas com concentrações mais elevadas deste tipo de hormonas. Quando assim acontece, um suplemento exógeno de citocininas deixa de ser necessário para uma multiplicação continuada. Em geral, uma habituação às citocininas tem como efeito dificuldades posteriores no enraizamento devido, provavelmente, aos altos níveis endógenos de citocininas que os rebentos devem possuir.

Outro problema é a formação de plantas com folhas translúcidas e com um aspecto muito hidratado, um processo normalmente conhecido por vitrificação ou hiperhidricidade. Estes rebentos têm, normalmente, taxas de crescimento mais reduzidas e são difíceis de enraizar. A vitrificação está relacionada com factores ambientais e do próprio meio de cultura e pode ser sintomática de mais do que uma desordem fisiológica.

A nível anatómico a vitrificação manifesta-se pela existência de um parênquima em paliçada pouco desenvolvido e de um parênquima lacunoso com extensos espaços intercelulares. Além destas anomalias, a epiderme apresenta uma reduzida deposição de cêras epicuticulares enquanto os estomas surgem frequentemente mal formados não respondendo a variações de luminosidade, presença de CO₂ ou de ABA. O deficiente funcionamento

dos estomas parece estar relacionado com a presença de altos níveis de Na^+ nas células guarda, podendo este ião ter um efeito negativo no movimento de K^+ necessário para a abertura e fecho dos estomas. Todos estes factores são responsáveis por um aumento da taxa de transpiração das plantas.

A nível fisiológico a vitrificação interfere com a fotossíntese e com as trocas gasosas nas plantas. De facto, nas plantas vitrificadas ocorre uma lenhificação deficiente e uma reduzida síntese de celulose, factores que afectam a rigidez e extensibilidade da parede celular. Estas modificações da parede celular afectam as relações hídricas das células vegetais, sendo responsáveis por uma diminuição da pressão de turgescência que leva a uma maior absorção de água.

Duas hormonas vegetais parecem estar estreitamente relacionadas com o aparecimento de plantas vitrificadas: o etileno e as citocininas. Um excesso de etileno conduz a uma hipolinhificação devido a um decréscimo nas actividades das enzimas fenilalanina amónia liase (PAL) e da hidroxilase cinâmico CoA-ligase.

Quanto às citocininas, embora se saiba que a sua concentração está relacionada com a vitrificação, pouco se conhece sobre os mecanismos responsáveis por esse efeito. Elas parecem contribuir para um distúrbio da relação entre a ocorrência de divisões celulares e a diferenciação, promovendo as primeiras e afectando a última através da inibição da síntese de lenhina

Finalmente, deve referir-se que algumas espécies são particularmente difíceis de multiplicar por este método. Essa dificuldade resulta, em grande parte, de problemas na fase de estabelecimento visto que ocorrem com frequência contaminações sendo também muito comum a produção e exsudação de compostos fenólicos que promovem a necrose dos tecidos.

3.6. Indução de organogénese

Segundo T. Thorpe, organogénese é o processo pelo qual células e tecidos são induzidos a sofrer determinadas modificações que levam à produção de uma estrutura unipolar, nomeadamente um primórdio radicular ou caulinar (flores podem também ser formadas), cujo sistema vascular está em conexão

com os tecidos de origem. Ao contrário do tipo de micropropagação abordado nas secções anteriores, em que os meristemas já existiam, neste caso trata-se da indução *de novo* de meristemas. Os meristemas produzidos *in vitro* são um caso particular de meristemas adventícios, sendo semelhantes aos produzidos *in vivo* por algumas plantas. Para não serem confundidos é vulgar denominar os meristemas produzidos *in vitro* por meristemas de neoformação. Embora, como referimos, a formação de raízes também seja um exemplo de organogénese, em termos de micropropagação interessa apenas obter gemas caulinares que, após sofrerem alongamento e darem origem a rebentos, possam ser enraizadas e formar plantas.

Existem dois tipos de processos que podem levar à regeneração de plantas por organogénese e que são denominados organogénese directa e indirecta. No primeiro caso, num explante cultivado num meio de cultura formam-se meristemas adventícios (Fig. 27) que se desenvolvem em rebentos caulinares e que, depois de enraizados, formam novas plantas. Na organogénese indirecta, um processo mais comum, há primeiro a formação de um calo a partir do qual se diferenciam gemas, seguindo-se depois um processo de enraizamento tal como no primeiro caso. Existem espécies em que a organogénese pode levar à formação não de rebentos caulinares, mas sim de outras estruturas reprodutoras como tubérculos, na batateira (Fig. 27) ou bolbos, em liliáceas (Fig. 27). Em algumas espécies tem sido observada a formação de nódulos organogénicos, estruturas compactas, de forma esférica que se podem multiplicar de forma autónoma e que, em determinadas circunstâncias podem evoluir em rebentos caulinares.

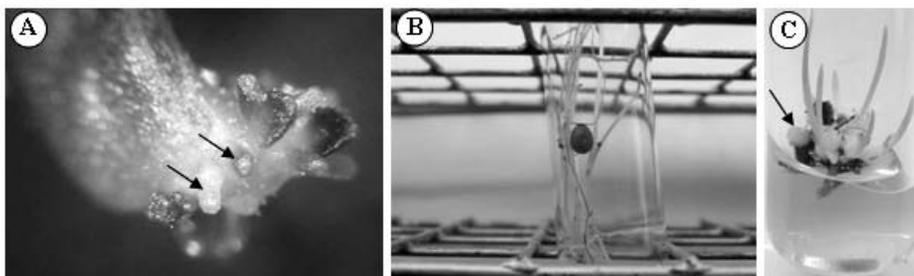


Figura 27 – Aspectos da indução de organogénese. A – Fase inicial da formação de rebentos (setas) em folhas de *Bryophyllum tubiflorum*. B – Microtubérculo de batateira (*Solanum tuberosum*) formado *in vitro*. C – Estruturas bulbosas (setas) em culturas de *Bellevalia hacketii*.

Embora vários factores possam influenciar a resposta organogénica, desde há muito que se conhece que este tipo de morfogénese é regulado por um balanço entre auxinas e citocininas. De facto, os trabalhos de Skoog e Miller no final da década de 50 na medula do tabaco mostraram que auxinas e citocininas eram necessárias para que divisões celulares e alongamento ocorressem. No entanto, o tipo de resposta morfogénica obtida dependia mais da relação das concentrações entre estes dois tipos de reguladores de crescimento do que das respectivas concentrações absolutas. Assim, uma elevada relação auxina/citocinina favorecia a formação de raízes enquanto uma situação inversa era responsável pela formação de gemas caulinares. Quando apenas a auxina estava presente ocorria a formação de calos. Respostas similares foram obtidas em muitas outras espécies embora nem sempre este tipo de resposta em função das concentrações exógenas de reguladores de crescimento aplicadas se verifique. De facto, os níveis endógenos de hormonas são também muito importantes no controlo da organogénese.

Para além das auxinas verificou-se que outros compostos podem também afectar a resposta organogénica. É o caso dos oligossacarídeos, hidratos de carbono de baixo peso molecular formados por um número reduzido de resíduos, e resultantes da clivagem de componentes da parede celular pela acção de enzimas. Estes compostos, quando adicionados a determinados sistemas de cultura, como as "thin cell layers" (camadas finas de células) induzem uma resposta organogénica a concentrações da ordem de 100-1000 vezes inferiores às concentrações de auxinas e citocininas necessárias para induzir organogénese. É provável que estes compostos sejam parte de um sistema de sinalização que leve à activação de vias de transdução de sinal promotoras da organogénese. O facto destes compostos serem produzidos na sequência de tratamentos com hormonas vegetais parece sustentar esta hipótese.

A organogénese pode ser conseguida através da cultura dos mais variados tipos de órgãos vegetais como sejam folhas, raízes, caules, hipocótilos, pétalas e sépalas. Na diferenciação dos meristemas formados *in vitro* podem também estar envolvidos diferentes tipos celulares. Assim, em culturas de segmentos foliares, os meristemas podem resultar das células epidérmicas,

células do córtex ou células próximas dos tecidos vasculares. O processo inicia-se com a ocorrência de divisões celulares seguida da organização de uma zona meristemática idêntica aos meristemas apicais do caule (Fig. 28). O meristema em desenvolvimento cedo estabelece ligações vasculares com o tecido de suporte através da formação de cordões de procâmbio (Fig. 28).

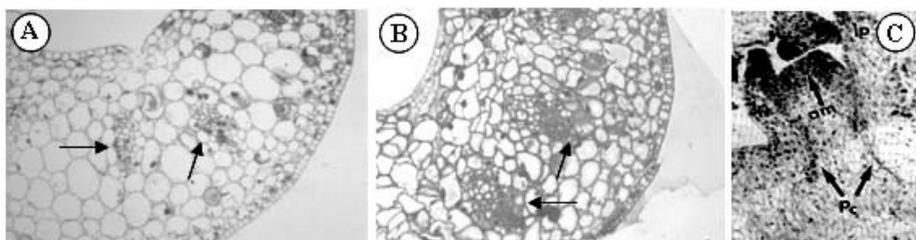


Figura 28 – Diferenciação de meristemas adventícios em segmentos foliares. A – secção transversal de uma folha onde estão assinalados os feixes condutores (setas). B – Início de proliferações celulares nas zonas próximas dos feixes (setas). C – Meristema caulinar (am) formado numa folha. Notar os primórdios foliares (lp) e os cordões de procâmbio (pc) que ligam o meristema ao tecido foliar de suporte.

Uma vez obtidos os rebentos caulinares, as fases seguintes do processo de regeneração são idênticas às referidas no caso da proliferação de meristemas e passam essencialmente pelo enraizamento dos rebentos caulinares e aclimatização das plântulas obtidas.

Nos últimos anos o papel de alguns genes no funcionamento dos meristemas apicais do caule tem sido analisado, tendo-se chegado a um modelo em que os genes *WUSCHEL* (*WUS*) e *CLAVATA* (*CLV*) desempenham um papel essencial na coordenação da actividade do meristema, em particular no balanço entre proliferação e diferenciação celular. Outros genes, como *KNOTTED1* no milho, e *SHOOT MERISTEMLESS* em *Arabidopsis*, foram também identificados e o seu papel no funcionamento do meristema apical examinado. A expressão ectópica de alguns destes genes em *Arabidopsis* induz a formação de meristemas adventícios sugerindo que a formação destas estruturas passam pela activação destes genes ou de outros ainda não detectados. No entanto, a relação entre as condições de cultura que levam à formação de meristemas adventícios e a actividade destes genes não se encontra estabelecida, sabendo-se muito pouco sobre os mecanismos que

levam as células diferenciadas a adquirir uma competência organogénica com a ulterior diferenciação de uma zona meristemática. À semelhança do que se verifica noutros sistemas experimentais a análise genética e molecular dos mecanismos de morfogénese é bastante limitada pelo reduzido número de células envolvidas nestes processos. O desenvolvimento de sistemas mais eficazes de indução de organogénese, através da indução de um maior número de células pode ser um aspecto importante para ultrapassar estas dificuldades.

A indução de organogénese é potencialmente um bom método de micropropagação atendendo a que centenas de rebentos podem ser formados a partir de um único explante. Teoricamente, o limite para o número de rebentos formados, é o número de células vivas do explante. Mas, uma vez que apenas uma percentagem das células do explante é induzida, o número de rebentos é consideravelmente menor que o número de células existentes.

Existem, contudo, algumas espécies em que têm sido observadas limitações à utilização desta metodologia como método de micropropagação. Assim, em muitas espécies, particularmente entre as gramíneas e as lenhosas verifica-se uma certa recalcitrância à regeneração. A ocorrência de contaminações, a oxidação de fenóis e o aparecimento de plantas vitrificadas são outras limitações.

(Página deixada propositadamente em branco)

CAP. 4. EMBRIOGÉNESE SOMÁTICA

4.1. Introdução

Em condições naturais o embrião resulta do processo de reprodução sexuada em que dois gâmetas se fundem formando uma nova entidade, o zigoto. Este, através de uma série de divisões sucessivas e da subsequente especialização celular, origina um embrião. Nas angiospérmicas, o embrião desenvolve-se no interior do saco embrionário, o qual, por sua vez, se encontra envolvido pelos tecidos do óvulo. Também o óvulo está inserido no ovário o que torna difícil o acesso ao embrião durante o seu desenvolvimento. No entanto, nas plantas, o zigoto não é a única célula com potencial para formar um embrião, tendo sido descritas muitas situações em que outras células também podem estar envolvidas na formação de estruturas análogas aos embriões zigóticos. Mais interessante ainda, quer sob o ponto de vista de aplicações práticas quer numa perspectiva mais científica, em condições experimentais, embriões com origem em células do corpo (*soma*) podem também ser produzidos. Estes embriões, vulgarmente chamados “somáticos” são, tal como os zigóticos, estruturas bipolares com um pólo radicular e um pólo caulinar, possuindo o mesmo genótipo da planta mãe. Na maioria dos casos, e embora pequenas variações possam ocorrer, eles são morfológicamente idênticos aos embriões zigóticos produzidos pela mesma espécie. A formação de embriões a partir de células somáticas é a mais clara demonstração da totipotência que alguns tipos celulares manifestam.

Antes de focar com mais detalhe os diferentes aspectos relacionados com a regeneração de plantas por embriogénese somática segue-se uma breve recapitulação da embriogénese zigótica.

4.2. Embriogénese zigótica

Um embrião resulta do desenvolvimento do zigoto, uma célula resultante da fecundação de um gâmeta masculino (célula espermática) com a oosfera (gâmeta feminino). Os gâmetas masculinos formam-se nos grãos de pólen (gametófitos) contidos nos sacos polínicos das anteras enquanto a oosfera se diferencia no interior do saco embrionário (gametófito feminino) presente no óvulo. Nas angiospérmicas (dicotiledóneas e monocotiledóneas), ocorre um processo denominado dupla fecundação em que um gâmeta masculino fecunda a oosfera originando o zigoto enquanto o outro se funde com a célula central do saco embrionário dando origem a uma célula triplóide que, por divisões sucessivas, forma o endosperma, o tecido de reserva das sementes.

Após a fecundação, o ovário desenvolve-se num fruto (Fig. 29) enquanto o óvulo origina uma semente (Fig. 29). De uma maneira geral, uma semente possui um embrião (Fig. 29), o tecido de reserva e a testa ou tegumento formada a partir de um ou de ambos os tegumentos do óvulo. Na maioria das espécies não existe perisperma na semente adulta devido à sua absorção mas, em alguns casos (e.g. cafeeiro, *Yucca*), este tecido, derivado do nucelo, pode estar presente e ser a maior fonte de substâncias de reserva.

As sementes podem ser divididas em endospérmicas e não-endospérmicas consoante o endosperma está ou não presente nas sementes maduras. Embora um endosperma possa estar presente, algumas sementes são consideradas não-endospérmicas em virtude daquele tecido ser muito reduzido (soja, ervilheira). Nestes casos, outras estruturas, normalmente os cotilédones, são os principais órgãos de reserva. Em muitas espécies o endosperma apresenta-se bem desenvolvido e é a principal fonte de reservas metabólicas necessárias para a germinação. Nos cereais e em algumas leguminosas a maioria das células do endosperma não estão vivas na semente madura,

tendo o citoplasma ficado obliterado pelas substâncias de reserva durante o desenvolvimento da semente. Um endosperma pouco habitual é o do coco, em que uma parte permanece acelular e no estado líquido.

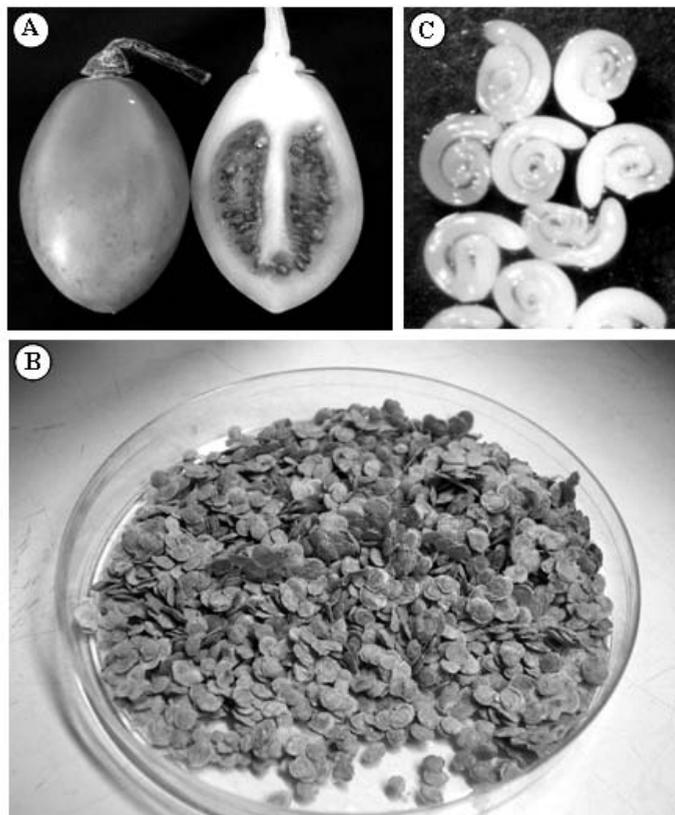


Figura 29 – Fruto (A), sementes (B) e embriões isolados (C). Todas as figuras são de tamarillo (*Cyphomandra betacea*).

As substâncias de reserva acumuladas nos tecidos são variáveis de espécie para espécie mas podem dividir-se nos seguintes compostos: 1) hidratos de carbono, 2) lípidos e 3) proteínas. Algumas sementes possuem também quantidades apreciáveis de outros compostos, nomeadamente fitina, alcalóides e compostos fenólicos.

O principal hidrato de carbono acumulado pelas sementes é o amido embora outros compostos como hemiceluloses, sacarose e oligossacarídeos de rafinose possam ser também encontrados em algumas espécies. O amido

concentra-se normalmente em grãos de tamanho e estrutura variável denominados amiloplastos (Fig. 30). Os lípidos acumulados podem também ser de vários tipos como triglicerídeos, fosfolípidos ou glicolípidos. Este tipo de compostos encontram-se normalmente presentes num tipo particular de organitos denominados corpos lipídicos (Fig. 30). Uma situação semelhante verifica-se com as proteínas que se podem dividir em albuminas, globulinas, glutelinas e prolaminas e que se acumulam nos corpos proteicos (Fig. 30). Em muitas espécies é comum a existência, no interior dos corpos proteicos, de uma inclusão designada globóide onde se acumulam grandes quantidades de fitina. Quanto aos alcalóides e compostos fenólicos presentes em algumas espécies eles parecem ter, por norma, uma função ecológica podendo contribuir para limitar o crescimento de outras espécies na vizinhança de sementes em germinação, sendo designados por compostos alelopáticos.

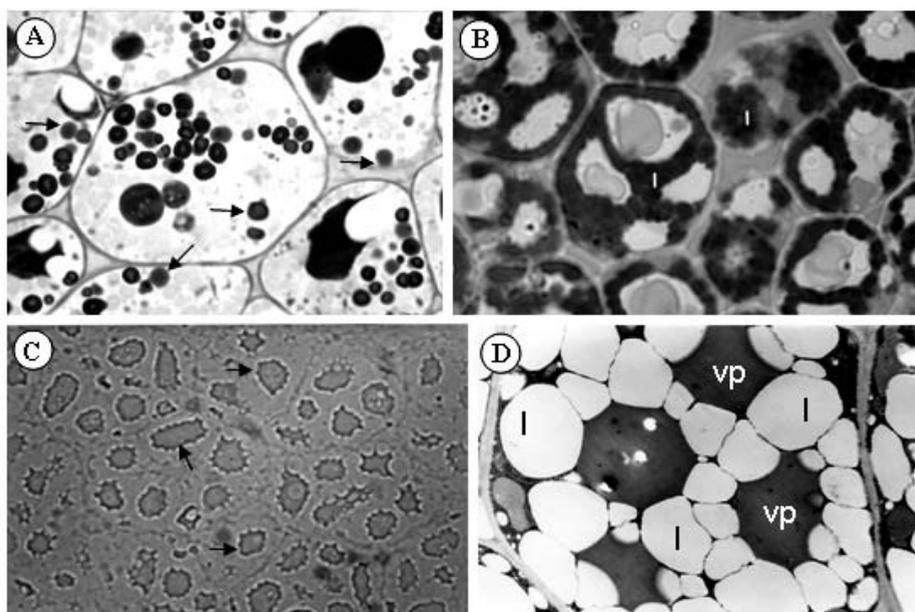


Figura 30 – Reservas em células de embriões zigóticos. A – Coloração de amido (setas) pela técnica do PAS (*periodic acid Schiff*). B – Lípidos (l) corados com negro de Sudão B. C – Proteínas (setas) coradas com amarelo de naftol S. D - Ultraestrutura de uma célula preenchida com vacúolos proteicos (vp) e gotas lipídicas (l). No interior dos vacúolos proteicos as zonas claras correspondem aos locais onde estavam presentes os globóides de fitina.

Quando atinge a maturação o embrião é constituído por um eixo embrionário e um (monocotiledóneas) ou mais cotilédones (dois nas dicotiledóneas, eventualmente mais nas gimnospérmicas). O eixo incorpora a raiz embrionária (radícula), o hipocótilo ao qual se ligam os cotilédones e o meristema apical caulinar com as primeiras folhas (plúmula). Estas partes são fáceis de identificar num embrião de uma dicotiledónea mas em monocotiledóneas, particularmente nas gramíneas (trigo, centeio, aveia, cevada, arroz, milho, ...), a identificação destas estruturas é consideravelmente mais difícil. Neste grupo de plantas, o único cotilédone tem uma posição lateral e apresenta-se bastante modificado formando uma estrutura conhecido por escutelo.

Desde a primeira divisão do zigoto até à sua maturação, o embrião das dicotiledóneas passa por fases morfológicas bem definidas (Fig. 31):

i) Pró-embrião - desde a primeira divisão do zigoto até à diferenciação da protoderme. A primeira divisão do zigoto é assimétrica e origina duas células com funções distintas. A célula apical origina o embrião propriamente dito enquanto a célula basal forma o suspensor, uma estrutura que não apenas liga o embrião aos tecidos maternos durante as fases iniciais de desenvolvimento, mas que também participa activamente no desenvolvimento do embrião quer através da produção e/ou transporte de hormonas quer através de interacções mais complexas em termos de actividade de determinados genes. Em fases mais tardias da embriogénese o suspensor sobre um processo de morte celular programada e degenera. Em *Arabidopsis* e espécies relacionadas, a célula do suspensor mais próxima do embrião (hipófise) é a única célula que tem descendentes no embrião maduro e, mais tarde, na planta, pois dá origem ao centro quiescente e à columela da raiz.

ii) Fase globular – Nesta fase o embrião é formado por uma massa compacta de células, de forma esférica, e simetria radial caracterizando-se por uma intensa actividade mitótica. Estudos de linhagens celulares mostram que a metade superior do embrião origina os futuros órgãos aéreos da planta e que a metade inferior forma a parte radicular.

iii) Fase cordiforme – Através de um mecanismo de transporte polar de auxina, ocorre a acumulação desta hormona em zonas muito definidas do embrião que se irão diferenciar nos cotilédones. Este processo é o reflexo da diferenciação apical-basal que se verifica durante o desenvolvimento embrionário com a formação dos diferentes órgãos embrionários: cotilédones, meristema apical do caule (SAM), eixo hipocótilo-raiz e meristema apical da raiz (RAM). Os meristemas apicais do caule e da raiz começam a organizar-se tal como a diferenciação radial de tecidos: protoderme, meristema fundamental e procâmbio. O embrião passa de uma simetria bilateral para uma simetria radial.

iv) Fase de torpedo - Acentua-se a diferenciação dos cotilédones e o embrião alonga-se. Os meristemas apicais estão completamente formados. As células do embrião começam a acumular substâncias de reserva e o suspensor degenerou.

v) Fase cotiledonar - Os cotilédones encontram-se perfeitamente desenvolvidos e, em muitas espécies, devido a restrições físicas impostas pelo tegumento da semente o embrião encurva ficando com os cotilédones próximos do eixo hipocótilo-raiz. As células do embrião, não apenas nos cotilédones, encontram-se completamente preenchidas com substâncias de reserva. Completou-se o desenvolvimento embrionário e o embrião completou o processo de morfogénese. Segue-se agora a perda de grandes quantidades de água (dessecação) acompanhada pela produção de compostos protectores da dessecação como acontece com as proteínas LEA. Em muitas espécies o embrião entra numa fase de dormência. Uma vez quebrada a dormência e criadas as condições de adequadas o embrião pode germinar e dar origem a uma plântula que prosseguirá o seu desenvolvimento pela actividade dos meristemas apicais do caule e da raiz.

Em monocotiledóneas, mais concretamente em gramíneas, consideram-se as seguintes fases: globular, escutelar e coleoptilar. A fase globular é semelhante à que se observa em dicotiledóneas. A fase escutelar corresponde à formação do escutelo enquanto a fase coleoptilar está relacionada com a diferenciação do coleóptilo, uma bainha que envolve as folhas embrionárias.

Obviamente, e dada a grande diversidade existente entre as plantas superiores, existem muitas exceções a estas características fundamentais. Assim, por exemplo, em muitas espécies parasitas os embriões não possuem cotilédones enquanto nas orquídeas as sementes, quando libertadas, possuem embriões num estado muito precoce de desenvolvimento, sem que o endosperma esteja formado. Também nas gimnospéricas (pinheiros, cedros, ciprestes, epíceas, abetos....) existem características particulares. Neste grupo de plantas é vulgar a ocorrência de poliembrionia (formação de mais que um embrião) simples ou de clivagem e não ocorre dupla fecundação sendo o megagametófito haplóide o tecido onde se concentram as substâncias de reserva. Além disso, o embrião apresenta, nas fases iniciais do seu desenvolvimento, núcleos livres e, quando maduro, possui vários cotilédones.

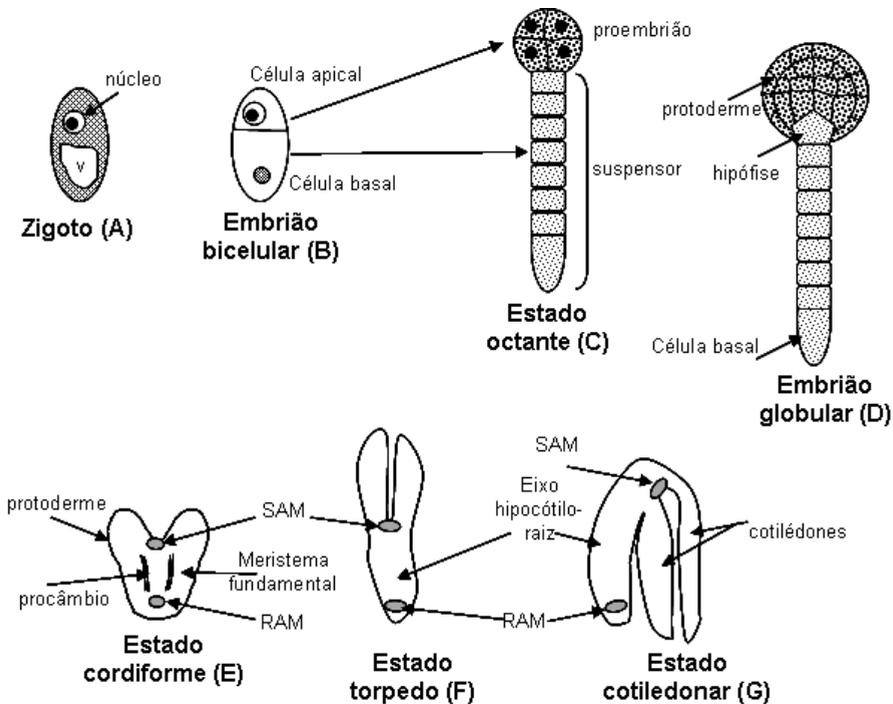


Figura 31 – Fases características do desenvolvimento embrionário em crucíferas (e.g. *Arabidopsis thaliana* e *Capsella bursa-pastoris*). O desenvolvimento embrionário inicia-se com a divisão do zigoto (A) e termina com a formação de um embrião cotiledonar (G). As primeiras divisões (B e C) originam um embrião com oito células (estado octante) distribuídas em dois planos. No embrião globular (D) diferencia-se o primeiro tecido (protoderme) e nas fases seguintes

(E, F e G) ocorre o desenvolvimento do embrião segundo dois eixos de diferenciação: apical-basal que leva à formação de órgãos e radial responsável pela formação dos tecidos.

4.3. Embriogénese não zigótica

116

Nas plantas superiores, o zigoto não é a única célula com capacidade para formar embriões. Em determinadas circunstâncias, outras células podem dividir-se e dar origem a embriões adventícios. Por exemplo, em algumas famílias de angiospérmicas (e.g. *Myrtaceae* e *Rutaceae*) é vulgar a ocorrência de poliembrionia, isto é, o aparecimento de sementes com mais que um embrião. Em várias espécies de *Citrus* (género ao qual pertencem as laranjeiras e os limoeiros), onde a ocorrência de poliembrionia está bem caracterizada e foi primeiro observada, os embriões supranumerários são produzidos em grande quantidade a partir de células do nucelo. Embora noutras espécies o aparecimento de embriões nucelares ou a partir dos tegumentos ovulares seja também vulgar existem, no entanto, outras células do óvulo que podem estar envolvidas na formação de embriões adventícios. É o caso das siner-gídeas e das antípodas. Os embriões adventícios podem também resultar da proliferação de células do suspensor. A formação de embriões a partir de células do endosperma tem também sido assinalada (embriões triplóides).

Pode ainda acontecer que os sacos embrionários se formem a partir de células diplóides e que os embriões derivem directamente destas células sem que haja fecundação (partenogénese). Este processo, conhecido como apomixia, e visto durante muitos anos como uma simples curiosidade botânica, tem sido ultimamente objecto de muitos programas de melhoramento no decurso dos quais se tem tentado transferir esta capacidade para espécies com importância agrícola como é o caso do milho e do arroz. Na apomixia, ocorre uma reprodução assexual (sem fecundação) por meio de sementes. Existem três tipos de apomixia: adventícia, diplospórica e apospórica. Na apomixia adventícia uma célula não reprodutora (diplóide) do óvulo (normalmente do nucelo) divide e dá origem a um embrião. Este tipo de apomixia é muito comum no género *Citrus*, onde inúmeros embriões podem ser formados numa mesma semente. Normalmente, forma-se também um saco embrionário normal. Na apomixia diplospórica uma célula mãe dos macrósporos sofre meiose mas esta decorre anormalmente, formando-se núcleos de restituição (núcleos 2n). Em virtude destas anomalias os sacos embrionários são constituídos por células diplóides. O embrião forma-se a partir de uma destas células do saco

embrionário. Na aposporia o saco embrionário forma-se directamente (por mitoses) a partir de uma célula que não a célula mãe dos macrósporos sem que haja meiose. Neste caso, embriões sexuais e assexuais podem ocorrer no mesmo óvulo mas, na maior parte dos casos, o embrião normal degenera em fases precoces do seu desenvolvimento. O interesse da apomixia resulta do facto dos embriões resultantes possuírem o mesmo genótipo da planta mãe e permitirem, assim, fixar a heterozigotia (vigor híbrido) muito importante para o aumento dos rendimentos das culturas.

Um outro exemplo de embriogénese não zigótica tem a ver com a formação de embriões de clivagem nas gimnospérmicas em que o zigoto resultante da fecundação não dá directamente origem a um embrião mas sofre divisões que levam ao aparecimento de embriões supranumerários.

Na orquídea *Malaxis paludosa* observa-se ainda uma situação mais insólita resultante do aparecimento de estruturas semelhantes a protocormos nas folhas, estruturas essas que, uma vez separadas da planta mãe podem dar origem a novas plantas. Espécies do género *Bryophyllum* (ver Fig. 8, capítulo 3) e alguns fetos (*Diplazium* sp.) são igualmente capazes de originar plantas a partir da diferenciação de células das folhas em plântulas.

Grande parte dos exemplos descritos na literatura sobre embriogénese não-zigótica correspondem a situações em que os embriões formados têm origem em células que, de algum modo, estão relacionadas com os órgãos envolvidos na reprodução. Todavia, também células somáticas quando cultivadas *in vitro* se podem comportar como um zigoto e dar origem a embriões (Fig. 32), conforme mostraram independentemente, Reinert e Steward *et al.* em finais dos anos 50, na cenoura. Nas secções seguintes iremos caracterizar este tipo de embriogénese.

4.4. Embriogénese somática

Desde a sua descoberta, tem havido alguma polémica quanto à designação que deve ser atribuída aos embriões formados a partir de células somáticas. Denominações como embrióides, embriões adventícios, embriões supranumerários e embriões acessórios são alguns dos termos utilizados para designar

este tipo de estruturas. Apesar destas diferentes terminologias os embriões formados a partir de células somáticas são normalmente conhecidos como “embriões somáticos” sendo esta a designação mais vulgarmente aplicada.

Nos anos que se seguiram à descoberta da embriogénese somática discutiu-se muito sobre o facto dos embriões somáticos poderem ser considerados, ou não, verdadeiros embriões. Esta discussão é ainda hoje alimentada por alguns embriologistas. Vejamos então quais as principais características dos embriões zigóticos e, ponto por ponto, fazer a sua comparação com os embriões somáticos.

Os embriões zigóticos têm origem unicelular. Os embriões somáticos podem ter uma origem unicelular ou multicelular. Uma origem unicelular é absolutamente requerida quando se regeneram plantas geneticamente transformadas por embriogénese somática pois, a verificar-se uma origem pluricelular, corre-se o risco das plantas regeneradas apresentarem sectores transformados e outros não transformados, sendo portanto quimeras. Em termos de propagação em massa a origem dos embriões é irrelevante. Os embriões com origem unicelular parecem formar-se preferencialmente quando as células embriogénicas se encontram rodeadas por outras células não embriogénicas. Quando diversas células embriogénicas se encontram em contacto é possível que elas tenham um comportamento semelhante e participem na formação de uma estrutura que, a partir de uma certa fase, apresenta uma perfeita identificação morfológica com os embriões zigóticos, conforme sustentado por Williams e Maheswaran (1986) e depois confirmado por outros autores.

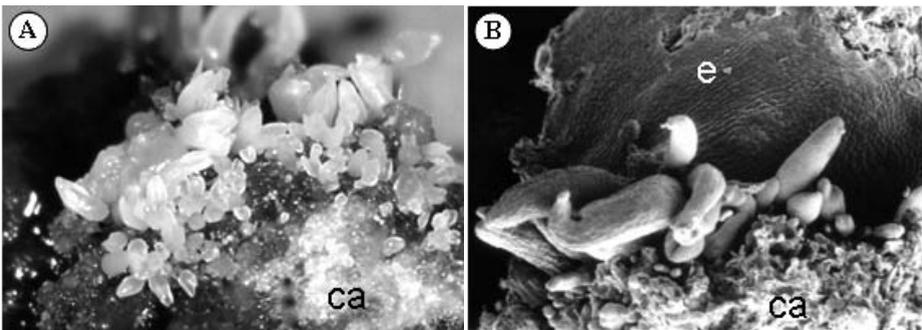


Figura 32 – Embriões somáticos de feijoa fotografados à lupa (A) e num microscópio electrónico de varrimento (B). ca – calo, e – explante inicial.

Os embriões zigóticos são formados no interior do saco embrionário num ambiente perfeitamente controlado e estão envolvidos por outros tecidos como o endosperma e a testa da semente. O processo é perfeitamente controlado não apenas pela informação genética do zigoto mas também por sinais químicos provenientes da planta mãe. Os embriões somáticos formam-se num meio de cultura onde a presença dos diversos constituintes (hormonais e nutricionais) foi determinada empiricamente. Além disso, não existem tecidos de reserva ou tecidos protectores do embrião. Mesmo assim, na maioria dos casos, os embriões somáticos são cópias muito fidedignas (“true to type”) dos embriões zigóticos correspondentes o que sugere um controlo genético equivalente. As anomalias verificadas em alguns embriões somáticos estão em parte relacionadas com uma deficiente composição dos meios de cultura nos seus diversos componentes e que acabam por se reflectir no fenótipo dos embriões.

Tal como os embriões zigóticos, os embriões somáticos passam por fases de desenvolvimento bem características (globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar). Todavia, enquanto as primeiras divisões do zigoto seguem um padrão bem definido e que é característico da espécie, nos embriões somáticos, dentro de uma mesma espécie, a primeira divisão das células embriogénicas parece dar-se ao acaso. Esta diferença deve ser o resultado do zigoto ser uma célula bastante polarizada enquanto as células que originam os embriões somáticos não apresentam essa polaridade tendo normalmente um aspecto meristemático (isodiamétricas com núcleo volumoso). Deste modo, as fases mais precoces do desenvolvimento dos embriões somáticos e zigóticos podem ser ligeiramente diferentes mas, a partir daí, as fases características da embriogénese verificam-se também nos embriões somáticos. Também o estado cotiledonar varia entre embriões zigóticos e somáticos de uma mesma espécie. Nos primeiros, a existência dos tecidos do óvulo limita a expansão dos cotilédones que muitas vezes se encurvam no interior da semente. Pelo contrário, nos embriões somáticos, estas limitações físicas não existem e os embriões expandem-se por vezes de forma inusitada.

Os embriões zigóticos apresentam um sistema vascular independente da planta mãe. Da mesma forma, os embriões somáticos possuem um sistema vascular independente dos tecidos de suporte, contrariamente ao que se

verifica na formação de gemas durante o processo de organogénese em que as estruturas formadas são unipolares e encontram-se ligadas ao tecido mãe por cordões de tecido vascular. Em certas circunstâncias, pode suceder que se formem, num mesmo calo, e na proximidade uns dos outros, meristemas caulinares e radiculares de modo que, quando os dois tipos de meristemas se desenvolvem simultaneamente pode haver alguma analogia com a formação de um embrião somático. Nestes casos, só a realização de cortes histológicos permite detectar se as estruturas formadas são gemas ou embriões somáticos através da presença ou não de um sistema vascular independente.

Os embriões somáticos e os zigóticos, por germinação, originam uma planta. Ao contrário das estruturas formadas por organogénese não é necessário proceder ao enraizamento dos embriões somáticos pois eles já apresentam um pólo radicular.

Tendo em conta estas características, podemos dizer que a principal diferença entre embriões zigóticos e somáticos tem a ver com a sua origem e local de formação o que obviamente condiciona as primeiras fases do desenvolvimento. Deste modo, a questão de certo modo académica, de saber se os embriões somáticos devem ser considerados como verdadeiros embriões parece ultrapassada, sendo geralmente aceite que devem ser considerados como tal.

4.4.1. Tipos de embriogénese somática

Como já foi referido anteriormente a cenoura (*Daucus carota*) foi a primeira espécie onde se conseguiu a indução de embriogénese somática. Nesta espécie, o processo de indução ocorre normalmente em duas fases e o mesmo tipo de embriogénese tem sido descrito para muitas outras espécies. Vejamos o que se verifica no caso do tamarilho onde um tipo de embriogénese semelhante ao da cenoura foi também descrito (Fig. 33).

Nesta espécie, os explantes (folhas jovens ou embriões zigóticos cotiledonares) são cultivados num meio contendo a auxina 2,4-D. Após cerca de 8 a 10 semanas neste meio começam a formar-se calos de aspecto nodular constituídos por aglomerados celulares de células isodiamétricas com características

meristemáticas. Estas massas são designadas por massas proembriogénicas. Se estes calos forem fragmentados e os diferentes pedaços inoculados num meio de cultura igual ao inicial (com 2,4-D) os calos voltam a crescer e a formar novas massas proembriogénicas podendo este processo manter-se por vários anos. Se, pelo contrário, os calos forem transferidos para um meio sem auxina, as massas proembriogénicas evoluem de forma diferente e organizam-se em embriões somáticos. Isto significa que, nestas situações, a auxina promove a formação de células embriogenicamente competentes mas o seu ulterior desenvolvimento em embriões é inibido pela mesma auxina. Nestas espécies a embriogénese ocorre em duas fases (“two-step embryogenesis”) e é indirecta, verificando-se primeiro a formação de um calo embriogénico e, em condições diferentes, o desenvolvimento dos embriões. A principal vantagem deste tipo de embriogénese é que os calos embriogénicos se podem manter em cultura durante períodos alargados podendo inclusive fazer-se ensaios de campo com as plantas obtidas por este processo e ver como elas se comportam. Caso seja necessário, novas plantas podem ser produzidas a partir dos calos que estão em cultura. As principais desvantagens residem no tempo que decorre até à obtenção dos embriões e no facto dos calos de algumas espécies poderem perder potencial embriogénico com o decorrer do tempo.

De uma maneira geral, a formação de embriões somáticos ocorre normalmente de forma indirecta sendo muito raros os casos em que se tem verificado a obtenção de embriões directamente a partir de células diferenciadas sem intervenção de uma fase de calo. Quando assim acontece, como se verifica no *Ranunculus sceleratus* em que as células epidérmicas do hipocótilo formam embriões, a embriogénese diz-se directa.

Um outro tipo de embriogénese somática, também muito comum, é aquele que se verifica quando os embriões são induzidos e se desenvolvem no mesmo meio de cultura, normalmente também na presença de 2,4-D ou de outra auxina. Ao contrário do que acontece na cenoura ou no tamarilho, nestas situações os níveis de auxina aplicados não inibem o desenvolvimento dos embriões e eles atingem o estado cotiledonar na presença da auxina (Fig. 34). Este tipo de embriogénese é designado por embriogénese numa fase (“one-step embryogenesis”) e pode ser directa

(sem formação de calo) ou indirecta, com a formação prévia de um calo onde os embriões se formam, sendo este o tipo mais comum. Este tipo de embriogénese tem a vantagem das plantas obtidas não apresentarem normalmente alterações relativamente ao fenótipo original. Por outro lado, as células perdem rapidamente a capacidade embriogénica não sendo possível mantê-las em cultura por muito tempo.

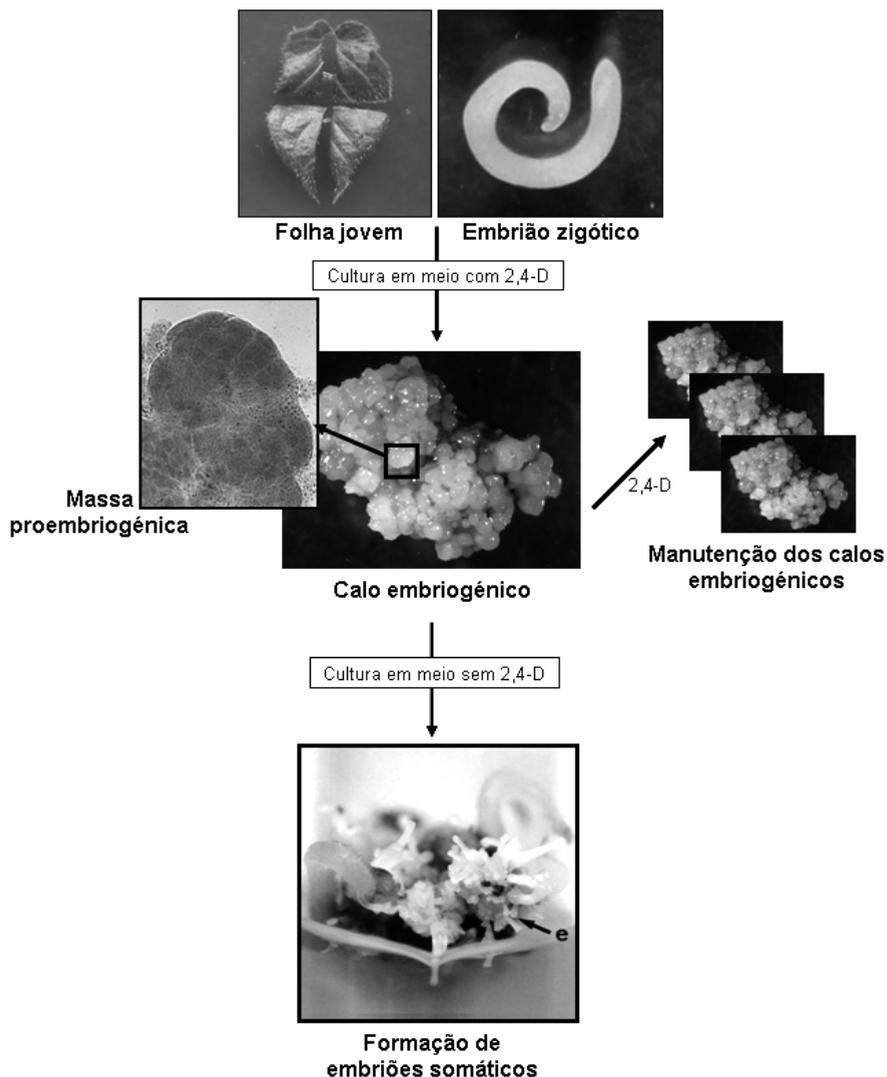


Figura 33 – Esquema ilustrativo da indução de embriogénese indirecta no tamarilho. e – embrião.

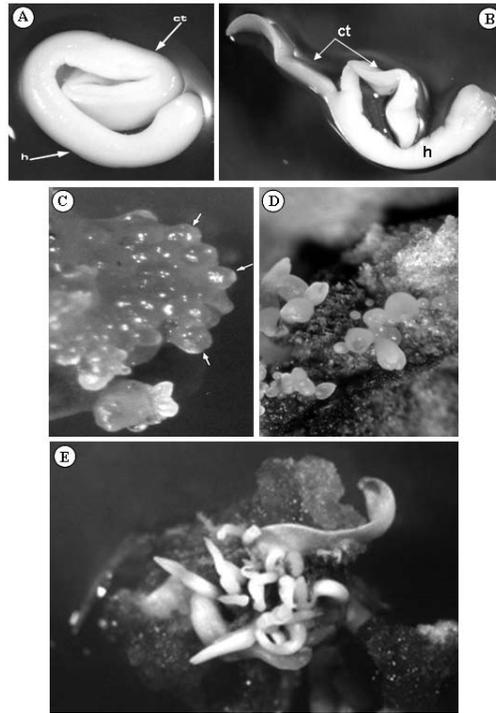


Figura 34 – Indução de embriogénese numa só fase. A – Embrião zigótico na altura da cultura em meio com auxina. B – Expansão dos cotilédones (ct) e hipocótilo (h) após 10 dias de cultura. C - Início da formação dos embriões somáticos (setas) após 3 semanas de cultura. D – Embriões somáticos em fases precoces de desenvolvimento. E – Embriões somáticos em fases mais avançadas.

Finalmente, verifica-se a existência de espécies em que os embriões somáticos produzidos têm capacidade de iniciar novos ciclos de embriogénese, formando novos embriões somáticos. Este tipo de embriogénese é chamada embriogénese secundária, cíclica ou recorrente e observa-se, por exemplo, no loureiro. Tal como acontece no caso da cenoura, este tipo de embriogénese somática pode manter-se por vários anos, dando origem a um elevado número de plantas.

A razão ou razões que explicam estes diferentes comportamentos das células em cultura não são conhecidas embora tenham supostamente a ver com os níveis endógenos de hormonas ou com os mecanismos de inactivação ou degradação das auxinas existentes nas células das diferentes espécies e dos diferentes tecidos. Quando a embriogénese é directa as células que originam os embriões são designados por PEDC (“pre-embryogenic determined cells”;

células pré-embriogenicamente determinadas) o que significa que elas são competentes para sofrer embriogénese e que as condições de cultura apenas criam as condições para elas exprimirem o seu potencial embriogénico como é o caso das células epidérmicas dos hipocótilos de *Ranunculus*. Quando a embriogénese é indirecta as células que formam os embriões designam-se por IEDC („induced embryogenic determined cells“, células embriogenicamente determinadas após indução). Neste caso, as células necessitam de sofrer um ou vários ciclos mitóticos antes de serem capazes de exprimir o seu potencial embriogénico como acontece com as células da raiz de cenoura ou das folhas de tamarilho. Independentemente do tipo de indução as células embriogénicas apresentam normalmente um certo número de características citológicas e ultraestruturais. Assim, trata-se em geral de células pequenas e isodiamétricas, possuindo paredes primárias finas, com um citoplasma denso e pouco vacuolizado, uma elevada relação núcleo/citoplasma e um nucléolo proeminente. Estas particularidades também se manifestam nas células dos meristemas apicais do caule e da raiz.

Variantes destes tipos de embriogénese são a manutenção de calos embriogénicos ou seja, de calos que mantêm a capacidade embriogénica ao longo de várias subculturas e a embriogénese repetitiva, processo em que os embriões somáticos dão origem a novos ciclos de embriogénese.

4.4.2. Fases da regeneração de plantas por embriogénese somática

O processo de regeneração de plantas por embriogénese somática implica diferentes fases com condições geralmente diferentes para cada uma delas. Nas secções seguintes caracterizam-se as diferentes fases e os principais factores que as condicionam.

4.4.2.1. Indução

À semelhança do que foi dito para as outras técnicas de micropropagação, são também vários os factores que afectam a indução de embriogénese

somática: tipo de explante, meio de cultura, genótipo da planta dadora e as condições de cultura são alguns desses parâmetros.

De todos os factores acima referidos, o mais importante é talvez a composição dos meios de cultura, nomeadamente no que diz respeito à composição hormonal e aos hidratos de carbono. Em algumas espécies, o tipo e a concentração dos compostos azotados (minerais ou orgânicos) presentes desempenham também um papel preponderante.

Embora em algumas espécies seja possível induzir embriogénese em meios sem hormonas, a formação de embriões somáticos requer, normalmente a presença de uma auxina ou condições de stresse. A auxina mais utilizada é o 2,4-D, mas outras como NAA, IBA, IAA dicamba ou picloram podem também ser aplicadas com sucesso. O tipo de auxina utilizada, bem como as concentrações aplicadas, variam muito de espécie para espécie. Como se viu na secção anterior, em algumas espécies, a indução de embriogénese somática e o ulterior desenvolvimento dos embriões, até à sua maturação, ocorre em meios com auxina. Noutras espécies, cuja cenoura é o exemplo mais conhecido, a indução verifica-se num meio com auxinas mas o desenvolvimento ulterior dos embriões apenas tem lugar se a auxina for removida do meio de cultura. Ensaio realizados em diferentes espécies têm também mostrado que choques auxínicos, em que os explantes são submetidos a concentrações superiores a 100 mM/l por períodos relativamente curtos (até 24h) são capazes de promover a formação de embriões somáticos. Este tipo de sistema experimental é particularmente interessante pois limita o período de indução a algumas horas, tornando mais fácil a análise do processo em termos moleculares (ver secção 4.5). Estas diferenças de comportamento parecem estar relacionadas com os níveis endógenos de auxinas existentes nos tecidos utilizados como explantes. Nas espécies em que o desenvolvimento dos embriões é inibido na presença de auxinas os níveis endógenos somados aos níveis exógenos tornar-se-ão inibidores do desenvolvimento. Pelo contrário, nos casos em que a maturação se verifica em meios com auxina, os níveis endógenos de auxina serão, provavelmente, mais baixos. Recentemente, vários dados experimentais indicam que um conjunto de outros reguladores de crescimento como poliaminas, oligossacarídeos e brassinosteróides podem ser também importantes no controlo da resposta embriogénica por células em cultura.

A presença de elevadas concentrações de hidratos de carbono, nomeadamente de sacarose, tem-se revelado, em algumas espécies, como potenciadora da resposta embriogénica. A sacarose, ou outro açúcar metabolizável tem uma função de fonte de carbono mas desempenha também um papel osmótico. O facto do efeito da sacarose poder, em parte, ser substituído pela adição de hidratos de carbono não metabolizáveis, como manitol ou sorbitol, sugere que o efeito de elevadas concentrações de sacarose na embriogénese somática é, pelo menos parcialmente, resultante do seu papel como agente osmótico. Os mecanismos moleculares subjacentes a este efeito não são conhecidos, mas é provável que altas concentrações de açúcares afectem as vias metabólicas conducentes à produção de hormonas vegetais, nomeadamente auxinas, etileno ou ácido abscísico (ABA). Para além de aumentarem a resposta embriogénica, altas concentrações de sacarose diminuem também o crescimento dos calos, reduzindo assim a heterogeneidade celular e facilitando a realização de estudos citológicos e bioquímicos.

Um outro componente do meio de cultura que condiciona a resposta embriogénica é o azoto. O azoto é depois do C, O e H o elemento mais abundante nas plantas quer como constituinte dos aminoácidos e proteínas quer como fazendo parte da composição de nucleótidos que constituem os ácidos nucleicos e daqueles envolvidos no transporte de electrões e armazenamento de energia. Ensaio iniciais realizados na cenoura mostraram que mais importante que a concentração de azoto presente no meio de cultura era o tipo de composto azotado. Esses ensaios mostraram que o azoto na forma reduzida, mineral (amónia) ou orgânica (alanina, glutamina, hidrolisado de caseína), era fundamental para a formação de embriões somáticos. Mais tarde foi também demonstrado que o azoto na forma de nitrato era igualmente essencial para a embriogénese. O azoto pode afectar a resposta embriogénica através da variação que provoca no pH extracelular. Assim, se o amónio do meio de cultura for muito abundante a sua absorção tende a acidificar o meio exterior (extrusão de H^+). O pH extracelular pode, por sua vez, afectar o alongamento celular situação que também pode afectar a embriogénese. Modificações do pH extracelular condicionam igualmente o transporte de auxinas para o interior das células. Alguns ensaios têm mostrado que choques de pH (superiores a 9.0 ou inferiores a 4.0) são,

só por si, capazes de promover a formação de embriões em algumas espécies, mostrando que este factor é também muito importante no controlo do processo embriogénico.

Mais recentemente, tem sido referido que os níveis de cálcio, um importante mensageiro secundário, condicionam também a indução de embriogénese somática. De facto, tem-se verificado que a utilização nos meios de cultura de compostos que interferem com os níveis de cálcio intracelular ou que inibem proteínas ligadoras de cálcio, como a calmodulina, inibem a embriogénese.

Os mais variados tipos de explantes podem ser utilizados para a indução de embriogénese somática, como sejam, folhas, caules, pétalas, sépalas, cotilédones, hipocótilos, raízes, anteras ou embriões zigóticos (maduros ou imaturos). Em algumas espécies como na cenoura, praticamente qualquer órgão apresenta a capacidade de formar embriões somáticos. Noutros casos, como na feijoa, apenas os embriões zigóticos possuem essa potencialidade. De uma maneira geral, tecidos jovens respondem melhor que tecidos já diferenciados, a que não será alheia uma menor diferenciação celular que ocorre nos primeiros. Em virtude desta situação, os embriões zigóticos são os mais utilizados para a indução de embriogénese somática, particularmente em espécies lenhosas. Em termos de propagação de um determinado genótipo, esta situação não é eficaz pois na fase de embrião é impossível dizer se a planta que dele resultaria seria interessante em termos agronómicos. Todavia, se o objectivo for a regeneração de plantas geneticamente transformadas ou a propagação em massa sem objectivos de selecção clonal – por exemplo na cultura de embriões zigóticos resultantes do cruzamento entre duas espécies ou cultivares diferentes com vista à obtenção rápida de um número elevado de plantas - então os embriões zigóticos podem ser utilizados sem limitações.

O genótipo da planta dadora dos explantes parece ser, em alguns casos, um factor a considerar para o sucesso da embriogénese. Alguns tipos de experiências têm mostrado que, numa mesma espécie, existem genótipos com maior capacidade de sofrer embriogénese que outros. Noutros casos, cruzamentos entre genótipos com elevada capacidade embriogénica e genótipos com reduzida ou sem capacidade embriogénica conduzem à obtenção de híbridos com repostas intermédias. No trigo e noutros cereais têm sido

feitas tentativas para identificar em que cromossomas se encontram situados estes genes, através do estudo da indução de embriogénese somática em linhas de adição, substituição e aneuplóides. Deste modo, verificou-se que os cromossomas 6 e 7 D (originários do centeio) contêm factores positivos para a indução de calos numa variedade de trigo designada Chinese Spring. Noutra variedade (Capello) foi demonstrado que os cromossomas 7B, 7D e 1D eram os mais importantes no controlo da embriogénese. Este tipo de ensaios parece indicar que existe um sistema poligénico que controla a indução de embriogénese. No entanto, quais são esses genes e em que circunstâncias são activados não está ainda determinado.

Relativamente às condições de cultura, elas são muito variáveis de espécie para espécie, particularmente no que diz respeito às condições de luz. Assim, existem espécies que respondem melhor em condições de obscuridade enquanto outras requerem luz contínua. Em alguns casos, uma alternância de períodos de luz e escuro tem sido utilizada. Quanto à temperatura não existem muitos dados e na maioria dos casos uma temperatura de 24 - 27 °C é utilizada.

Para além dos factores aqui referidos muitos outros têm sido apontados como capazes de influenciar o processo de formação de embriões somáticos *in vitro*. A enumeração desses factores seria exaustiva pelo que se referiram aqueles que têm sido motivo de estudos mais aprofundados.

4.4.2.2. Desenvolvimento e maturação dos embriões somáticos

As fases iniciais da embriogénese zigótica seguem um padrão regular e muito definido que é específico para cada espécie e constitui mesmo uma característica taxonómica importante. As fases iniciais do desenvolvimento dos embriões somáticos, podem ser variáveis, e muito diferentes do padrão seguido pelo zigoto. Contudo, a partir da fase globular, os diferentes estádios são muito similares. Assim, tal como no caso dos embriões zigóticos, os embriões somáticos passam também pelas fases cordiforme, torpedo e cotiledonar (Fig. 35).

As condições de cultura adequadas ao desenvolvimento dos embriões não são necessariamente as mesmas que as utilizadas para a indução e, em

muitas espécies, são mesmo consideravelmente diferentes. Assim, como já foi referido, o desenvolvimento requer a transferência para um meio sem auxina. Também o potencial hídrico deve ser diferente pois, à semelhança do óvulo, aquela variável deve ir aumentando à medida que o embrião se desenvolve.

É durante o desenvolvimento embrionário que se estabelecem os padrões axial e radial do embrião que mais tarde se reflectirão na morfologia das plantas. Nos embriões zigóticos as auxinas desempenham um papel importante nesse processo, nomeadamente na transição da simetria radial (embrião globular) para a simetria bilateral (embrião cordiforme). Experiências realizadas com embriões somáticos mostraram também o papel das auxinas no desenvolvimento dos embriões somáticos pois o tratamento de embriões globulares com inibidores do transporte polar de auxinas, como o TIBA (ácido triiodobenzóico), afecta o número de embriões que passa à fase seguinte da embriogénese. Para além disso, interferências no transporte polar de auxinas conduzem também à formação de embriões somáticos com os cotilédones fundidos, em forma de taça (Fig. 36), indicando que este mecanismo é crucial para a transição de simetria. Estes fenótipos são muito parecidos com os mutantes *pin* de *Arabidopsis* os quais devido a anomalias na proteína PIN responsável pelo transporte de auxina para o exterior da célula apresentam também os cotilédones fundidos. Estes dados sugerem que os mecanismos de controlo da transição de simetria são os mesmos em embriões zigóticos e somáticos.

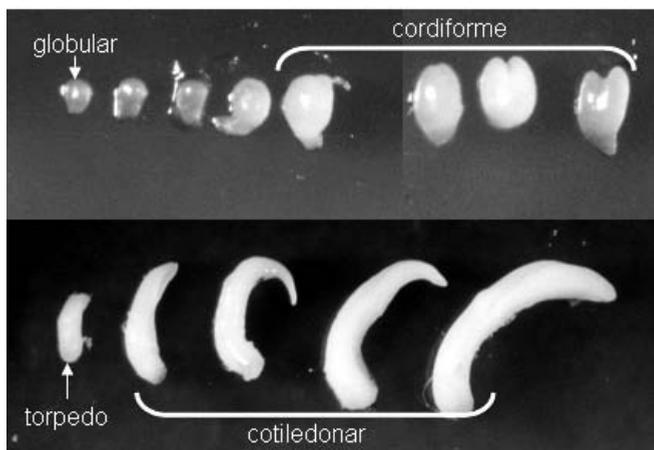


Figura 35 – Embriões somáticos em diferentes estados de desenvolvimento.

Um aspecto que tem sido muito discutido durante o desenvolvimento dos embriões somáticos é a presença de uma estrutura equivalente ao suspensor dos embriões zigóticos. Ensaios realizados em várias espécies de gimnospermas têm mostrado que o suspensor está normalmente presente durante o desenvolvimento dos embriões somáticos. No entanto, em angiospermas o suspensor nem sempre está presente e, quando associado ao embrião, a sua função tem sido questionada. Como já se referiu, nos embriões zigóticos o suspensor tem, entre outras, uma função importante na nutrição dos embriões durante as fases iniciais de desenvolvimento embrionário. No caso, dos embriões somáticos, os nutrientes são em grande parte adicionados ao meio de cultura pelo que os embriões obtêm os nutrientes do meio. No entanto, em várias espécies tem sido observada uma estrutura análoga ao suspensor e que liga o embrião ao explante inicial (Fig. 37) sugerindo um papel semelhante ao desempenhado pelo suspensor dos embriões zigóticos. No entanto, ao contrário do suspensor dos embriões zigóticos, que é por norma uma estrutura bem definida e que segue sempre o mesmo padrão de desenvolvimento, os estudos realizados em embriões somáticos mostram que o suspensor pode ser muito parecido com o seu equivalente em embriões zigóticos mas, com frequência, ocorrem modificações morfológicas que originam suspensores com aspectos muito variados.

A análise do desenvolvimento dos embriões somáticos de algumas espécies tem mostrado uma estreita associação entre os embriões somáticos e células ricas em compostos fenólicos (Fig. 38). Estas células formam como que uma zona de delimitação entre os embriões e o tecido que lhes deu origem, permitindo a sua separação do explante inicial e consequente individualização. A análise dos compostos fenólicos mostrou a formação de ácido gálico e compostos derivados. A maneira como os compostos fenólicos interferem com a embriogénese não é conhecida embora os compostos fenólicos produzidos pela cultura de células vegetais tenham efeitos negativos nas culturas devido à sua oxidação. No entanto, mais recentemente, alguns estudos têm mostrado que os fenóis podem interferir de forma positiva em alguns tipos de morfogénese *in vitro*, em particular na indução de embriogénese somática provavelmente através do seu efeito na modificação dos níveis endógenos de auxinas.

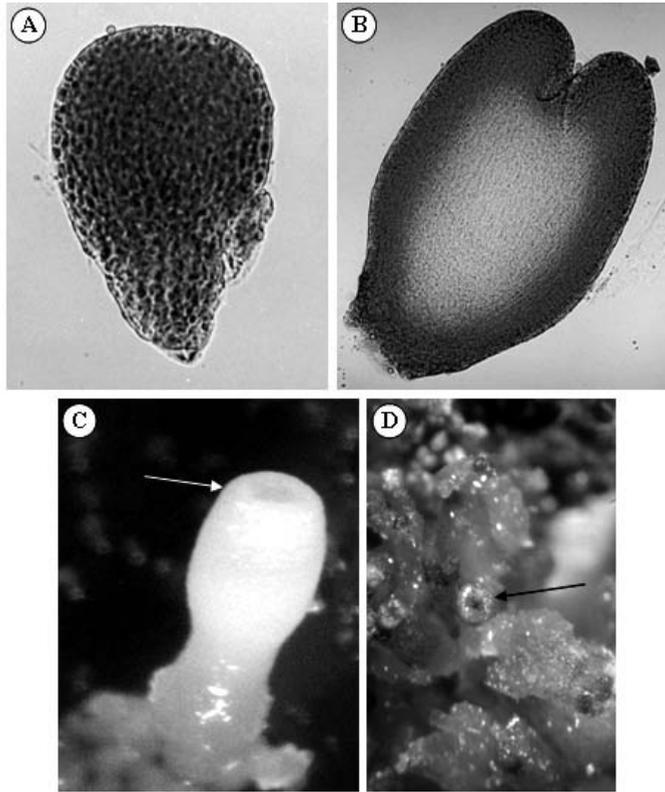


Figura 36 – Transição da simetria radial (A, embrião globular) para a simetria bilateral (B, embrião cordiforme) e anomalias na transição de simetria em embriões somáticos tratados com um inibidor do transporte polar de auxinas (C e D). A figura C é um embrião zigótico com os cotilédones fundidos (seta) enquanto a figura D é uma plântula resultante da germinação de um embrião somático do tipo representado em C e onde são também visíveis os cotilédones fundidos (seta).

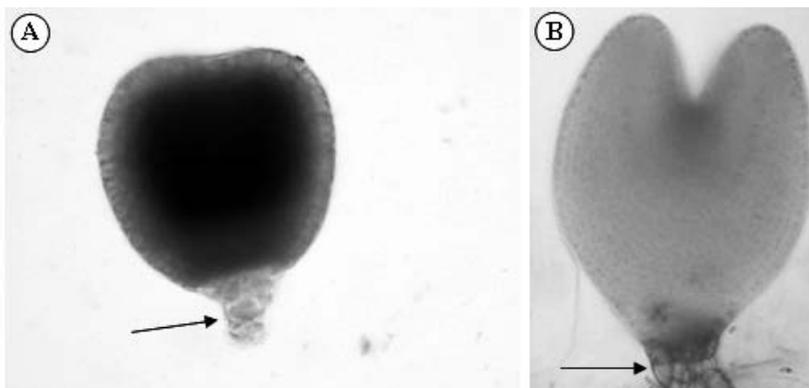


Figura 37 – Suspensor num embrião zigótico (A) e num embrião somático (B) de feijoa.

Quando atingem o estado cotiledonar os embriões zigóticos acumulam grandes quantidades de substâncias de reserva (secção 4.1) e sofrem perdas consideráveis de água, preparando-se para entrar num período de quiescência ou dormência. Uma situação semelhante acontece nos embriões somáticos. No entanto, neste tipo de embriões, o meio de cultura, fortemente hidratado, não permite a dessecação dos embriões não se verificando também, por norma, uma fase de dormência, podendo os embriões germinar imediatamente após a sua formação.

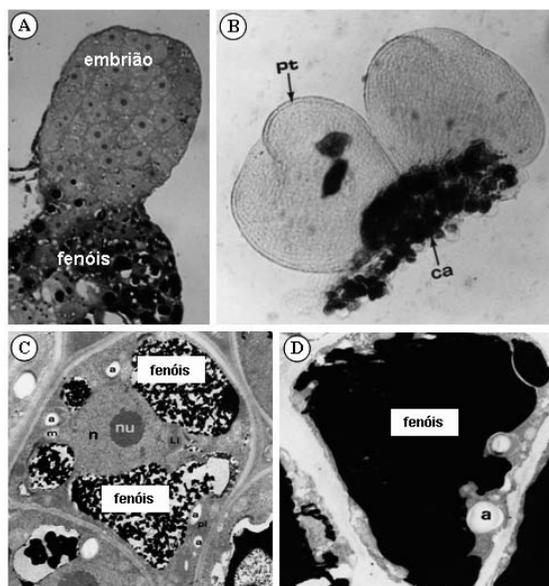


Figura 38 – Separação do embrião dos tecidos que lhe deram origem através da formação de uma camada rica em fenóis. A – Embrião globular e zona de células que acumulam compostos fenólicos. B – Dois embriões somáticos ligados a um calo (ca) com células totalmente preenchidas com compostos fenólicos. C – Observação por microscopia electrónica de varrimento de uma célula da camada rica em fenóis sendo notória a acumulação de fenóis nos vacúolos. D – Célula cujo vacúolo está repleto de compostos fenólicos. a - amido, Li - lípidos, m - mitocôndrias, n - núcleo, nu - nucléolo, pl - plastídeos, pt - protoderme.

Em algumas espécies o ácido abscísico tem sido utilizado para promover uma maturação mais eficaz dos embriões somáticos através do seu efeito positivo na acumulação de substâncias de reserva. Tratamentos com ácido abscísico e/ou com agentes osmóticos como manitol ou sorbitol são recomendados quando os embriões têm tendência para germinar precocemente, um processo que consiste no desenvolvimento da parte caulinar e radicular sem

que os embriões tenham passado pelas fases características de desenvolvimento. Com frequência, os embriões precocemente germinados apresentam cotilédones e hipocótilos pouco desenvolvidos em comparação com a raiz (Fig. 39). Uma eficaz maturação é crucial não apenas para a germinação e conversão dos embriões em plantas mas também para a produção de sementes artificiais (secção 4.5). O ABA promove também a síntese de um grupo particular de proteínas designadas por LEA como foi assinalado anteriormente. A sua função parece ser a de preparar os embriões para a dessecação em que grandes quantidades de água são perdidas. Estas proteínas têm uma forte capacidade de hidratação e parecem também actuar como estabilizadores da membrana celular. Uma dessecação eficaz dos embriões somáticos é particularmente útil quando se pretende manter os embriões somáticos conservados por períodos alargados de tempo em azoto líquido.

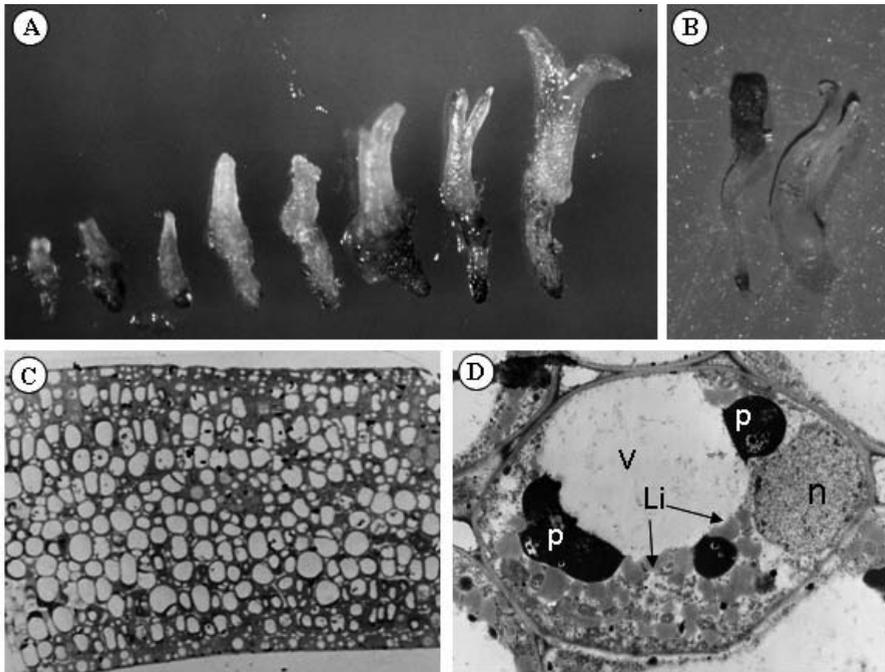


Figura 39 – Aspectos da germinação precoce de embriões somáticos. A – Embriões precocemente germinados em diferentes fases de desenvolvimento. Em todos eles é comum um hipocótilo pouco desenvolvido, ao contrário da raiz. B – Embrião precocemente germinado (esquerda) e embrião normal (direita). C - Secção de um cotilédone de um embrião somático onde é notória a vacuolização das células resultante de uma deficiente acumulação de reservas. D – Célula cotiledonar observada por microscopia electrónica. Notar o reduzido teor em corpos proteicos (p) e gotas lipídicas (Li). n – núcleo, v – vacúolo.

4.4.2.3. Germinação dos embriões somáticos e conversão em plantas

134

Por definição, a germinação inicia-se com a absorção de água pela semente e termina com o alongamento do eixo embrionário, normalmente a radícula. Tudo o resto são eventos pós-germinativos. Durante este processo ocorre a hidratação de proteínas, aumento da taxa respiratória, síntese de macromoléculas, alongamento celular e consumo de reservas com degradação dos corpos proteicos e lipídicos. Organitos celulares, como mitocôndrias e cloroplastos, iniciam a sua diferenciação. No entanto, a designação de germinação usa-se normalmente para englobar todos os processos que se iniciam com a hidratação das sementes e que terminam com a formação de plântulas. Alguns autores utilizam o termo conversão quando se referem à germinação dos embriões somáticos para a diferenciarem da germinação dos embriões zigóticos. Todavia, parece mais correcto usar o termo “germinação” para os eventos acima referidos, independentemente do tipo de embriões, e a designação “conversão” para as fases ulteriores que levam à obtenção de plantas a partir dos embriões germinados.

Como já se referiu, os embriões zigóticos podem permanecer num estado quiescente no interior da semente durante períodos muito alargados de tempo que chegam a atingir dezenas de anos (recentemente conseguiu-se no Japão a germinação de sementes de magnólia com cerca de 2000 anos). Isto permite que estas estruturas possam ser armazenadas sem perda de viabilidade ao contrário do que se verifica com os embriões somáticos.

A germinação dos embriões somáticos é normalmente conseguida após a sua transferência para um meio sem hormonas (Fig. 40). Nos casos em que os embriões são formados em meios com reduzidos potenciais osmóticos uma diminuição do teor de açúcares é também requerida para que ocorra germinação. No entanto, em muitas situações, é necessária a aplicação de tratamentos particulares. Assim, em algumas espécies, a presença de ácido giberélico ou de GA₃ mais citocininas favorece a germinação dos embriões. Noutras espécies, como por exemplo na vinha, é necessária a aplicação de tratamentos pelo frio para que os embriões germinem, situação que também ocorre nas sementes. Os tratamentos pelo frio quebram algum tipo particular de dormência que parece ser intrínseca ao próprio embrião

uma vez que os embriões somáticos também manifestam esta dormência. A aclimatização das plantas obtidas por embriogênese somática (Fig. 40) não requer condições diferentes das utilizadas com outros propágulos obtidos por outras técnicas de micropropagação (organogênese e proliferação de meristemas). Trata-se na verdade de uma fase crítica em que podem surgir perdas consideráveis. Assim, deve ser dada uma especial atenção aos níveis hídricos e à qualidade fitossanitária, evitando-se contaminações por fungos ou bactérias, como foi indicado no capítulo anterior.



Figura 40 – Germinação dos embriões somáticos e obtenção de plantas. A – Plântula obtida por germinação de um embrião somático. B – Plântulas em estados mais avançados de desenvolvimento regeneradas por embriogênese somática. C – Plantas após transferência para solo. D – Conjunto de plantas obtidas por embriogênese somática após cerca de 1 ano em vaso.

A germinação dos embriões é muitas vezes dificultada pelo elevado número de embriões anómalos que se formam durante a indução de embriogênese somática. Para além da formação de embriões precocemente germinados já referidos, essas anomalias estão relacionadas com o aparecimento de embriões com um número alterado de cotilédones ou com cotilédones

fundidos (Fig. 41). Noutras situações, os próprios embriões aparecem fundidos. Em muitos casos, os embriões apresentam grandes dimensões enquanto outros não ultrapassam o estado globular. Noutros casos ainda, os embriões somáticos são aparentemente normais mas a regeneração de plantas a partir deles não é conseguida. Nestas situações, a dificuldade de germinação pode estar relacionada com alterações estruturais no meristema apical caulinar, alterações genéticas ou fisiológicas ou com algum tipo de dormência que bloqueie a germinação. Muito comum é o aparecimento de alterações no cariótipo das plantas regeneradas (Fig. 41), em particular quando se trata de plantas obtidas a partir de calos embriogénicos mantidos por períodos muito longos em cultura. Pode também acontecer que as plantas regeneradas sejam morfológicamente normais mas apresentem algum tipo de variabilidade relativamente à planta mãe. Esta variabilidade entre as plantas de um suposto clone, e que surge com alguma frequência quando ocorre regeneração *in vitro* por embriogénese somática e também por organogénese, é designada variação somaclonal. As possíveis causas para o aparecimento de variação somaclonal são variadas e podem estar relacionadas com mecanismos genéticos ou epigenéticos. Embora esta variação tenha um carácter negativo pode acontecer que a variabilidade observada tenha interesse agronómico e, nessa perspectiva, a ocorrência de variação somaclonal pode contribuir para a obtenção de plantas com novas características. Algumas espécies parecem ser mais propícias à ocorrência de variação somaclonal do que outros. Por exemplo, nas gimnospérmicas (e.g. *Picea*, *Pinus*) em que algumas espécies são clonadas para fins comerciais por embriogénese somática, as plantas obtidas não apresentam, por regra, qualquer tipo de variação. Sempre que se suspeita que as plantas obtidas não sejam geneticamente iguais à planta que se pretende clonar devem utilizar-se análises do cariótipo ou marcadores moleculares para determinar se a variabilidade ocorre ou não.

Particularmente interessante é o facto de várias das anomalias apresentadas pelos embriões somáticos serem semelhantes aos fenótipos de mutantes defeituosos (“defective”) de *Arabidopsis* que afectam o desenvolvimento embrionário e as fases iniciais do desenvolvimento das plântulas. Por exemplo, na figura 41 (C), está representada uma plântula de feijoa que não possui raiz

primária. Em *Arabidopsis* os mutantes incapazes de formar a raiz primária são designados *hobbit* e essa anomalia está relacionada com uma alteração no padrão de divisões celulares durante fases precoces do desenvolvimento embrionário. A ocorrência de fenótipos análogos durante a indução de embriogênese somática sugere que os mesmos genes envolvidos no controle da embriogênese zigótica estarão também activos na embriogênese somática.

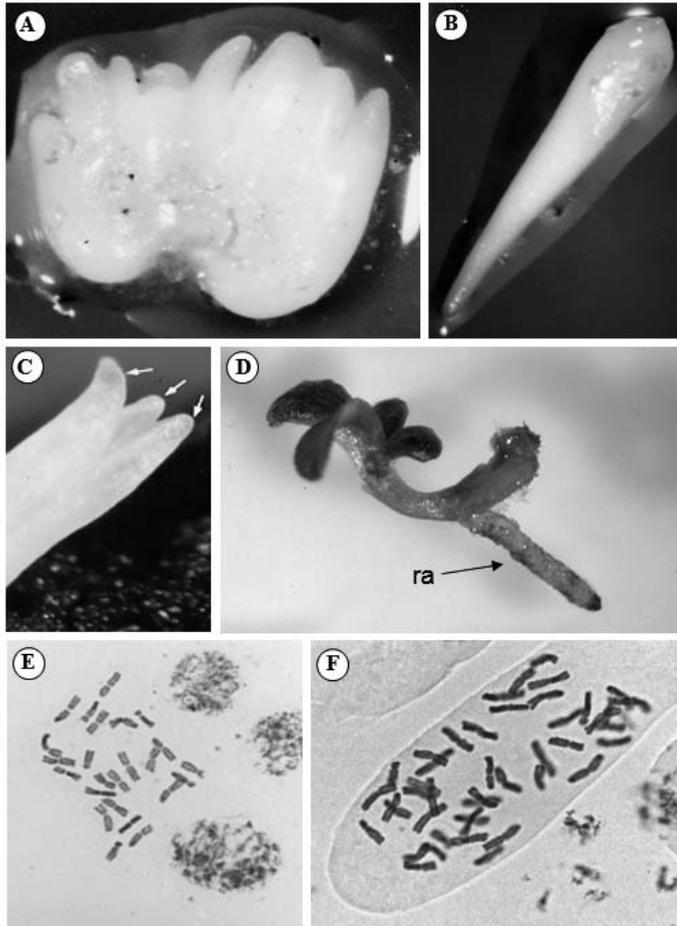


Figura 41 – Anomalias nos embriões ou nas plantas obtidas por embriogênese somática. A – embriões fundidos. B – Embrião com uma forma bizarra, parecido com um taco de "baseball". C – Embrião com 3 cotilédones. D – Plântula obtida por germinação de um embrião sem que a raiz principal se tenha desenvolvido. A raiz formada (ra) é uma raiz adventícia. Este fenótipo é análogo ao mutante defeituoso ("defective") de *Arabidopsis hobbit*. E – Placa metafásica obtida por tratamento com colchicina de uma raiz de uma planta de tamarilho com o número normal de cromossomas ($2n=24$). F – Como em E mas de uma planta obtida por embriogênese somática de um calo embriogénico com 5 anos de cultura em meio com 2,4-D. Notar o número anómalo de cromossomas (45).

Alguns autores consideram que uma exposição prolongada às auxinas e, em particular, ao 2,4-D, poderá ser a principal causa do elevado número de anomalias detectados em alguns sistemas embriogénicos. No entanto, a utilização de auxinas mais fracas como o IAA, ou de tempos de exposição ao 2,4-D mais curtos, não tem permitido reduzir o número de embriões anómalos. A principal causa do elevado número de embriões somáticos anómalos que se formam nas culturas *in vitro* está provavelmente relacionada com o facto deles se originarem em condições muito diferentes daquelas que existem no decurso da embriogénese zigótica. De facto, enquanto na embriogénese zigótica os embriões se desenvolvem num ambiente muito específico em que o acesso de nutrientes e reguladores de crescimento é perfeitamente controlado, no caso da embriogénese somática isso não se verifica, estando os explantes expostos a um meio de cultura que pode não ser o mais adequado ao seu desenvolvimento e que com dificuldade pode recriar as condições existentes no óvulo.

4.5. “Sementes artificiais”

Os embriões somáticos, ao contrário dos embriões zigóticos, não se encontram revestidos e não estão em contacto com um tecido de reserva idêntico ao endosperma. A possibilidade de revestir os embriões somáticos de forma a poderem ser armazenados e semeados como se de verdadeiras sementes se tratasse tem levado alguns investigadores a estudarem metodologias que possam no futuro levar à formação de estruturas equivalentes às sementes. A inclusão de embriões somáticos num revestimento artificial permite a obtenção de estruturas que são denominadas „sementes artificiais“ ou “sementes sintéticas” (Fig. 42). Teoricamente, a formação de sementes artificiais é mais fácil de aplicar em embriões de espécies exalbuminosas (não possuem endosperma quando maduras) como acontece na alfalfa (*Medicago sativa*) pois, neste caso, não será necessário incluir no revestimento substâncias de reserva, visto elas existirem nos cotilédones.

O alginato de sódio (extraído de algas castanhas) é o composto mais frequentemente utilizado para revestir os embriões somáticos. Trata-se de

um polissacarídeo que possui grupos negativamente carregados. O estabelecimento de ligações entre estes grupos de carga negativa e catiões divalentes (particularmente o cálcio), conduz à formação de um gel cujo grau de dureza depende da concentração de alginato e do tempo de exposição ao cálcio. Em regra utiliza-se uma concentração de alginato de 2-4% e tempos de exposição ao CaCl_2 (25-100 mM) de 20-40 min. Para além do alginato outros compostos podem também ser utilizados como é o caso do ágar, gelrite, gelatina, carragenanos ou quitosano. No entanto, o alginato, devido ao seu baixo custo, à sua reduzida toxicidade e facilidade de manuseamento é o composto mais promissor.

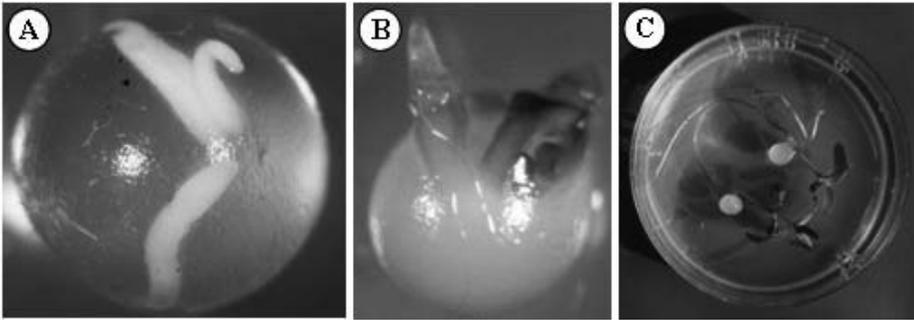


Figura 42 – Sementes artificiais. A – embriões somáticos revestidos por alginato. B – Germinação de um embrião somático incluído em alginato. C – Plantas obtidas por germinação de embriões incluídos em alginato.

Embora a utilização de sementes artificiais na agricultura esteja ainda longe de se poder tornar uma realidade, é provável que dentro de alguns anos embriões somáticos encapsulados possam de facto vir a ser utilizados no campo para a propagação de algumas espécies. As sementes artificiais, para além de poderem ser produzidas em grandes quantidades permitem fixar a heterozigotia de um determinado genótipo. Elas poderão ainda vir a ser usadas para a propagação de espécies que em condições naturais não produzem semente (e. g. bananeira) ou para a propagação de espécies dióicas em que é mais vantajoso ter plantas que produzam flores femininas (e.g. alfarrobeira, kiwi, tamareiras) pois são estas que originam o fruto. Outras vantagens residem no facto dos embriões encapsulados serem mais fáceis

de armazenar que os embriões somáticos isolados e numa maior garantia fitossanitária quando se fazem transferências de material vegetal entre países.

As principais dificuldades relacionadas com este tipo de tecnologia dizem respeito à reduzida viabilidade que as sementes artificiais apresentam, sendo difícil armazená-las por períodos longos. Este aspecto relaciona-se com a dificuldade dos gases difundirem no alginato e com a rápida dessecação que estas estruturas sofrem quando expostas ao ar. Como já referimos, em espécies endospérmicas a sua produção é ainda mais difícil em virtude de até ao momento não se ter conseguido inserir nas cápsulas compostos que possam suportar o crescimento dos embriões nas fases iniciais da germinação. Um composto com potencialidades é a sacarose mas trata-se de um açúcar que difunde rapidamente através do alginato sendo difícil de fixar nas cápsulas. A fraca qualidade dos embriões somáticos obtidos em muitas espécies bem como os custos de produção e dificuldades de robotização são outros problemas a resolver antes desta tecnologia poder ser aplicada.

4.6. Estudos genéticos, bioquímicos e moleculares

Apesar dos progressos que a biologia molecular tem conhecido nas últimas duas décadas, e dos primeiros embriões somáticos na cenoura terem sido obtidos há quase cinquenta anos, muito existe ainda para descobrir sobre os mecanismos genéticos e moleculares subjacentes à indução de embriogénese somática. Muitas centenas de artigos têm sido publicados sobre a indução de embriogénese somática nas mais variadas espécies mas apenas um número reduzido está relacionado com os possíveis mecanismos de indução. De entre estes, a maioria dos ensaios tem sido realizado na cenoura ou noutros sistemas modelo (*Medicago sativa*). Mais recentemente, a espécie *Arabidopsis thaliana* tem também sido utilizada na análise dos mecanismos moleculares subjacentes à indução de embriogénese somática.

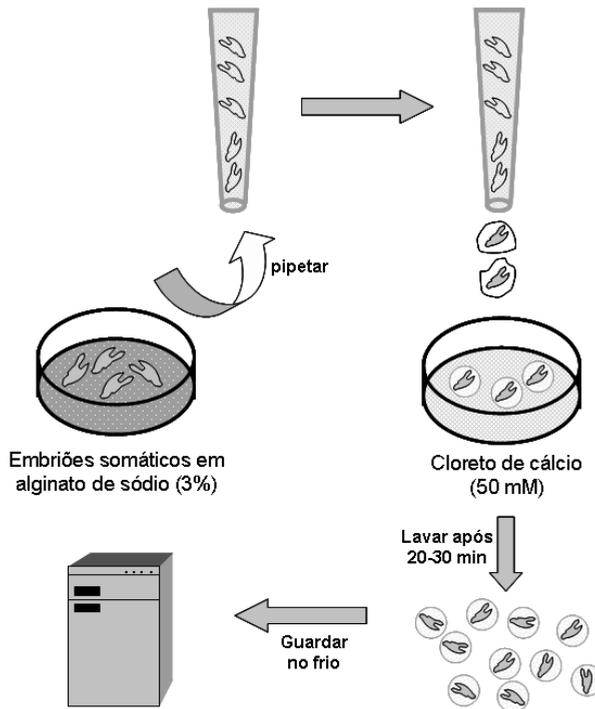


Figura 42 – Esquema do procedimento experimental usado para inclusão dos embriões somáticos em alginato de sódio. Os embriões revestidos podem ser armazenados no frio a 4°C ou por períodos mais longos se criopreservados em azoto líquido.

Este tipo de análise tem seguido, essencialmente, as seguintes vertentes:

- Comparação dos perfis de proteínas e RNA entre linhas embriogénicas e não embriogénicas
- Estudo da evolução da síntese de macromoléculas ácidos nucleicos e proteínas durante a indução de embriogénese somática.
- Estudos da expressão de determinados genes durante a indução de embriogénese somática.
- Utilização de mutantes de *Arabidopsis* que interferem com o funcionamento do meristema apical do caule.
- Expressão ectópica de genes que controlam o desenvolvimento embrionário.
- Análise do papel de proteínas de arabinogalactano (AGPs) e de lipogalactanos (LCOs).

Na cenoura, em que a formação dos embriões somáticos ocorre em duas fases, uma indutora na presença de auxina e outra de desenvolvimento dos embriões somáticos na ausência de auxina, realizaram-se estudos com vista à identificação de proteínas específicas do início do desenvolvimento dos embriões.

De acordo com os trabalhos do grupo de De Vries a formação de embriões somáticos na cenoura é acompanhada pela secreção de um número limitado de proteínas para o meio de cultura (proteínas extracelulares, EPs). Em culturas que não formam embriões somáticos estas proteínas não estão presentes ou existem em quantidades muito reduzidas. Estes resultados sugerem que algumas das proteínas segregadas para o meio estão relacionadas com o desenvolvimento embrionário. O facto das proteínas secretadas poderem ter um papel na embriogénese somática é sustentado por três tipos de observações:

1) a velocidade com que células da cenoura, libertadas do hipocótilo, adquirem a capacidade de formar embriões somáticos é consideravelmente aumentada pela adição de componentes de elevado peso molecular e sensíveis ao calor, provenientes de suspensões celulares embriogénicas;

2) a ausência ou fraca produção de embriões somáticos em linhas não embriogénicas pode ser revertida pela adição de componentes segregados para o meio em suspensões celulares embriogénicas;

3) quando o desenvolvimento dos embriões somáticos é inibido pela tunicamicina (um antibiótico de origem fúngica inibidor da N-glicosilação de proteínas) a adição de glicoproteínas segregadas para o meio em suspensões embriogénicas pode recuperar o desenvolvimento dos embriões.

Tentativas realizadas para identificar quais os factores responsáveis pelas respostas acima referidas presentes no meio de cultura de suspensões embriogénicas levaram à identificação de diferentes tipos de proteínas. Uma das primeiras proteínas (10 kDa) a ser identificada foi designada por EP2 a qual mostrou ser análoga a proteínas de transferência de lípidos (LTPs,

“lipid transfer proteins”) presentes noutras espécies. Analisando a distribuição desta proteína em diferentes tecidos vegetais, verificou-se que ela estava presente apenas na protoderme de embriões zigóticos e somáticos e nas células epidérmicas dos primórdios foliares, órgãos florais e sementes maduras. A expressão desta proteína na protoderme e tecidos epidérmicos levou à hipótese que ela poderia estar envolvida na transferência de monómeros de cutina através da parede celular para locais de polimerização da cutina. No que diz respeito à embriogénese somática foi sugerido que a proteína EP2 possa estar envolvida na deposição de uma cutícula a envolver os somáticos embriões. De facto, em muitas espécies, verifica-se que os embriões estão isolados das células adjacentes por uma espessa parede celular. Nos embriões somáticos a cutícula poderá servir para proteger o embrião da actividade de enzimas hidrolíticas provenientes do meio de cultura e evitar a absorção de grandes quantidades de água do meio exterior que poderiam perturbar o normal desenvolvimento dos embriões.

Uma outra proteína foi designada por EP3 e isolada a partir de experiências com uma linha celular de cenoura sensível à temperatura (ts11, “temperature sensitive”) e obtida após tratamento com um agente mutagénico (EMS, etil metano sulfonato). Esta linha celular, quando mantida a uma temperatura de 24°C dá origem a embriões que se desenvolvem normalmente. Todavia, a 32°C, os embriões somáticos não ultrapassam o estado globular. A adição de meio das suspensões celulares à linha celular submetida a uma temperatura de 32°C restaura o normal desenvolvimento dos embriões. Na sequência destas experiências, uma proteína de 32 kDa de natureza acídica foi purificada do meio adicionado e identificada como uma endoquitinase. Em condições normais esta enzima poderá ter como substrato quitina proveniente da parede de fungos desempenhado assim um papel na defesa contra este tipo de agentes patogénicos. O seu substrato durante o desenvolvimento dos embriões somáticos não foi ainda determinado com exactidão mas poderá ser algum componente da parede celular. O principal efeito morfológico desta endoquitinase nos embriões globulares da linha ts11 parece ser a edificação da protoderme, sugerindo que a causa do não desenvolvimento embrionário desta linha é causada pela inability de formar uma protoderme a uma temperatura não permissiva.

Dados mais recentes sugerem que as proteínas de arabinogalactano podem ser um substrato para este tipo de endoquitinases, levando à produção de lipoquitiligosacarídeos que podem ter um papel importante no desencadear da embriogénese. As AGPs são um grupo diversificado de proteínas formadas por um peptídeo, um glicano altamente ramificado e de elevado peso molecular (90% do peso da molécula) e uma porção lípidica. Estão presentes no plasmalema e na parede celular e alterações no seu padrão de distribuição afectam a embriogénese somática. Por exemplo, na cenoura, a adição de AGPs promove a formação de embriões somáticos enquanto a adição do reagente de Yariiv, que liga especificamente AGPs, bloqueia o processo de indução. O mesmo se verifica quando anticorpos contra AGPs são utilizados. Por sua vez, os LCOs são moléculas sinal promotoras da divisão celular em células vegetais, como se verifica com os factores Nod produzidos pelas bactérias do género *Rhizobium* que formam nódulos em raízes de leguminosas. À semelhança do que se verifica com as AGPs a adição de factores Nod estimula a embriogénese somática na cenoura e em epíceas e pode substituir o efeito das endoquitinases no processo de indução de embriogénese na cenoura. Os resultados parecem sugerir que as AGPs possam servir de substrato a endoquitinases, cuja clivagem pode levar à produção de LCOs, os quais servirão como moléculas sinal no processo de indução de embriogénese.

Nos ensaios realizados com tunicamicina verificou-se que o factor responsável por contrariar o efeito da tunicamicina era uma peroxidase catiónica de 38 kDa (EP5). A tunicamicina bloqueia a embriogénese somática antes do estado globular e promove a expansão das células da superfície de massas proembriogénicas alterando completamente a sua estrutura. A adição de peroxidases inibe a expansão celular e permite o desenvolvimento normal dos embriões. Destes resultados foi proposto que esta peroxidase pode ter uma função na embriogénese somática reduzindo a expansão celular através de ligações cruzadas entre polímeros da parede celular e cadeias fenólicas.

Todas estas proteínas poderão ter um papel na inibição da expansão celular ou na vacuolização precoce das células embrionárias contribuindo para a manutenção das células num estado embrionário quer através do estabelecimento de ligações cruzadas nas células embriogénicas (EP5)

quer através do desenvolvimento de uma protoderme que impõe um limite à expansão dos embriões (EP2, EP3). Outros factores parecem também indicar que uma expansão celular precoce afecta o desenvolvimento dos embriões somáticos. Assim, durante a embriogénese zigótica o potencial osmótico nos óvulos é muito reduzido nos estados iniciais da embriogénese contribuindo para evitar a expansão celular. Também em algumas espécies a adição de elevadas concentrações de sacarose favorece a indução da embriogénese somática provavelmente por um efeito osmótico. Finalmente, na cenoura, baixos valores de pH (4,5) também promovem a embriogénese somática e evitam a expansão celular.

Este tipo de estudos comparativos entre linhas embriogénicas e não embriogénicas são aqueles que melhor informação têm dado quanto às proteínas (e conseqüentemente aos genes) que desempenham um papel importante na indução de embriogénese. A expressão de genes conhecidos no desenvolvimento dos embriões somáticos pouco tem permitido avançar o mesmo se podendo dizer sobre a análise de macromoléculas durante as fases iniciais de indução. De facto, neste último caso, apenas se tem provado um aumento das taxas de síntese de RNA e proteínas durante a indução, situação que seria de esperar em células metabolicamente activas como são as células embriogénicas.

Embora o sistema modelo da cenoura tenha sido o mais utilizado para a indução de embriogénese somática na cenoura este modelo apresenta uma enorme desvantagem que tem levado alguns autores a estudarem outros sistemas. Essa desvantagem reside no facto de na cenoura os embriões se formarem em dois passos: um primeiro em que a auxina é necessária para a indução de massas pró-embriogénicas e um segundo em que é necessário remover a auxina no meio para que estas massas evoluam em embriões somáticos. Acontece que a maior parte dos estudos têm sido feitos na segunda fase do processo, numa altura em que a indução já se verificou. Isto implica que os produtos isolados não têm a ver com a indução mas com uma fase posterior do processo. Além disso, os estudos na presença de auxina, são muitas vezes confusos devido ao facto de não se conhecer com precisão se as alterações verificadas são específicas da embriogénese ou se são devidos a outros efeitos laterais que as auxinas

também podem provocar, como sejam o alongamento celular, a divisão celular ou a activação de vias específicas de sinalização intracelular que envolvem a ubiquitina.

Como se referiu, uma possível alternativa à cenoura pode ser o sistema modelo da alfalfa. Neste caso, os calos mantidos em meios líquidos contendo NAA e KIN proliferam e não formam embriões somáticos. No entanto, se o meio de cultura for substituído por um meio contendo 2,4-D e se submeterem os calos a um choque com elevadas concentrações desta auxina (100 mM) durante 1h então formam-se inúmeros embriões somáticos no meio de cultura. Este tipo de investigação conduzido pelo grupo de D. Dudits tem seguido uma linha de raciocínio que compara as modificações no zigoto em consequência da fecundação com as modificações celulares derivadas do choque auxínico. A transição de um estado caloso para um estado embriogénico pode ser analisado como um choque hormonal ou como um stresse que activa componentes idênticos aos da via de transdução de sinal que ocorre quando o gâmeta masculino se liga ao feminino. À semelhança da cenoura este modelo também apresenta alguns problemas o principal dos quais é saber até que ponto estas modificações estão de facto relacionadas com a embriogénese ou são simplesmente o resultado de uma exposição ao 2,4-D não directamente relacionado com a embriogénese. Apesar destes paralelismos não há ainda uma teoria unificadora que permita, quer no caso da cenoura quer no caso da alfalfa, juntar os dados adquiridos e explicar aquilo que desencadeia a embriogénese. Isto resulta em grande parte dos próprios sistemas embriogénicos que apresentam bastantes limitações como sejam:

- ausência de sincronização no desenvolvimento dos embriões;
- presença de células embriogénicas e não embriogénicas numa mesma população com predominância destas últimas;
- expressão do potencial embriogénico apenas durante um certo período de tempo;
- fracos conhecimentos sobre o mecanismo de actuação das auxinas quer relativamente à indução de embriogénese quer relativamente a outros dos seus efeitos.

Um gene identificado por Schmidt *et al.* (1997) em fases muito precoces do desenvolvimento embrionário e presumivelmente envolvido na aquisição de competência embriogénica pelas células somáticas é o gene *SERK* (*SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE*), primeiro identificado na cenoura (*DcSERK*) e depois em várias outras espécies como *Arabidopsis*, *Dactylis glomerata* e *Zea mays* entre outras. Este gene codifica para uma proteína transmembranar que possui um domínio extracelular com cinco regiões ricas em leucina (LRR, “leucine reach repeat”) e um domínio intracelular com actividade cinásica. Para além disso, a proteína tem uma região rica em prolina entre o domínio extracelular e a região incluída na membrana, uma característica normalmente associada às extensinas, proteínas envolvidas no mecanismo de alongamento celular. A região proteica extracelular funciona provavelmente como um local receptor enquanto a região intracelular será responsável pela activação de cascatas de transdução de sinal envolvidas na formação de embriões somáticos.

As limitações dos sistemas embriogénicos referidos levaram vários autores a utilizar a planta *Arabidopsis* para tentar perceber os factores que controlam a indução de embriogénese somática. Estudos realizados recentemente mostraram que a indução de embriogénese somática em *Arabidopsis* é facilitada em plântulas mutantes que apresentam um meristema apical do caule anormalmente desenvolvido como nos mutantes *primordia timing* (*pt*) e *clavata* (*clv*). Estes indicam que um aumento de células meristemáticas pode estar envolvido numa maior facilidade de formação de embriões. No entanto, estes dados são contrariados pelo facto de mutantes incapazes de formar SAM serem capazes de formar embriões da mesma forma que o fenótipo selvagem.

Ainda em *Arabidopsis* verificou-se que em plantas geneticamente transformadas com genes que se exprimem durante o desenvolvimento embrionário, e que codificam factores de transcrição, como os genes *LEAFY* *COTYLEDON* (*LEC1* e *LEC2*) ocorre a formação de embriões somáticos de forma espontânea nas células mesmo na ausência de auxinas. Mutantes deste gene apresentam características embrionárias nas plântulas como sejam a presença de tricomas nas folhas e a ausência de acumulação de substâncias de reserva. Isto sugere que o gene é específico da embriogénese.

O gene *LEC* parece ser controlado pelo gene *PICKLE* o qual é activado por giberelinas. O gene *PICKLE* codifica para um factor que altera a conformação da cromatina sugerindo um possível envolvimento na embriogénese. A expressão ectópica de outros genes como *AGAMOUS-LIKE15*, *BABY BOOM* e *WUSCHEL* leva também à formação de embriões somáticos. Muitos destes genes codificam factores de transcrição que podem interferir com a expressão de genes necessários para o desencadear da embriogénese. Em tamarilho a comparação dos perfis proteicos de calos embriogénicos e não embriogénicos de origem foliar permitiu identificar uma proteína de cerca de 25 kDa presente em calos não embriogénicos e que parece ser um repressor da embriogénese. Linhas de *Arabidopsis knocked out* para o gene responsável pela síntese da referida proteína mostram níveis mais elevados de indução de embriogénese sugerindo de facto que a proteína tem um efeito inibidor no processo de formação de embriões somáticos. A forma como esta proteína exerce o seu efeito inibidor não está ainda determinada. A análise de bases de dados revelou que a proteína tem algumas analogias com RNA metil transferases sugerindo que possa actuar através de um mecanismo de metilação do RNA.

4.7. Considerações finais

Embora seja um facto que os mecanismos moleculares envolvidos na formação dos embriões somáticos estão longe de estar compreendidos não deixa de ser verdade que a embriogénese somática foi já aplicada com sucesso à multiplicação de um grande número de espécies pertencentes às mais variadas famílias de angiospérmicas e gimnospérmicas. No que diz respeito à regeneração de plantas *in vitro* os embriões somáticos são muito vantajosos pois, ao contrário das estruturas obtidas nos outros tipos de regeneração, não é necessário proceder ao seu enraizamento o que encurta o período de regeneração. Esta metodologia é também a ideal para a regeneração de plantas geneticamente transformadas desde que esteja provado que os embriões têm uma origem unicelular. A qualidade fitossanitária das plantas regeneradas por embriogénese somática está também garantida

uma vez que estas estruturas não se apresentam contaminadas por vírus. A embriogénese somática pode também ser utilizada para a obtenção de grandes quantidades de híbridos inter ou intra-específicos através da proliferação embriogénica das células dos embriões zigóticos assim obtidos. Outras vantagens deste tipo de morfogénese relacionam-se com a possibilidade de estudar a fisiologia do desenvolvimento embrionário situação que não se verifica durante a embriogénese zigótica em virtude do zigoto e do embrião serem uma estrutura de difícil acesso; o rejuvenescimento em espécies lenhosas e a possibilidade de, no futuro, produzir-se sementes artificiais.

A utilização de modernas técnicas de análise molecular como *differential display*, *microarrays*, hibridação subtractiva, construção de bibliotecas de cDNA, e bases de dados de ESTs (*expressed sequence tags*) tem permitido novas abordagens na identificação de genes relacionados com a embriogénese somática. No entanto, a indução de embriogénese somática permanece ainda, na maioria das espécies, um processo um pouco estocástico, cujo maior ou menor sucesso é difícil de controlar. De facto, embora existam actualmente protocolos para a indução de embriogénese somática em centenas de espécies, a verdade é que sabemos muito pouco sobre os mecanismos fisiológicos e moleculares que lhe estão subjacentes, em particular sobre as chamadas vias de transdução de sinal. O que desencadeia o comportamento embriogénico de uma célula ou de um grupo de células? Quais são os genes envolvidos? Porque razão condições de cultura diferentes resultam numa resposta semelhante? Quais são os receptores do “sinal embriogénico”? Tudo isto são questões em aberto que mostram que ainda há muita investigação a realizar nesta área. A indução de embriogénese somática envolve uma série complexa de diferentes fases que pressupõe, pelo menos, o reprogramar do programa genético de uma célula diferenciada, a ocorrência de divisões celulares, aquisição de competência embriogénica, estabelecimento de polaridade e diferenciação dos embriões somáticos. Todos estes processos estão interligados e a maneira como interagem não está de forma alguma esclarecida. Mecanismos celulares relacionados com o controlo do ciclo celular, com a actividade do citosqueleto e com vias de transdução de sinal mediadas por cálcio e calmodulina durante o processo de indução necessitam de ser melhor analisados.

Outro aspecto que deve merecer uma atenção mais cuidada relaciona-se com a qualidade dos embriões produzidos. Em muitas espécies, a qualidade dos embriões somáticos obtidos é deficiente, provavelmente devido ao número de variáveis envolvidas no processo e ao nosso desconhecimento sobre as condições mais adequadas para ultrapassar as diferentes etapas, da indução à transferência das plantas para solo. Dado o elevado número de anomalias que se observam entre os embriões somáticos, torna-se imperioso estabelecer condições de cultura que reduzam drasticamente as alterações genéticas e fisiológicas que estão na base das modificações observadas. Sem que isso aconteça, dificilmente será possível utilizar os embriões somáticos em termos agrícolas. No entanto, e considerando as anomalias observadas mais numa perspectiva da biologia do desenvolvimento, a sua caracterização molecular poderá ser uma ferramenta útil na identificação de eventuais genes envolvidos no controlo do desenvolvimento embrionário.

CAP. 5. EMBRIOGÉNESE POLÍNICA E OBTENÇÃO DE HAPLÓIDES

5.1. Introdução

Nos capítulos anteriores foram referidos processos de cultura *in vitro* relacionados com a clonagem de plantas. Este capítulo e os seguintes tratam de técnicas de cultura *in vitro* cujo objectivo não é a clonagem de plantas mas sim a utilização das plantas ou das células em cultura com outras finalidades. No caso particular deste capítulo, será analisada a formação de plantas haplóides e o seu potencial em termos de melhoramento de plantas. A obtenção de plantas haplóides não necessita obrigatoriamente do recurso a técnicas de cultura *in vitro*. No entanto, nos nossos dias, estas são as metodologias mais eficazes para a obtenção de um grande número de plantas haplóides que possam depois ser usadas em programas de melhoramento genético.

A obtenção de haplóides implica que as plantas regeneradas tenham origem em células haplóides. Nas angiospérmicas, a ocorrência de células haplóides limita-se aos gametófitos masculinos e femininos, ou seja, respectivamente, os grãos de pólen formados no interior das anteras e aos sacos embrionários que se desenvolvem no interior dos óvulos. Esta é uma limitação importante e que muito condiciona a realização de ensaios experimentais pois, para além do número de células haplóides ser reduzido (1 a 3 no caso dos grãos de pólen, 6 no caso dos sacos embrionários), existe também uma limitação temporal, uma vez que algumas plantas só formam flores após um longo período juvenil de crescimento vegetativo e, na maior parte das espécies, a floração ocorre apenas uma vez por ano. Ao comparar

os dois tipos de estruturas a partir das quais se podem obter os haplóides facilmente somos levados a concluir que as anteras são um material de estudo mais interessante pois o número de grãos de pólen formados por antera é incomparavelmente superior ao número de sacos embrionários por formado num óvulo, na verdade apenas um.

Os grãos de pólen (gametófitos masculinos) produzidos no interior das anteras (Fig. 43) têm uma função bem definida que consiste na formação dos gâmetas masculinos (células espermáticas) envolvidos na dupla fecundação característica das angiospérmicas. Mas, como mostraram Guha e Maheshwari em meados dos anos 60, em *Datura innoxia* e em *Datura stramonium*, quando estavam a estudar factores capazes de desencadear a meiose em células mães dos grãos de pólen, a capacidade dos grãos de pólen não se esgota com esta função. Quando cultivados *in vitro* os microsporos ou os grãos de pólen, à semelhança do que acontece na embriogénese somática, são também capazes de manifestar totipotência, formando assim embriões e/ou calos polínicos, denominados embriões polínicos. Estes embriões são morfologicamente semelhantes aos embriões zigóticos da mesma espécie e, ao germinarem, originam plantas também morfologicamente idênticas às obtidas por germinação de sementes, como foi demonstrado, pela primeira vez, no tabaco por Bourgin e Nitsch e na *Datura* por Guha e Maheshwari, em finais dos anos 60.

A regeneração de plantas a partir dos microsporos ou grãos de pólen é um processo vulgarmente conhecido por androgénese (origem a partir da parte masculina), embriogénese polínica, embriogénese dos microsporos ou embriogénese gamética. Esta última designação não é particularmente feliz uma vez que os embriões formam-se a partir dos microsporos ou do pólen mas não dos gâmetas masculinos. A descoberta da embriogénese polínica abriu um leque de novas oportunidades ao melhoramento vegetal que os melhoradores rapidamente começaram a aproveitar. De facto, a obtenção de plantas haplóides permite que, por duplicação cromossómica se obtenham plantas totalmente homozigóticas (linhas puras) cujo interesse em termos de melhoramento genético é há muito reconhecido. Nas secções seguintes será analisada a obtenção de plantas haplóides bem como o seu interesse em termos práticos.

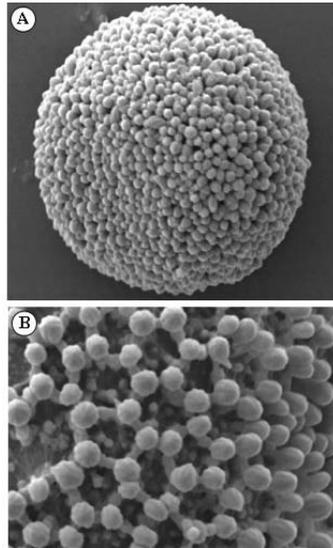


Figura 43 – Grão de pólen (A) e detalhe da exina (B), uma das estruturas biológicas mais resistentes que se conhece.

5.2. Ocorrência natural de haplóides

Antes de nos debruçarmos mais detalhadamente sobre a importância dos haplóides em termos de melhoramento vegetal, é interessante referir que, na natureza, a ocorrência de organismos haplóides é mais vulgar do que à primeira vista se poderia pensar. Assim, em pelo menos quatro ordens de insectos (coleópteros, himenópteros, homópteros e tisanópteros), os machos de algumas espécies, cuja determinação sexual é feita pelo sistema haploidia-diploidia, são haplóides pois resultam de óvulos não fecundados enquanto as fêmeas, resultantes de um processo normal de fecundação, são diplóides. Espécies haplo-diplóides são também características de outros grupos como ácaros, nemátodes e rotíferos. A ocorrência de outros organismos com ciclos de vida totalmente haplóides é comum em protozoários, algas verdes e vermelhas e muitos fungos. Nas plantas, verifica-se uma redução da fase haplóide desde as plantas menos evoluídas (briófitas) até às angiospérmicas onde a fase haplóide se limita aos grãos de pólen e aos sacos embrionários. Apesar da condição normal das angiospérmicas

ser a diploidia, plantas haplóides podem ocorrer espontaneamente numa população como foi primeiro assinalado por Bergner em 1921 em *Datura stramonium*, e ulteriormente, referido para várias espécies. Em condições naturais, a frequência de formação de haplóides é muito reduzida, tendo sido estimada entre 0,001 e 0,01% das plantas. Importa aqui fazer a distinção entre os haplóides das espécies diplóides, designados por monohaplóides e que possuem apenas um único conjunto de cromossomas e que são na realidade os verdadeiros haplóides, e os haplóides das espécies poliplóides (trigo, batateira...), denominados polihaplóides e que podem ser considerados haplóides em relação à planta a partir do qual foram obtidos mas que não são na realidade verdadeiros haplóides. Por exemplo, na batateira que se cultiva, e que é um tetraplóide ($2n=4x=48$), os haplóides obtidos são na verdade diplóides ($n=2x=24$). Um caso muito interessante é o de uma formiga australiana (*Myrmecia pilosula*) cujo número diplóide é $2n=2$ mas em que os machos, por serem haplóides possuem apenas um cromossoma.

As plantas haplóides espontâneas podem surgir na sequência da proliferação da oosfera sem que ocorra fecundação (partenogénese) ou da divisão de outras células haplóides do saco embrionário como as sinérgidas ou as antípodas (apogamia generativa). Pode ainda acontecer que as células gaméticas masculinas que entram no saco embrionário possam proliferar e dar origem a plantas haplóides de origem masculina, um processo que, à semelhança da obtenção de plantas por cultura de microsporos é também conhecido por androgénese. Por este motivo, a designação embriogénese polínica será usada ao longo deste trabalho para referir a formação de plantas com origem nos microsporos ou grãos de pólen. Existem espécies em que estas situações são relativamente comuns e, mais interessante ainda, dentro de uma mesma espécie, genótipos com maior potencial para formar plantas desta maneira.

Anteriormente à descoberta da indução de embriogénese polínica alguns autores tinham constatado que nas anteras de determinadas espécies era possível detectar, *in vivo*, grãos de pólen multicelulares os quais, remotamente, se assemelhavam a sacos embrionários. Este fenómeno, conhecido como fenómeno Nemeč (em homenagem ao primeiro autor que observou estas estruturas), foi assinalado em *Hyacinthus orientalis*, *Leptomeria billardieri*

e em *Bellevallia hackelii* e mostrou que o potencial de desenvolvimento do pólen ia muito para além da formação dos gâmetas masculinos.

5.3. Métodos de obtenção de haplóides

Com a descoberta dos haplóides espontâneos começaram a surgir diversas metodologias para a produção de plantas haplóides. Os primeiros haplóides induzidos foram obtidos, em 1926, por Gaines e Aase no trigo. Alguns desses métodos como o método "bulbosum", aplicado na cevada e no trigo e a utilização da espécie *Solanum phureja* em cruzamentos com *Solanum tuberosum* (para a obtenção de plantas de batateira haplóides) são bastante eficazes, mas a sua utilização está limitada a um número reduzido de espécies. O método *bulbosum* tem sido aplicado com grande sucesso para a obtenção de haplóides de trigo e cevada. Em termos gerais, esta metodologia consiste em cruzar plantas de trigo (*Triticum aestivum*, $2n = 6x = 42$ ou *Triticum durum* $2n = 4x = 28$) ou de cevada (*Hordeum vulgare*, $2n = 2x = 14$) com plantas de *Hordeum bulbosum* ($2n = 2x = 14$), funcionando as plantas de *H. bulbosum* como progenitores masculinos e as plantas das quais se pretendem obter os haplóides como progenitores femininos (Fig. 44). Os cruzamentos são feitos de forma controlada polinizando as espigas de trigo ou cevada com pólen de *bulbosum*. Em condições naturais as sementes (embriões) produzidas a partir deste cruzamento desenvolvem-se durante cerca de 10 dias após os quais o embrião começa a degenerar, em virtude do desenvolvimento embrionário não ser acompanhado pela formação do endosperma. Todavia, se os embriões imaturos forem isolados cerca de 15 dias após a polinização e cultivados num meio nutritivo (uma técnica chamada "salvamento de embriões"), eles podem continuar o seu desenvolvimento e originar plantas. No entanto, e contrariamente ao que seria expectável, as plantas obtidas não vão ser híbridos entre as duas espécies. Na verdade, as plantas assim obtidas possuem apenas 7 cromossomas (21 no caso do trigo) sendo todos eles provenientes do progenitor que funcionou como feminino (*H. vulgare* ou *T. aestivum*). Uma explicação plausível para esta situação seria supor que as plantas resultam da ocorrência de

partenogénese, sendo formadas a partir do desenvolvimento da oosfera de *H. vulgare* sem que tenha ocorrido fecundação. No entanto, verificou-se que o processo é um pouco mais complexo e que, na verdade, as plantas haplóides de *H. vulgare* resultam do facto de ocorrer uma eliminação selectiva dos cromossomas de *H. bulbosum* em ciclos mitóticos sucessivos, em particular nos primeiros 3-5 dias de cultura após a polinização. O mecanismo de eliminação cromossómica não está definitivamente esclarecido mas julga-se envolver uma incompatibilidade entre o citoplasma materno (*H. vulgare* ou *T. aestivum*) e os cromossomas paternos (*H. bulbosum*) tendo como consequência o retardar da deslocação de alguns cromossomas de *bulbosum* para a placa equatorial, seguida de uma segregação assimétrica na anafase e a formação de micronúcleos contendo os cromossomas de *H. bulbosum* que são ulteriormente degradados. Outras hipóteses como a degradação de cromossomas estranhos por endonucleases, assincronia nos ciclos celulares dos dois progenitores ou a separação espacial dos genomas durante a interfase têm também sido sugeridas. Relativamente à obtenção de haplóides por embriogénese polínica este método apresenta a vantagem das plantas regeneradas serem verdes em oposição ao elevado número de plantas albinas que se obtêm por embriogénese polínica na cevada e no trigo (secção 5.8.1). Além disso, a técnica pode ser utilizada com qualquer cultivar de trigo ou cevada enquanto na embriogénese polínica apenas alguns cultivares parecem responder. Este método, descoberto por Kasha e Kao nos anos 70 tem sido aplicado a cruzamentos entre outras gramíneas com o intuito de obter haplóides noutras espécies.

Outros métodos fazem uso da polinização com pólen irradiado, ou pólen de outras espécies, com o objectivo de estimular divisões nas células que constituem os sacos embrionários sem que ocorra fecundação. Divisões destas células podem também ser estimuladas por tratamentos físicos (raios x, choques térmicos) ou químicos (colchicina). Haplóides podem ainda ser obtidos através da cultura de óvulos, processo denominado ginogénese. Embora o número de plantas haplóides que se podem obter por ginogénese seja, potencialmente, mais reduzido que quando se trata da indução de embriogénese polínica, esta técnica é muito utilizada em espécies em que a androgénese é difícil de induzir, como *Beta vulgaris* (beterraba) ou

em situações em que as anteras degeneram em fases precoces do seu desenvolvimento, como acontece em alguns cultivares de *Hevea brasiliensis* (árvore-da-borracha).

5.4. Embriogénese polínica

A produção de haplóides a partir da cultura de anteras ou de pólen isolado é, de entre todos os métodos de obtenção de haplóides, aquele que mais vantagens apresenta, não apenas devido ao elevado número de grãos de pólen que uma antera possui, mas também por ser relativamente simples de aplicar. Daí o elevado número de espécies em que foi possível regenerar plantas por androgénese. Embora a maioria dos resultados positivos se tenha verificado com espécies das famílias Gramineae (trigo, cevada, milho, arroz...) Cruciferae (couves, nabos, mostarda...) e Solanaceae (tabaco, batateira, pimenteiros, daturas...) mais recentemente, têm sido também obtidos resultados importantes com lenhosas (choupo, árvore-da-borracha, cameleira...).

A obtenção de plantas haplóides é de grande importância em termos de melhoramento vegetal. De facto, a duplicação do número de cromossomas de uma planta haplóide permite a obtenção de uma planta totalmente homocigótica. Estas linhas puras, designadas duplo-haplóides ou haplóides-duplos (HD) são de grande interesse no melhoramento uma vez que, do cruzamento de duas linhas puras, se obtêm verdadeiros híbridos que são muito produtivos em termos agrícolas por possuírem aquilo a que vulgarmente se chama heterose ou vigor híbrido. Por exemplo, muitas dos modernos cultivares de milho actualmente cultivados são milhos híbridos com uma produção muito mais interessante que as linhas originais. Em programas de melhoramento convencional uma linha pura leva 6-8 anos a ser obtida através de autofecundações sucessivas, ocorrendo sempre alguma heterocigotia residual. Além disso, em espécies que apresentam polinização cruzada, a obtenção de linhas puras torna-se bastante problemática pois os cruzamentos têm que ser feitos de forma artificial. Utilizando a obtenção de haplóides por embriogénese polínica (ou qualquer outro método de obtenção de haplóides) e a ulterior duplicação dos cromossomas podem

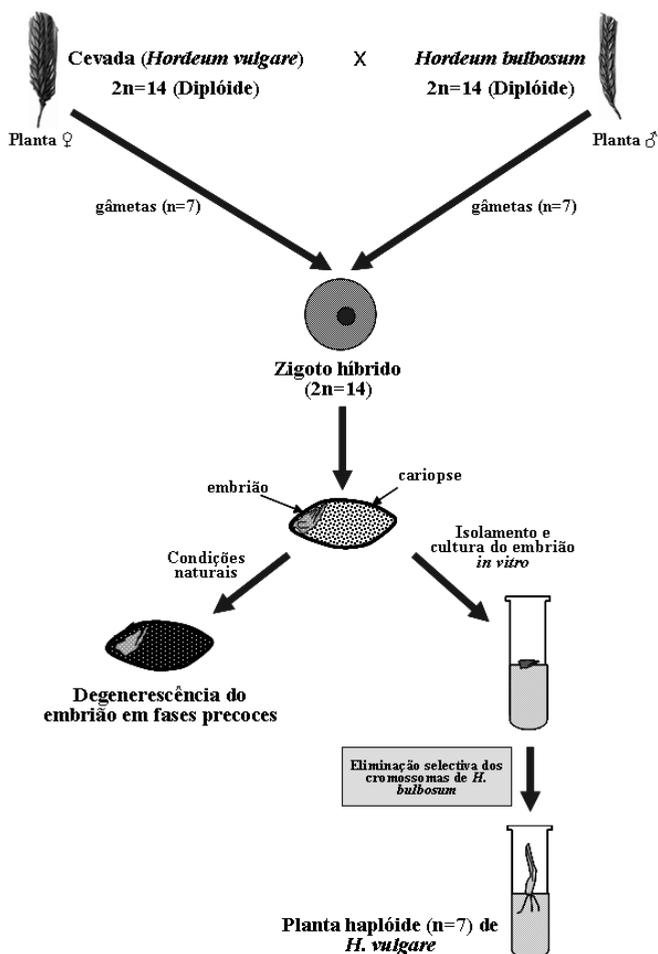


Figura 44 – Esquema representativo da utilização do método *bulbosum* para obtenção de haplóides na cevada. O mesmo procedimento pode aplicar-se para obtenção de haplóides no trigo.

obter-se linhas puras num período relativamente curto (cerca de um ano ou mesmo menos). Em plantas com uma fase juvenil alargada como as árvores de fruto ou florestais este aspecto é particularmente importante. Outra particularidade dos haplóides relaciona-se com o facto de nestas plantas (nos verdadeiros haplóides) existir um único conjunto de cromossomas, fazendo com que qualquer alteração no genótipo seja expressa uma vez que não existem eventuais alelos dominantes a mascarar as características recessivas. Nos haplóides o fenótipo é um reflexo mais verdadeiro do genótipo.

Isto torna mais fácil a recuperação de genes recessivos, em particular quando se utiliza pólen de linhas F1 ou F2. Utilizando haplóides é também mais fácil obter mutações (não letais) no estado homozigótico pois a duplicação de um haplóide no qual foi induzida uma mutação permite a sua obtenção no estado homozigótico. Plantas de origem polínica têm também sido usadas em estudos de mapeamento cromossómico com marcadores moleculares, na detecção de QTLs (“quantitative trait loci”) de interesse em termos de melhoramento, na selecção *in vitro* e em ensaios de transformação genética. Para além destes aspectos mais práticos, os haplóides são também interessantes numa abordagem mais científica, no estudo da meiose nomeadamente na análise do comportamento dos cromossomas sem a presença do homólogo correspondente e em estudos de biologia do desenvolvimento, pois trata-se de organismos com apenas metade do número de cromossomas e que conseguem sobreviver sendo muito semelhantes aos diplóides correspondentes, distinguindo-se destes por serem, em geral, mais pequenos e não serem férteis.

As plantas haplóides colocam novos desafios sobre a interpretação das relações entre o gametófito e o esporófito nas angiospérmicas e sobre o papel da redundância genética (diploidia) em termos evolutivos levando autores como F. Bonet a questionar se a capacidade dos micrósporos formarem plantas é uma expressão da totipotência ou uma característica atávica. De facto, nos musgos, os esporos originam gametófitos com um modo de vida independente do esporófito, ao contrário do que se verifica nas angiospérmicas e nas gimnospérmicas.

Antes de se proceder à caracterização, com mais detalhe, dos diferentes aspectos relacionados com a indução de embriogénese polínica recapitula-se, na secção seguinte, como decorre o desenvolvimento normal dos grãos de pólen.

5.4.1. Desenvolvimento do pólen

Os grãos de pólen formam-se no interior das anteras, as quais juntamente com o filete, constituem os estames de uma flor (Fig. 45). O conjunto de estames é denominado androceu. Uma antera encontra-se dividida em

duas tecas cada uma das quais possui dois sacos polínicos (total de 4 sacos polínicos). É no interior dos sacos polínicos (tecido esporogénico) que se formam os grãos de pólen em estreita associação com os tecidos da parede da antera, em particular com o tapete (Fig. 45).

O processo de formação dos grãos de pólen envolve duas fases, a microsporogénese e a microgametogénese (Fig. 46). Como os nomes sugerem, a microsporogénese é a formação dos esporos masculinos enquanto a microgametogénese é o processo de diferenciação do pólen que leva à formação dos dois gâmetas masculinos que cada grão de pólen produz.

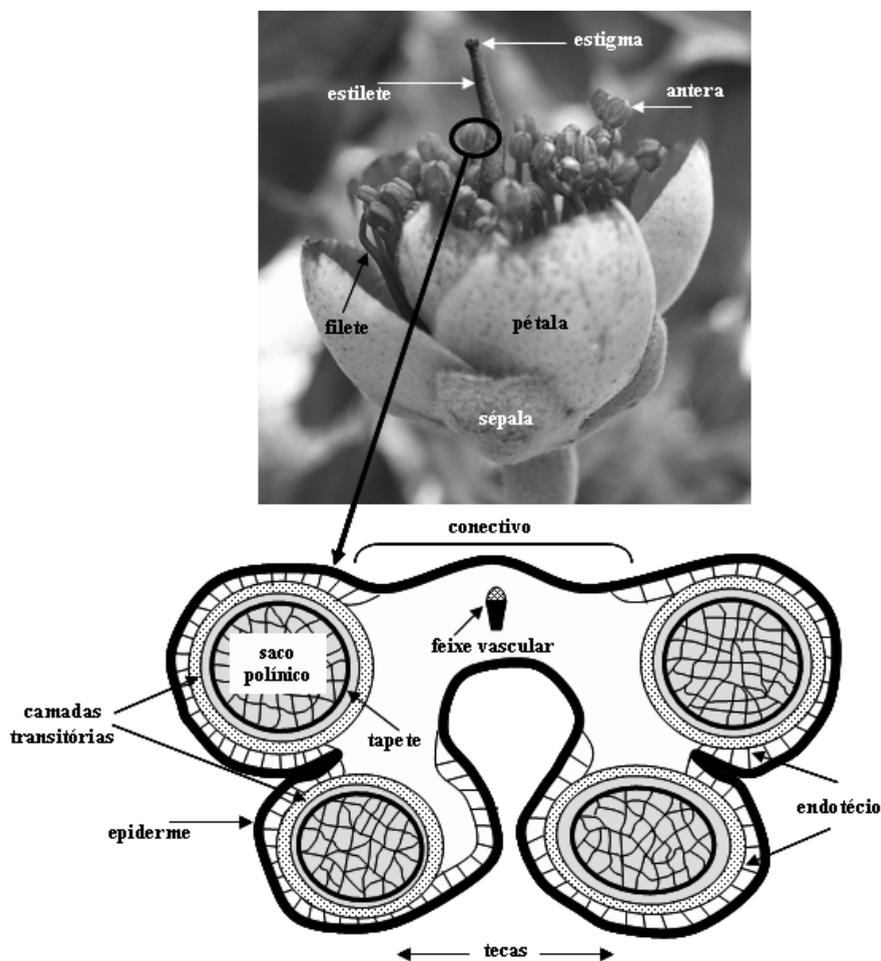


Figura 45 – Diferentes órgãos da flor e representação esquemática dos diferentes tecidos numa secção transversal de uma antera.

Os microsporos são formados a partir das células mães dos grãos de pólen, ou microsporócitos, por meiose. As 4 células resultantes da meiose são os micrósporos que, numa fase inicial, se encontram reunidas numa tétrada e envolvidas por calose (Fig. 46). Ulteriormente, uma enzima segregada pelo tapete da antera (calase) digere a calose e provoca a dissociação da tétrada, ficando os micrósporos livres no interior dos sacos polínicos. Após libertação da tétrada, os jovens micrósporos apresentam uma parede bastante fina e uma elevada relação núcleo/citoplasma. Seguidamente, ocorrem dois acontecimentos bastante importantes no desenvolvimento do pólen: a vacuolização dos grãos de pólen com o conseqüente deslocamento do núcleo para a periferia e a formação da exina (parte externa da parede do pólen). Segue-se a microgametogénese que se inicia com a primeira mitose polínica que origina as células vegetativa e generativa. Nesta fase, a estrutura designa-se por grão de pólen. A célula vegetativa preenche grande parte do volume do gametófito e possui um núcleo volumoso, com cromatina pouco condensada. Por sua vez, a célula generativa, está rodeada pela célula vegetativa, é de reduzidas dimensões e caracteriza-se por possuir um núcleo condensado e que preenche praticamente toda a célula e um citoplasma muito reduzido. Apesar destas diferenças na sua morfologia, as duas células (núcleos) são haplóides e possuem a mesma informação genética. A célula generativa é responsável, na sequência da segunda mitose polínica, pela formação dos gâmetas masculinos (células espermáticas) enquanto a célula vegetativa origina o tubo polínico necessário para transportar os gâmetas até ao saco embrionário onde ocorre a dupla fecundação característica das angiospérmicas.

Num grande número de angiospérmicas, os grãos de pólen são libertados das anteras no estado bicelular, após terem acumulado grande quantidade de substâncias de reserva, particularmente amido. Só após a formação e desenvolvimento do tubo polínico no estigma a célula generativa se divide (2ª mitose polínica) e dá origem às duas células espermáticas (praticamente constituídas só pelo núcleo). Em algumas espécies, como nas gramíneas, compostas e crucíferas, a célula generativa divide-se antes da formação do tubo polínico e os grãos de pólen são libertados no estado tritelular (uma célula vegetativa mais dois gâmetas).

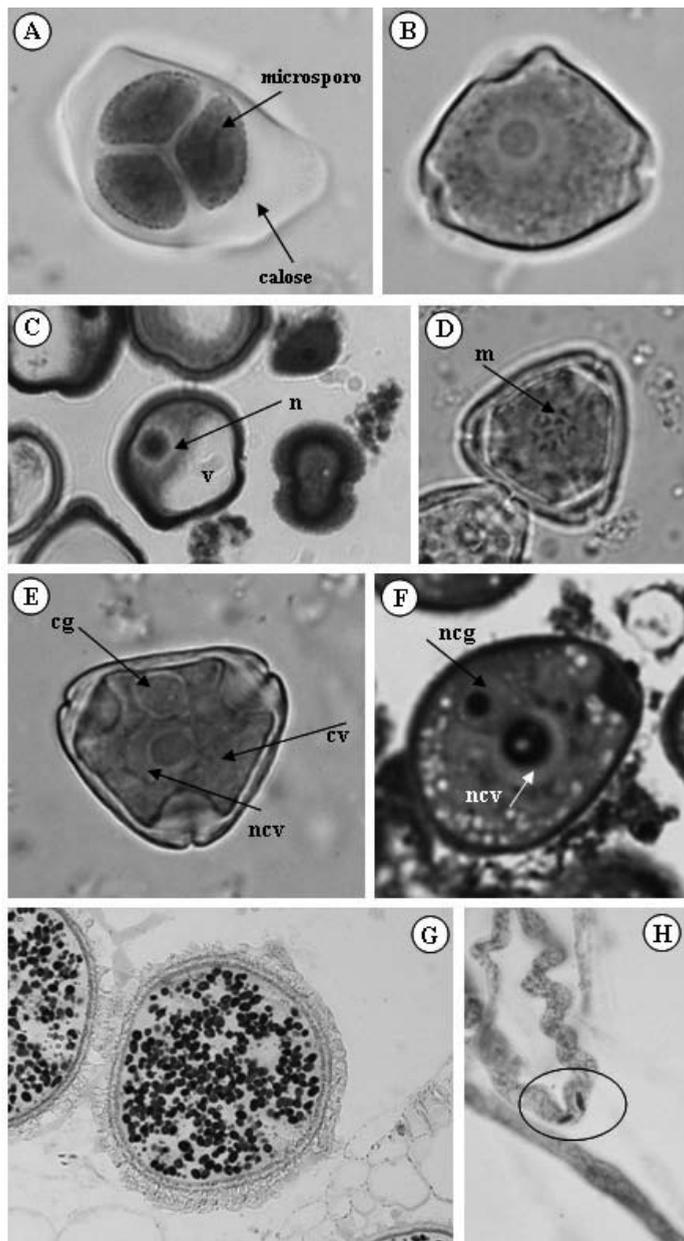


Figura 46 - Estados de desenvolvimento do pólen numa angiospérmica. A - Tétrada polínica resultante da meiose nos microsporócitos existente nos sacos polínicos. B - Microsporo. C - Microsporo vacuolizado próximo da primeira mitose polínica. D - Microsporo na altura da primeira mitose polínica sendo visível a placa metafásica (m). E - Jovem grão de pólen com a célula vegetativa (cv) e a célula generativa (cg). F - Grão de pólen numa fase mais adiantada de desenvolvimento. G - Grão de pólen maduro com grande quantidade de substâncias de reserva (amido). H - Células espermáticas (área em destaque) num tubo polínico após germinação *in vitro* e divisão mitótica (2ª mitose polínica) da célula generativa, n - núcleo, ncg - núcleo da célula generativa, ncv - núcleo da célula vegetativa, v - vacúolo.

5.4.2. Vias androgénicas

Quando as anteras ou grãos de pólen isolados, são cultivadas *in vitro* num meio indutor de embriogénese polínica, o desenvolvimento normal do pólen é alterado e os grãos de pólen, por divisões sucessivas podem originar plantas. A percentagem de grãos de pólen que numa antera seguem a via androgénica é muito reduzida (frequentemente menos de 1%) e, a maioria dos grãos de pólen, após alguns dias de cultura rapidamente degenera, como se pode observar utilizando corante vitais ou fluorocromos como o diacetato de fluoresceína que especificamente marca as células viáveis. Estas reduzidas taxas de indução não devem ser, todavia, subestimadas, pois é frequente que numa antera possam existir milhares de grãos de pólen podendo assim obter-se várias plantas por antera.

A formação de plantas a partir dos microsporos pode ocorrer, directamente, por divisões sucessivas daqueles e subsequente formação de embriões ou, indirectamente, havendo em primeiro lugar a formação de um calo onde ulteriormente se diferenciam rebentos caulinares ou embriões. As duas possibilidades podem ocorrer na mesma planta e dentro de uma mesma antera.

Quer se trate da formação directa ou indirecta de embriões ou rebentos caulinares, a contribuição dos núcleos do grão de pólen para a formação dos embriões e/ou calos apresenta algumas variantes. Normalmente, consideram-se quatro vias principais havendo outras situações mais complexas que têm sido esporadicamente assinaladas (Fig. 47).

Na chamada via A, a primeira mitose polínica ocorre com a formação do núcleo vegetativo e generativo, originando-se os calos e/ou os embriões a partir de divisões sucessivas da célula vegetativa enquanto a célula generativa degenera ou pode dividir-se uma ou duas vezes. Microsporos da cevada, do tabaco e do trigo podem originar plantas por esta via.

Na via B, a primeira mitose polínica origina dois núcleos (células) morfológicamente idênticos (B-mitose) podendo ambos os núcleos, ou apenas um sofrer novas divisões e participar na formação de estruturas multicelulares. Espécies como *Atropa belladonna*, *Datura innoxia* e *Hordeum vulgare* constituem alguns exemplos em que esta via desempenha um papel importante.

A via C, inicialmente semelhante à via A, distingue-se desta última pelo facto de ambos os núcleos (vegetativo e generativo) participarem na embriogénese depois de fundirem. Entre as espécies onde esta via ocorre podem referir-se *Datura innoxia* e *Hordeum vulgare*.

Finalmente, na via D, a última a ser descrita em *Hyoscyamus niger*, é o núcleo generativo que está envolvido na formação de embriões polínicos.

Os estudos sobre as diferentes vias têm sido realizados quase exclusivamente em solanáceas e gramíneas pouca informação havendo relativamente a outras espécies, em particular nas lenhosas.

Nos primeiros estádios da androgénese é relativamente fácil distinguir entre as diferentes vias que estão em curso. Todavia, em estádios mais avançados, torna-se extremamente difícil fazer essa distinção uma vez que em embriões constituídos por 100-200 células é praticamente impossível destrinçar entre, por exemplo, os produtos das divisões mitóticas das células da via B e as células resultantes da divisão de uma célula tipicamente vegetativa. Nestes casos, quer a reacção de coloração quer o tamanho das células produzidas são semelhantes. Além disso, na via A, a célula generativa degenera rapidamente o que torna ainda mais difícil fazer a distinção entre a via A e B. Os estudos sobre o envolvimento das várias vias na embriogénese não assumem simplesmente um aspecto académico. Uma vez perfeitamente estabelecidas as vias existentes e os factores que determinam a ocorrência de uma em detrimento das outras pode ser possível obter plantas predominantemente haplóides (vias A, B, e D) ou plantas com outros níveis de ploidia, como acontece na via C onde ocorre fusão entre os núcleos nas fases iniciais da androgénese.

Não existe de momento uma explicação plausível para a ocorrência de várias vias nem para a causa que leva uns grãos de pólen a seguirem uma em detrimento das outras.

Uma vez formados os grãos de pólen multicelulares (Fig. 48), a continuação das divisões celulares no interior da exina acaba por levar a um aumento de pressão que tem como consequência a ruptura da parede e a libertação das massas celulares. Estas massas crescem agora no interior da antera de forma organizada (embriões) ou de uma maneira mais desorganizada, sob a forma de um calo. Em fases mais adiantadas do processo os embriões ou

calos polínicos surgem no exterior das anteras, normalmente pelas linhas de deiscência por onde, em condições naturais, o pólen é libertado. Os embriões evoluem depois em plantas que podem ser aclimatadas e transferidas para solo de modo a obter as plantas de origem polínica (Figs. 47 e 48).

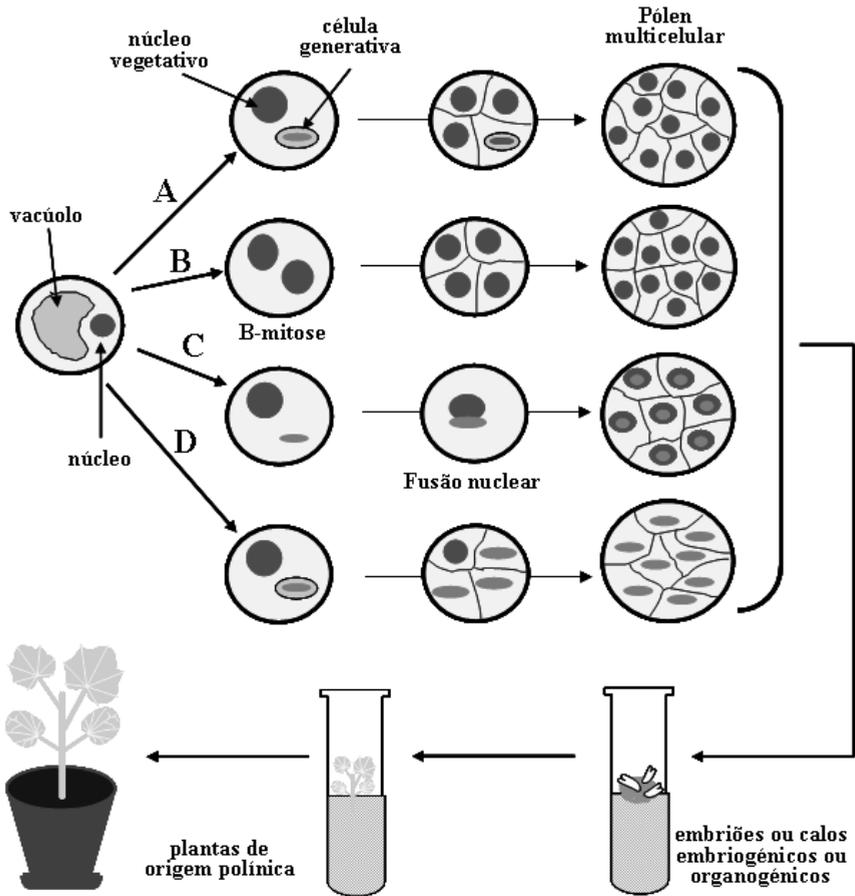


Figura 47 – Vias androgénicas que podem levar à formação de plantas de origem polínica.

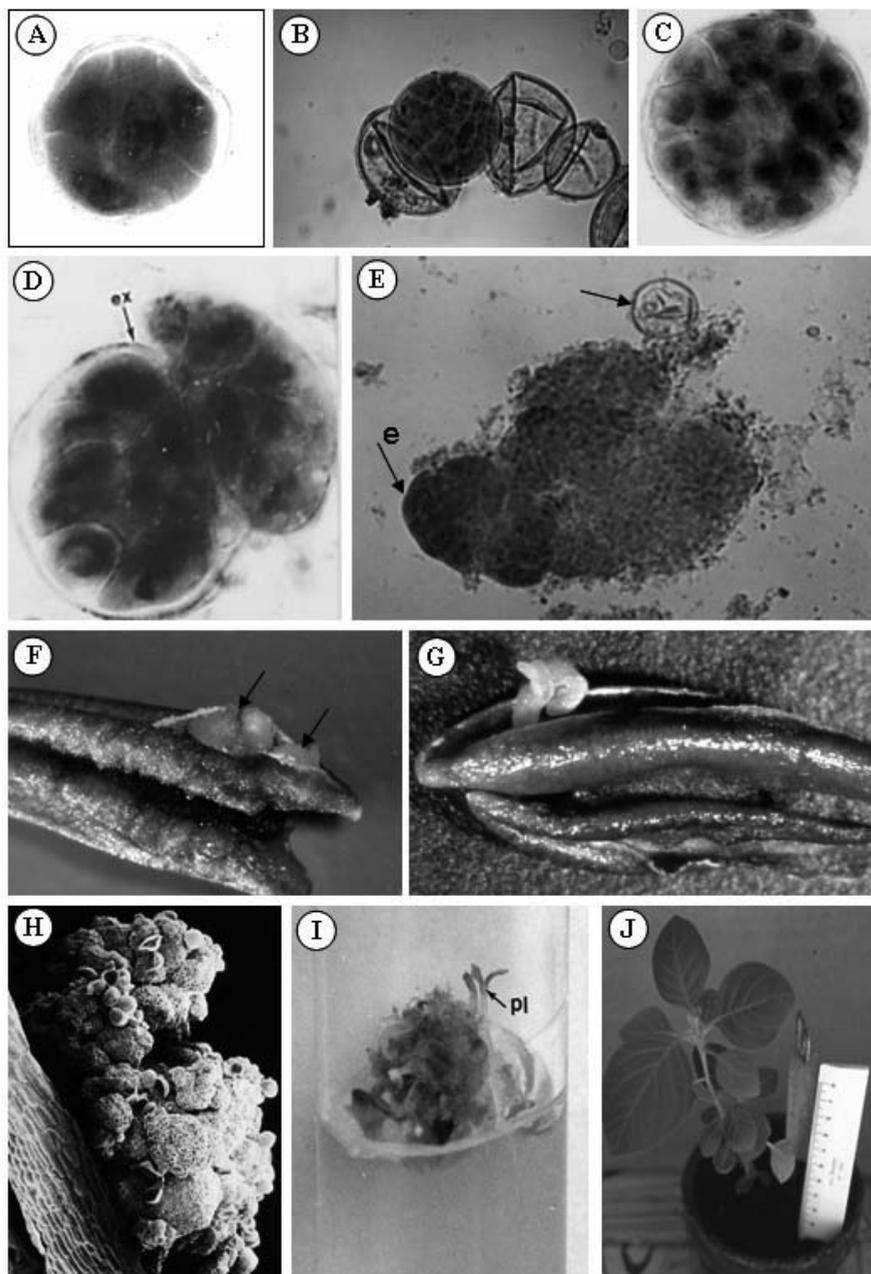


Figura 48 – Diferentes aspectos da regeneração de plantas por embriogênese polínica. A a C – Grãos de pólen multicelulares. D – Ruptura da exina (ex). E – Microcalo de origem polínica no interior de uma antera. A seta representa um microsporo que degenerou. Um embrião parcialmente esmagado é também visível. F – Embriões (setas) a surgir no exterior de uma antera através da linha de deiscência. G – Planta a surgir do interior de uma antera. H – Calo polínico numa antera. I – Várias plantas obtidas por embriogênese polínica. J – Planta envasada, com cerca de 1 ano, obtida por embriogênese polínica.

5.4.3. Dimorfismo polínico e culturas *ab initio*

Em algumas espécies (e.g. *Paeonia*, tabaco, cevada, trigo) as anteras possuem dois tipos morfológicamente diferentes de grãos de pólen, situação conhecida pelo nome de dimorfismo polínico (Fig. 49). A existência deste dimorfismo polínico, possivelmente relacionado com a androgénese, foi primeiro assinalado em peónias. Nesta espécie, a maioria dos grãos de pólen, após coloração com corantes básicos, apresentavam-se corados e possuíam amido (pólen N, normal). Contrariamente a estes grãos de pólen outros existiam que se caracterizavam pelo seu tamanho reduzido, fraca coloração citoplasmática e ausência de amido. Estes últimos seriam grãos embriogénicos (pólen E) e seriam eles os responsáveis pela resposta androgénica, em oposição aos grãos normais. Sunderland colocou ainda a hipótese de, mesmo nas espécies em que os grãos E podem não ser detectados a nível morfológico, poder existir um dimorfismo a nível fisiológico.

Baseados na existência deste dimorfismo polínico e no pressuposto que os grãos E são de facto os grãos embriogénicos, foram feitos ensaios (tabaco, cevada) em que esta população de grãos de pólen E foi separada dos grãos de pólen normais (centrifugação em gradientes de densidade) e cultivada separadamente com vista à indução de embriogénese polínica. Este tipo de culturas tem o nome de culturas *ab initio*.

Existem dados que permitem supor que os grãos de pólen E são de facto os grãos embriogénicos mas também existem observações que levantam algumas dúvidas quanto à veracidade desta hipótese.

A favor da hipótese dos grãos E serem os grãos que sofrem embriogénese polínica temos a correlação observada entre o número de grãos de pólen E e o número de grãos de pólen multicelulares formados por antera. O facto de tratamentos que aumentam a percentagem de pólen E (por exemplo dias curtos no tabaco, ou aplicação de agentes femininizantes também no tabaco) aumentarem a percentagem de grãos androgénicos suporta o papel do pólen E na androgénese. A principal objecção à aceitação desta hipótese reside no facto de existirem espécies que sofrem androgénese e onde não se verifica a ocorrência de dimorfismo polínico.

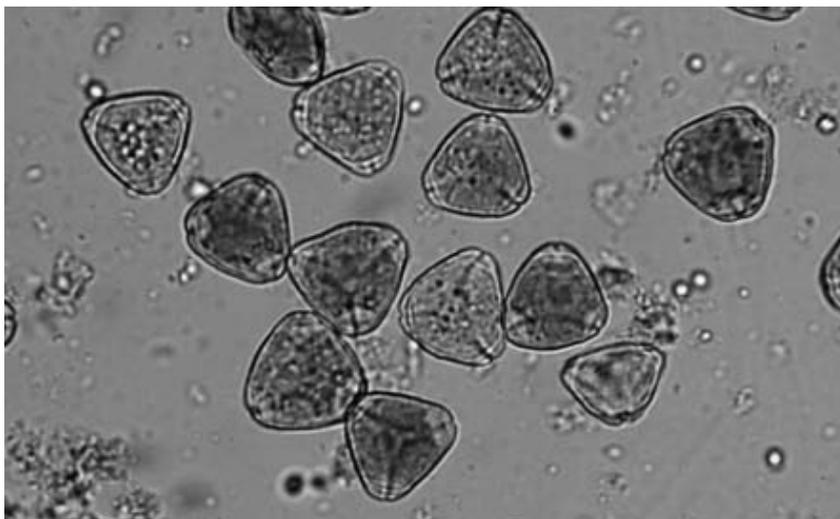


Figura 49 – Dimorfismo polínico em *Feijoa sellowiana*. Os grãos de pólen são morfologicamente semelhantes mas uns coram mais intensamente que outros com carmim acético.

Tendo em conta estes dados contraditórios duas interpretações podem ser feitas quanto ao papel de um dimorfismo polínico na androgénese:

- em espécies onde não foi obtido qualquer indício da existência de pólen E, existe também um dimorfismo polínico que, contrariamente ao que se verifica no tabaco, é apenas de natureza fisiológica, portanto difícil de detectar.
- Os grãos de pólen embriogénicos não são os únicos capazes de originar embriões ou calos podendo, em certas espécies e em certas condições, os grãos N sofrer androgénese.

Não é conhecida a razão que leva o pólen E a originar embriões, nem tão pouco a razão pela qual ele é produzido, embora tenha sido proposto que anomalias na meiose das células mães dos grãos de pólen possam ser responsáveis pelo seu aparecimento. Foi também sugerido que, em condições normais, o pólen E se encontra reprimido, não podendo seguir a via gametofítica mas, uma vez em cultura, a repressão deixa de existir, podendo este pólen formar embriões.

Embora prometedora a cultura *ab initio* tem tido uma aplicação reduzida, talvez devido à relativa complexidade do processo de isolamento do pólen embriogénico e de não ser possível detectar o pólen E em muitas espécies.

5.4.4. Factores que afectam a indução de androgénese

A indução de embriogénese polínica pode ser conseguida através da cultura de anteras ou procedendo primeiro ao isolamento do pólen e depois à sua cultura livre dos restantes tecidos da antera. A cultura de anteras é um procedimento mais simples uma vez que basta remover as anteras da flor na fase apropriada e proceder à sua cultura em condições laboratoriais. A cultura de pólen é mais complexa pois envolve primeiro o seu isolamento e separação dos diferentes tecidos utilizando centrifugações em gradientes de densidade, e só depois a sua cultura. Em regra, os meios para a cultura de pólen são também mais complexos sendo ainda necessário efectuar as culturas com uma determinada densidade de microsporos. A vantagem da cultura de microsporos é que não existe a possibilidade dos tecidos somáticos da antera poderem proliferar e, assim, levar à regeneração de plantas somáticas em associação com plantas de origem polínica tornando difícil determinar a sua proveniência. Para além disso, em termos de transformação genética a manipulação dos microsporos livres dos tecidos das anteras é mais eficaz sendo mais fácil seguir o processo.

A cultura de microsporos isolados requer muitas vezes a utilização de técnicas mais específicas como sejam o recurso a culturas “nurse” em que um tecido de suporte separado dos microsporos por papel de filtro ou outro suporte permeável fornece alguns dos nutrientes que os grãos de pólen necessitam para se manterem em cultura ou para desencadear o desenvolvimento esporofítico.

Em algumas espécies, com maior incidência nas gramíneas, tem-se utilizado uma metodologia intermédia entre a cultura de anteras e de pólen e que consiste na cultura das anteras num meio líquido com baixo potencial hídrico, onde ocorre a sua deiscência e libertação gradual dos microsporos que ficam no meio líquido livres da acção dos tecidos da antera. A transferência

das anteras, após diferentes períodos de cultura, para meio fresco, permite obter diferentes populações de micrósporos (culturas em série).

Muitos são os factores que condicionam a resposta do pólen em cultura. Estes factores dizem respeito à composição dos meios de cultura, às condições de cultura e factores da própria planta.

Em geral, as condições de cultura (luz, temperatura, pH, estado físico do meio) não são muito diferentes daquilo que foi dito para as diferentes técnicas de micropropagação e, tal como na altura foi referido, são muito variáveis em função das diferentes espécies. De referir apenas que, em algumas espécies, pré-tratamentos pelo frio (4 °C) aplicados às flores favorecem a indução de androgénese. Este efeito poderá estar relacionado, por um lado, com a maior viabilidade do pólen em cultura e por outro com o aumento do número de grãos de pólen que sofrem uma B-mitose os quais, em muitas espécies, são os que originam os grãos de pólen multicelulares. Choques térmicos mas utilizando temperaturas elevadas (30 – 32°C) durante 1 a vários dias têm sido utilizados com sucesso para estimular a embriogénese polínica em várias espécies de brássicas. Outras condições de stresse normalmente usadas para desencadear a totipotência dos grãos de pólen estão relacionadas com a cultura prévia dos microsporos em meios empobrecidos (sem sacarose, fosfato ou azoto) seguida da cultura num meio normal. Este tipo de tratamentos tem permitido, em algumas situações obter taxas mais elevadas de indução.

Os meios utilizados na cultura de pólen isolado são mais complexos que os usados para cultivar anteras, apesar das exigências variarem muito de espécie para espécie. No tabaco, por exemplo, a androgénese pode ser induzida na ausência de reguladores do crescimento enquanto nas plantas lenhosas a inclusão de auxinas e citocininas nos meios de cultura é, geralmente, indispensável. Em algumas espécies, particularmente entre as gramíneas, a inclusão de altas concentrações de sacarose (8 - 12%) ou de maltose tem-se revelado benéfica mas em muitas outras espécies, e ao contrário do que acontece com a indução de embriogénese somática, altas concentrações de hidratos de carbono são em geral prejudiciais. Nos casos em que é absolutamente necessário utilizar auxinas nos meios de indução de androgénese para promover as divisões polínicas deve ter-se em atenção

que este tipo de hormonas pode conduzir também à proliferação dos tecidos somáticos das anteras. Esta situação é prejudicial pois o crescimento destes tecidos pode afectar a indução de androgénese e, além disso, pode, como já foi indicado conduzir à regeneração de plantas ficando depois a dúvida sobre se as plantas têm uma origem polínica ou somática.

Os factores da própria planta que mais condicionam o sucesso da androgénese são o estado de desenvolvimento do pólen na altura da inoculação, a parede da antera, estado fisiológico das plantas dadoras e o genótipo da planta mãe.

Quando se colocam as anteras ou pólen em cultura este pode encontrar-se em diferentes fases do seu desenvolvimento (Fig. 46) e, consoante as espécies, o estado mais favorável para a indução de androgénese é variável. De uma maneira geral, o estado mais adequado é o estado uninucleado, próximo da primeira mitose polínica, ou mesmo durante a mitose mas, nas gramíneas, a indução ocorre de forma mais eficaz com pólen uninucleado pouco tempo depois da libertação da tétrada. Em regra, o pólen maduro, ou pólen muito precoce, não é susceptível de sofrer androgénese embora tenham sido referidos casos de indução de embriogénese polínica em grãos de pólen binucleados, como acontece no tabaco.

O método geralmente adoptado para verificar o estado de desenvolvimento do pólen consiste em analisar o pólen de uma antera de cada flor ao microscópio e inocular as restantes no meio de cultura. No entanto, este processo torna-se bastante moroso e inviável em programas de selecção onde é impossível analisar uma antera por flor inoculada (por exemplo, nas gramíneas, que possuem 3 anteras por flor isso corresponderia a uma perda de material de 1/3). Em virtude disso, tem-se procurado detectar alguma relação entre o estado de desenvolvimento do pólen e certas características das flores ou das inflorescências, como as suas dimensões ou o tamanho das próprias anteras. Esta metodologia torna-se difícil de aplicar em alguns casos, como por exemplo nas gramíneas, onde existe uma certa variabilidade no estado de desenvolvimento do pólen ao longo de uma inflorescência. Além disso, este procedimento pode originar grandes variações nos resultados em virtude das características das flores poderem variar com a idade das plantas e com as condições em que ocorreu o seu

desenvolvimento. Assim, no trigo, para um mesmo estado de desenvolvimento do pólen, as anteras de plantas crescidas no campo são maiores que as de plantas crescidas em estufa.

A cultura de anteras implica, obviamente, a cultura dos tecidos que envolvem o pólen. A influência que estes tecidos, particularmente o tapete, possam ter na indução e desenrolar da androgénese tem sido discutida. A principal questão que se coloca é saber se a parede da antera terá um efeito promotor ou se, pelo contrário, a sua presença é nefasta, podendo inibir a resposta androgénica. Vários estudos têm indicado que a antera desempenha um papel benéfico. Assim, em datura, apenas se conseguiu sucesso com culturas de pólen quando de adicionou ao meio um extracto de anteras androgénicas. Outras indicações, como os relativos insucessos com a cultura de pólen isolado, a obtenção de melhores resultados com a cultura de pólen isolado após pré-cultura das anteras, a estreita ligação entre o pólen androgénico e o tapete em algumas plantas, a relação positiva entre o sucesso da androgénese e a densidade das anteras em cultura e, ainda, a formação de uma espécie de suspensor que em alguns casos liga os próembriões à parede da antera sugerem que os tecidos da antera são sem dúvida importantes para a androgénese.

O facto de muitos embriões polínicos degenerarem em fases precoces do seu desenvolvimento é o principal argumento daqueles que consideram ter a parede da antera um papel negativo. A possibilidade de obter plantas a partir da cultura de pólen isolado também indica que a influência positiva da parede não deve ser determinante. É pois notório o envolvimento dos tecidos somáticos das anteras na androgénese embora um mais perfeito esclarecimento das suas funções só possa ser conseguido com o isolamento e caracterização das substâncias implicadas (inibidores e/ou promotores). Além disso, e independentemente da libertação de qualquer substância, a parede da antera, só por si, cria uma atmosfera muito própria em redor dos grãos de pólen, controlando as trocas gasosas com o exterior.

A capacidade androgénica dos grãos de pólen é também influenciada pelas condições em que as plantas dadoras das anteras se desenvolvem. Deste modo, têm sido obtidos melhores resultados quando a cultura é feita com anteras ou pólen dos períodos iniciais da floração. A temperatura de

crescimento das plantasadoras parece ser também um factor relevante, como acontece no trigo, onde as temperaturas de crescimento das plantas condicionam o sucesso da androgénese sendo 32°C a temperatura mais favorável. Em termos de genótipo tem-se verificado que existem cultivares onde a indução de embriogénese polínica ocorre a frequências elevadas enquanto noutros casos a indução é reduzida ou não ocorre mesmo. É também conhecido que o potencial embriogénico pode ser transferido de cultivares mais eficazes em termos de indução para outros menos susceptíveis. Em alguns cereais tem sido possível relacionar a capacidade androgénica com determinados genes e com cromossomas em aneuplóides ou em linhas possuindo mais um cromossoma. No trigo os cromossomas 7A e 1B parecem ter um efeito inibidor da embriogénese polínica enquanto o braço longo do cromossoma 5B no cultivar “Chinese Spring” parece favorecer o processo de embriogénese.

Em espécies das famílias Gramineae, Solanaceae e Cruciferae existem actualmente protocolos bastante eficazes para a obtenção de embriogénese polínica quer a partir de microsporos isolados quer a partir da cultura de anteras. No entanto, os mecanismos moleculares subjacentes à indução de androgénese polínica e à passagem dos microsporos de um tipo de desenvolvimento gametofítico para um desenvolvimento esporofítico não são em grande parte conhecidos. Como se referiu no capítulo anterior este problema é comum a outros tipos de morfogénese que ocorrem *in vitro*.

As análises moleculares dos processos de morfogénese *in vitro* são normalmente limitadas por dois factores: as reduzidas taxas de indução e a assincronia do processo. Esta situação não permite a obtenção de material biológico em grandes quantidades de forma a efectuar análises bioquímicas ou moleculares. Apesar destas limitações, tem-se assistido, nos últimos anos, à publicação de resultados muito interessantes relativos à caracterização molecular da androgénese. Este tipo de análises tem sofrido várias abordagens sendo de salientar o seguinte tipo de estudos: 1) isolamento de genes relacionados com a indução 2) identificação de marcadores moleculares associados a genes envolvidos na androgénese 3) estudo das vias de transdução de sinal, 4) efeito das condições de stresse na indução de androgénese e 5) caracterização do pólen embriogénico.

A estratégia utilizada para a identificação de genes específicos da embriogénese polínica tem sido a comparação entre a expressão genética durante a microgametogénese e durante a indução de androgénese. Os resultados obtidos através da utilização de modernas técnicas de análise genómica e proteómica como electroforese bidimensional, hibridação substractiva, *microarrays*, expressão diferencial de RNAm, entre muitas outras, permitiram, à semelhança do que se referiu no caso da embriogénese somática identificar proteínas e sequências genéticas específicas da androgénese. A comparação dessas sequências com outras existentes nas bases de dados revelou a analogias com genes cuja função é conhecida bem como de sequências até então desconhecidas. Algumas dessas sequências apresentam analogias com genes envolvidos no desenvolvimento embrionário (e.g. *CLAVATA*, *SCARECROW*), com genes que codificam para proteínas do citosqueleto e com genes que codificam para proteínas cinases, só para citar alguns exemplos. Genes codificadores para proteínas de choque térmico e metalotioneínas foram também identificados o que de alguma forma confirma a importância das situações de stresse no processo de indução.

Apesar destes resultados animadores importa esclarecer inequivocamente se estes genes estão directamente relacionados com o processo de indução ou são um efeito lateral relacionado com as condições de stresse necessárias para desencadear o processo de indução. A expressão deste tipo de genes durante o processo de indução de embriogénese não é muito surpreendente. De facto, é conhecido que em muitas espécies uma alteração no plano da primeira divisão do núcleo do microsporo e na orientação do aparelho mitótico está relacionada com a indução de androgénese, formando-se duas células morfológicamente idênticas em vez de duas células bem diferenciadas (generativa e vegetativa) resultantes de uma divisão assimétrica. Uma modificação na organização do citosqueleto é essencial para que este tipo de divisão ocorra. O envolvimento de genes relacionados com a actividade dos meristemas (*CLAVATA*) ou com o estabelecimento de planos de simetria (*SCARECROW*) é igualmente previsível dado que o desenvolvimento de embriões polínicos é muito semelhante ao dos embriões zigóticos. No que diz respeito às cinases proteicas é bem conhecido o seu papel em inúmeras vias de transdução de sinal podendo, no caso da androgénese, estar

envolvidas na activação de mecanismos que levam à expressão de determinados genes responsáveis pelo desencadear da androgénese. O facto de algumas das sequências genéticas identificadas apresentarem fortes homologies com factores de transcrição parece corroborar esta ideia.

Experiências recentes realizadas em *Brassica napus* utilizando um protocolo optimizado de indução de embriogénese polínica permitiram obter elevadas taxas de indução e a formação de embriões polínicos muito semelhantes aos embriões zigóticos da mesma espécie, apresentando igualmente um suspensor bem definido. Estudos de electroforese bidimensional e a utilização de *microarrays* permitiram a R. Joosen e aos seus colaboradores identificar um conjunto alargado de marcadores moleculares do processo de indução. As funções destes marcadores não são ainda conhecidas esperando-se que a sua caracterização possa dar informações importantes sobre o tipo de genes envolvidos no processo de indução.

5.5. Níveis de ploidia das plantas regeneradas

A determinação do nível de ploidia é feita contando o número de cromossomas nos vértices vegetativos das raízes das plantas regeneradas após aplicação de uma agente c-mitótico (por exemplo, colchicina ou orizalina). Estes compostos interferem com a polimerização dos microtúbulos impedindo a formação de uma placa metafásica normal (Fig. 50). Em vez disso, os cromossomas ficam distribuídos na célula o que torna mais fácil a sua visualização e contagem. Todavia, em algumas espécies, particularmente entre as lenhosas, os cromossomas são pequenos e difíceis de visualizar ao microscópio o que torna problemática a sua contagem (Fig. 50). Nestes casos, o nível de ploidia pode ser determinado por citometria de fluxo – uma técnica que permite comparar a quantidade de DNA nuclear e que se baseia no facto dos haplóides terem apenas metade do DNA dos diplóides correspondentes. O próprio tamanho das plantas obtidas ou dos seus órgãos pode ser um indicador importante do nível de ploidia. Por exemplo, no trigo, as espigas das plantas haplóides são consideravelmente mais pequenas que as das plantas diplóides correspondentes (Fig. 50). O facto do

número de cloroplastos ou o tamanho das células guarda estar, dentro de certos parâmetros, relacionado com o nível de ploidia tem também sido por vezes utilizado para determinar o nível de ploidia. Uma observação mais nítida dos cloroplastos nas células estomáticas pode ser conseguida após tratamento com nitrato de prata.

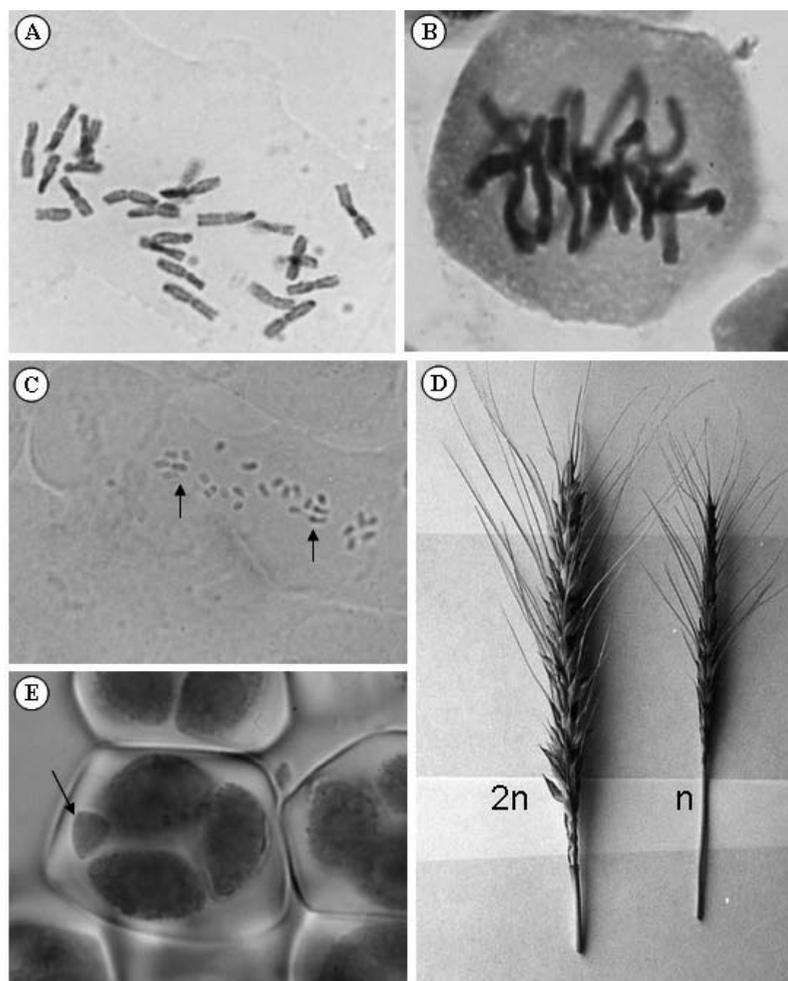


Figura 50 – Análise do nível de ploidia das plantas obtidas por embriogénese polínica. A – Placa metafásica numa célula do vértice vegetativo de uma raiz de uma planta diplóide ($2n=24$) obtida por embriogénese polínica. B – O mesmo que em A mas sem tratamento com colchicina e coloração com orceína acética. C – Placa metafásica numa célula da raiz de medronheiro. Notar as reduzidas dimensões dos cromossomas em comparação com a figura A. D – Espigas de plantas de trigo obtidas por embriogénese polínica. E – Tétrada polínica de feijoa onde se pode observar um microsporo supranumerário de menores dimensões. Anomalias deste tipo levam à formação de microsporos com números anómalos de cromossomas.

As plantas obtidas por androgénesese não são necessariamente haplóides. Variações no número de cromossomas são frequentes entre as plantas regeneradas havendo a assinalar, além de diplóides e de níveis mais elevados de ploidia (poliplóides), a regeneração de plantas aneuplóides e mixoplóides (células de um mesmo indivíduo com números diferentes de cromossomas). A obtenção de plantas diplóides é vantajosa, desde que as plantas sejam homozigóticas e originadas de grãos de pólen normais em que houve duplicação do número de cromossomas. A obtenção de triplóides ou tetraplóides pode também apresentar algumas vantagens visto estas plantas terem algum interesse em termos de melhoramento. De facto, plantas tetraplóides são em regra de dimensões maiores sendo essa característica importante na produção de frutos. Cultivares triplóides podem também ter algum interesse na produção de frutos partenocárpicos. Os próprios aneuplóides podem ser preciosos em estudos de genética com vista à localização de genes em determinados cromossomas.

Várias situações podem contribuir para o aparecimento de outros níveis de ploidia. Assim, em determinadas circunstâncias (e.g. altas concentrações de auxina no meio), os tecidos somáticos da antera (parede, e/ou conectivo, ou restos do filete) podem proliferar originando um calo com capacidade organogénica ou embriogénica. Quando assim, acontece, as plantas eventualmente regeneradas são heterozigóticas (possuindo o mesmo genótipo da planta mãe) e de pouco interesse em termos de obtenção de novas variedades. A distinção entre as plantas diplóides que se podem formar a partir dos tecidos somáticos e as de origem polínica coloca grandes dificuldades que apenas podem ser ultrapassadas pela utilização de marcadores genéticos, através da descendência obtida da cultura de anteras dos híbridos F1, pela análise de isoenzimas ou pela utilização de marcadores moleculares.

Outro factor que pode levar à formação de plantas heterozigóticas por cultura de anteras ou de pólen é a presença, entre uma população de grãos de pólen normais, de grãos de pólen não reduzidos. Estes grãos de pólen resultam de anomalias na meiose e possuem um número diplóide de cromossomas. Outros tipos de anomalias poderão resultar na formação de grãos de pólen com guarnições cromossómicas anormais.

Grãos de pólen normais podem também estar na origem de plantas não haplóides. Isso verifica-se na sequência de endomitoses (mitoses sem separação e organização dos cromátídeos em dois núcleos distintos) associadas ou não a fusões nucleares nos estados iniciais da androgénese.

Segundo alguns autores, as plantas aneuplóides poderão resultar de instabilidades cromossómicas causadas pela própria cultura *in vitro* enquanto outros atribuem a aneuploidia a anomalias meióticas verificadas na formação dos grãos de pólen (Fig. 50).

5.6. Duplicação do número de cromossomas dos haplóides

A obtenção de plantas haplóides por androgénese ou qualquer outro método não é o objectivo final de um programa de selecção de plantas. Na verdade, as plantas assim obtidas pouco ou nenhum interesse apresentam.

O grande interesse da androgénese reside no facto das plantas haplóides obtidas poderem originar indivíduos completamente homozigóticos através da duplicação do seu número cromossómico, formando haplóides-duplos.

Em praticamente todas as espécies em que a androgénese foi conseguida observa-se uma percentagem mais ou menos elevada de plantas regeneradas que não são haplóides, as quais, com frequência, são diplóides. Estes diplóides, se originados de grãos de pólen normais, são completamente homozigóticos pelo que o processo de duplicação cromossómica não é necessário. Um tanto paradoxalmente, podemos dizer que um dos inconvenientes da androgénese é originar, em alguns casos (e.g. tabaco), uma percentagem muito elevada de haplóides.

Quando o número de HD obtidos espontaneamente é reduzido há necessidade de proceder à duplicação do número de cromossomas das plantas haplóides. Existem basicamente dois procedimentos para conseguir essa duplicação:

- utilização de colchicina
- via formação de um calo

5.6.1. Utilização de colchicina

A aplicação da colchicina deve ser feita quando os haplóides estão ainda em fases precoces do seu desenvolvimento. A metodologia mais eficaz consiste em submergir os embriões de origem polínica numa solução de 0,4% de colchicina previamente esterilizada. Como já se referiu anteriormente, a colchicina, ao inibir a formação das fibras do fuso impede a migração dos cromossomas para pólos opostos da célula durante a anafase. Em virtude desta situação, após separação dos cromatídeos irmãos, estes permanecem na mesma célula formando-se um núcleo de restituição e a consequente duplicação do número de cromossomas. Se a colchicina for removida do meio, as células em que ocorreu duplicação cromossômica podem agora seguir o processo de divisão normal dando origem a células com a mesma guarnição cromossômica. Os tempos de exposição à colchicina bem como as concentrações utilizadas devem ser optimizadas para cada espécie de forma a evitar a formação de níveis mais elevados de ploidia. Para além disso, os tratamentos devem ser aplicados em fases precoces do desenvolvimento para que o maior número possível de células sofra duplicação cromossômica. Caso esta situação não se verifique corre-se o risco de surgirem quimeras, ou seja plantas com partes em que ocorreu duplicação cromossômica e outras em que tal não se verificou. Um método alternativo que também faz uso de agentes c-mitóticos consiste em remover a gema apical das plantas haplóides com vista à quebra da dormência e ao desenvolvimento de ramos laterais, aplicando simultaneamente, na axila das folhas, uma pasta de lanolina contendo colchicina.

5.6.2. Duplicação via formação de um calo

No decurso da desdiferenciação de um tecido vegetal em cultura, com passagem por uma fase de calo, surgem frequentemente anomalias na estrutura e no número de cromossomas das células. Essas perturbações são ainda mais acentuadas quando se trata da cultura de células ou tecidos haplóides, os quais têm tendência para formar rapidamente células diplóides

por endomitose. Explorando esta instabilidade das células haplóides, foi desenvolvido um método para duplicação do número de cromossomas dos haplóides. Esta metodologia consiste na cultura de fragmentos de órgãos de plantas haplóides num meio indutor de calo, contendo auxinas e citocininas. Após a formação e crescimento dos calos, estes são transferidos para um meio de diferenciação (sem auxinas) onde várias plantas podem ser obtidas, sendo muitas delas diplóides em virtude da ocorrência de endomitoses durante a fase de crescimento do calo, ou devido à presença de células diplóides no órgão inicial.

Em termos de rendimento, não existe uma grande diferença entre os dois métodos, sendo a percentagem de plantas diplóides obtidas mais ou menos idêntica. No entanto, ambos os processos apresentam algumas contrariedades. Assim, a colchicina poderá ser uma agente mutagénico, tendo sido apontada como um dos presumíveis factores responsáveis pela variabilidade por vezes assinalada em HD obtidos por tratamento com colchicina. Além disso, a resposta das diferentes espécies à colchicina não é uniforme.

Por sua vez, a regeneração via formação de um calo, pode provocar o aparecimento de anomalias nas plantas obtidas sendo, além disso, um processo longo que requer grandes disponibilidades de material. Se a passagem pela fase calosa for muito alargada poderão surgir, além de plantas diplóides, outras com níveis de ploidia mais elevados. Como é evidente este método é limitado às espécies nas quais a indução de calos e ulterior regeneração é possível, como acontece na planta do tabaco.

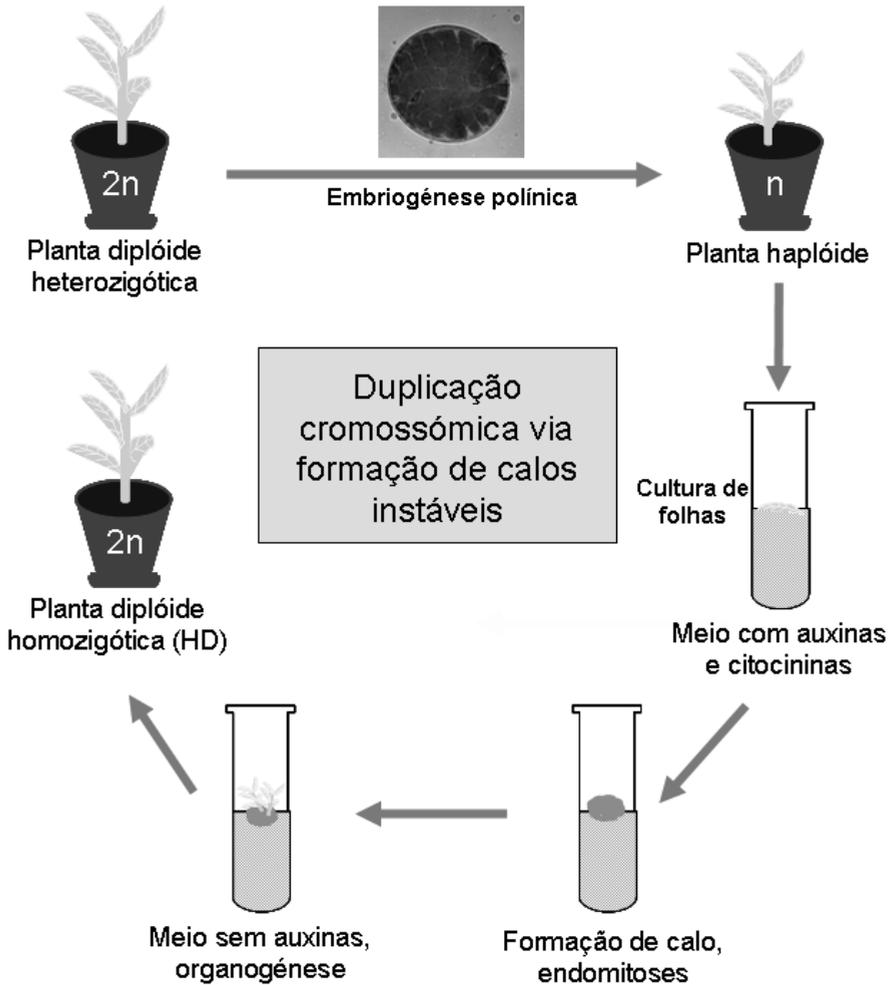


Figura 51 – Representação esquemática da técnica utilizada para obtenção de haplóides-duplos a partir de plantas haplóides.

5.7. Os haplóides e o melhoramento vegetal

Como referimos os haplóides estão na base de muitos programas de melhoramento vegetal, realizados em diversos países, e que têm culminado na obtenção de novos cultivares em algumas espécies. Os resultados mais interessantes têm sido conseguidos em gramíneas, em particular no trigo, arroz, milho, cevada, centeio e tritcale. No entanto, em espécies das famílias

Solanaceae e Brassicaceae, programas de melhoramento envolvendo a obtenção de haplóides têm também sido desenvolvidos e levado à obtenção de resultados muito promissores. Em plantas com mecanismos de fecundação cruzada, onde existe uma elevada heterozigotia nas populações e como acontece em muitas espécies arbóreas, a indução de embriogénese polínica tem igualmente permitido a obtenção de linhas HD com vista à sua incorporação em programas de melhoramento.

Desde as primeiros cultivares Florin e Jinghua nº 1 obtidos por investigadores franceses e chineses, respectivamente, o número de cultivares obtidos com base em métodos de regeneração de haplóides não tem parado de aumentar. Actualmente existem cultivares resistentes a doenças provocadas por vírus (cevada), bactérias (arroz), fungos (trigo) e insectos (arroz) resultantes de plantas de origem polínica de diferentes espécies. A tolerância a factores abióticos como as baixas temperaturas, a elevada salinidade dos solos ou a presença de concentrações excessivas de alumínio são outros exemplos de cultivares obtidos com base na embriogénese polínica. No tabaco, a indução de mutações em haplóides e a selecção celular a partir de células haplóides tem permitido obter plantas tolerantes a bactérias e vários tipos de compostos químicos (toxinas, herbicida e antibióticos). Todos estes dados mostram que de todas as técnicas mais recentes de biotecnologia vegetal, a embriogénese polínica é talvez aquela cujas aplicações mais têm contribuído para o melhoramento das espécies agrícolas.

Um caso muito interessante de utilização da embriogénese polínica no melhoramento vegetal foi a obtenção de super-machos nos espargos por investigadores franceses em meados dos anos 70. No espargo (*Asparagus officinalis*) foram também obtidas linhas mais produtivas com base na indução de androgénese.

O espargo é uma espécie dióica (indivíduos masculinos e indivíduos femininos) em que a maior parte das características com interesse agronómico surgem preferencialmente nos pés masculinos (precocidade, maior produção, robustez). Para interesse dos agricultores seria conveniente assegurar que na descendência de um determinado cruzamento todos os indivíduos fossem do sexo masculino. Nesta espécie, a determinação sexual tem como base a existência de cromossomas sexuais, um pouco à semelhança do que

se verifica nos mamíferos e em outros organismos. Assim, as fêmeas possuem dois cromossomas X enquanto os machos possuem um cromossoma X e um cromossoma Y. Tal significa que na sequência de um cruzamento, 50% dos descendentes serão masculinos e os restantes 50% femininos. Investigadores do INRA (Institut National de la Recherche Agronomique, em França) conseguiram modificar a percentagem de descendentes masculinos através da obtenção de linhas que designaram por super-machos e que possuem dois cromossomas YY em vez de uma guarnição XY (Fig. 52). Numa primeira fase, obtiveram por cultura de anteras, plantas haplóides masculinas (1 cromossoma Y). Numa segunda fase duplicaram o número de cromossomas destas plantas e obtiveram plantas com dois cromossomas Y (super-machos). Do cruzamento entre estes super-machos e plantas normais femininas obtém-se uma descendência constituída por 100% de machos. Os super-machos podem ser mantidos por clonagem e utilizados sempre que se pretende obter uma geração 100% masculina.

5.8. Problemas e limitações

Para além da formação de plantas com níveis elevados de ploidia ou da proliferação dos tecidos somáticos das anteras os quais já foram referidos, existem vários outros problemas que condicionam a utilização dos haplóides em programas de melhoramento vegetal.

5.8.1. Albinismo

O albinismo (formação de plantas sem clorofila) é, talvez, o principal obstáculo à androgénese como método de obtenção de haplóides nas gramíneas. Nesta família, uma grande percentagem das plantas obtidas por embriogénese polínica são albinas (Fig. 53) ou apresentam deficiências clorofilinas. Por vezes as plantas obtidas apresentam secções de fenótipo normal e secções albinas sugerindo uma alteração ao nível das células do meristema apical do caule. As causas do aparecimento de percentagens tão

elevadas de plantas albinas não são conhecidas embora certos factores do meio bem como as condições de cultura influenciem o seu aparecimento.

No arroz o albinismo aumenta com a concentração de 2,4-D no meio enquanto na cevada altas concentrações de sacarose favorecem o aparecimento de albinos. Pré-tratamentos muito prolongados pelo frio com vista aumentar as taxas de indução de embriogénese polínica reflectem-se também num aumento do número de albinos. O genótipo tem igualmente importância neste processo, pois verificou-se que no arroz a subespécie *indica* originava, nas mesmas condições, mais albinos que a subespécie *japonica*. Também no trigo, alguns cultivares apresentam uma maior frequência de formação de plantas albinas do que outros. Um aspecto interessante é que a indução de embriogénese polínica, a regeneração de plantas e a formação de plantas verdes ou albinas parecem ser controlados por genes diferentes.

No arroz, o albinismo aumenta com a concentração de 2,4-D no meio enquanto na cevada altas concentrações de sacarose favorecem o aparecimento de albinos. Pré-tratamentos muito prolongados pelo frio com vista aumentar as taxas de indução de embriogénese polínica reflectem-se também num aumento do número de albinos. O genótipo tem igualmente importância neste processo, pois verificou-se que no arroz a subespécie *indica* origina, nas mesmas condições, mais albinos que a subespécie *japonica*. Também no trigo, alguns cultivares apresentam uma maior frequência de formação de plantas albinas do que outros. Um aspecto interessante é que a indução de embriogénese polínica, a regeneração de plantas e a formação de plantas verdes ou albinas parecem ser controlados por genes diferentes.

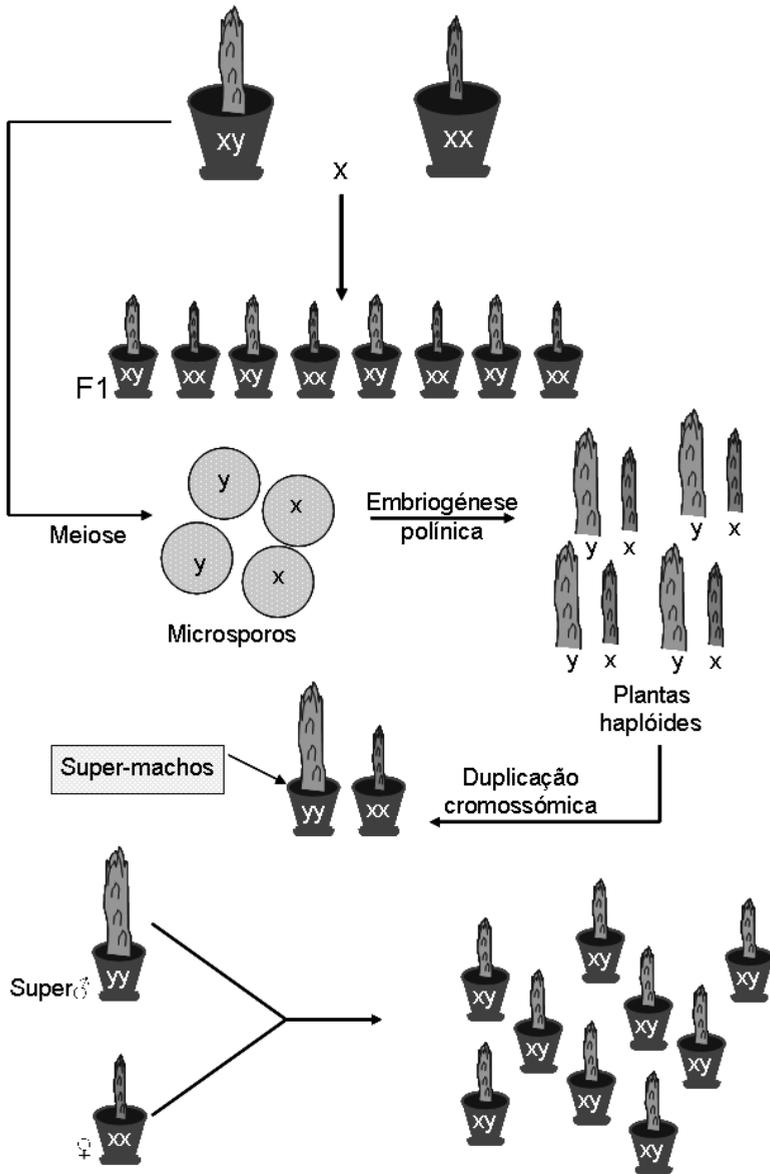


Figura 52 – Obtenção de plantas super-macho no espargo (com base em Moinet, 1985).

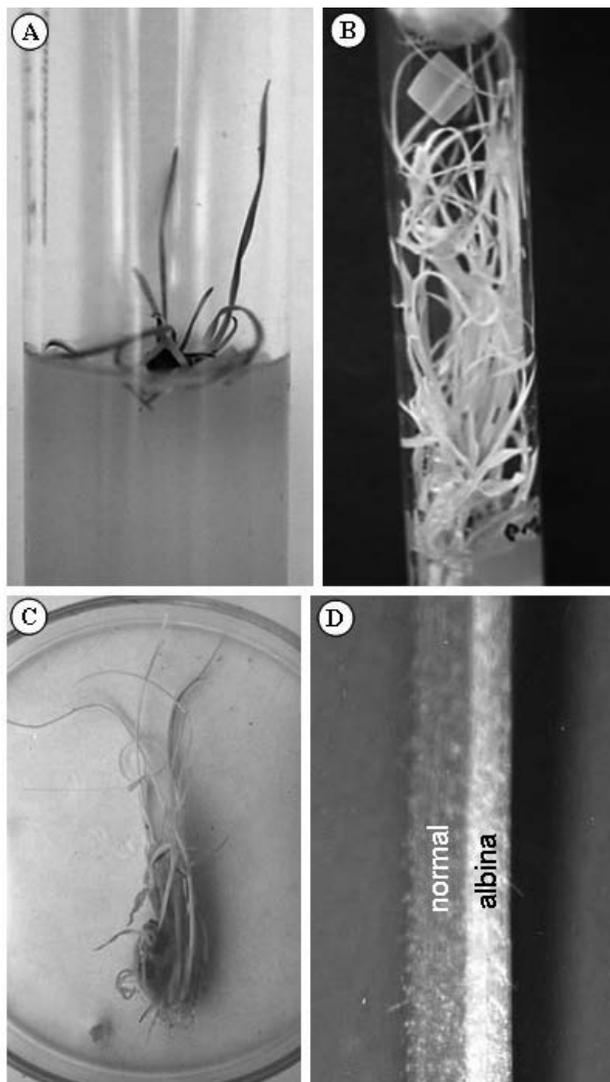


Figura 53 – Formação de plantas albinas por embriogênese polínica. A – Planta de arroz com fenótipo normal obtida por androgênese. B – Como em A mas plantas albinas. C – Planta de trigo albina obtida por androgênese. D – Folha de uma planta de trigo em que metade se apresenta com fenótipo normal e metade albina.

Estes dados pouca informação fornecem sobre as causas citológicas ou moleculares que determinam o aparecimento de albinos. Apesar disso, muitas propostas têm sido sugeridas, algumas delas baseadas em meras especulações. Vejamos então algumas das possíveis explicações para o aparecimento de plantas albinas e algumas objeções a essas mesmas explicações.

- Origem dos albinos na célula generativa uma vez que esta célula que possui um citoplasma muito reduzido com um número muito pequeno de plastídeos.

Objecções: 1) Em algumas espécies existe um número elevado de plastídeos na célula generativa. 2) Em *Hyoscyamus niger*, onde a androgénese ocorre por divisões do núcleo generativo (via D), não se formam albinos. 3) Nas gramíneas as plantas obtidas têm, na maior parte dos casos, origem em divisões da célula vegetativa.

- Presença de genes nucleares que controlariam esta característica sendo os albinos originados a partir de grãos de pólen com o gene para o albinismo.

Objecções: em culturas de anteras de HD (plantas em que os genes do albinismo, a existirem, não estariam representados) também se formam plantas albinas.

- Ocorrência de mutações em cultura.

Objecções: 1) a taxa de mutações teria que ser muito elevada pois, em alguns casos, 100% das plantas regeneradas são albinas. 2) A verificarem-se, as mutações também deveriam ocorrer, por exemplo, em solanáceas. Todavia, nestas espécies poucos albinos são formados.

Análises moleculares detectaram modificações do DNA e de proteínas cloroplastidiais. Em plantas albinas de arroz verifica-se que ocorrem variações no RNAr e nas proteínas dos plastídeos de plantas albinas relativamente aos cloroplastos de plantas normais. No que diz respeito às proteínas observa-se que a banda 3 (denominada fracção I) está praticamente ausente nos albinos enquanto a banda 11 não existe. Relativamente ao RNAr, verifica-se que as plantas albinas não possuem as fracções 16S e 23S. Com base nestes resultados, a obtenção de plantas albinas por androgénese parece ter como causa uma deficiência na síntese proteica e de RNAr ao nível dos cloroplastos, provavelmente relacionada com alguma alteração do DNA cloroplastidial, embora não seja de excluir também o envolvimento de DNA nuclear. Alterações no

DNAcP que se traduzem na ausência de secções mais ou menos extensas foram de facto detectadas em plantas albinas produzidas por androgénese.

Uma hipótese avançada por Huang parece reunir maior consenso para explicar a formação de plantas albinas por androgénese. Segundo este autor, existirá uma fase transitória na ontogenia dos plastídeos durante o desenvolvimento dos grãos de pólen. Assim, o denso estroma existente nos plastídeos após o estado de tétada, perde-se com a evolução dos grãos de pólen e, nos períodos médio e tardio do estado uninucleado (no caso das gramíneas), os proplastídeos tornam-se estruturalmente muito simples. Esta metamorfose dos plastídeos representa uma transição do desenvolvimento esporofítico para o gametofítico. Se os grãos de pólen são induzidos a dividir antes da fase de transição serão formadas plantas verdes, se essa indução for ulterior à fase de transição então formar-se-ão plantas albinas, pois os proplastídeos, após essa fase, não conseguem originar cloroplastos. Deste modo, a taxa de plantas verdes/albinas depende do grau de metamorfose dos plastídeos dos grãos de pólen na altura da indução.

A reduzida formação de albinos em solanáceas seria explicada pelo facto de nas plantas desta família a metamorfose plastidial, ocorrer mais tardiamente que nas gramíneas, no estado bicelular tardio. No momento mais favorável para a indução (próximo da primeira mitose polínica) os plastídeos contêm ainda um estroma abundante podendo prosseguir o seu desenvolvimento normal em cloroplastos. Esta hipótese é bastante interessante e é a única que permite explicar as diferenças entre os resultados obtidos com gramíneas e solanáceas no que se refere à formação de albinos.

Provavelmente, vários dos factores acima referidos ou outros ainda não detectados, poderão contribuir simultaneamente para a origem dos albinos, não parecendo possível, neste momento, atribuir a uma única causa a formação de todos os albinos produzidos por androgénese.

5.8.2. Variabilidade das plantas regeneradas

O estudo dos HD e da sua descendência revelou algumas particularidades não esperadas. Assim, embora seja lógico aparecerem indivíduos com

características diferentes entre as plantas regeneradas a partir de anteras de plantas heterozigóticas (como consequência da segregação e *crossing-over* que ocorrem na meiose), o mesmo já não se deve esperar quando se utilizam anteras de linhas completamente homozigóticas como os HD. Esta variabilidade assume os mais variados aspectos e é designada por variação gametoclinal de forma análoga à variação observada nos tecidos somáticos (variação somaclonal). A variação detectada não é sempre de carácter negativo embora isso seja a situação mais frequente. Alterações na estrutura dos cromossomas (duplicações, deleções, translocações, inversões), na quantidade de DNA por célula (amplificação genética) ou mesmo mecanismos epigenéticos como modificações na estrutura da cromatina ou na metilação do DNA podem explicar a variação encontrada. Alguns autores têm igualmente sugerido que modificações em genes citoplasmáticos e alterações provocadas pelos agentes c-mitóticos utilizados podem também contribuir para a variabilidade observada.

Qualquer que seja a causa da variabilidade observada em linhas androgénicas obtidas por cultura de anteras de plantas HD, podem-se retirar duas ilações. Em primeiro lugar fica a ideia de que as plantas conseguidas por androgénese devem ser testadas no campo durante vários ciclos com a finalidade de detectar alguma variabilidade ou perda de vigor. Por outro lado, o aparecimento de variabilidade pode assumir aspectos positivos, mostrando os HD, algumas características que os seus progenitores não possuíam e que poderão vir a ser vantajosas sob o ponto de vista agronómico.

Para além do albinismo e da variabilidade outros factores que limitam o sucesso da embriogénese polínica são a fraca indução, quer ao nível do número de grãos de pólen por antera quer ao nível da percentagem de anteras inoculadas, as anomalias morfológicas que ocorrem nos embriões e nas plantas obtidas, tal como observado no caso dos embriões somáticos, a elevada mortalidade dos próembriões durante as fases iniciais de indução e a instabilidade das células haplóides em cultura o que leva ao aparecimento de plantas com complementos cromossómicos anómalos.

(Página deixada propositadamente em branco)

CAP. 6. SUSPENSÕES CELULARES E METABOLITOS SECUNDÁRIOS

6.1. Introdução

Como se referiu em capítulos anteriores a cultura *in vitro* de plantas pode ser utilizada com diferentes objectivos como sejam a clonagem e a obtenção de haplóides. Nesses capítulos vimos também que na cultura *in vitro* de plantas é frequente a formação de calos. Esses calos podem ter a capacidade de regenerar plantas por organogénese ou embriogénese somática. No entanto, eles podem também ser utilizados com outros objectivos como sejam a análise do crescimento celular, a produção de biomassa ou para a extracção de determinados metabolitos. Os calos obtidos por cultura de células vegetais podem ter aspectos muito diferentes que variam desde a sua consistência (compactos ou friáveis) até à sua coloração (verdes, amarelados, esbranquiçados...) e que estão relacionados com o material de origem e com as condições de cultura. Em meio sólido as células dos calos, ao dividirem, tendem a ficar agrupadas formando massas de células. No entanto, se os calos forem transferidos para um meio de cultura líquido, as células têm tendência a separar-se umas das outras, ficando livres ou formando pequenos agregados celulares. É a esta população de células isoladas ou na forma de agregados que se chama suspensão celular. Neste capítulo serão focados aspectos relacionados com a obtenção e manutenção de suspensões celulares bem como as suas aplicações.

6.2. Obtenção de suspensões celulares

192

Uma suspensão celular de células vegetais consiste num conjunto de células isoladas e/ou agregados celulares de 20 a 100 células (Fig. 54) dispersas e a crescer num meio líquido, em agitação (30 – 150 rpm). A agitação permite uma melhor oxigenação da material em cultura e evita a agregação celular ao mesmo tempo que permite uma melhor distribuição das células e agregados no meio, facilitando o contacto com os nutrientes. As células podem ser de tipo meristemático ou células alongadas e vacuolizadas (Fig. 54). Restos de células mortas, resultantes da senescência celular, e detritos celulares surgem com frequência nas suspensões.

As suspensões celulares são normalmente iniciadas pela transferência de um calo friável (calo em que as células facilmente se separam umas das outras) obtido na presença de uma auxina ou de uma auxina e uma citocinina para um meio líquido de composição semelhante (Fig. 55). O calo que vai servir de base para a formação da suspensão celular pode ser do tipo embriogénico (Fig. 55) como acontece por exemplo com calos de cenoura ou tamarilho ou não (caso da linha BY-2 de tabaco). Calos embriogénicos permitem a obtenção de um grande número de embriões somáticos num volume reduzido podendo ser utilizados biorreactores com um volume maior e com controlo automático das condições de cultura de forma a obter um grande número de plantas. As suspensões celulares podem também ser estabelecidas pela cultura de células isoladas obtidas directamente de órgãos vegetais por métodos mecânicos ou enzimáticos. Em cultura estas células proliferam numa suspensão celular sem ser necessária a obtenção de um calo intermédio em meio sólido.

Uma suspensão celular vegetal apresenta uma dinâmica de crescimento (Fig. 56) semelhante ao crescimento de outras populações celulares, como por exemplo uma população bacteriana, com a diferença do tempo de duplicação (período necessário para a duplicação do número de células) ser muito maior no caso das plantas. De facto, enquanto numa população bacteriana esse período pode ser de 15 – 30 min., numa suspensão de células vegetais ele pode atingir vários dias (24-48h em condições óptimas). Numa fase inicial, a população celular mantém-se mais ou menos constante (fase

de adaptação) sem que a população sofra um aumento significativo, após o que se segue uma fase de crescimento activo em que o número de células aumenta exponencialmente (fase exponencial) e depois de uma forma linear. Segue-se uma fase de desaceleração em que as taxas de divisão e alongamento celular diminuem e, finalmente, quando um factor se torna limitante, a fase estacionária em que o número e o tamanho das células permanecem constantes. Nesta altura, deve proceder-se à renovação do meio ou ao estabelecimento de subculturas para assegurar a continuação do crescimento. Caso este procedimento não ocorra, a população celular começa a diminuir e, ao fim de algum tempo, as células degeneram.

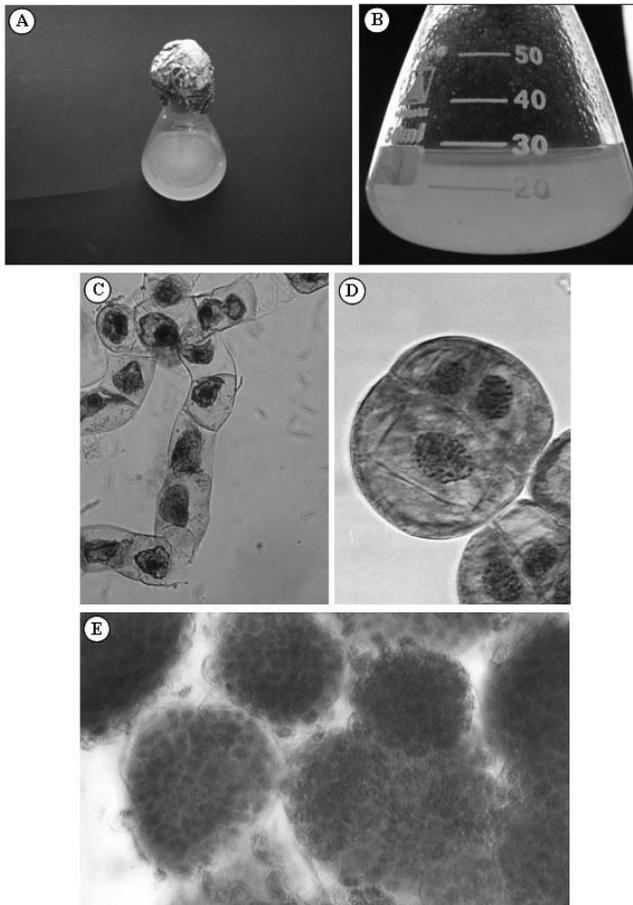


Figura 54 – Células em suspensão. A – Suspensão celular de células de tabaco. B – Detalhe de A. C – Células de tamarilho muito vacuolizadas em suspensão. D – Células de tipo meristemático em suspensão. E – Agregados embriogénicos em suspensão.

O período que decorre desde a iniciação das culturas até à fase estacionária depende essencialmente dos seguintes factores:

194

- 1) densidade celular inicial - altas densidades celulares ($0.5 - 2.5 \times 10^5$ células/ml) favorecem o crescimento,
- 2) duração da fase de adaptação,
- 3) taxa de crescimento da linha celular.

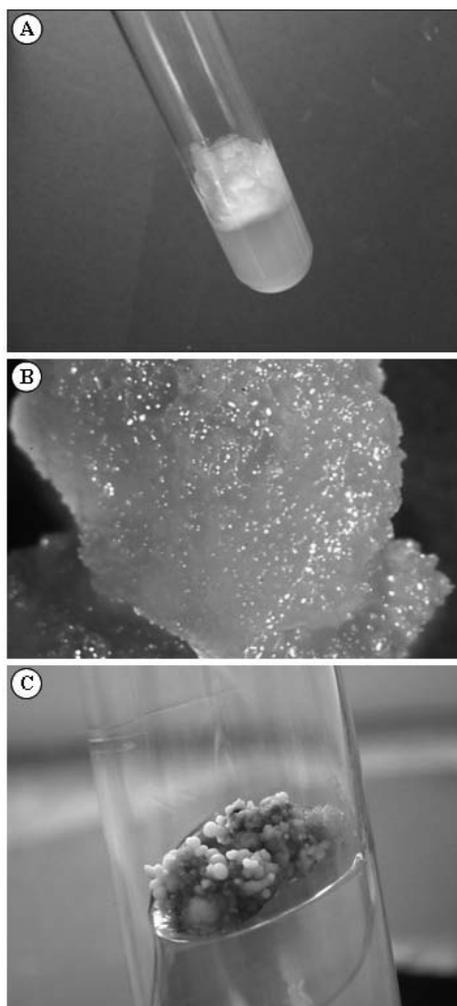


Figura 55 – Calos utilizados na obtenção de suspensões celulares. A – Calo friável da linha BY-2 de tabaco. Detalhe de um calo friável. Notar o aspecto muito hidratado das células. C – Calo embriogénico de tamarilho. Os nódulos claros representam embriões em fases precoces de desenvolvimento.

Uma suspensão de cultura ideal deve ser caracterizada por uma homogeneidade morfológica e bioquímica e por possuir uma elevada percentagem de células isoladas ou de pequenos agregados. Numa cultura sincronizada, os ciclos de células individuais estão numa mesma fase e o comportamento de uma população reflecte o comportamento de uma célula individual. A sincronização é ainda importante quando se pretendem produzir metabolitos secundários a partir de suspensões celulares ou quando se pretendem realizar estudos bioquímicos sobre o desenvolvimento de embriões somáticos. Embora a sincronização das suspensões celulares seja difícil de obter podendo coexistir, numa mesma suspensão, células isodiamétricas, células vacuolizadas e todos os graus de diferenciação entre estes dois estádios têm sido feitas tentativas de sincronizar as suspensões. De acordo com Chawla (2009), uma cultura sincronizada é aquela em que a maioria da população celular se encontra na mesma fase do ciclo mitótico. Existem vários procedimentos para sincronizar as suspensões celulares, como sejam a utilização de inibidores metabólicos (5-aminouracilo, hidroxureia), de choques térmicos (frio) ou a limitação de um determinado factor de crescimento (fonte de carbono, azoto ou fósforo). Com a aplicação destes tratamentos as células ficam bloqueadas nas fases G1 e G2 da interfase. Outros agentes, como a colchicina podem bloquear o ciclo celular na fase de mitose. Uma vez restabelecidas as condições normais de cultura as células reassumem o crescimento verificando-se uma certa uniformidade entre as diferentes células relativamente à fase do ciclo celular em que se encontram. O problema é que, na maioria das circunstâncias a uniformidade está restringida a um único ciclo celular. Muitas suspensões celulares estabelecidas, após um período alargado, apresentam uma certa heterogeneidade genética na sua população que é impossível de ultrapassar e que resulta de alterações no número e na estrutura dos cromossomas. Outros problemas relacionados com as suspensões celulares têm a ver com o facto de ser necessário proceder a subculturas frequentes, particularmente se a taxa de crescimento for elevada, situação que se relaciona com o rápido consumo de nutrientes essenciais ou que pode estar também relacionada com a acumulação de compostos inibitórios.

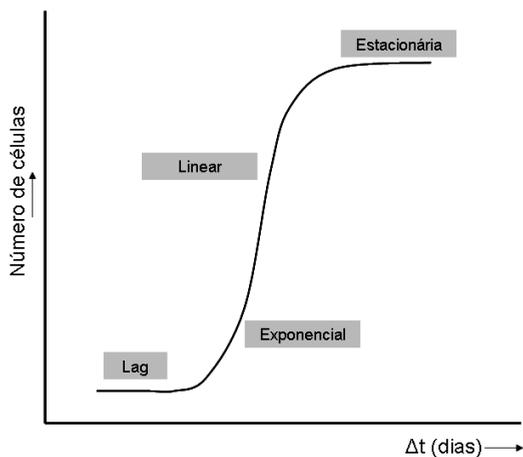


Figura 56 – Curva típica do crescimento de uma suspensão celular de células vegetais.

6.3. Medidas de viabilidade e crescimento celular

Para analisar o comportamento de uma suspensão celular, quer em termos fisiológicos quer do ponto de vista da produção de metabolitos secundários, é necessário avaliar os parâmetros de crescimento das suspensões celulares e a viabilidade das células em cultura.

A viabilidade celular é normalmente determinada utilizando FDA (diacetato de fluoresceína). Trata-se de um composto apolar que atravessa a membrana celular. No interior da célula, e sob a ação de esterases, o composto é clivado em fluoresceína e acetato sendo a primeira fluorescente quando submetida à ação de radiação ultravioleta, emitindo uma coloração amarelada (Fig. 57). Uma vez que o acetato não está associado à fluoresceína, a molécula apresenta-se polar, sendo incapaz de atravessar a membrana de forma passiva. Deste modo, a fluorescência observada é resultante, por um lado da clivagem da molécula e, por outro, da sua retenção nas células. As células não viáveis, não possuindo esterases são incapazes de decompor e reter a fluoresceína não emitindo fluorescência. Um outro composto utilizado para determinar a viabilidade das células em cultura é o azul de Evans. Neste caso, as células viáveis reduzem o corante tornando-o incolor enquanto as células não viáveis não o fazem, apresentando uma tonalidade azul.

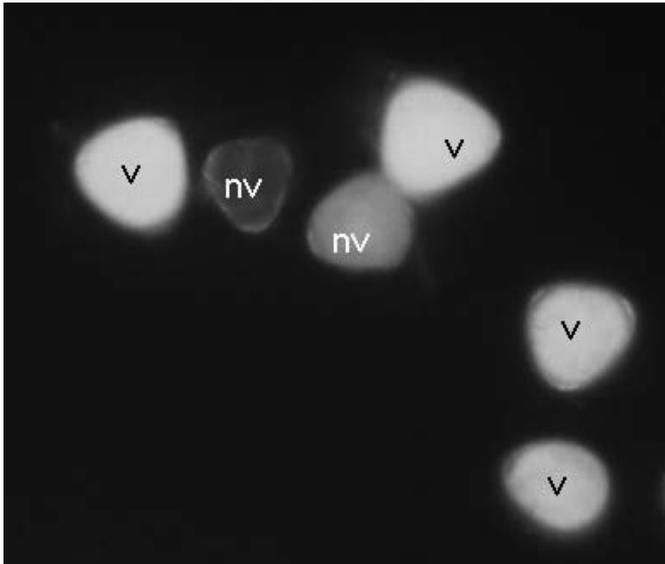


Figura 57 – Determinação da viabilidade celular através da utilização de diacetato fluoresceína. Neste caso trata-se da viabilidade de grãos de pólen. v – pólen viável; nv – pólen não viável.

O crescimento das suspensões pode ser determinado por contagem directa das células com o auxílio de um hemocítmetro, por determinação do peso seco e através da condutância (um parâmetro que é inversamente proporcional ao peso fresco). A determinação dos níveis de proteína total pode também ser utilizada pois é proporcional ao número de células em cultura. No entanto, as células vegetais em cultura não têm tendência para acumular grandes quantidades de proteína de reserva pelo que este método, devido também à sua morosidade, raramente é utilizado. Alguns autores usam um procedimento chamado "packed cell volume" (PCV) que consiste em remover, periodicamente, determinadas quantidades de meio da suspensão (até 10 ml). Estas porções de meio são transferidas para tubos de centrifuga e centrifugados a baixas velocidades durante 5 minutos. Isto faz com que as células em suspensão sedimentem. O PCV é determinado como ml de sedimento por ml de meio de cultura. O índice mitótico, definido como a relação entre o número de células em mitose o número total de células em cultura, é também um bom indicador da proliferação celular de uma suspensão embora o crescimento de uma suspensão celular esteja também relacionado com o aumento do volume celular.

6.4. Suspensões celulares e produção de metabolitos secundários

198

As suspensões celulares podem ter várias aplicações. Elas podem utilizar-se para determinar os factores envolvidos na nutrição e divisão das células em cultura, para a formação de embriões somáticos ou de outro tipo de propágulos ou para a obtenção de protoplastos. No entanto, a maior potencialidade deste tipo de culturas, está relacionada com a produção de embriões somáticos e de metabolitos secundários. A produção de embriões somáticos já foi referida pelo que vamos agora abordar com mais pormenor a produção de metabolitos secundários.

As plantas são fábricas muito eficazes. A partir de água, elementos minerais e dióxido de carbono e utilizando a luz solar captada pela clorofila, são capazes de formar hidratos de carbono que são depois utilizados para as mais diversificadas funções. Este metabolismo conduz à formação dos compostos mais abundantes nas plantas e que se podem designar como metabolitos primários. Os compostos assim formados onde se incluem os lípidos, as proteínas, os hidratos de carbono e os ácidos nucleicos desempenham funções essenciais nas plantas. Para além deste tipo de metabolitos, comuns a todas as plantas e produzidos em grandes quantidades, existem outros cujas funções não são tão claras, de natureza mais diversificada e produzidos em menores quantidades. Para além disso, muitos desses compostos são apenas sintetizados em determinadas células ou específicos de um grupo particular de plantas. Durante muito tempo pensou-se que estes compostos eram produtos laterais do metabolismo sem uma função particular nas plantas podendo, alguns deles, ser mesmo considerados uma espécie de lixo metabólico. Por estas razões, tais compostos foram chamados metabolitos secundários. No entanto, à medida que o metabolismo das plantas foi sendo melhor caracterizado, e que os mecanismos envolvidos nos diferentes aspectos do desenvolvimento foram sendo compreendidos, chegou-se à conclusão que muitos dos metabolitos secundários são cruciais para o normal funcionamento dos organismos vegetais.

Esses produtos englobam aromas, resinas, taninos, óleos essenciais, borracha, tintas, medicamentos, especiarias, produtos de cosmética e aditivos alimentares. Os compostos referidos são de natureza química bastante

diversa e as funções precisas de muitos deles no desenvolvimento normal das plantas estão ainda longe de estar determinadas. No entanto, sabe-se actualmente que muitos destes compostos são importantes do ponto de vista ecológico, funcionando como compostos alelopáticos e conferindo às plantas que os produzem uma vantagem competitiva relativamente a outras plantas inibindo ou retardando o seu crescimento evitando a competição pela luz, água ou elementos minerais. Noutros casos, trata-se de compostos que conferem às plantas um odor ou um gosto pouco apetecível evitando o ataque por herbívoros. A atracção de agentes polinizadores ou dispersores de sementes e o seu envolvimento no estabelecimento de interacções com microrganismos são outras importantes funções destes compostos. Alguns protegem também as plantas de determinado tipo de radiações, por exemplo radiações ultravioletas enquanto outros são importantes em mecanismos de comunicação celular. De facto, algumas hormonas vegetais, como as citocininas, giberelinas e ácido abscísico, só para referir as mais importantes são derivados de metabolitos secundários. Esta breve descrição das funções destes compostos mostra que o seu papel nas plantas está longe de poder ser considerado secundário. Deste modo, muitos autores sugerem que estes compostos não devem ser chamados metabolitos secundários tendo sido propostas várias designações alternativas, como por exemplo, “produtos naturais das plantas” ou simplesmente “produtos naturais”. No entanto, por uma questão de tradição o nome “metabolitos secundários” tem permanecido e é aquele que vulgarmente é utilizado. A tabela 2 mostra alguns metabolitos secundários produzidos pelas plantas bem como a função para a qual são normalmente utilizados. Como se pode observar, as aplicações são as mais variadas desde a sua aplicação em saúde pública até à utilização como condimentos.

Os metabolitos secundários podem dividir-se em três grandes grupos, vulgarmente conhecidos como terpenos, fenóis e alcalóides (compostos ricos em azoto). A figura 58 mostra as principais vias de síntese envolvidas na formação dos grupos de metabolitos secundários referidos. Como se pode observar, uma mesma via metabólica pode estar envolvida na produção de mais que um tipo de metabolitos secundários. Assim, a via do ácido chiquímico, conduz não apenas à formação de alcalóides via aminoácidos

aromáticos, mas também à formação de compostos de natureza fenólica. O inverso também é verdade, ou seja, um tipo particular de compostos secundários pode resultar do envolvimento de mais que uma via metabólica. É o caso dos compostos fenólicos cuja formação depende das vias do ácido chiquímico e do ácido malónico. A via do ácido chiquímico é particularmente importante nas plantas pois conduz à formação de aminoácidos aromáticos. Estes compostos estão depois envolvidos numa séria de etapas bioquímicas que levam à produção de compostos extremamente importantes quer em termos estruturais (caso da lenhina) quer em termos funcionais. De facto, o triptofano, um aminoácido aromático, é um precursor das auxinas, hormonas vegetais que controlam vários aspectos do desenvolvimento das plantas. Esta via do ácido chiquímico tem também sido alvo de investigação com vista à obtenção de plantas tolerantes a determinados herbicidas (ver capítulo 8).

Tabela 2. – Exemplos de alguns metabolitos secundários produzidos pelas plantas e indicação da sua actividade ou utilização principal (adaptado de Gawer, 1995 e Chawla, 2009).

Composto	Espécie	Actividade/utilização
Ácido rosmarínico	<i>Coleus blumei</i>	Antioxidante
Antraquinonas	<i>Morinda citrifolia</i>	Laxativo
Atropina	<i>Atropa belladonna</i>	Antiespasmódico
Berberina	<i>Coptis japonica</i>	Anti-inflamatório
Cafeína	<i>Coffea arabica</i> , <i>Coffea robusta</i>	Estimulante, cardiotónico
Capsaicina	<i>Capsicum frutescens</i>	Condimento
Codeína	<i>Papaver</i> spp.	Analgésico
Crocina	<i>Crocus sativus</i>	Especiaria
Digitoxina	<i>Digitalis lanata</i> , <i>Digitalis purpurea</i>	Cardiotónica
Digoxina	<i>Digitalis lanata</i> , <i>Digitalis purpurea</i>	Cardiotónica
Diosgenina	<i>Dioscorea deltoides</i>	Contraceptivo
Escopolamina	<i>Datura stramonium</i>	Anti-hipertensão
Ginsenosídeos	<i>Panax ginseng</i>	Tonificante
Maitansina	<i>Maytenus buchananii</i>	Antitumoral
Morfina	<i>Papaver somniferum</i>	Analgésico
Nicotina	Várias espécies de <i>Nicotiana</i>	Insecticida
Óleos essenciais	<i>Lavandula</i> , <i>Rosa</i> sp. <i>Eucalyptus</i> sp.	Perfumaria
Piretrinas	<i>Chrysanthemum cinerariifolium</i>	Insecticida
Quinina	<i>Cinchona officinalis</i>	Anti-malária
Rotenóides	<i>Derris elliptica</i> , <i>Tephrosia vogaeli</i>	Insecticida
Siconina	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	Corante, cicatrizante
Stevióside	<i>Stevia rebaudiana</i>	Adoçante
Taxol	<i>Taxus brevifolia</i>	Anti-tumoral
Ubiquinona 10	<i>Nicotiana tabacum</i>	Cardiotónica
Vanilina	<i>Vanilla planifolia</i>	Aroma, condimento
Vinblastina	<i>Catharanthus roseus</i>	Anti-tumoral
Vincristina	<i>Catharanthus roseus</i>	Antitumoral

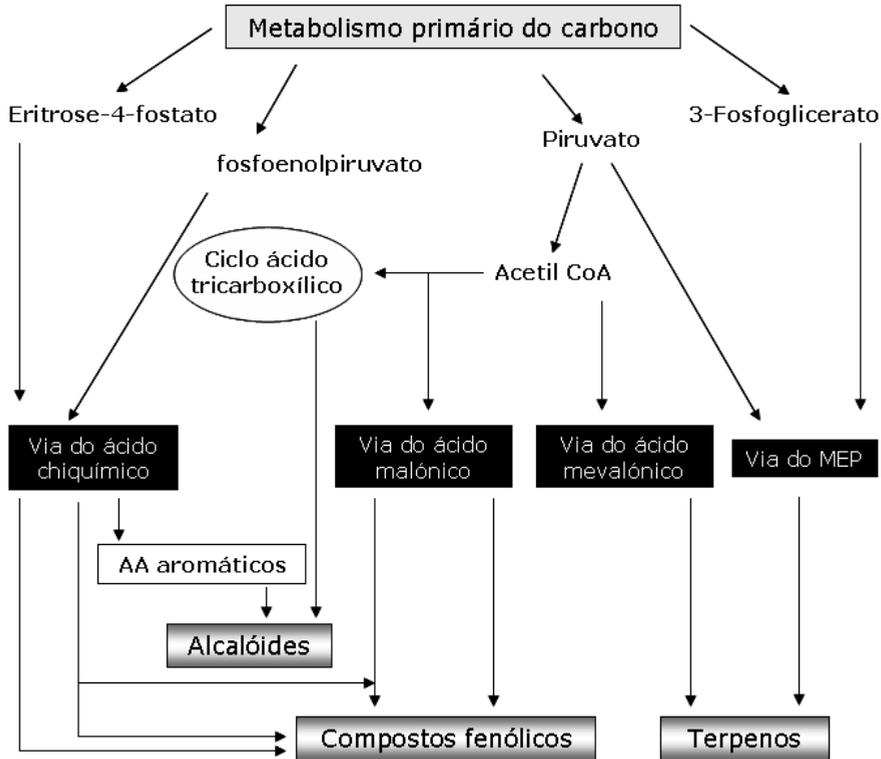


Figura 58 – Principais vias metabólicas envolvidas na produção de metabolitos secundários. AA – aminoácidos, MEP – metileritritol fosfato (adaptado de Taiz e Zeiger, 2006).

Os terpenos e seus derivados formam o grupo mais abundante de metabolitos secundários. Uma vez que a decomposição dos compostos terpênicos, a elevadas temperaturas, origina unidades de isopreno (C_5H_8) estes compostos são também designados por isoprenóides. Os diferentes terpenos são classificados de acordo com o número de unidades de isopreno que possuem. Assim, os monoterpenos possuem 2 unidades de isopreno (10 átomos de carbono), enquanto os diterpenos possuem 4 unidades de isopreno (20 C). Hemiterpeno é a designação que se aplica a um terpeno com 5 átomos de carbono enquanto um sesquiterpeno possui 15 átomos de carbono. Compostos com um número elevado de unidades de isopreno são denominados politerpenos. Muitas plantas produzem misturas complexas de terpenos voláteis designadas óleos essenciais e que conferem às plantas que os produzem um odor característico. Lavândulas, citrinos e eucaliptos

são algumas das plantas que produzem este tipo de óleos. Alguns compostos terpénicos são poderosos insecticidas como acontece com as piretrinas produzidas por plantas do género *Chrysanthemum*. Os brassinosteróides, um grupo de hormonas vegetais descoberto inicialmente no pólen de espécies do género *Brassica*, são compostos terpénicos com 30 átomos de carbono (triterpenos). Os pigmentos carotenóides são também terpenos e a borracha encontrada no látex de algumas plantas (*Ficus elastica*, *Hevea brasiliensis*) é um polímero formado por mais de 15000 unidades de isopreno.

Compostos fenólicos, como o nome indica, são compostos que possuem pelo menos um grupo fenólico: um anel de benzeno ao qual está directamente ligado um grupo hidroxilo (OH). Os fenóis, tal como os terpenos, são também um conjunto muito heterogéneo de compostos orgânicos, sendo conhecidos mais de 10.000. Variam entre compostos estruturalmente muito simples até polímeros de elevado peso molecular como os taninos condensados. Muitos compostos fenólicos são produzidos a partir do aminoácido aromático fenilalanina com a sua conversão em ácido cinâmico numa reacção catalizada pela enzima fenilalanina amónia liase. Trata-se de uma enzima chave no metabolismo das plantas pois o ácido cinâmico é um composto essencial para a formação da lenhina, um componente essencial da parede celular de vários tipos celulares. Vários pigmentos comuns nas plantas são também compostos de natureza fenólica responsáveis pela coloração das flores e dos frutos, ajudando assim à atracção de polinizadores e à dispersão de sementes. Alguns fenóis possuem actividade antioxidante sendo extremamente interessantes do ponto de vista alimentar pois podem ajudar a prevenir problemas vasculares.

Como o nome sugere, os alcalóides são compostos alcalinos que se calcula estejam presentes em cerca de 20% das plantas vasculares. Os alcalóides constituem também uma vasta família de compostos orgânicos que possuem três características em comum: são solúveis em água, possuem um ou mais átomos de azoto e exibem uma forte actividade biológica. De acordo com Hopkins e Hüner (2004) algumas das drogas mais importantes derivadas das plantas são alcalóides. Muitos destes compostos são poderosos venenos pois interferem com a actividade de neurotransmissores. A título de curiosidade pode referir-se que Sócrates foi executado pela ingestão de um

extracto de *Conium* spp. Algumas plantas são particularmente conhecidas por produzirem este tipo de compostos. É o caso de vários membros das famílias *Solanaceae* e *Papaveraceae*. Em condições naturais muitos destes compostos funcionam como uma protecção das plantas visto serem tóxicos para os herbívoros. Por exemplo, os glicósidos cianogénicos libertam ácido cianídrico, um poderoso inibidor da respiração. Embora extremamente tóxicos para outros organismos, os compostos são inofensivos para as plantas visto que são armazenados em compartimentos celulares diferentes das enzimas envolvidas na sua hidrólise.

Muitos dos metabolitos secundários produzidos pelas plantas são utilizados pelos humanos desde tempos imemoriais. A curtição das peles com taninos, a extracção de corantes ou a utilização das plantas para fins medicinais são apenas alguns exemplos deste aproveitamento das potencialidades do mundo vegetal. Nas mais antigas civilizações o exercício da medicina e da farmacologia esteve sempre associado ao conhecimento das plantas e dos produtos que elas produzem. Os curandeiros e os feiticeiros foram sempre indivíduos poderosos no seio das sociedades onde se inseriam devido aos conhecimentos que tinham do mundo vegetal, uma situação que ainda hoje se verifica em povos primitivos. Também numa perspectiva histórica é sabido que o exercício da medicina esteve sempre ligado ao conhecimento que os médicos tinham dos compostos químicos extraídos das plantas. Como exemplo podemos citar o trabalho do médico e botânico português Garcia de Orta, um estudioso das potencialidades curativas das plantas da Índia. Mesmo nas modernas sociedades ocidentais são poucas as pessoas que nunca recorreram a uma infusão de uma qualquer planta para tratar uma indisposição ou mesmo doenças mais graves. O entusiasmo recente com a planta *Aloe vera* é indicativo do ponto a que pode chegar a crença nas potencialidades das plantas.

Apesar dos avanços na síntese química de medicamentos e de outros compostos de interesse prático como herbicidas, aromas ou aditivos alimentares, uma grande percentagem dos fármacos utilizados em medicina tem origem em produtos de origem vegetal. O taxol extraído do teixo-americano e usado no combate contra alguns tipos particulares de cancro, e a utilização do ácido chiquímico extraído em grandes quantidades da planta *Illicium*

verum (usada como condimento em países como a China, Índia e Malásia) para a produção de tamiflu são dois dos exemplos mais recentes de como as plantas continuam a ser fontes importantes de princípios activos. A síntese química de compostos produzidos pelas plantas ou a produção alternativa por outros organismos nem sempre é eficaz e, em algumas situações, torna-se mesmo impraticável não apenas por dificuldades técnicas mas também porque os procedimentos experimentais encarecem o produto tornando-o pouco competitivo. Por exemplo, no caso do tamiflu, o ácido chiquímico pode também ser produzido pela fermentação de determinadas estirpes de *Escherichia coli* mas os rendimentos são menores que a extracção a partir da planta *I. verum*. Para além disso, nos países mais desenvolvidos há um interesse crescente pelos produtos ditos naturais pese embora o facto de eles poderem ser exactamente iguais aos de síntese química. No entanto, o “mercado verde” está em expansão e os gigantes da indústria química já perceberam esses sinais, apostando cada vez mais em produtos extraídos de plantas. Finalmente, deve dizer-se que, das cerca de 400.000 plantas que se estima existirem, a maior parte não está caracterizada quanto ao seu potencial químico havendo muito a esperar no que diz respeito à descoberta de novos compostos químicos de interesse.

Tradicionalmente os metabolitos secundários têm sido obtidos a partir de plantas espontâneas ou cultivadas. No caso das plantas espontâneas, a principal limitação que se coloca é a exploração excessiva que pode levar a uma perda rápida da diversidade se a procura for muito intensa. No caso das plantas cultivadas colocam-se outros problemas como seja o custo de produção, a interferência de factores bióticos e abióticos que podem levar a perdas acentuadas das culturas.

A produção de metabolitos vegetais por células em cultura é uma metodologia alternativa à extracção de produtos a partir de plantas e que pode mesmo apresentar algumas vantagens. Entre essas vantagens contam-se a independência da extracção relativamente às condições climáticas ou geográficas e altura do ano, a possibilidade de produzir compostos em condições controladas, uma melhor garantia de qualidade do produto, modificação de compostos com vista à obtenção de um melhor rendimento ou de produtos com novas potencialidades e a possibilidade de utilização de plantas com

ciclos de vida longos reduzindo assim o tempo de produção. Não menos importante é o impacto deste tipo de técnica em termos de conservação e redução dos impactos negativos no que diz respeito à diversidade biológica. De facto, uma procura intensiva de determinadas plantas não cultivadas com o objectivo de extracção de compostos químicos pode colocar em causa a sua manutenção nos habitats naturais pelo que o recurso a culturas *in vitro* reduz ou evita a sua colheita excessiva.

Muitos metabolitos secundários são apenas produzidos em estruturas particulares que normalmente não se formam a partir de calos ou suspensões celulares. Como exemplo podem citar-se os óleos essenciais que algumas plantas aromáticas produzem em tricomas glandulares ou em estruturas secretoras internas (Fig. 59) ou a produção de látex em laticíferos. Nestas circunstâncias, a extracção implica necessariamente a utilização dessas estruturas. No entanto, outros compostos podem ser produzidos a partir de células em cultura ou mesmo de órgãos particulares como sejam as raízes pelo que, nesses casos, a obtenção dos metabolitos não requer a formação das estruturas secretoras.

A obtenção de metabolitos secundários a uma escala industrial a partir de culturas de células em suspensão implica a utilização de biorreactores com volumes de cultura que podem chegar aos 75.000 litros. Os principais problemas que se colocam a estes sistemas de cultura são a oxigenação das células evitando a sua deposição e o fornecimento dos nutrientes necessários ao seu crescimento, bem como a manutenção das condições óptimas de cultura, nomeadamente o pH do meio.

Existem actualmente dois principais tipos de biorreactores. Aqueles em que a agitação é mecânica e análogos aos fermentadores utilizados na cultura de microrganismos. Neste caso a agitação é provocada por um rotor que faz mover lâminas ou hélices. Noutros sistemas, a agitação é conseguida pela injeção de uma corrente de ar ascendente ou através de um tambor oscilante. Os biorreactores de agitação mecânica são particularmente eficazes para volumes de cultura da ordem dos 750 a 1.000 litros enquanto os biorreactores de injeção de ar são mais adequados para uma produção industrial. Mais recentemente, surgiram novos sistemas de biorreactores em que as células podem ser imobilizadas numa determinada substância poro-

sa que permite a difusão do oxigénio. A utilização de fibras de propileno como material de suporte é muito comum nestes sistemas.

206

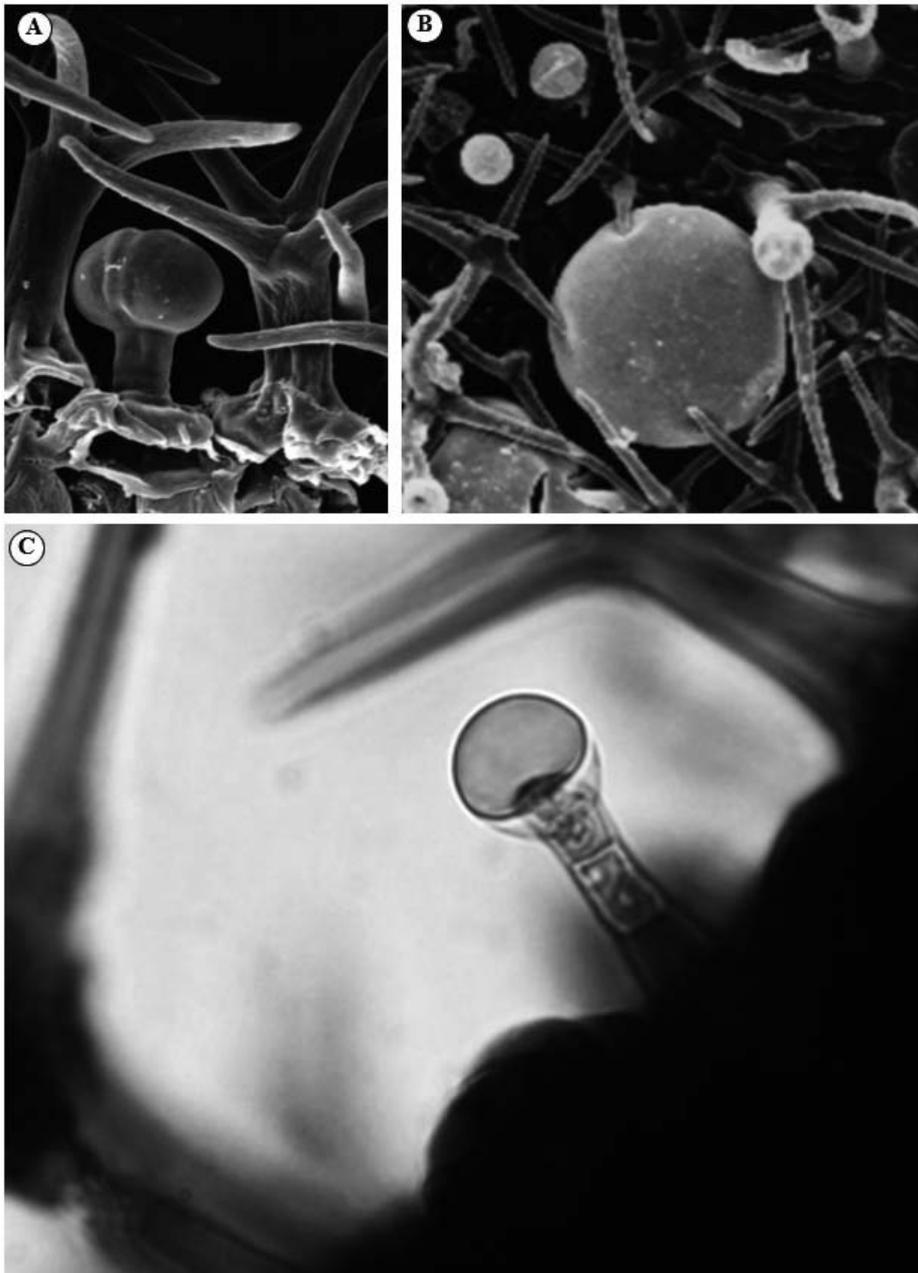


Figura 59 – Estruturas secretoras de *Lavandula*.

No que diz respeito ao sistema de fornecimento dos nutrientes podem-se distinguir os sistemas de cultura contínua abertos e sistemas de cultura contínua fechados. Nos sistemas de cultura contínua abertos a adição de novo meio de cultura é compensada pela colheita de um igual volume de meio contendo células em suspensão. Desta forma, a densidade de células em cultura é mantida a uma taxa relativamente constante e as células mantêm-se uniformes num mesmo estado metabólico. Este sistema é o mais utilizado quando as células são capazes de produzir os metabolitos durante a fase exponencial, sendo mantidas a uma taxa de crescimento subóptimo. Pelo contrário, nos sistemas fechados, as células são mantidas no meio e a adição de um determinado volume de meio é compensada pela eliminação de um volume igual. As células eventualmente removidas com o meio são adicionadas de novo à cultura. Ao contrário dos sistemas abertos, nestes sistemas há um aumento contínuo de biomassa. Estes sistemas são particularmente importantes na extracção de metabolitos que são libertados para o meio de cultura como sejam cumarinas e alguns compostos terpénicos e em situações em que a produção dos metabolitos é atingida na fase estacionária. Finalmente, há a considerar ainda os sistemas de cultura semi-contínuos em que a remoção de um determinado volume de meio é compensada pela adição de um volume equivalente. Nos intervalos entre a substituição de meio quer a densidade celular quer a concentração de nutrientes variam. Deste modo, o crescimento das células em cultura sofre oscilações periódicas variando entre um valor máximo e mínimo que depende da quantidade de meio removido e adicionado e da periodicidade das substituições.

Em algumas situações a produção de metabolitos secundários por células em cultura pode requerer a utilização de dois meios de cultura diferentes. Um meio de crescimento com vista à obtenção de uma população celular uniforme e um segundo meio com o objectivo de produzir o composto de interesse. Esta situação verifica-se porque, em muitas espécies, o crescimento celular e a produção de metabolitos são incompatíveis e as condições de cultura para otimizar os dois aspectos são também diferentes. Por exemplo, em algumas espécies, a inclusão de maiores concentrações de fosfato no meio de cultura é necessário para obter antroquinonas. No entanto, a inclusão das mesmas concentrações em fases de crescimento têm um efeito

inibidor impedindo assim um crescimento eficaz da suspensão. O que é válido para o fosfato pode também aplicar-se a outros componentes do meio. Por exemplo, o 2,4-D, responsável pela estimulação das divisões celulares e pelo alongamento, é inibidor da produção de metabolitos. Outros factores que podem promover o crescimento e afectar a produção de metabolitos secundários são a fonte de carbono, o azoto o sulfato e o cobre bem como os meios base utilizados. Deste modo, para cada tecido e tipo de compostos a produzir as condições de cultura têm que ser optimizadas. Existem no entanto casos em que a utilização de dois meios diferentes não é necessário reduzindo o tempo de cultura e as manipulações celulares.

A produção de metabolitos secundários por células em suspensão está muito dependente da dinâmica de crescimento da suspensão celular (Fig. 56). De uma maneira geral, é nas fases lag e na fase exponencial que a produção de metabolitos secundários é mais reduzida. A produção de quantidades significativas dos metabolitos secundários tem lugar no final da fase exponencial ou durante a fase estacionária. Nesta altura, o crescimento celular é reduzido e as vias metabólicas primárias podem ser direccionadas para o fornecimento de substratos necessários para as vias metabólicas secundárias. Deste modo, os sistemas mais eficazes de produção de metabolitos secundários são aqueles que permitem um crescimento rápido das suspensões levando à obtenção de uma grande biomassa a partir da qual podem depois ser extraídos os compostos.

Como já foi referido alguns metabolitos secundários produzidos *in vitro* podem ser libertados para o meio de cultura. Nestes casos, a sua extracção do meio é relativamente fácil recorrendo-se a técnicas bioquímicas de análise e extracção como sejam espectrofotometria, cromatografia, imunodeteccção, radioimunoensaio, entre outras. No entanto, muitos produtos são produzidos e mantidos no interior das células no citoplasma (e.g. siconina no retículo) ou em compartimentos intracelulares, vulgarmente nos vacúolos (antocianinas, berberina). Nestas situações, é necessário proceder à sua deteccção e extracção ou então favorecer a sua libertação para o meio de cultura. Alguns agentes permeantes têm sido utilizados para favorecer a libertação de compostos químicos para o meio. É o caso do dimetil sulfóxido, um composto frequentemente adicionado às células em cultura de forma

a facilitar a obtenção do composto de interesse. A electroporação das células tem também sido utilizada. Noutras situações é necessário proceder à destruição celular para remover o produto e numa fase ulterior purificá-lo. Nestes casos deve acautelar-se a eventual alteração dos compostos pelos métodos de extracção utilizados.

6.5. Optimização de rendimentos

Várias metodologias têm sido utilizadas com o objectivo de aumentar ou alterar os produtos produzidos *in vitro* tornando assim mais rentáveis as culturas. De entre os procedimentos adoptados destacam-se a adição de precursores, a biotransformação, elicitação e a selecção de linhas mais produtivas.

6.5.1. Adição de precursores

Num certo número de sistemas experimentais, foi observado que as enzimas do metabolismo secundário não operavam às suas taxas máximas porque as concentrações dos precursores estavam presentes em quantidades reduzidas. Assim, um aumento das concentrações intracelulares de determinados precursores, pode levar a um aumento da síntese de determinados compostos secundários. Por exemplo, suspensões celulares de *Datura innoxia* (solanácea) crescidas em meio com ornitina produzem grandes quantidades de escopolamina, um alcalóide, o mesmo sucedendo com suspensões de *Coffea arabica* (cafeeiro) que convertem teobromina em cafeína.

6.5.2. Biotransformação

As reacções de biotransformação (bioconversão) envolvem oxidações, reduções, hidroxilações, metilações acetilações ou glicosilações. O princípio deste processo assenta na capacidade que as células vegetais possuem de

transformar um determinado composto num produto final de elevado valor. Os compostos químicos que podem sofrer transformações pelas células em cultura incluem fenóis, esteróides, alcalóides, terpenos, entre outros. A biotransformação por células vegetais é atractiva sob o ponto de vista económico quando a síntese de determinados compostos químicos não pode ser realizada por síntese química ou por microrganismos. Na tabela 3 estão representados alguns exemplos de biotransformação por células em cultura de diferentes espécies. Um exemplo deste tipo de processo é a obtenção de um derivado da aspirina a partir de culturas celulares de *Mallotus japonica*. As células desta espécie são capazes de adicionar um glicósido ao ácido salicílico originando um derivado que tem uma actividade analgésica mais rápida que a aspirina apresentando ainda uma melhor tolerância gástrica.

A biotransformação é particularmente interessante quando as células que não produzem um composto particular têm a capacidade de o transformar. É o caso da arbutina que não é produzida por células de tabaco mas que estas podem produzir a partir de hidroquinona. Noutras situações, a biotransformação pode levar à síntese de compostos até então desconhecidos. A capacidade das células vegetais modificarem agentes xenobióticos tem sido recentemente alvo de estudos. A manipulação das vias metabólicas envolvidas na modificação destes compostos pode conduzir à obtenção de plantas que possam ser utilizadas na fitorremediação de locais contaminados com determinados produtos químicos, um pouco à semelhança do que já se faz actualmente com base no potencial de algumas espécies de plantas para extraírem metais pesados do solo (capítulo 9).

Tabela 3. – Exemplos de alguns metabólitos secundários biotransformados por células vegetais em cultura (adaptado Ishihara *et al.*, 2003 e Chawla, 2009).

Composto inicial	Espécie	Produto
Catequina	<i>Eucalyptus perriniana</i>	Glicósidos de catequina
Codeinona	<i>Papaver somniferum</i>	Codeína
Digitoxina	<i>Digitalis lanata</i>	Digoxina
Esteviol	<i>Stevia rebaudiana</i>	Esteviósido
Hidroquinona	<i>Nicotiana tabacum</i> (BY-2)	Arbutina
Hidroquinona	<i>Datura</i> spp.	Arbutina
N-flatoil-L-glutamina	<i>Taxus brevifolia</i>	Talidomida
Paclitaxel	<i>Rauwolfia serpentina</i>	10-deacetil taxol
<i>p</i> -hidroxibenzaldeído	<i>Datura stramonium</i>	Gastrodina
Progesterona	<i>Capsicum frutescens</i>	Progesterona dihidroxilada
Salicil aldeído	<i>Varthemia persica</i>	Salicina
Triptamina	<i>Peganum harmala</i>	Serotonina

6.5.3. Elicitação

Muitas plantas respondem ao ataque por fungos ou bactérias através da produção de fitoalexinas no local da infecção. Este mecanismo de defesa tem sido explorado em culturas de células com vista à produção de metabolitos secundários e é designado por elicitação. Elicitadores como homogeneizados de fungos e mesmo sais inorgânicos como sulfato de cobre têm sido utilizados para induzir a formação de produtos secundários. Por exemplo, o tratamento de suspensões celulares de *Papaver somniferum* (papoila-do-ópio) com um homogeneizado do fungo *Botrytis* tem como consequência a acumulação de sanguinarina um composto com actividade antibiótica contra as bactérias que causam formação da placa dentária. Tentativas realizadas com o objectivo de determinar que componente dos fungos seria responsável por esta resposta parecem apontar para a quitina, um constituinte da parede dos fungos. No caso de um outro fungo, *Phytophthora megasperma* o agente elicitor é um β -glucano. Em *Gossypium arboretum* (uma espécie do mesmo género do algodoeiro) a adição de um extracto de *Verticillium*, um fungo parasita das plantas, induz a formação de gossipol, um potencial contraceptivo masculino.

Para além destes elicitores bióticos existem os chamados elicitores abióticos como sejam metais pesados ou o pH. Para além destes, tem-se verificado que uma vasta gama de substâncias tem a capacidade de induzir a formação de metabolitos secundários em culturas de células. Por exemplo, a agaropectina, um composto extraído do agar, induz a produção de siconina em linhas celulares de *Lithospermum erythrorhizon*, uma planta perene nativa do Japão e da China cuja raiz é designada “shikon” na medicina chinesa e que contém o pigmento siconina. Por sua vez, o manitol leva à acumulação de alcalóides indólicos em culturas de células de *Catharanthus*.

O tipo de composto produzido pelas células pode ser dependente do elicitor ou não. Assim, em alguns casos verifica-se que o composto elicitor apenas promove um aumento do produto que era normalmente produzido. Noutros casos, porém, a aplicação de um elicitor conduz ao aparecimento de compostos que não eram produzidos ocorrendo a síntese de novo de novos compostos, um pouco à semelhança do que foi referido no caso da biotransformação.

Em certas circunstâncias a inclusão no meio de cultura de compostos adsorventes, como o carvão activado ou resinas favorece também a produção de metabolitos secundários. Neste caso não se trata de um processo indutivo mas sim o resultado desses compostos poderem adsorver o material evitando assim a sua degradação física por acção de enzimas presentes nas células.

6.5.4. Selecção de linhas celulares

As culturas de células vegetais em suspensão são um sistema ideal para a indução de mutagénese ou para estudos de pressão de selecção utilizando agentes selectivos com vista ao isolamento e multiplicação de linhas celulares com novas características. Nesta última situação as células em cultura são expostas a um composto tóxico sendo seleccionadas as células resistentes. Uma vez que as células estão isoladas ou em pequenos agregados e apresentam uma forte heterogeneidade bioquímica, a indução de mutação numa célula seguida da sua divisão permite obter um clone de células com uma característica particular. Por exemplo, células com níveis mais elevados de produção de compostos fenólicos (ácido rosmarínico) têm sido obtidas após exposição e selecção de linhas celulares (e.g. *Capsicum annuum*) resistentes à *p*-fluorofenilalanina. A mutagénese pode ser conseguida submetendo as culturas a agentes mutagénicos como o composto EMS ou a radiações. Com base neste tipo de ensaios podem ser obtidas linhas celulares com maior capacidade de síntese de determinados compostos ou com a capacidade de biotransformar produtos de baixo valor comercial em químicos de elevado interesse. A obtenção de linhas celulares interessantes pode também verificar-se através da ocorrência de variação somaclonal nas células em cultura, um processo que pode ter diversas causas mas cujo resultado final é a variabilidade genética. Esta é muitas vezes de carácter negativo mas os somaclones podem, por vezes, apresentar características de interesse.

As limitações à selecção de células por este tipo de metodologia são várias. Assim, muitas funções metabólicas (e.g. fotossíntese) não se realizam em cultura. Deste modo, as manipulações celulares estão limitadas àquelas características que são expressas na planta e ao nível celular. Ao contrário das bactérias, as culturas celulares de plantas representam uma população bastante he-

terogénea se não ao nível morfológico pelo menos ao nível bioquímico. Se a mutagénese for induzida, o carácter mutagénico será, com forte probabilidade, muito variável dada a gama de estados fisiológicos que existem numa mesma população. Com frequência, apenas um número muito reduzido de células exprime a característica pretendida. Além disso, só uma pequena percentagem desta população é capaz de divisão celular e dentro desta apenas uma pequena parte é capaz de regeneração com o objectivo de obter plantas com a nova característica.

6.6. Transformação genética de plantas e produção de metabolitos secundários

A transformação genética de plantas será tratada com mais detalhe nos capítulos 8 e 9. No entanto, as vias metabólicas, estando sob o controlo de enzimas, podem em última análise ser manipuladas por modificações nos genes que controlam a síntese dos diferentes intermediários metabólicos numa determinada via de síntese. Em vias metabólicas complexas, onde uma série de reacções decorrem sob a acção de diferentes enzimas a manipulação é difícil pois o produto final, por exemplo, um pigmento, depende de um conjunto prévio de reacções sob o controlo de diferentes genes Trata-se de características poligénicas. No entanto, por vezes, vias metabólicas complexas podem ser manipuladas com vista à obtenção de um determinado produto. Por exemplo, no caso do arroz dourado, foi conseguida a produção de β -caroteno no endosperma de cariopses de arroz, um local onde este composto não é produzido (capítulo 9). A recente obtenção de roseiras capazes de produzir rosas azuis por uma firma japonesa é um outro exemplo de manipulação de vias de síntese complexas, neste caso a produção de pigmentos antociânicos. Em *Catharanthus roseus*, uma planta conhecida pela sua capacidade de produzir metabolitos secundários em culturas celulares, foi conseguida um aumento da produção de alcalóides terpenóides através da sobre-expressão de enzimas da via de síntese destes compostos, em particular da enzima triptofano descarboxilase.

O potencial das células vegetais tem sido usado não apenas para a produção de metabolitos secundários mas também para a obtenção de

outros compostos com importantes aplicações em termos da indústria farmacêutica como sejam vacinas, anticorpos, proteínas animais, hormonas, entre muitos outros, num conjunto de técnicas vulgarmente designadas por “biofarming”. Estes sistemas de produção baseados em células vegetais poderão vir a ser uma alternativa aos sistemas de produção com base em microrganismos. A produção de compostos de natureza proteica é particularmente atractiva estimando-se que mais de 100 proteínas recombinantes diferentes tenham já sido produzidas em plantas com base em técnicas de transformação genética. A principal vantagem das plantas em relação aos microrganismos para a produção de proteínas recombinantes reside no facto das proteínas recombinantes produzidas em procariotas não poderem sofrer modificações pós-translacionais enquanto as células vegetais possuem a capacidade de realizar essa transformação necessária para uma correcta actividade fisiológica.

Como já foi referido, a produção de alguns tipos de metabolitos secundários ocorre apenas em estruturas ou órgãos particulares e nesse caso a sua produção por células em cultura é impossível. As raízes são órgãos particularmente eficazes na produção de metabolitos secundários. Essa situação parece ser o resultado do facto das raízes crescerem no solo onde existe uma grande variedade de microrganismos e onde as células experimentam com frequência diferentes situações de stresse. Tendo em consideração a capacidade das raízes produzirem metabolitos secundários têm sido desenvolvidos sistemas com o objectivo de obter raízes em grande número com vista à sua cultura e ulterior extracção de metabolitos secundários.

Nas plantas, a primeira raiz que se forma resulta da germinação do embrião. Esta raiz pode depois formar raízes laterais as quais, por sua vez, se podem voltar a ramificar dando assim origem ao sistema vascular de uma planta. No entanto, as raízes podem também ser induzidas noutros órgãos através de tratamentos hormonais. Como vimos no capítulo 3 esse é um procedimento adoptado para o enraizamento de rebentos caulinares de forma a obter plantas completas. Em condições experimentais, a formação de raízes pode ser conseguida submetendo as células vegetais a um tratamento com auxina. As raízes assim obtidas podem ser cultivadas em meio líquido em pequena escala ou em biorreactores com vista à extracção de metabolitos secundários.

6.6.1. Produção de metabolitos em *hairy roots*

Um sistema alternativo consiste em infectar as células vegetais com uma bactéria, designada *Agrobacterium rhizogenes* que provoca um fenótipo particular nos tecidos infectados e que se manifesta pela formação de um grande número de raízes muito finas, alongadas, com crescimento plagiotrópico e por vezes muito ramificadas chamadas “hairy roots”. Trata-se, de um processo infeccioso semelhante ao provocado por uma bactéria idêntica muito utilizada na transformação genética de plantas, *Agrobacterium tumefaciens* (capítulo 8). Relativamente a outros métodos de indução de rizogénese, as *hairy roots* têm a vantagem de não necessitarem de exposição às auxinas pois o mecanismo de infecção leva à inserção de genes que controlam a síntese de auxinas no genoma das células infectadas o que conduz à sua proliferação contínua num meio de cultura através da subcultura dos ápices radiculares. Para além disso, as *hairy roots* são muito estáveis em cultura quer do ponto de vista fenotípico como genotípico ao contrário do que se verifica com as raízes obtidas por tratamentos químicos com auxinas.

Tabela 4. – Exemplos de alguns metabolitos secundários produzidos a partir da cultura de *hairy roots* (adaptado de Ishihara *et al.*, 2003; Hu e Du, 2006).

Composto	Espécie	Efeito/aplicação
Artemisina	<i>Artemisia annua</i>	Antimalárico
Hiosciamina	<i>Datura stramonium</i>	Anticolinérgico
Escopolamina	<i>Duboisia muopporoides</i>	Contra o enjoo do movimento
Siconina	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	Anti-inflamatório
Betacianina	<i>Beta vulgaris</i>	Pigmento
Saponinas	<i>Panax ginseng</i>	Tónico
Catarantina	<i>Catharanthus roseus</i>	Síntese de vinblastina
Nicotina	<i>Nicotiana tabacum</i>	Insecticida, antipsicótico
Alcalóides quinolínicos	<i>Cinchona ledgeriana</i>	Antimalárico
Esculetina	<i>Cichorium intybus</i>	Antioxidante
Cardenólidos	<i>Digitalis lanata</i>	Cardiotónicos
Cardenólidos	<i>Digitalis purpurea</i>	Cardiotónicos
Quinonas	<i>Bidens sulphureus</i>	Produção de tintas
Antraquinonas	<i>Polygonum multiflorum</i>	Corantes, repelentes de aves
Antraquinonas	<i>Rubia cordifolia</i>	Serotonina

À semelhança das suspensões celulares as *hairy roots* podem também ser cultivadas em biorreactores com vista à produção em larga escala de compostos químicos. No entanto, devido às suas particularidades, as *hairy roots* necessitam de biorreactores com características mecânicas diferentes

daqueles usados para as células em suspensão. Ainda de maneira similar ao que foi dito para as suspensões celulares, as *hairy roots* podem também realizar a biotransformação de compostos e podem responder à adição de precursores de metabolitos no meio de cultura pelo aumento da síntese do produto final. A aplicação de elicitores estimula também a síntese de metabolitos secundários pelas *hairy roots*. Na tabela 4 indicam-se alguns metabolitos de interesse produzidos por *hairy roots* de várias espécies.

As *hairy roots* têm também sido utilizadas em estudos para avaliar o potencial de fitorremediação de algumas espécies, em ensaios de produção de proteínas recombinantes e ainda na regeneração de plantas. As plantas produzidas a partir de *hairy roots* apresentam um fenótipo característico que se manifesta pela presença de folhas enrugadas, dominância apical reduzida, redução dos entrenós e extrema facilidade dos caules e folhas formarem raízes adventícias.

A cultura de *hairy roots* tem tido uma aplicação crescente apesar de alguns dos problemas que lhe estão associados. Essas limitações resultam do facto de nem todas as plantas serem facilmente infectadas com *A. rhizogenes*, como acontece com as monocotiledóneas, a manifestação de mecanismos de silenciamento dos genes introduzidos, mecanismos de controlo diferentes das mesmas vias metabólicas em espécies semelhantes tornando problemática a generalização de resultados e obrigando a uma optimização sempre que novas espécies ou variedades são testadas. Outro problema reside na ocorrência de variações cromossómicas nas raízes cultivadas ou de outros mecanismos responsáveis pelo aparecimento de variação somaclonal. Uma outra limitação resulta do facto das *hairy roots* constituírem um sistema isolado, no sentido de que não existe uma ligação com outros órgãos como normalmente se verifica numa planta. Esta situação pode resultar em deficiências nutricionais nas raízes que, por sua vez, podem dificultar a produção de determinados compostos. Para além disso, em condições naturais os compostos produzidos na raiz são translocados para outras partes da planta através do sistema vascular. Nas *hairy roots* esta situação não se verifica podendo ocorrer uma acumulação excessiva de compostos que se podem tornar tóxicos para as células. Desta forma, deve fazer-se uma monitorização cuidadosa das condições de cultura para que deficiências dos meios de cultura ou um excesso de metabolitos acumulados nas raízes não afecte o seu desenvolvimento.

Finalmente, deve referir-se que a produção de metabolitos pelas *bairy roots* pode ser otimizada através da co-cultura com outros órgãos, como sejam caules ou folhas. A libertação para o meio de determinados compostos por estes órgãos podem ser necessários para que as raízes consigam produzir determinados metabólitos a taxas mais elevadas. O pressuposto desta metodologia é que os órgãos co-cultivados forneçam compostos que em condições normais seriam transportados até á raiz pelo sistema vascular.

6.7. Produção de metabolitos noutros órgãos

A cultura de rebentos caulinares pode também ser usada para a extracção de metabolitos secundários quando a produção desses metabolitos ocorre em estruturas específicas como tricomas glandulares ou estruturas secretoras internas. Neste caso são necessários sistemas eficazes de micropropagação para que se possa obter uma quantidade importante de biomassa a partir da qual se possa extrair o ou os compostos desejados. Existem ainda metabolitos secundários que são produzidos durante a fase de reprodução, e que em condições naturais se destinam a atrair polinizadores. Algumas plantas possuem a capacidade de florir *in vitro* (Fig. 60) podendo as flores ser utilizadas na extracção de compostos de interesse. A floração *in vitro* pode ocorrer várias vezes por ano ao contrário do que acontece em condições naturais. No entanto, em culturas *in vitro* as flores têm por regra dimensões muito mais reduzidas que as produzidas em condições naturais o que pode ser uma limitação importante. Em determinadas espécies tem sido também referida a possibilidade dos embriões somáticos produzirem compostos de interesse como alcalóides no caso de *Papaver somniferum* ou de ácido linolénico em *Borago officinalis*.

6.8. Sistemas de cultura imobilizados

Para além dos sistemas já mencionados de culturas de células ou órgãos utilizados na produção de metabolitos secundários é ainda possível obter

estes compostos a partir de células imobilizadas. Os suportes utilizados para a imobilização das células são de diferentes tipos. Os primeiros sistemas consistiam na imobilização das células numa matriz gelatinosa de agar, agarose, carragenanos ou alginato. Mais recentemente têm sido utilizados substratos de poliuretano ou matrizes de natureza fibrosa. Proteínas como colagénio, gelatina, fibrina e outros hidratos de carbono como celulose ou quitosano são outros materiais de suporte que têm tido alguma aplicação. Sistemas deste tipo têm permitido, em alguns casos, obter níveis de metabolitos secundários superiores aos obtidos por células em suspensão.

Por exemplo, células imobilizadas de *Capsicum frutescens* produzem quantidades de capsaïcina mais elevadas que células em suspensão. Uma situação semelhante ocorre com a produção de alcalóides tropânicos por células imobilizadas de *Datura innoxia*. As células imobilizadas podem também utilizar-se na biotransformação de metabolitos, à semelhança do observado em sistemas atrás referidos.

Os sistemas de células imobilizadas apresentam algumas vantagens relativamente a outros como sejam um aumento do período em que as células estão na fase estacionária com um aumento consequente da capacidade de produção. A redução dos níveis de arejamento e o aumento da viscosidade do meio, factores limitantes nas culturas em suspensão não ocorrem em células imobilizadas. Como limitações deste método devem referir-se a necessidade de obter as células em suspensão e só depois proceder à sua imobilização a ocorrência de mais uma barreira para a difusão dos produtos de interesse e o facto deste sistema não ser adequado para aqueles casos em que a produção ocorre na fase de crescimento.

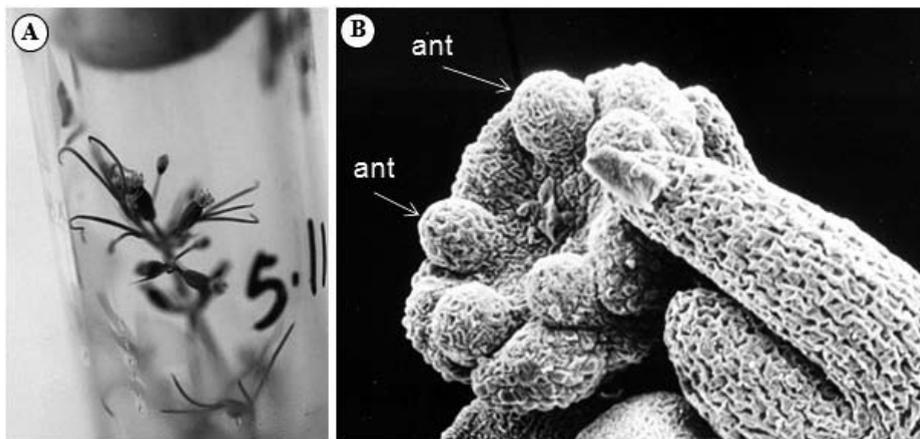


Figura 60 – Flores de cominhos (*Cuminum cyminum*) produzidas *in vitro* a partir de embriões somáticos germinados. A – Planta com flores no interior de um tubo de ensaio. B- fase inicial da diferenciação de uma flor sendo visíveis várias anteras (ant).

6.9. Considerações finais

Embora a utilização de suspensões celulares ou dos métodos alternativos apresente inúmeras potencialidades para a produção de metabolitos secundários, existem ainda algumas contrariedades que é preciso ultrapassar antes desta tecnologia poder vir a ser utilizada de forma mais eficaz. Esses problemas foram sendo apontados ao longo do capítulo e têm a ver com o facto de muitas vezes as células em suspensão não produzirem os mesmos compostos que *in vivo*, com o facto de em cultura não se diferenciarem os tipos celulares responsáveis pela produção de determinados compostos, com a agregação e o tamanho das células que causam o seu afundamento e morte por anoxia e pelo facto dos produtos produzidos não serem facilmente secretados para o meio de cultura tornando a sua extracção difícil.

Com o objectivo de contrariar estas dificuldades e aumentar o rendimento na produção têm sido feitos alguns ensaios sobre diferentes aspectos das culturas. Assim variações na composição hormonal nos meios de cultura podem ser responsáveis por alterações na produção de compostos. De uma maneira geral composições que favorecem o crescimento celular (altas concentrações de auxinas e citocininas) levam a uma diminuição do

teor de compostos, normalmente produzidos na fase estacionária. Outros componentes do meio de cultura como sacarose e a concentração de azoto influenciam também a produção de metabolitos secundários, embora as concentrações óptimas tenham que ser determinadas para cada espécie. Factores físicos como luz, temperatura, pH dos meios e o arejamento condicionam igualmente a resposta.

O custo de produção é também um factor a ter em consideração neste tipo de culturas. A necessidade de equipamento específico (biorreactores, câmaras de cultura), o custo dos nutrientes e das hormonas vegetais bem como a necessidade de mão-de-obra especializada são aspectos importantes quando se pensa numa produção á escala industrial. Embora o valor de mercado de alguns metabolitos secundários seja tentador (cerca de 800.000€/kg no caso da vinblastina) os custos de manutenção e os riscos inerentes a eventuais contaminações das culturas exigem uma criteriosa ponderação sobre a técnica a utilizar.

CAP. 7. PROTOPLASTOS E HIBRIDAÇÃO SOMÁTICA

7.1. Introdução

As células vegetais possuem uma parede celular que é responsável pela sua forma, protecção contra choques osmóticos e manutenção da rigidez. A remoção da parede celular a uma célula vegetal, desde que realizada em condições que evitem o seu rebentamento, conduz à obtenção de células esféricas, designadas por protoplastos (Fig. 61). Para além dessas funções mais óbvias a parede celular é ainda importante como uma barreira física à passagem de moléculas para a célula, é fundamental em mecanismos de reconhecimento e na interacção das células vegetais com organismos simbiotes ou organismos patogénicos, controla o alongamento celular e condiciona a diferenciação celular e o desenvolvimento, é uma barreira contra gentes patogénicos, funciona como um local onde se podem acumular substâncias de reserva e elementos minerais e está envolvida em mecanismos de comunicação celular. Tendo em conta todas estas funções poderá parecer estranho que haja algum interesse na remoção desta estrutura das células vegetais. No entanto, em sistemas experimentais a remoção da parede pode ter algum interesse para estudar os mecanismos de transporte membranar, a interacção da membrana com microrganismos e a própria síntese dos componentes da parede os quais ou são sintetizados na membrana plasmática ou têm que atravessar esta estrutura para poderem ser incluídos na parede. Do ponto de vista de aplicações práticas, a remoção da parede apresenta também vantagens pois a inserção de moléculas como o DNA pode ser facilitada em células às quais a parede foi removida, permitindo

a sua transformação genética (capítulo 8). Para além disso, as células desprovidas de parede podem ser estimuladas a fundir abrindo a possibilidade de fusões entre células de espécies filogeneticamente distantes de forma a ultrapassar as barreiras de incompatibilidade reprodutora e possibilitar a obtenção de novas combinações genéticas.

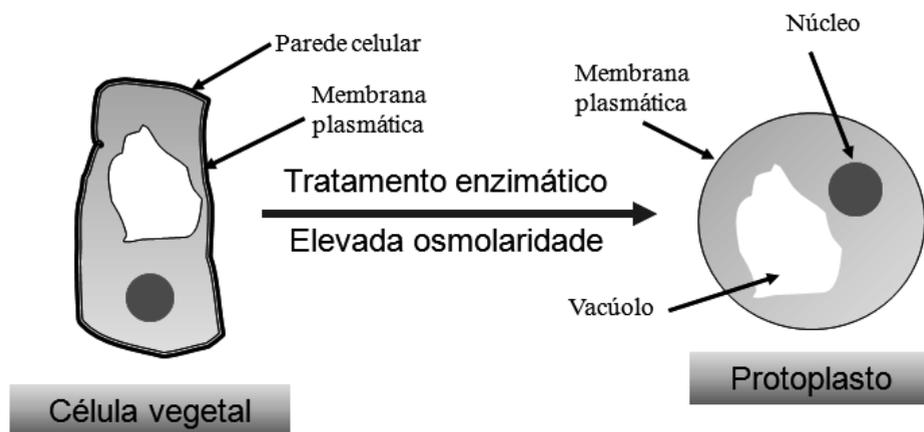


Figura 61 – Esquema geral para a obtenção de protoplastos em células vegetais.

A parede das células vegetais é uma estrutura química e estruturalmente complexa que varia em composição em função dos diferentes tipos celulares que existem nos tecidos das plantas. A lamela média (Fig. 62), rica em pectinas é a zona de contacto entre duas células adjacentes. Interiormente à lamela média, existe a designada parede primária (Fig. 62). Esta parede é em geral fina embora algumas células, como as de colênquima, possam apresentar paredes primárias espessas.

A parede primária é formada durante o alongamento celular, e devido à sua elasticidade permite às células sofrerem algum alongamento. Trata-se de uma estrutura que existe em todos os tipos celulares, desde as células meristemáticas ou parenquimatosas, às células muito lenhificadas do xilema ou do esclerênquima. Em termos químicos, a parede primária é rica em celulose. Esta organiza-se em longas cadeias de celobiose que, por sua vez, se associam em microfibrilhas que estão embebidas numa matriz formada por pectinas e hemiceluloses. Estes são os três principais componentes

da parede primária, aos quais se juntam compostos fenólicos, proteínas estruturais (em muitos casos glicosiladas) e enzimáticas, lípidos e vários elementos minerais. Diversos tipos celulares formam, internamente à parede primária, uma parede secundária (Fig. 62) bastante rígida e que impede o alongamento ulterior da célula. As células envolvidas em funções de suporte, como as fibras e os esclerídeos, ou as células de xilema, sujeitas a tensões elevadas são os tipos celulares onde a parede secundária é comum.

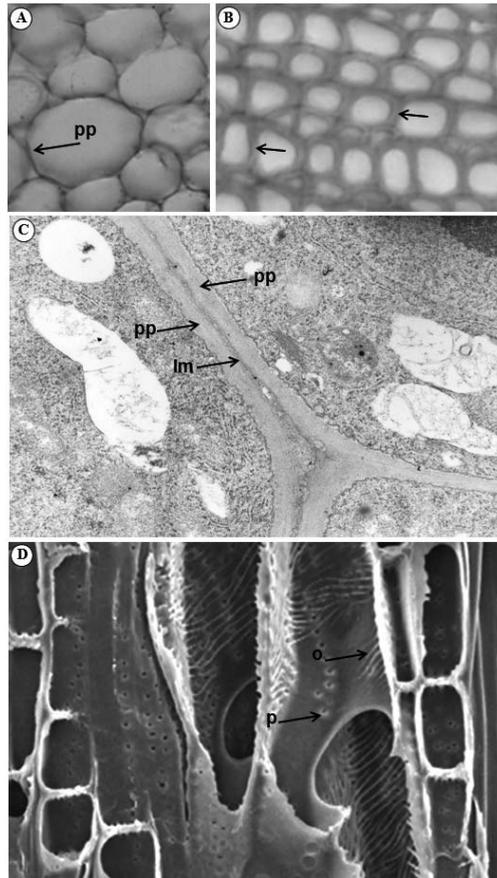


Figura 62 – Diferentes aspectos da parede de células vegetais. A – Paredes primárias (pp) em células de parênquima da raiz. B – Parede secundárias (setas) em células de xilema. C – Zona de contacto entre duas células adjacentes mostrando a lamela média (lm) e a parede primária (pp). D – Células do xilema secundário de *Ailanthus altissima* com pontuações (p) e ornamentações (o) na parede secundária.

A parede secundária é também rica em celulose mas, neste caso, as fibrilhas de celulose estão rodeadas por lenhina, um polímero formado a partir de álcoois aromáticos bastante resistente a substâncias químicas e enzimas. Quando completamente diferenciadas, as células onde a parede secundária existe estão frequentemente mortas, limitando-se às várias camadas de parede secundária que foram antes formadas. Outros tipos celulares podem ainda apresentar inclusões de suberina como acontece nas células do súber ou de cutina como é vulgar nas células epidérmicas.

Do ponto de vista da biotecnologia vegetal, as células a partir das quais interessa obter protoplastos são aquelas que apenas possuem parede primária, como sejam células meristemáticas ou células de parênquima. A remoção da parede implica a destruição ou a remoção dos seus componentes pelo que as células têm que sofrer tratamentos químicos ou mecânicos. Para além disso, estes tratamentos não devem afectar a integridade do citoplasma nem a expressão da totipotência de forma a manter intactas as potencialidades das células em termos de regeneração de plantas. Nas próximas secções são referidos os métodos utilizados na remoção da parede e as aplicações biotecnológicas que este procedimento permite realizar.

7. 2. Breve resenha histórica

Os primeiros procedimentos adoptados para o isolamento de protoplastos faziam uso de métodos mecânicos e foram realizados ainda no século XIX por Klercker (1892) na cebola e em *Stratiotes aloides*. O método consistia em cortar uma folha numa solução de potencial hídrico muito baixo (osmolaridade elevada). De uma forma puramente casual alguns desses cortes removiam parte da parede e possibilitavam a libertação do protoplasto. Este procedimento era moroso, de rendimentos muito limitados e pouco reprodutível. Quase um século depois destes trabalhos pioneiros, Em 1960, Cocking isolou, a partir de raízes de tomateiro, os primeiros protoplastos com base em métodos enzimáticos, fazendo uso de enzimas hidrolíticas as quais degradam os componentes da parede celular. Dez anos depois foram observadas as primeiras divisões em protoplastos

do tabaco (*Nicotiana tabacum*) cultivados *in vitro* por Kao e colaboradores 1970. A partir daqui os sucessos sucederam-se a um ritmo mais elevado, com a obtenção de calos a partir da cultura de protoplastos de tabaco e, ainda nesse ano, o mesmo grupo de investigação conseguiu regenerar plantas de tabaco a partir de calos formados por divisões de protoplastos. Os primeiros híbridos somáticos, resultantes da fusão entre protoplastos de espécies diferentes, foram obtidos através da fusão de protoplastos de *Nicotiana glauca* com *Nicotiana langsdorffii*. Estes híbridos podem também ser formados por hibridação sexual pelo que a sua obtenção através da cultura de protoplastos não era mais do que a verificação em laboratório de cruzamentos que podiam ocorrer na natureza. No final da década de 70 o grupo de G. Melchers no Max Planck Institute (Alemanha) conseguiu, pela primeira vez, a regeneração de híbridos somáticos entre a batateira (*Solanum tuberosum*) e o tomateiro (*Lycopersicon esculentum*), os célebres "pomatoes" ou "topatoes", duas espécies que embora pertencendo à mesma família (Solanaceae), são de géneros diferentes e não hibridizam em condições naturais. Os primeiros sucessos com a regeneração de plantas a partir de protoplastos de gramíneas ocorreram apenas na segunda metade da década de 80 do século passado. Na sequência destes trabalhos pioneiros o isolamento, cultura e regeneração de protoplastos foi conseguido num grande número de espécies, pertencentes aos mais variados grupos taxonómicos. No início dos anos 80 os protoplastos começaram também a ser utilizados como um sistema para a introdução de DNA estranho nas células vegetais tendo sido obtidas as primeiras plantas geneticamente transformadas a partir de protoplastos.

7.3. Isolamento de protoplastos

O isolamento de protoplastos por métodos enzimáticos baseia-se na utilização de enzimas que estão disponíveis comercialmente e que podem ser adquiridas a diferentes companhias. Estas enzimas são normalmente obtidas a partir de fungos como *Aspergillus*, *Rhizopus* e *Trichoderma* mas também de outros organismos como bactérias (*Bacillus polymyxa*) ou ca-

racóis (*Helix pomatia*). Estas enzimas digerem os componentes da parede celular e, consoante o polímero que são capazes de digerir, designam-se por pectinases, celulases e hemicelulases. As pectinas (e.g. macerozima R-10), são responsáveis pela digestão da lamela média que mantém as células ligadas nos tecidos enquanto as celulases degradam a celulose. As hemicelulases são apenas usadas em casos pontuais uma vez que as celulases mais utilizadas (celulase Onozuka R-10 e celulase Onozuka RS) possuem também actividade hemicelulásica. Em alguns casos em que a parede celular tem uma constituição mais específica é necessário aplicar outros tipos de enzimas. Por exemplo, a parede que envolve os produtos resultantes da meiose (tétradas polínicas) na parte masculina da flor é essencialmente constituída por calose. Neste caso particular há necessidade de utilizar calase. Muitas das enzimas utilizadas no isolamento de protoplastos apresentam contaminantes tais como: ribonucleases, proteases, lipases, fenóis e sais. Curiosamente, enzimas muito purificadas dão por vezes rendimentos inferiores que enzimas com um grau menor de purificação, o que sugere que alguns dos contaminantes poderão ter um efeito benéfico no processo de isolamento.

De uma maneira geral, os tecidos a partir dos quais se pretendem obter os protoplastos são seccionados e incubados numa mistura enzimática contendo celulase e pectinase. Como alternativa pode primeiro fazer-se um tratamento com pectinase seguido de um tratamento com celulase. Este método é aplicado menos frequentemente pois requer mais manipulações do material vegetal. Em algumas espécies pode usar-se apenas a enzima driselase que tem simultaneamente actividade celulásica e pectinásica. Os mais variados tecidos vegetais podem ser utilizados para isolar protoplastos. Calos friáveis ou suspensões celulares poderão ser igualmente utilizados mas, neste caso, podem ocorrer anomalias nas plantas regeneradas embora haja a vantagem de não ocorrer grande contaminação pois estes materiais já estão em cultura em condições assépticas. Um sistema ideal consiste no isolamento a partir de calos ou suspensões embriogénicas pois existe a possibilidade dos protoplastos assim obtidos regenerarem plantas mais facilmente por embriogénese somática. As folhas são dos órgãos mais utilizados para o isolamento dos protoplastos. A epiderme da

página inferior é removida e as soluções enzimáticas penetram facilmente no parênquima lacunoso do mesófilo digerindo os componentes da parede. De preferência as folhas devem ser obtidas a partir de plantas a crescer em condições controladas, se possível já em condições de cultura *in vitro*. Como alternativa podem usar-se folhas de plantas em estufa as quais devem sofrer uma descontaminação prévia. Folhas jovens respondem melhor que folhas mais diferenciadas.

Antes de serem submetidos à acção das enzimas hidrolíticas os tecidos dadores são, com frequência, submetidos a um tratamento denominado pré-plasmólise. Este passo consiste em submeter os tecidos a um potencial osmótico baixo de forma a plasmolisar as células. Na sequência deste tratamento a turgescência das células reduz-se e o plasmalema afasta-se da parede celular. A plasmólise pode ser conseguida através da adição de hidratos de carbono como manitol ou sorbitol ou compostos iónicos como CaCl_2 ou KCl . A pré-plasmólise reduz o impacto do choque osmótico aplicado durante o isolamento e impede a entrada de substâncias exógenas prejudiciais para as células. O manitol em concentrações que variam entre 0,3 e 0,7 M é, por norma, o agente osmótico utilizado visto ser metabolicamente inerte. Uma situação semelhante verifica-se com o sorbitol embora algumas espécies de plantas consigam metabolizar este composto.

Após a pré-plasmólise os tecidos são incubados na solução enzimática. A composição das soluções enzimáticas bem como o período de incubação são variáveis (celulase 0,2 - 2%; pectinase 0,1 - 1%). Por norma, quanto maior for a concentração de enzima, menor deverá ser o tempo de exposição. A temperatura a que os tecidos são colocados em contacto com a solução enzimática é também importante. Temperaturas mais elevadas (25- 30°C) devem ser acompanhadas por tempos de exposição mais curtos (3 - 5h) enquanto temperaturas da ordem dos 18-20°C podem ser aplicadas durante a noite. O tipo de material vegetal a utilizar condiciona também o tipo e a concentração das enzimas. Por exemplo, a parede das gramíneas possui um teor muito reduzido em pectinas quando comparada com as paredes das dicotiledóneas. Assim, nas gramíneas, a utilização de apenas uma celulase pode ser suficiente para obter protoplastos. Para além das enzimas, a solução de isolamento deverá conter um estabilizador osmótico (manitol,

sorbitol, sacarose, NaCl) para evitar que os protoplastos rebentem devido à entrada de água, um tampão (MES – 2N-morfolino-etano sulfonato) que minimize as variações de pH e CaCl_2 que estabiliza as membranas. Alguns autores incorporam os sais minerais do meio de cultura onde se vai proceder à cultura dos protoplastos na solução enzimática de isolamento. Durante o isolamento algumas células rebentam e libertam enzimas hidrolíticas e compostos fenólicos que podem afectar a viabilidade dos protoplastos. Para minimizar este efeito, o sulfato dextrano de potássio é frequentemente incorporado na solução de isolamento.

Todo o procedimento experimental deve ser realizado em condições assépticas de forma a evitar a contaminação por fungos e/ou bactérias. As soluções enzimáticas não devem ser autoclavadas pois as elevadas temperaturas inactivam-nas. A esterilização destas soluções deve fazer-se por filtração usando uma malha de 0,22 μm .

7.4. Purificação de protoplastos

Na sequência do tratamento enzimático obtém-se uma mistura de tecido não digerido, células rebentadas, cloroplastos e outros organitos citoplasmáticos, restos de parede e protoplastos. É pois necessário separar os protoplastos dos restantes constituintes, um procedimento designado por “purificação dos protoplastos”. Numa primeira fase, a mistura resultante da digestão dos tecidos pela solução enzimática é passada através de um filtro (40 - 100 μm) metálico ou de *nylon* de forma a reter as células não digeridas e os agregados celulares de maiores dimensões. A solução filtrada contendo os protoplastos e os detritos contaminantes deve ser misturada com um volume adequado de uma solução de sacarose de forma a obter uma concentração final de 15 a 20%. Esta solução é centrifugada a cerca de 100g durante 3 – 10 min. De forma a não destruir os protoplastos. Na sequência da centrifugação os detritos movem-se para o fundo dos tubos devido à sua maior densidade enquanto os protoplastos formam uma banda na zona de transição entre a solução de sacarose e o meio de suspensão dos protoplastos. Esta banda deve ser removida com o auxílio de uma pipeta

de Pasteur para um outro tubo procedendo-se a uma nova centrifugação. As concentrações de sacarose ou outros hidratos de carbono bem como a duração do período de centrifugação e a velocidade utilizada devem ser optimizadas para cada situação pois existem diferenças consideráveis nos rendimentos obtidos com o mesmo material vegetal de diferentes cultivares de uma mesma espécie. No final, os protoplastos são transferidos para o meio de cultura e ressuspensos na densidade adequada para realizar as culturas. Outros métodos têm sido utilizados para a purificação dos protoplastos destacando-se aqueles que fazem uso de gradientes de compostos de elevado peso molecular como Ficoll ou Percoll em vez de sacarose. Depois de purificados os protoplastos podem ser cultivados num meio de cultura adequado. Antes disso deve proceder-se à sua contagem para poder determinar a densidade de cultura. Para além disso, é importante determinar a sua viabilidade. A figura 63 resume os passos necessários para o isolamento e purificação dos protoplastos.

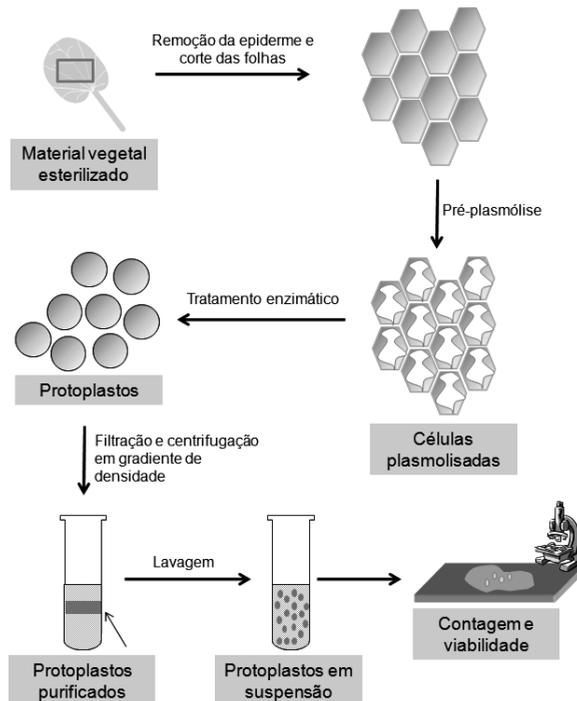


Figura 63 - Esquema representativo do isolamento e purificação de protoplastos.

7.5. Contagem e determinação da viabilidade

230

Depois da obtenção dos protoplastos há dois parâmetros que importa analisar. Por um lado, a determinação do rendimento do processo, ou seja, qual a quantidade de protoplastos obtida a partir do material inicial. Este procedimento visa determinar se a quantidade de protoplastos é adequada para a fase de cultura pois esta implica que os protoplastos sejam cultivados a determinadas densidades. Se a quantidade de protoplastos obtida for reduzida é necessário otimizar os processos de digestão e purificação de protoplastos de forma a aumentar os rendimentos. Se, pelo contrário, a quantidade de protoplastos obtida for muito elevada é necessário diminuir a sua densidade pela adição de meio de cultura. A contagem dos protoplastos pode ser facilmente realizada utilizando um hemocitómetro, extrapolando-se os valores obtidos para o volume total de meio onde se encontram os protoplastos. Deste modo, é possível calcular o rendimento do processo tendo em consideração a quantidade de tecido original e o número de protoplastos obtidos. Se o material de partida for uma suspensão celular o rendimento pode ser calculado em função do número de células presente na suspensão. Caso não seja possível utilizar um hemocitómetro, podem fazer-se várias contagens num determinado volume de meio onde se encontram os protoplastos e calcular um valor médio.

Antes de proceder à cultura dos protoplastos deve-se determinar se os protoplastos obtidos são viáveis ou não pois não faz sentido cultivar protoplastos que não tenham capacidade de divisão. Um indicador muito fiável da viabilidade dos protoplastos está relacionado com a forma como os cloroplastos estão distribuídos na célula. Em protoplastos viáveis, os cloroplastos distribuem-se uniformemente na célula enquanto em células mortas eles têm tendência a depositar por acção da gravidade (Fig. 64). Deste modo, e se o material de origem for rico em células com cloroplastos, como acontece com as folhas, uma simples observação ao microscópio permite ter uma ideia da viabilidade dos protoplastos obtidos. No entanto, existem métodos mais precisos e que permitem determinar de forma mais objectiva a viabilidade. Um desses métodos baseia-se na capacidade que os protoplastos possuem de pouco tempo depois de removida a parede

celular começarem a edificar uma nova parede. Como já foi referido, a parede celular é rica em celulose. A aplicação de um composto que se ligue às moléculas de celulose permite visualizar a síntese de uma nova parede. Esse composto é o “calcofluor white” e a sua mistura com uma solução onde se encontram os protoplastos e ulterior observação num microscópio de fluorescência utilizando radiação ultra-violeta permite detectar os protoplastos viáveis pela formação de um anel de fluorescência branco azulada que envolve as células (Fig. 64). Em células não viáveis em que a síntese de parede não ocorre, não se verifica emissão de fluorescência.

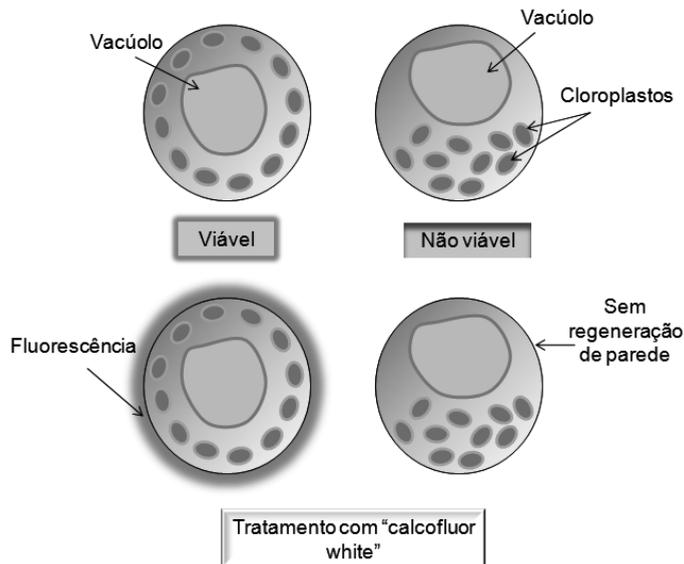


Figura 64 – Verificação da viabilidade dos protoplastos. Em cima estão representados dois protoplastos, em que a distribuição dos cloroplastos é diferente em função da viabilidade celular. Nas duas figuras de baixo está representada a regeneração e detecção da parede com o fluorocromo “calcofluor white”.

Um outro método baseado na emissão de fluorescência faz uso do diacetato de fluoresceína, uma técnica já referida anteriormente para a determinação da viabilidade de microsporos ou de células em suspensão. Neste caso, o princípio é o mesmo e, após tratamento com FDA (0,01%, dissolvida em acetona) e observação num microscópio de fluorescência, apenas os protoplastos viáveis emitem uma fluorescência amarelo-esverdeada.

Corantes como a feno-safranina (0,01%) ou o azul de Evans permitem obter uma coloração diferencial das células. No caso destes corantes os protoplastos viáveis não apresentam coloração enquanto as células mortas se apresentam coradas.

A observação dos movimentos de ciclose, modificações no tamanho dos protoplastos como resposta a variações de potencial hídrico do meio ou a análise da distribuição dos cloroplastos utilizando microscopia de fluorescência para detectar a autofluorescência (vermelha) da clorofila podem também ser usados como indicadores da viabilidade celular.

Métodos baseados na actividade metabólica dos protoplastos através da medição do consumo de oxigénio ou da actividade fotossintética podem também ser usados mas são de aplicação mais difícil pois requerem equipamento muito específico.

A viabilidade dos protoplastos permite verificar se as condições de isolamento e purificação dos protoplastos são as ideais. Caso a viabilidade seja reduzida é necessário proceder a alterações no procedimento experimental que permitam aumentar os níveis de células viáveis. No entanto, como tem sido referido por vários autores, a prova final da viabilidade dos protoplastos é a capacidade que eles possuem de dividir quando cultivados num meio adequado com o objectivo de regenerar plantas.

7.6. Cultura de protoplastos

Um factor importante nos meios de cultura de protoplastos é a concentração de hidratos de carbono. Numa fase inicial da cultura os protoplastos devem ser cultivados em meios com osmolaridades elevadas de forma a evitar uma absorção excessiva de água e o seu rebentamento. Podem utilizar-se estabilizadores osmóticos metabolicamente activos (e.g. glicose ou sacarose) juntamente com outros metabolicamente inactivos (manitol ou sorbitol). Nesta situação, os primeiros vão sendo progressivamente digeridos durante as divisões iniciais dos protoplastos o que tem como resultado um aumento gradual do potencial hídrico do meio. Deste modo, evita-se que as células regeneradas sejam sujeitas a choques osmóticos ao serem transferidas para

o meio de crescimento onde a concentração de hidratos de carbono não metabolizáveis pode ser reduzida ou esse tipo de compostos ser mesmo eliminado do meio para permitir um crescimento mais eficaz das massas celulares e ulterior diferenciação.

Os meios utilizados para a cultura de protoplastos não diferem muito dos que se utilizam noutros sistemas de cultura *in vitro* embora, com alguma frequência, sejam mais ricos em vitaminas e aminoácidos. O meio MS é usado com frequência mas outros meios base têm dado também bons resultados. Modificações deste meio incluem a utilização de baixas concentrações de amónio ou mesmo a sua eliminação e elevadas concentrações de cálcio (2 - 4x a concentração normal). Outros catiões como o zinco e o ferro devem também ser usados a concentrações mais reduzidas. Tal como já foi referido noutras circunstâncias, o meio de cultura deve ser otimizado para cada situação. Um factor que pode condicionar o sucesso da cultura é a densidade dos protoplastos. Em geral, a densidade situa-se entre valores de 5×10^3 a 5×10^5 células/ml. No entanto, em espécies recalcitrantes, densidades mais elevadas, da ordem dos 10^6 ou mesmo superiores podem ser necessárias. Densidades muito elevadas podem levar a mecanismos de competição entre as células e, para além disso, tornam difícil seguir a evolução dos protoplastos em fases mais adiantadas da cultura pois as colónias resultantes de protoplastos próximos podem sobrepor-se. Por outro lado, uma densidade elevada de alguma forma parece estimular as divisões celulares. Os meios de cultura possuem também na sua composição reguladores de crescimento, sendo os mais comuns as auxinas e as citocininas. São estes compostos que vão estimular a divisão celular e a obtenção de calos a partir dos quais ocorre a regeneração de plantas.

Os protoplastos podem ser cultivados em meios sólidos ou líquidos. No primeiro caso os protoplastos são embebidos num gel de agar, alginato ou agarose, sendo este último composto mais frequência devido ao seu maior grau de pureza. As culturas em agarose são realizadas misturando iguais volumes da solução contendo os protoplastos (a uma densidade dupla da densidade final pretendida) e da solução de agarose preparada com o dobro da concentração prevista. Após autoclavagem da solução de agarose e redução da temperatura para cerca de 40°C , as duas soluções são misturadas

no recipiente de cultura, numa camada fina, por norma em caixas de Petri de pequenas dimensões (5 cm de diâmetro) ou em placas de cultura com vários buracos, o que permite testar diferentes parâmetros. Em alternativa, os protoplastos podem ser cultivados em meio sem agarose. Com alguma frequência os protoplastos em meio líquido são cultivados sobre um meio gelificado com agarose. Uma variante deste último procedimento consiste em cultivar os protoplastos sobre uma membrana porosa colocada sobre culturas de calos ou de outros explantes em meio gelificado. Estas culturas são designadas “nurse” e os compostos produzidos pelos tecidos em cultura fornecem os nutrientes necessários para os protoplastos dividirem.

Outras técnicas de cultura dos protoplastos incluem a cultura em gotas suspensas em que pequenos volumes de meio de cultura de protoplastos são colocados na face inferior da tampa de uma caixa de Petri e estas colocadas sobre caixas contendo uma solução de sacarose ou água esterilizada para manter a humidade. Os protoplastos podem também ser inicialmente incluídos num gel ou em esferas de alginato de sódio após o que, secções do gel ou as esferas de alginato são colocadas num meio líquido apropriado à indução de visões celulares.

7.7. Evolução das culturas

Uma vez realizadas as culturas importa agora analisar o comportamento dos protoplastos (Fig. 65) e a maneira como respondem às condições testadas. Alguns parâmetros podem ser analisados com o objectivo de determinar a eficácia do método. Assim, como já foi referido, após isolamento e cultura, os protoplastos começam a sintetizar uma nova parede celular. Essa síntese é acompanhada por uma alteração na forma das células que inicialmente eram esféricas e adquirem contornos mais irregulares. Deste modo, após 3-4 dias de cultura, pode determinar-se o índice de deformação celular dividindo o número de células deformadas sobre o número total de células multiplicado por 100. Nas primeiras fases de cultura pode igualmente determinar-se a viabilidade das células através dos métodos anteriormente referidos. A primeira divisão nos protoplastos (Fig. 65) ocorre em geral entre 2 – 7

dias de cultura, variando este período com as espécies, tipo de protoplastos e condições de cultura. Assim, após 7 – 10 dias pode fazer-se uma primeira avaliação do índice de protoplastos em que ocorreu divisão. Eficiências de cultura da ordem dos 20-30% são consideradas muito promissoras. A continuação das divisões celulares origina microcalos (Fig. 65) formados por um reduzido número de células. Nos casos em que a proliferação celular é intensa é necessário adicionar meio fresco às culturas para evitar a necrose das células resultante de eventuais deficiências em nutrientes. Quando os calos começam a ser visíveis à vista desarmada (cerca de 1mm), após cerca de 4-7 semanas de cultura, devem ser isolados e transferidos para meio fresco para que o seu desenvolvimento possa prosseguir.

A regeneração de plantas a partir de protoplastos pode ocorrer por organogénese ou por embriogénese somática. De uma maneira geral, a formação de plantas a partir de protoplastos ocorre após passagem por uma fase de calo. As situações em que um protoplasto pode originar directamente um embrião somático sem se formar um calo intermédio são muito raras. Assim, uma vez obtidos calos com as dimensões adequadas é necessário aplicar os estímulos hormonais adequados à formação de rebentos caulinares ou de embriões somáticos.

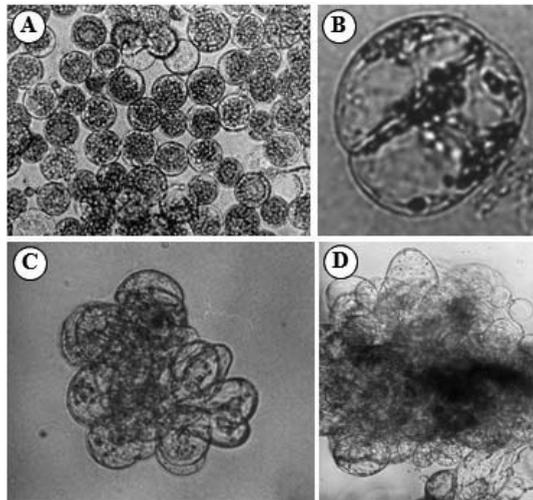


Figura 65 – Protoplastos e fases iniciais da sua divisão. A – Protoplastos após o isolamento. B – Primeira divisão de um protoplasto. C e D – Colónias de células derivadas de um único protoplasto formando microcalos. (Fonte: Manuel Tomé).

Tratamentos com a auxina 2,4-D para a indução de embriogénese ou combinações de auxinas com citocininas para a formação de meristemas caulinares adventícios são os tratamentos mais vulgarmente aplicados. A regeneração por embriogénese somática é preferível à organogénese uma vez que as estruturas formadas apresentam um pólo caulinar e radicular não sendo necessário o enraizamento de rebentos caulinares. No entanto, este processo é também aquele que ocorre mais raramente.

A partir da formação dos rebentos caulinares ou dos embriões somáticos, os processos de obtenção de plantas seguem as orientações indicadas nos capítulos 3 e 4, quando estes tipos de morfogénese foram analisados. A regeneração de plantas a partir de protoplastos é um processo moroso que não é utilizado para a clonagem de plantas *in vitro* pois existem técnicas mais eficazes de clonagem de plantas que já foram referidas em capítulos anteriores. Os protoplastos são utilizados para a realização de estudos mais específicos, relacionados com a transformação genética de plantas ou com a fusão de protoplastos de espécies ou variedades diferentes para obtenção de novas combinações genéticas.

A figura 66 representa, de forma esquemática, o processo de formação de plantas a partir da cultura de protoplastos.

7.8. Fusão de protoplastos

Os protoplastos obtidos de espécies ou variedades diferentes podem ser usados para a criação de híbridos somáticos e obtenção de plantas com novas características ultrapassando assim as barreiras de incompatibilidade que limitam os cruzamentos por reprodução sexuada entre espécies diferentes. A hibridação somática requer a obtenção de protoplastos de dois genótipos distintos de acordo com os métodos previamente descritos e um sistema que permita a fusão, selecção das células híbridas e regeneração de plantas a partir dos produtos de hibridação.

A fusão de protoplastos pode ocorrer de forma espontânea ou os protoplastos podem ser estimulados a fundir através da aplicação de determinados estímulos. A função espontânea ocorre a taxas muito baixas pelo que não

é eficaz em ensaios em que é necessário obter um número considerável de produtos de fusão para que as fases ulteriores do processo possam prosseguir.

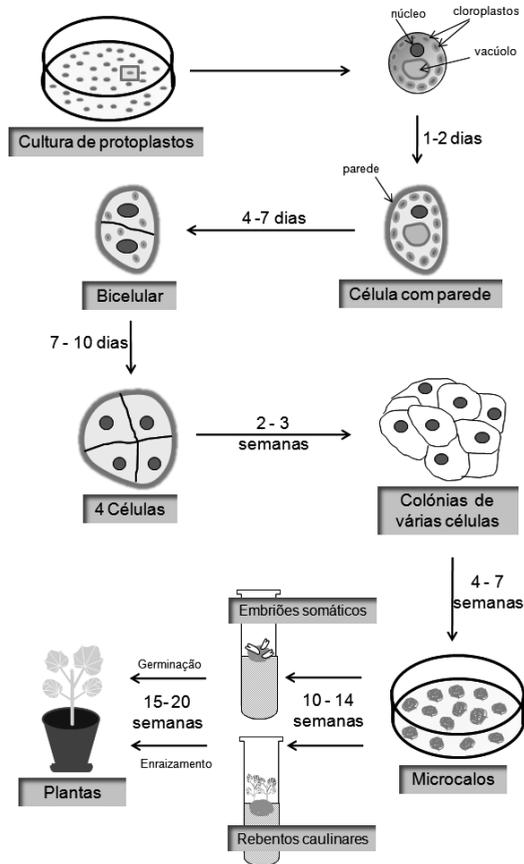


Figura 66 – Esquema representativo da regeneração de plantas por cultura de protoplastos. Os períodos referidos para o final de cada fase são apenas indicativos variando com a origem dos protoplastos e as condições de cultura.

Um dos métodos utilizados na fusão de protoplastos é a fusão mecânica. Neste caso os protoplastos são induzidos a fundir através da sua aproximação. Com o auxílio de micropipetas, e sob observação num microscópio de platina invertida, dois protoplastos são colocados em contacto. Este método é muito moroso, de rendimentos limitados e requer equipamento laboratorial muito específico pelo que a sua utilização é reduzida.

Outro método faz uso de substâncias que promovem a fusão membranar sendo por isso chamadas fusigénicas. Este método foi o primeiro a ser aplicado para a fusão de protoplastos em larga escala. O composto que se utilizou nos primeiros ensaios foi o nitrato de sódio mas este composto revelou-se tóxico para as células. Outras soluções salinas com potencial fusigénico são as soluções de cloreto de potássio, cloreto de sódio e nitrato de potássio. Ulteriormente fizeram-se ensaios de fusão em meios com elevados valores de pH (10,5) e elevadas concentrações de cálcio. Outros compostos que também têm sido utilizados são o álcool polivinil (PVA), o dextrano de potássio, concavalina A e a lisolecitina. Actualmente, utiliza-se com frequência o polietilenoglicol (PEG), um polímero de elevado peso molecular que aglutina os protoplastos e estabelece uma espécie de ponte molecular entre as membranas plasmáticas de dois protoplastos adjacentes os quais acabam por fundir. O PEG contraria o efeito provocado pelo grande número de cargas negativas (devidas aos grupos fosfato e proteínas membranares) que existem à superfície das células e que faz com que estas tenham tendência a repelir-se. O PEG é um polímero disponível sob a forma de diferentes pesos moleculares. O mais comum é a utilização de PEG com um peso molecular entre 1500 e 6000 em concentrações que variam entre 30 e 60%. PEG com um peso molecular superior a 6000 torna as soluções muito viscosas enquanto pesos moleculares muito baixos não promovem a fusão. O tratamento com PEG fornece melhores resultados se, após tratamento com este composto, os protoplastos foram colocados em contacto com uma solução de lavagem contendo elevadas concentrações de cálcio e valores de pH elevados (9 -11) para estimular o processo de fusão. Este decorre após se misturar de forma equitativa (1:1), e a densidades apropriadas (0,5 a $1,0 \times 10^6$ protoplastos/ml), as duas suspensões de protoplastos a partir das quais se pretende obter os produtos de fusão. A principal vantagem da fusão química é a sua simplicidade de aplicação, não sendo necessário qualquer equipamento específico para promover a fusão celular.

A fusão de protoplastos pode realizar-se aplicando aos protoplastos uma corrente eléctrica. Este método implica duas fases, uma em que os protoplastos são colocados em contacto e uma segunda em que se estimula a fusão membranar. O processo inicia-se com a aplicação de uma corrente

alternada (AC) de alta frequência (cerca de 1 MHz) e reduzida voltagem (50 – 100 V/cm) num campo eléctrico criado entre dois eléctrodos. Este tratamento elimina as correntes negativas localizadas à superfície dos protoplastos e estes passam a comportar-se como dipolos eléctricos, migrando para as regiões vizinhas dos eléctrodos apresentando uma zona carregada negativamente e outra positivamente. Este efeito é chamado dieléctrico e tem como consequência o alinhamento das células ao longo das linhas de campo. O aspecto que os protoplastos passam a apresentar é conhecido como “colar de pérolas” devido à forma como ficam alinhados (Fig. 67) e permite a aglutinação dos protoplastos necessária para que a fusão possa ocorrer. O segundo passo deste processo de fusão consiste em submeter os protoplastos alinhados a uma corrente contínua (DC) por curtos períodos (20 – 50 microsegundos) e elevada voltagem (3 KV/cm). Este tratamento abre poros transitórios na membrana sem danificar definitivamente as membranas ou os organitos celulares. Os poros são reversíveis e o seu fecho permite a fusão e reorganização de membranas de células diferentes levando à sua fusão (Fig. 67). A adição de cálcio ao meio aumenta a eficiência do processo. O sistema mais comum neste tipo de fusão utiliza uma câmara de electrofusão equipada com vários eléctrodos paralelos. O sistema é colocado num caixa de Petri onde se encontram os protoplastos e a observação dos efeitos das correntes aplicadas é seguida num microscópio de platina invertida. Este método é fácil de aplicar e muito rápido são sendo necessárias grandes manipulações dos meios em que se encontram os protoplastos. Além disso, não existe o perigo de toxicidade como quando se utilizam compostos químicos. A principal dificuldade reside no facto de ter de se utilizar equipamento específico. Com este método podem obter-se rendimentos da ordem dos 20% em termos de produtos de fusão enquanto com PEG esses valores são, com frequência, inferiores a 1%.

7.9. Produtos de fusão

Na sequência da aplicação dos métodos estimuladores da fusão de protoplastos os produtos de fusão obtidos apresentam uma grande diversidade

podendo ocorrer fusões entre protoplastos iguais ou diferentes. À exceção da fusão mecânica, em que se pode estimular a fusão de protoplastos de forma controlada, nos outros métodos a fusão verifica-se de forma aleatória e, para além da fusão entre dois protoplastos, podem também obter-se fusões múltiplas se envolverem mais de dois protoplastos. A fusão entre duas células não implica necessariamente a fusão dos respectivos núcleos. No entanto, a formação de um núcleo híbrido é absolutamente necessária para que se verifique hibridação somática. De acordo com o que foi referido, quando protoplastos de duas espécies (A e B) são induzidos a fundir os produtos de fusão podem ser (Fig. 68):

- Fusão de protoplastos A x A (homocarions, núcleos iguais).
- Fusão de protoplastos B x B (homocarions, núcleos iguais).
- Fusão de protoplastos A x B sem fusão nuclear (heterocarions, núcleos diferentes).
- Fusão de protoplastos A x B com fusão nuclear (híbridos somáticos).
- Fusão de protoplastos A x B mas em que o núcleo de um dos protoplastos é segregado. O resultado é um protoplasto com o núcleo de um dos progenitores e um citoplasma híbrido (cíbridos ou híbridos citoplasmáticos).

Os híbridos somáticos são os produtos de fusão mais interessantes pois permitem obter combinações que não se encontram na natureza. Além disso, os híbridos somáticos obtidos por fusão de protoplastos entre duas espécies são diferentes dos híbridos sexuais obtidos por cruzamento entre essas mesmas espécies. Assim, num híbrido obtido por via sexual ocorre mistura dos genomas dos progenitores mas os genes do citoplasma (presentes em mitocôndrias e cloroplastos) são, na maioria das espécies, herdados do progenitor feminino. Num híbrido somático, para além de haver mistura de genomas nucleares, os genes citoplasmáticos são provenientes dos dois progenitores. Pode no entanto acontecer que os organitos celulares de um dos progenitores, após divisões sucessivas possa ser eliminado. Neste caso temos um híbrido somático que possui apenas o genoma citoplasmático de um dos progenitores.

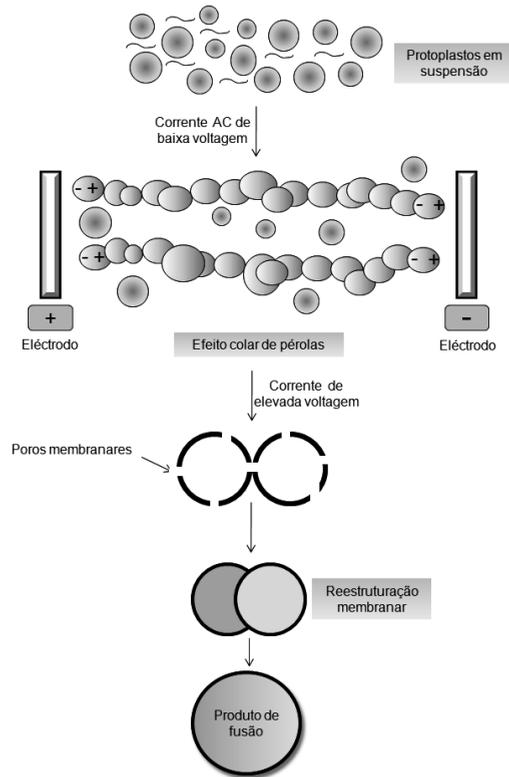


Figura 67 – Principais passos no mecanismo de fusão eléctrica de protoplastos.

Os cíbridos podem também revelar-se interessantes do ponto de vista agronómico. A segregação de um dos núcleos nos produtos de fusão pode ser obtida espontaneamente. No entanto, esta situação ocorre a taxas muito reduzidas. Assim, a obtenção de cíbridos requer a aplicação de procedimentos específicos como sejam a utilização de protoplastos sem núcleo (citoplastos) ou a eliminação de um dos núcleos após a fusão. Ensaio deste tipo permitem a obtenção de linhas aloplásmicas, ou seja possuindo um núcleo de uma linha num citoplasma estranho de outra linha. Esta situação permite combinar o genoma nuclear de um progenitor com o genoma citoplasmático de outro. Por métodos clássicos, as linhas aloplásmicas podem ser obtidas através de retrocruzamentos (“backcrosses”) sucessivos entre os híbridos e a linha que funciona como progenitor feminino. Embora, em termos comparativos, o genoma citoplasmático seja uma fracção muito

reduzida do genoma total (10^{-3} a 10^{-4}) com esta técnica podem transferir-se potencialidades do genoma citoplasmático de umas linhas/espécies para outras. Uma das características interessantes é a resistência ao herbicida atrazina codificada pelo genoma cloroplastidial. Outra é a obtenção de linhas CMS ("cytoplasmic male sterility") que não produzem pólen viável, sendo funcionalmente femininas. Neste caso, a característica é determinada por genes mitocondriais. Estas plantas são importantes quando se pretendem obter híbridos pois não há necessidade de proceder a uma polinização artificial, basta possuir uma linha CMS e uma linha normal lado a lado. Todas as sementes produzidas pelas plantas CMS serão de natureza híbrida. Muitas vezes o problema neste tipo de ensaios é a manutenção da característica CMS nos híbridos obtidos.

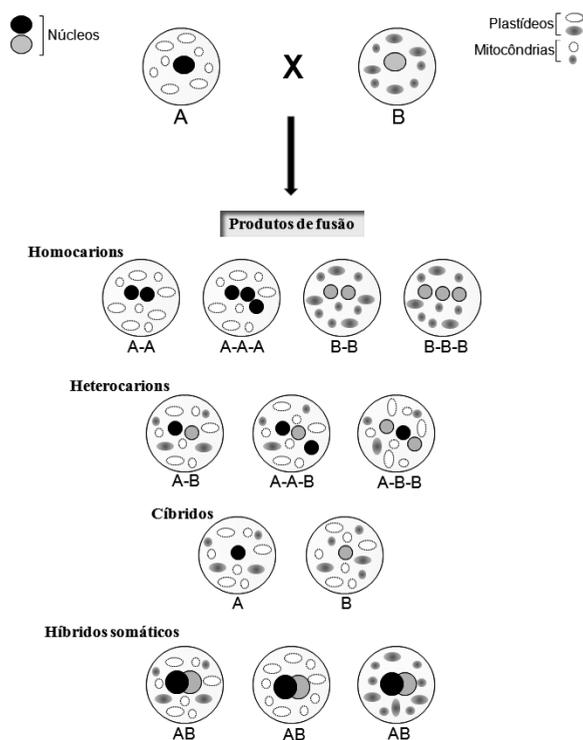


Figura 68 – Produtos resultantes da fusão de dois tipos diferentes de protoplastos A e B. Os híbridos somáticos estão representados pela designação AB enquanto A-B se refere à fusão celular mas não há fusão nuclear (adaptado de Sihachakr e Haïcour, 1995).

Finalmente, deve referir-se que a fusão de protoplastos de um mesmo tipo pode permitir a obtenção de plantas tetraplóides cuja produtividade pode ser mais elevada ou que podem ser usadas como porta-enxertos ou em cruzamentos com diplóides de forma a obter híbridos triplóides os quais, em algumas espécies, têm a capacidade de produzir frutos sem sementes (partenocárpicos).

7.10. Selecção dos produtos de fusão e caracterização das plantas obtidas

A selecção dos produtos de fusão de protoplastos, em particular dos híbridos somáticos é absolutamente essencial para o sucesso desta técnica. No conjunto das duas populações de protoplastos que foram colocadas em contacto para ocorrer fusão, o número de células não fundidas e o número de homocarions é largamente superior ao número de protoplastos híbridos (<5% da população celular). Importa pois dispor de um sistema que permita uma eficaz selecção das células de interesse. Na realidade, se não existir um método eficaz que permita seleccionar os híbridos somáticos em fases precoces do seu desenvolvimento, os passos restantes do processo podem ficar seriamente comprometidos. Infelizmente, não existe um método universal que permita fazer este tipo de selecção e os métodos disponíveis têm que ser adaptados às características das espécies a partir das quais os protoplastos são obtidos.

Os métodos actualmente existentes para identificar as células híbridas podem dividir-se em três grupos: 1) baseados na observação de características visuais, 2) complementação fisiológica para determinados compostos ou 3) complementação genética para mutações recessivas. Existem ainda situações pontuais em que as células híbridas podem apresentar novas particularidades que permitam a sua fácil selecção. Por exemplo, nos híbridos somáticos entre *Nicotiana glauca* e *Nicotiana langsdorffii* os tecidos possuem a capacidade de proliferarem *in vitro* na ausência de auxinas enquanto os tecidos dos progenitores requerem a presença deste tipo de hormonas para proliferarem. Deste modo, a cultura dos protoplastos, após tratamentos de fusão, em meios sem hormonas permite seleccionar os protoplastos híbridos já que apenas estes dividem.

No que diz respeito às características visuais este é o método mais eficaz para seleccionar os híbridos mas também o que requer mais esforço sendo os rendimentos reduzidos. Neste método, protoplastos com colorações diferentes, por exemplo protoplastos foliares com cloroplastos e protoplastos de calos ou de suspensões celulares contendo amiloplastos são utilizados no processo de fusão. Com o auxílio de um micromanipulador e de um microscópio de platina invertida os protoplastos resultantes da fusão podem ser isolados e separados dos restantes. Uma alternativa a este método consiste em tratar os dois tipos de protoplastos que se pretende fundir com fluorocromos distintos, por exemplo isotiocianato de fluoresceína (FITC) e isotiocianato de rodamina (RITC). O primeiro leva à emissão de uma fluorescência esverdeada enquanto o RITC faz com que as células emitam fluorescência na banda do vermelho. Um microscópio de fluorescência com micromanipulador permite a selecção das células híbridas cuja fluorescência é amarelada. De maneira mais sofisticada pode-se utilizar um citómetro de fluxo equipado com um sistema laser que permite separar os diferentes tipos celulares com base na fluorescência emitida. A maior dificuldade com estes métodos consiste em manter as condições assépticas e em evitar que os compostos utilizados interfiram com as fases seguintes de divisão celular.

No tabaco foi possível isolar protoplastos com base na ocorrência de uma mutação auxotrófica em ambos os progenitores. Existem linhas de *Nicotiana tabacum* incapazes de crescer em meio de cultura contendo nitrato como a única fonte de azoto. Esta deficiência resulta do facto da enzima nitrato reductase não ser funcional. Deste modo as células são incapazes de formar nitrito e de o converter em amónio. O cruzamento de duas linhas auxotróficas de tabaco incapazes de produzir nitrato reductase funcional mas afectando genes diferentes (nia- afecta a apoenzima, cnx⁻ o cofactor) permite, por complementação, obter protoplastos híbridos capazes de sobreviver num meio de cultura contendo apenas nitrato como fonte de azoto. Pelo contrário, os protoplastos dos progenitores ou os homocariões são incapazes de sobreviver no mesmo meio de cultura.

Na cenoura existem linhas celulares que permitem seleccionar os protoplastos híbridos com base na complementação genética para mutações recessivas. Essas linhas são chamadas hibridizadores universais (linhas

celulares ou plantas com uma mutação dominante: resistência a um determinado inibidor e uma mutação recessiva: auxotrofismo - mutação em que as células não conseguem sintetizar um determinado composto essencial ao seu desenvolvimento tendo esse composto que ser fornecido ao meio de cultura). Na cenoura existe uma linha celular que possui, simultaneamente, uma mutação dominante que lhe permite resistir à amanitina e uma mutação auxotrófica recessiva em que as células necessitam para o seu crescimento do meio HAT (hipoxantina, aminopeterina, glicina e timidina). Da fusão de protoplastos desta linha celular duplamente mutante com protoplastos de uma linha normal obtêm-se produtos de fusão que são resistentes à amanitina e que não necessitam do meio HAT para dividirem. A selecção faz-se procedendo à cultura, após fusão, num meio com amanitina e sem HAT (Fig. 69). A grande limitação destes métodos reside no facto da sua aplicação estar limitada àquelas espécies em que mutações deste tipo estão identificadas. Na grande maioria das espécies, em particular naquelas mais interessantes do ponto de vista económico, não existem linhas mutantes que permitam este tipo de selecção.

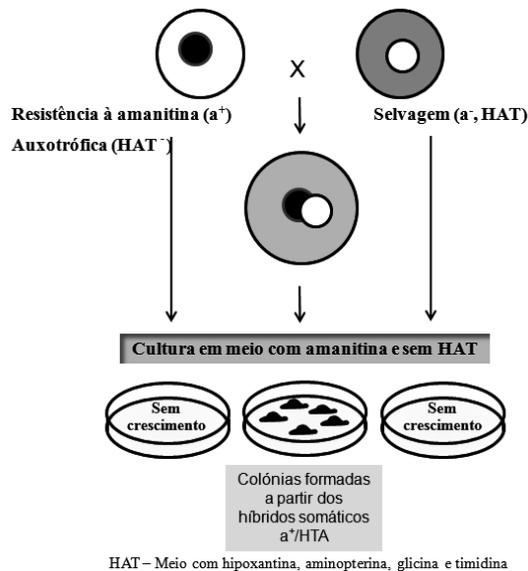


Figura 69 - Selecção de protoplastos híbridos na cenoura com base na utilização de hibridadores universais (baseado em Morikawa e Yamada, 1992).

A selecção dos produtos de fusão é apenas um primeiro passo no objectivo geral de obtenção de híbridos somáticos. Em seguida é necessário assegurar que essas novas combinações citológicas proliferam em meios de cultura apropriados e que são capazes de formar plantas. A análise das plantas obtidas e a comprovação do carácter híbrido pode ser realizada de várias maneiras. Uma primeira abordagem é a morfologia das plantas. À semelhança dos híbridos sexuais os híbridos somáticos apresentam fenótipos intermédios entre os correspondentes progenitores.

A contagem do número de cromossomas nos vértices vegetativos das raízes utilizando agentes c-mitóticos e técnicas de coloração específicas para o DNA, como a técnica de Feulgen, permitem caracterizar o cariótipo das plantas obtidas. Os híbridos poder-se-ão distinguir de plantas resultantes de protoplastos que não fundiram por terem uma guarnição cromossómica que será a soma dos cromossomas dos dois progenitores. No entanto, na fusão de protoplastos de génotipos diferentes de uma mesma espécie ou de espécies diferentes com o mesmo número de cromossomas, a distinção torna-se problemática. Para além do número de cromossomas pode igualmente analisar-se a estrutura dos cromossomas através de técnicas de “banding” em espécies em que estes apresentem dimensões que permitam essa análise. No entanto, em muitas espécies, os cromossomas são de dimensões reduzidas ou em número elevado tornando difícil a sua caracterização por técnicas citológicas. Além disso, as plantas obtidas por hibridação somática apresentam com frequência pequenas variações no número de cromossomas (aneuploidia) que se afastam do número correspondente à soma dos cromossomas dos dois progenitores.

Uma alternativa à contagem de cromossomas pode ser a avaliação do teor em DNA das plantas obtidas por citometria de fluxo. Com base na emissão de fluorescência por um fluorocromo que se liga especificamente ao DNA é possível determinar a quantidade de DNA presente nas células das plantas regeneradas e fazer a comparação com os progenitores.

A análise do padrão de isozimas e a comparação dos perfis com os padrões obtidos para os progenitores pode também ajudar na confirmação do carácter híbrido das plantas obtidas.

Em anos mais recentes vários marcadores de DNA têm sido utilizados para caracterizar as plantas obtidas por hibridação somática. Estes marcadores

baseiam-se em diferenças nas sequências de bases que existem no genoma dos diferentes organismos. Através da utilização de enzimas de restrição que fragmentam o DNA em locais específicos e/ou da amplificação de determinadas zonas do DNA utilizando *primers* específicos ou arbitrários cujos padrões de amplificação podem depois ser verificados por electroforese ou sequenciação é possível detectar diferenças entre os progenitores e os produtos de fusão de protoplastos. Estas técnicas incluem a utilização de RAPDs, RFLPs, AFLPs (“Amplified Fragment Length Polymorphisms”) e microssatélites. Dada a sua fiabilidade e reprodutibilidade estes métodos são cada vez mais utilizados para a caracterização do material vegetal em programas de melhoramento.

A produção de híbridos somáticos e a confirmação do carácter híbrido das plantas obtidas não é o objectivo final dos procedimentos experimentais que têm vindo a ser analisados. À semelhança do que acontece em qualquer programa de melhoramento, as características dos híbridos somáticos devem ser analisadas ao longo de gerações sucessivas, pois só assim é possível verificar a sua hereditariedade e verificar se as plantas obtidas são de facto interessantes do ponto de vista agronómico ou de qualquer outra característica que se pretenda obter. Dito de outra forma, os híbridos somáticos devem ser incorporados em programas de selecção e melhoramento necessitando de ser testados em condições de campo e sob diferentes condições ambientais antes da sua utilização pelos agricultores (Fig. 70).

Com base na hibridação somática têm sido obtidos híbridos somáticos através da fusão de protoplastos de diferentes espécies, incluindo variedades ou genótipos de uma mesma espécie, espécies de um mesmo género ou mesmo entre espécies de géneros diferentes. Na tabela 5 estão indicados alguns desses híbridos.

A principal diferença entre os híbridos somáticos e os híbridos sexuais obtidos a partir dos mesmos progenitores resulta do facto dos híbridos somáticos serem, teoricamente, férteis não sendo necessário proceder à duplicação do número de cromossomas dos produtos de fusão os quais são verdadeiros anfiplóides. Pelo contrário, nos híbridos sexuais, o zigoto dá origem a uma planta viável mas que não é fértil, uma vez que os cromossomas provenientes de cada progenitor são univalentes, não possuindo

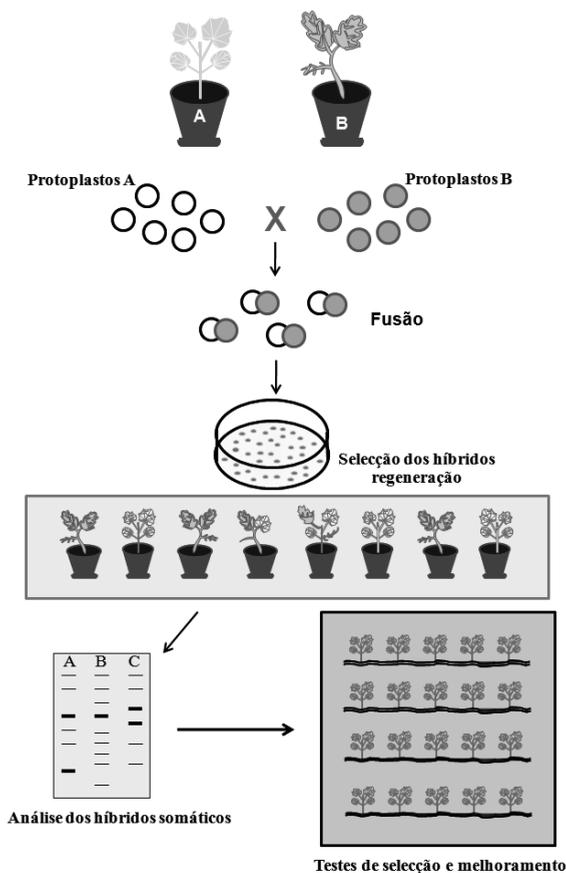


Figura 70 – Esquema ilustrativo da obtenção de híbridos somáticos e sua integração em programas de melhoramento.

o cromossoma homólogo correspondente de forma a que se possam formar bivalentes e a meiose possa prosseguir normalmente. Nestes casos, como acontece no triticale, para que os híbridos sejam férteis é necessário proceder à duplicação do seu número cromossómico de forma a que se tornem anfiploídes. Deste modo, o processo é mais moroso e a taxa de sucesso esperada é menor pois as técnicas que se utilizam para duplicação cromossómica não são totalmente eficazes.

Outra diferença entre os híbridos somáticos e os híbridos sexuais tem a ver com a relação entre os genes nucleares e os genes citoplasmáticos. Nos híbridos sexuais, o genoma citoplasmático da maioria das espécies (cerca de dois terços das espécies estudadas) é herdado exclusivamente a partir

da célula gamética do progenitor feminino (oosfera) enquanto o genoma nuclear é uma mistura dos dois genomas parentais. Existem, no entanto, espécies em que a hereditariedade citoplasmática é masculina., sendo nestes casos, as células espermáticas, as responsáveis pela transmissão dos organitos citoplasmáticos. Nos híbridos somáticos, embora possa ocorrer a segregação de um dos genomas citoplasmáticos essa situação não é frequente pelo que os híbridos apresentam também um genoma citoplasmático híbrido. Esta situação pode ter implicações em termos das características das plantas mas é também interessante para estudar a interação entre os dois tipos de genomas existentes nas células.

7.11. Aplicações e limitações da utilização de protoplastos

Como foi referido ao longo do capítulo, a utilização de protoplastos abriu novas perspectivas em termos de transformação genética das plantas e da quebra das barreiras de incompatibilidade genética entre diferentes espécies. A possibilidade de introduzir DNA em células desprovidas de parede e de realizar cruzamentos entre espécies afastadas abriu uma série de possibilidades ao melhoramento de plantas que até aí não existiam. A transferência de DNA para protoplastos pode ser conseguida através de várias técnicas como sejam a electroporação, microinjecção, sonicação, utilização de lipossomas ou tratamento com polietilenoglicol. Nos capítulos seguintes serão analisados em mais detalhe os mecanismos de transformação genética de células vegetais. Para já importa referir que nos métodos de transformação com protoplastos o DNA a inserir é misturado com as células sendo depois aplicado um tratamento que permite a abertura de poros membranares através dos quais o DNA penetra nas células inserindo-se no genoma. No caso da utilização de lipossomas trata-se de promover a fusão de vesículas contendo o DNA transformante com os protoplastos.

Apesar de teoricamente promissoras as técnicas envolvendo a utilização de protoplastos têm ficado um pouco aquém daquilo que poderia ser perspectivado quando começaram a ser utilizadas. Em termos de transformação genética, por exemplo, a utilização de protoplastos parecia ser uma alter-

nativa eficaz para a transformação genética de gramíneas, dada a reduzida susceptibilidade desta família à infecção com *Agrobacterium tumefaciens*. No entanto, o aparecimento de outros métodos de transferência directa do DNA para as células vegetais sem ser necessário recorrer à remoção da parede celular bem como a descoberta de estirpes mais virulentas de *A. tumefaciens* que juntamente com a aplicação de acetoseringona permitem a infecção de monocotiledóneas contribuíram de forma decisiva para um menor interesse da transformação genética de protoplastos.

Tabela 5. – Exemplos de alguns híbridos somáticos obtidos a partir da fusão de protoplastos de diferentes plantas (adaptado de Sihachakr e Haïcour 1995; Chawla, 2009).

Dentro da mesma espécie	Dentro do mesmo género
<i>Arabidopsis thaliana</i> (erva-estrelada)	<i>Brassica napus</i> x <i>Brassica campestris</i>
<i>Brassica napus</i> (couve-nabo)	<i>Brassica napus</i> x <i>Brassica oleracea</i>
<i>Brassica oleracea</i> (couve)	<i>Carica papaya</i> x <i>Carica candamarcensis</i>
<i>Citrus sinensis</i> (laranjeira)	<i>Citrus sinensis</i> x <i>Citrus paradisi</i>
<i>Daucus carota</i> (cenoura)	<i>Lycopersicon esculentum</i> x <i>Lycopersicon peruvianum</i>
<i>Lycopersicon esculentum</i> (tomateiro)	<i>Lycopersicon esculentum</i> x <i>Lycopersicon pennellii</i>
<i>Medicago sativa</i> (luzerna)	<i>Nicotiana tabacum</i> x <i>Nicotiana glauca</i>
<i>Nicotiana tabacum</i> (tabaco)	<i>Populus nigra</i> x <i>Populus koreana</i>
<i>Solanum melongena</i> (beringela)	<i>Solanum tuberosum</i> x <i>Solanum chacoense</i>
<i>Solanum tuberosum</i> (batateira)	<i>Solanum tuberosum</i> x <i>Solanum nigrum</i>
<i>Triticum aestivum</i> (trigo)	<i>Solanum tuberosum</i> x <i>Solanum pbureja</i>
<i>Zea mays</i> (milho)	<i>Solanum melongena</i> x <i>Solanum nigrum</i>
	<i>Solanum melongena</i> x <i>Solanum torvum</i>
Entre géneros da mesma família	<i>Trifolium rubens</i> x <i>Trifolium pratense</i>
Brassicaceae: <i>Brassica oleracea</i> x <i>Moricandia arvensis</i>	<i>Trifolium pratense</i> x <i>Trifolium hybridum</i>
Brassicaceae: <i>Brassica oleracea</i> x <i>Raphanus sativus</i>	<i>Triticum monococcum</i> x <i>Pennisetum americanum</i>
Brassicaceae: <i>Brassica napus</i> x <i>Eruca sativa</i>	
Brassicaceae: <i>Arabidopsis thaliana</i> x <i>Brassica napus</i>	Entre espécies de famílias diferentes
Fabaceae: <i>Medicago sativa</i> x <i>Lotus corniculatus</i>	<i>Oryza sativa</i> x <i>Daucus carota</i> (Poaceae x Apiaceae)
Fabaceae: <i>Glycine max</i> x <i>Lotus corniculatus</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> x <i>Daucus carota</i> (Solanaceae x Apiaceae)
Poaceae: <i>Pennisetum americanum</i> x <i>Panicum maximum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> x <i>Glycine max</i> (Solanaceae x Fabaceae)
Poaceae: <i>Festuca arundinacea</i> x <i>Lolium multiflorum</i>	<i>Nicotiana glauca</i> x <i>Glycine max</i> (Solanaceae x Fabaceae)
Poaceae: <i>Saccharum officinarum</i> x <i>P. americanum</i>	<i>Hordeum vulgare</i> x <i>Daucus carota</i> (Poaceae x Apiaceae)
Rutaceae: <i>Citrus sinensis</i> x <i>Poncirus trifoliatus</i>	<i>Vicia faba</i> x <i>Petunia hybrida</i> (Fabaceae x Solanaceae)
Solanaceae: <i>Solanum tuberosum</i> x <i>L. esculentum</i>	<i>Oryza sativa</i> x <i>Glycine Max</i> (Poaceae x Fabaceae)
Solanaceae: <i>Nicotiana tabacum</i> x <i>Petunia hybrida</i>	<i>Populus</i> sp. x <i>Hibiscus sabariffa</i> (Salicaceae x Malvaceae)

Por outro lado, a ideia que os protoplastos de diferentes espécies podem ser fundidos com uma certa facilidade não é muito correcta. Embora tenham sido referidos alguns casos na literatura de obtenção de híbridos somáticos entre espécies de géneros diferentes ou mesmo entre espécies de famílias diferentes (tabela 5), a verdade é que esses híbridos, na maior parte dos casos, não passam de curiosidades científicas sem um grande interesse em termos agronómicos. Por exemplo, os primeiros híbridos somáticos obtidos entre espécies de dois géneros diferentes, a batateira e o tomateiro, não mostraram o potencial que os cientistas que as produziram certamente esperariam. Isto significa, que mesmo através da fusão de protoplastos, as barreiras genéticas permanecem, sendo difícil conciliar numa mesma planta o funcionamento de dois genótipos distintos, com genomas programados para exprimirem determinados genes em locais diferentes e sob a acção de estímulos diversos. Apesar destas limitações tem sido possível obter híbridos somáticos com algum interesse através da transferência de características para os híbridos e ulterior integração em programas de melhoramento. Por exemplo, a característica CMS foi obtida em *Brassica rapanus* através de cibridização com *Raphanus sativus*. De forma análoga, linhas CMS de chicória (*Cichorium intybus*) foram conseguidas através da fusão com protoplastos de uma linha CMS de girassol (*Helianthus annuus*). Na batateira, uma espécie que tem sido muito estudada em termos de obtenção de protoplastos e hibridação somática, foram obtidas cultivares resistentes a vários fungos e vírus através da transferência dessa característica por fusão com protoplastos de várias espécies não domesticadas de *Solanum*.

As principais limitações que se verificam no que diz respeito às técnicas relacionadas com o isolamento e manipulação de protoplastos são de vários tipos. A primeira tem a ver com o conjunto de passos que é preciso executar até obter plantas. Em muitos desses passos as taxas de sucesso são limitadas reduzindo consideravelmente a eficiência do processo. Além disso, as condições utilizadas numa fase podem afectar as fases subsequentes do processo. Um aspecto não negligenciável tem a ver com o facto de material geneticamente muito próximo responder às condições experimentais de forma diversa. Por exemplo, diferentes cultivares de *Oryza sativa* dão rendimentos diferentes em termos de eficiência do isolamento, capacidade

de divisão e potencial de regeneração. Outro factor importante é a dificuldade em reproduzir resultados obtidos num laboratório num outro em que as não sejam exactamente as mesmas. Esta situação torna difícil comprovar resultados e repetir ensaios com vista a otimizar processos.

A inexistência de métodos de selecção eficazes dos produtos resultantes da fusão de protoplastos é uma limitação importante. Variações no número de cromossomas relativamente ao número esperado, alterações na estrutura dos cromossomas, segregação de organitos e mecanismos epigenéticos responsáveis pela ocorrência de variação somaclonal podem também interferir com a obtenção de híbridos somáticos interessantes. Um aspecto curioso, e contrário ao que seria de esperar, tem sido a verificação que os híbridos sexuais são, por norma, estéreis. Tendo em conta que nos produtos de fusão que dão origem a essas plantas existem os dois conjuntos completos de cromossomas de cada progenitor, esta situação é difícil de compreender. Provavelmente, durante o processo de cultura e regeneração, a instabilidade das células leva à perda de cromossomas mecanismo que torna inviável a ocorrência de meioses normais nos híbridos somáticos. Em alternativa a esterilidade dos híbridos somáticos poderá estar relacionada com a incompatibilidade dos dois genomas em termos dos mecanismos que desencadeiam a floração e a subsequente formação dos gâmetas.

CAP. 8. TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE PLANTAS

8.1. Introdução

Como foi referido na introdução, a domesticação e o melhoramento de plantas vem sendo praticado pela humanidade desde há pelo menos 10.000 anos. Durante milhares de anos, a modificação genética das plantas com o objectivo de melhorar as suas características foi praticada de forma empírica sem qualquer fundamentação científica. Os agricultores guardavam as sementes das plantas mais produtivas ou daquelas que melhor toleravam as condições ambientais e usavam-nas em novas culturas. Esta selecção artificial praticada nas plantas (e também nos animais) permitiu apurar génotipos adaptados às mais variadas condições ambientais e criou, naquelas plantas que são mais cultivadas, uma grande diversidade genética que ainda hoje é importante em programas de melhoramento vegetal. A base deste melhoramento arcaico era a variabilidade natural existente numa população e resultante das recombinações genéticas que ocorrem durante a reprodução sexuada e as mutações que em condições naturais afectam todos os organismos, sendo também uma fonte importante de variabilidade. Com a descoberta por Mendel das leis da hereditariedade e, alguns anos mais tarde com a sua redescoberta, abriu-se um novo caminho ao melhoramento vegetal. Conhecidas as bases genéticas do melhoramento este passou a ser feito de uma forma mais racional tendo sido possível perceber de que forma as características eram transmitidas à descendência. A transferência de genes de plantas selvagens, apresentando características de interesse, para as plantas cultivadas ou a combinação das características dos progenitores

nos híbridos tornou-se uma prática comum e permitiu, na última metade do século XX, ganhos de produtividade que se julgavam impensáveis. Além disso, foi também possível verificar que manipulações do DNA através da indução de mutações ou da manipulação dos níveis de ploidia das plantas, com a obtenção de haplóides, poliplóides e aneuplóides permitiam a obtenção de plantas com novas características muitas vezes interessantes do ponto de vista agronómico. Deste modo, todas as variedades de plantas que actualmente consumimos resultaram de profundas alterações genéticas introduzidas no seu genoma por cruzamentos ou por manipulações grosseiras do seu DNA.

Apesar dos resultados obtidos, estas técnicas convencionais apresentam limitações que tornam difícil a modificação genética para além de um determinado patamar. Assim, a indução de mutagénese utilizando agentes físicos ou químicos é um processo pouco preciso, puramente aleatório e grande parte da variabilidade induzida é de carácter negativo. A transferência de genes por cruzamentos também só é possível entre plantas geneticamente relacionadas, dentro da mesma espécie ou, quando muito, entre espécies muito próximas filogeneticamente. É possível transferir genes por cruzamento e selecção entre, por exemplo, duas espécies de cevada, mas não é possível efectuar o mesmo tipo de transferência entre um cereal e uma leguminosa. O aumento dos níveis de ploidia também não pode ir além de um certo limite pois, caso contrário, os mecanismos de controlo genético podem ser profundamente alterados. Finalmente, deve referir-se que estes métodos convencionais de melhoramento são bastante morosos e a incorporação de uma nova característica numa determinada variedade pode demorar uma dezena de anos no caso das plantas com um ciclo de vida anual. Em árvores, cuja fase reprodutiva apenas é atingida ao fim de alguns anos de crescimento vegetativo, este tipo de melhoramento torna-se praticamente impossível.

A possibilidade de obter plantas geneticamente modificadas por técnicas de engenharia genética veio permitir ultrapassar algumas destas limitações e tornar o processo de manipulação genética de plantas mais eficaz. De facto, utilizando as modernas técnicas de transformação genética é possível inserir genes de interesse de outros organismos nas plantas alargando

a base genética do melhoramento. O DNA de todos os organismos é química e estruturalmente semelhante e os mecanismos de controlo genético, embora com algumas diferenças entre procariotas e eucariotas, são em traços gerais, similares, permitindo que um gene de uma bactéria possa ser inserido numa planta e que, feitas as alterações adequadas continue a funcionar. A utilização de técnicas de engenharia genética (DNA recombinante), associadas à totipotência da célula vegetal, é cada vez mais uma metodologia utilizada no melhoramento vegetal. As primeiras plantas transgênicas foram criadas no início da década de 80, na planta do tabaco e desde então, a manipulação do DNA foi realizada em centenas de espécies.

Neste capítulo será feita uma breve análise ao melhoramento de plantas com base em cruzamentos e selecção. Em seguida serão analisados os fundamentos da transformação genética de plantas por métodos de biologia molecular bem como os sistemas experimentais actualmente disponíveis que permitem concretizar essa transformação genética.

8.2. Transferência de genes por cruzamento e selecção

O melhoramento é um processo contínuo e resulta do facto de em cada momento as plantas utilizadas na agricultura apresentarem características que não são as mais adequadas e que podem afectar a produtividade. A necessidade de melhoramento é também em grande parte ditada pelas preferências dos consumidores, as quais vão evoluindo com a própria sociedade e com as modas e convicções de cada época. Uma vez que a obtenção de novas variedades é um processo que demora alguns anos, desde os cruzamentos iniciais até aos testes de campo e entrada no mercado, de alguma maneira o melhorador deve tentar antecipar quais as exigências dos mercados em termos futuros ou quais os eventuais factores que será necessário melhorar numa variedade de forma a torná-la mais apelativa em termos de mercado. Isto implica não só um conhecimento detalhado do material vegetal mas também uma atenção profunda às tendências dos consumidores. Nesta perspectiva, a profissão de melhorador não é fácil. Ele tem que ser simultaneamente um bom técnico, um razoável economista e, talvez não menos

importante, ter alguma capacidade de perspectivar o futuro, uma espécie de astrólogo do melhoramento.

O processo de melhoramento clássico inicia-se sempre por uma escolha criteriosa dos progenitores ou seja das plantas a cruzar. Vamos imaginar que um melhorador pretende modificar uma variedade de uma espécie cultivada que é muito produtiva mas que é simultaneamente sensível a fungo que ataca as culturas reduzindo assim os rendimentos. A primeira coisa a fazer é tentar encontrar plantas da mesma espécie que sejam tolerantes ao fungo. Esse escrutínio pode ser feito em plantas selvagens ou noutras variedades da mesma espécie. Existem actualmente muitas instituições que possuem bancos de sementes de plantas que por uma ou outra razão não são cultivadas mas em que características de interesse podem estar presentes. Caso isso não seja possível, pode ainda tentar procurar-se uma espécie filogeneticamente próxima que apresente tolerância ao fungo e que possa ser cruzada com a variedade a melhorar. Neste caso vamos supor que o melhorador encontrou de facto uma planta da mesma espécie que é tolerante ao fungo. Esta planta irá fornecer essa característica à variedade que queremos manter. No final espera-se que a nova variedade tenha todas as características que a variedade inicial tinha mais a resistência ao fungo.

A segunda fase do processo consiste em cruzar a variedade que se pretende melhorar (planta recorrente) com a variedade resistente (planta dadora). Desse primeiro cruzamento obtém-se uma primeira geração (F1) que é relativamente uniforme em termos fenotípicos e que torna difícil ao melhorador fazer algum tipo de selecção. Para aumentar a variabilidade fenotípica é conveniente cruzar esta primeira geração entre si e obter uma segunda geração (F2) onde a variabilidade é agora mais pronunciada. É a partir daqui que o papel do melhorador se torna importante. Nesta segunda geração, o melhorador deve escolher plantas que em termos gerais se assemelhem à variedade inicial e, simultaneamente, apresentem tolerância ao fungo. É importante não esquecer que, tratando-se de plantas de ciclo de vida anual, cada cruzamento e obtenção de descendência implica um ano, exceptuando-se situações em que duas ou três colheitas podem ser feitas no mesmo ano, como acontece com a cultura de algumas plantas em climas tropicais.

Uma vez seleccionadas as plantas mais interessantes da F2, o melhoramento prossegue com o cruzamento entre estas plantas e a planta recorrente. Este tipo de cruzamentos, em que os descendentes são cruzados com um dos progenitores são vulgarmente designados por retrocruzamentos (*backcrosses*). No caso concreto, o cruzamento deve ser realizado com o progenitor cujas características gerais se pretendem manter. O resultado é uma terceira geração de plantas onde se voltam a seleccionar aquelas que apresentam as características fenotípicas da variedade inicial mais a resistência ao fungo. Tal como acontecia na situação anterior, volta-se a realizar um retrocruzamento e estas plantas voltam a cruzar-se com a variedade recorrente. O processo repete-se mais algumas vezes (3-5) até termos uma nova variedade que possui o genoma da variedade inicial mais o gene ou os genes responsáveis pela resistência ao fungo. Aquilo que se conseguiu foi a inserção de novos genes na planta original sem que se tenha realizado qualquer manipulação laboratorial do DNA. Obtém-se assim uma planta geneticamente transformada através da realização de cruzamentos e selecção, em cada geração, das características mais interessantes.

Um esquema deste tipo de transformação genética encontra-se representado na figura 71. Na sequência de cada retrocruzamento, o número de genes da planta inicial resistente ao fungo vai-se reduzindo a metade enquanto o número de genes da variedade inicial vai aumentando. Se partirmos de duas plantas que, por suposição tenham 20.000 genes, os híbridos resultantes deste cruzamento terão também 20.000 genes mas, em termos estatísticos, 10.000 genes serão provenientes de um dos progenitores (planta recorrente) e os outros 10.000 do outro progenitor (planta dadora). Quando esta planta F1 é cruzada com a planta recorrente, os descendentes terão 5000 genes de B e 15.000 de A. Na sequência do retrocruzamento seguinte a proporção será 17.500 genes de A e 2.500 de B. A percentagem de genes da planta recorrente na sequência de cada retrocruzamento pode obter-se pela fórmula $1 - (0,5)^{n+1}$ em que n corresponde ao número de retrocruzamentos. Assim, após o primeiro retrocruzamento o valor será $1 - 0,25 = 75\%$ de genes da planta dadora. De acordo com o mesmo raciocínio após 8 retrocruzamentos, a percentagens de genes da planta recorrente nos descendentes seria de 99,85% qualquer coisa como 19.970 genes assumindo um valor inicial de

20.000. Como a selecção é feita escolhendo sempre as plantas resistentes ao fungo isso significa que estas plantas terão entre os cerca de 30 genes da planta dadora aqueles responsáveis pela tolerância ao fungo. Esta situação explica-se pelas leis da hereditariedade e pelo processo da meiose que ocorre durante a reprodução sexuada.

Do que foi dito pode concluir-se que embora tenha sido conseguida a transferência da característica pretendida existem algumas limitações. Assim, pode acontecer que o gene de interesse a transferir da planta dadora para a planta recorrente esteja muito próximo e em estreita associação (*linkage*) com outros genes e que estes tenham algum efeito negativo em termos de fenótipo. Nesta situação, por reprodução sexuada, o gene que interessa transferir irá sempre associado aos genes que conferem a característica negativa. Embora muitas vezes o melhorador se possa aperceber dessa situação pela análise da descendência que vai sendo obtida, pode também acontecer que essa característica negativa seja mais subtil e só possa ser detectada uma vez obtida a nova variedade. Para além disso, muitas características que interessa melhorar nas plantas não são controladas por um único gene, mas sim por vários genes que pela sua interacção contribuem para um determinado resultado. O fenótipo, nestes casos, não é uma característica qualitativa, como por exemplo nas experiências clássicas de Mendel com ervilhas lisas ou rugosas, mas sim uma característica quantitativa, como seja, por exemplo, o peso de um grão de trigo ou o comprimento de uma espiga. Uma vez que o fenótipo é controlado por genes localizados em diferentes *loci*, estas características são designadas por QTL e já referidos no capítulo 5. Trata-se de fenótipos muito difíceis de analisar pelos métodos clássicos uma vez que o as condições ambientais influenciam de forma preponderante estas características que apresentam uma grande variabilidade em função dessas mesmas condições. Um método de analisar estas características é tentar associá-las a marcadores de DNA que mostrem um padrão similar de hereditariedade. Neste caso, a selecção é feita com base no marcador identificado e não nas características fenotípicas tornando possível fazer a selecção como se de uma característica monogénica se tratasse. Este tipo de selecção em que um fenótipo é associado a um marcador de DNA é vulgarmente designada por MAS (Seleção Assistida por Marcadores) e tem

permitido seleccionar características importantes como sejam a resistência a stresses bióticos ou abióticos. Outra dificuldade do melhoramento clássico é que alguma heterozigotia residual (genes da planta dadora para além do gene de interesse) estará sempre presente na nova variedade sendo a sua interacção com o genoma da planta recorrente imprevisível.

A introdução de genes de uma planta numa outra por introgressão não é a única ferramenta que os melhoradores possuem para seleccionar novas variedades. Esses métodos de melhoramento dependem muito do sistema de reprodução da planta em causa, ou seja, se as plantas apresentam um sistema de reprodução cruzada ou se são capazes de autofecundação. A análise destes diferentes métodos de melhoramento, como sejam a produção de híbridos (e.g. milho híbridos), a selecção massal, a selecção recorrente, entre outros sai fora do âmbito dos objectivos deste trabalho pelo que o leitor interessado nestes assuntos poderá encontrar informação relevante noutras fontes (Allard, 1999; Caligari, 2001; Tinker, 2008). Através destes métodos, os progressos conseguidos no aumento da produtividade agrícola têm sido consideráveis e todos os anos milhares de novas variedades de diferentes espécies chegam aos agricultores e aos consumidores com base neste tipo de tecnologia. Por vezes, as modificações são mais profundas e novas espécies podem ser conseguidas. É o caso do triticale (*X Triticosecale* Wittmack), um híbrido entre trigo (género *Triticum*) e o centeio (género *Secale*) que se tornou um sucesso importante em termos agronómicos. O triticale é um bom exemplo para mostrar até que ponto a manipulação genética pode conduzir sem que se interfira directamente com o DNA. Haverá planta mais geneticamente modificada que o triticale? No entanto, nunca se ouviu da parte daqueles que atacam as PGMs qualquer protesto contra a cultura de triticale. Ignorância? Talvez. Afinal, como dizia Fernando Pessoa, “pensar incomoda como andar à chuva”.

A descoberta dos métodos moleculares de transformação genética de plantas de que trataremos em seguida permitiu ultrapassar algumas das limitações dos métodos convencionais. No entanto, deve ter-se presente que estes métodos são ainda hoje aqueles que mais vulgarmente são utilizados na obtenção de novas variedades sendo também imprescindíveis na integração das plantas obtidas por engenharia genética em programas

de melhoramento. Importa também referir que a obtenção de plantas geneticamente modificadas (PGMs) é realizada em variedades que já foram profundamente modificadas por métodos de selecção prévios. Por exemplo, o arroz dourado, que será provavelmente disponibilizado nos próximos anos, é uma variedade geneticamente modificada obtida a partir da variedade IR 64, ela própria resultante inicialmente do cruzamento entre *landraces* (variedades locais adaptadas a determinados habitats) e ulterior melhoramento. Assim, longe de poderem ser considerados como métodos alternativos a modificação genética de plantas por métodos convencionais e a modificação genética de plantas por engenharia genética são antes duas ferramentas complementares que os melhoradores têm ao seu dispor para concretizar um mesmo objectivo: a obtenção de plantas com novas características.

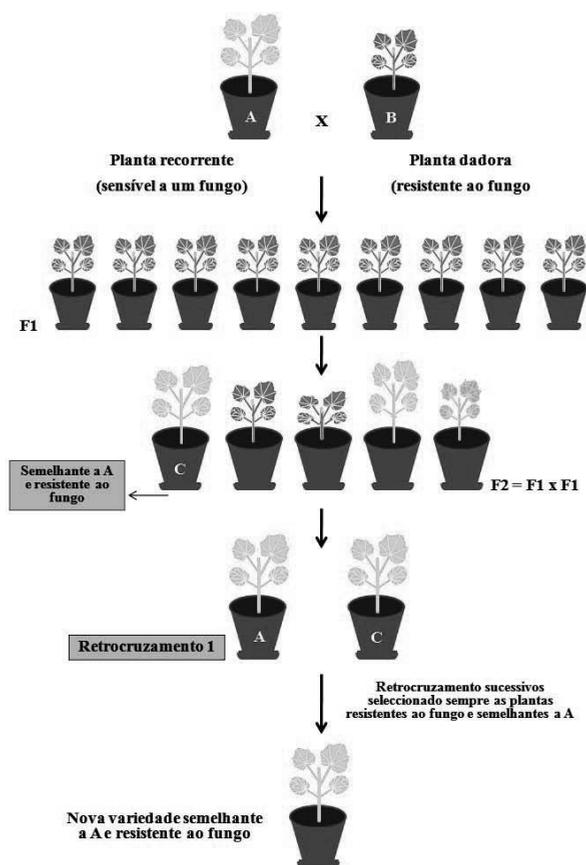


Figura 71 – Transferência de genes entre plantas através de cruzamentos e selecção.

8.3. Plantas geneticamente modificadas por engenharia genética

Nesta parte do capítulo vamos analisar a modificação de plantas em laboratório por técnicas de biologia molecular, aquilo a que vulgarmente se chama plantas geneticamente modificadas (PGMs) ou plantas transgénicas. Antes disso, convém clarificar alguns conceitos que muitas vezes são veiculados de forma imprecisa. Uma planta geneticamente modificada é uma planta que sofreu uma alteração genética quer através de cruzamentos e selecção como se referiu anteriormente ou por mutação ou por transformação genética em laboratório. No entanto, e uma vez que o público em geral não tem um conhecimento muito aprofundado desta temática a designação “plantas geneticamente modificadas” foi sendo associada àquelas plantas modificadas por manipulação do DNA em condições laboratoriais. É também nesse sentido que a partir daqui elas serão referidas neste trabalho e fazendo parte de uma designação mais vasta que engloba os organismos geneticamente modificados (OGMs). A designação “plantas transgénicas” tem sido utilizada como um sinónimo de PGMs. No entanto, esta sinonímia não corresponde à realidade. Uma planta transgénica é aquela que foi modificada com um ou mais genes de outra espécie (genes heterólogos), ou seja, com um gene estranho (transgene). Uma planta transgénica é, também, uma planta geneticamente modificada. Por exemplo, a introdução de um gene de origem bacteriana nas variedades de milho resistentes à broca-do-milho é um exemplo de transgénesse. No entanto, nem todas as plantas geneticamente modificadas são plantas transgénicas. Pode-se transformar uma planta com um gene que já exista no seu genoma (gene homólogo). O resultado é uma sobre-expressão de um determinado gene mas, como o gene é proveniente da mesma espécie, não é correcto falar-se em planta transgénica. As plantas podem também ser geneticamente modificadas não pela inserção de um novo gene mas sim pela inactivação de genes que existam no seu genoma. Assim, no caso da primeira planta geneticamente modificada que foi comercializada (1994), uma variedade de tomateiro designada Flavr Savr produzida por uma companhia americana chamada Calgene, as plantas tinham inibido o gene da poligalacturonase, uma enzima envolvida no amadurecimento dos frutos através da degradação

de componentes pécticos da matriz da parede celular, através daquilo que se chama tecnologia do RNA antisense (capítulo 9). Neste caso, trata-se de uma planta geneticamente modificada em que não foi inserido qualquer gene no genoma mas, pelo contrário, um gene que em condições normais funcionaria foi inativado.

Uma vez clarificados estes aspectos importa agora analisar como se processa a transformação genética de plantas em condições laboratoriais. O conjunto de técnicas utilizadas com este objectivo e que vai desde o isolamento e caracterização dos genes que interessa inserir nas plantas até à sua inserção no genoma vegetal tem sido vulgarmente designado como engenharia genética. Esses processos envolvem técnicas de biologia molecular que permitem a clivagem do DNA e a sua inserção em plasmídeos e cuja descrição de forma exaustiva ultrapassa os objectivos deste livro. Aqui far-se-á apenas alusão pontual a algumas destas técnicas quando tal se revelar essencial para a compreensão do mecanismo de transformação genética. A compreensão dos mecanismos de transformação genética implica também alguns conhecimentos gerais sobre a organização do genoma e o controlo da expressão genética que se torna impraticável abordar aqui. Qualquer livro de genética ou de biologia molecular possui informação detalhada sobre estes assuntos.

Em traços gerais, a transformação genética de plantas envolve uma série de procedimentos gerais cujas técnicas utilizadas em cada situação podem variar. Esses procedimentos são a inserção do gene (ou dos genes) nas células vegetais sendo para isso necessário um vector, a selecção das células geneticamente transformadas, o funcionamento do gene sob controlo do genoma da planta, a regeneração de plantas a partir das células geneticamente transformadas, o que pode ocorrer pelos métodos de regeneração *in vitro* que foram previamente analisados, e a confirmação da transformação e a análise da sua distribuição à descendência.

As primeiras plantas geneticamente modificadas foram obtidas em 1983. Do ponto de vista agronómico essas plantas tinham um interesse limitado mas do ponto de vista científico os ensaios que levaram à sua obtenção mostraram que era possível a transferência de genes de outros organismos para as plantas e que esses genes podiam funcionar normalmente uma vez

integrados no genoma das células vegetais. Estes primeiros resultados foram apresentados, em Janeiro daquele ano, numa conferência realizada em Miami, por grupos da Universidade de Washington no Missouri, da Universidade de Gent na Bélgica e da companhia agroquímica Monsanto. Alguns meses mais tarde, em Abril, um quarto grupo (Universidade do Wisconsin) apresentou também resultados sobre a transformação genética de plantas num congresso realizado na Califórnia. O grupo da cientista M.-D. Chilton da Universidade de Washington procedeu à transformação de células de uma espécie relacionada com o tabaco, *Nicotiana plumbaginifolia*, resistentes ao antibiótico canamicina. O grupo de M. von Montagu e J. Schell (Bélgica) conseguiu obter plantas de tabaco resistentes à canamicina e ao metotrexato enquanto o grupo da Monsanto (R. Fraley e colaboradores) obteve plantas de petúnia também resistentes à canamicina. Finalmente, os cientistas da Universidade de Wisconsin (J. Kemp e T. Hall) procederam à transferência de um gene de feijoeiro para a planta do girassol. Estes primeiros sucessos, pouco tempo depois publicados em revistas científicas, constituíram um marco importante em termos científicos dadas as dificuldades que foi necessário ultrapassar. De facto, nesta altura, os kits de extracção de DNA não existiam, a reacção de PCR que permite obter quantidades apreciáveis de DNA não era conhecida e os métodos de sequenciação de DNA, comparados com as modernas técnicas de análise, eram bastante primitivos. Para além disso, estes trabalhos pioneiros mostraram que as barreiras genéticas podiam ser ultrapassadas e que genes de outros organismos podiam funcionar numa planta. No final dos anos 80 foram obtidos os primeiros sucessos na transformação genética de monocotiledóneas e, rapidamente, protocolos para a transformação genética de várias espécies foram publicados. No final de 1986 foi autorizada, nos Estados Unidos, a primeira libertação para o ambiente de uma planta (tabaco) geneticamente modificada enquanto em 1994 a comercialização de uma variedade de tomateiro geneticamente modificada foi autorizada pela autoridade de segurança alimentar americana (FDA – Food and Drug Administration). As primeiras culturas em larga escala de plantas geneticamente modificadas iniciaram-se em 1996 e, segundo dados da ISAAA (<http://www.isaaa.org/>), em 2009, 14 anos depois, as culturas com PGMs ultrapassaram os 130 milhões de

hectares em 25 países (ver figura 5, capítulo 1) tendo sido cultivadas por mais de 13 milhões de agricultores em todo o mundo.

Nas secções seguintes serão analisados os métodos de transformação genética de plantas mais comuns com especial ênfase na utilização da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* como veículo para a transformação genética das plantas.

8.4. *Agrobacterium tumefaciens*

O primeiro método de transformação genética em plantas, e ainda hoje o mais utilizado recorre ao *Agrobacterium*, uma bactéria Gram⁻, flagelada, pertencente à família Rhizobiaceae (tal como o género *Rhizobium*, responsável pela associação com raízes de leguminosas e pela fixação do azoto atmosférico), fitopatogénica, que vive no solo e que é responsável por uma doença das plantas denominada "crown gall" (galha-do-colo). Esta doença manifesta-se pela proliferação de células na zona de contacto entre o caule e a raiz, vulgarmente designada por colo (Fig. 72). Embora mais raramente, esta proliferação pode também ser observada no caule e na raiz sendo uma espécie de tumor vegetal. A doença, que é muito vulgar em algumas dicotiledóneas, como a vinha, o pessegueiro, a nogueira e a amendoeira tem um impacto muito reduzido em gimnospérmicas e em monocotiledóneas, principalmente nos cereais que são as espécies vegetais mais importantes do ponto de vista alimentar.

Outra espécie de *Agrobacterium*, denominada *A. rhizogenes*, induz a formação de "hairy roots" enquanto *A. rubi* é uma espécie que se desloca no xilema e produz galhas nas partes aéreas das plantas. Algumas espécies do género, *Agrobacterium* não apresentam patogenicidade como é o caso de *A. radiobacter*.

A doença da galha-do-colo é conhecida desde a Antiguidade mas só no início do século xx se determinou que a bactéria era responsável pelos tumores que apareciam em algumas plantas. A bactéria penetra nas plantas através de zonas de ferimento provocadas por práticas agrícolas ou resultantes da actividade de organismos como insectos, nemátodes, ou mamíferos

e o tumor que provoca é bastante diferente de outras proliferações que também ocorrem em plantas resultantes da actividade de bactérias, fungos ou insectos. No caso desta doença, a proliferação de tecidos pode atingir proporções consideráveis e as células dos tumores, quando cultivadas *in vitro*, mesmo na ausência da bactéria ou de reguladores de crescimento são capazes de proliferar, o que atesta a sua natureza tumoral. Tal como tem acontecido em muitos aspectos da biologia vegetal a cultura *in vitro* deu um importante contributo para a compreensão dos mecanismos biológicos envolvidos no desencadear e proliferação desta doença.

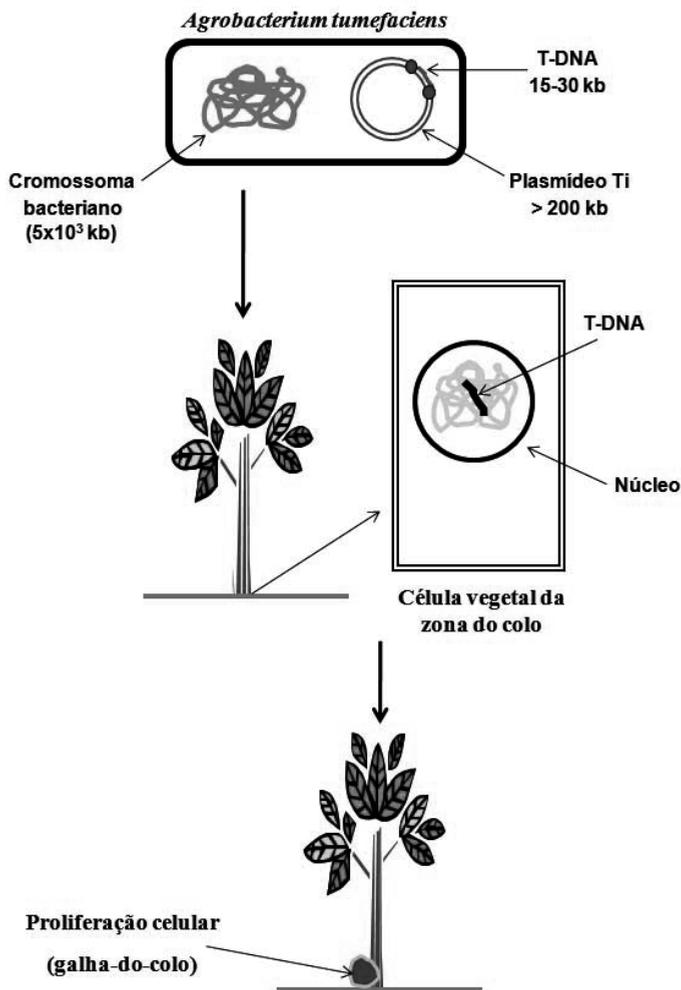


Figura 72 – Representação esquemática da infecção de plantas por *Agrobacterium tumefaciens*.

Assim, estudos *in vitro* mostraram que o “crown gall” continha substâncias que durante o desenvolvimento normal não são produzidas pelas células vegetais. Esses compostos denominam-se opinas (Fig. 73) e são derivados de aminoácidos. Por curiosidade refira-se que a octopina foi inicialmente descoberta em polvos (“octopus”, em inglês) derivando daí a sua designação. Agropinas, compostos derivados de açúcares são também produzidas pelas células infectadas. Posteriormente, verificou-se que era possível distinguir entre diferentes tumores e, conseqüentemente, entre diferentes estirpes de bactérias, devido à produção de diferentes opinas. Esta constatação, associada ao facto das células do tumor continuarem a sintetizar opinas mesmo na ausência das bactérias sugeriu que ocorria um processo de transformação através da transferência de material genético das bactérias para as células vegetais. Uma outra descoberta bastante importante foi a detecção de um plasmídeo grande de 150-250 kb nas bactérias (o “cromossoma” bacteriano possui cerca de 5×10^3 kb).

Plasmídeos são moléculas circulares de DNA de cadeia dupla que existem nas bactérias para além do "cromossoma" bacteriano. A informação genética contida nos plasmídeos não é essencial para a sobrevivência das bactérias mas eles contêm genes importantes na resistência a antibióticos e estão também envolvidos no mecanismo de conjugação entre bactérias. Plasmídeos podem também ser encontrados noutros organismos.

Algumas observações indicaram que o plasmídeo estava envolvido na infecção das plantas por *Agrobacterium*. Assim verificou-se que a aplicação de elevadas temperaturas destruía o plasmídeo e afectava também a formação de tumores. Todavia, a patogenicidade podia ser restaurada em contacto com bactérias não submetidas a elevadas temperaturas. Ulteriormente foram detectados no DNA dos tecidos infectados fragmentos de plasmídeos bacterianos tendo sido verificado que a bactéria transferia para o genoma das células vegetais uma parte do DNA do plasmídeo Ti (do inglês *tumor inducing*), mais concretamente uma ou mais cópias de uma molécula de DNA de cadeia única (DNAss) ou dupla designado T-DNA (do inglês, *transferred* DNA, 14 – 42 kb).

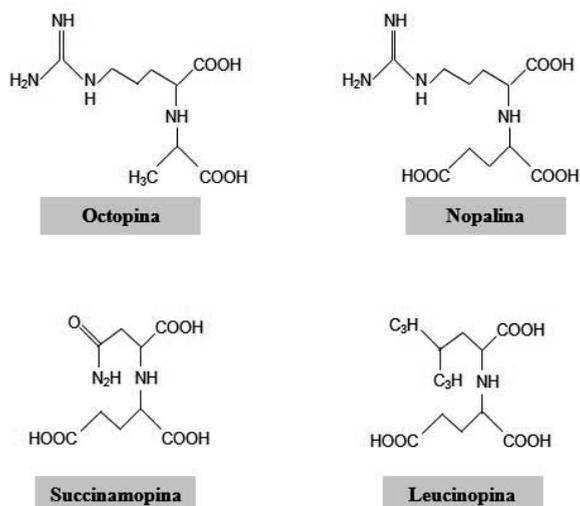


Figura 73 – Exemplos de diferentes tipos de opinas.

A descoberta que este plasmídeo (Fig. 74), denominado Ti ou Ri (do inglês *root inducing*, no caso de *A. rhizogenes*) conferia o carácter patogénico à bactéria conduziu a enormes progressos na engenharia genética dos vegetais. Outros plasmídeos não patogénicos podem existir na mesma bactéria. Existem actualmente mapas físicos e sequências de vários plasmídeos Ti e Ri de diferentes estirpes de bactérias. Análises moleculares permitiram verificar que no plasmídeo se localizam vários tipos de genes que são essenciais para o processo infeccioso desencadeado pelo *Agrobacterium* e que desempenham diversas funções. As principais regiões do plasmídeo Ti (Fig. 74) em termos de processo infeccioso são o T-DNA, a região *vir*, e as regiões dos *borders* (pólos, limites ou sequências terminais). Outras zonas do plasmídeo estão envolvidas na replicação do plasmídeo (região *rep*), no transporte e catabolismo das opinas (região *occ*) ou no controlo da conjugação bacteriana responsável pela transferência do plasmídeo Ti para estirpes avirulentas (região *tra*). Genes do cromossoma bacteriano são essenciais para a ligação de *A. tumefaciens* às células vegetais e no mecanismo de detecção de moléculas sinal que vão desencadear as reacções conducentes à transferência do T-DNA para as células vegetais.

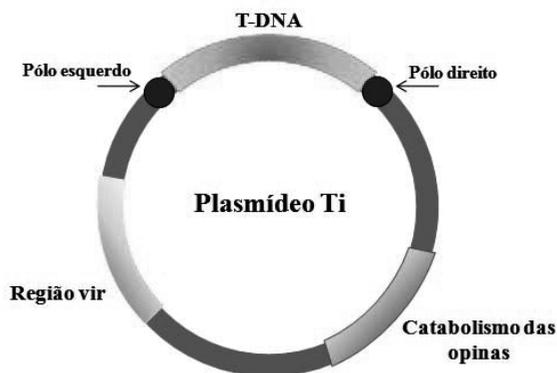


Figura 74 – Representação simplificada do plasmídeo Ti de *A. tumefaciens* (adaptado de Binns e Campbell, 2001 e Chawla, 2009).

Os pólos são curtas seqüências de 24 pares de bases designadas “imperfect direct repeats”. Como o nome indica trata-se de seqüências de DNA muito parecidas em termos de seqüências de bases e que possuem a mesma orientação. Estas seqüências encontram-se bastante conservadas em termos evolutivos o que revela a sua importância para as bactérias e são importantes nas fases iniciais do processamento do T-DNA como será referido na secção seguinte. O pólo direito é essencial no processo de transferência do T-DNA enquanto o pólo esquerdo tem um papel secundário.

O T-DNA é a região do plasmídeo situada entre os dois pólos (esquerdo e direito) sendo a única parte do plasmídeo que é transferida para as células vegetais durante o processo infeccioso. Possui os genes responsáveis pela síntese de opinas e de hormonas de crescimento (auxinas e citocininas). As opinas e agropinas funcionam como alimento para as bactérias pois são ricas em carbono e azoto. Para além disso, elas induzem conjugação bacteriana, permitindo que o plasmídeo de uma estirpe infecciosa possa ser transferido para outra estirpe. Outro aspecto interessante relacionado com as opinas reside no facto das opinas sintetizadas pelos genes de uma determinada estirpe de *Agrobacterium* apenas poderem ser metabolizadas por essa mesma estirpe, conferindo-lhe assim uma vantagem selectiva. Como já foi referido, cada estirpe de *Agrobacterium* produz um tipo particular de opina. Deste modo, o processo de infecção é altamente eficaz pois obriga as células vegetais a produzir compostos que não têm qualquer interesse para a planta

e que são úteis para as bactérias sob diferentes perspectivas. Na figura 75 estão representados dois tipos diferentes de plasmídeos Ti responsáveis pela síntese de dois tipos diferentes de opinas, um plasmídeo responsável pela síntese da nopalina (pTiC58) e um plasmídeo do tipo da octopina (pTiAch5). A principal diferença reside no facto do plasmídeo da nopalina possuir uma região única de T-DNA de cerca de 23 kb enquanto o plasmídeo da octopina possui o T-DNA dividido em duas regiões (esquerda e direita em função da proximidade dos pólos) de 13 kb (esquerda) e 8 kb (direita). Para além disso, nos plasmídeos da octopina existe uma sequência *overdrive* (ou *enhancer*) no pólo direito que é necessária para uma transferência eficaz do T-DNA. O plasmídeo da nopalina possui 13 ORFs (*open reading frames*) enquanto o plasmídeo da octopina possui, na totalidade, 14 ORFs (8 na região esquerda e 6 na região direita). ORFs são sequências do DNA delimitadas pelo codão de iniciação (AUG) e por um dos codões de terminação podendo ser consideradas como potenciais genes. As ORFs do T-DNA possuem características normalmente encontradas em ORFs de organismos eucariotas e não de procaríotas, como seria de esperar, dada a sua origem.

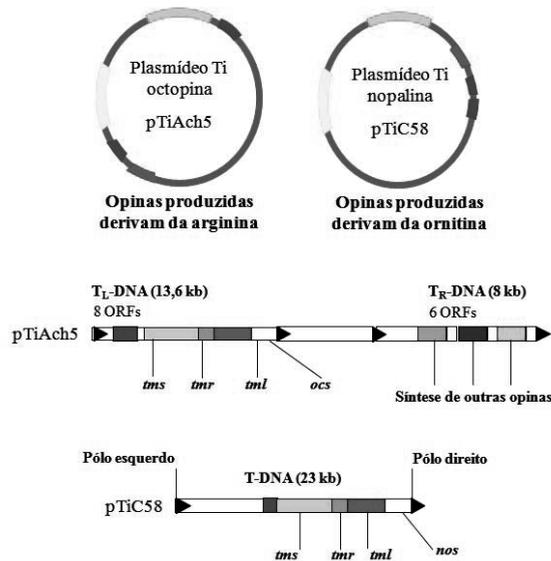


Figura 75 – Dois tipos diferentes de plasmídeos Ti e respectivos mapas de restrição do T-DNA. *nos* – gene da nopalina sintetase, *ocs* – gene da octopina sintetase, ORF – “Open Reading Frame”, *tml* – *large tumors*, *tmr* – *tumor rooty*, síntese de citocininas, *tms* – *tumor shooty*, síntese de auxinas (adaptado de Otten, 2001 e Chawla, 2009).

Para além dos genes responsáveis pela síntese de opinas o T-DNA possui igualmente genes que determinam a produção de hormonas vegetais mais concretamente genes envolvidos na síntese de uma auxina (IAA) e de uma citocinina (isopentenil-adenosina-5-monofosfato) pelas células infectadas (Fig. 76). A produção destes compostos pelas células infectadas estimula a divisão celular tendo como consequência a proliferação do tumor. Por essa razão, os genes em causa são referidos como oncogenes. No caso da produção de IAA, o T-DNA possui dois genes envolvidos na síntese desta auxina. Um deles (*tms1*, também designado *iaaM* ou *aux1*) codifica para a enzima triptofano-2-monooxigenase que converte o precursor triptofano em 3-indol acetamida. Um segundo gene (*tms2* – ou *iaaH* ou *aux2*) é responsável pela síntese da enzima 3-indol acetamida hidrolase que converte 3-indol acetamida em IAA. O gene *tmr* codifica a enzima isopentenil transferase responsável pela conversão de AMP e isopentenil pirofosfato em isopentenil-adenosina-5-monofosfato, um composto com actividade de citocinina. Modificações nos genes *tms* originam o aparecimento de tumores com aquilo que se designa um fenótipo *shooty* resultantes de uma redução dos níveis de auxinas nas células do tumor. Nestes casos, as células diferenciam rebentos caulinares anómalos. No caso de mutações no gene *tmr* o resultado é um decréscimo da produção de isopentenil-adenosina-5-monofosfato tendo como consequência uma redução dos níveis de citocinina e o aparecimento de raízes anómalas (fenótipo *rooty*). Outros genes localizados no T-DNA são responsáveis pela secreção das opinas enquanto outros controlam a resposta dos tecidos vegetais às hormonas. Os genes do T-DNA não se expressam na bactéria pois possuem sinais de regulação que apenas são efectivos em células eucariotas.

A região *vir* (virulência) é uma região que não é transferida para as células vegetais mas que é extremamente importante no controlo dos diferentes passos que permitem a separação do T-DNA do plasmídeo Ti, a substituição do T-DNA no plasmídeo e o seu transporte e integração no núcleo das células vegetais. Na região *vir* (cerca de 40 kb) situam-se pelo menos nove operões designados *vir A* – *vir J* que englobam um mínimo de 24 genes co-regulados formando um regulão. Os genes *vir A* e *vir G* são responsáveis pela formação de um sistema regulador de dois componentes que detecta determinados estímulos e desencadeia a activação das outras regiões *vir*.

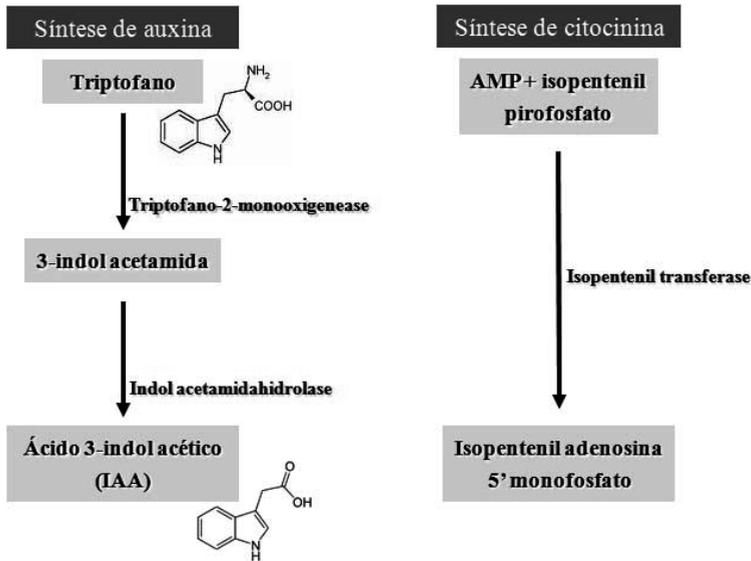


Figura 76 – Vias de síntese de uma auxina e de uma citocinina controladas por oncogenes localizados no T-DNA (adaptado de Otten, 2001 e Chawla, 2009). AMP – adenosina monofosfato.

8.5. Mecanismo de infecção das células vegetais com *Agrobacterium tumefaciens*

No processo infeccioso das células vegetais por *A. tumefaciens* podem distinguir-se várias etapas que vão desde a atracção das células bacterianas para os locais de infecção até à integração do T-DNA no núcleo das células. Em seguida são referidas as características das diferentes fases do mecanismo de infecção.

8.5.1. Ligação das bactérias às células vegetais

O primeiro passo do processo de infecção é a libertação pelas células vegetais feridas de compostos fenólicos, aminoácidos, ácidos orgânicos e hidratos de carbono. Alguns destes compostos desempenham papéis importantes nos mecanismos de defesa das plantas contra agentes patogénicos,

estando provavelmente envolvidos na síntese de lenhina e de fitoalexinas. Entre os compostos que desempenham um papel preponderante estão os fenóis acetoseringona e a β -hidroxi-acetoseringona. As bactérias são quimiotacticamente atraídas por compostos libertados pelas células vegetais e que sinalizam também as células competentes para a infecção, ou seja, aquelas que estão aptas a receber o T-DNA. Curiosamente, a acetoseringona, não atrai quimiotacticamente as bactérias. A ligação das bactérias às células vegetais é controlada por genes do cromossoma bacteriano, nomeadamente os *loci chv A*, *chv B* e *chv E* envolvidos na síntese de glucanos cíclicos ou na síntese de proteínas que ligam hidratos de carbono e do *locus cel* e *pscA* envolvidos, respectivamente, na síntese de celulose e exopolissacarídeos (succinoglucano), componentes essenciais da parede das células das plantas e que permitem às bactérias estabelecerem uma espécie de ponte com as células a infectar. O *locus att* que codifica para proteínas da superfície celular está também envolvido. Estirpes de *A. tumefaciens* com mutações nos diferentes tipos de genes indicados são avirulentas ou apresentam uma capacidade de infecção reduzida o que atesta a importância destes genes localizados no cromossoma bacteriano.

A ligação das bactérias às células vegetais ocorre através da formação de um biofilme sendo o processo de infecção mediado por proteínas receptoras da parede. Proteínas do tipo das vitro-nectinas e das ricadsinas parecem desempenhar um papel importante no mecanismo de reconhecimento. Estudos mais recentes parecem implicar também proteínas de arabinagalactano no processo de reconhecimento bactéria-hospedeiro.

Os compostos fenólicos e os hidratos de carbono libertados pelas células vegetais vão activar os genes *vir* do plasmídeo Ti, desencadeando o processamento do T-DNA.

8.5.2. Indução dos genes *vir*

O sistema que permite às células bacterianas detectar os sinais químicos emitidos pelas células vegetais competentes é um sistema de dois componentes constituído pelos produtos dos genes *vir A* e *vir G*, genes que se

exprimem constitutivamente na bactéria. Sistemas deste tipo são muito comuns em células bacterianas e permitem às bactérias responder a variações no habitat que as rodeia. No caso de *A. tumefaciens*, o sistema de dois componentes é formado por uma proteína que possui um domínio periplásmico (entre as duas membranas) capaz de detectar compostos fenólicos e que também possui actividade cinásica no domínio intracelular, chamada vir A. A ligação de compostos fenólicos ao quimiorreceptor vir A induz uma alteração conformacional nesta proteína resultante da sua autofosforilação em resíduos de histidina do terminal C onde também se localiza o domínio cinásico. A proteína A activada interage em seguida com o outro componente do sistema, a proteína vir G, fosforilando-a, e fazendo com que esta passe a funcionar como um activador da transcrição (Fig. 77) promovendo a activação de outros genes *vir* (incluindo *vir A* e *vir G*) necessários para o processamento, transporte e transferência do T-DNA para as células vegetais. Dados experimentais sugerem que a proteína vir A também interage com a proteína *chv E* a qual está envolvida na detecção de hidratos de carbono (glucose, galactose e xilose) naquilo que pode constituir uma via alternativa de infecção quando o teor de compostos fenólicos for reduzido.

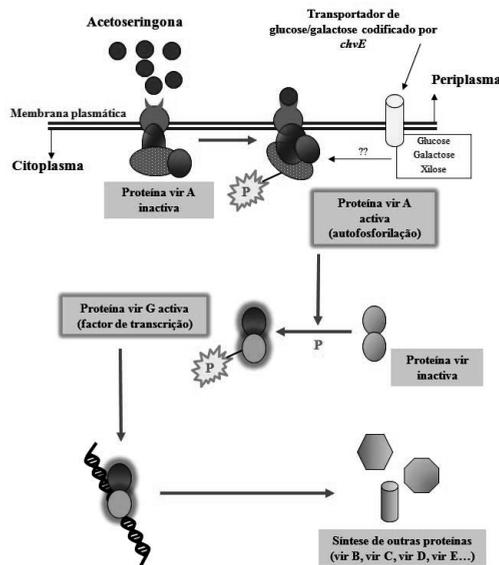


Figura 77 – Detecção de compostos fenólicos e activação de outros genes *vir* pelo sistema de dois componentes, as proteínas *vir A* e *vir G* (adaptado de Chriqui, 1995 e Anand e Mysore, 2006).

8.5.3. Processamento do T-DNA

274

A activação dos genes *vir* tem como consequência a clivagem de uma molécula de T-DNA de cadeia única do plasmídeo Ti e que irá ser incorporada nas células vegetais. Um dos primeiros acontecimentos na transferência do T-DNA é a clivagem do plasmídeo Ti entre a 3ª e a 4ª base de cada um dos pólos. Duas das proteínas codificadas pelo gene policistrónico *vir* D, *vir* D1 e *vir* D2, funcionam como endonuclease e executam a clivagem do T-DNA nos pólos. Proteínas codificadas pelo locus C, proteína *vir* C1 e *vir* C2, aumentam a eficácia do processo, através da sua interacção com a sequência *overdrive*. A clivagem no pólo direito, onde se localiza a sequência *overdrive*, funciona como um local de iniciação para a síntese de uma nova molécula de DNA que irá substituir o T-DNA e cuja síntese se processa no sentido 5' para 3'. À medida que a nova molécula de DNA vai sendo sintetizada, a deslocação do complexo enzimático desloca o T-DNA do plasmídeo Ti ao mesmo tempo que substitui o DNA removido (Fig. 78). Durante o processo a proteína *vir* D2 permanece covalentemente ligada à extremidade 5' do T-DNA (Fig. 78) tornando a cadeia menos susceptível a ataques de exonucleases e contribuindo para dirigir o movimento do T-DNA em direcção ao núcleo das células vegetais. Estes dados permitem concluir que o T-DNA não é transportado isoladamente para as células vegetais mas sim sob a forma de um completo T-DNA/proteína. Como já foi referido uma dessas proteínas é a *vir* D2. Outra proteína importante do complexo é a proteína *vir* E2 (69 kDa) que envolve completamente o T-DNA e a proteína *vir* D2 protegendo-os de ataques enzimáticos. Esta proteína pode ser transportada para a célula vegetal envolvendo o completo T-DNA/*Vir* D2 (estima-se que cerca de 600 moléculas de *vir* E2 são necessárias por cada T-DNA com cerca de 20 kb) mas pode também ser transportada de forma autónoma, com o auxílio da proteína *vir* E1 (chaperona), associando-se ao T-DNA e a *vir* D2 apenas no citoplasma da célula vegetal e formando aquilo que se chama o complexo-T maduro. Ao conjunto do T-DNA e das proteínas protectoras é também vulgarmente dado o nome de *firecracker complex* devido à forma que apresenta.

8.5.4. Transporte e integração do T-DNA nas células vegetais

Antes da sua inserção no núcleo das células das plantas, o T-DNA deve ultrapassar uma série de barreiras físicas tais como as membranas interna e externa da bactéria, a parede bacteriana, e a parede celular, membrana celular, citoplasma e invólucro nuclear das células vegetais. A primeira etapa no transporte do T-DNA é a passagem através da membrana bacteriana. Este obstáculo é transposto através da formação de um canal formado por proteínas segregadas pelo operão *vir* B. A proteína *vir* D4 faz também parte do aparelho de transferência e, juntamente com *vir* B formam um sistema de conjugação do tipo IV que existe em muitos procariotas. As proteínas *vir* B formam um *pillus* que permite a passagem do T-DNA da bactéria para a célula a infectar enquanto a proteína *vir* D4 é uma proteína transmembranar em que a maior parte da molécula se situa no interior da célula onde, através da hidrólise de nucleótidos obtém energia para a ligação a complexos proteicos envolvidos no transporte de DNA. Também a proteína *vir* B11 possui um local de ligação ao ATP e actividade ATPásica. O papel de algumas das proteínas codificadas pelo operão *vir* B não está completamente esclarecido. Algumas destas proteínas têm uma função estrutural (*vir* B2, *vir* B4 e *vir* B7), constituindo o *pillus* (poro de conjugação) enquanto outras como *vir* B1 e *vir* B5 parecem ser importantes em sistemas de reconhecimento interagindo com receptores das células vegetais. No entanto, deve salientar-se que o mecanismo através do qual o T-DNA é transferido para as células vegetais está ainda longe da completa elucidação visto que alguns autores verificaram o transporte da proteína *vir* D2 e *vir* E2 independentemente deste sistema. Os dois genes do operão H codificam enzimas envolvidas na degradação de compostos produzidos pelas células vegetais que podem afectar o crescimento de *A. tumefaciens*.

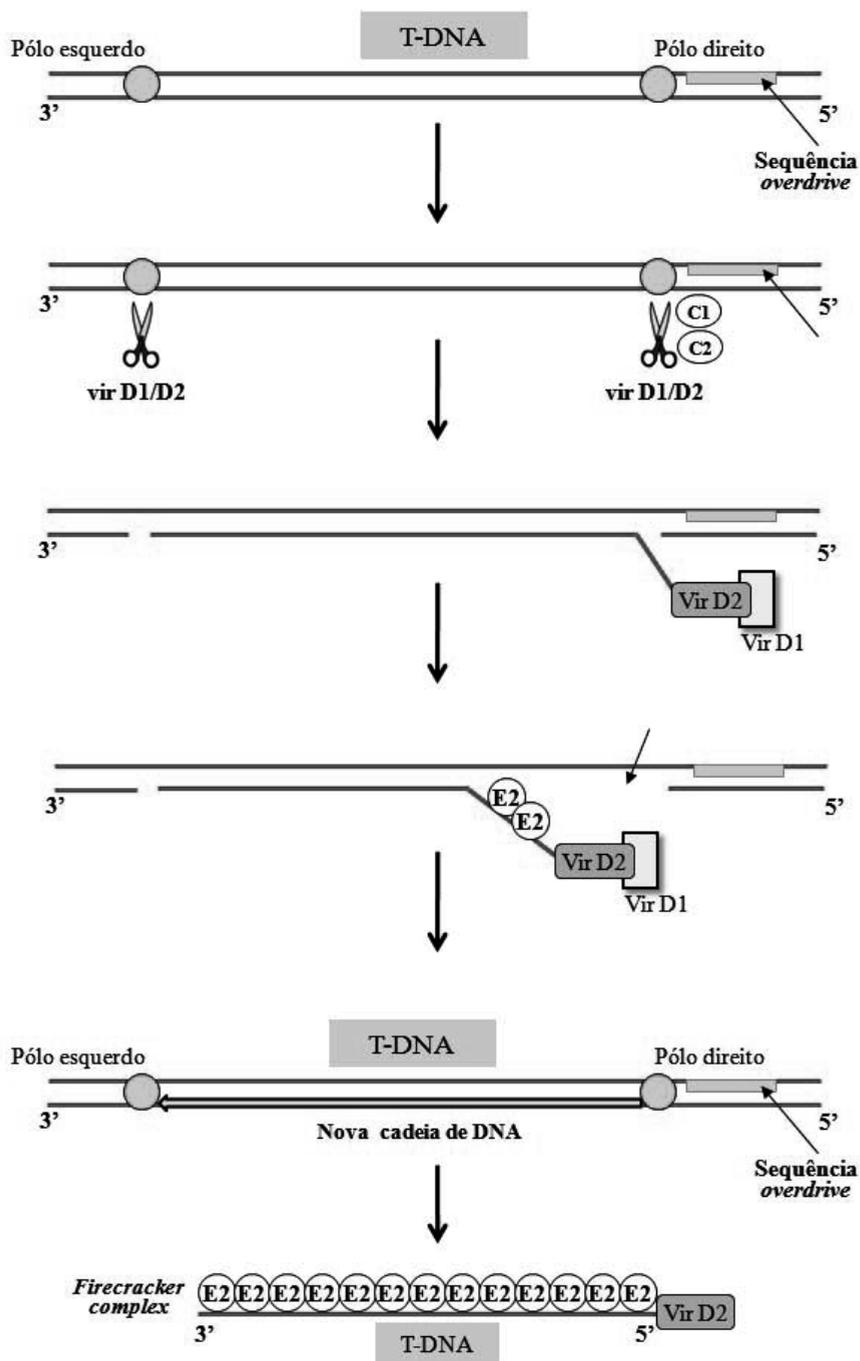


Figura 78 – Síntese do T-DNA e reparação do plasmídeo Ti (adaptado de Chriqui, 1995; Gelvin, 2000; Slater *et al.*, 2008).

Uma vez no citoplasma da célula vegetal, o complexo T-DNA/proteínas deve agora atravessar o invólucro nuclear. O tamanho deste complexo parece exceder o limite de exclusão dos poros do invólucro nuclear. No entanto, a dimensão dos poros pode variar em situações em que se verifica o transporte activo de substâncias sugerindo que possa ser esse o caso no transporte do T-DNA. A proteína vir D2 volta a desempenhar um papel essencial no transporte para o núcleo pois possui duas sequências de localização nuclear (NSL) sendo aquela que se encontra localizada no terminal C a que desempenha um papel mais importante no transporte para o núcleo. A proteína vir D2 interage com um grupo de proteínas da família α -carioferina envolvidas em mecanismos de reconhecimento e transporte através do invólucro nuclear. Outras proteínas vegetais importantes no transporte do T-DNA são as ciclofilinas e alguns tipos de fosfatases e cinases. Assim, verificou-se que a ciclosporina A, um inibidor das ciclofilinas reduz a eficiência da transformação em *Arabidopsis* e no tabaco. Provavelmente este tipo de proteínas auxilia o transporte citoplasmático do complexo T-DNA/proteínas. No que diz respeito aos processos de fosforilação e desfosforilação tem sido sugerido que estes mecanismos actuem como reguladores positivos e negativos, respectivamente, do processo de transformação mediado por *A. tumefaciens*. A proteína vir E2 que como já se referiu envolve completamente o T-DNA possui também NSLs. Esta proteína vir E2 liga-se a uma outra proteína designada VIP1 (do inglês *virE2-interacting protein*) e que é funcionalmente homóloga da proteína bacteriana vir E3. VIP1 e vir E3 parecem auxiliar a interacção de vir E2 com α -carioferina e o transporte para o núcleo. Outra proteína envolvida no processo de transporte do T-DNA é a proteína vir F. Mutantes de *A. tumefaciens* incapazes de produzir vir F são avirulentos. A função de vir F permanece largamente obscura mas é possível que esteja envolvida na proteólise do complexo T-DNA/proteína no interior do núcleo.

Depois da passagem para o núcleo, VIP1 interactua com a histona H2A num mecanismo que direcciona o T-DNA para o local de integração. Antes da integração o complexo deve ser digerido de forma a libertar o T-DNA e neste mecanismo a proteína vir F, desempenha, como já foi referido, um papel importante. Finalmente, o T-DNA é integrado no genoma bacteriano, ao acaso, por um processo designado recombinação ilegítima e que explora

quebras cromossômicas existentes naturalmente no genoma. Ao contrário dos processos de recombinação homóloga, este tipo de recombinação não depende da existência de sequências idênticas entre o DNA do genoma vegetal e o T-DNA bacteriano. Uma vez integrado num dos cromossomas da célula vegetal o T-DNA produz uma cópia complementar passando a existir na forma de cadeia dupla.

Como se pode concluir daquilo que foi referido anteriormente, o processo de integração do T-DNA nas células vegetais é controlado por uma multiplicidade de factores. Alguns dos aspectos do mecanismo de infecção estão bem caracterizados mas existem ainda muitas lacunas no processo que limitam a nossa compreensão do mesmo.

Deste processo infeccioso resultam células vegetais que proliferam devido à produção de níveis elevados de auxina e citocinina e bactérias que encontram onde podem crescer devido à produção de compostos que utilizam no seu metabolismo. Para além disso, as bactérias não perdem qualquer informação genética pois conseguem restaurar o DNAss que perderam sendo ainda capazes, por conjugação bacteriana, de transmitir o plasmídeo Ti a estirpes avirulentas. Este mecanismo de transferência horizontal de genes, único na natureza, constitui um eficaz processo de engenharia genética que os biólogos vegetais, após caracterização do mecanismo de infecção, se apressaram a aproveitar para a transferência de genes de interesse para as células vegetais. Curiosamente, este sistema permite a transferência de genes não apenas para plantas mas também para outras bactérias, fungos e mesmo células humanas abrindo um vasto leque de oportunidades para a manipulação genética de muitos organismos.

A figura 79 resume o processo de infecção provocado por *A. tumefaciens*.

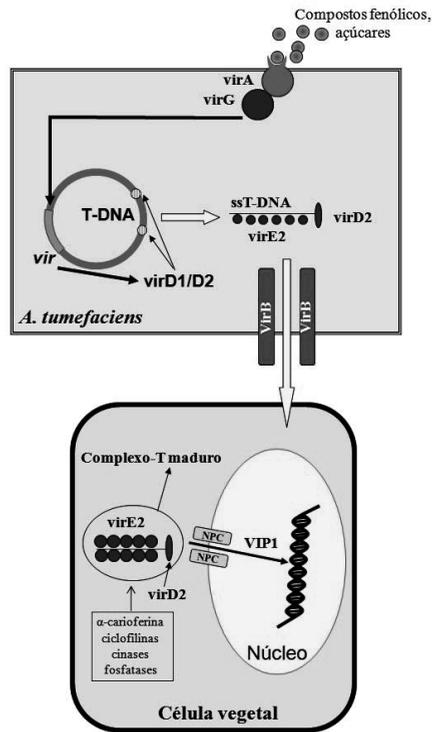


Figura 79 – Infecção das células vegetais por *A. tumefaciens* (com base em Otten, 2001; Anand e Mysore, 2006; Slater, 2008 e Chawla, 2009).

8.6. A utilização de *A. tumefaciens* na transformação experimental de plantas

Uma descoberta importante na caracterização do funcionamento do plasmídeo Ti foi a verificação que o plasmídeo era capaz de transferir outros tipos de DNA para as células das plantas desde que esse DNA estivesse localizado entre os dois pólos. O primeiro DNA a ser transferido foi DNA de *Escherichia coli*, uma bactéria muito utilizada em ensaios de manipulação genética. Esta descoberta mostrou que *A. tumefaciens* poderia ser utilizada como um veículo para a introdução de genes nas plantas permitindo assim a obtenção de plantas geneticamente transformadas. No entanto, para que o plasmídeo Ti possa ser utilizado de forma eficaz é necessário que o plasmídeo seja desarmado, ou seja, que os oncogenes (e também os genes de síntese das opinas) responsáveis pela síntese de

hormonas sejam removidos pois, caso contrário, os tecidos infectados proliferam de forma descontrolada tornando difícil a regeneração de plantas *in vitro*. O desarme da bactéria elimina a capacidade desta causar infecção mas mantém intacto o mecanismo de transferência do DNA. Para além disso, os plasmídeos Ti naturais são muito grandes o que torna difícil a sua manipulação *in vitro* devido à sua tendência para fragmentarem e à ausência de locais únicos de restrição. À remoção dos genes responsáveis pela síntese de hormonas e opinas chama-se desarme do plasmídeo e a sua remoção não afecta o mecanismo de infecção para o qual apenas são imprescindíveis os genes *vir* e os pólos do plasmídeo Ti.

A procura de plasmídeos Ti mais eficazes em termos de transformação genética teve como consequência a obtenção de dois tipos diferentes de vectores para a transferência de DNA para as células vegetais. Um dos tipos de vectores foi designado por vector co-integrado. Neste caso, o DNA que se pretende transferir para as plantas é introduzida num pequeno plasmídeo intermédio o qual não é mais que um plasmídeo de *E. coli* que possui um local de restrição único para a subclonagem dos genes a transferir. Para além destes, deve ser inserido um gene de resistência a um antibiótico (e.g. ampicilina) que permita a selecção das bactérias que possuem os vectores co-integrados quando estas são crescidas na presença do antibiótico correspondente. O plasmídeo intermédio é então transferido por conjugação para uma estirpe de *A. tumefaciens* possuindo um plasmídeo Ti desarmado onde se insere por recombinação homóloga. O resultado é um plasmídeo que possui simultaneamente as regiões *vir* e o DNA que se pretende transferir para as células vegetais, com a região *vir* a controlar o processo de infecção como acontece durante a infecção em condições naturais. Para a obtenção deste tipo de vectores (co-integrados), é necessária a presença de uma estirpe de *E. coli* possuindo um plasmídeo que auxilia (plasmídeo *helper*) a transferência do plasmídeo intermédio para *A. tumefaciens*. O sistema experimental para a obtenção destes vectores é complexo e a obtenção de bactérias possuindo os vectores co-integrados ocorre a baixas frequências (cerca de 10^{-5}). Esta situação levou ao desenvolvimento de vectores mais eficazes como é o caso dos vectores binários.

Ao contrário do que acontece nos vectores co-integrados, a região *vir* e o DNA a transferir não se encontram posicionados no mesmo plasmídeo (*cis*) mas sim em plasmídeos diferentes funcionando em *trans*. Neste tipo de vectores a sequência de DNA a transferir para as células vegetais é inserida num pequeno plasmídeo de *E. coli* que possui os pólos esquerdo e direito. O plasmídeo possui ainda uma origem de replicação compatível com vários tipos de bactérias (incluindo *A. tumefaciens*) e um número variável de locais de restrição entre os pólos que permitem a inserção dos genes a transferir e de genes de resistência a antibióticos. Após inserção (electroporação, choque térmico ou estirpe *helper* de *E. coli*) do plasmídeo numa estirpe desarmada de *A. tumefaciens*, selecção e multiplicação das bactérias transformadas obtém-se uma estirpe que possui o plasmídeo Ti desarmado com a região *vir* e o plasmídeo binário que possui os genes a transferir. A maioria dos sistemas de transformações actualmente utilizados baseiam-se em vectores binários dada a sua mais fácil manipulação e maior eficiência de transformação.

Mais recentemente foram desenvolvidos novos sistemas para a transferência de fragmentos de DNA entre vectores e que se baseiam não na utilização de locais de clonagem, enzimas de restrição e de ligases para manipulação do DNA mas que fazem uso de recombinases que permitem uma transferência mais eficaz de um segmento de DNA de um vector para outro mantendo a sua correcta orientação e funcionalidade numa elevada percentagem. Um dos exemplos é o sistema *Gateway*, desenvolvido pela firma Invitrogen que utiliza uma recombinase de alta especificidade do fago λ . Neste sistema, um fragmento de DNA que se pretenda incorporar num vector é flanqueado por locais de recombinação, que na presença de uma recombinase são capazes de inserir esse DNA num vector que apresente sequências de recombinação homólogas. Este procedimento evita as morosas estratégias de clonagem utilizadas na preparação dos vectores clássicos como os vectores pBIN19 ou pGreen. Outros sistemas que se baseiam num princípio semelhante são o sistema *Creator Cloning* e o sistema *Univector Cloning* que utilizam uma técnica de recombinação mediada pela recombinase CRE do bacteriófago P1.

8.7. Genes quiméricos

282

A transformação genética de plantas com um gene particular implica não apenas a transferência desse gene mas de mais alguns elementos que vão ser necessário para a expressão eficaz do gene na planta. Para além disso, no processo de transformação é também importante poder identificar e/ou seleccionar as plantas transformadas pelo que se torna importante associar ao gene de interesse um gene marcador. Deste modo, as sequências a inserir nas células vegetais são de vários tipos e, no seu conjunto, constituem aquilo a que se chama uma gene quimérico ou uma construção quimérica. Os diferentes elementos de um gene quimérico podem ter diferentes proveniências. Podemos, por exemplo, ter um promotor de origem viral, um gene de interesse de origem vegetal e um gene marcador de origem bacteriana. Em seguida são analisadas algumas particularidades dos diferentes componentes.

Um promotor é uma região a montante de um determinado gene e que controla a sua expressão. O promotor possui regiões de ligação às RNA polimerases bem como regiões que permitem a ligação de factores de transcrição que modulam a expressão de um determinado gene. Existem vários tipos de promotores. Se um promotor permite a expressão de um gene numa vasta gama de células e tecidos diz-se constitutivo. Se, pelo contrário, o promotor apenas funciona em regiões particulares (raízes, pólen, folhas) diz-se que é um promotor específico. Alguns promotores são particularmente úteis pois apenas funcionam depois de induzidos por determinados estímulos (agentes patogénicos, temperatura, compostos químicos, ferimentos), podendo a sua manipulação ser controlada. A expressão de um gene na planta deve estar sob controlo de promotores de origem vegetal ou que funcionem em plantas como acontece com os promotores de alguns vírus que infectam células vegetais. O primeiro promotor utilizado para promover o funcionamento de um gene nas células vegetais foi o promotor do gene da nopalina sintetase (*nos*). O promotor mais utilizado na transformação genética de plantas tem sido o promotor constitutivo do RNA 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV 35 S, do inglês *cauliflower mosaic virus*). Este promotor tem uma eficácia mais reduzida em monocotiledóneas pelo

que neste grupo de plantas têm sido utilizados outros promotores com resultados mais interessantes. É o caso dos promotores da ubiquitina I do milho, da actina-1 do arroz e da enzima álcool desidrogenase. Em algumas situações, a presença de outras sequências otimizam a expressão do gene. Por exemplo, a inclusão de um intrão heterólogo em CaMV 35 S aumenta a actividade do promotor o mesmo se verificando quando um intrão é adicionado à sequência *leader* do promotor da actina-1 do arroz. A presença de um (ou mais) intrão no gene que vai ser expresso aumenta por vezes os níveis de expressão. A adição de uma ou mais cópias da região *enhancer* também pode estimular a actividade do promotor CaMV 35 S.

Para além do promotor os genes quiméricos devem possuir uma sequência de terminação em que o codão stop é seguido de uma cadeia poliadenilada (poliA). No caso de genes que não sejam de origem vegetal esta sequência deve ser adicionada. Normalmente utilizam-se as sequências poliA do gene *nos* de *Agrobacterium* ou do promotor 35 S de CAMV. A ausência de sequências de terminação eficazes pode conduzir à produção de transcriptos anómalos responsáveis pelo inactivação ou silenciamento de genes. Sempre que a proteína a codificar pelo gene de interesse seja uma proteína que interessa que seja expressa num determinado local da célula (por exemplo no retículo), é necessário incluir no início da sequência codificadora uma sequência sinal que facilite o transporte para o local desejado. Por exemplo, a sequência que se utiliza para descolar proteínas para o cloroplasto é a proveniente da subunidade mais pequena da enzima Rubisco.

Finalmente, o gene quimérico deve possuir uma sequência responsável pela produção de um factor que permita a selecção ou a identificação das células transformadas. Esses genes são designados por marcadores e podem ser de dois tipos: genes repórter e genes de selecção. A utilização destes sistemas é importante pois durante o processo de infecção das células vegetais apenas um pequeno número é geneticamente transformado pelo que a sua identificação/selecção é de importância primordial.

Os genes repórter são muito úteis em ensaios de transformação genética pois permitem verificar se o DNA foi inserido nas células vegetais sendo também utilizados para a análise da actividade dos promotores. Um bom gene repórter deve ser não destrutivo e altamente sensível, deve permitir

uma análise quantitativa da expressão, a sua análise deve ser simples e económica e não deve existir qualquer actividade deste gene na planta em condições naturais. Este tipo de genes são, em regra, analisados ao nível da quantificação da proteína para a qual codificam ou de outros produtos do metabolismo (por exemplo opinas). Existem vários tipos de genes repórter. Nas plantas, os mais utilizados são o gene da β -glucuronidase (*uidA* ou *gus*), o gene da proteína GFP (do inglês *green fluorescent protein*) e, com menos frequência, os genes da luciferase (*lux* e *luc*), o gene da enzima cloranfenicol acetiltransferase (*cat*), genes envolvidos na síntese de antocianinas e genes envolvidos na síntese de opinas como sejam o gene da octopina sintetase (*ocs*) e da nopalina sintetase (*nos*).

O gene *gus* é um gene de origem bacteriana responsável pela produção da enzima β -glucuronidase a qual utiliza como substrato glucurónidos dando origem a uma coloração azulada que pode ser facilmente visualizada *in situ*. Os substratos utilizados são o composto X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-glucurónido) que permite a visualização da actividade enzimática por um método histoquímico e o composto 4-MUG (4-metilumbeliferil- β -D-glucurónido) que permite a análise por fluorescência. No primeiro caso, a actividade da enzima dá origem a um precipitado insolúvel de tonalidade azul que pode ser observado *in situ*, funcionando como um marcador visual que permite determinar a localização precisa da expressão do gene (Fig. 80). O método fluorométrico fundamenta-se também na actividade da enzima GUS que converte 4-MUG em 4-MU (4-metilumbeliferona) cuja presença pode ser detectada por fluorescência. Uma modificação deste método permite utilizar como substratos glucurónidos associados a citocininas cuja clivagem resulta na produção de citocininas livres capazes de promover divisões celulares nas células transformadas. Neste caso, o gene funciona quer como repórter quer como gene de selecção. O gene *gus* tem sido muito utilizado em plantas pois é relativamente simples de detectar podendo ser aplicado em ensaios quantitativos ou qualitativos. A sua principal desvantagem resulta do facto de ser necessário provocar a “descoloração” dos tecidos vegetais para observar a sua actividade. Uma vez que o gene *gus* é um gene bacteriano que pode funcionar em *A. tumefaciens* a sua inserção nas células vegetais é feita utilizando uma variante do gene que possui um intrão de forma

a assegurar que a marcação observada resulta de facto da transformação de células vegetais e não da sua expressão em *A. tumafaciens*. Genes com intrões apenas se expressam em eucariotas.

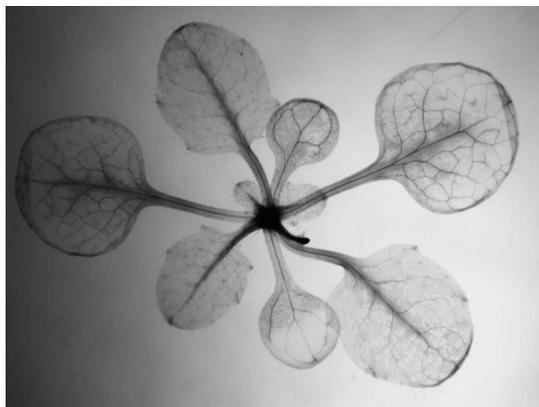


Figura 80 – Detecção do gene *gus* em tecidos de *Arabidopsis*. As zonas escuras correspondem ao local em que o gene *gus* é expresso. Supostamente o gene inserido juntamente com o gene *gus* será expresso nos mesmos locais.

O gene *gfp* é um gene com origem numa alforreca chamada *Aequorea victoria*. Nos últimos anos este sistema tem-se tornado o método mais eficaz para avaliar a expressão dos genes em ensaios de transformação genética. Em condições normais a proteína faz parte de um mecanismo de defesa de *A. victoria* contra predadores funcionando em conjugação com uma outra proteína designada aequarina estando o cálcio envolvido no desencadear da bioluminescência por estas proteínas. Trata-se de uma proteína de 238 aminoácidos associada a um cromóforo (β -hidroxi-benzilidina imidazolinone) que quando submetida a radiação na banda do azul ou do ultra-violeta emite uma fluorescência verde. Quando expressa noutros organismos a proteína não necessita de qualquer co-factor ou da associação com aequarina para emitir fluorescência. Apenas oxigénio e um comprimento de onda adequado são necessários. A fluorescência emitida (Fig. 81) pode ser detectada por microscopia de fluorescência ou por outros métodos permitindo a análise quantitativa e qualitativa da expressão sem que seja necessário adicionar qualquer substrato. Além disso, a avaliação da expressão de um gene ao longo do tempo torna-se mais fácil. Nos últimos anos esta proteína tem sido

objecto de estudos detalhados que levaram à obtenção de GFPs modificadas capazes de emitir fluorescência noutras bandas do espectro permitindo a análise simultânea de diferentes genes. Em 2008, os cientistas O. Shimomura, M. Chalfie e R. Tsien foram galardoados com o Prémio Nobel da Química pelos seus trabalhos nesta proteína. No caso particular das plantas os genes *gfps* utilizados tiveram que sofrer algumas modificações antes de poderem ser utilizados de forma eficaz. Essas modificações permitiram a remoção de um intrão que nas plantas funcionava de forma anómala causando a remoção de um número considerável de nucleótidos do RNAm e a modificação de alguns aminoácidos de forma a tornar a proteína mais análoga a proteínas vegetais.

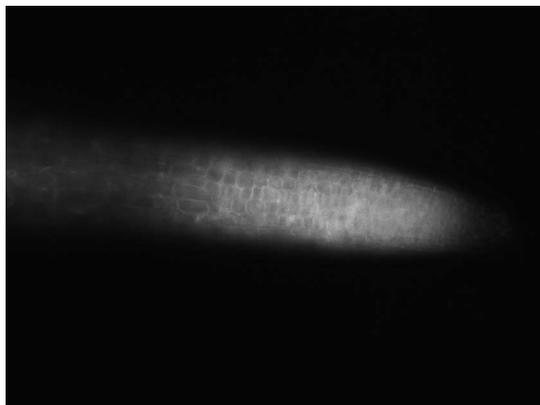


Figura 81 – Detecção do gene *gfp* em células de *Arabidopsis*.

Os genes das luciferases podem ter origens em insectos (pirilampos) ou em bactérias. O gene *luc* do pirilampo *Photinus pyralis* cataliza a oxidação de luciferina e a sua consequente conversão em oxiluciferina na presença de ATP, oxigénio e iões magnésio. A luminescência emitida pode ser registada num luminómetro (ou numa película fotográfica) e quantificada. Os genes bacterianos da luciferase (*luxA* e *luxB*) têm sido obtidos a partir das bactérias *Vibrio harveyi* e *V. fischerii*. As luciferases codificadas por estes genes são responsáveis pela oxidação de aldeídos de cadeia longa da qual resulta a emissão de luz. A emissão de luz é bastante rápida o que associada à necessidade de equipamento específico torna este tipo de procedimento pouco eficaz.

Genes envolvidos na síntese de opinas podem também ser utilizados como genes repórter uma vez que as células não infectadas não produzem opinas. Estes sistemas baseiam-se na análise das opinas ou na medição da actividade das enzimas responsáveis pela sua síntese. Em virtude de implicarem procedimentos experimentais mais elaborados não são muito utilizados. O mesmo se verifica com o gene da cloranfenicol acetil transferase, o primeiro gene bacteriano a ser introduzido em células vegetais, que cataliza a acetilação de cloranfenicol. O ensaio baseia-se na detecção de cloranfenicol acetilado após incubação dos tecidos com cloranfenicol marcado radioactivamente (^{14}C). O facto da realização desta técnica implicar a manipulação de materiais radioactivos tem contribuído para a sua reduzida utilização.

Um último tipo de genes repórter que tem sido utilizado são genes responsáveis pela síntese de antocianinas. Estes pigmentos que se acumulam nos vacúolos das células vegetais e que são responsáveis pela coloração azulada, vermelha ou púrpura de determinadas estruturas vegetais, podem ser usados como marcadores visíveis das células geneticamente transformadas cuja detecção ao microscópio óptico é fácil de concretizar. Genes repórter deste tipo têm sido utilizados em gramíneas como o milho e o trigo tendo a vantagem de ser um método não destrutivo e de não necessitar de substratos. No entanto, as vias de síntese de antocianinas são vias complexas onde interagem várias enzimas e substratos tornando difícil a manipulação destas vias por alteração de um único gene.

Em vários tipos de estudos de transformação genética os genes repórter são muito interessantes pois permitem avaliar se os procedimentos experimentais que estão a ser utilizados são eficazes na transferência dos genes seleccionados para as células vegetais. No entanto, quando os ensaios têm como objectivo final a obtenção de plantas geneticamente modificadas, a utilização de genes de selecção associados ao gene que se pretende inserir nas plantas torna-se imprescindível pois só assim é possível seleccionar as células que de facto incorporaram o gene pretendido daquelas onde essa situação não se verificou, e que são a esmagadora maioria. O princípio da utilização de genes de selecção baseia-se na toxicidade que alguns compostos causam nas células vegetais como é o caso de vários antibióticos

e de herbicidas. Se as células vegetais forem dotadas de mecanismos que permitam a sua sobrevivência na presença do composto tóxico então essas células sobreviverão enquanto as células susceptíveis são eliminadas. O número de genes de selecção actualmente disponível é considerável pelo que apenas se fará referência a um número reduzido de exemplos.

Um dos genes de selecção mais utilizado nos vectores de transformação de células vegetais é o gene da neomicina fosfotransferase II (*nptII*) que confere resistência a antibióticos do tipo dos aminoglicósidos, produzidos por exemplo por bactérias do género *Streptomyces*. Estes antibióticos interferem com a síntese proteica em procariotas e embora as plantas sejam eucariotas a síntese proteica nos cloroplastos também é afectada por estes compostos. O gene *nptII* confere resistência a antibióticos como a geneticina, paromomicina e canamicina sendo este último o mais utilizado nas plantas em concentrações que variam entre os 50 e 500 mg/l. A selecção dos transformantes pode ser obtida através da inclusão do antibiótico no meio de cultura ou da pulverização das plantas obtidas com uma solução contendo o antibiótico. O facto de algumas plantas apresentarem uma resistência natural à canamicina e de outras serem muito sensíveis ao antibiótico, mesmo quando utilizado a baixas concentrações, conduz com alguma frequência à selecção de falsos positivos ou à dificuldade em regenerar plantas a partir das células transformadas. Desta forma, a utilização antibióticos ou de outro qualquer tipo de agente de selecção deve ser monitorizada de forma cuidada com o objectivo de verificar quais as concentrações tóxicas para os tecidos vegetais.

As dificuldades encontradas com a utilização da canamicina levaram à utilização de outros genes de selecção. Assim, o gene da higromicina fosfotransferase (*hpt*), isolado de *E. coli* confere resistência ao antibiótico higromicina B, um composto que bloqueia a síntese proteica. A higromicina é um antibiótico mais tóxico que a canamicina podendo ser utilizada a concentrações mais reduzidas e permitindo uma selecção mais rápida das células transformadas.

A utilização de genes que conferem resistência a herbicidas como genes de selecção baseia-se em princípios análogos ao da utilização de tolerância a herbicidas. De entre os genes de resistência aos herbicidas mais utilizados

destacam-se os genes que conferem resistência ao herbicida bialafos (fosfinotricina) ou ao herbicida bromoxinil. No caso da fosfinotricina, trata-se de um composto que inibe a enzima glutamina sintetase, uma enzima chave do metabolismo do azoto necessária para a formação de glutamina a partir de amónia. A inibição da enzima tem como consequência a acumulação de quantidades elevadas de amónia nos tecidos vegetais que se tornam tóxicas para as células. O gene *bar*, isolado de *Streptomyces hygrosopicus*, codifica a enzima PAT (fosfinotricina acetil transferase) que converte o herbicida numa forma acetilada não tóxica para as células. No caso do bromoxinil, trata-se de um inibidor do fotossistema II. O gene da enzima bromoxinil nitrilase (*bxn*), isolado da bactéria *Klebsiella pneumoniae*, converte o bromoxinil num composto inactivo permitindo que as células cresçam num meio contendo o herbicida.

Um outro tipo de estratégia de selecção consiste em na utilização de fontes alternativas de carbono ou de azoto. Por exemplo, as células vegetais em cultura utilizam normalmente como fonte de carbono a sacarose sendo incapazes de proliferar em meios que tenham fontes de carbono que não são normalmente metabolizáveis. O gene da enzima xilose isomerase (*xylA*), isolado a partir da bactéria *Streptomyces rubiginous*, cataliza a conversão de D-xilose em D-xilulose, um isómero do primeiro composto. As células não transformadas não possuem a capacidade de usar D-xilose como fonte de carbono mas as células transformadas com o gene *xylA* são capazes de crescer num meio contendo D-xilose como única fonte de carbono pois convertem a D-xilose em D-xilulose que é usada como fonte de carbono.

Muitos outros genes de selecção existem pelo que se tornaria exaustivo indicar grande parte deles neste trabalho. Mais informação sobre o assunto pode ser obtida em Slater et al. (2008). A disponibilidade de vários tipos de genes de selecção é vantajosa pois pode permitir uma segunda transformação genética da planta utilizando um tipo de gene de selecção diferente do utilizado numa primeira transformação.

A utilização de genes de selecção que conferem resistência a compostos químicos tem sido criticada por supostamente permitir a criação das chamadas super-ervas ou, no caso dos antibióticos, provocar o aparecimento de estirpes bacterianas resistentes. Este assunto será analisado no capítulo 10.

8.8. A transformação genética de plantas com *A. tumefaciens*

290

O potencial de *A. tumefaciens* para a introdução de DNA em células vegetais tem sido explorado desde os primeiros ensaios de transformação genética até aos nossos dias com o objectivo de obter plantas geneticamente transformadas com as características desejadas. A utilização de *A. tumefaciens* em ensaios de transformação genética implica um protocolo eficaz de transformação e, não menos importante, um eficiente sistema de regeneração que permita obter plantas a partir das células em que o gene de interesse foi inserido. O mesmo se aplica a outros métodos de transformação que serão analisados mais à frente.

Um dos protocolos mais utilizados para a transformação genética de plantas envolve a co-cultura em meio líquido de discos ou segmentos foliares com bactérias de *Agrobacterium* possuindo o vector de transformação (Fig. 82). Como alternativa aos explantes de origem foliar podem utilizar-se outros materiais que apresentem um bom potencial de regeneração. Calos embriogénicos ou com capacidade organogénica são frequentemente utilizados. Neste método, o material vegetal deve estar em condições assépticas e, de preferência, deve ser material que já se encontre estabelecido *in vitro* evitando assim a necessidade de esterilização. As folhas são segmentadas com o auxílio de um bisturi ou são obtidos discos foliares usando um furador de rolhas. Os ferimentos provocados nas plantas induzem a libertação de compostos fenólicos que atraem as bactérias permitindo a ligação das células bacterianas às células vegetais e a formação de células competentes para a infecção. A adição de compostos fenólicos como acetoseringona aumenta, em muitos casos, as taxas de infecção. O processo de transformação inicia-se com o contacto dos tecidos a transformarem com as bactérias que possuem o gene a transferir, um período que pode ser relativamente curto (cerca de 30 minutos). Numa fase seguinte (2 – 4 dias) os discos foliares são removidos do meio de incubação, o excesso de meio eliminado sendo transferidos para um meio de cultura que não contém qualquer agente selectivo para que as bactérias se possam manter e transferir o T-DNA para as células vegetais. Ulteriormente, os explantes são lavados e cultivados num meio de cultura com um antibiótico que elimina as bactérias (e.g. carbenicilina,

cefotaxina). A fase seguinte consiste na selecção das células transformadas. Deste modo, o meio de cultura deve possuir um composto que funciona como um agente selectivo e que como vimos em secções anteriores pode ser um antibiótico, um herbicida ou outro composto, dependendo da estratégia que foi utilizada na obtenção do vector de transformação. A utilização de canamicina como agente selectivo é muito comum nesta fase. Finalmente, é necessário que as células transformadas sejam induzidas a formar plantas. Deste modo, o meio de cultura deve conter as combinações hormonais mais adequadas para o tipo de regeneração que se pretende e que pode ser pela indução de organogénese ou de embriogénese somática. Este tipo de protocolo foi inicialmente desenvolvido para plantas do tabaco pelo que deve ser adaptado a cada espécie ou tipo de explante, em particular no que diz respeito aos meios de cultura, sensibilidade dos tecidos vegetais ao agente de selecção, concentração dos antibióticos e concentrações e combinações hormonais para a regeneração.

A co-cultura com *Agrobacterium* pode também ser realizada utilizando protoplastos em vez de tecidos intactos. O procedimento envolve primeiro o isolamento de protoplastos. Uma vez isolados os protoplastos são cultivados com *A. tumefaciens* a densidades da ordem de 1 protoplasto por 100 células bacterianas. Os procedimentos seguintes envolvem o mesmo tipo de passos que foram indicados para o método dos discos foliares. No entanto, como vimos no capítulo anterior, os protoplastos requerem cuidados especiais de forma a evitar o seu rebentamento. A principal vantagem dos protoplastos é que não possuem parede sendo mais fácil a introdução de moléculas nas células. Por outro lado, como foi referido no capítulo anterior, os ensaios que permitem o isolamento, cultura e regeneração a partir de protoplastos são, em algumas espécies, difíceis de concretizar sendo esse o maior obstáculo à utilização de protoplastos em protocolos de transformação genética de plantas.

A transformação de protoplastos pode também verificar-se sem que se utilize *A. tumefaciens* através de métodos de transferência directa à semelhança do que se verifica na transformação de células animais. Nestas situações o vector é incorporado nos protoplastos através da fusão com lipossomas, microinjecção, sonicação, tratamentos com PEG e cálcio ou electroporação.

A transformação das células vegetais com *A. tumefaciens* apresenta algumas vantagens como sejam o facto de se tratar de um sistema natural capacitado para a introdução de DNA em células vegetais de forma precisa e estável. A capacidade da bactéria transferir fragmentos relativamente longos de DNA para diferentes tipos de órgãos vegetais permitindo a regeneração *in vitro* é também um aspecto interessante. No entanto, existem igualmente limitações importantes que tornam esta bactéria pouco eficaz em determinadas situações. Assim, as monocotiledóneas (onde se incluem os cereais) têm uma reduzida susceptibilidade à infecção com *A. tumefaciens* o que torna desaconselhável a utilização desta bactéria. No entanto, nos últimos anos foram desenvolvidos protocolos eficazes de transformação de cereais utilizando *A. tumefaciens*. Estes protocolos baseiam-se na aplicação do composto fenólico acetoseringona que potencia o processo de infecção e na utilização de estirpes com uma maior capacidade de infecção, chamadas supervirulentas (EHA101 ou EHA105), e que possuem cópias extra de alguns dos genes *vir* tornando-se mais eficazes que as estirpes vulgarmente usadas (e.g. LBA4404). Outra limitação relacionada com *A. tumefaciens* é a dificuldade que frequentemente se observa em conseguir a transformação de tecidos com uma elevada capacidade de regeneração como sejam calos embriogénicos. Esta situação resulta em parte da existência de células embriogénicas em zonas mais interiores dos calos tornando o acesso das bactérias a estas células problemático e da dificuldade em eliminar as bactérias nos calos após a cocultura. A necessidade de utilizar protocolos de regeneração *in vitro*, por vezes durante períodos muito longos de vários meses, causa também algumas limitações como sejam a possibilidade de surgirem contaminações nas culturas ou a ocorrência de variação somaclonal.

Estas limitações têm conduzido ao aparecimento de métodos de transformação genética alternativos que são referidos na secção seguinte.

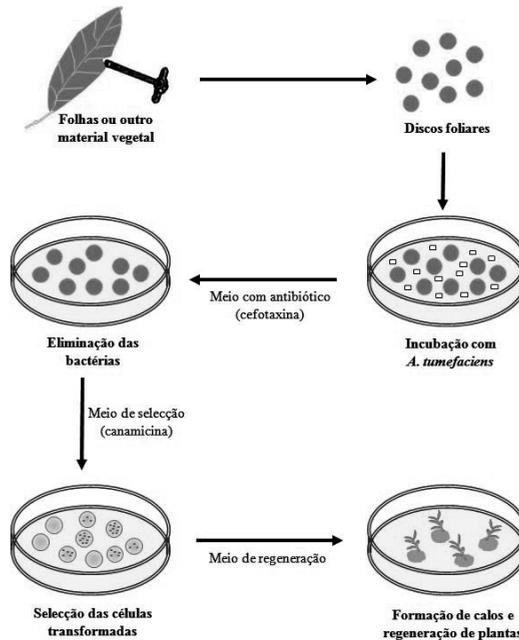


Figura 82 – Protocolo utilizado para a transformação de plantas com *A. tumefaciens*.

8.9. Outros métodos de transformação

Na generalidade das plantas, o principal método alternativo à utilização de *A. tumefaciens* como agente de transformação é a utilização de uma técnica conhecida como bombardeamento de partículas, bombardeamento de microprojectéis ou biolística. O método foi desenvolvido no final dos anos 80 do século passado por J. Sanford e pelos seus colaboradores na Universidade de Cornell, nos Estados Unidos, tendo-se tornado rapidamente um método de eleição para a transformação genética de gramíneas e de outras monocotiledóneas e mesmo de dicotiledóneas. Este método baseia-se na utilização de partículas metálicas de um metal inerte (ouro, paládio, platina, tungsténio), de reduzidas dimensões (0,5 – 3 μm de diâmetro, dependendo do metal) e com uma elevada massa volúmica revestidas com o DNA que se pretende introduzir nas células vegetais e projectadas a altas velocidades (250 - 600 m/s) contra os tecidos a transformar. Um grande número de células na

zona de impacto dos microprojecteis morrem mas aquelas que conseguem sobreviver, e em que o DNA tenha sido incorporado no núcleo podem, nas condições de cultura adequadas, regenerar plantas com o gene de interesse incorporado. Os primeiros aparelhos (canhão de partículas) desenvolvidos com este objectivo utilizavam pólvora para projectar as partículas e, para além do seu preço elevado, tinham o problema dos restos de pólvora poderem ser tóxicos para os tecidos. Esta situação levou ao desenvolvimento de aparelhos mais simples e eficazes. Actualmente, o sistema de propulsão baseia-se na utilização de hélio. Na figura 83 encontra-se uma representação esquemática do processo de transformação utilizando um canhão de partículas. Os tecidos são colocados numa câmara de vácuo a alguma distância (12 – 15 cm) da zona que bloqueia a passagem do macroprojectil onde as micropartículas são inseridas. Quando a pressão de hélio no sistema atinge um determinado valor que pode ser controlado pelo tipo de discos que permitem suportar uma determinada pressão (500 a 1700 psi), o disco rompe e o gás expande impelindo o macroprojectil contendo as micropartículas a alta velocidade. Ao encontrar a barreira que bloqueia o seu movimento o macroprojectil interrompe subitamente a sua trajectória mas a das micropartículas prossegue sendo propulsionadas a alta velocidade contra os tecidos. Uma descrição mais exhaustiva de aparelhos deste tipo pode ser obtida no sítio da empresa BioRad, uma das poucas que comercializa este tipo de instrumentos (<http://www.bio-rad.com>). A preparação das micropartículas é um procedimento experimental simples que envolve a deposição do plasmídeo previamente preparado à superfície das esferas. O DNA é precipitado nas esferas após tratamento com a poliamina espermidina, cloreto de cálcio e, finalmente, etanol. Os microprojecteis suspensos em etanol são colocados numa membrana que é inserida num suporte (macroprojectil) sendo este suporte projectado contra uma barreira que, como já foi referido, permite a passagem das esferas revestidas com o DNA.

Este sistema permite controlar vários parâmetros que podem influenciar o sucesso do processo de transformação, em particular a distância a que os tecidos se encontram, a profundidade a que as partículas penetram nos tecidos e a concentração de DNA. A colocação dos tecidos numa câmara de vácuo permite reduzir a resistência à passagem das micropartículas.

A biolística não implica a utilização de células desprovidas de parede para a transformação uma vez que as partículas conseguem atravessar a parede celular e ficar posicionadas no citoplasma ou no núcleo. As construções para a inserção do DNA de interesse nas células vegetais são também mais simples pois os genes *vir* não são necessários neste tipo de transformação. Análises histológicas têm permitido verificar que uma grande percentagem das células atingidas apresenta partículas no núcleo ou em regiões citoplasmáticas adjacentes ao núcleo. Ao contrário da transformação com *A. tumefaciens* em que os genes *vir* controlam a incorporação do T-DNA nas células vegetais, neste caso a inserção do DNA nas células é um processo puramente físico pelo que a incorporação do DNA de interesse nas células vegetais permanece em grande parte obscura não se conhecendo exactamente de que forma o DNA é libertado das partículas e através de que mecanismo de posiciona nos cromossomas. Esta situação, juntamente com a obtenção de quimeras entre as plantas regeneradas e a ocorrência de rearranjos e inserção de cópias múltiplas do gene no genoma da planta têm sido os principais problemas encontrados na aplicação da biolística como método de transformação genética.

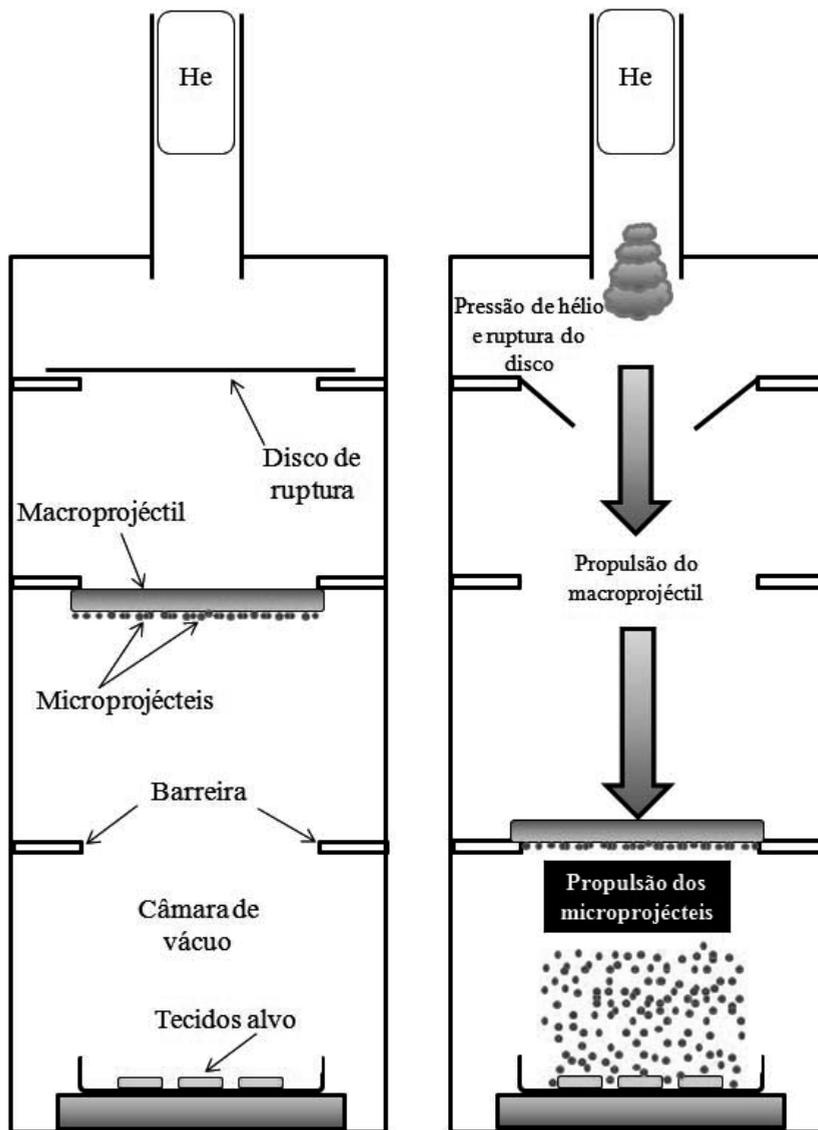


Figura 83 – Transformação de tecidos vegetais por bombardeamento de partículas (adaptado de Kikkert, 2001 e Slater *et al.*, 2008).

Um outro método de transformação foi inicialmente desenvolvido para *Arabidopsis thaliana* sem que até agora tenha sido aplicado de forma muito eficaz em muitas outras espécies. No caso da transformação de *Arabidopsis thaliana*, a planta modelo utilizada em biologia e genética molecular de plantas, o objectivo é não tanto a obtenção de plantas com características

agronômicas particulares mas sim a possibilidade de analisar de que forma os genes se expressam na planta, quais os mecanismos envolvidos no seu controle e a possibilidade de obter mutações pela inserção de fragmentos de DNA num gene provocando assim a sua inativação (perda de função), um processo conhecido como mutagênese de inserção que permite simultaneamente a etiquetagem (*gene tagging*) dos genes alterados. O método designa-se *floral dip* e, ao contrário das técnicas anteriores, trata-se de um processo de transformação em que é utilizada a planta e não células isoladas tecidos ou órgãos, não implicando qualquer processo de cultura *in vitro*, consistindo naquilo a que comumente se convencionou chamar transformação *in planta*. Este método consiste na imersão breve (2 – 3 segundos) das flores numa suspensão bacteriana contendo um surfactante (Silwet L-77 a 0.05%) por altura da fertilização ou nas fases iniciais do desenvolvimento embrionário. Após imersão as flores são colocadas a crescer em condições normais procedendo-se à recolha das sementes na altura própria. Desta forma, o DNA é incorporado nas células do embrião em desenvolvimento cuja linhagem celular dará origem, na planta adulta, aos órgãos reprodutores. A eficiência da transformação é reduzida mas como cada planta de *A. thaliana* pode formar cerca de 10.000 sementes em geral consegue-se obter uma dezena de plantas transformadas por cada planta tratada. Algumas das plantas obtidas podem ser quimeras com zonas transformadas e não transformadas. Variações deste método incluem a embebição de sementes de *A. thaliana* numa suspensão bacteriana durante a noite, introdução das bactérias nas flores por infiltração no vácuo ou a introdução do DNA em zonas meristemáticas. À semelhança dos outros métodos as plantas transformadas devem ser seleccionadas com base no gene de selecção utilizado, normalmente o *nptII*. Para o efeito podem cultivar-se as sementes em solo ou em placas de Petri contendo canamicina. Como alternativa as plantas podem ser pulverizadas com uma solução contendo o mesmo antibiótico.

Os vírus, devido à sua simplicidade em termos de genoma e à capacidade que têm de infectar plantas são bons candidatos a serem utilizados como vectores para a introdução de material genético nas células vegetais. Sequências de ácidos nucleicos virais podem ser incorporadas no plasmídeo

Ti de *A. tumefaciens* e, deste modo, serem incorporadas no genoma das plantas. Este processo é conhecido como agroinfecção ou agroinoculação.

Durante muito tempo, e como resultado de dificuldades de manipulação do RNA, pensou-se que os vírus de DNA de cadeia dupla (caulimovírus) ou única (geminivírus) seriam os ideais para transformar as células vegetais. As modernas técnicas de manipulação dos ácidos nucleicos permitem a conversão de RNA em DNA utilizando a enzima transcriptase inversa o que permite alargar os potenciais vírus a utilizar em sistemas de transformação aos vírus de RNA, que na realidade constituem a maior parte dos vírus que infectam plantas. Os vírus possuem a capacidade de infectar diferentes tipos de células e de rapidamente se espalhar por diferentes partes do corpo, permitindo uma rápida expansão de genes estranhos nas plantas. No entanto, a replicação dos vírus é epissomática, pelo que o seu DNA não se incorpora no genoma da planta o que torna problemática a transformação estável das plantas. No entanto, eles podem ser utilizados em casos em que se pretenda a expressão de uma determinada proteína em células vegetais. Podem também ser úteis em estudos de eficácia de promotores através da expressão transiente (transitória) de um determinado gene. A expressão transiente resulta do facto de um determinado gene, mesmo que não integrado de forma estável no genoma do hospedeiro, se poder exprimir durante um certo período de tempo após o que os mecanismos de defesa das células o silenciam. No entanto, durante esse período de expressão é possível verificar qual o nível de expressão e assim otimizar as condições de transformação. O objectivo do melhoramento de plantas é a expressão estável dos genes inseridos nas plantas para que possam ser transmitidos à descendência mas a análise da expressão transiente tem-se revelado bastante importante para a definição das condições de transformação mais adequadas.

Os vírus têm também sido utilizados em estudos de genómica funcional através do silenciamento de genes e verificação da sua função em termos de desenvolvimento, mecanismos de defesa ou caracterização de vias metabólicas.

Métodos de transformação menos eficazes e com resultados menos reprodutíveis incluem a utilização de fibras de carboneto de silício ou de nanofibras. As fibras de carboneto de silício, designadas por *whiskers*, são

fibras pontiagudas com cerca de 15 a 50 μm de comprimento e 0,5 a 1 μm de diâmetro. As fibras são misturadas com o tecido a transformar e com DNA e agitadas a alta velocidade. As fibras causam ferimentos na parede celular e na membrana que permitem a passagem do DNA para o interior das células. As nanofibras são estruturas de forma piramidal nas quais são depositadas moléculas de DNA. As células são colocadas em contacto com estas fibras que provocam lesões nas membranas e a concomitante entrada do DNA. Este sistema tem sido utilizado em células animais permanecendo a sua utilização em plantas marginal.

8.10. Transformação de organitos citoplasmáticos

De acordo com a hipótese mais aceite, e embora outras teorias possam ser também consideradas, pensa-se que os plastídeos e as mitocôndrias existentes nas células eucariotas terão sido o resultado de uma associação simbiótica de que resultou a inclusão daqueles em células primitivas. Ao longo do processo evolutivo, as actuais mitocôndrias e cloroplastos terão perdido muitas das suas características originais mas outras mantiveram-se. Assim, estes organitos são, de todos os que existem nas células, os únicos a possuírem moléculas de DNA. O DNA das mitocôndrias e plastídeos funciona independentemente do DNA nuclear e replica-se de forma autónoma. O conjunto do DNA extranuclear constitui o genoma citoplasmático o qual, tal como o genoma nuclear pode ser manipulado. Nas células vegetais tem sido dada uma particular atenção ao genoma dos plastídeos (plastoma) e, dentro destes, ao genoma cloroplastidial. Embora variável de espécie para espécie a unidade genómica dos cloroplastos é uma molécula circular de DNA de dupla hélice com cerca de 120 – 180 kb onde se incluem cerca de uma centena de genes. O DNA encontra-se associado a estruturas membranares formando aquilo que se convencionou chamar como nucleóides plastidiais. O número de nucleóides por cloroplasto é variável podendo ir de algumas unidades a mais de uma centena. Uma vez que o número de cloroplastos numa célula do mesófilo foliar pode ultrapassar uma centena isso significa que o número de moléculas de DNA cloroplastidial por célula pode ultrapassar

a dezena de milhar. Quer em termos estruturais quer em termos funcionais, o genoma cloroplastidial é muito semelhante ao de organismos procariotas como sejam algumas cianobactérias. De facto, muitos dos genes cloroplastidiais funcionam em operões e possuem mecanismos de controlo de replicação, transcrição e síntese proteica com nítidas semelhanças com o que se verifica em procariotas. No entanto, descobertas recentes, mostraram que alguns genes cloroplastidiais possuem um funcionamento próximo dos genes eucariotas o que pode significar que durante a evolução, alguns genes nucleares poderão ter sido incorporados no genoma cloroplastidial. Um número considerável de genes do genoma plastidial relaciona-se com a produção de proteínas fotossintéticas em particular aquelas envolvidas na fase luminosa. No entanto, o genoma nuclear tem um papel determinante no funcionamento dos cloroplastos pois calcula-se que mais de 2000 genes nucleares participam na produção de proteínas cloroplastidiais. Essas proteínas são sintetizadas no citoplasma e transferidas para o núcleo com o auxílio de sequências sinal no terminal N.

O elevado número de moléculas de DNA existente em alguns tipos celulares faz da transformação genética dos cloroplastos um procedimento com grande potencial para a expressão de proteínas em elevadas quantidades com eventual aplicação industrial ou farmacêutica.

A primeira transformação genética de cloroplastos foi efectuada numa alga unicelular (*Chlamydomonas reinhardtii*) e, pouco tempo depois, conseguida em plantas de tabaco. Desde estes ensaios pioneiros a planta do tabaco tornou-se um bom sistema para o estudo e compreensão dos mecanismos envolvidos na transformação genética de cloroplastos. A unidade genética de transformação plastidial é o nucleóide. Tendo em consideração o elevado número de moléculas de DNA cloroplastidial por célula a transformação de cloroplastos apenas ocorre em algumas dessas moléculas sendo obtidas células quiméricas com um número reduzido de plastídeos transformados (população heteroplásmica). As plantas com o genoma cloroplastidial transformado são designadas por transplastómicas. Através de uma selecção dos plastídeos transformados durante o processo de regeneração podem obter-se plantas com uma população uniforme (homoplásmica) de plastídeos geneticamente transformados devido à segregação ao acaso

do genoma cloroplastidial durante a divisão dos cloroplastos e à segregação de cloroplastos durante a divisão celular.

Embora outros órgãos possuam também cloroplastos ou outro tipo de plastídeos a transformação genética do plastoma faz-se normalmente em folhas sendo a regeneração de plantas efectuada por organogénese. A técnica de transformação mais comum é o bombardeamento de partículas e os vectores possuem, tal como no caso dos vectores para transformação do genoma nuclear, genes de selecção e/ou marcação com vista a seleccionar as células transformadas. Embora tenham sido referidos alguns casos de transformação de plastídeos com *A. tumefaciens* a utilização desta bactéria não é adequada visto o T-DNA ser dirigido para o núcleo das células vegetais. Os genes de selecção mais utilizados em protocolos de transformação de cloroplastos são o da espectinomicina (gene *aadA* que codifica a enzima aminoglicósido adenil transferase), estreptomomicina e canamicina. No caso da transformação de cloroplastos é possível inserir no vector sequências que flanqueiam os genes de interesse e que permitem a inserção do genes em locais específicos da molécula de DNA cloroplastidial por um processo de recombinação homóloga em que essas sequências apresentam homologia com sequências do DNA do plastídeo. Este tipo de vectores evita a integração ao acaso dos genes no genoma do plastídeo e os consequentes mecanismos de silenciamento que daí poderiam resultar (ver secção seguinte) devido a efeitos posicionais da inserção como acontece no genoma nuclear. À semelhança da transformação genética do genoma nuclear, a transformação do plastoma pode ser utilizada para aplicações básicas ou para aplicações biotecnológicas. No primeiro caso está a possibilidade de obter linhas com genes citoplasmáticos silenciados de maneira a perceber qual a função de um determinado gene. No segundo caso está a possibilidade de conferir às plantas novas características com interesse na agricultura ou na indústria. Os principais sucessos no caso da transformação de cloroplastos têm residido na obtenção de plantas resistentes a herbicidas e a insectos. O número de plantas em que houve sucesso é ainda reduzido (tabaco, tomateiro, batateira, brássicas, soja) mas nos próximos anos espera-se que a manipulação do genoma cloroplastidial possa dar contributos importantes nomeadamente ao nível da expressão heteróloga de proteínas tendo-se verificado que

as proteínas assim produzidas apresentam uma conformação correcta devido à formação de pontes dissulfídicas permitindo uma correcta conformação de proteínas humanas abrindo a porta para a sua produção em larga escala nestes organitos. Além disso, tem sido também possível obter produções elevadas de proteínas dado o nível de ploidia do genoma plastidial. Situações em que mais de 40% das proteínas solúveis presentes no estroma plastidial eram resultado da transformação genética foram assinaladas. A possibilidade dos cloroplastos acumularem as proteínas no seu interior permite evitar a sua modificação citoplasmática bem como preservar proteínas que poderiam apresentar alguma toxicidade e afectar a actividade celular.

A transformação de cloroplastos com genes de origem bacteriana é vantajosa pois os genes funcionam da mesma maneira não sendo necessárias modificações nos codões de forma a tornar os genes mais “adaptados” à maquinaria dos cloroplastos como frequentemente acontece quando esses genes são inseridos no genoma nuclear. Para além disso, os genes procaríotas funcionam em sequências policistrónicas podendo ser incluídos mais que um gene ao mesmo tempo facilitando assim a manipulação de vias metabólicas complexas sendo que algumas vias metabólicas chave das plantas ocorrem ou têm uma componente importante nos plastídeos. Finalmente deve referir-se que em cerca de 70% das angiospérmicas os plastídeos são herdados por via materna não havendo contribuição do genoma plastidial masculino. Esta situação impede a disseminação de pólen com os genes modificados evitando assim a eventual dispersão de genes para espécies vizinhas um dos grandes receios dos grupos ambientalistas relativamente às plantas geneticamente modificadas.

Um dos principais problemas relacionado com a transformação de plastídeos reside no facto de tecidos embriogénicos não clorofilinos, a partir dos quais a regeneração é conseguida em algumas espécies, como acontece com os cereais, possuírem outro tipo de plastídeos (proplastídeos, leucoplastos, amiloplastos) que não cloroplastos. Tais plastídeos apresentam mecanismos de expressão e regulação genética diferente dos cloroplastos e estão pouco estudados em termos moleculares. Neste grupo de plantas, a regeneração a partir de tecidos clorofilinos é difícil o que dificulta a regeneração a partir de células em que ocorreu transformação cloroplastidial.

A transformação de mitocôndrias tem apenas sido referida esporadicamente sem grande impacto em termos de ciência aplicada ou de biotecnologia. As principais dificuldades na manipulação do genoma mitocondrial prendem-se com a dificuldade em introduzir DNA nas mitocôndrias e com a ausência de marcadores de selecção eficazes.

8.11. Expressão dos genes nas plantas

Os protocolos de transformação genética actualmente utilizados para a integração de genes no genoma hospedeiro não permitem ainda a sua integração em locais específicos do genoma nuclear (recombinação ilegítima) uma vez que as plantas não possuem um sistema endógeno que permita recombinação homóloga, ao contrário do que se verifica com a transformação do genoma plastidial. Isto apesar de alguns resultados promissores utilizando um sistema de recombinação mediado por CRE/*loxP* do bacteriófago P1 terem permitido uma recombinação homóloga eficaz. Uma vez inserido no genoma vegetal, de uma forma puramente aleatória, um gene está totalmente dependente da célula hospedeira em termos de mecanismos enzimáticos de replicação, recombinação e reparação do DNA. A forma como estes mecanismos interagem com um DNA estranho é ainda, em grande parte, desconhecida e pode ser responsável por alterações nos padrões de expressão dos genes relativamente ao que seria esperado. Um processo de transformação genética eficaz deve conduzir à inserção de uma única cópia do gene no genoma vegetal sem que a sua inserção modifique a expressão de outros genes. Para além disso, o gene deve integrar-se de forma estável e a sua transmissão aos descendentes deve obedecer às leis da hereditariedade mendeliana. Em situações ideais a inserção de um gene na planta deve conduzir à regeneração de plantas transgênicas (T0) hemizigóticas ou seja possuindo o gene num determinado *locus* de um cromossoma sem que o cromossoma homólogo tenha uma cópia. Por cruzamento destas plantas T0 obtém-se uma geração T1 de plantas em que 50% serão hemizigóticas, 25% de plantas homozigóticas positivas (com o gene inserido localizado no mesmo locus de cromossomas homólogos) e 25% de plantas hemizigóticas

negativas sem qualquer cópia do transgene. Numa terceira geração (T2) as plantas homozigóticas positivas permitem, por autofecundação, a obtenção de linhas 100% homozigóticas para o transgene.

A realidade, porém, mostra que os padrões de inserção de genes numa planta são mais complexos podendo em casos extremos conduzir a mecanismos de inativação genética total ou parcial resultando naquilo a que se chama silenciamento genético. De facto, é muito comum que várias cópias do gene possam ser integradas no genoma em tandem formando concatâmeros, ou que as cópias inseridas sofram rearranjos, inversões, deleções ou outro tipo de modificações estruturais que interfiram com a sua expressão. Este tipo de alterações é mais comum quando se utiliza como método de transformação o bombardeamento de partículas pois o processo de integração depende de parâmetros físicos enquanto na transformação genética baseada em *A. tumefaciens* a integração é condicionada pelas características do sistema de infecção sendo, portanto, um processo mais controlado de que resulta a inserção de um menor número de cópias. À primeira vista poderia supor-se que a inserção de cópias múltiplas de um transgene seria mais favorável pois permitiria níveis de expressão mais elevados. O que se verifica, de facto é precisamente o oposto pois a inserção de uma cópia única com elevada expressão permite não apenas uma melhor actividade do gene como também facilita a análise da hereditariedade do transgene em programas de melhoramento. Pelo contrário, a inserção de várias cópias do DNA no mesmo *locus* ou em *loci* diferentes pode conduzir a padrões de hereditariedade do transgene complexos e difíceis de analisar. Para além do método de transformação, o próprio tecido vegetal onde o DNA é inserido interfere com a forma como o gene se vai inserir no genoma vegetal tendo sido observados grandes variações no número de cópias consoante a inserção ocorre na raiz ou em folhas, por exemplo.

O silenciamento de genes em processos de transformação genética pode ter várias causas e ocorrer a diferentes níveis. Uma das causas que tem sido apontada relaciona-se com a metilação do DNA. De uma maneira geral, a metilação do DNA ao nível da citosina está relacionada com uma redução da transcrição e conseqüente inactividade genética. A metilação do gene inserido pode ser o resultado de um efeito posicional devido à sua integra-

ção em regiões altamente metiladas do genoma ou pode ser o resultado de um mecanismo de defesa da célula hospedeira que reconhece o DNA como estranho inactivando-o através da metilação. Um aumento dos níveis de metilação tem também sido observado quando várias cópias de um mesmo gene se inserem num mesmo local do genoma hospedeiro.

Outro factor que interfere com a expressão de um gene é a sequência de bases presente na sua estrutura. Vários estudos têm mostrado que a inserção de genes ricos em G-C, por exemplo, em zonas do genoma onde predominam as bases A-T pode conduzir à sua inactivação. Também a própria estrutura da cromatina onde o gene é inserido pode condicionar a sua expressão. Regiões heterocromáticas (facultativas ou constitutivas) são zonas do genoma onde a expressão genética é condicionada e a inserção de genes nestas regiões conduz à sua inactivação. A inserção de sequências designadas MAR (*matrix-attachment regions*) que permitem manter uma estrutura da cromatina mais aberta tem sido utilizada em algumas situações para aumentar a expressão dos transgenes.

A homologia de sequências é outra factor importante na expressão dos genes inseridos nas células e pode afectar não apenas a expressão do transgene mas também de genes da célula hospedeira. Um dos mecanismos de silenciamento mais interessantes foi inicialmente observado em petúnias. Nesta espécie a inserção de um gene envolvido na síntese da enzima chalcona sintetase, responsável pela síntese de um pigmento floral com o objectivo de aumentar a produção desse mesmo pigmento e produzir flores com uma cor purpúrea mais intensa, levou ao aparecimento de plantas com folhas brancas ou variegadas. Estes padrões florais resultaram da inserção de um gene na planta homólogo a um gene já existente no genoma. O resultado é a inactivação dos dois genes ou de qualquer um deles. Este mecanismo foi designado co-supressão e ao contrário da metilação que pode ocorrer ao nível da transcrição, é um mecanismo de silenciamento pós-transcricional (PTGS, do inglês *post-transcriptional gene silencing*) que envolve a degradação a formação de pequenas moléculas de RNA de cadeia dupla designadas siRNAs (*small interfering RNAs*) envolvidas num mecanismo de degradação do RNAm que leva à inactivação dos genes envolvidos. A descoberta deste mecanismo de co-supressão em plantas e noutros organismos levou

à identificação de novos mecanismos de controlo da expressão genética com importantes aplicações em medicina e no melhoramento de plantas e que permitiram a A. Fire e C. Mello ganhar o Prémio Nobel da Medicina e Fisiologia em 2006 pelos seus trabalhos nesta área.

Estes dados permitem concluir que a inserção no genoma de um transgene ou mesmo de um gene homólogo deve ser criteriosamente acompanhada desde o número de cópias até ao controlo da sua expressão nas plantas geneticamente modificadas e nos descendentes onde modificações epigenéticas podem ocorrer. O número de cópias pode ser verificado por técnicas como *Southern blot* podendo os dados ser complementados por RT-PCR (*real time PCR*) enquanto técnicas citogenéticas como FISH (*fluorescent in situ hybridization*) podem dar uma ideia do local de inserção dos genes no genoma. A expressão (ao nível do RNAm) pode ser analisada por *northern blot* ou por RT-PCR (*reverse transcriptase PCR*). O nível de proteína produzido pelo gene pode também ser avaliado por *western blot* ou por testes ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*).

CAP. 9. PLANTAS COM NOVAS CARACTERÍSTICAS OBTIDAS POR TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA

9.1. Introdução

No capítulo anterior foram analisados os princípios e as técnicas subjacentes à transformação genética de plantas por metodologias que permitem a manipulação do DNA em condições laboratoriais e sua inserção nas células vegetais. Importa agora analisar de que forma esses procedimentos experimentais têm sido aplicados na obtenção de plantas com novas características e que estratégias têm sido utilizadas para aumentar a produção ou reduzir as perdas das colheitas resultantes de factores ambientais adversos ou da interacção com outros organismos ou ervas-daninhas. Milhares de artigos científicos têm sido publicados sobre este tema existindo actualmente protocolos de transformação genética para as principais espécies de interesse económico. Os tipos de plantas produzidas em condições experimentais são também muito variadas indo desde a resistência a factores bióticos ou abióticos até à produção de proteínas recombinantes com interesse farmacêutico ou à modificação dos alimentos para que possam suprir deficiências nutritivas resultantes de dietas alimentares deficientes. No entanto, uma coisa é a produção de plantas transgênicas em condições laboratoriais e outra bem diferente é a produção dessas plantas a uma escala muito maior resultante da sua utilização em termos agrícolas ou industriais. Desta forma, o número de espécies em que se obtiveram plantas geneticamente modificadas para uma produção a uma escala superior é muito reduzido em comparação com a literatura científica publicada sobre o tema o mesmo se

podendo dizer das características manipuladas. Vários factores contribuem para esta situação como sejam as dificuldades técnicas relacionadas com o próprio processo de obtenção de plantas geneticamente transformadas, a necessidade de um investimento avultado de alto risco que só algumas empresas ou instituições são capazes de suportar e, não menos importante, a apertada legislação que, de uma forma abusiva em comparação com outros métodos de melhoramento, limita a possibilidade de colocar no campo e nos circuitos comerciais este tipo de plantas ou os seus derivados, como será analisado em mais detalhe no capítulo seguinte.

Apesar destas limitações, são cada vez mais os agricultores interessados nesta tecnologia cuja aplicação tem consistentemente aumentado desde que as primeiras plantas geneticamente modificadas foram autorizadas. Segundo os últimos dados fornecidos pela ISAAA, relativos a 2009, as plantas geneticamente modificadas cultivadas são essencialmente o milho, algodoeiro, a colza e a soja mantendo-se esta situação inalterada desde que as PGMs são comercializadas em larga escala. Também as características destas PGMs se têm mantido incidindo sobre a resistência a insectos e/ou herbicidas. No entanto, os progressos verificados nos últimos anos em termos de genética funcional, associados à sequenciação do genoma num número cada vez maior de espécies de plantas e aos métodos cada vez mais eficazes de manipulação do DNA e de transformação genética de plantas têm permitido progressos assinaláveis na obtenção de PGMs, esperando-se que nos próximos anos um grande número de plantas com novas características possa chegar aos agricultores e consumidores.

Seria fastidioso referir neste capítulo de forma detalhada todos os tipos de manipulações que têm sido realizados com vista à introdução de novas características nas plantas. Deste modo, será apenas feita referência aos principais tipos de PGMs já cultivadas mais utilizados bem como às estratégias que levaram à sua obtenção. Serão ainda analisadas estratégias que num futuro próximo conduzirão à obtenção de PGMs com novas características bem como estratégias de transformação que se pensa possam vir a ter algum interesse nos próximos anos. Deve ainda alertar-se o leitor para o facto deste tipo de investigação ser em grande parte realizado ou financiado por empresas que, por razões económicas facilmente compre-

ensíveis, evitam a disseminação dos resultados antes de poderem patentear ou comercializar as suas descobertas. Deste modo, é natural que plantas com novas características possam surgir brevemente sem que no momento actual se suspeite que particularidades irão apresentar.

9.2. Plantas tolerantes a herbicidas

O combate às ervas-daninhas está, com grande probabilidade, entre as profissões mais antigas praticadas pelos humanos. A cultura de espécies agrícolas está associada, de forma muito estreita, à proliferação de outras espécies vegetais que competem com as culturas pelos mais variados factores como sejam a luz, água e elementos minerais contribuindo também para a propagação de doenças que afectam as plantas. Quem tem um pedaço de quintal com relva ou com qualquer tipo de cultura sabe, por experiência própria, que a eliminação deste tipo de vegetação é essencial para que as plantas cultivadas possam crescer de maneira eficaz.

A eliminação das ervas-daninhas começou por ser uma actividade manual situação que ainda hoje se verifica em muitas circunstâncias, tratando-se de um trabalho que requer um enorme esforço físico e que está longe de ser compensado pelos modestos salários de quem o pratica. Para além disso, nos locais onde ainda se realiza é um serviço essencialmente feminino, o que é muitas vezes justificado pelos empregadores para pagarem salários mais baixos. Com a mecanização da agricultura, o combate às ervas-daninhas passou a ser feito de forma mais eficaz, reduzindo a componente humana mas, por outro lado, aumentando os gastos de energia e a degradação dos solos e alterando a estrutura dos terrenos agrícolas tornando-os mais compactos e menos capazes de reter a água. A fase seguinte desta luta contra estes persistentes invasores foi a utilização de produtos químicos, vulgarmente chamados herbicidas que interferem com o crescimento das ervas-daninhas. A utilização de herbicidas, embora eficaz em muitas situações, trouxe também outros problemas. A contaminação dos habitats e os efeitos colaterais noutras espécies são impactos negativos da utilização dos herbicidas. De salientar ainda que as culturas agrícolas tal como

as ervas-daninhas também são plantas pelo que a aplicação de herbicidas não selectivos pode interferir com o seu desenvolvimento. Outro factor a considerar é o inevitável aparecimento de plantas resistentes aos herbicidas situação que só pode ser contornada pelo desenvolvimento de compostos químicos mais eficazes. Finalmente, deve referir-se que nenhum herbicida por mais eficaz que seja foi ainda capaz de resolver de forma definitiva o problema das ervas-daninhas. A eliminação de um tipo de erva-daninha é normalmente acompanhada pelo aparecimento de uma outra espécie que preenche a lacuna deixada pela anterior e que coloca novos desafios aos agricultores com vista à sua eliminação. É como combater um exército que é sempre capaz de compensar as baixas sofridas com soldados melhor preparados para a luta.

Existem vários tipos de herbicidas que podem ser divididos de acordo com o modo de acção, a forma como são absorvidos pelas plantas, o grau de translocação nos tecidos vegetais ou mesmo a altura em que são aplicados. Em termos de selectividade os herbicidas podem ser selectivos ou não selectivos. Os herbicidas selectivos como o nome indica, afectam tipos particulares de plantas através, por exemplo, da inibição de uma via metabólica específica que não existe nas plantas que se pretende proteger. O desenvolvimento de herbicidas selectivos é difícil em virtude da heterogeneidade das plantas cultivadas e do facto delas terem mecanismos de desenvolvimento idênticos aos das ervas-daninhas. Os herbicidas não selectivos têm um espectro de acção mais alargado mas possuem o inconveniente de afectarem de forma mais intensa as plantas cultivadas pelo que a sua aplicação tem que ser feita em situações em que a planta a proteger não possa ser afectada, por exemplo antes do seu crescimento.

O problema das ervas-daninhas é variável de região para região e está também dependente do tipo de plantas utilizadas em termos agrícolas e dos próprios métodos utilizados na agricultura e na condução das culturas. No entanto, estima-se que as ervas-daninhas sejam responsáveis por perdas nas culturas da ordem dos 10-15% a nível global apesar dos avultados investimentos que os agricultores anualmente fazem na compra e aplicação de herbicidas.

Nesta sequência de metodologias que vem sendo aplicada ao combate das ervas-daninhas surgiram, mais recentemente as plantas geneticamente modificadas tolerantes a herbicidas. O princípio subjacente a esta nova estratégia baseia-se no facto das plantas serem capazes de tolerar a aplicação de herbicidas de espectro largo, como o Roundup cujo composto activo é o glifosato, por possuírem algum tipo de mecanismo que as protege do herbicida e que lhes foi conferido pela inserção de um gene através de métodos de manipulação genética. Deste modo, o herbicida pode ser aplicado em qualquer fase do desenvolvimento da planta sem que a sua aplicação cause danos nas culturas. Pelo contrário, outras plantas presentes no mesmo local são inibidas pois não têm mecanismos de protecção.

O exemplo mais comum de resistência a um herbicida obtida por manipulação genética é a resistência ao herbicida glifosato conferido a várias espécies como soja, algodoeiro ou milho e que é, refira-se, a característica mais difundida entre as PGMs com maior impacto em termos de produção agrícola e as plantas de soja com esta característica (soja RoundUp Ready) foram das primeiras a ser autorizadas e usadas de forma intensiva em termos agrícolas. O glifosato é um composto derivado do aminoácido glicina muito parecido em termos estruturais com o fosfoenolpiruvato, um metabolito essencial para a formação do ácido chiquímico. A via do ácido chiquímico (Fig. 84) que ocorre nos cloroplastos é uma via metabólica crucial para as plantas pois conduz à produção de aminoácidos aromáticos como tirosina, triptofano e fenilalanina. Estes aminoácidos são essenciais para o desenvolvimento das plantas e sem a sua formação estas rapidamente morrem. Por exemplo, o triptofano é um precursor das auxinas (capítulo 2) enquanto a fenilalanina é essencial para a produção de lenhina, um composto estrutural da parede de alguns tipos celulares vegetais. Na presença de glifosato (um composto muito semelhante ao PEP - fosfoenolpiruvato) a enzima EPSPS (5-enolpiruvil chiquimato-3-fosfato sintetase) é incapaz de formar quantidades adequadas do composto EPSP (5-enolpiruvil chiquimato-3-fosfato) e, em consequência disso, dos compostos que se situam a jusante na via metabólica. O glifosato é um herbicida não tóxico para os animais (não possuem a via do ácido chiquímico),

efectivo a baixas concentrações e facilmente degradado por microrganismos do solo, não permanecendo nos ecossistemas durante muito tempo.

A obtenção de plantas tolerantes a herbicidas tem sido conseguida seguindo diferentes tipos de estratégias. Uma dessas estratégias consiste na transformação genética de plantas com um gene que codifica para uma forma de EPSPS que é funcional em plantas mas insensível ao herbicida. Neste caso trata-se de um gene de origem vegetal que foi inicialmente isolado de uma linha de *Petunia hybrida* obtida após selecção para o glifosato. Uma estratégia semelhante consiste em utilizar um gene de origem bacteriana insensível ao glifosato. Neste último caso e como se trata de um gene de origem bacteriana a sequência a inserir nas células vegetais deve codificar também para um peptídeo sinal que permita o trânsito de EPSPS para os cloroplastos onde irá exercer a sua actividade. Finalmente existe uma estratégia baseada na degradação de glifosato. Neste caso tem sido utilizada uma estratégia dupla em que se utiliza simultaneamente um gene de *Agrobacterium* insensível ao glifosato e um gene de responsável pela síntese da enzima glifosato oxidase que degrada o glifosato impedindo a sua acumulação nos tecidos.

Um outro herbicida que tem sido alvo de estudos de tolerância é uma formulação comercializada com o nome de Basta ou Liberty cujo princípio activo é a fosfinotricina (PTT), um sal de amónio do glufosinato. O composto PPT é derivado de um produto natural conhecido como Bialaphos, um tripeptídeo de PPT-Ala-Ala produzido por bactérias do género *Streptomyces*. Por remoção proteolítica dos resíduos de alanina o Bialaphos é convertido na sua forma activa que inibe a enzima glutamina sintetase essencial para o metabolismo do azoto e que é responsável pela síntese do aminoácido glutamina. A enzima utiliza amónio para a produção do aminoácido. A inibição da enzima conduz à acumulação de amónia que atinge níveis tóxicos para a planta. Neste caso a estratégia seguida foi inserir nas plantas um gene que inactiva o herbicida. Esse gene é proveniente de bactérias da espécie *Streptomyces hygrosopicus* que produzem a enzima fosfinotricina acetiltransferase que inactiva a fosfinotricina. O gene *bar*, responsável pela produção desta enzima, foi isolado e inserido em plantas conferindo a resistência à fosfinotricina por destoxificação.

adultos ou as suas larvas podem ser combatidos pela aplicação de pesticidas que, tal como os herbicidas, podem ser responsáveis por danos ambientais. Para além disso, a aplicação de pesticidas implica gastos acrescidos para os produtores com o conseqüente impacto do aumento de preços nos consumidores.

À semelhança do que se verifica com a tolerância a ervas-daninhas têm também sido desenvolvidas estratégias de forma a obter, por engenharia genética, plantas resistentes a insectos. Numa altura em que a procura de insecticidas de origem biológica com reduzidos impactos ambientais é um objectivo perseguido por muitos dos actores envolvidos no melhoramento de plantas importa referir que um herbicida biológico existe há muito tempo e tem sido utilizado de forma sistemática para combater os efeitos de alguns insectos nas plantas. Esse insecticida biológico é conhecido pelo nome de toxina Bt devido ao facto de ser produzido pela bactéria do solo *Bacillus thuringiensis*. Estas bactérias Gram⁺ produzem endósporos e nesse tipo particular de esporos acumulam-se, sob a forma de cristais, proteínas designadas CRY (primeiras letras de *crystal*) com um peso molecular que pode variar entre 70 e mais de 150 kDa em função do tipo de endotoxina. Uma mesma subespécie ou estirpe de *B. thuringiensis* é capaz de produzir diferentes endotoxinas (δ -endotoxinas) sendo cada uma delas mais eficaz contra um tipo particular de insectos. Por exemplo as endotoxinas da subespécie *kurstaki*, pertencentes à família CRY1, são mais eficazes contra lepidópteros enquanto algumas das endotoxinas produzidas pela subespécie *japonensis* são mais eficazes contra coleópteros sendo conhecidos mais de 50 holótipos destas endotoxinas. As endotoxinas são codificadas por genes plasmidiais e apresentam actividade específica para diferentes grupos de insectos como coleópteros, dípteros, himenópteros lepidópteros e mesmo nemátodes. Em condições naturais a ingestão pelas larvas de insectos dos cristais proteicos é seguida da sua solubilização e ulterior digestão por proteases específicas no aparelho digestivo dos insectos onde o pH é alcalino (≥ 8). O resultado é a produção de uma potente toxina (cerca de 70 kDa) capaz de se inserir nas membranas microvilares das células epiteliais do aparelho digestivo onde se liga a um receptor de certas células intestinais e funciona como um poro levando

a um fluxo de catiões para as células com a consequente lise osmótica e ulterior morte das larvas (Fig. 85).

A pulverização das culturas com esporos de *B. thuringiensis* é uma prática agrícola efectuada desde há muito com o objectivo de combater pragas de insectos sendo, inclusive, uma metodologia utilizada em sistemas de agricultura orgânica devido aos reduzidos impactos ambientais que provoca uma vez que a toxina não afecta mamíferos ou os seres humanos sendo ainda de fácil aplicação. Os diferentes tipos de receptores existentes nas células do sistema digestivo das larvas condicionam a capacidade de diferentes tipos de toxinas infectarem as células. Também o pH do aparelho digestivo dos diferentes insectos interfere com a maior ou menor solubilização dos diferentes tipos de cristais proteicos. A pulverização das culturas com este tipo de insecticida (na forma de esporos ou cristais) é muitas vezes pouco eficaz devido ao facto da toxina permanecer durante um período limitado (cerca de dois dias no caso dos cristais proteicos) no meio ambiente e de não permitir o ataque a insectos que se encontram nos tecidos internos da planta.

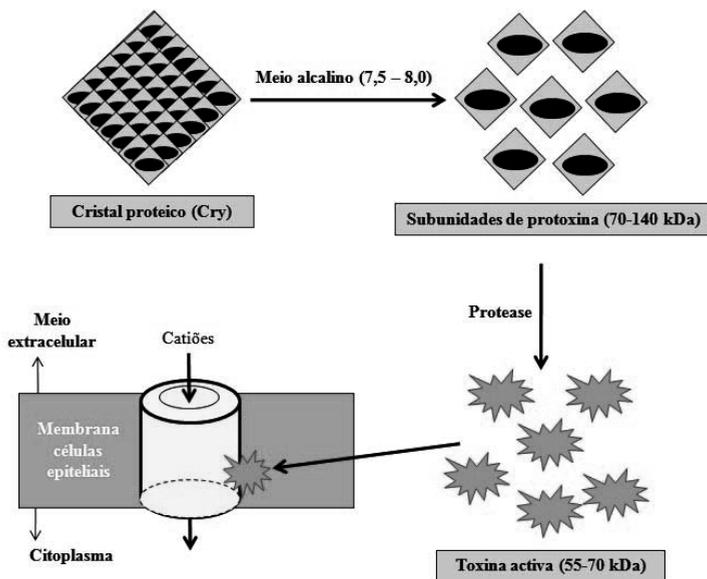


Figura 85 – Modo de acção das proteínas digestão e acção das proteínas CRY de *B. thuringiensis*.

Com base neste sistema natural foram desenvolvidas linhas de investigação com o objectivo de caracterizar o gene responsável pela síntese da toxina de forma a inseri-lo em plantas podendo estas produzir a sua própria toxina (produção *in planta*) e assim combater os insectos prejudiciais. Um dos casos de maior sucesso com base nesta estratégia foi a obtenção de variedades de milho capazes de produzir a toxina CRY1A. As plantas assim obtidas são tolerantes a uma doença chamada broca-do-milho provocada pelas larvas da espécie *Ostrinia nubilalis*, um lepidóptero capaz de digerir os tecidos internos do caule e das maçarocas. As larvas deste insecto causam só por si um grande impacto nas culturas mas são também responsáveis pelo aparecimento de ataques secundários de fungos que potenciam a devastação das culturas e são produtores, em algumas situações, de toxinas que podem ter efeitos muito graves em termos de saúde pública.

As primeiras tentativas de inserir o gene responsável pela síntese da toxina em plantas tiveram um sucesso limitado pois a quantidade de toxina produzida pelas células era limitada. Esta situação resultava em grande parte do gene ser procariótico tendo sido necessário moldá-lo de forma a torná-lo “mais eucariótico” para que os níveis de expressão em células vegetais pudessem ser mais consentâneos com a aplicação prática desta tecnologia. Uma dessas modificações foi a redução do teor em bases A-T e um aumento das bases G-C com o objectivo de facilitar a leitura dos codões durante o processo de síntese proteica nas células vegetais. Outras modificações que se revelaram importantes foram a remoção de potenciais locais de poliadenilação e a utilização de uma versão truncada (mais curta) do gene responsável pela síntese da toxina. O gene da toxina é associado a um promotor forte de maneira a promover a sua expressão em diferentes locais da planta e, com este tipo de modificações, conseguiram-se níveis de expressão elevados correspondentes a cerca de 0,01 a 0,03% da proteína total. Níveis de expressão mais elevados poderão ser obtidos através da transformação cloroplastidial uma vez que o transgene é de origem bacteriana (ver capítulo 8).

As primeiras variedades de milho *Bt* foram inicialmente comercializadas nos Estados Unidos, em 1996, e três anos depois, em 1999, cerca de 25% do milho cultivado nos Estados Unidos era milho deste tipo. Actualmen-

te esses valores ultrapassam em muito os 50%. A tecnologia *Bt* tem sido utilizada também com sucesso noutras plantas sendo de destacar o caso do algodoeiro. Em Portugal foram feitos nos últimos anos alguns ensaios pioneiros com milho *Bt* tendo a resposta dos agricultores sido positiva. A eficiência desta tecnologia depende como é óbvio da severidade dos ataques dos insectos e, em anos em que as condições climáticas são menos propícias à proliferação dos insectos, os efeitos positivos da tecnologia *Bt* têm menos impacto nos rendimentos dos agricultores que em anos em que as pragas são mais agressivas.

A introdução de variedades *Bt* de milho e algodoeiro beneficia as companhias produtoras de semente e os agricultores que vêem os seus rendimentos aumentados devido à maior produtividade das culturas e também devido à redução dos gastos com pesticidas e fungicidas. De uma forma directa os consumidores podem beneficiar de uma redução do preço caso os produtores façam reflectir o abaixamento de custos na comercialização do produto. Por outro lado, o milho *Bt* permite a obtenção de grãos de melhor qualidade sanitária uma vez que se trata de grãos mais “limpos” no sentido em que a utilização de pesticidas é reduzida e também na perspectiva que a ausência de danos devido aos insectos reduz o aparecimento de doenças secundárias de origem bacteriana ou fúngica responsáveis pela produção de toxinas nefastas para os consumidores. Finalmente, a potencial redução da aplicação de pesticidas não pode deixar de ser referida como tendo um impacto positivo directo em termos ambientais e indirecto na medida em que a redução da utilização de pesticidas implica também uma redução da pegada ecológica e das emissões de CO₂.

A obtenção de plantas resistentes é um exemplo ilustrativo do potencial da transformação genética aplicada ao melhoramento de plantas, mas é também um bom exemplo das dificuldades que são precisas ultrapassar até à obtenção dos resultados desejados.

A produção de variedades *Bt* não é a única estratégia que pode ser utilizada no combate a insectos ou outras pragas que afectam plantas. Outras estratégias que envolvem a produção de plantas geneticamente transformadas têm também sido seguidas com o objectivo de encontrar métodos alternativos de combate às diferentes pragas. À semelhança das variedades *Bt* o objec-

tivo é identificar e transferir para as plantas genes que estejam envolvidos directa ou indirectamente na produção de proteínas ou outros metabolitos que interfiram com o ciclo de vida dos organismos alvo. Exemplos dessas estratégias são a utilização de venenos de escorpiões e aranhas, proteínas que interferem com a digestão, inibindo a actividade digestiva de proteases ou amilases no sistema digestivo dos insectos, a produção de metabolitos tóxicos para os insectos ou a produção de lecitinas, um tipo particular de glicoproteínas que têm uma forte capacidade de se ligar a outras proteínas e que podem ser muito úteis no combate a insectos sugadores.

9.4. Plantas resistentes a agentes patogénicos

Para além das ervas-daninhas e das pragas referidas nas secções anteriores as plantas estão sujeitas a ataques por uma grande variedade de organismos que podem também causar danos importantes nas culturas e que vão desde vírus a bactérias e fungos. Um pouco à semelhança do que tem sido realizado para a obtenção de resistência a pragas de insectos, têm também sido feitos esforços para a obtenção de plantas geneticamente modificadas resistentes a diferentes tipos de doenças.

Existe uma grande diversidade de vírus vegetais alguns deles capazes de infectar diferentes espécies. Muitos dos vírus vegetais são vírus de RNA de cadeia única positiva mas também no que diz respeito à organização do genoma existe uma grande variabilidade sendo conhecidos vírus de DNA de cadeia dupla ou vírus de RNA de cadeia única negativa. Os vírus vegetais são um grande problema para muitas das plantas cultivadas uma vez que, ao contrário dos animais, as plantas não apresentam um mecanismo de defesa imunitário. As infecções reduzem a produção e o crescimento das culturas podendo mesmo levar à morte das plantas. Para se ter uma ideia dos danos causados importa referir as perdas anuais de cerca de 50 milhões de dólares causadas por vírus apenas na indústria de tomate nos Estados Unidos. O combate aos vírus de plantas é difícil por não existirem compostos químicos eficazes. Muitas vezes a solução está em combater os vectores responsáveis pela propagação dos vírus (insectos, nemátodes, fun-

gos) com pesticidas agressivos em termos ambientais ou manter as plantas em quarentena de forma a evitar danos mais severos nas culturas. Como foi referido no capítulo 3, a micropropagação através da cultura de meristemas e associada a uma termoterapia permite a obtenção de plantas livres de vírus mas esta situação não confere nenhuma protecção às plantas contra ulteriores infecções virais. Também nesta situação, a transformação genética de plantas pode revelar-se uma tecnologia promissora no combate aos vírus.

Observações realizadas nos anos 20 do século passado em plantas infectadas com vírus mostraram que estas plantas apresentavam resistência à infecção por estirpes mais virulentas do mesmo tipo de vírus ou mesmo contra vírus de outros tipos. Este processo foi designada protecção cruzada e, embora o mecanismo da protecção cruzada não seja inteiramente conhecido, uma proteína da cápsula do vírus parece ser a responsável por este efeito protector. Dados experimentais mostram que mecanismo de protecção cruzada está relacionado com a inibição do vírus replicar no local de infecção em virtude da incapacidade de sintetizar proteínas da cápsula. Para além disso, a protecção cruzada reduz de forma considerável os potenciais locais de infecção sugerindo que algum mecanismo relacionado com as fases iniciais de replicação do vírus se encontra afectado. O sistema de protecção cruzada foi utilizada em algumas situações para combater vírus que causam danos importantes nas culturas como sejam o vírus da tristeza dos citrinos ou o vírus da papaia.

Tendo por base este tipo de dados têm sido realizados ensaios com o objectivo de conferir protecção a algumas plantas através da inserção no seu genoma de genes responsáveis pela síntese de proteínas da cápsula viral que conferem protecção contra o mesmo vírus ou vírus relacionados. Os primeiros ensaios deste tipo foram realizados em plantas de tabaco susceptíveis ao vírus do mosaico do tabaco (TMV) e permitiram obter plantas tolerantes a estirpes mais agressivas do vírus. No entanto, o caso de maior sucesso foi conseguido no Hawai onde a cultura de papaia assume uma relevante importância económica. Nos anos 90 do século passado a cultura desta espécie nas ilhas do Hawai estava em situação calamitosa devido a um vírus que afecta as plantas de papaia designado “papaya ringspot vírus” (PRSV). A recuperação da cultura de papaia nesta região foi conseguida utilizando plantas geneti-

camente modificadas capazes de sintetizar uma proteína da cápsula viral de uma estirpe atenuada. Estas plantas geneticamente modificadas serviram de base à criação de uma nova variedade que é agora cultivada nas ilhas do Hawaii. Para além da papaia e do tabaco a transformação genética de plantas relacionada com o mecanismo de protecção cruzada permitiu obter plantas resistentes a vírus em várias outras espécies como sejam a alfalfa, citrinos, batateira, arroz, trigo e beterraba, entre outras.

O combate aos vírus baseada na protecção cruzada não é a única estratégia eficaz para a obtenção de plantas resistentes a estes agentes patogénicos. Nos últimos anos outras estratégias promissoras têm sido desenvolvidas e que têm como alvo mecanismos de replicação dos vírus nos tecidos vegetais. Uma das estratégias consiste em transformar geneticamente as plantas com uma sequência do genoma viral. A inclusão desta sequência do genoma viral tem como resultado mecanismos de silenciamento genético do genoma viral que impedem a sua proliferação. A expressão de sequências *antisense* (ver secção 9.7) capazes de hibridizar com sequências específicas do genoma viral tem sido outra das estratégias utilizada. A produção de proteínas anti-virais que são capazes de modificar a estrutura do RNA ribossómico e assim interferir com a produção de proteínas virais, a utilização de ribozimas capazes de clivar o RNA viral ou a produção de proteínas que condicionam o movimento das partículas virais são igualmente estratégias com um grande potencial de utilização.

No que diz respeito às bactérias e fungos que causam danos nas plantas as soluções utilizadas na agricultura convencional passam pela aplicação de fungicidas ou pela aplicação de sistemas de controlo integrado das pragas em que ocorre uma rotação das culturas. Processos de controlo destes microrganismos com base na utilização de plantas geneticamente modificadas são ainda escassos e têm subjacentes os mecanismos de defesa que as plantas naturalmente apresentam contra esses tipos de organismos. Quando os tecidos vegetais são invadidos por microrganismos um dos mecanismos de defesa utilizados baseia-se numa interacção genética conhecida como “gene para gene”. Este mecanismo consiste na activação de um gene particular (gene *R*) responsável pela resposta a um determinado factor de virulência (codificado por um gene de virulência *Avr*) produzido pelo organismo invasor. Neste sistema, moléculas

libertadas pelo agente patogénico, designadas elicitores estimulam uma série de respostas nas plantas que incluem morte celular, síntese de fitoalexinas, produção das chamadas proteínas PR (“pathogenesis related”) que incluem quitinases e glucanases e produção de celulose e lenhina de forma a delimitar a área de infecção e inibir a propagação da invasão. Este tipo de resposta, conhecida como resposta hipersensitiva, é sistémica pelo que regiões que não estão em contacto com o agente estão também envolvidas na resposta, prevenindo a propagação do agente patogénico. A resposta hipersensitiva é precedida pela acumulação de espécies reactivas de oxigénio como o anião superóxido, o peróxido de hidrogénio ou o radical hidroxilo e, também pelo aumento dos níveis de óxido nítrico um segundo mensageiro em muitos sistemas de transdução de sinal em animais e em plantas.

Este tipo de resposta das plantas é conhecido há muito pelos melhoradores de plantas que têm procurado transferir a capacidade de resposta de espécies selvagens a determinados agentes patogénicos para as espécies cultivadas por introgressão. Como vimos no capítulo 8 este tipo de procedimento tem algumas limitações e apenas pode ser usado entre espécies filogeneticamente próximas.

Com base neste princípio tem-se procurado identificar e isolar genes responsáveis pela resistência a factores de avirulência transferindo-os para as plantas de forma a protegê-las contra os organismos patogénicos, tratando-se de uma forma de tratamento preventivo semelhante ao conseguido pela vacinação mas que não envolve mecanismos de produção de anticorpos. Esta “memória” adquirida pelos tecidos vegetais como resposta a um agente patogénico é chamada resistência sistémica adquirida (SAR), pode manter-se durante vários dias e conferir protecção não apenas contra o microrganismo original mas também contra outros agentes patogénicos. Como exemplo de plantas geneticamente modificadas com resistência a bactérias pode referir-se o caso do arroz onde foi obtida resistência à bactéria *Xanthomonas oryzae* uma bactéria que causa danos no arroz cultivado (*Oryza sativa*) mas não numa espécie de arroz selvagem chamada *Oryza longistaminata*. O gene R (neste caso designado *Xa21*) foi isolado da espécie selvagem e incorporado no genoma de *O. sativa* onde se mostrou eficaz na protecção das plantas. O potencial desta estratégia preventiva é enorme e pode ser potenciado se

os genes R inseridos nas plantas estiverem sob a acção de um promotor induzido pelo organismo patogénico.

Tendo por base este tipo de tecnologia foram produzidas plantas resistentes a bactérias ou fungos nas mais variadas espécies podendo referir-se a resistência ao fungo *Rhizoctonia solani* em plantas de arroz transformadas com um gene para a produção de quitinase (uma enzima que digere a quitina presente na parede celular de fungos), a resistência de tabaco ao fungo *Botrytis cinerea* através inclusão do gene da enzima stilbeno sintetase que leva à produção de resveratrol, um composto tóxico para os fungos ou a resistência de plantas de batateira a bactérias do género *Erwinia* através da introdução no genoma da planta de um gene do bacteriófago T4 responsável pela produção da enzima lisozima que digere componentes da parede bacteriana.

9.5. Plantas resistentes a factores abióticos

Tal como acontece com diversos factores bióticos responsáveis por perdas elevadas das culturas, os factores abióticos causam também importantes problemas em termos agrícolas. Entre esses problemas contam-se a temperatura, a salinidade dos solos, a disponibilidade de água ou a acumulação de poluentes nos solos. Muitos destes factores são imprevisíveis e variam ao longo do ano pelo que a manipulação das plantas com vista à sua protecção contra estes agentes é problemática. No entanto, factores de stresse como a salinidade ou a falta de água podem ser atenuados através da manipulação genética de plantas. O potencial de crescer plantas em solos com pouca água é particularmente interessante não apenas para a recuperação de solos marginais mas também para um aumento da produção visto que as áreas actualmente disponíveis para a utilização agrícola estão praticamente ocupadas ou são solos dedicados a outras finalidades. Face às eventuais alterações climáticas que se avizinham com a consequente redução da disponibilidade de água no solo e para rega em muitas zonas do globo, o desenvolvimento de plantas com a capacidade de crescer em solos com um conteúdo hídrico baixo tornar-se-á de extrema importância de forma a evitar uma redução na produção alimentar a nível global.

Muitas plantas respondem ao stresse hídrico através da produção dos chamados solutos compatíveis, que são moléculas como o aminoácido prolina, glicina betaína, poliaminas, polióis, ou ácidos orgânicos responsáveis por uma diminuição do potencial hídrico no interior da planta o que permite retirar água do solo mesmo que este tenha uma elevada concentração de sais ou baixos teores de água. Estes compostos acumulam-se no sistema vacuolar das células pelo que a sua presença, mesmo a concentrações elevadas não é tóxica para as células. Uma das estratégias seguida com vista à obtenção de plantas tolerantes ao stresse hídrico tem sido a de promover a síntese dos compostos acima referidos através da introdução nas plantas de genes das vias de síntese destes metabolitos. Deste modo, plantas de arroz transformadas com o gene da betaína aldeído desidrogenase acumulam níveis elevados de glicina betaína e são capazes de tolerar severas condições de stresse hídrico. Da mesma maneira, plantas de tabaco induzidas a produzir níveis mais elevados de prolina apresentam maiores taxas de crescimento em condições de stresse hídrico ou salino. Outras estratégias que têm sido desenvolvidas relacionam-se com a tentativa de transferir para as plantas cultivadas os mecanismos de tolerância ao stresse salino que existem em halófitas mais concretamente sistemas de transporte que permitem transferir o excesso de iões para os vacúolos das células. Por exemplo, em plantas de tomateiro transformadas com o gene *AtNHX1* responsável pela síntese de uma proteína *antiporter* foi possível observar o crescimento de plantas num meio com 200 mM de NaCl em plantas que eram susceptíveis ao sal. A transformação genética de plantas com genes que codificam proteínas osmoprotectoras chamadas desidrinas tem também permitido obter plantas tolerantes aos stresses hídrico e salino.

A exposição das plantas a diversas condições de stresse tem como consequência um efeito comum e que é a produção excessiva de várias espécies reactivas de oxigénio (ROS) já anteriormente referidas e que são responsáveis pelo stresse oxidativo. As ROS são extremamente reactivas atacando as estruturas membranares através da peroxidação de lípidos e outras macromoléculas como proteínas e DNA causando assim danos irreversíveis nas células. Desta forma, a capacidade das plantas reagirem a condições de stresse está também relacionada com a forma mais ou menos eficaz como são

capazes de inactivar estes produtos do metabolismo extremamente reactivos. As plantas possuem mecanismos de inactivação das ROS que passam pela produção de compostos antioxidantes como ácido ascórbico, glutationa ou tocoferol, entre outros e, também pela produção de enzimas capazes de os inactivar. Enzimas do tipo das superóxido dismutases (SODs) são capazes de inactivar o radical superóxido através da ligação deste a dois átomos de hidrogénio com a formação de oxigénio e peróxido de hidrogénio, muito menos reactivos podendo este último ainda ser convertido em oxigénio e água. A transformação de plantas com genes que codificam para a síntese de enzimas envolvidas na formação de compostos antioxidantes ou com genes responsáveis pela síntese de diferentes tipos de SODs tem permitido obter plantas geneticamente transformadas tolerantes a diversos tipos de stresses oxidativos causados pelas mais diversas condições de stresses abióticos.

Muitos solos são natural ou artificialmente ricos em metais pesados ou tóxicos (cádmio, chumbo, mercúrio, arsénico) existindo plantas capazes de acumular alguns desses metais em concentrações muito mais elevadas que aquelas que existem nos solos sendo por isso designadas plantas hipercumuladoras. Para além disso, uma grande percentagem (40%) dos solos agrícolas são ácidos possuindo níveis elevados de alumínio que causam problemas ao crescimento das plantas através de uma redução da disponibilidade de fósforo. Também os solos alcalinos, ricos em cálcio e magnésio interferem com a absorção de fósforo. As actividades antropogénicas têm provocado a acumulação de compostos orgânicos nos solos ou nos sistemas aquáticos que podem interferir com o crescimento das plantas ou de outros produtores primários afectando assim os ecossistemas. A descontaminação dos solos ou de outros sistemas é um processo caro e moroso que pode levar vários anos até ser conseguido. O potencial remediador das plantas, em ambientes terrestres ou aquáticos pode, em determinadas circunstâncias, constituir uma boa alternativa aos métodos convencionais de descontaminação dos habitats. Esta metodologia, designada fitorremediação, baseia-se na capacidade natural que as plantas possuem para remover alguns metais do solo, como já foi referido, mas também com a capacidade que possuem de inactivar compostos químicos de natureza orgânica que possam ocorrer no meio ambiente. As plantas mais adequadas para este tipo de procedimento

são plantas capazes de produzir uma grande biomassa num curto período de tempo e que possuem, simultaneamente, os mecanismos necessários para a absorção ou inativação dos elementos ou compostos em causa.

As plantas desenvolveram diferentes tipos de estratégias para fazerem face à acumulação de poluentes nos solos ou nas águas. Entre eles encontram-se a capacidade de secretar para o solo, através das raízes, ácidos orgânicos capazes de quelar iões nocivos como o alumínio e de promoverem a atracção de microrganismos como fungos de forma a aumentarem a capacidade de absorção de nutrientes. Outras moléculas queladoras de metais pesados são as fitoquelatinas, peptídeos derivados da glutatona e cuja síntese não ocorre nos ribosomas. A glutatona é um tripeptídeo formado por L-cisteína, L-ácido glutâmico e glicina e que por transpeptidação origina moléculas de fitoquelatina de peso molecular variável em função das unidades de glutatona utilizadas na sua formação. As metalotioneínas, um grupo diversificado de pequenas proteínas ricas em cisteína são um outro tipo de moléculas envolvidas na quelação de metais pesados, não apenas em plantas mas também noutros organismos como mamíferos ou leveduras. De referir ainda a capacidade de alguns aminoácidos como histidina ou nicotianamina (um aminoácido não proteico) e de algumas proteínas do tipo das chaperonas em funcionarem como agentes queladores dos metais pesados. A capacidade de quelação não é o único mecanismo de defesa das plantas contra os metais pesados podendo estes ser acumulados nos vacúolos através do envolvimento de transportadores específicos e de proteínas capazes de sequestrar os metais no vacúolo. De referir ainda que algumas espécies são capazes de transportar activamente para o exterior das células os metais acumulados. Este último tipo de mecanismo tem pouco interesse em termos de fitorremediação uma vez que os poluentes não se acumulam nos tecidos vegetais.

Tendo como base estes processos de fazer face a concentrações elevadas de metais pesados têm sido feitas tentativas para identificar genes envolvidos no controlo destes processos os quais podem depois ser transferidos para plantas de interesse com vista à sua utilização em processos de fitorremediação. Muitos destes estudos têm sido inicialmente realizados na planta modelo *Arabidopsis thaliana* onde a identificação e caracterização de genes

está facilitada devido à sequenciação do genoma e à facilidade em obter mutantes. Por sua vez, a expressão dos genes tem sido testada na levedura *Saccharomyces cerevisiae* devido à sua facilidade de crescimento em laboratório e à possibilidade de estabelecer sistemas experimentais simples em que as leveduras geneticamente modificadas são submetidas a diferentes condições de cultura. Várias espécies de plantas tem sido modificadas com genes de origem bacteriana ou de outras plantas com vista a aumentar a sua capacidade fitorremediadora. Entre elas contam-se *Liriodendron tulipifera* transformada com um gene bacteriano responsável pela síntese de uma enzima (MerA) envolvida na produção de mercúrio volátil a partir de mercúrio e *Brassica juncea* modificada com um gene de *Arabidopsis thaliana* que codifica para a enzima ATP sulfúrilase envolvida na redução de selenato.

Em virtude da complexidade dos sistemas de defesa das plantas contra metais pesados ou outros poluentes que envolvem por norma mais do que um mecanismo e que são, muitas vezes, o resultado de vias metabólicas complexas, os resultados práticos da aplicação de técnicas de transformação genética a este aspecto particular são ainda reduzidas. No entanto, os resultados mostram que é possível manipular as plantas de forma a torná-las mais eficazes na descontaminação de locais poluídos pelo que nos próximos anos esta é uma área onde se esperam novos desenvolvimentos.

9.6. Produção de compostos de interesse

A tecnologia do DNA recombinante aplicada às plantas é normalmente vista como uma tecnologia em que o principal papel é a obtenção de plantas com determinado tipo de resistência com o objectivo de limitar os danos nas culturas provocados por factores bióticos ou abióticos, como foi visto nas secções anteriores. No entanto, o potencial da transformação genética das plantas vai muito para além desse tipo de aplicações permitindo também a produção em plantas de compostos com importantes aplicações na produção de fármacos ou de proteínas industriais. As plantas podem assim ser utilizadas como biorreactores para a produção de tipos particulares de compostos num processo conhecido como “molecular farming ou mole-

cular pharming”. No seu sentido mais lato, “molecular farming” pode ser aplicado à produção de qualquer produto pelas plantas incluindo aqueles que elas já manifestam capacidade de produzir. De uma forma mais restrita a designação é, com frequência, empregue para se referir à produção de moléculas ou compostos que as plantas são induzidas a sintetizar na sequência de manipulações genéticas. O tipo de compostos produzidos é também variável podendo ir de alcalóides a macromoléculas como lípidos (ácidos gordos saturados, ácido ricinoléico), hidratos de carbono (amilose, ciclodextrinas, frutanos), enzimas industriais com aplicações na produção de amido, alimentação animal ou na indústria da pasta e do papel e plásticos biodegradáveis dos quais o exemplo mais conhecido é o da produção de polihidroxibutirato (PHB), um tipo de polímero biodegradável utilizado na produção de plástico, em plantas de *A. thaliana*. No entanto, o objectivo é muitas vezes a produção de peptídeos de interesse na indústria farmacêutica para a prevenção, tratamento ou diagnóstico de doenças.

O princípio subjacente a esta aplicação é simples e tem como base o facto das plantas serem capazes de sintetizar compostos, em particular proteínas, que em condições normais não são por elas produzidos mas que, uma vez inserido o gene ou os genes responsáveis pela sua síntese, podem de facto ser sintetizados em plantas. As plantas podem ser cultivadas no campo em extensas áreas ou em estufas, em locais confinados, necessitando de condições mínimas para a sua manutenção. Esta situação permite, em teoria, reduzir os custos de produção e, por outro lado, dada a biomassa das plantas e as áreas de cultura que podem ser utilizadas, produzir os compostos em larga escala. Nos nossos dias, muitas das proteínas com interesse farmacêutico são produzidas por microrganismos em laboratório ou por animais (mamíferos) geneticamente modificados capazes de produzir e secretar esses produtos para fluidos orgânicos como o leite ou o soro. A produção e ulterior extracção destes compostos a partir de animais coloca alguns problemas como sejam eventuais contaminações com agentes patogénicos. Para além disso, a utilização de animais e em particular de mamíferos de grandes dimensões, não é muito bem aceite por sectores da sociedade, uma dificuldade acrescida na utilização destes organismos. Relativamente aos microrganismos (bactérias e leveduras), as plantas têm

a vantagem de permitir uma correcta modificação pós-translacional das proteínas uma vez que são células eucariotas e muitas das proteínas de interesse são proteínas eucaróticas enquanto os organismos procariotas são incapazes de proceder a estas modificações.

Uma grande diversidade de proteínas com interesse médico é actualmente produzida em bactérias. Entre essas proteínas encontra-se a insulina, a primeira a ser produzida desta maneira. Outros compostos produzidos a uma escala comercial são, entre muitos outros, moléculas anticoagulantes, hormonas, interferões, interleucinas, vacinas e anticorpos monoclonais. O mesmo tipo de compostos pode também ser produzido em animais. Embora a produção em larga escala de proteínas recombinantes em plantas não seja ainda utilizada em termos comerciais em larga escala, ensaios laboratoriais têm permitido a expressão de proteínas recombinantes em células de diferentes plantas. O primeiro caso de sucesso foi obtido nos finais dos anos 80 com a transformação genética de células de tabaco e girassol com o gene responsável pela síntese da hormona de crescimento humano. Destes estes primeiros trabalhos uma grande diversidade de proteínas recombinantes tem sido produzida em plantas como sejam colagénio e hemoglobina em células de tabaco, interleucina em tabaco e batateira, lisozima no arroz e albumina sérica humana também no tabaco. Como se pode constatar muitas destas experiências têm sido realizadas no tabaco devido à facilidade com que esta planta pode ser manipulada *in vitro* quer em termos de regeneração quer em termos de transformação genética. Para além disso, a planta de tabaco apresenta uma boa taxa de crescimento com a formação de folhas grandes permitindo assim obter uma apreciável biomassa para extracção dos compostos de interesse.

A produção de anticorpos (imunoglobulinas) em plantas (planticorpos) é um dos aspectos que mais interesse tem suscitado nas grandes companhias do sector agroquímico e farmacêutico. O potencial de produção de anticorpos em plantas pode ter diferentes tipos de aplicações. Uma das aplicações será a própria protecção da planta contra um herbicida ou uma toxina que lhe permita uma vantagem selectiva relativamente às ervas daninhas. Anticorpos podem ser também produzidos em plantas para fins medicinais. A complexidade estrutural dos anticorpos constituídos por duas cadeias

proteicas leves e duas cadeias pesadas torna a sua produção em plantas uma tarefa difícil. Uma das estratégias seguida para a utilização das plantas como bioreactores para a produção de anticorpos tem sido a de transformar (com *Agrobacterium*) um grupo de plantas com o gene responsável pela síntese da cadeia pesada e um outro grupo com o gene responsável pela síntese das cadeias leves. O cruzamento destes dois tipos diferentes de plantas leva à formação de uma geração F1 capaz de sintetizar anticorpos funcionais. Isto significa que as células vegetais são não apenas capazes de sintetizar as subunidades proteicas que constituem os anticorpos, como seria de esperar, mas que também possuem os mecanismos celulares apropriados para a formação de anticorpos funcionais tais como os produzidos em células animais.

Os primeiros ensaios com o objectivo de produzir anticorpos de mamíferos em plantas foram realizados na planta do tabaco e mostraram-se bastante promissores. Trabalhos mais recentes mostraram que a produção de antibióticos em plantas pode também ser conseguida através de processos mais simples utilizando a biolística como processo de transformação em que os genes para a síntese dos dois tipos de cadeias podem ser simultaneamente inseridos nas células sem necessidade de efectuar cruzamentos para a produção dos anticorpos funcionais. No entanto, a eficácia de um anticorpo pode manifestar-se sem que seja necessário a produção de um anticorpo completo. Assim, a síntese de regiões específicas de um anticorpo, codificadas por sequências simples de DNA pode ser eficaz para a ligação a um composto ou a um agente patogénico impedindo deste modo a sua distribuição nos tecidos. É o caso das regiões Fab (*fragment antigen binding*) responsáveis pela ligação ao antigénio e em particular, da região Fv um componente variável da região Fab determinante no reconhecimento dos antigénios. A introdução de sequências de DNA responsáveis pela produção destas regiões particulares dos anticorpos é tecnicamente mais simples permitindo uma mais eficaz produção de moléculas de interesse farmacêutico. Um exemplo da aplicação prática da produção de anticorpos em plantas com fins terapêuticos é a produção de um composto designado CaroRxTM um anticorpo monoclonal que em testes clínicos se revelou eficaz contra *Streptococcus mutans*, uma bactéria que causadora de cáries. A aplicação

directa do composto nos dentes inibiu a colonização pela referida bactéria por períodos de 4 meses, conferindo uma protecção eficaz contra este tipo de infecção bacteriana. Anticorpos totais ou regiões particulares de anticorpos têm sido produzidas por transformação genética em diferentes tipos de plantas, incluindo a já referida planta do tabaco mas também *Arabidopsis*, arroz, batateira, bananeira, tomateiro ou alfalfa. Alguns autores sustentam que a inclusão de anticorpos em frutos ou outras partes comestíveis das plantas seria útil na obtenção de uma imunidade passiva contra diferentes tipos de antigénios. A produção de anticorpos em plantas apresenta algumas vantagens nomeadamente a eficácia do processo de transformação e a capacidade de sintetizar os anticorpos completos a partir das diferentes subunidades. A ausência de eventuais contaminações e a possibilidade de produção em larga escala são também factores a ter em conta. Os ensaios e os testes já realizados mostram que este tipo de tecnologia tem um elevado potencial de sucesso. No entanto, importa agora passar de uma fase de estudos piloto para uma produção à escala industrial não sendo ainda evidente que a produção de anticorpos possa competir de forma eficaz com a produção de anticorpos em plantas ou de outras proteínas heterólogas por outros processos.

Para terminar esta secção importa fazer uma referência à produção de vacinas em plantas e em particular às chamadas vacinas comestíveis. Várias plantas foram geneticamente modificadas de forma a produzirem antigénios de vírus ou bactérias que infectam humanos ou animais. Como exemplos podem referir-se a produção da subunidade B da toxina da cólera, a toxina do tétano, um epítipo do vírus da hepatite C, um antigénio de *Bacillus anthracis* causador do antrax, uma glicoproteína do vírus da raiva ou o vírus de Norwalk, causador de diarreias que todos os anos causam a morte de milhões de crianças. O princípio subjacente à utilização de vacinas comestíveis assenta na possibilidade da ingestão de alimentos (frutos, tubérculos, legumes) contendo determinados antigénios que possam desencadear uma resposta imunitária eficaz contra agentes agressores. A principal vantagem deste tipo potencial de vacinação reside no facto das vacinas serem administradas oralmente não sendo necessária o seu armazenamento a baixas temperaturas, uma dificuldade em muitas

zonas do globo, evitando-se também os problemas relacionados com os sistemas de distribuição e com a aplicação por via intravenosa. Os estudos já realizados em voluntários mostraram que o consumo de batatas geneticamente modificadas com um antigénio do vírus de Norwalk desencadeou uma resposta imunitária contra o vírus. Num outro ensaio, uma toxina de *Escherichia coli* causadora de diarreias severas foi expressa também em batatas e os ensaios realizados com voluntários desencadearam também uma resposta imunológica local (mucosa bucal) e sistémica. Uma situação semelhante foi observada quando batatas contendo um antigénio de superfície do vírus da hepatite B foram administradas a um conjunto de 33 voluntários. Ensaio realizado com ratos mostraram que estes desenvolviam uma resposta imunitária quando alimentados com batatas contendo a toxina da cólera provocada pela bactéria *Vibrio cholerae*. Estes resultados são promissores mas os tempos em que as vacinas comestíveis se tornarão uma realidade estão ainda longe devido às limitações ainda existentes. Uma das limitações tem a ver com o tipo de material vegetal utilizado. Por exemplo, as batatas ou outros tubérculos ou raízes não são comidas cruas e a sua cozedura ou fritura pode destruir os antigénios responsáveis pelo desencadear da resposta imunitária. A expressão dos antigénios em frutos coloca também problemas de conservação dada a rapidez com que ocorre a sua senescência. Por outro lado, a produção de uma toxina em quantidades necessárias para desencadear uma resposta imunológica pode interferir com o próprio crescimento das plantas enquanto mecanismos de silenciamento pós-transcricionais (ver secção 9.8) podem interferir com a produção dos antigénios. Problemas importantes são também o controlo do consumo deste tipo de alimentos pois não se sabe que efeitos uma dosagem elevada destes antigénios pode ter no organismo, o controlo da cultura deste tipo de plantas, devendo a sua produção limitar-se a zonas confinadas e a eventual destruição dos antigénios no sistema digestivo dificultando assim o desencadear da resposta imunitária. Algumas destas limitações são tecnicamente ultrapassáveis enquanto outras necessitam de estudos mais aprofundados que permitam compreender melhor de que forma este tipo de tecnologia é suficientemente segura para que possa ser utilizada.

9.7. Alteração das propriedades dos alimentos

332

O caso mais mediático de plantas com modificações da qualidade alimentar é o chamado arroz dourado, devido à coloração amarelada do endosperma em virtude da produção de provitamina A (β -caroteno). Trata-se de uma linha de arroz obtida com base numa variedade da subespécie *indica* muito utilizada na Ásia designada IR64. Esta variedade foi desenvolvida por Potrykus e seus colaboradores com o objectivo de fazer face a um problema de saúde pública que ocorre em muitos países onde a dieta alimentar é feita à base de arroz tendo como resultado uma reduzida quantidade de provitamina A. O arroz é o principal alimento de cerca de metade da população humana tendo particular importância em muitos países asiáticos. Uma dieta à base de arroz conduz a deficiências em vitamina A (retinol) uma vez que as células do endosperma de arroz não possuem a maquinaria enzimática necessária para a produção de β -caroteno um composto que o nosso organismo é capaz de converter em vitamina A. Dada a incapacidade das células humanas produzirem vitamina A, esta tem que ser incorporada na dieta alimentar na forma de vitamina A ou de um precursor. Fontes importantes de vitamina A são a carne, ovos e lacticínios enquanto precursores da vitamina A são abundantes em diversos tipos de frutos e vegetais como cenoura, espinafres, tomates e pimentos. O consumo destes alimentos pode suprir os níveis de vitamina A necessários para o organismo humano visto que as células do intestino e do fígado são capazes de converter a provitamina A em vitamina A. Dietas pobres em vitamina ou provitamina A têm consequências nefastas para a saúde podendo levar a problemas de cegueira (nocturna ou total) em particular em crianças, problemas de crescimento ósseo e aumento da susceptibilidade a doenças respiratórias, malária, sarampo e diarreias. Estima-se que anualmente mais de cem milhões de crianças sejam afectadas por deficiências em vitamina A das quais 500.000 acabam por ficar cegas e 1 a 2 milhões por morrer. Trata-se pois de um problema de saúde pública de grandes proporções que importa combater. A distribuição de cápsulas com suplementos de vitamina A tem sido uma das estratégias utilizadas para combater este flagelo mas sem grandes resultados práticos devido a dificuldades de distribuição. Tentativas

de introdução de outros tipos de culturas agrícolas com teores adequados de próvitamina A têm também sido estimulados mas também sem grande sucesso quer por razões culturais quer por razões económicas ou técnicas. Isto significa que o problema ameaça persistir sem que melhorias significativas da situação se possam perspectivar num futuro próximo. Preocupados com esta situação calamitosa, cientistas de diferentes países liderados pelo suíço I. Potrykus têm procurado uma solução para este problema através da obtenção de variedades de arroz capazes de produzir β -caroteno (um processo chamado biofortificação) e, deste modo, reduzir os efeitos negativos desta deficiência (Golden Rice Project, www.goldenrice.org). A ideia subjacente a esta estratégia é dotar os agricultores de alguns países asiáticos com sementes de variedades de arroz geneticamente transformado capazes de produzir uma quantidade apreciável de β -caroteno com o objectivo de colmatar as deficiências em vitamina A sentidas por uma parte importante da população desses países.

A via de síntese do β -caroteno está relacionada com a produção de um grupo importante de metabolitos secundários referidos no capítulo 6 designados terpenóides. A síntese ocorre nos plastídeos e a molécula precursora da síntese do β -caroteno é o geranyl geranyl difosfato (GGPP ou GGDP), um diterpenóide (20 átomos de carbono). As células do endosperma (tecido triplóide da semente onde se acumulam substâncias de reserva) embora sendo capazes de produzir GGPP não conseguem converter este precursor em β -caroteno em virtude de não possuírem as enzimas necessárias para o prosseguimento das reacções metabólicas subsequentes. Essas reacções (Fig. 86) são a condensação de duas moléculas de GGPP em fitoeno catalizada pela enzima fitoeno sintetase, o estabelecimento de ligações duplas adicionais necessárias para a obtenção de licopeno a partir de fitoeno resultante da actividade das enzimas fitoeno desaturase e β -caroteno desaturase e, por último, a conversão de licopeno em β -caroteno através da formação de grupos cíclicos.

A produção de β -caroteno no endosperma do arroz tornou-se possível após identificação, isolamento e clonagem dos genes responsáveis pela codificação das enzimas envolvidas nos passos acima referidos e ulterior transferência para plantas de arroz por transformação genética de embriões

imaturos. Os primeiros ensaios mostraram que era possível a obtenção de plantas de arroz capazes de acumular fitoeno através da inserção do gene da fitoeno sintetase de *Narcissus pseudonarcissus* (uma planta que produz flores amarelas ricas em β -caroteno). Numa fase ulterior foi possível obter a produção de β -caroteno utilizando os genes das enzimas fitoeno sintetase (*psy*) e licopeno ciclase de *N. pseudonarcissus* e o gene *crtI* (caroteno desaturase) da bactéria *E. uredovora* que codifica uma enzima que possui simultaneamente actividade de fitoeno β -caroteno desaturases. O gene desta última enzima foi colocado sob controlo do promotor 35S enquanto o gene *psy* era controlado pelo promotor da proteína glutelina do arroz estando estes dois genes na mesma construção. A outra construção utilizada no processo de transformação possuía o gene para a síntese da licopeno ciclase (*lcy*) e um marcador de selecção de resistência à higromicina (*aphIV*). As duas construções foram inseridas em *A. tumefaciens* e os tecidos transformados com duas populações bacterianas cada uma delas contendo a sua construção. Para além disso, sequências sinal de forma a permitir o trânsito das enzimas para os plastídeos (ver cap. 8) foram também inseridas. Um aspecto interessante deste tipo de manipulações foi constatar que a transformação de plantas de arroz com vista à produção de licopeno permitia também a formação de β -caroteno, uma situação que indica que as células do endosperma possuem a capacidade de converter licopeno em β -caroteno. Com esta tecnologia foi possível obter as primeiras linhas de arroz dourado capazes de sintetizar cerca de $2 \mu\text{g g}^{-1}$ de provitamina A correspondentes, para uma dieta de 300 g de arroz diário, a cerca de 100 μg de equivalentes de retinol ou seja cerca de 20% das necessidades diárias de um adulto. No entanto, linhas de arroz dourado mais recentes são capazes de produzir quantidades de β -caroteno mais elevadas capazes de suprir as necessidades diárias. Essa situação foi o resultado da optimização dos protocolos de transformação nomeadamente a utilização de um gene de milho para a síntese de fitoeno sintetase mais eficaz que o gene de *N. pseudonarcissus*, a utilização do gene manose-6-fosfato isomerase como gene de selecção em vez do gene de resistência a um antibiótico e a verificação, já referida, que a inserção do gene *lcy* não é necessária para a produção da provitamina A. O processo de optimização permitiu a síntese

de β -caroteno a níveis 20 vezes superiores aos obtidos com as primeiras linhas tornando assim uma dieta diária à base de arroz suficiente para obter os níveis de β -caroteno necessários.

O processo de obtenção do arroz dourado ilustra bem as dificuldades que têm sido colocadas à cultura e comercialização de plantas geneticamente modificadas. As variedades de arroz dourado que diga-se, ainda não têm autorização para serem comercializadas, foram produzidas em parcerias que envolveram instituições públicas e a companhia privada Syngenta, não colocam nenhum problema ambiental, não é possível antever nenhum problema de saúde pública que possam causar, serão distribuídas aos agricultores gratuitamente podendo estes continuar a multiplicar as plantas através da semente que vão anualmente produzindo, beneficiam os produtores e os consumidores e não necessitam de nenhum tratamento com algum tipo particular de herbicida. Dito de outra maneira, não se enquadram em nenhuma das críticas que as organizações ambientalistas fazem às PGMs (ver capítulo 10). No entanto, e na ausência de argumentos mais inteligentes, os ambientalistas opõem-se ao arroz dourado afirmando que se trata de uma espécie de cavalo de Tróia que se destina a abrir a porta a PGMs de outras espécies nocivas por alguma razão mais ou menos obscura (ver capítulo seguinte). Apesar destas dificuldades, a que se juntaram os problemas relacionados com os direitos de propriedade intelectual que foram necessários obter de diferentes empresas e instituições estima-se que a cultura deste tipo de arroz se possa iniciar em 2011. Entretanto, e como refere o responsável do projecto, perderam-se, por culpa de uma legislação absurda adoptada em muitos países, anos em ensaios experimentais supérfluos destinados a provar que o arroz dourado é um produto seguro e que não coloca problemas ambientais específicos. Durante este longo período, o aparecimento de problemas de saúde graves e a morte de muitas crianças poderia ter sido evitada.

Para além da sua importância em termos sociais, o arroz dourado é também um marco no avanço do conhecimento científico, mostrando que é possível a manipulação de vias metabólicas complexas e abrindo as portas para a criação de plantas geneticamente modificadas com um forte impacto na qualidade de vida dos consumidores. Apesar de todas as dificuldades

encontradas, os esforços de I. Potrykus e da sua equipa mostraram que a colaboração entre instituições públicas e privadas, dois tipos de organizações que nem sempre se compreendem muito bem, pode conduzir a resultados bastante interessantes.

O arroz dourado não é o único tipo de modificação genética que permitiu melhorar a qualidade dos alimentos. De facto, a manipulação dos alimentos de forma a eliminar determinadas deficiências nutritivas é uma das mais promissoras linhas de investigação no âmbito da obtenção de PGMs. Assim, têm também sido realizadas tentativas com o objectivo de aumentar os níveis de ferro no endosperma de arroz. Estima-se que um quarto da população mundial sofra de carências de ferro e, em alguns países em desenvolvimento, esse valor chega a atingir os 60%. Os níveis reduzidos de ferro no endosperma são apenas um dos factores que condiciona os níveis de ferro no organismos de pessoas sujeitas a uma alimentação à base deste cereal. A existência, nos grãos de arroz, de elevadas quantidades de fitato, um composto capaz de inibir a absorção de ferro no intestino, contribui também para a redução dos níveis de ferro no organismo. O aumento dos níveis de ferro em plantas de arroz transformadas com um gene da ferritina de feijoeiro, ou a inclusão de um gene de origem fúngica para a síntese de fitase resistente a elevadas temperaturas permite reduzir os níveis de fitato no arroz cozinhado são exemplos de estratégias que têm sido utilizadas para ultrapassar o problema dos baixos níveis de ferro numa dieta à base de arroz.

Na impossibilidade de referir todos os exemplos de modificações nos níveis de nutrientes que têm sido modificados por engenharia genética, assinala-se o caso dos ensaios realizados com o objectivo de aumentar os níveis de vitamina E nos tecidos vegetais.

A vitamina E engloba um conjunto de compostos hidrofóbicos (lipossolúveis) dos quais o α -tocoferol representa o composto com maior actividade. Os compostos em causa desempenham uma importante actividade antioxidante, evitando a oxidação de lípidos e protegendo, desta forma, os sistemas membranares. A principal fonte de vitamina E são os óleos vegetais e os chamados “frutos secos” e a ingestão das doses adequadas desta vitamina ajuda a prevenir problemas vasculares e o aparecimento de doenças degenerativas, reforçando ainda o sistema imunitário. Os óleos alimentares

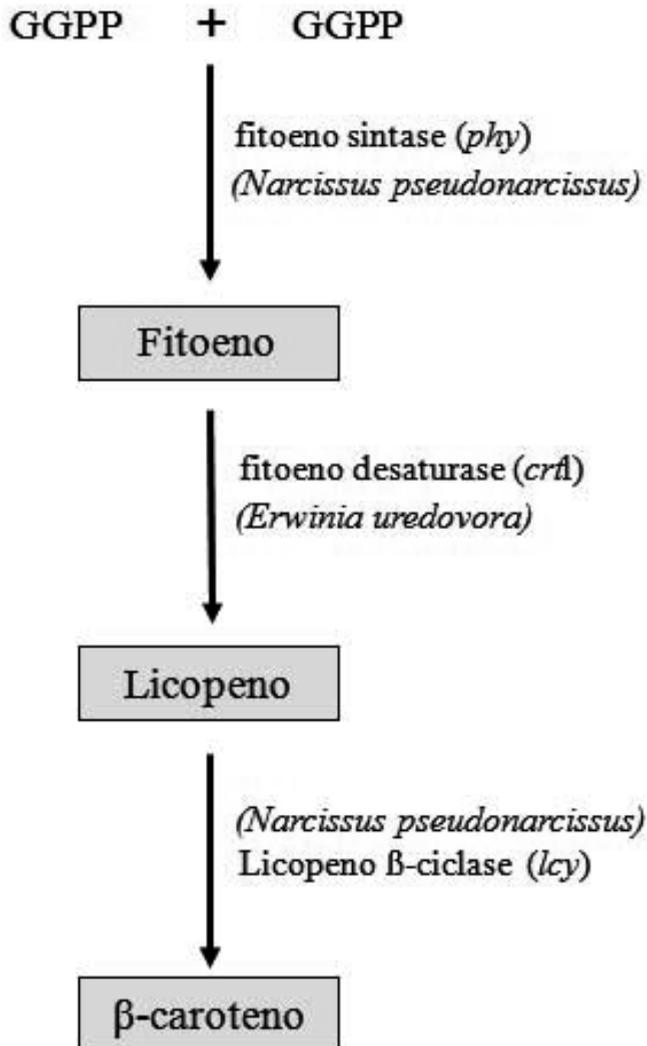


Figura 86 – Formação de β -caroteno em plantas de arroz após inserção dos genes responsáveis pela síntese das enzimas necessárias para completar a via metabólica.

possuem reduzidos níveis de α -tocoferol, possuindo no entanto quantidades apreciáveis de γ -tocoferol um composto com uma actividade 10 vezes inferior à do α -tocoferol. A via de síntese dos tocoferóis é uma via complexa resultante de duas das principais vias de síntese de metabolitos secundários, a via do ácido chiquímico e a via do MEP (ver capítulo 6). Todos os tocoferóis têm como precursor o ácido homogentísico que, dependendo

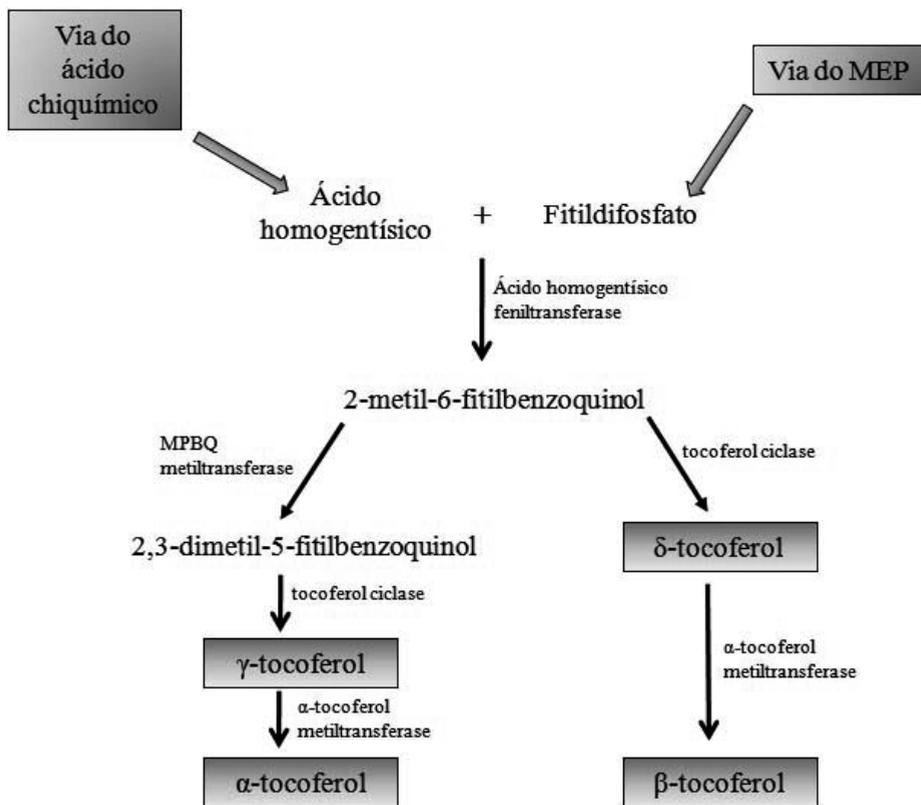


Figura 87 – Via de síntese dos tocoferóis em plantas (adaptado de Primrose e Twyman, 2006).

das enzimas envolvidas, pode levar à formação dos tocoferóis γ e α ou δ e β (Fig. 87). Os produtos finais desta via metabólica são o tocoferol α produzido a partir de tocoferol γ pela enzima γ -tocoferol metil transferase (γ -TMT) e o tocoferol β produzido a partir de tocoferol δ pela mesma enzima. A transformação genética de plantas de *Arabidopsis thaliana* com o gene de uma cianobactéria (*Synechocystis*) usando um promotor específico das sementes de cenoura (DC3) permitiu obter níveis elevados de γ -tocoferol nas sementes das plantas geneticamente transformadas. É claro que a planta *Arabidopsis thaliana* não faz parte da dieta alimentar dos humanos mas este tipo de estudos mostra que a via de síntese dos tocoferóis pode ser modificada de forma a aumentar os níveis de síntese dos tocoferóis mais

interessantes. Estudos recentes na soja, uma planta muito usada na produção de óleos alimentares, confirmaram os resultados obtidos em *Arabidopsis* e abrem a porta ao aparecimento de variedades enriquecidas em vitamina E.

9.8. Alterações no amadurecimento dos frutos

Todas as características obtidas por transformação genética que foram referidas nas secções anteriores têm como base a introdução nas plantas de novos genes aquilo que se costuma designar como ganho de função. No entanto, a inactivação de genes das plantas pode também ser uma ferramenta muito útil não apenas para a compreensão das funções dos genes mas também no melhoramento das plantas. Uma das técnicas que se utiliza para modular ou inibir a expressão de um gene baseia-se num mecanismo de controlo pós-transcricional em que se estimula a produção de um RNA antisense que seja complementar de um RNA mensageiro responsável pela formação de uma proteína. Quando os dois tipos de RNA coexistem na mesma célula e uma vez que as sequências das suas bases são complementares eles têm tendência a formar moléculas de RNA de cadeia dupla. Desta forma as células não conseguem produzir a proteína que seria formada após tradução do RNAm nos ribossomas. O mecanismo exacto de inactivação do DNA não se encontra bem estabelecido existindo várias possibilidades de explicação. A mais óbvia é que a ligação estequiométrica entre as duas moléculas impeça a leitura do RNAm nos ribossomas e que as moléculas duplex sejam degradadas por RNAsases reduzindo ou inibindo completamente a formação de uma determinada proteína. No entanto, pode também acontecer que o RNA antisense afecte directamente, por metilação por exemplo, o gene alvo no núcleo impedindo a sua transcrição, interfira com o processamento do RNAm, ou se ligue a locais específicos dos ribossomas que impeçam o início da tradução. Qualquer que seja o mecanismo envolvido, o resultado é um processo de inactivação genética que tem como consequência a perda de uma determinada função. Deste modo pode estudar-se qual o efeito da ausência de expressão de um gene no fenótipo da planta o que em termos

funcionais corresponde à ocorrência de uma mutação. As plantas com esta particularidade são chamadas *knockouts* funcionais ou fenocópias.

O silenciamento de genes através da formação de moléculas de RNA antisense é um mecanismo natural de controlo da expressão genética comum em procariotas embora se manifeste também em células eucariotas. Em termos práticos, a inactivação de um gene num determinado local ou em determinada altura do desenvolvimento de uma planta pode revelar-se importante para a eliminação de características indesejáveis. O silenciamento de um gene pela tecnologia do RNA *antisense* é conseguido inserindo no genoma da planta uma sequência de DNA codificadora desse mesmo gene mas que se posiciona com uma orientação inversa relativamente ao promotor que controla a sua transcrição (Fig. 88). Um efeito idêntico pode ser conseguido inserindo directamente nas células um RNA antisense ou nucleótidos complementares de um RNAm. No entanto, neste caso, a inactivação genética é apenas transitória.

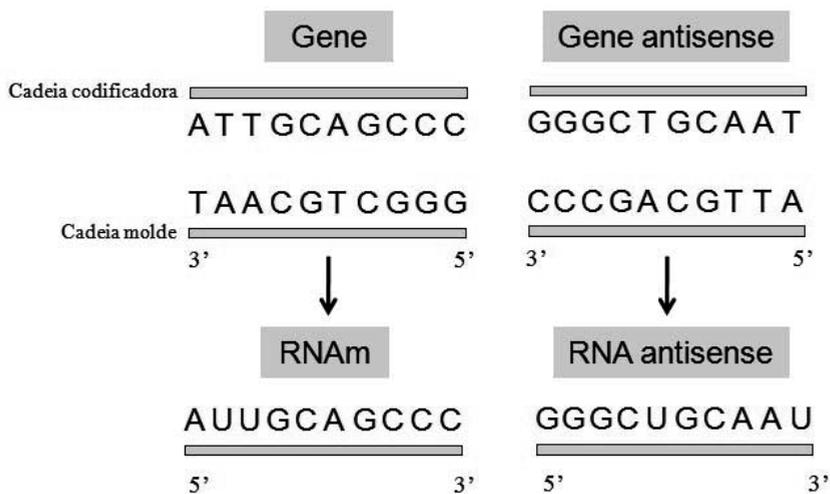


Figura 88 – Estratégia do RNA antisense para inativação de genes.

A utilização da tecnologia do RNA antisense foi a primeira técnica de transformação genética de plantas a ser aplicada em termos comerciais tendo sido utilizada para a obtenção de variedades de tomateiro em que o amadurecimento dos frutos se encontrava afectado. O amadurecimento

dos frutos consiste numa séria complexa de modificações morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares que ocorrem na fase final de desenvolvimento dos frutos. De entre as modificações mais notórias destacam-se a diminuição dos teores de clorofila e o aparecimento de novos pigmentos (no tomateiro o licopeno), o amolecimento dos tecidos, a produção de vários açúcares a partir da digestão do amido e a libertação de aromas. Muitas destas modificações destinam-se a atrair agentes que se alimentam dos frutos podendo assim promover a dispersão das sementes. Em muitos frutos o amadurecimento é desencadeado por um aumento das concentrações de etileno, uma hormona vegetal que controla vários mecanismos de desenvolvimento nas plantas (capítulo 2). Estes frutos, como a banana, o tomate ou a manga, são chamados frutos climatéricos e o pico observado na formação de etileno é seguido por um aumento acentuado da actividade respiratória. Pelo contrário, existem frutos onde estas modificações nos níveis de etileno não se verificam. É o caso das cerejas, morangos, laranjas ou uvas, sendo estes frutos chamados não climatéricos.

Para os produtores e distribuidores de frutos o controlo do processo de maturação é fundamental uma vez que muitas vezes os frutos são consumidos muito longe do local de produção (por exemplo as bananas) e uma maturação normal pode conduzir a perdas importantes. Esta situação é de extrema importância em países tropicais onde as elevadas temperaturas aceleram o processo de amadurecimento. Uma das estratégias seguidas para diminuir as perdas é proceder à colheita dos frutos ainda verdes estimulando depois o seu amadurecimento submetendo os frutos a uma atmosfera rica em etileno. No entanto, a colheita dos frutos verdes e o seu ulterior amadurecimento já separados da planta mãe altera muitas vezes o processo normal de amadurecimento conduzindo a modificações no sabor que os consumidores não apreciam.

Na sequência de uma caracterização aprofundada dos mecanismos de amadurecimento dos frutos e no isolamento e clonagem de genes envolvidos nesse processo, algumas companhias lançaram-se, nos anos 90, na produção de plantas em que o amadurecimento dos frutos pudesse ser retardado por manipulação genética. Uma dessas companhias foi a empresa americana Calgene que, em 1994, viu aprovada pela agência americana que

controla os alimentos e medicamentos consumidos (Food and Drug Administration), uma variedade (Flavr Savr) de tomateiro geneticamente modificada com o objectivo de retardar o amadurecimento dos frutos.

O tomate Flavr Savr foi obtido através da inserção na planta de uma sequência codificadora para um RNA antisense da enzima poligalacturonase (PG). Esta enzima é responsável, embora não seja a única, pela degradação de compostos pécnicos da parede das células vegetais contribuindo assim para uma das alterações que ocorrem nos frutos durante o seu amadurecimento e que é o amolecimento dos tecidos. De referir que esta modificação apenas interferia com o amolecimento dos tecidos e não com outras características do processo de maturação. Por exemplo, o pigmento licopeno continua a acumular-se o que permite manter a coloração vermelha dos frutos.

Uma estratégia diferente foi seguida pela empresa britânica ICI (Imperial Chemical Industries) mais tarde chamada Zeneca. Os investigadores desta empresa decidiram manipular a maturação do tomate através da modificação na síntese de etileno. O etileno é um gás produzido nos tecidos vegetais a partir do aminoácido metionina numa via metabólica relativamente simples (Fig. 89) que tem como intermediários metabólicos os compostos S-adenosilmetionina (SAM) e o precursor directo do etileno ácido 1-amino-ciclopropano-1-carboxílico (ACC). Neste caso, o mecanismo alvo foi a inibição da síntese da enzima ACC oxidase através da inserção de uma sequência codificadora para um RNA antisense da referida enzima. Em termos práticos o resultado obtido é completamente diferente uma vez que neste processo todos os mecanismos de maturação dos frutos são afectados e não apenas o amolecimento. O tomate assim produzido foi mais utilizado por esta firma para a produção de pasta sendo comercializado na forma enlatada uma vez que se verificou que estes frutos apresentavam uma maior viscosidade devida à redução na degradação das pectinas.

Qualquer dos tipos de tomate referidos não foi um grande sucesso comercial e, após algum tempo, estas variedades foram retiradas do mercado devido ao reduzido nível de interesse manifestado pelos produtores e consumidores. No caso do tomate produzido pela firma Zeneca, embora comercializado a um preço inferior ao da concorrência, as embalagens faziam alusão ao facto de se tratar de um alimento geneticamente modificado numa

altura em que na Europa acontecimentos recentes (vacas loucas) tinham provocado receios nos consumidores relativamente aos produtos alimentares. No que diz respeito ao Flavr Savr verificou-se que a sua produção no campo era inferior relativamente a outras variedades de tomate mais competitivas e que, por melhoramento convencional, apresentavam já uma maior capacidade de resistirem ao armazenamento. Para além disso, a firma Calgene não se encontrava vocacionada para a produção e distribuição de tomate pelo que a escolha da variedade inicial não foi a mais indicada e o processo de integração dessa variedade em esquemas de melhoramento também não foi o mais apropriado.

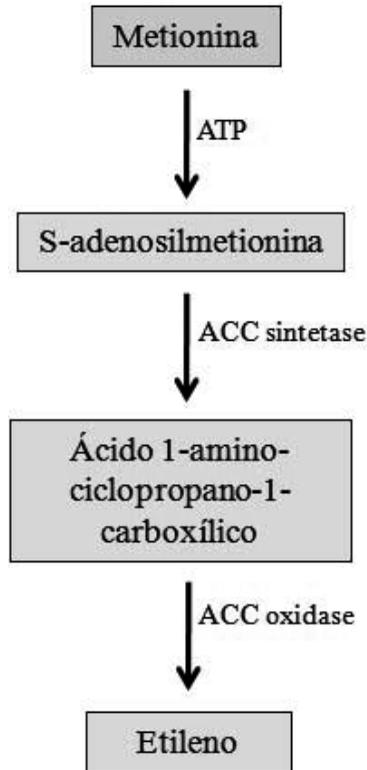


Figura 89 – Via de síntese do etileno.

Estes falhanços mostram que não basta apenas produzir plantas geneticamente modificadas para que elas se tornem, como que por magia, num produto apetecível para os consumidores. É preciso ter um conhecimento

aprofundado das particularidades do mercado, utilizar estratégias de marketing adequadas e inserir as técnicas de melhoramento genético molecular em programas mais alargados de melhoramento onde as variedades de partida e o esquema de selecção ulterior desempenham um papel crucial.

Os exemplos acima referidos são apenas duas das estratégias que podem ser utilizadas no retardamento da maturação de frutos. A descoberta que existem enzimas capazes de degradar compostos intermediários da síntese de etileno permitiu inserir no genoma de algumas plantas (tomateiro, meloeiro) os genes que controlam a síntese dessas enzimas e, como consequência, uma diminuição nos níveis de etileno produzidos. É o caso do gene da enzima ACC deaminase de *Pseudomonas chloraphis* que degrada ACC e o gene da enzima AdoMet hidrolase, responsável pela hidrólise da S-adenosilmetionina, existente no fago T3 de *E. coli*.

Como foi referido no capítulo 3, o etileno controla diversos mecanismos de desenvolvimento das plantas. Desta forma, a manipulação dos níveis de etileno ou dos seus precursores nos tecidos pode ser utilizada para manipular outros aspectos para além da maturação dos frutos. Um desses aspectos, também muito importante do ponto de vista económico, é a manipulação da senescência das flores, em particular das pétalas, após colheita. É desde há muito conhecido que no processo de senescência das flores está envolvido o etileno pelo que a redução dos níveis desta hormona nas flores tem também vindo a ser estudada (por exemplo nos craveiros, *Dianthus* sp.) com o objectivo de limitar as perdas durante o processo de colheita e comercialização pois, à semelhança dos frutos, também as flores são muitas vezes vendidas a grandes distâncias dos locais de produção. Uma situação semelhante verifica-se no comércio de alguns vegetais utilizados na alimentação.

9.9. Alterações na coloração das flores

O mercado de comercialização de flores é extremamente importante em termos económicos representando uma fonte interessante de divisas em muitos países. Todos os anos são lançadas no mercado novas variedades

de flores com formas e padrões de coloração distintos com o objectivo de estimular o interesse dos consumidores por novos produtos.

A coloração das flores é em grande parte devida à formação de flavonóides e, de entre estes, às antocianinas, metabolitos secundários que se acumulam nos vacúolos das células, em particular nas pétalas. Outros pigmentos como os carotenóides e as betalainas são também importantes no estabelecimento dos padrões de coloração. Sendo assim, uma grande parte do esforço realizado com o objectivo de modificar as cores das flores tem residido na modificação das vias de síntese dos pigmentos antociânicos. Trata-se de vias metabólicas complexas que envolvem um grande número de enzimas e intermediários metabólicos mas que, apesar disso, têm sido manipuladas de forma a atingir os objectivos perseguidos.

A tentativa de manipulação das vias de síntese das antocianinas conduziu a uma descoberta da maior importância em termos da compreensão dos mecanismos de controlo da expressão dos genes e permite constatar como estamos ainda longe de compreender o funcionamento dos genomas em toda a sua plenitude. Os ensaios que conduziram a esta descoberta tinham como objectivo a produção de flores de petúnia, um género muito utilizado como ornamental e que pertence à família solanácea, com uma coloração púrpura mais intensa que o fenótipo original. Deste modo, as plantas foram transformadas com uma cópia do gene da chalcona sintetase (CHS) uma enzima envolvida na síntese de chalcona um precursor chave na via biossintética de vários tipos de flavonóides. No entanto, o resultado obtido não foi o esperado e em vez da acumulação de uma maior quantidade do pigmento antociânico responsável pela coloração púrpura o que se observou foi que algumas das flores apresentavam as pétalas variegadas com sectores brancos e púrpura e, noutros casos, apenas pétalas brancas. A conclusão é que a inserção de uma cópia de um gene inactivou o próprio gene endógeno num processo de silenciamento genético que ficou conhecido como co-supressão. A co-supressão pode também verificar-se entre um transgene e o seu homólogo ou mesmo em processos de transformação com sequências de DNA antisense suspeitando-se que um dos possíveis processos de inactivação de genes pela tecnologia do RNA antisense funcione por intermédio de mecanismos de co-supressão (ver secção 9.8.). Resultados semelhantes

foram depois observados nos mais variados organismos tendo-se chegado à conclusão que a este mecanismo de inativação genética é comum na natureza e funciona como um processo de inativação de DNA estranho (por exemplo vírus) que possa invadir as células. Estudos mais detalhados levaram ao esclarecimento do mecanismo de inativação que se baseia na produção dos chamados RNAs de interferência (RNAi), pequenas (21 – 25 pares de bases) moléculas de RNA de cadeia dupla resultantes da clivagem de moléculas maiores por uma nuclease (Dicer ou membros desta família de nucleases). Estes RNAs de interferência, em associação com proteínas, funcionam como marcadores de moléculas de RNAm que serão degradadas por um complexo enzimático (RISC) de forma a evitar a sua tradução nos ribossomas. A descoberta e a clarificação deste tipo de inativação genética tem-se revelado uma importante ferramenta médica e de investigação e vem sendo utilizada para as mais variadas aplicações como sejam a inativação de genes responsáveis por tumores, no caso dos humanos, ou tentativas de alterar características das plantas como acontece com a cor das flores. Para além disso, os RNAs de interferência são ferramentas bastante eficazes para a inativação de genes e consequente compreensão do seu papel no desenvolvimento dos organismos. A descoberta destes mecanismos de inativação genética é uma evidência do quão tão pouco ainda sabemos sobre os mecanismos de controlo da expressão genética bem como sobre a interacção entre os diferentes agentes envolvidos nestes processos. A este propósito convém não esquecer que uma grande parte do genoma das células eucariotas não codifica para RNAm ou qualquer outro tipo de RNA sendo a sua função desconhecida. Outro aspecto interessante destas descobertas foi a constatação de que a ciência fundamental também pode beneficiar com as aplicações tecnológicas resultantes dessa mesma investigação fundamental sendo importante uma estreita interacção entre estes dois ramos do conhecimento.

Uma das empresas mais dinâmicas na procura de flores com novas cores é a Florigene (www.florigene.com), uma empresa australiana que tem procurado obter flores azuis de espécies como o craveiro ou a roseira nas quais nunca foi possível obter flores com estas características apesar das inúmeras tentativas realizadas. Em 1996 esta empresa iniciou

a produção de uma variedade de cravo chamada *Moondust* o qual, não sendo azul, apresentava uma cor malva. Esta empresa possui actualmente várias variedades de craveiro com diferentes tons de púrpura obtidas por transformação genética. Seguiram-se tentativas com vista à produção de rosas azuis por uma empresa japonesa (Suntory) em colaboração com a Florigene e uma empresa australiana (CSIRO). Em 2004 a companhia anunciou a criação das primeiras plantas capazes de produzir rosas azuis através da inserção de gene de petúnia responsável pela síntese do pigmento azul delfinidina (não existente em roseiras). Na realidade as rosas assim obtidas não eram verdadeiramente azuis devido à contaminação com o pigmento vermelho cianidina presente na variedade original. No entanto, a possibilidade de sintetizar o pigmento azul delfinidina em roseiras abria as portas à criação de rosas verdadeiramente azuis. Mais recentemente foi criada uma variedade capaz de produzir rosas com uma coloração já mais próxima do verdadeiro azul mas que se encontra ainda na transição entre o malva e o azul. Estas rosas foram produzidas utilizando a interferência de RNA para silenciar o gene responsável pela síntese da enzima dihidroflavonol-4-reductase (DFR) e que, através de modificações nos precursores, conduz à formação dos três tipos de pigmentos mais abundantes nas flores: cianidina (vermelho), delfinidina (azul) e pelargonidina (laranja). Como os precursores não possuem cor qualquer mutação no gene *dfR* origina plantas com rosas brancas. A transformação genética foi completada com a introdução de um gene para a delfidina da planta do amor-perfeito e um novo gene *dfR* de *Iris*. Deste modo, evitou-se a contaminação com cianidina e as rosas obtidas possuíam uma coloração já mais próxima do azul. A dificuldade em obter uma coloração verdadeiramente azul pode estar relacionada com o pH vacuolar nas pétalas de rosa. De facto, é conhecido desde há muito que o pH influencia a coloração dos pigmentos antocianicos com o mesmo pigmento a apresentar tonalidades diferentes para valores de pH diferentes. No caso das células de roseira o valor de pH ronda os 4,5 enquanto o valor ideal para uma tonalidade mais azul seria um pH menos ácido, à volta de 5,5. Deste modo, embora em termos genéticos as células tenham todas as condições para produzirem um pigmento azul existe um factor fisiológico que

condiciona o resultado final, mais um exemplo das dificuldades técnicas que condicionam a transformação genética de plantas.

9.10. Alteração nos teores de lenhina

Nos últimos anos e ao contrário do que seria porventura expectável o consumo de papel aumentou e as indústrias de produção de pasta e de papel são hoje indústrias florescentes em diferentes partes do globo, Portugal incluído. Grande parte da matéria prima para a indústria do papel é proveniente de recursos florestais sendo as espécies utilizadas variáveis de região para região. Um passo chave na produção de pasta de papel é a separação da celulose de outros componentes existentes na parede celular das células vegetais como pectinas e lenhina. Este procedimento é económica e ambientalmente pouco eficaz pelo que qualquer melhoria neste processo terá importantes aplicações naquelas duas vertentes.

A engenharia genética tem sido também aplicada à transformação genética de espécies arbóreas. A primeira árvore geneticamente modificada foi obtida em 1987, numa espécie de choupo, e desde então mais de 20 espécies de árvores geneticamente modificadas foram já testadas no campo. Em termos comerciais apenas duas espécies arbóreas tiveram sucesso, uma variedade de papaia resistente a um vírus (secção 9.4) e uma variedade de choupo cultivada na China. O choupo tem sido o género mais utilizado devido por um lado à sua fácil manipulação *in vitro* e ao facto do genoma de uma espécie de choupo (*Populus trichocarpa*) se encontrar sequenciado. Por outro lado, trata-se de uma espécie de crescimento rápido o que facilita a sua incorporação em programas de selecção e melhoramento. Em termos de características os ensaios têm incidido em grande parte na resistência a herbicidas, resistência a insectos e modificação ou redução da lenhina.

Nas paredes secundárias das células do xilema a lenhina constitui uma parte importante da biomassa variando entre 15 e 40% do peso seco em função das espécies e do tipo de xilema. A lenhina é um composto de natureza fenólica produzida a partir de álcoois aromáticos derivados do aminoácido fenilalanina e designados por coumaril álcool, coniferil álcool e sinapil álco-

ol. No processo de polimerização dos três tipos de álcoois aromáticos estão envolvidas enzimas do tipo das peroxidases e lacases que dão origem a um polímero bastante resistente que permite às células onde se encontra (essencialmente xilema e esclerênquima) suportarem tensões ou pressões elevadas.

Vários genes envolvidos na síntese de lenhina foram já identificados e analisados e a sua manipulação efectuada utilizando a técnica do RNA antisense ou mecanismos de co-supressão. Esta manipulação tem tido como objectivo dois aspectos principais. Por um lado a redução dos teores em lenhina sem que isso afecte a arquitectura e a estrutura do lenho e desse modo interfira com o desenvolvimento das árvores. Por outro lado, tentativas de modificar a composição da lenhina de forma a tornar a sua separação da celulose mais eficaz. Apesar de resultados promissores obtidos em choupos, eucaliptos e algumas gimnospérmicas a utilização comercial de árvores geneticamente modificadas com alterações no teor ou características da lenhina está ainda longe de ser uma realidade.

9.11. Rendimento das culturas

O rendimento das culturas depende de uma multiplicidade de factores que têm a ver com factores endógenos das plantas e com as condições ambientais onde as plantas se desenvolvem. Uma das maneiras de aumentar os rendimentos de culturas é através da redução das perdas devidas a factores bióticos e abióticos como foi referido em algumas das secções anteriores. No entanto, é também possível aumentar os rendimentos tornando as plantas mais eficazes em termos fotossintéticos ou através de uma mais eficaz absorção dos elementos minerais de que necessitam.

No decurso da fotossíntese as moléculas de carbono podem ser fixadas em compostos com 3 ou 4 átomos de carbono. A fixação do CO_2 em moléculas de quatro átomos de carbono, como acontece por exemplo no milho ou na cana-do-açúcar é um processo energeticamente mais eficaz que a fixação em C3. O processo de fixação em C4 depende da enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PPEC) que é responsável pela formação de ácidos orgânicos de 4 carbonos enquanto na fotossíntese em C3 (formação

de ácido 3-fosfoglicérico) a enzima chave é a Rubisco, que devido à sua actividade de oxigenase, limita a eficiência fotossintética em virtude da fotorespiração. Com base nestas diferenças têm sido realizados ensaios com o objectivo de expressar em plantas C3 os genes responsáveis por enzimas da via fotossintética C4. Assim, o gene do milho responsável pela produção de PPEC foi transferido para plantas de arroz tendo-se verificado elevados níveis de expressão da enzima e um aumento dos rendimentos (10 – 30%) em ensaios experimentais realizados no campo. No entanto, deve referir-se que as plantas em C4 possuem não apenas diferenças em termos bioquímicos relativamente às plantas C3 mas também alterações importantes na anatomia do mesófilo com os tecidos vasculares a serem rodeados por uma bainha formada por células bastante desenvolvidas e uma camada mais exterior de células do mesófilo de tamanho mais pequeno. Este tipo de disposição dos tecidos é chamado anatomia de Kranz e é essencial para o mecanismo de fotossíntese em C4 uma vez que a enzima PEPC está limitada às células do mesófilo enquanto as enzimas do ciclo de Calvin se localizam nas células da bainha. A manipulação genética permite alterações nas enzimas presentes mas a modificação da estrutura dos tecidos é uma característica difícil de modificar pelo que os resultados estarão sempre condicionados por esta limitação.

Um outro aspecto que tem merecido algum interesse pelos investigadores é a interacção entre o pigmento fitocromo e a fotossíntese. O fitocromo é na realidade um conjunto de proteínas detectoras da luz envolvidas no controlo de diferentes aspectos do desenvolvimento como sejam a floração, germinação de sementes ou o crescimento das plantas. É sabido que as plantas são capazes de detectar a intensidade e qualidade da radiação através do fitocromo e modificar algumas das suas características de forma a responder a diferentes condições de luz. Também importante é a constatação de que a distribuição dos produtos da fotossíntese depende também da actividade do fitocromo. Ensaio de manipulação genética do fitocromo realizados no tabaco mostraram que a inserção de cópias adicionais do gene do fitocromo A de aveia conduz, em determinadas condições ambientais e de densidade das culturas, a uma diminuição do tamanho das plantas e uma maior distribuição dos assimilados para as folhas, aumentando o ín-

dice de colheita em cerca de 20%. Estes resultados mostram que o fitocromo é um alvo interessante em termos de transformação genética de plantas de forma a aumentar os rendimentos das colheitas sendo necessário uma maior compreensão do papel deste tipo de pigmento em processos fisiológicos das plantas que podem afectar a produção como sejam a fotossíntese, crescimento e transporte de produtos da fotossíntese para locais de armazenamento.

O desenvolvimento das plantas depende dos elementos minerais que elas são capazes de retirar do solo. Nas culturas agrícolas onde se pretendem elevadas taxas de crescimento, os elementos minerais constituem muitas vezes um factor limitante pelo que são adicionados ao solo na forma de adubos. A utilização de adubos permite otimizar o crescimento mas pode ser também uma causa importante de poluição com a lixiviação destes elementos a contaminar as águas de superfície e os lençóis freáticos. Para além disso, a utilização de adubos aumenta os custos de produção e como consequência o preço final dos produtos agrícolas.

Um dos elementos mais importantes para o desenvolvimento das plantas é o azoto. As plantas não têm a capacidade de captar o azoto atmosférico onde existe em elevadas quantidades pelo que a nutrição azotada é feita através da absorção de compostos azotados do solo como nitrato e amónio que as plantas depois convertem em compostos orgânicos. No entanto, algumas espécies, em particular as leguminosas, são capazes de estabelecer associações simbióticas com bactérias fixadoras de azoto e obter assim este elemento de uma forma mais eficaz, não estando dependentes da maior ou menor presença de compostos azotados no solo. A possibilidade de bactérias fixadoras de azoto poderem estabelecer associações simbióticas com outras espécies, em particular com os cereais, seria de grande interesse em termos agrícolas e ambientais pois estes são as espécies mais cultivadas a nível global. O estabelecimento de associações simbióticas entre bactérias do género *Rhizobium* e as raízes de leguminosas é uma interacção complexa que leva à formação de nódulos que alteram a estrutura das raízes. O estabelecimento deste tipo de associação depende de mecanismos específicos de reconhecimento entre as bactérias e as células deste grupo de plantas que não se verificam noutras espécies impossibilitando assim o alargar deste tipo de interacção a outras espécies de plantas. A questão que se coloca é se será viável

a manipulação genética de plantas de forma a permitir o estabelecimento de associações simbióticas entre bactérias fixadoras de azoto e, por exemplo, o trigo, o milho ou o arroz? No estado actual do conhecimento é situação é impossível. No entanto, este desafio deve ser encarado com algum optimismo. Alguém imaginava, há 50 anos atrás, a possibilidade de as plantas produzirem o seu próprio insecticida? Ou de se inactivarem genes utilizando moléculas de RNA? Provavelmente não. Os progressos obtidos nos anos mais recentes no âmbito da genómica funcional deixam antever que estamos apenas a dar os primeiros passos no âmbito da compreensão dos mecanismos de controlo genético e da manipulação de plantas. Convém ainda lembrar que há bem pouco tempo atrás, a transformação genética de cereais com *A. tumefaciens* (uma bactéria da mesma família do género *Rhizobium*) era praticamente impossível devido ao facto de em condições naturais a bactéria não infectar monocotiledóneas. No entanto, a descoberta de estirpes mais virulentas e a utilização de compostos químicos como a acetoseringona veio tornar a manipulação de gramíneas com *Agrobacterium* uma realidade. A possibilidade que uma situação semelhante se verifique no caso das bactérias do género *Rhizobium* parece assim plausível embora seja difícil antever para quando.

9.12. Tecnologia *terminator*

A chamada tecnologia *terminator* também conhecida como TPS (*Technology Protection System*) ou GURT (*Genetic Use Restrictive Technology*) afecta a viabilidade de sementes impedindo que elas possam ser utilizadas em novos ciclos de propagação. A tecnologia foi inicialmente desenvolvida e patenteada por uma empresa americana (Delta and Pine Land Co.) em colaboração com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (US Department of Agriculture, USDA). A polémica surgiu em grande parte quando a empresa Monsanto se envolveu na aquisição da referida companhia e da respectiva patente provocando os receios de que esta tecnologia pudesse cair nas mãos de um gigante do sector agroquímico com eventuais consequências na proibição de utilização de sementes pelos agricultores.

Existem vários modelos de tecnologia terminator desenvolvidos por diferentes instituições e normalmente protegidos por patentes mas, em termos gerais, a tecnologia baseia-se em três genes que são inseridos nas plantas. Esses genes são o gene letal responsável pela síntese de uma proteína letal para as plantas, o gene que codifica para uma recombinase e o gene repressor. A figura 90 ilustra o processo que leva à formação de sementes não viáveis utilizando os três genes acima referidos e que em seguida se descreve de forma resumida.

O gene letal pode ser um gene que codifica para uma proteína inibidora dos ribossomas (RIP) que vai interferir com a síntese proteica. O gene é associado a um promotor específico que é funcional apenas em fases adiantadas do desenvolvimento da semente, por exemplo o promotor das proteínas LEA produzidas apenas nas fases tardias do desenvolvimento embrionário. De forma a evitar a expressão do gene RIP na primeira geração de sementes uma sequência bloqueadora é colocada entre o promotor LEA e o gene RIP. Esta sequência possui locais de reconhecimento específicos para uma recombinase que, uma vez produzida, irá remover a sequência bloqueadora colocando o gene sob ação do promotor permitindo assim a sua expressão. Por sua vez, a recombinase é controlada por um promotor específico para uma proteína repressora codificada pelo terceiro gene. A proteína repressora torna-se inactiva quando se liga a um composto específico, por exemplo a tetraciclina.

As sementes produzidas pelas plantas geneticamente transformadas com as sequências acima referidas são vendidas aos agricultores após tratamento com tetraciclina. Estas plantas de primeira geração irão produzir uma semente normal que germinará e dará origem a uma segunda geração de plantas, uma vez que, o tratamento com tetraciclina é ulterior à fase em que o promotor LEA está activo. No entanto, nas sementes produzidas pelas plantas de segunda geração, semeadas pelos agricultores, a proteína repressora está inactiva devido ao tratamento inicial com tetraciclina. Em consequência disso, o promotor da recombinase é activado permitindo a síntese da enzima correspondente e a remoção da sequência bloqueadora entre o gene RIP e o promotor LEA, que numa fase precisa do desenvolvimento da semente estará funcional. Desta forma, a proteína RIP é activada, a síntese proteica

inibida e as sementes ficam impossibilitadas de germinar o que não impede, todavia, a sua utilização na alimentação. Uma estratégia alternativa consiste em produzir duas linhas de plantas geneticamente transformadas que são depois cruzadas. Numa das linhas estão presentes o gene RIP, o promotor LEA e as sequências bloqueadoras. Na outra linha está presente o gene responsável pela produção da enzima recombinase associado a um promotor específico da germinação. As sementes híbridas (vendidas aos agricultores) germinam sendo o gene da recombinase activado durante o processo de germinação. No entanto, o promotor LEA apenas será activo durante uma fase tardia do desenvolvimento das sementes produzidas pelas sementes híbridas impedindo assim a sua germinação e a possibilidade dos agricultores usarem estas sementes no ano seguinte.

Devido à polémica resultante deste tipo de tecnologia as empresas responsáveis por estas patentes nunca utilizaram a tecnologia em termos comerciais embora novas patentes tenham sido conseguidas para este tipo de plantas transgénicas o que significa que a hipótese de poder vir a ser utilizada não está posta de parte. Os principais beneficiários destas PGMs seriam as empresas vendedoras de sementes pois anualmente os agricultores seriam obrigados a comprar novas sementes o que, apesar de tudo, é uma situação que não é nova. No entanto, a tecnologia terminator pode também ter algum interesse em evitar a disseminação de sementes geneticamente modificadas, um dos principais receios das organizações ambientalistas (ver capítulo 10).

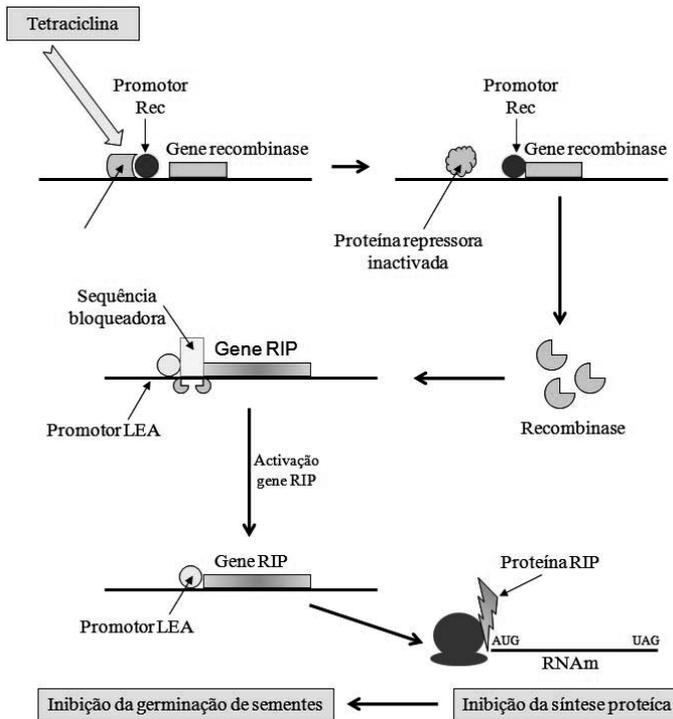


Figura 90 – Um dos possíveis métodos usados na tecnologia terminator.

9.13. Outras características

As metodologias de transformação genética de plantas permitem possibilidades quase infinitas no que diz respeito à modificação das características das plantas. Para além dos exemplos já referidos outros que têm sido objecto de ensaios laboratoriais ou ensaios de campo podem se referidos de forma mais sintética.

Uma das aplicações de grande interesse é a obtenção de plantas incapazes de formar pólen viável e, em consequência disso, gâmetas masculinos. O resultado é a obtenção de plantas funcionalmente femininas. Estas plantas podem ser facilmente cruzadas com linhas normais dando origem a sementes híbridas sem necessidade de despendere um enorme esforço na polinização artificial. A sua obtenção tem um interesse particular em plantas como o milho em que as sementes vendidas aos agricultores são

híbridas. O problema destas plantas é que as sementes obtidas possuem também esterilidade masculina podendo essa dificuldade ser ultrapassada pela utilização de genes capazes de restaurar a fertilidade nos híbridos. A esterilidade masculina pode resultar da actividade de genes nucleares ou citoplasmáticos sendo neste último caso designada por cms (*cytoplasmic male sterility*) e está, por norma, associada a anomalias nas células do tapete que acabam por degenerar impedindo o desenvolvimento normal do pólen. Por transformação genética foi possível obter linhas cms em brássicas e no tabaco utilizando um gene bacteriano responsável pela síntese de uma ribonuclease associado a um promotor específico das células do tapete.

Outra aplicação das plantas geneticamente modificadas que pode vir a ter um grande interesse num futuro próximo é a produção de biocombustíveis. Os elevados preços dos combustíveis fósseis e a eventual diminuição destes recursos tem estimulado o desenvolvimento de fontes alternativas de combustíveis. A produção de biocombustíveis não é uma tecnologia nem uma ideia recente sendo este tipo de combustíveis usados desde há muito. O etanol pode ser produzido a partir de plantas como o milho mas os custos de produção, para a maior parte das variedades, parecem ser demasiado elevados para uma produção sustentável. A utilização de plantas de milho geneticamente modificadas e capazes de efectuar as fases iniciais de digestão do amido em açúcares mais simples de maneira a tornar mais eficaz a ulterior digestão desses açúcares em álcool por leveduras é uma das estratégias que pode ser utilizada para a obtenção de melhores rendimentos. A produção de etanol a partir de biomassa que normalmente não é utilizada é outro aspecto interessante. No entanto, a conversão de celulose em açúcares e em etanol é um processo pouco eficaz em parte devido à presença de lenhina que interfere com a degradação da celulose. A manipulação das vias de síntese da lenhina, à semelhança do que foi referido na secção 9.10, tornando mais eficaz a extracção da celulose é um dos possíveis caminhos para tornar a utilização de biomassa mais eficaz na produção de etanol. No Brasil, a utilização da cana-do-açúcar para a produção de etanol utilizado como combustível em automóveis é um bom exemplo da utilização de plantas como fontes alternativas de combustíveis, ainda que neste caso não se trate de plantas geneticamente modificadas.

As plantas são também promissoras na produção de diesel. O biodiesel é produzido a partir de plantas ricas em óleos como sejam a soja, a canola e a purgueira. Embora a informação relativa à manipulação genética de plantas na produção de biodiesel seja escassa convém referir que duas das espécies mais importantes na produção de biodiesel são em grande parte cultivadas como PGMs. A manipulação das vias de síntese dos lípidos com o objectivo de aumentar a eficiência do processamento dos óleos com vista à produção de biodiesel pode permitir aumentar a produção deste tipo de combustível.

Para terminar convém referir que a transformação genética pode permitir a modificação de alguns alimentos tornando-os mais ricos num tipo particular de nutrientes, menos prejudiciais para a saúde reduzindo os níveis de determinados compostos ou mais eficazes para uma utilização industrial fazendo variar os seus diferentes componentes. Por exemplo, é possível aumentar os níveis de aminoácidos básicos (lisina ou arginina) ou ricos em enxofre (cisteína ou metionina) das proteínas vegetais tornando-se mais parecidas com as proteínas animais, mais ricas nestes compostos. Também a composição do amido pode ser modificada de forma a torná-lo mais eficaz em termos industriais impedindo a sua floculação. É o que acontece no amido de batata quando a proporção de hidratos de carbono lineares (amilose) e ramificados (amilopectina) é alterada inibindo as enzimas envolvidas na formação de um dos componentes. Pode-se assim obter um amido com um teor mais elevado de amilose indicado para aplicações industriais. Batatas com um teor de amido mais elevado absorvem menos óleo durante a fritura um aspecto importante na redução dos níveis de lípidos ingeridos.

Muitas outras características podem no futuro vir a ser melhoradas algumas delas dificilmente as conseguiremos imaginar no presente. A maneira como as plantas geneticamente modificadas vão influenciar o futuro da humanidade depende muito da forma como a sociedade vier a aceitar este tipo de tecnologia. Para já os receios da sociedade são muitos, em grande parte infundados, como veremos no capítulo seguinte, mas que têm dificultado em muitos países, em particular na Europa, a adopção desta tecnologia de uma forma mais eficaz. O papel dos investigadores é aqui de primordial importância tentando explicar à sociedade as metodologias utilizadas e os

benefícios que podem advir da utilização deste tipo de tecnologia bem como as suas limitações. A confiança nas entidades reguladoras é também crucial e os escândalos mais ou menos recorrentes que se têm verificado com vários produtos alimentares não contribui em muito para a abertura da sociedade a alimentos vistos por muitas pessoas como “não naturais” e resultantes de “sinistras manipulações genéticas” que ocorrem nos laboratórios de perigosas empresas de biotecnologia cujo único objectivo é o lucro fácil e o controlo da humanidade através de uma perigosa produção industrial de alimentos.

A compreensão dos procedimentos experimentais utilizados na manipulação genética de plantas não é fácil para a generalidade da população. Esta situação presta-se à manipulação daqueles que, por ignorância ou por razões bem definidas, são contra a utilização das PGMs. Importa pois informar para que as pessoas possam julgar com base em informação credível e não em receios infundados que são muitas vezes propalados como se de verdades absolutas se tratassem.

CAP. 10. IMPACTO DAS PLANTAS GENETICAMENTE MODIFICADAS

10.1. Introdução

Cada vez que se cria um novo conhecimento há pessoas que resistem, que o negam. Mas no final a verdade e a ciência triunfam.

(Rajendra Pachauri, Presidente do IPPC – Painel Intergovernamental para as Alterações Climáticas. Jornal Público, 30/4/2010)

A tecnologia actual permite a modificação genética das plantas de forma bastante eficaz e a obtenção de uma grande diversidade de características que, como vimos no capítulo anterior vão desde a possibilidade de resistência a insectos ou herbicidas até à produção de compostos químicos de interesse industrial. Como resultado da aplicação desta tecnologia, a cultura de plantas geneticamente modificadas tornou-se comum em alguns países como os Estados Unidos, Canadá, Brasil, Argentina e China sendo de esperar aumentos consideráveis na cultura e comercialização deste tipo de plantas nos próximos anos, especialmente em países asiáticos. A cultura em larga escala e a consequente comercialização de produtos geneticamente modificados levantou novas questões que em muitos países, têm provocado acesas controvérsias entre oponentes desta tecnologia e aqueles que são favoráveis à sua implementação.

Os receios surgidos em relação à utilização de plantas geneticamente modificadas são, na maior parte dos casos, infundados e sem qualquer sustentação de natureza científica limitando-se a explorar os medos que

muitas pessoas manifestam relativamente ao consumo de alimentos resultante essencialmente dos escândalos alimentares que em anos recentes agitaram alguns países como sejam a doença das vacas loucas, a febre aftosa, os nitrofuranos, entre outros. Em muitos casos, trata-se de manter uma agenda com objectivos políticos, no caso dos movimentos ambientalistas, ou económica, no caso de agricultores ou associações ligadas à agricultura orgânica, lançando na opinião pública, através de uma imprensa ávida de escândalos e assuntos polémicos, informações erróneas baseadas em factos pseudo-científicos ou na propagação de mitos urbanos.

Talvez não tão surpreendente quanto isso estes movimentos conseguiram, em alguns países, e em particular na União Europeia, condicionar a legislação existente sobre PGMs tornando-a absurda ao ponto de apenas grandes empresas do sector agroindustrial poderem desenvolver este tipo de investigação. De facto, os custos associados à investigação e, numa fase ulterior, ao cumprimento das normas de segurança ambiental e de saúde são de tal modo elevados que empresas de pequena ou média dimensão ou organismos públicos são incapazes de conduzir este tipo de ensaios. Acrescem aos custos os direitos de propriedade intelectual ou de patentes existentes sobre muitas das tecnologias ou dos produtos que é preciso utilizar. O resultado absurdo desta situação é que, ao contrário do que aconteceu durante a revolução verde, em que o melhoramento das variedades foi realizado, em grande parte, por organismos públicos encontramos actualmente numa situação em que são 3 ou 4 empresas gigantes do sector agroquímico que lideram este tipo de investigação. Para além disso, ao impor restrições draconianas ao comércio e cultura de plantas geneticamente modificadas cria-se na população em geral a ideia de que se trata de uma tecnologia perigosa o que só contribui para agravar os receios já existentes. Como pode alguém sentir-se seguro a consumir plantas geneticamente modificadas se o legislador condiciona de forma tão apertada a sua utilização permitindo ao mesmo tempo que as plantas obtidas por outros métodos como mutações ou poliploidia não sofram um controlo tão rígido?

A agricultura não nasceu com as plantas geneticamente modificadas e uma correcta avaliação dos riscos das PGMs só pode ser feita em comparação com os riscos e impactos colocados pelas variedades e práticas

agrícolas que têm sido utilizadas até aqui. Pretender avaliar o impacto das PGMs como se antes não houvesse agricultura e os alimentos crescessem em prateleiras de supermercado sem qualquer impacto ambiental é, no mínimo, surrealista.

A actividade agrícola, como qualquer outra actividade humana tem um custo ambiental que pode ser diminuído mas não pode ser eliminado. Se alguma utilidade existe nas plantas geneticamente modificadas, e os factos têm mostrado que existe, ela é com toda a certeza a diminuição dos impactos ambientais resultantes da agricultura.

Nas secções seguintes são analisados os possíveis impactos das plantas geneticamente modificadas à luz dos conhecimentos que existem e não com base em teorias da conspiração. Alguns dos argumentos utilizados pelos movimentos anti-PGMs serão também discutidos. Como se compreende, a interpretação dos factos é a do autor e, não sendo a biologia uma ciência exacta, outros pontos de vista são certamente possíveis.

10.2. Eventuais impactos em termos de saúde

Na fase inicial de cultura e comercialização das plantas geneticamente modificadas as principais críticas que se apontaram à tecnologia foram os seus riscos em termos de saúde pública. Antes de analisar com mais detalhe este aspecto convém deixar muito claro que, após 14 anos de cultura de PGMs em larga escala, os últimos seis (2004-2009) com áreas de cultura superiores a 80 milhões de hectares/ano, não se registou qualquer problema de saúde em humanos ou animais que possa ser apontado às plantas geneticamente modificadas. Assim, qualquer informação que até hoje possa ter sido encontrada referindo acidentes com a utilização de PGMs é falsa. Um exemplo de uma tentativa de manipulação de factos com o objectivo de imputar às PGMs a responsabilidade por acidentes é analisada na secção seguinte. Vejamos então quais os eventuais problemas que têm sido apontados às PGMs em termos de saúde pública.

Um dos argumentos utilizados contra as PGMs tem-se baseado no facto da selecção das células geneticamente transformadas, durante o processo de

regeneração das plantas em condições laboratoriais, se fazer com base na utilização da resistência a um antibiótico, como foi referido no capítulo 8. A ideia subjacente a esta crítica é que o gene responsável pela resistência ao antibiótico, normalmente o gene *nptII* que confere resistência à canamicina possa ser, de alguma maneira, transferido para as bactérias existentes no sistema digestivo dos humanos ou dos animais domésticos alimentados com PGMs levando assim à criação de estirpes resistentes aos antibióticos utilizados no combate a infecções bacterianas. O que seria preciso para que o gene de resistência a um antibiótico localizado numa planta de milho e ingerido pudesse ser incorporado numa bactéria? Em primeiro lugar convém referir que estamos a falar de um gene localizado num genoma que terá, no mínimo, uns 30.000 genes. Depois, é também importante salientar que apenas uma parte muito reduzida do genoma codifica para proteínas. Nos humanos essa percentagem anda à volta dos 2%. Supondo que numa planta de milho a percentagem de DNA que codifica para proteínas é semelhante, o gene de resistência à canamicina inserido no genoma de milho representa menos de 0,0033% do número de genes presente numa célula, não contando com o genoma citoplasmático. Fazendo uma proporção para o genoma total do milho esse valor seria inferior a 0,00001% do genoma. Outro facto que teria de se verificar seria que o gene em questão não fosse danificado durante a digestão e conseguisse passar incólume à acção dos agentes químicos que existem no sistema digestivo. Suponhamos que isso de facto acontecia e que o gene se mantinha intacto. A probabilidade seguinte seria que o gene intacto de alguma maneira passasse para o interior das bactérias. Diga-se que as bactérias podem incorporar DNA estranho, um processo chamado competência. Essa capacidade é mesmo usada para transformar bactérias em condições laboratoriais em situações muito específicas (competência artificial). Depois, seria ainda preciso que o gene se integrasse num plasmídeo ou no cromossoma bacteriano sem que os sistemas de defesa das bactérias o destruíssem. Um gene não é apenas uma sequência de DNA pelo que o seu funcionamento implica a existência de mecanismos de controlo de expressão, por exemplo promotores, os quais teriam também que acompanhar neste processo o gene em questão, ou então, que o gene fosse incorporado num local do genoma bacteriano

associado a um promotor endógeno. Finalmente, o gene teria que ser transmitido a outras bactérias através de mecanismos de conjugação bacteriana.

Esta situação implicaria um conjunto de ocorrências cuja probabilidade de se verificarem é remota. É claro que a probabilidade de todos estes eventos acontecerem em simultâneo não é zero e, não sendo zero pode eventualmente vir a acontecer. Também pode acontecer que alguém acerte no euromilhões em 5 semanas consecutivas mas até agora parece que nenhum felizardo teve essa sorte. A ciência não pode demonstrar que um determinado facto não se venha a verificar. Esse exercício é impossível. Mas pode indicar, com um grau de certeza elevado, se um determinado acontecimento pode ou não ocorrer. Para isso os cientistas usam tratamentos estatísticos que permitam sustentar as hipóteses que colocam. Quando o valor de significância para uma determinada análise é inferior a 0,05, ou se quisermos ser mais exigentes a 0,01, isso implica que a hipótese de um acontecimento não se dever ao acaso é superior a 95 ou 99%, respectivamente.

Uma via alternativa para a aquisição de resistência a antibióticos através de transferência horizontal de genes poderia ser a passagem do gene de resistência ao antibiótico de restos de PGMs que ficam no campo onde são degradadas, podendo o gene ser incorporado em bactérias do solo e depois eventualmente transferido para bactérias que causam doenças nas pessoas ou em animais. Também neste caso as probabilidades são reduzidas pois as plantas sofrem processos de senescência que degradam o DNA e outras macromoléculas, para além das outras dificuldades já referidas. Como alguém dizia de forma jocosa relativamente a esta hipótese de transferência horizontal de genes, *se as bactérias incorporassem genes de plantas, ao longo de milhões de anos de permanente contacto com os tecidos vegetais algumas delas, por certo, já se teriam tornado plantas.*

Apesar desta improbabilidade, as companhias produtoras de PGMs têm desenvolvido estratégias com o objectivo de remover os genes de selecção utilizados durante o processo de obtenção das PGMs para que eles não se mantenham nas plantas que vão ser usadas no campo. Um dos exemplos é o arroz dourado referido no capítulo anterior. Para as companhias este procedimento tem a vantagem de permitir usar estas plantas em futuros ensaios de transformação genética utilizando o mesmo material vegetal.

Caso contrário ter-se-ia que utilizar um gene de selecção diferente. Uma das estratégias utilizadas para remoção dos genes consiste na utilização de recombinases que reconhecem sequências marcadoras que delimitam o gene em causa provocando assim a sua eliminação do genoma. Outro tipo de procedimentos envolve a obtenção de PGMs em que a inserção do gene de interesse e do gene marcador é feita em separado. Esta situação conduz a que os dois genes possam ser inseridos em locais diferentes do mesmo cromossoma ou em cromossomas diferentes. A realização de cruzamentos em as plantas transformadas simultaneamente com os dois genes permitirá na F1 obter linhas em que apenas o gene de interesse estará presente.

Como se pode concluir, não só a probabilidade de um gene de resistência a um antibiótico se transferir das plantas para as bactérias é diminuta, como existem soluções técnicas que permitem evitar que isso aconteça. Deste modo, pode concluir-se que a principal causa de resistência aos antibióticos reside na facilidade com que as pessoas têm acesso a este tipo de agentes antimicrobianos, em muitos casos usados indevidamente na automedicação. A utilização destes compostos na alimentação animal é outra possível via de aquisição de resistência.

Uma segunda fonte de preocupação com as PGMs é que elas possam introduzir na alimentação humana novas proteínas responsáveis pelo aparecimento de alergias. Esta possibilidade foi muito explorada devido a um incidente ocorrido nos Estados Unidos com uma variedade de milho geneticamente modificada designada StarLink. Esta variedade foi aprovada pela EPA (*Environmental Protection Agency*) apenas para consumo animal. O milho StarLink continha uma proteína Bt do tipo Cry9C contra insectos. A EPA autorizou esta variedade apenas para consumo animal devido ao facto das análises de risco terem indicado que a proteína apresentava uma maior estabilidade durante a digestão e maior tolerância a elevadas temperaturas. Estas características podem ser indícios de uma maior alergenicidade proteica o que aconselha cautelas na utilização deste tipo de proteínas para consumo humano. Ao mesmo tempo que a companhia Aventis realizava mais testes requeridos pela EPA para provar a inocuidade da utilização desta variedade de milho em humanos surgiu a notícia de que traços do milho StarLink tinham sido detectados em tacos (uma comida muito popular

no México e nos USA) comercializados por uma empresa de alimentação. Como resultado desta situação, as companhias alimentares retiraram os produtos dos supermercados e a comercialização deste tipo de milho foi descontinuada pela empresa Aventis mesmo para consumo animal. Testes ulteriores realizados pelo CDCP (*Center for Disease Control and Prevention*) em pessoas que supostamente teriam desenvolvido alergias como consequência do consumo deste tipo de milho mostraram que não foi possível relacionar nenhum dos casos com o consumo de milho StarLink (para mais detalhes consultar Lemaux, 2008; 2009).

A presença do milho StarLink em produtos alimentares onde ele supostamente não deveria existir pode ter surgido por contaminação durante o processamento do milho após colheita ou ser o resultado de polinização cruzada com outras variedades de milho. Este acontecimento levanta questões relacionadas com a rotulagem dos produtos alimentares, com a possibilidade de mistura de alimentos de diferentes proveniências e com a possibilidade de ocorrência de cruzamentos entre variedades com diferentes características que serão abordadas mais à frente.

Outra situação relacionada com alergias e plantas transgênicas surgiu com a transformação genética de plantas de soja com o gene de uma albumina presente nas sementes da noz-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*) de forma a aumentar os teores de metionina, um aminoácido que existe em reduzidas quantidades na maioria dos frutos e legumes o que pode causar deficiências nutritivas em pessoas com uma dieta vegetariana desequilibrada. A companhia (Pioneer Hi-Bred International) produtora desta variedade de soja identificou problemas de alergenicidade o mesmo tendo concluído a agência americana que controla a segurança de alimentos e medicamentos (FDA, *Food and Drug Administration*). Tendo em conta estes dados a empresa e a FDA concluíram que não seria seguro comercializar esta variedade. De referir que o carácter alergénico da albumina produzida na noz-do-Brasil já era conhecido pelo que seria de alguma forma expectável que a introdução do gene desta proteína numa outra espécie levasse igualmente à produção de uma proteína alergénica. A eventual alergenicidade de uma proteína pode ser prevista com algum grau de certeza comparando a sua sequência de aminoácidos com outras proteínas de alergenicidade conhecida.

Essa informação está disponível online no sítio <http://www.allergenonline.org> onde este tipo de pesquisa pode ser efectuado. No entanto, o facto de não existirem semelhanças entre uma determinada proteína e uma outra já referida como alergénica não significa, logo à partida, ausência de carácter alergénico devendo ser realizados testes adequados. Como já foi referido, a estabilidade da proteína no sistema digestivo ou a sua capacidade de tolerar temperaturas elevadas são outros indicadores potenciais do carácter alergénico. Por outro lado, uma proteína não alergénica numa planta não se irá tornar alergénica apenas por ser expressa numa outra planta na sequência de um processo de transformação genética. Por exemplo, a ferritina, uma proteína transportadora de ferro não se irá tornar alergénica se for expressa em variedades de arroz para consumo humano uma vez que a proteína não tem esse carácter alergénico no material de origem.

As alergias resultam de uma reacção a determinados antigénios que tem como consequência a produção de imunoglobulinas. As reacções alergénicas são mais ou menos comuns numa percentagem de 1-2% dos adultos e 5-8% das crianças. O grau de sensibilidade a um determinado alergénico é variável em pessoas alérgicas e o tipo de produtos a que as pessoas são alérgicas é também variável. Em termos alimentares, produtos como amendoins e os chamados frutos secos, peixe, leite, marisco, trigo e soja estão entre aqueles que causam maiores problemas de alergias. Nos Estados Unidos, os amendoins causam todos os anos alguns problemas de saúde graves e mesmo algumas mortes. No entanto, nenhuma referência é feita em termos de rotulagem a este problema o mesmo se verificando com os outros produtos referidos.

Os conhecimentos científicos actualmente disponíveis, associados a um controlo eficaz pelas autoridades competentes e a testes adequados de avaliação de risco tornam pouco provável que as PGMs possam vir a ser um problema grave de saúde pública relativamente à sua eventual alergenicidade. Importa ainda referir que problemas de alergias podem também surgir em variedades produzidas pelos métodos convencionais de cruzamento e selecção pois pode ocorrer a incorporação de genes cuja função não esteja determinada e que podem conduzir à produção de proteínas alergénicas. A diferença é que as PGMs sofrem um maior controlo e, em consequência disso, são mais seguras no que se refere a este aspecto.

Ainda no que se refere aos problemas de alergias convém referir que a tecnologia de manipulação do DNA pode permitir que plantas produtoras de produtos alergénicos sejam manipuladas de forma a evitar a produção dessas proteínas por exemplo no trigo e na soja. De forma irónica, as PGMs surgem assim como uma ferramenta de elevado potencial para combater as alergias.

De acordo com alguns sectores de opinião, outro possível impacto negativo da utilização de PGMs prende-se com a eventual entrada na cadeia alimentar de proteínas ou de outros compostos produzidas pelas PGMs e com as quais os humanos não teriam tido contacto. A ingestão destes compostos pode resultar em problemas de toxicidade aguda a curto prazo ou no aparecimento de cancro a longo prazo. Este risco eventual tornou-se uma bandeira do movimento anti-PGMs quando um investigador escocês, do Instituto Rowett, em Aberdeen, sugeriu que ratinhos alimentados com batatas geneticamente modificadas apresentavam alterações intestinais. Estes resultados foram tornados públicos num programa televisivo antes de serem publicados numa revista internacional com arbitragem científica, situação que só ocorreu depois da polémica estar instalada e a pedido da revista. De acordo com A. Pusztai, ratos alimentados com batatas geneticamente modificadas contendo um gene da planta *Galanthus nivalis* (campaínhas-de-inverno) para a produção de uma lectina com vista a reduzir o ataque por insectos apresentavam anomalias no sistema imunitário e em órgãos do sistema digestivo o que afectava o seu desenvolvimento quando este era comparado com ratos alimentados com batatas não transgénicas. Curiosamente, o investigador atribuiu o problema não à lectina consumida (tóxica para insectos) mas sim ao próprio método de transformação genética que fazia uso do promotor CaMV 35S usado em muitos protocolos de transformação. Tentativas para repetir os resultados obtidos revelaram-se infrutíferas tendo uma comissão da Royal Society analisado os resultados sem que tivesse chegado à mesma conclusão. No final, A. Pusztai acabou por ser despedido do instituto onde trabalhava por alegada manipulação de resultados. Embora esta variedade de batateira nunca tenha sido comercializada e dos resultados nada terem provado, a polémica estava instalada tendo sido aproveitada de forma eficaz pelo movimento anti-PGMs com a ajuda

da imprensa sensacionalista. Importa acrescentar que o eventual perigo da utilização do promotor CaMV 35S não faz o mais pequeno sentido. O vírus CaMV que fornece o promotor é comum em muitas plantas e é continuamente ingerido pelas pessoas. Tanto quanto se sabe nenhum problema de saúde pública foi alguma vez relacionado com este vírus.

Num outro exemplo de eventuais efeitos negativos do consumo de PGMs ou de produtos derivados a cientista russa I. Ermakova anunciou, também neste caso fora do âmbito das publicações em revistas da especialidade com arbitragem científica, a ocorrência de uma elevada taxa de mortalidade infantil em ratos alimentados com soja transgénica resistentes ao herbicida glifosato: mais de 50% de mortalidade em comparação com o controlo onde esse valor era de 9%. De acordo com a autora estes resultados seriam o resultado da elevada actividade mutagénica causada pela inserção do DNA de resistência ao herbicida na variedade de soja em questão. Estes resultados nunca foram confirmados por outros autores e a autora nunca aceitou a publicar os resultados numa revista científica onde pudessem ser escrutinados.

Se alguma coisa há de positivo a retirar dos casos Pusztai e Ermakova é a necessidade de efectuar testes toxicológicos sempre que seja previsível que a introdução de um determinado gene numa planta possa causar alguma toxicidade. Essa toxicidade potencial deve ter em conta o próprio produto do gene inserido, por exemplo proteínas que funcionem como lectinas, para usarmos como exemplo o caso Pusztai, e a possibilidade do gene inserido provocar alterações não expectáveis na planta geneticamente transformada devido à activação/inactivação de genes não alvo.

Quanto ao eventual aparecimento de doenças cancerígenas a longo termo como resultado do consumo de plantas geneticamente modificadas muitas vezes sugerido por algumas pessoas trata-se de um argumento difícil de rebater. Uma análise correcta deste tipo de problemas só poderia ser feita com estudos epidemiológicos de longa duração em voluntários ou através do conhecimento de hábitos de consumo de PGMs. Essa informação não existe pelo que há aqui uma lacuna de informação que é aproveitada para incutir receios nas pessoas. O argumento é primário mas eficaz: se não conhecemos se um determinado produto provoca algum tipo de problema

então o melhor é não consumirmos. É o princípio da precaução utilizado com muita frequência pelos movimentos contra as PGMs. É claro que deve haver alguma precaução no que diz respeito a qualquer produto que entre na cadeia alimentar. As pessoas estão saturadas de uma sucessão de escândalos alimentares e reagem negativamente à possibilidade de novos problemas surgirem. No entanto, se os testes conduzidos pelas empresas que pretendem comercializar as PGMs não detectaram nenhum problema, se esses testes foram analisados e validados pelas agências reguladoras, que argumentos racionais existem para que se possa impedir o consumo desses alimentos? A resposta é nenhuns, a não ser trazer para o campo de discussão aspectos difíceis de contrariar cientificamente. Se aplicado de maneira consistente o princípio da precaução teria como consequência o fim prematuro de qualquer nova tecnologia ou produto. Por exemplo, de acordo com este princípio seria muito difícil a criação de novos medicamentos. Como todos sabemos, muitos medicamentos podem ter efeitos laterais graves que em casos extremos podem conduzir à morte dos pacientes. Nesta perspectiva parece mais sensato adotar o princípio da equivalência substancial seguido pelas autoridades reguladoras canadianas e americanas, segundo o qual, se um produto que é equivalente a outro que já existe não deve ser tratado de forma diferente. Por exemplo, uma variedade de soja resistente a um herbicida tem as mesmas características da variedade a partir da qual foi obtida. Elas diferem apenas num único gene. Em termos alimentares elas são substancialmente equivalentes não havendo razão para que sejam tratadas pelo legislador de forma diferente.

Mais uma vez os aspectos toxicológicos das PGMs não devem ser analisados separadamente do contexto mais vasto que é a utilização das plantas pelos humanos. Problemas toxicológicos podem, teoricamente, também surgir com variedades obtidas pelos métodos convencionais de melhoramento de plantas ou com plantas produzidas pela agricultura orgânica. Nenhum alimento é 100% seguro e natural não significa sem risco como muitas vezes, por questões económicas, se quer fazer querer. Todos os dias ingerimos uns bons miligramas de produtos potencialmente cancerígenos existentes nos mais diversos alimentos, mesmo nos “naturais”. Para muita gente, seria surpreendente conhecer os químicos potencialmente cancerígenos que

diariamente ingere. Níveis elevados de compostos nocivos podem surgir em variedades obtidas por qualquer processo de melhoramento como já aconteceu com níveis elevados de alcalóides (solanina) em batateira ou de psoraleno, um potente mutagénico detectado no aipo.

A finalizar esta secção é importante mencionar que ao contrário do que é por norma veiculado, as PGMs têm importantes benefícios em termos de saúde pública. Por exemplo, o milho obtido a partir de PGMs resistentes a insectos tem um teor mais reduzido de toxinas de origem fúngica (micotoxinas) que o milho de variedades tradicionais. Algumas dessas micotoxinas como as aflotoxinas são venenos extremamente tóxicos que podem causar envenenamentos mortais.

A diminuição da aplicação de pesticidas com a redução dos efeitos negativos noutros organismos e a redução da exposição dos trabalhadores agrícolas a este tipo de compostos são dois aspectos que não devem ser negligenciados.

10.3. Eventuais impactos ambientais

À semelhança do que foi analisado na secção anterior os argumentos de natureza ambiental ou ecológica contra as PGMs são de diferentes tipos e, também neste âmbito, alguns casos sensacionalistas contribuíram para lançar a polémica e desviar a discussão do essencial.

Um dos casos mais mediáticos foi a divulgação de um estudo que sugeria que o consumo de pólen de uma variedade de milho geneticamente modificada (milho *Bt*) por borboletas monarca (*Danaus plexippus*) diminuía a taxa de sobrevivência destas borboletas. A borboleta monarca é muito apreciada nos Estados Unidos e México, onde efectua longas migrações entre zonas a norte dos Estados Unidos e o México. A borboleta alimenta-se das folhas de *Asclepias syriaca* uma planta herbácea perene produtora de látex da família Apocynaceae, comum em zonas agrícolas ou nas bermas de estradas e caminhos. De acordo com um estudo realizado em estufa por cientistas (liderados por J. Losey) da Universidade de Cornell, nos Estados Unidos da América, e publicado em 1999 na reconhecida revista *Nature*,

as larvas de monarca alimentadas com pólen *Bt* apresentavam uma taxa de mortalidade de 44% enquanto no caso das larvas alimentadas com pólen não *Bt* não se verificou a morte de qualquer larva. Segundo os autores, os resultados mostravam também uma diminuição do consumo em borboletas alimentadas com pólen transgénico bem como uma redução nas taxas de crescimento. Os dados obtidos por estes autores indicavam que as PGMs podiam ter efeitos negativos em organismos não alvo com a consequente alteração da diversidade ecológica e do funcionamento dos ecossistemas.

As organizações ambientalistas tiveram aqui o seu momento de glória. Finalmente uma vítima (ainda que não humana) das perigosas PGMs e ainda por cima com base em dados publicados por uma prestigiada revista científica. Foram dias de glória e a nostalgia por esses dias maravilhosos ainda hoje se faz notar na maneira como os militantes destas organizações se vestem em manifestações contra as PGMs. Se procurarmos bem há sempre uma boa meia dúzia vestidos de borboletas.

Infelizmente, a realidade nem sempre é quilo que gostaríamos que fosse. Resultados publicados por outros grupos de investigação com base em ensaios de campo não mostraram qualquer efeito negativo do pólen *Bt* na sobrevivência das borboletas (Sears *et al.*, 2001). Este tipo de estudos, realizado em condições experimentais muito diferentes daquelas que ocorrem naturalmente foi criticado por vários cientistas em virtude de não corresponder às condições naturais onde as borboletas possuem capacidade de escolha em termos de alimento. Análise mais detalhadas mostraram que as doses necessárias para que as larvas fossem afectadas teriam que corresponder a densidades de pólen superiores a 1000 grãos de milho *Bt* por cm^{-2} . De acordo com Chawla, em condições naturais, e para a área referida, o número médio de grãos anda à volta de 170, raramente se tendo encontrado densidades superiores a 600 grãos/ cm^2 . Além disso, em condições naturais, o peso dos grãos de pólen de milho não permite que eles sejam transportados a distâncias muito grandes pelo que a densidade de grãos rapidamente diminui à medida que nos afastamos das zonas de produção. Mais algumas considerações parecem importantes. Apenas 10% do habitat de borboletas monarca nos Estados Unidos se situa próximo de campos de milho. Os Estados Unidos são o principal produtor mundial

de milho *Bt* não havendo notícia que essas extensas culturas tenham provocado diminuições nas populações de monarca. O insecticida *Bt* é usado na agricultura orgânica sem que se tenha verificado qualquer problema com as borboletas monarca ou outro tipo de insecto. As asclépias são indesejadas pelos agricultores sendo eliminadas dos campos de cultura de plantas não transgênicas pela aplicação de herbicidas que supostamente afectarão também as borboletas. De toda esta informação parece poder concluir-se que o perigo do milho *Bt* para as borboleta monarca é negligenciável. No entanto, os estudos realizados pela equipa de J. Losey são de grande interesse pois permitem alertar para eventuais problemas que só uma cuidadosa avaliação de riscos ambientais permite clarificar. Como dizia J. W. von Goethe, e numa tradução livre, *tudo é mais simples do que se possa pensar e, ao mesmo tempo, tudo é mais complexo do que se possa imaginar.*

Outro caso polémico em termos ambientais foi assinalado no México, na região de Oaxaca. Tratou-se aqui da detecção de sequências do promotor 35S do CaMV e do gene da enzima desidrogenase alcoólica em variedades locais de milho. Este facto alertou para a possibilidade de genes poderem passar de PGMs para outras plantas aquilo que alguns designam como poluição genética. A poluição genética é muito comum na natureza e sem ela dificilmente haveria evolução. Plantas pertencentes a espécies filogeneticamente muito próximas podem cruzar-se resultando em novas combinações genéticas ou seja, variabilidade. Nas células dos organismos também ocorre poluição genética. Transposões são responsáveis pela deslocação de genes no genoma. Os dados acima referidos foram também publicados na revista Nature. No entanto, depois de uma série detalhada de estudos conduzidos pelo CIMMYT, um instituto público internacional sediado no México e dedicado ao estudo do melhoramento do trigo e do milho, e conduzido em 23 linhas existentes em bancos de genes e na zona de Oaxaca, não foi detectada a presença de qualquer sequência transgênica em linhas locais. O resultado foi o reconhecimento pelo editor da revista de que o artigo originalmente publicado não o deveria ter sido. No entanto, parece óbvio que o problema existe, ou seja, é natural que ocorra fluxo genético entre PGMs e variedades tradicionais. O pólen de PGMs pode ser transportado pelo vento ou por insectos para variedades da mesma espécie ou mesmo

para espécies semelhantes levando à dispersão do transgene. A legislação de alguns países ultrapassa este problema pela obrigatoriedade de deixar uma zona tampão entre as culturas com PGMs e os outros tipos. No entanto, parece possível que, mesmo assim, cruzamentos possam ocorrer ainda que em menor número.

Deve referir-se, mais uma vez, que esta situação não é exclusiva das PGMs e também pode acontecer quando em campos próximos temos variedades tradicionais diferentes. Por exemplo, pode cultivar-se lado a lado um campo de milho mais vocacionado para a produção de farinha para alimentação animal e milho para produção de broa, por exemplo. Também convém não esquecer que o fluxo genético pode ser nos dois sentidos. Um agricultor que investiu em milho *Bt* também pode não querer o seu milho polinizado com pólen não resistente à broca-do-milho. Esta situação é muitas vezes esquecida porque se parte do princípio, sem fundamento diga-se, que um agricultor que cultiva variedades não tradicionais tem uma maior legitimidade para cultivar esse tipo de variedades que um agricultor que usa PGMs pois as suas variedades são “naturais” enquanto as PGMs são “artificiais”.

O problema do fluxo genético pode assumir maior importância quando se trata de genes que conferem uma vantagem selectiva às plantas. Por exemplo, a possibilidade de um gene de resistência a um herbicida poder ser transferido para uma espécie relacionada levando à criação das chamadas super-ervas. Outra hipótese para o aparecimento de super-ervas seria a possibilidade das próprias plantas cultivadas, devido à sua resistência a herbicidas poderem proliferar descontroladamente no ambiente. É sabido, no entanto, que ao longo do processo de selecção artificial praticado na agricultura grande parte das plantas cultivadas perderam mecanismos eficazes de dispersão estando dependentes dos humanos para a sua propagação. A proliferação de plantas invasoras tem-se acentuado nos últimos anos devido às facilidades de comunicação e troca de germoplasma entre países, apesar das políticas bastante restritivas que alguns países implementaram relativamente à entrada nas suas fronteiras de material vegetal e sem que essa situação esteja relacionada com cultura de PGMs. É também sabido que muitas plantas adquiriram resistências a herbicidas sem que essa situação tenha levado ao aparecimento de super-ervas. Outras plantas,

mesmo não sendo resistentes a herbicidas, como acontece com a espécie *Ailanthus altissima* (árvore-do-céu) apresentam mecanismos tão eficazes de propagação que a sua eliminação é bastante difícil, mesmo recorrendo a herbicidas. Na actualidade não é conhecida nenhuma super-erva que tenha resultado da utilização de PGMs. Essas super-ervas podem surgir no futuro? A resposta mais correcta é que não sabemos mas é uma hipótese que não deve ser descartada. Deve deixar-se de comercializar PGMs por causa dessa eventualidade? A resposta é seguramente não. Super-servas já existem e continuarão a existir mesmo sem o contributo das PGMs.

Algumas soluções técnicas podem vir a ser utilizadas para reduzir ou eliminar o fluxo genético entre PGMs e outras plantas. Uma das tecnologias é o recurso a variedades com esterilidade masculina do citoplasma incapazes de produzir pólen viável. A utilização de promotores específicos que não se exprimam no pólen ou a aplicação da tecnologia *terminator* são outros métodos que podem ser algum interesse nesta perspectiva.

Ainda na âmbito do aparecimento de resistências tem sido referido como bastante preocupante o facto da utilização de milho e de outras espécies *Bt* poder conduzir ao aparecimento de insectos resistentes perdendo-se assim uma arma poderosa de combate às pragas e que tem sido usada com sucesso na agricultura convencional. Seria irrealista negar esta possibilidade. A história da agricultura e, também da própria medicina, tem sido um combate sem tréguas entre os humanos e os diferentes tipos de pragas ou doenças. Cada vez que um novo pesticida ou medicamento entra no mercado para combater determinados organismos existe a possibilidade dos organismos alvo desenvolverem mecanismos de defesa. O combate de agentes microbianos com antibióticos é bem ilustrativo desta situação. Com as PGMs resistentes a determinadas pragas ou doenças a situação não é diferente. No entanto, para além de alguns caso pontuais que têm sido assinaladas, não se verifica ainda nenhuma resistência generalizada a algum tipo particular de praga. No caso das variedades *Bt*, e como foi referido no capítulo anterior, existe uma grande variabilidade de toxinas potenciais produzidas por diferentes tipos de bactérias o que torna o desenvolvimento de novas toxinas promissor. De forma a prevenir este eventual problema muitos agricultores cultivam linhas não geneticamente modificadas à periferia ou misturadas com as PGMs

que funcionam como refúgio para os organismos alvo, reduzindo assim a possibilidade de se desenvolverem resistências.

A utilização em larga escala de PGMs resistentes a herbicidas tem sido também alvo de muitas críticas. O argumento aqui utilizado é que, como o herbicida não afecta as culturas, os agricultores têm tendência a fazer um maior número de aplicações provocando assim danos maiores no meio ambiente em comparação com a utilização de herbicidas nas culturas convencionais. Este argumento parte de um pressuposto errado que é o dos agricultores gostarem de gastar dinheiro em herbicidas. Como se sabe, os herbicidas são compostos caros, que aumentam os custos de produção. Não se percebe assim que tipo de masoquismo poderá afectar a generalidade dos agricultores que os leva a querer diminuir os seus rendimentos. Por outro lado, os herbicidas associados às PGMs, como o glifosato, são herbicidas facilmente degradáveis e que não afectam outros organismos. É claro que não existe nenhum herbicida ideal mas, se algum se aproxima, esse é com certeza o glifosato. Esta crítica às PGMs também contradiz tudo aquilo que são dados conhecidos sobre a aplicação de herbicidas a nível mundial. Uma consulta à página da ISAAA (<http://www.isaaa.org/>) permite verificar que as PGMs têm tido um impacto bastante positivo em termos ambientais devido à redução das quantidades de pesticidas (herbicidas incluídos) aplicados pelos agricultores.

Na tentativa de apresentar factos contra a utilização de PGMs algumas organizações chegam mesmo a cair no ridículo tal é a pobreza intelectual dos argumentos que apresentam. Um caso típico pode ser consultado na página da organização Transgénicos Fora (<http://stopogm.net/node/179>). A notícia começa com a seguinte afirmação “Este sítio da Plataforma Transgénicos Fora é dedicado a Silvino Talavera, uma das vítimas mais jovens que a agricultura intensiva com transgénicos tem feito no mundo”. Esta informação pressupõe que, para além desta putativa vítima, outras terão ocorrido o que é manifestamente mentira. Para além disso, também a referida criança, a ser verdade a notícia morreu devido à aplicação de um herbicida, que igualmente por um mero acaso se destinava, supostamente, a uma cultura de PGMs. Se uma pessoa cair de um escadote será que a culpa é da empresa que produziu ou vendeu o escadote? A fazer fé nesta

organização não restam dúvidas que sim. Todos os anos morrem, infelizmente, centenas de pessoas devido à aplicação de pesticidas. Será que se a cultura não fosse de PGMs a criança não teria morrido? Se a notícia não fosse triste seria, certamente, hilariante. Se não há vítimas reais devido às PGMs não faz mal, inventa-se uma. Este tipo de demagogia pseudo-científica utilizado pelos modernos selenitas é tão básico que não se julgaria possível de utilizar por pessoas supostamente tão esclarecidas. Mas, pior do que isso é que esta argumentação encontra eco em alguma imprensa e assim chega à opinião pública como se de verdades se tratasse.

Para concluir esta secção com algo mais positivo, deve salientar-se que a utilização de plantas resistentes a herbicidas permite também realizar uma agricultura com menos impactos ambientais. Na realidade a aplicação de herbicidas como o glifosato não implica uma intervenção no solo tão profunda como no caso de outros herbicidas em que é necessário arar o solo antes de iniciar novas culturas para remover as erva-daninhas. Este tipo de prática agrícola designado *no-till* para além de reduzir a erosão do solo conserva a sua humidade permitindo uma melhor gestão dos recursos hídricos.

Num mundo ideal e romanceado, imaginado pelos ambientalistas urbanos, a agricultura é uma actividade lúdica em que as culturas crescem em perfeita sintonia numa natureza pristina e sem intervenção da perigosa mão humana. A realidade é, porém, bem diferente. O sucesso da agricultura depende do combate eficaz contra as mais variadas pragas e sem as ferramentas disponíveis de combate a essas pragas os rendimentos agrícolas seriam consideravelmente mais reduzidos com todas as implicações daí resultantes. Mesmo a chamada agricultura orgânica faz uso de compostos químicos para o combate a pragas embora essa situação tente ser camuflada e se tente passar a ideia que os alimentos orgânicos nunca foram sujeitos a tratamentos químicos. Basta consultar a legislação e ver que muitos compostos químicos são permitidos na agricultura orgânica. Como se trata de compostos que não são de síntese há tendência para pensar que são produtos naturais. Mas os produtos naturais também são compostos químicos, alguns deles são mesmo pesticidas muito potentes.

10.4. Eventuais impactos sócio-económicos

As plantas geneticamente modificadas são actualmente cultivadas por cerca de 13 milhões de agricultores em todo o mundo. Cerca de 12.000 milhões destes agricultores são proprietários de pequenas parcelas agrícolas em países em desenvolvimento, nomeadamente na Índia e em alguns países do Oriente. Esta situação contrasta com o facto do comércio das PGMs se encontrar nas mãos de um conjunto restrito de empresas do sector agroquímico. Por esta razão, tem sido referido que as PGMs irão agravar ainda mais o fosso entre os países desenvolvidos e os países em desenvolvimento. É um facto que o sector agroquímico, à semelhança do sector farmacêutico, é dominado por um número limitado de companhias uma situação que tem muito a ver com a legislação extremamente exigente que existe em alguns países, nomeadamente na Europa. Como já se referiu, a investigação na área das PGMs implica a realização de testes laboratoriais e de campo que necessitam de um investimento avultado só ao alcance de grandes empresas. No entanto, é também verdade que durante as duas últimas décadas um grande número de cientistas de países em desenvolvimento tiveram acesso a formação privilegiada em laboratórios de biotecnologia europeus e americanos e podem agora aplicar os conhecimentos obtidos ao desenvolvimento de variedades mais adaptadas aos seus países de origem. Países como a China, Índia, Coreia do Sul, Filipinas e Brasil fizeram um forte investimento nesta área estando agora a começar a recolher os resultados.

Algumas organizações internacionais têm também procurado transferir alguma tecnologia para países em desenvolvimento nomeadamente em África e em zonas economicamente débeis da Ásia. O arroz dourado anteriormente referido é um desses exemplos, pretendendo-se distribuir aos pequenos agricultores, de forma gratuita, as sementes necessárias para iniciarem a cultura deste tipo de arroz. Infelizmente, os contratemplos logísticos, económicos e legislativos têm sido difíceis de ultrapassar e só no próximo ano se espera que o arroz dourado pode ser cultivado livremente em alguns países.

O arroz dourado é um bom exemplo de como uma atitude negativa perante uma tecnologia pode condicionar a sua aplicação sem nenhuma

razão cientificamente sustentada. Refira-se que o arroz dourado, pelas suas características biológicas dificilmente se poderá tornar uma super-erva ou transferir para outras espécies genes que levem ao aparecimento de plantas com alguma vantagem selectiva. Também não apresenta nenhum tipo de resistência a insectos ou a herbicidas e foi produzido por uma parceria público-privada com objectivos humanitários, longe portanto de constituir um interesse para multinacionais do sector agroquímico. Também não possui nenhum novo produto químico que possa causar algum problema em termos de saúde pública e as plantas não possuem nenhum gene de tolerância a antibióticos. Apesar de não apresentar nenhuma contrariedade aparente o arroz dourado é visto, como já se referiu pelas organizações ambientalistas como uma ameaça que, na opinião de alguns servirá como um cavalo de Tróia destinado a abrir a porta a outras PGMs, essas sim realmente malévolas. Mais uma vez a argumentação roça a insanidade.

Em sociedades de economia não planificada é legítimo que dentro das regras estabelecidas as empresas obtenham lucros do seu investimento. Isso só é possível se os produtos disponibilizados forem interessantes para os consumidores ou para os agricultores que os utilizem. Desta forma, o funcionamento de um mercado concorrencial encarregar-se-á de seleccionar os produtos de facto interessantes e qualquer companhia tem em atenção este princípio básico. O que é importante é que a legislação não crie distorções abusivas como com frequência acontece quando põe em planos diferentes as PGMs e as plantas obtidas por outro métodos. Não é legítimo criar dificuldades a um produto só porque a sua produção segue procedimentos inovadores. A legislação deve regular as características do produto final e não a forma como foi produzido, a menos que o desenvolvimento do produto resulte de práticas ilegais ou que ponham em risco os cidadãos.

Na Europa a rotulagem dos alimentos OGMs ou de produtos com mais de 0,9% de conteúdo derivado de OGMs é obrigatória desde 2004. Curiosamente, alguns produtos em que utilizam enzimas obtidas por engenharia genética para o seu fabrico, como acontece com alguns tipos de queijo, não necessitam de rotulagem. O rotulagem obrigatória parece sensata pois os consumidores devem estar tão bem informados quanto possível. Um consumidor pode, por princípio, não querer utilizar PGMs assim como

existem pessoas que não querem consumir alimentos de origem animal. É um direito que assiste a cada um. No entanto, se analisarmos mais atentamente a obrigatoriedade de rotulagem facilmente nos apercebemos de lacunas que são, no mínimo, incongruentes. Porque razão apenas as PGMs ou os seus derivados devem ser rotulados? Por exemplo, um amido obtido a partir de uma variedade de trigo ou milho resultante de mutagenese não deveria fazer também referência à sua origem? Afinal trata-se também de uma manipulação genética. Nos medicamentos é feita alguma referência à forma como são obtidos? Os refrigerantes ou as margarinas discriminam o processamento a que foram submetidos. Os produtos da agricultura orgânica mencionam se foram utilizados químicos na sua produção? Todas estas questões têm uma resposta negativa. Não se percebe assim porque razão os PGMs devem ser tratados de forma diferente.

Nos Estados Unidos, ao contrário da Europa, a rotulagem não é obrigatória para PGMs. Exceptuam-se os casos em que os produtos sejam substancialmente diferentes dos produtos equivalentes não transgênicos. Mas esta situação aplica-se a qualquer tipo de produto independentemente da forma como foi obtido. Por exemplo, a soja transgênica é tratada da mesma maneira que a soja não transgênica pois a única modificação são quantidades ínfimas de uma enzima que permite a tolerância ao herbicida. Apesar disso, um grande número de companhias procede à rotulagem voluntária dos produtos. Esta atitude parece a mais sensata pois responsabiliza as companhias e fornece a informação adequada ao consumidor. Para além disso, a rotulagem nos USA pode funcionar de forma inversa ou seja os produtos podem ser rotulados como sendo livres de OGMs.

A rotulagem está relacionada com a rastreabilidade de um determinado produto, ou seja, a possibilidade de seguir o seu percurso desde a produção até à sua disponibilização aos consumidores. Tal como a rotulagem a possibilidade de seguir um produto ao longo da fileira de produção parece uma medida adequada. No entanto, também aqui há algumas limitações logísticas e algumas incongruências quanto à forma como o procedimento é aplicado. Nos Estados Unidos, como as PGMs são considerados equivalentes às plantas variedades tradicionais mesmo que produzidas de forma diferente é possível a mistura de milho OGM e não OGM. Dito de outra

maneira, isto significa que um agricultor americano que produza milho transgénico e não transgénico que difira apenas na resistência à broca do milho pode processá-lo da mesma forma pois os dois tipos são considerados iguais. Se esse milho for destinado à alimentação humana para a produção de farinha, por exemplo, essa farinha vai ter uma mistura de milho geneticamente modificado e não geneticamente modificado. As autoridades reguladoras americanas consideram que este milho é todo igual e sem problemas de saúde pelo que os consumidores não necessitam de conhecer a sua origem. Na Europa isso não é possível pois o milho OGM deve ir para uma fileira diferente e não deve haver mistura com milho não geneticamente modificado pois os dois tipos não são considerados iguais. Em termos da exportação de produtos agrícolas esta situação também causa problemas complexos que têm sido objecto de acesas discussões no âmbito da Organização Internacional do Comércio. As fortes barreiras comerciais colocada pela União Europeia a produtos de países terceiros, incluindo OGMs é também uma causa importante de conflitos entre as autoridades europeias e de outros países.

Cada PGM deve ser considerada pelas características que apresenta e não com base em posições de princípio em que, sem sustentação científica, se parte do princípio que OGM é sinónimo de maiores riscos para os consumidores. Nesta perspectiva a existência de entidades reguladoras fidedignas e a confiança que os consumidores nelas depositam é essencial para avaliar os riscos potenciais de novos alimentos. Nos Estados Unidos as PGMs estão sob a alçada de três entidades reguladoras que têm sido referidas ao longo deste trabalho: FDA, EPA e USDA. Cada uma delas deve avaliar aspectos particulares das plantas. No caso da FDA a sua acção prende-se mais com a qualidade dos alimentos enquanto a EPA está mais vocacionada para avaliar o impacto ecológico das PGMs relacionado com a utilização de pesticidas e de herbicidas. Finalmente, o USDA avalia o impacto das PGMs mais em termos dos seus potenciais efeitos noutros organismos e do eventual impacto nos ecossistemas. O princípio orientador destas 3 instituições é que as PGMs devem ser vistas não como um perigo potencial mas sim como sendo substancialmente equivalentes às variedades existentes desde que não existam modificações assinaláveis que façam pressupor o contrário.

Nesta perspectiva, o arroz dourado, devido à produção de provitamina A, seria avaliado pela FDA devido ao facto de produzir um composto que não se encontra noutras variedades e por ser utilizado na alimentação. Uma variedade de soja resistente a um herbicida está mais no domínio da EPA pois a planta produz moléculas com actividade contra um herbicida que vai ser utilizado no campo em larga escala e do USDA pelo facto de ser necessário avaliar o risco relacionado com a eventual transferência da característica para outras espécies.

Na União Europeia a entidade reguladora é a EFSA (*European Food and Safety Authority*, <http://www.efsa.europa.eu/>). No entanto a legislação europeia sobre OGMs tem cláusulas de salvaguarda que permitem aos países membros aprovar legislação mais restritiva que a aplicada pela própria União. Cada país tem depois os seus organismos de controlo. Existe ainda a possibilidade de aplicar moratórias aos produtos PGMs o que na realidade já se verificou relativamente a algumas PGMs. Em Portugal, a entidade responsável pela cultura e comercialização de PGMs é a Agência Portuguesa do Ambiente (<http://www.apambiente.pt/Paginas/default.aspx>) sendo consultadas durante a elaboração dos processos a Direcção-Geral da Saúde e a Direcção-Geral de Protecção das Culturas. No Reino Unido a instituição reguladora é o DEFRA (*Department for Environment Food and Rural Affairs*, <http://ww2.defra.gov.uk/>). As directivas europeias sobre PGMs têm sido transcritas para a legislação nacional. A legislação sobre esta matéria está disponibilizada online no sítio da Direcção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural (<http://www.dgadr.pt/>) e também na página Web da Agência Portuguesa do Ambiente.

Informação independente sobre PGMs pode ser obtida através de documentos da FAO (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura, <http://www.fao.org/biotech/>) e da OCDE (Organização para a Cooperação Económica e Desenvolvimento - http://www.oecd.org/topic/0,3373,en_2649_37437_1_1_1_1_37437,00.html).

Limitações de carácter editorial e o próprio objectivo deste livro condicionam uma abordagem mais aprofundada e o refutar de muitos outros argumentos utilizados contra a cultura das PGMs. Em particular os argumen-

tos de carácter religioso contra a utilização de organismos geneticamente modificados foram deixados de fora desta análise por se entender não ser este o local mais apropriado para proceder à sua discussão. Para além disso, argumentos respeitantes à consciência de cada um são difíceis de rebater e esse não é o objectivo primordial da ciência. Nos livros e artigos indicados na bibliografia pode encontrar-se informação mais detalhada sobre os assuntos aqui tratados. Muita da informação relativa às PGMs está disponível em endereços de internet fidedignos e que são indicados no final da bibliografia e ao longo do livro.

Cada PGM tem as suas particularidades e a sua utilidade deve ser analisada caso a caso pelas autoridades competentes. Uma vez avaliados os prós e os contras a nova variedade deve ser aprovada ou rejeitada. A mesma situação deveria ocorrer com variedades obtidas por outros métodos. Infelizmente isso não acontece e uma correcta avaliação de riscos das variedades tradicionais nunca foi feita. Assim, parece óbvio poder concluir-se que as plantas PGMs foram até hoje os mais escrutinados organismos quanto aos seus eventuais impactos na sociedade.

A transformação genética de organismos, e das plantas em particular, é uma tecnologia recente que começa a dar os primeiros passos em termos de aplicações práticas. Uma maior consciencialização da necessidade de produzir mais alimentos e um melhor esclarecimento da opinião pública relativamente aos procedimentos adoptados na produção de PGMs e ao seu potencial tornarão, no futuro, esta tecnologia mais aceitável por parte de uma grande parte da opinião pública e dos governantes que ainda manifestam sérias reservas à sua aplicação. Apesar de terem uma utilização recente, as plantas geneticamente modificadas têm já uma história de cultura que, em 15 anos, não revelou qualquer problema grave quer em termos de saúde pública quer em termos ambientais. Parece pois poder concluir-se que se trata de uma tecnologia segura.

Dentro de 20 anos, talvez menos, a análise das objecções agora levantadas às PGMs fará rir muita gente e corar muitos outros.

BIBLIOGRAFIA

- Achar, P. N., (2002). A study of factors affecting embryo yields from anther culture of cabbage. *Plant Cell, Tis. & Org. Cult.*, 69, 183-188.
- Allard, R. W. (1999). *Principles of plant breeding* (2nd Ed.). New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Ammann, K. (2005). O potencial ecológico da engenharia genética. In: E.V. Schärer-Züblin (Ed.), *Os genes e a alimentação* (pp. 24-27). Fondation Alimentarium, Nestlé.
- Anand, A., & Mysore, K. S. (2006). *Agrobacterium* biology and crown gall disease. In: S. S. Gnanamanickam (Ed.), *Plant-associated bacteria* (359-384). Netherlands: Springer.
- Anderson, W. C. (1984). A revised tissue culture medium for shoot multiplication of *Rhododendron*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 109, 343-347.
- Anil, V. S., & Rao, K. S. (2000). **Calcium mediated signalling during sandalwood somatic embryogenesis**. Role for exogenous calcium as second messenger. *Plant Physiol.*, 123, 1301-1311.
- Aragão, F. J. L. (2003). *Organismos transgênicos*. Tamboré: Editora Manole Ltda.
- Arnold, S. V., & Eriksson, T. (1981). *In vitro* studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. *Can. J. Bot.*, 59, 870-874.
- Bajaj, Y. P. S. (1990). *In vitro* production of haploids and their use in cell genetics and plant breeding. In: Y. P. S. Bajaj (Ed), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 12, *Haploids in Crop Improvement I* (pp. 3-44). Berlin: Springer-Verlag.
- Barta, A., Sommergruber, K., Thompson D. et al., (1986). The expression of a nopaline synthase-human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. *Plant Mol Biol.* 6:347-357.
- Bartsch, D., Gathmann, A., Saeglitz, C & Sinha, A. (2008). Field testing of transgenic plants. In: C. N. Stewart Jr. (Ed.), *Plant biotechnology and genetics – principles, techniques, and applications* (pp. 311-323). New Jersey: Wiley.
- Barz, H., & Oksman-Caldentey, K.-M. (2002). Plant biotechnology – an emerging field . In: K.-M. Oksman-Caldentey & W. H. Barz (Eds.), *Plant Biotechnology and Transgenic Plants* (pp. 1-21). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Basett, M. J. (1970). The use of asparagus monoploids for inbred production. *Hort. Sci.*, 5, 41.
- Belo, J. A., Vieira, P., & Sottomayor, M., (2001). Organismos (eucariotas) geneticamente modificados. In: A. Videira (Ed.), *Engenharia genética – princípios e aplicações* (pp. 115-154). Lisboa: Lidel.
- Belogradova, K., Lewicka, I., Heberle-Bors, E., & Touraev, A. (2009). An overview on tobacco doubled haploids. In: A. Touraev, B. P. Foster & S.M. Jain (Eds.), *Advances in haploid production in higher plants* (75-85). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

- Bewley, J. D., & Black, M. (1994). Seeds – physiology of development and germination (2nd ed.). New York: Plenum Press.
- Biemelt, S., & Sonnewald, U. (2005). Molecular pharming in plants. Encyclopedia Life Sciences. In: Encyclopedia of Life Sciences. New York: Wiley-Blackwell (versão on-line – www.els.net). Acedido em 10 de Fevereiro de 2010.
- Binns, A., Campbell, A. (2001). *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of plant cells. In: Encyclopedia of Life Sciences. New York: Wiley-Blackwell (versão on-line – www.els.net). Acedido em 9 de Fevereiro de 2010.
- Biranova, P., Hause, G., Cenklová, V., Cordewener, J. H. G., & Campagne, M. M. L. (1997). A short severe heat shock is required to induce embryogenesis in late bicellular pollen of *Brassica napus* L. Sex. Plant Rep., 10, 200-208.
- Blakeslee, A., Belling, J., Farnham, M. E., & Berger, A. D. (1922). A haploid mutant in *Datura stramonium*. Science, 55, 646-647.
- Blumenthal, F., & Meyer, P. (1924). Über durch Acidum tecticum erzeugte Tumoren auf Moohr-rubensheiben. Z. f. Krebsg., 21, 250252.
- Bohanec, B. (2003). Ploidy determination using flow cytometry. In: M. Malszynski, K. J. Kasha, B.P. Forster & I. Szaejko (Eds.), Doubled haploid production in crop plants (pp. 397-403). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Bonet, F.J., Azbaid, L., & Olmedilla, A. (1998). Pollen embryogenesis: atavism or totipotency. Protoplasma, 202, 115-121.
- Borlaug, N. E., Dowsell, C. R. (2003). Feeding a world of ten billion people: a 21st century challenge. In: R. Tuberosa, R. L. Phillips & M. Gale (Eds.), Proceedings of the International Congress "In the Wake of the Double Helix: From the Green Revolution to the Gene Revolution" (pp. 3-23). Bolonha.
- Boudet, A.-M., (2002). Lignin genetic engineering: a way to better understand lignifications beyond applied objectives. In: K.-M. Oksman-Caldentey & W. H. Barz (Eds), Plant Biotechnology and Transgenic Plants (pp. 477-495). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Bourgin, J. P. & Nitsch, J. P. (1967). Obtention de *Nicotiana* haploides à partir d'étamines cultivés *in vitro*. Ann. Physiol. Vég., 9, 377-382.
- Bourne Jr., J. K. (2009). The end of plenty. National Geographic, Junho, 26-59.
- Boutilier, K., Offringa, R., & Sharma V. K. (2002). Ectopic expression of *BABY BOOM* triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. Plant Cell, 14, 1737-1749.
- Bowsher, C., Sterr, M. & Tobin, A. (2008). Plant biochemistry. New York: Garland Science.
- Bradford, K. J. & Bewley, J. D. (2003). Seed: biology, technology, and role in agriculture. In: M. J. Chrispeels & D. E. Sadava (Eds), Plants, Genes, and Crop Biotechnology (2nd ed.). (pp. 214-239). Boston: Jones and Bartlett Publishers, American Society of Plant Biologists.
- Braybrook, S. A., Stone, S. L., & Park, S. (2006). Genes directly regulated by *LEAFY COTYLEDON 2* provide insight into the control of embryo maturation and somatic embryogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 103, 3468-3473.
- Brookes, G. (2008). Plant agriculture: the impact of biotechnology. In: C. N. Stewart Jr. (Ed.), Plant biotechnology and genetics – principles, techniques, and applications (pp. 1-19). New Jersey: Wiley.
- Brosnan, C., McCallum, E. J., Botella, J. R. & Carroll B. J. (2008). RNA interference. In: G. Kahl, & K. Meksem (Eds.), The handbook of Plant Functionla Genomics: Concepts and Protocols (pp. 209-225). Weinheim: Wiley-Blackwell.

- Brown, T. A. (2006). Gene cloning & DNA analysis – an introduction (5th ed.). Oxford: Blackwell Publishing.
- Bueno, M.A., & Manzanera, J.A. (2003). Oak anther culture. In: M. Malszynski, K. J. Kasha, B.P. Forster & I. Szaejko (Eds.), Doubled haploid production in crop plants (pp. 297-301). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Cairney, J., Zheng, L., Cowels, A., Hsiao, J., Zismann, V., Liu, J., Ouyang, S., Thibaud-Nissen, F., Hamilton, J., Childs, K., Pullman, G. S., Zhang, Y., Oh, T., & Buell, C. R. (2006). Expressed sequence tags from loblolly pine embryos reveal similarities with angiosperm embryogenesis. *Plant Mol. Biol.*, 62, 485-501.
- Caligari, P. D. S. (2001). Plant breeding and crop improvement. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. New York: Wiley-Blackwell (versão on-line – www.els.net). Acedido em 27 de Dezembro de 2009.
- Canhoto, J. M. (1988). Androgénese nas gramíneas e solanáceas. Coimbra: Universidade de Coimbra. Monografia.
- Canhoto, J. M. (1994). *Feijoa sellowiana* Berg (Myrtaceae): estudos sobre embriogénese somática e outros tipos de morfogénese. Coimbra: Universidade de Coimbra. Dissertação de Doutoramento.
- Canhoto, J. M., & Cruz, G. S. (1993). Induction of pollen callus in anther cultures of *Feijoa sellowiana* Berg. (Myrtaceae). *Plant Cell Rep.*, 13, 45-48.
- Canhoto, J. M., & Cruz, G. S. (1996). *Feijoa sellowiana* Berg (pineapple guava). In: Y. P. S. Bajaj, (Ed.), *Biotechnology in agriculture and forestry*, Vol. 35, Trees IV (pp. 335-354). Berlin: Springer.
- Canhoto, J. M., & Cruz, G. S. (1996). Histodifferentiation of somatic embryos in cotyledons of pineapple guava (*Feijoa sellowiana* Berg.). *Protoplasma*, 191, 34-45.
- Canhoto, J. M., & Cruz, G. S. (1994). Improvement of somatic embryogenesis in *Feijoa sellowiana* Berger (Myrtaceae) by manipulation of the induction and regeneration media. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 30, 21-25.
- Canhoto, J. M., Cruz, G. S., & Mesquita, J. F. (1996). Ultrastructural changes in cotyledons of pineapple guava (Myrtaceae) during somatic embryogenesis. *Ann. Bot.*, 78, 513-521.
- Canhoto, J. M., Guimarães, M. L. & Lopes, G. S. (1990). Induction of haploid, diploid and triploid plants by anther culture of *Iochroma warscewiczii* Regel. *Plant Cell, Tis. & Org. Cult.*, 69, 171-177.
- Canhoto, J. M., Lopes, M. L., & Cruz, G. S. (2005). Protocol for somatic embryogenesis. In: S. M. Jain & Gupta, P. K. (Eds), *Protocol for somatic embryogenesis in woody plants* (379-389). Dordrecht: Springer.
- Canhoto, J. M., Rama, S. C., Cruz, G. S. (2006). Somatic embryogenesis and plant regeneration in carob (*Ceratonia siliqua* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 42, 514-519.
- Canhoto, J.M. (2005). Androgénese e obtenção de haplóides. *Biologia Vegetal e Agro-Industrial*, 2, 35-54.
- Canhoto, S. I., Correia, S. I., & Marques, C. I. (2009). Factors affecting somatic embryogenesis induction and development in *Feijoa sellowiana* Berg. *Acta Hort.*, 839, 147-156.
- Caponetti, J. D., Gray, D. J., & Trigiano, R. (2005). History of plant tissue and cell culture. In: R.N. Trigiano & D.J. Gray (Eds.), *Plant Development and Biotechnology* (pp. 9-15g). Boca Raton: CRC Press.
- Capron, A., Chatfield, S., Provar, N., & Berleth, T. (2009). Embryogenesis: pattern formation from a single cell. *The Arabidopsis Book*, February 12, <http://www.aspb.org/publication/arabidopsis/>. Rockville, MD: American Society of Plant Biologists.

- Cardoza, V. (2008). Tissue culture: the manipulation of plant development. In: C. N. Stewart Jr. (Ed.), *Plant biotechnology and genetics – principles, techniques, and applications* (pp. 113-134). New Jersey: Wiley.
- Caredda, S. e Clément, C. 1999. Androgenesis and albinism in *Poaceae*: influence of genotype and carbohydrates. In: C. Clément, E. Pacini e J.-C. Audran (Eds.), *Anther and Pollen – From Biology to Biotechnology* (pp. 211-228). Berlin: Springer.
- Carloto, J. M. (2001) Estudo de processos moleculares associados à embriogênese somática em *Cyphomandra betacea*. Coimbra: Universidade de Coimbra. Dissertação de Mestrado.
- Casson, S. A., Spenser, M. W. B., & Lindsey, K. (2008). Laser-capture microdissection to study global transcriptional changes during plant embryogenesis. In: M. F. Suárez & P. V. Bozhkov (Eds.), *Methods in molecular biology*, Vol 427: plant embryogenesis (pp. 111-121). Totowa: Humana Press.
- Castillo, A. M., Cistué, L., Vallés, M. P., & Soriano, M. (2009). Chromosome doubling in monocts. In: A. Touraev, B. P. Foster & S.M. Jain (Eds.), *Advances in haploid production in higher plants* (329-338). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Chabaud, M., Biosson-Dernier, A., Zhang, J., Taylor, c. G., Yu, O., & Barker, D. G. (2009). *Agrobacterium* rhizogenes-mediated root transformation. In: *Medicago truncatula handbook*. The Samuel Roberts Noble Foundation, Inc. (versão on-line – <http://www.noble.org/MedicagoHandbook/>). Acedido em 15 de Fevereiro de 2010.
- Chattopadhyay, S., Srivastava, A. K. & Bisaria, V. S. (2004). Production of phytochemicals in plant cell bioreactors. In: P. S. Srivastava, A. Narula & S. Srivastava (Eds), *Plant biotechnology and molecular markers* (117-128). New Dehli: Anamaya Publishers.
- Chauvin, J. E., Souchet, C., Dantec, J. P., & Ellissèche, D., 2003. Chromosome doubling of 2x *Solanum* species by oryzalin: method development and comparison with spontaneous chromosome doubling *in vitro*. *Plant Cell, Tis. & Org. Cult.*, 73, 65-73.
- Chawla, H. S. (2009). Introduction to plant biotechnology (3rd Ed.). Enfield: Science Publishers.
- Chen Z. (1987). Induction of androgenesis in hardwood trees. In: J. M. Bonga & D. J. Durzan (Eds.), *Cell and tissue culture in forestry*, vol. 2, specific principles and methods: growth and development (pp. 247-268). Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers.
- Chriqui, D. (1995). Génie Génétique. In: Y. Demarly & E. Pichard (Eds.), *Biotechnologies végétales* (3-96). Paris, UNISAT.
- Chriquid, D. (2008). Developmental biology. In: E. F. George, M. A. Hall & G.-J De Klerk (Eds.), *Plant propagation by tissue culture* (3rd ed). Vol. 1, Background (pp. 283-333). Dordrecht: Springer.
- Chrispeels, M. J., & Sadava, D. (2003). Development, productivity, and sustainability of crop production. In: M. J. Chrispeels & D. E. Sadava (Eds), *Plants, Genes, and Crop Biotechnology* (2nd ed.). (pp. 52-75). Boston: Jones and Bartlett Publishers, American Society of Plant Biologists.
- Christou, P., & Capell, T. (2007). Genetically modified plants. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. New York: Wiley-Blackwell (versão on-line – www.els.net). Acedido em 5 de Setembro de 2009.
- Chugh, A., & Khurana, P. (2002). Gene expression during somatic embryogenesis – recent advances. *Curr. Sci.*, 86, 715-730.
- Cistué, L. & Kasha, K. J. (2005). Gametic embryogenesis in *Triticum*: a study of some critical factors in haploid (microspore) embryogenesis. In: A. Mujib & J. Šamaj (Eds.), *Somatic embryogenesis* (pp. 321-342). Heidelberg: Springer.

- Clemens, S., Thomine, S. & Schroeder, J. I. (2002). Molecular mechanisms that control plant tolerance to heavy metals and possible roles in manipulating metal accumulation. In: K.-M. Oksman-Caldentey & W.H. Barz (Eds), *Plant Biotechnology and Transgenic Plants* (665-691). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Clough, S. J., & Bent, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 16, 735-743.
- Cocking, E. C. (1960). A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. *Nature*, 187, 962-963.
- Cohen, M. J. (2003). Food security: why do hunger and malnutrition persist in a world of plenty? In: M. J. Chrispeels & D. E. Sadava (Eds), *Plants, Genes, and Crop Biotechnology* (2nd ed.). (pp. 78-99). Boston: Jones and Bartlett Publishers, American Society of Plant Biologists.
- Cordewener, J. H. G., Custers J. B., & Campagne, M. L. (1998). Microspore culture: a model for investigating the role of stress in the induction of embryogenesis. In: Y. Chupeau, M. Caboche e Y. Henry (Eds.), *Androgenesis and Haploid Plants* (pp. 54-68). Berlin: Springer.
- Cordewener, J. H. G., Custers, J. B. M., Dons, H. J. M. e Campagne, M. L. (1996). Molecular and biochemical events during the induction of microspore embryogenesis. In: S. M. Jain, S. K. Sopory e R. E. Veilleux (Eds.), *In Vitro Haploid Production in Higher Plants, Vol. 1, Fundamental Aspects and Methods* (pp. 111-124). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Cordewener, J., van der Wal, F., Joosen, R., Boutilier, K., & America T. (2009). Proteomics in rapeseed microspore embryogenesis. In: A. Touraev, B. P. Foster & S.M. Jain (Eds.), *Advances in haploid production in higher plants* (135-146). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Correia, S. (2007). Embriogênese somática em *Feijoa sellowiana* Berg.: caracterização do suspenso. Coimbra: Universidade de Coimbra. Dissertação de Mestrado.
- Correia, S. I., Lopes, M. L., & Canhoto, J. M. (2009). Somatic embryogenesis in tamarillo (*Cyphomandra betacea*): recent advances. *Acta Hort.*, 839, 157-164.
- Cruz, G. S., Canhoto, J. M., & Abreu, M. A. (1990). Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryos of *Feijoa sellowiana* Berg. *Plant Sci.*, 66, 263-270.
- Cuc Hoa, T. T., Al-Babili, S., Schaub, P., Potrykus, I., & Beyer, P. (2003). Golden *indica* and *japonica* rice lines amenable to deregulation. *Plant Physiol.*, 133: 161-169.
- Curtis, M. D. (2008). Recombinant DNA, vector design, and construction. In: C. N. Stewart Jr. (Ed.), *Plant biotechnology and genetics – principles, techniques, and applications* (pp. 159-191). New Jersey: Wiley.
- Custers, J.B.M., Cordewener, J.H.G., Fiers, M.A., Maassen, B.T.H., Champagne, van L., & Liu, C.M. (2001). Androgenesis in *Brassica*. In: S.S. Bhojwani, & W.Y. Soh (Eds.), *Current trends in the embryology of angiosperms* (451-470). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- D'Amato, F. (1978). Chromosome number variation in cultured cells and regenerated plants. In: T. A. Thorpe (Ed.), *Frontiers of Plant Tissue Culture* (pp.287-295). Calgary: Calgary Press.
- Dale, J. W., & von Schantz, M. (2007). From genes to genomes – concepts and applications of DNA technology. Chichester: John Wiley & Sons Ltd.
- Daniell, H., Khan, M. S., & Allison, L. (2002). Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology. *Trends Plant Sci.*, 7, 84-91.
- Daniell, H., Kumar, S., & Dufourmantel, N. (2005). Breakthrough in chloroplast genetic engineering of agronomically important crops. *Trends Biotechnol.*, 23, 238-245.
- Datta, S. K. (2001). Androgenesis in cereals. In: S.S. Bhojwani & W.Y. Soh (Eds.), *Current Trends in the Embryology of Angiosperms* (471-488). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

- Datta, S. K., Potrykus, I., Bolik, M. & Wenzel, G. (1990). Culture of isolated pollen of wheat (*Triticum aestivum* L.). In: Bajaj Y. P. S. Bajaj (Ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry* vol 35, Trees IV (pp. 435-447). Berlin: Springer-Verlag.
- Datta, S.K. (1995). Androgenesis in cereals. In: S.S. Bhojwani, & W.Y. Soh (Eds.), *Current trends in the embryology of angiosperms* (471-488). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Davey, M.R., Lowe, K.C., & Power, J.B. (1998). Progress and future perspectives for protoplasts of woody plants: the application of innovative culture technologies. In: M.R. Davey et al. (Eds.), *Tree biotechnology: towards the millenium* (223-241). Nottingham: Nottingham University Press.
- Davies, P.A., (2003). Barley isolated microspore culture (IMC) method. In: M. Malszynski, K. J. Kasha, B.P. Forster & I. Szaejko (Eds.), *Doubled haploid production in crop plants* (49-52). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Davies, P.J. (2004). The plant hormones: their nature, occurrence and functions. In: P. J. Davies (Ed.), *Plant hormones – biosynthesis, signal transduction, action!* (pp. 1-15). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Day, A. G. (1992). Plant genetic transformation. In: M. W. Fowler, G. S. Warren & M. Moo-Young (Eds.), *Plant biotechnology* (pp. 151-182). Berlin: Springer-Verlag.
- De Buck, S., Peck, I., De Wilde, C. *et al.* (2007). **Generation of single copy T-DNA transformants in *Arabidopsis* by the CRE/loxP recombination-mediated resolution system.** *Plant Physiol.*, 145:1171-1182.
- De Buyser, J., & Henry, Y. (1995). *L'androgenèse et son utilisation en génétique et amélioration des plantes.* In: M. Petitprez (Ed.), *Haplodiploïdisation* (pp. 89-101). Rennes: UNISAT Université audiovisuelle francophone.
- De Buyser, J., Henry, Y., Lonnet, P., Hertzog, R., & Hespel, A. (1987). "Florin": a doubled haploid wheat variety developed by the anther culture method. *Z. Pflanzenzüchtg.* 98, 53-56.
- De Fossard, R. A., Myint, A., & Lee, E. C. M. (1974). A broad spectrum tissue culture experiment with tobacco (*Nicotiana tabacum*) pit tissue callus. *Physiol. Plant.*, 31, 125-130.
- De Fossard, R. A., Nitsch, C., Cresswell, R. J., & Lee, E. C. M. (1974). Tissue and organ culture of *Eucalyptus*. *N. Z. J. For. Sci.*, 4, 267-278.
- De Jong, A. J., Schmidt, E. D. L., & De Vries, S. C. (1993). **Early events in higher-plant embryogenesis.** *Plant Mol. Biol.*, 22, 367-377.
- De Klerk, G.J. (2002). Rooting of microcuttings: theory and practice. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 38, 415-422.
- Devaux, P., (2003). The *Hordeum bulbosum* (L.) method. In: M. Maluszynski, K. J. Kasha, B. P. Forster & Szaejko, I. (Eds.), *Doubled haploid production in crop plants – a manual* (pp. 15-19). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Dodeman, V.L., Ducreux, G., & Keis, M. (1997). Zygotic embryogenesis *versus* somatic embryogenesis. *J. Exp. Bot.*, 48, 1493-1509.
- Doran, P. (2002). Properties and applications of hairy root cultures. In: K.-M. Oksman-Caldentey & W.H. Barz (Eds), *Plant Biotechnology and Transgenic Plants* (143-161). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Doré, C. (1989). *Cinquantenaire de la culture in vitro chez les végétaux.* Paris: INRA.
- Douce, R. (2002). *Les Plantes génétiquement modifiées. Rapport sur la science et la technologie, n° 13.* Paris: Académie des Sciences. Lavoisier.

- Dudits, D., Györgyey, J., Bögre, L., & Bakó, L. (1995). Molecular biology of somatic embryogenesis. In: T. A. Thorpe (Ed.), *In Vitro Embryogenesis in Plants* (pp. 267-308). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Eibl, R. & Eibl, D. (2002). Bioreactors for plant cell and tissue cultures. In: K.-M. Oksman-Caldentey & W.H. Barz (Eds), *Plant Biotechnology and Transgenic Plants* (163-199). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Einsele, A. (2007). The gap between science and perception: the case of plant biotechnology in Europe. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.*, 107, 1-11.
- Ewen, S. W. B., & Pusztai, A. (1999). Effect of diet containing genetically modified potatoes expressing *Galanthus nivalis* lectin on rat small intestine. *Lancet*, 354, 1353-1354.
- Faro, M. R., Lopes, M. L., Canhoto, J. M., Cheung, A., & Cruz, G. S. (2001). Identification and molecular characterization of a non-embryogenic calli protein in *Cyphomandra betacea*. Abstracts of the 7th Int. Bot. Meeting – Plant Cell Biology. Lisbon.
- Feher, A. (2005). Why somatic plant cells start to form embryos. In: A. Mujib & J. Šamaj (Eds.), *Somatic embryogenesis* (pp. 85-101). Heidelberg: Springer.
- Feher, A., Pasternack, T.P. & Dudits, D. (2003). Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tis. & Org. Cult.*, 74, 201-228.
- Feijó, J. A. (2001). Plantas transgênicas, saúde, ambiente e opinião pública. Comunicações do simpósio plantas transgênicas na agricultura. Que futuro? (49-68). Oeiras: Estação Agronômica Nacional.
- Ferrie, A. M. R. (2009). Current status of doubled haploids in medicinal plants. In: A. Touraev, B. P. Foster & S.M. Jain (Eds.), *Advances in haploid production in higher plants* (209-217). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Ferrie, A.M.R., Palmer, C.E. & Keller, W.A. (1995). Haploid embryogenesis. In: T.A. Thorpe (Ed.), *In vitro embryogenesis in plants* (309-344). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Finer, J. & Dhillon, T. (2008). Transgenic plant production. In: C. N. Stewart Jr. (Ed.), *Plant biotechnology and genetics – principles, techniques, and applications* (pp. 245-274). New Jersey: Wiley.
- Fletcher, J. C. (2002). The vegetative meristem. In: M. T. McManus & B. E. Veit (Eds.), *Meristematic tissues in plant growth and development* (pp. 16-57). Sheffield: CRC Press.
- Fontanet, P., & Vicient, C. M. (2008). Maize embryogenesis. In: M. F. Suárez & P. V. Bozhkov (Eds.), *Methods in molecular biology*, Vol 427: *plant embryogenesis* (pp. 17-29). Totowa: Humana Press.
- Forster, B. P., & Thomas, W. T. B. (2003). Doubled haploids in genetic mapping and genomics. In: M. Maluszynski, K. J. Kasha, B. P. Forster & Szarejko, I. (Eds.), *Doubled haploid production in crop plants – a manual* (pp. 367-390). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Gahan, P. B., & George, F. (2008). Adventitious regeneration. In: E. F. George, M. A. Hall & G.-J. De Klerk (Eds.), *Plant propagation by tissue culture* (3rd ed). Vol. 1, Background (pp. 355-401). Dordrecht: Springer.
- Gallo, M., & Flynn, A. K. (2008). Molecular genetics of gene expression. In: C. N. Stewart Jr. (Ed.), *Plant biotechnology and genetics – principles, techniques, and applications* (pp. 135-157). New Jersey: Wiley.
- Gamborg, O. L., Miller, R. A., & Ojuna, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.*, 50, 151-158
- Gautheret, R. J. (1935). *Recherche sur laculture des tissus végétaux*. Paris: Librairie E. Le François.
- Gawer, M., 1995. *Les métabolites secondaires*. UNISAT, France. pp:163-186.

- Gelvin, S. B. (2000). *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Ann. Rev. Plant Biol.*, 51, 223-256.
- George, F., & Debergh, P. C. (2008). Micropropagation: uses and methods. In: E. F. George, M. A. Hall & G.-J. De Klerk (Eds.), *Plant propagation by tissue culture* (3rd ed.). Vol. 1, Background (pp. 29-64). Dordrecht: Springer.
- Gepts, P. (2003). Ten thousand years of crop evolution. In: M. J. Chrispeels & D. E. Sadava (Eds.), *Plants, Genes, and Crop Biotechnology* (2nd ed.). (pp. 328-359). Boston: Jones and Bartlett Publishers, American Society of Plant Biologists.
- Germanà, M. A. (2009). Haploids and doubled haploids in fruit trees. In: A. Touraev, B. P. Foster & S.M. Jain (Eds.), *Advances in haploid production in higher plants* (241-263). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Gillaspy, G. E. (2008). Plant development and physiology. In: C. N. Stewart Jr. (Ed.), *Plant biotechnology and genetics – principles, techniques, and applications* (pp. 83-111). New Jersey: Wiley.
- Giri, A., Dhingra, V., Giri, C. C., Singh, A., Ward, O. P., & Narasu, M. L. (2001). Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzyme systems: current trends and future prospects. *Biotechnol. Adv.*, 19, 175-199.
- Gomes, F., & Canhoto, J. M. (2009). Micropropagation of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) from adult plants. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 45, 72-82.
- Gomes, M. F. (2000). Estabelecimento de culturas *in vitro* e micropropagação da espécie *Eucalyptus nitens*. Coimbra: Universidade de Coimbra. Dissertação de Mestrado.
- Gray, D. J. (2005). Propagation from nonmeristematic tissue: nonzygotic embryogenesis. In: R.N. Trigiano & D.J. Gray (Eds.), *Plant Development and Biotechnology* (pp. 187-200). Boca Raton: CRC Press.
- Gray, D. J., & Finer, J. J. (1993). Development and operation of five particle guns for introduction of DNA into plant cells. *Plant Cell, Tis. & Org. Cult.*, 33, 219-257.
- Gray, D.J., Compton, M.E., Hiebert, E., Lin, C.-M. & Gaba, V. P. (2005). Construction and use of a simple gene gun for particle bombardment. In: R.N. Trigiano & D.J. Gray (Eds.), *Plant Development and Biotechnology* (pp. 251-263). Boca Raton: CRC Press.
- Gressel, J. (2002). Transgenic herbicide-resistant crops – advantages, drawbacks, and failsafes. In: K.-M. Oksman-Caldentey & W.H. Barz (Eds), *Plant Biotechnology and Transgenic Plants* (597-633). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Guha, S., & Maheshwari, S.C., 1964. *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature*, 204, 497.
- Guha, S., & Maheshwari, S.C., 1966. Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura innoxia in vitro*. *Nature*, 212, 97-98.
- Guha, S., & Maheshwari, S.C., 1967. Development of embryos from pollen grains of *Datura in vitro*. *Phytomorphol.* 17:454-461, 212, 97-98.
- Guimarães, M. L., Cruz, G. S. & Montezuma-de-Carvalho J. M. (1988). Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. *Plant Cell, Tis. & Org. Cult.*, 15, 161-167.
- Guimarães, M. L., Tomé, M. C., & Cruz, G. S. (1996). *Cyphomandra betacea* (Cav). Sendtn. (tamarillo) In: Y. P. S. Bajaj, (Ed.), *Biotechnology in agriculture and forestry*, Vol. 35, Trees IV (pp. 120-137). Berlin: Springer.
- Häggman, H., Vuosku, J., Sarjala, T., Jokela, A., & Niemi, K. (2005). Somatic embryogenesis of pine species: from functional genomics to plantation forestry. In: A. Mujib & J. Šamaj (Eds.), *Somatic embryogenesis* (pp. 119-140). Heidelberg: Springer.

- Haïcour, R., & Sihachakr, D. (1995). Les protoplastes et l'hybridation somatique par fusion de protoplastes. In: Y. Demarly & E. Pichard (Eds.), *Biotechnologies végétales* (5-162). Paris, UNISAT.
- Hails, R. S. (2009). Environmental impact of genetically modified organisms (GMOs). In: *Encyclopedia of Life Sciences*. New York: Wiley-Blackwell (versão on-line – www.els.net). Acedido em 13 de Janeiro de 2010.
- Harada, J. J., & Kwong, R.W. (2001). Plant embryogenesis (zygotic and somatic). In: *Encyclopedia of Life Sciences*. New York: Wiley-Blackwell (versão on-line – www.els.net). Acedido em 13 de Maio de 2010.
- Harborne, J. B. (1998). *Phytochemical methods – a guide to modern techniques of plant analysis*. London: Chapman & Hall.
- Harding, E.W., Tang, W., Nichols, K. W., Fernandez, D. E., & Perry, S. E. (2003). Expression and maintenance of embryogenic potential is enhanced through constitutive expression of *AGAMOUS*-Like 15. *Plant Physiol.*, 133, 653-663.
- Hartmann, H., Kester, D. E., Davies, F. T. Jr., & Geneve, R. L. (1997). **Plant propagation: principles and practices** (6ª Ed.). New Jersey: Prentice Hall International, Inc.
- Haslam E. (2002). Plant secondary metabolism. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. New York: Wiley-Blackwell (versão on-line – www.els.net). Acedido em 3 de Junho de 2010.
- Hayes, P., Corey, A., & Maluszynski M. (2003). Doubled haploid production in barley using the *Hordeum bulbosum* (L.) technique. In: M. Maluszynski, K. J. Kasha, B. P. Forster & Szarejko, I. (Eds.), *Doubled haploid production in crop plants – a manual* (pp. 5-14). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Hecht, V., Vielle-Calzada, J.-P., Hartog, M. V., Schmidt, E. D. L., Boutilier, K., Grossniklaus, U., & De Vries, S. C. (2001). The *Arabidopsis* *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1* gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiol.*, 127, 803-816.
- Henry, Y., & De Buyser, J. (1990). *In vitro* production of haploids and release of varieties. In: Y. P. S. Bajaj, (Ed.), *Biotechnology in agriculture and forestry*, Vol. 13, Wheat (pp. 285-352). Berlin: Springer-Verlag
- Herman, E. B. (1997). *Micropropagation systems, techniques and applications: 2006-2010*. Vol. 13, *Recent advances in plant tissue culture*. Shrub Oak: Agritech Publications.
- Herren, R. V. (2005). *Introduction to biotechnology – an agricultural revolution*. New York: Thomson Delmar Learning.
- Holm, Y. & Hiltunen, R. (2002). Plant derived drugs and extracts. In: K.-M. Oksman-Caldentey & W.H. Barz (Eds), *Plant Biotechnology and Transgenic Plants* (23-44). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Hooykaas, P. J. J. (2010). Plant transformation. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. New York: Wiley-Blackwell (versão on-line – www.els.net). Acedido em 31 de Maio de 2010.
- Hopkins, W. G. & Hüner, N. P. A. (2004). *Plant Physiology* (3ª ed.). New Jersey: John Wiley & Sons.
- Howe, C. J. (2005). Chloroplast genome. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. New York: Wiley-Blackwell (versão on-line – www.els.net). Acedido em 27 de Março de 2009.
- Howell, S.H., 1998. *Molecular genetics of plant development*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Hu, Z. B., & Du, M. (2006). Hairy roots and its application in plant genetic engineering. *J. Int. Plant Biol.*, 48:121-127.

- Huang, B. (1986). Ultrastructural aspects of pollen embryogenesis in *Hordeum*, *Triticum* and *Paeonia*. In: H. Han & Y. HongYuan (Eds), Haploids of higher plants *in vitro* (pp. 91-117). Beijing: China Academic Publishers.
- Iantcheva, A., Vlahova, M., & Atanassov, A. (2005). Somatic embryogenesis in genera *Medicago*: na overview. In: A. Mujib & J. Šamaj (Eds.), Somatic embryogenesis (pp. 285-304). Heidelberg: Springer.
- Ikeda, M., & Kamada, H. (2005). Comparison of molecular mechanisms of somatic and zygotic embryogenesis. In: A. Mujib & J. Šamaj (Eds.), Somatic embryogenesis (pp. 51-68). Heidelberg: Springer.
- Inagaki, M. N. (1990). Wheat haploids through the *bulbosum* technique. In: Bajaj Y. P. S. Bajaj (Ed.), Biotechnology in Agriculture and Forestry vol 35, Trees IV (pp. 448-459). Berlin: Springer-Verlag.
- Ishihara, K., Hamada, H., Hirata, T., & Nakajima, N. E. (2003). Biotransformation using plant cultured cells. *J. Mol Catal B: Enzymatic*, 23, 145-170.
- Jenik, P. D., Gilmor, C. S., & Lukowitz, W. (2007). Embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Ann. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 23, 207-236.
- Jiménez, V. M. (2005). Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Regul.*, 74, 91-110.
- Joosen, R., Cordewener, J., Supena, E. D. J., Vorst, O., Lammers, M., Maliepaard, C., Zeilmaker, T., Miki, B., America, T., & Boutilier, K. (2007). Combined transcriptome and proteome analysis identifies pathways and markers associated with the establishment of rapeseed microspore-derived embryo development. *Plant Physiol.*, 144, 155-172.
- Kane, M. E. (2005). Shoot culture procedures. In: R. N. Trigiano & D. J. Gray (Eds.), *Plant Development and Biotechnology* (pp. 145-157). Boca Raton: CRC Press.
- Kao, K. N., Keller, W. A., & Miller, R. A. (1970). Cell division in newly formed cells from protoplasts of soybean. *Exp. Cell Res.*, 62, 338-340.
- Kasha, K. J., & Kao, K. N. (1970). High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Nature*, 225, 874-875
- Kasha, K. J., & Maluszynski M. (2003). **Production of doubled haploids in crop plants. An introduction.** In: M. Maluszynski, K. J. Kasha, B. P. Forster & Szarejko, I. (Eds.), *Doubled haploid production in crop plants – a manual* (pp. 1-4). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Kasha, K. J., Simion, E., Oro, R. & Shim Y. S. (2003). **Barley isolated microspore culture protocol.** In: M. Maluszynski, K. J. Kasha, B. P. Forster & Szarejko, I. (Eds.), *Doubled haploid production in crop plants – a manual* (pp. 43-47). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Kawashima, T., & Goldberg, R. B. (2010). The suspensor: not just suspending the embryo. *Trends Plant Sci.*, 15, 23-30.
- Keil, M. (2002). Fine chemicals from plants. In: K.-M. Oksman-Caldentey & W.H. Barz (Eds), *Plant Biotechnology and Transgenic Plants* (347-371). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Kessmann, H. & Schnurr, B. (2002). Industrial strategies for the discovery of bioactive compounds from plants. In: K.-M. Oksman-Caldentey & W.H. Barz (Eds), *Plant Biotechnology and Transgenic Plants* (45-58). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Kikkert, J. R. (2001). Microprojectile bombardment. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. New York: Wiley-Blackwell (versão on-line – www.els.net). Acedido em 6 de Abril de 2010.
- Kimber, G., & Riley, R. (1963). Haploid angiosperms. *Bot. Review*, 29, 480-531.
- Kirakosyan, A., & Kaufman, P. B. (2009). *Recent advances in plant biotechnology*. Dordrecht: Springer.

- Klein, T. M., Wolf, E. D., Wu, R., & Sanford, J. C. (1987). High-velocity microprojectiles for delivery of nucleic acids into living cells. *Nature*, 70-73.
- Klercker, I. A. F. (1892). Eine method zu Isolierung lebender Protoplasten. *Oefvers. K. Vetensk. Akad. Foerth* 9, 463-471
- Kohli, A., Twyman, R. M., & Abranches, R. et al. (2003) Transgene integration, organization and interaction in plants. *Plant Mol. Biol.*, 52, 247-258.
- Koltunow, A.M., & Grossniklaus, U. (2003). Apomixis: a developmental perspective. *Ann. Rev. Plant Biol.*, 54, 547-574.
- Konar, R.N. & Nataraja, G.J. (1965). Experimental studies in *Ranunculus sceleratus* L.: development of embryos from the stem epidermis. *Phytomorphol.*, 15, 132-137.
- Korth, K. L. (2008). Genes and traits of interest for transgenic plants. In: C. N. Stewart Jr. (Ed.), *Plant Biotechnology and Genetics – principles, techniques, and applications* (pp. 193-216). New Jersey: Wiley.
- Kotte, W., (1922). Kulturversuche mit isolierten Wurzelspitzen. *beitr. z. Allgem. Bot.*, 2:413-434.
- Kreuger, M., Hengel, A. V., & De Vries, S. (2000). **Effect of arabinogalactan-proteins and chitinases on somatic embryogenesis.** In: E. A. Northnagel, A. Bacic & A. E. Clarke (Eds.), *Cell and developmental biology of arabinogalactan-proteins* (pp. 109-118). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Krikorian, A. D. (2000). Historical insights into some contemporary problems in somatic embryogenesis. In: S. M. Jain, P. K. Gupta & R. J. Newton (Eds.), *Somatic embryogenesis in woody plants*, Vol. 6 (pp. 17-49). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Kumlehn, J. (2009). Embryogenic pollen culture: a promising target for genetic transformation. In: A. Touraev, B. P. Foster & S.M. Jain (Eds.), *Advances in haploid production in higher plants* (295-305). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Lacadena, J. R., 1974. Spontaneous and induced parthenogenesis and androgenesis. In: K. J. Kasha (Ed.), *Haploids in Higher Plants – Advances and Potential* (pp. 13-32). Guelph: University of Guelph Press.
- Langridge, W. H. R. (2000). Edible vaccines. *Sci. Amer.*, Sep., 66-71
- Lawler, J. F., Hyland, E. M., & Boeke, J.D. (2008). Genetic engineering: reporter genes. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. New York: Wiley-Blackwell (versão on-line – www.els.net). Acedido em 25 de Fevereiro de 2010.
- Lemaux, P. G. (2008). Genetically engineered plants and foods: a scientist's analysis of the issues (part I). *Ann. Rev. Plant. Biol.*, 59, 771-812.
- Lemaux, P. G. (2009). Genetically engineered plants and foods: a scientist's analysis of the issues (part II). *Ann. Rev. Plant. Biol.*, 60, 511-559.
- Lheureux, K., & Menrad, K. (2004). A decade of European field trials with genetically modified plants. *Environ. Biosafety Res.*, 3, 99-107.
- Li, Z. T. & Gray, D. J. (2005). Genetic engineering technologies. In: R.N. Trigiano & D.J. Gray (Eds.), *Plant Development and Biotechnology* (pp. 241-250). Boca Raton: CRC Press.
- Li, Z.T. (2005). Software and databases as tools for analyzing nucleic acid and protein sequences. In: R.N. Trigiano & D.J. Gray (Eds.), *Plant development and biotechnology* (101-118). Boca Raton: CRC Press.
- Lico, C., Baschieri, S., Marusic, C., & Benvenuto, E. (2007). **Molecular farming for antigen (vaccine) production in plants.** In: P. Ranalli (Ed.), *Improvement of crop plants for industrial end uses* (pp. 417-433). Dordrecht: Springer.

- Lila, M.A. (2005). Valuable secondary products from *in vitro* cultures. In: R.N. Trigiano & D.J. Gray (Eds.), Plant development and biotechnology (285-289). Boca Raton: CRC Press.
- Lima, M.A., Paiva, A., & Candeias M. I. (2003). Flow cytometry – a simple method for nuclear DNA content evaluation of *Vitis vinifera* cv. Periquita somatic embryos obtained from anther cultures. *Vitis*, 42, 99-100.
- Limasset, P., & Cornuet, P. (1949). Recherche du virus de la mosaïque du Tabac dans les méristèmes de plantes infectées. *C. R. Acad. Sci.*, 228, 1971-1972.
- Liu, C., Xu, Z., & Chua, N. (1993). Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. *Plant Cell*, 5, 621-630.
- Liu, J., (2005). Protoplast isolation and culture of woody plants. In: S.M. Jain & P. K. Gupta (Eds.), protocol for somatic embryogenesis in woody plants (553-566). Dordrecht: Springer.
- Llewellyn, D. J., & Higgins, T. J. V. (2002). Transgenic crop plants with increased tolerance to insect pests. In: K.-M. Oksman-Caldentey & W. H. Barz (Eds), Plant Biotechnology and Transgenic Plants (pp. 571-595). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Lomonossoff, G. P., & Montague, N. P. (2008). Plant viruses as gene expression and silencing vectors. In: Encyclopedia of Life Sciences. New York: Wiley-Blackwell (versão on-line – www.els.net). Acedido em 18 de Agosto de 2009.
- Lopes, M. L., Ferreira, M. R., Carloto, J. M., Cruz, G. S., & Canhoto, J. M. (2000). Applied and fundamental aspects of somatic embryogenesis in Tamarillo (*Cyphomandra betacea*). In: S. M. Jain, P.K. Gupta & R.J. Newton (Eds.), Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Vol. 6 (pp. 433-435). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Losey, J. E., Rayor, L.S., & Carter, M. (1999). Transgenic pollen harms monarch larvae. *Nature.*, 399, 214.
- Lotan, T., Ohto, M., & Yee, K. M. (1998). *Arabidopsis* *LEAFY COTYLEDON 1* is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell*, 93, 1195-1205.
- Lucca, P., Hurrel, R., & Potrykus, I. (2001). Genetic engineering approaches to improve the bioavailability and the level of iron in rice grains. *Theor. Appl. Genet.*, 102, 392-397.
- MacMillan, J., & Takahashi, N. (1999). Proposed procedure for the application of trivial names to the gibberellins. *Nature*, 217, 170-171.
- Maia, J. M. (2003). Obtenção de plantas de *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendtn. por embriogênese somática a partir de material adulto micropropagado. Coimbra: Universidade de Coimbra. Dissertação de Mestrado.
- Maliga, P. (2004). Platyid transformation in higher plants. *Ann. Rev. Plant Biol.*, 55:289-313.
- Malik, M. R., & Krochko, J. E. (2009). Gene expression profiling of microspore embryogenesis in *Brassica napus*. In: A. Touraev, B. P. Foster & S.M. Jain (Eds.), Advances in haploid production in higher plants (115-125). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers
- Maluszynski, J. (2003). Cytogenetic tests for ploidy level analysis – chromosome counting. In: M. Maluszynski, K. J. Kasha, B. P. Forster e I. Szarejko (Eds.), Doubled Haploid Production in Crop Plants – a manual (pp. 391-395). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Maraschin, S. F., van Bergen, S., Vennik, M., & Wang, M. (2008). Culture and time-lapse tracking of barley microspore-derived embryos. In: M. F. Suárez & P. V. Bozhkov (Eds.), Methods in molecular biology, vol 427: plant embryogenesis (77-91). Totowa: Humana Press.
- Margara, J. (1982). Bases de la multiplication vegetative. Paris: INRA.
- Marques, M. R. (2003). Ensaios para otimizar a indução e desenvolvimento de embriões somáticos em *Pinus pinaster* Aiton e *Fejoa sellowiana* Berg. Coimbra: Universidade de Coimbra. Dissertação de Mestrado.

- Martins, J. M. N. (2001). Avaliação de novos genótipos transgênicos face à homologação e certificação. Comunicações do simpósio plantas transgênicas na agricultura. Que futuro? (87-120). Oeiras: Estação Agronômica Nacional.
- Mason, H. S., Haq, T. A., Clements, J. D., & Arntzen, C. J. (1988). Edible vaccine protects mice against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic LT-B gene. *Vaccine*, 16, 1336-1343.
- Matos, A. M. (2005). Ensaio de morfogênese *in vitro* em *Bellevalia hackelli* Freyn. Coimbra: Universidade de Coimbra. Dissertação de Mestrado.
- Maurion, A. (2005). Engenharia genética e ética. In: E.V. Schärer-Züblin (Ed.), Os genes e a alimentação (pp. 12-17). Fondation Alimentarium, Nestlé.
- McCown, B. M. & Lloyd, G. (1981). Woody plant medium (WPM). A mineral nutrient formulation for microculture of woody plant species. *HortScience*, 16, 89.
- McHughen, A. (2008). Regulation and biosafety. In: C. N. Stewart Jr. (Ed.), *Plant biotechnology and genetics – principles, techniques, and applications* (pp. 291-310). New Jersey: Wiley.
- McHughen, A. (2008). Regulations and biosafety. In: C. N. Stewart Jr. (Ed.), *Plant biotechnology and genetics – principles, techniques, and applications* (pp. 291-310). New Jersey: Wiley.
- Meinke, D.W. (1995). Molecular genetics of plant embryogenesis. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 46, 369-394.
- Miki, B. (2008). Marker genes and promoters. In: C. N. Stewart Jr. (Ed.), *Plant biotechnology and genetics – principles, techniques, and applications* (pp. 217-243). New Jersey: Wiley.
- Mirkov, T. E. (2003). The molecular basis of genetic modification and improvement of crops. In: M. J. Chrispeels & D. E. Sadava (Eds), *Plants, Genes, and Crop Biotechnology* (2nd ed.). (pp. 124-151). Boston: Jones and Bartlett Publishers, American Society of Plant Biologists.
- Moerschbacher, B. (2002). The plant cell wall – structural aspects and biotechnological developments. In: K.-M. Oksman-Caldentey & W.H. Barz (Eds), *Plant Biotechnology and Transgenic Plants* (445-475). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Moinet, M.-L. (1985). Les asperges «supermâles». *Science et Vie*, 813, 101-111.
- Monteiro, T. (2002). A influência do cálcio na indução de embriogênese somática em Feijoa sellowiana Berg. Coimbra: Universidade de Coimbra. Dissertação de Mestrado.
- Moore, T.C. (1989). *Biochemistry and physiology of plant hormones* (2nd Ed.). New York: Springer-Verlag.
- Mordhorst, A., Charbit, E., & de Vries, S.C. (2005). Some developmental and molecular aspects of somatic embryogenesis (nonzygotic embryogenesis). In: R.N. Trigiano & D.J. Gray (Eds.), *Plant development and biotechnology* (201-209). Boca Raton: CRC Press.
- Mordhorst, A.P., Voerman, K.J., Hartog, M.V., Meijer, E.A., Went, J.V., Koornneef, M., & De Vries, S.C., 1998. Somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* is facilitated by mutations in genes repressing meristematic cell divisions. *Genetics*, 149, 549-563.
- Morel, G., & Martin, C. (1952). Guérison de dahlias atteints d'une maladie à virus. *R. R. Acad. Sci.*, 235:1324-1325.
- Morikawa, H., & Yamada, Y. (1992). Protoplast fusion. In: M. W. Fowler, G. S. Warren & M. Moo-Young (Eds.), *Plant biotechnology* (pp. 199-222). Berlin: Springer-Verlag.
- Muñoz-Amatriáin, M., Svensson, J.T., Castillo, A.M., Cistué, L., Close, T.J., & Vallés, M.P. (2009). Expression profiles in barley microspore embryogenesis. In: A. Touraev, B. P. Foster & S.M. Jain (Eds.), *Advances in haploid production in higher plants* (127-134). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers

- Murashige, T. (1974). Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 25, 135166.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
- Murray, E. E., Lotzer, J. & Eberle, M. (1989). Codon usage in plant genes. *Nucleic Acid Res.*, 17:477-498.
- Napoli, C., Lemieux, C., Jorgensen, R. (1990). Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell*, 2, 279-289.
- Newell-McGloughlin, M. & Re, E.B. (2006). The evolution of biotechnology – from natufians to nanotechnology. Dordrecht: Springer.
- Nitsch, J. P., & Nitsch, C. (1969). Haploid plants from pollen grains. *Science*, 163, 85-87.
- Nobécourt, P. (1939). Sur la pérennité et l'augmentation de volume des cultures de tissus végétaux. *C. R. Soc. Biol.*, 130, 1270-1271.
- Nomura, K. & Komamine A. (1995). Physiological and biochemical aspects of somatic embryogenesis. In: T.A. Thorpe (Ed.), *In vitro* embryogenesis in plants (pp. 249-265). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Ochatt, S. J. (1992). Plant regeneration from cultured protoplasts of higher plants. In: M. W. Fowler, G. S. Warren & M. Moo-Young (Eds.), *Plant biotechnology* (pp. 99-127). Berlin: Springer-Verlag.
- Ochatt, S.J., & Power, J.B. (1992). Plant regeneration from cultured protoplasts og higher plants. In: M.W. Fowler, G.S. Warren & M. Young (Eds), *Plant Biotechnology* (99-127). Oxford: Pergamon Press.
- Oeschger, M. P., & Silva, C. E. (2007). **Genetically modified organisms in the United States: implementation, concerns, and public perception.** *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.*, 107, 57-68.
- Ohlrogge, J. & Chrispeels, M. J. (2003). Plants as chemical and pharmaceutical factories. In: M. J. Chrispeels & D. E. Sadava (Eds), *Plants, Genes, and Crop Biotechnology* (2nd ed.). (500-525). Boston: Jones and Bartlett Publishers, American Society of Plant Biologists.
- Oliveira, M. M. (1992). *Actinidia deliciosa* var. *deliciosa* (kiwi): condições de cultura *in vitro* e bases para a transformação genética. Dissertação de Doutorado, Universidade de Lisboa.
- Oliveira, M. M. (2001). Vias para a engenharia genética de plantas e aplicações na agricultura moderna. Comunicações do simpósio plantas transgênicas na agricultura. Que futuro? (35-48). Oeiras: Estação Agronómica Nacional.
- Ooms, G. (1992). Genetic engineering of plants and cultures. In: M. W. Fowler, G. S. Warren & M. Moo-Young (Eds.), *Plant biotechnology* (pp. 223-257). Berlin: Springer-Verlag.
- Otten, L. (2001). Ti plasmids. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. New York: Wiley-Blackwell (versão on-line – www.els.net). Acedido em 3 de Janeiro de 2010.
- Pais, M. S. (2003). Biotecnologia vegetal. In: N. Lima & M. Mota (Eds.), *Biotecnologia – fundamentos e aplicações* (pp. 401-427). Lisboa: Lidel.
- Panteleitchouuk, A. (2003). Micropropagação de alfarrobeira (*Ceratonia siliqua*) variedade Aida – estudos químicos e de microscopia. Coimbra: Universidade de Coimbra. Dissertação de Mestrado.
- Paranhos, A. (2005). Cultura de células e tecidos vegetais *in vitro*: uma fonte alternative de metabolitos secundários. In: A. M. Proença da Cunha (Ed.), *Farmacognosia e Fitoquímica* (65-88). Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.

- Pardey, P. G. & Wright, B. D. (2003). Agriculture R&D, productivity, and global food prospects. In: M. J. Chrispeels & D. E. Sadava (Eds), *Plants, Genes, and Crop Biotechnology* (2nd ed.). (pp. 22-51). Boston: Jones and Bartlett Publishers, American Society of Plant Biologists.
- Park, S., & Harada, J. J. (2008). *Arabidopsis* embryogenesis. In: M. F. Suárez & P. V. Bozhkov (Eds.), *Methods in molecular biology*, Vol 427: plant embryogenesis (pp. 1-16). Totowa: Humana Press.
- Pauk, J., Jancsó, M. & Simon-Kiss, I. (2009). Rice doubled haploids and breeding. In: A. Touraev, B. P. Foster & S.M. Jain (Eds.), *Advances in haploid production in higher plants* (189-197). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Pedroso, M. C., & Pais M. S. (1999). Direct somatic embryogenesis from leaves of *Camellia japonica*. In: S. M. Jain, P. K. Gupta & R. J. Newton (Eds.), *Somatic embryogenesis in woody plants*, Vol. 5 (pp. 163-168). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Peixe, A. A. (2001). Estudo Sobre a Aplicação de Duas Técnicas de Haploidização (Androgénese *in Vitro* e Partenogénese *in Situ*), em Prunoideas. Évora: Universidade de Évora. Dissertação de Doutoramento.
- Pereira, A. N. (1995). *Biotecnologia e agricultura*. Lisboa: Universidade Aberta.
- Perpétuo, N. C. (2009). Estudo da acção dos genes da classe III *HD-Zip* e *KANADI* na ontogenia das raízes laterais de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Coimbra: Universidade de Coimbra. Dissertação de Mestrado.
- Pfeiffer, T. W. (2003). From classical plant breeding to modern crop improvement. In: M. J. Chrispeels & D. E. Sadava (Eds), *Plants, Genes, and Crop Biotechnology* (2nd ed.), (pp. 360-389). Boston: Jones and Bartlett Publishers, American Society of Plant Biologists.
- Philipon, P., & Tastemain, C. (1998). *Plantes transgéniques – les graines de la discorde*. Paris: Elsevier/Biofuture.
- Picard, E. (1995). Historique des methods d'haplodiploïdisation de 1922 à 1995. In: M. Petitprez (Ed.), *Haplodiploïdisation* (pp. 5-19). Rennes: UNISAT Université audiovisuelle francophone.
- Pinstrup-Andersen, P., & Cohen, M. J. (2001). Modern biotechnology for the developing countries: why the European and the developing-country perspectives are likely to differ. *Comunicações do simpósio plantas transgénicas na agricultura. Que futuro?* (1-34). Oeiras: Estação Agronómica Nacional.
- Potrykus, I. (2003). From golden to nutritionally optimized rice and from a scientific concept to the farmer. In: R. Tuberosa, R. L. Phillips & M. Gale (Eds.), *Proceedings of the International Congress "In the Wake of the Double Helix: From the Green Revolution to the Gene Revolution"* (pp. 656-671). Bolonha.
- Powell, D. (2008). Why transgenic plants are so controversial. In: C. N. Stewart Jr. (Ed.), *Plant biotechnology and genetics – principles, techniques, and applications* (pp. 343-355). New Jersey: Wiley.
- Preece, C. (2008). Stock plant physiological factors affecting growth and morphogenesis. In: E. F. George, M. A. Hall & G.-J De Klerk (Eds.), *Plant propagation by tissue culture* (3rd ed). Vol. 1, Background (pp. 403-422). Dordrecht: Springer.
- Primrose, S. B., & Twyman, R. M. (2006). *Principles of gene manipulation and genomics* (7th Ed.). Oxford: Blackwell Publishing.
- Proença da Cunha, A., Silva, A. P. & Roque, O. R. (2003). *Plantas e produtos vegetais em fitoterapia*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
- Puite, K.J. (2006). Progress in plant protoplast research. *Physiol. Plant.*, 85:401-410.

- Raemakers, K., Jacobsen, E., & Visser R. (1999). Proliferative somatic embryogenesis in woody species. In: S. M. Jain, P. K. Gupta & R. J. Newton (Eds.), *Somatic embryogenesis in woody plants*, Vol. 4 (pp. 29-59). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Raghavan, V. (1997). *Molecular Embryology of Flowering Plants*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Raghavan, V. (2006). Can carrot and *Arabidopsis* serve as model systems to study the molecular biology of somatic embryogenesis? *Curr. Sci.*, 90, 1336-1343.
- Raghavan, V. (2006). Double-fertilization – embryo and endosperm development in flowering plants. Heidelberg: Springer.
- Rajjou, L., Gallards, K., Job, C., & Job, D. (2006). Proteome analysis for the study of developmental processes in plants. In: C. Finnie (Ed.), *Plant proteomics* (151-184). Oxford: Blackwell Publishing.
- Rao, S. R., & Ravishankar, G. A. (2002). Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.*, 20, 101-153.
- Reed, S.M. (2005). Haploid cultures. In: R.N. Trigiano & D.J. Gray (Eds.), *Plant development and biotechnology* (225-234). Boca Raton: CRC Press.
- Reinert, J. & Yeoman, M. M. (1982). *Plant cell and tissue culture – a laboratory manual*. Berlin: Springer-Verlag.
- Reinert, J. (1958). Untersuchungen über die morphogenese an gewebekulturen. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, 71, 15.
- Reis, E. M. (2004). Estudo de fenóis durante a indução de embriogénese somática em *Feijoa sellowiana* Berg. (Myrtaceae). Coimbra: Universidade de Coimbra. Dissertação de Mestrado.
- Reis, E., Batista, M. T., & Canhoto, J. M. (2008). **Effect and analysis of phenolic compounds during somatic embryogenesis induction in *Feijoa sellowiana* Berg.** *Protoplasma*, 232, 193-202.
- Richards, H.A., Hudson, L.C., Halfhill, M.D. & Stewart Jr, C. N. (2005). Genetically modified plant controversies: sensational headlines versus sensible research. In: R.N. Trigiano & D.J. Gray (Eds.), *Plant Development and Biotechnology* (pp. 251-263). Boca Raton: CRC Press.
- Rodrigues, L. M. (2008) Efeitos alelopáticos de juglona e de extractos de *J. regia* L. e de *J. nigra* L. em *Hakea salicifolia* (Vent) B. L. Burt e *Acacia melanoxylon* R. Br. Coimbra: Universidade de Coimbra. Dissertação de Mestrado.
- Rojas-Herrera, R., Quiroz-Figueroa, F. R., Monforte-González, M. Saínchez-Teyer, F., & Loyola-Vargas, V. M. (2002). Differential gene expression during somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L., revealed by RT-PCR differential display. *Mol. Biotech.*, 21, 43-50.
- Rossi, L., Hohn, B., Tinland, B. (1993). The VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* carries nuclear localization signals important for transfer of T-DNA to plant. *Mol. Gen. Gene.*, 239, 345-353.
- Rossi, L., Hohn, B., Tinland, B. (1996). Integration of complete transferred DNA unit sis dependent on the activity of virulence E2 protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 93:126-130.
- Sadava, D. E. (2003). Human population growth: lessons from demography. In: M. J. Chrispeels & D. E. Sadava (Eds), *Plants, Genes, and Crop Biotechnology* (2nd ed.). (pp. 1-21). Boston: Jones and Bartlett Publishers, American Society of Plant Biologists.
- Saito, K. & Mizukami, H. (2002). Plant cell cultures as producers of secondary compounds. In: K.-M. Oksman-Caldentey & W.H. Barz (Eds), *Plant Biotechnology and Transgenic Plants* (77-109). New York: Marcel Dekker, Inc.

- Šamaj, J., Bobák, M., Blehová, A. & Pret'ová, A. (2005). Importance of cytoskeleton and cell wall in somatic embryogenesis. In: A. Mujib & J. Šamaj (Eds.), Somatic embryogenesis (pp. 35-50). Heidelberg: Springer.
- Sanford, J. C. (1988). The biolistic process. Trends Biotechnol., 6, 299-302.
- Sanford, J. C., Devit, M. J., Russell, J. A. *et al.*, (1991). An improved helium driven biolistic device. Technique, 3, 3-16.
- Santos, T. C. (2009). Estudos de morfogénese e análise de compostos fenólicos em material *in vitro* e *in vivo* de *Arbutus unedo* L. Coimbra: Universidade de Coimbra. Dissertação de Mestrado.
- Sarrafi, A. (1995). Régénération haploïde par les croisement intergénériques (blé x maïs) et interspécifiques (*H. vulgare* L. x *H. bulbosum* L.). In: M. Petitprez (Ed.), Haplodiploïdisation (pp. 163-174). Rennes: UNISAT Université audiovisuelle francophone.
- Sarrafi, A., & Ghaemi, M. (1995). Lándrogenèse et son utilisation en génétique et amélioration des plantes. In: M. Petitprez (Ed.), Haplodiploïdisation (pp. 43-88). Rennes: UNISAT Université audiovisuelle francophone.
- Sauer, M. & Friml, J. (2005). *In vitro* culture of *Arabidopsis* embryos. In: A. Mujib & J. Šamaj (Eds.), Somatic embryogenesis (pp. 343-354). Heidelberg: Springer.
- Savidge, B., Weiss, J. D., Wong, Y.H.H., Lassner, M. W., Misky, T. A., Shewmaker, C. K., Post-Beittenmiller, D. & Valentin, H. E. (2002). Isolation and characterization of homogentisate phytyltransferase genes from *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Arabidopsis*. Plant Physiol., 129, 321-332.
- Schenk, R. U., & Hildebrandt, A. C. (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant and cell cultures. Can. J. Bot., 50, 199-204.
- Schmidt, E. D. L., Guzzo, F., Toonen, M. A. J., & De Vries, S. C. (1997). A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. Development, 124, 2049-2062.
- Schumann, C. (1990). *In vitro* production of haploids in Triticale. In: Y. P. S. Bajaj, (Ed.), Biotechnology in agriculture and forestry, Vol. 13, Wheat (pp. 382-402). Berlin: Springer-Verlag
- Schwarz, O. J., Sharma, A. R., & Beaty, R. M. (2005). Propagation from nonmeristematic tissues: organogenesis. In: R. N. Trigiano & D. J. Gray (Eds.), Plant Development and Biotechnology (pp. 159-172). Boca Raton: CRC Press.
- Sears, M. K., Hellmich, R. L., Stanley-Horn, D.E., Oberhauser, K. S., Pleasants, J. M., Mattila, H. R., Siegfried, B. D. & Dively, G. P. (2001). Impact of *Bt* polle corn pollen on monarch butterfly populations: a risk assessment. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 11937-11942.
- Seguí-Simarro, J. M., Testillano, P. S., Jouannic, S., Henry, Y., & Risueño, M. C. (2005). Mitogen-activated protein kinases are developmentally regulated during stress-induced microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. Histochem. Cell Biol., 123, 541-551
- Sequeira, J. L. (2009). Avaliação do potencial de *Callitriche brutia* como fitorremediadora de urânio em ensaios de cultura *in vitro*. Coimbra: Universidade de Coimbra. Dissertação de Mestrado.
- Sharma, H. P. (2009). Plant embryology – classical and experimental. Oxford: Alpha Science International Ltd.
- Sharma, K. K., & Thorpe T. A. (1995). Asexual embryogenesis in vascular plants. In: T.A. Thorpe (Ed.), *In vitro* embryogenesis in plants (pp. 17-72). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Sharp, W. R., Söndahl, M. R., Caldas, L. S., & Maraffa, S. B. (1980). The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis. Hort. Rev., 2, 268-310.

- Shelton, A. M., & Sears, M. K. (2001). The monarch butterfly controversy: scientific interpretations of a phenomenon. *Plant J.*, 27, 483-488.
- Shim, Y.S., & Kasha, K.J. (2003). Barley microspore transformation protocol by biolistic gun. In: M. Malszynski, K. J. Kasha, B.P. Forster & I. Szaejko (Eds.), *Doubled haploid production in crop plants* (363-366). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Shivanna, K.R. (2003). *Pollen biology and biotechnology*. Enfield: Science Publishers, Inc.
- Slater, A., Scott, N., & Fowler, M. (2008). *Plant biotechnology – the genetic manipulation of plants* (2nd Ed.). Oxford: Oxford University Press.
- Smith, B. D. (1995). *The emergence of agriculture*. New York: Scientific American Library.
- Smith, C., Watson, C., Ray, J., et al. (1988). Antisense RNA inhibition of polygalacturonase gene expression in transgenic tomatoes. *Nature* 334, 724-726.
- Sniezko, R., & Visser, T. (2005). Embryo development and fruit-set in pear induced by untreated and irradiated pollen. *Euphytica*, 36, 287-294.
- Souvré, A. (1995). Événements cytologiques, biochimiques et moléculaires liés à l'embryogenèse haploïde mâle. In: M. Petitprez (Ed.), *Haplodiploïdisation* (pp. 147-162). Rennes: UNISAT Université audiovisuelle francophone.
- Srivastava, L.M. (2002). *Plant Growth and Development – Hormones and Environment*. Amsterdam: Academic Press.
- Stadler, B.M. (2005). Os alimentos geneticamente modificados e as alergias. In: E.V. Schärer-Züblin (Ed.), *Os genes e a alimentação* (pp. 102-103). Fondation Alimentarium, Nestlé.
- Steward Jr, C. N. & Wheaton, S. K. (2003). Urban myths and scientific facts about the biosafety of genetically modified (GM) crops. In: M. J. Chrispeels & D. E. Sadava (Eds), *Plants, Genes, and Crop Biotechnology* (2nd ed.). (530-551). Boston: Jones and Bartlett Publishers, American Society of Plant Biologists.
- Steward, F. C., Mapes, M. O. & Mears, K., 1958. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in culture grown from freely suspended cells. *Amer. J. Bot.*, 45, 705-708.
- Stewart Jr., C. N. & Ow, D. W. (2008). The future of plant biotechnology. In: C. N. Stewart Jr. (Ed.), *Plant Biotechnology and Genetics – principles, techniques, and applications* (pp. 357-369). New Jersey: Wiley.
- Stix, G. (2007). A question of sustenance. *Scientific American*, Set., 30-33.
- Supena, E. D. J., Winarto, B., Riksen, T., Dubas, E., van Lammeren, A., Offringa, R., Boutilier, K., & Custers, J. (2008). Regeneration of zygotic-like microspore-derived embryos suggests an important role for the suspensor in early embryo patterning. *J. Exp. Bot.*, 59, 803-814.
- Suprasanna, P. & Bapat, V. A. (2005). **Differential gene expression during somatic embryogenesis**. In: A. Mujib & J. Šamaj (Eds.), *Somatic embryogenesis* (pp. 305-320). Heidelberg: Springer.
- Svarowsky, S., Borokov, A., Sykes, K. (2008). Cationic gold microparticles for biolistic delivery of nucleic acids. *BioTechniques*, 45, 535-540.
- Szarejko, I. (2003). Doubled haploid mutant production. In: M. Maluszynski, K. J. Kasha, B. P. Forster & Szarejko, I. (Eds.), *Doubled haploid production in crop plants – a manual* (pp. 351-361). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Szarejko, I. (2003). Major media composition. In: M. Maluszynski, K. J. Kasha, B. P. Forster & Szarejko, I. (Eds.), *Doubled haploid production in crop plants – a manual* (pp. 405-413). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Plant physiology* (4th Ed.). Sunderland: Sinauer Associates, Inc., Publishers.

- Tang, W., & Newton, R. J. (2005). Genome-wide expression analysis of genes involved in somatic embryogenesis. In: A. Mujib & J. Šamaj (Eds.), *Somatic embryogenesis* (pp. 69-83). Heidelberg: Springer.
- Tavares, A. C., Salgueiro, L. & Canhoto, J. M. (2010). *In vitro* propagation of the wild carrot *Daucus carota* L. subsp. *balophilus* (Brot.) A. Pujadas for conservation purposes. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*
- Tavares, A. C., Zuzarte, M. R. & Salgueiro, L. R. (2008). *Plantas aromáticas e medicinais*. Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra.
- Tchorbadjieva, M. I. (2005). Protein markers for somatic embryogenesis. In: A. Mujib & J. Šamaj (Eds.), *Somatic embryogenesis* (pp. 215-233). Heidelberg: Springer.
- Teixeira, R. P. (2004). *Análise Citológica e Molecular de Plantas Verdes e Albinas de Arroz (Oryza sativa L.) Obtidas por Androgênese*. Coimbra: Universidade de Coimbra. Dissertação de Mestrado.
- Thakare, D., Tang, W., Hill, K., & Perry, S. E. (2008). The MADS-domain transcriptional regulator *AGAMOUS-LIKE15* promotes somatic embryo development in arabidopsis and soybean. *Plant Physiol.*, 146, 1663-1672.
- Thanavala, Y., Mahoney, M., Pal, S., Scott, A., Richter, L., Natarajan, N., Goodwin, P., Arntzen, C. J., & Mason H. S. (2005). Immunogenicity in humans of an edible vaccine for hepatitis B. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 102, 3373-3382.
- Thibaud-Nissen, F., Shealy, R. T., Khanna, A., & Vodkin, L. O. (2003). Clustering of microarray data reveals transcript patterns associated with somatic embryogenesis in soybean. *Plant Physiol.*, 132, 118-136.
- Thomas, W. T. B., Forster, B. P. & Gertsson B. (2003). Doubled haploids in breeding. In: M. Maluszynski, K. J. Kasha, B. P. Forster & Szarejko, I. (Eds.), *Doubled haploid production in crop plants – a manual* (pp. 337-349). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Thomas, W.T.B., Forster, B.P., & Gertsson, B. (2003). Doubled haploids in plant breeding. In: M. Malszynski, K. J. Kasha, B.P. Forster & I. Szaejko (Eds.), *Doubled haploid production in crop plants* (337-349). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Thorpe, T. A., & Stasolla, C., (2001). Somatic embryogenesis. In: S. S. Bhojwani & W. Y. Soh (Eds.), *Current trends in the embryology of angiosperms* (pp. 279-336). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Tinker, N. A. (2008). Plant breeding. In: C. N. Stewart Jr. (Ed.), *Plant biotechnology and genetics – principles, techniques, and applications* (pp. 47-82). New Jersey: Wiley.
- Tomé, M. A. (1991). *Isolamento, cultura e regeneração de plantas a partir de protoplastos de Solanum tuberosum L. cvs. Bintje e Desirée*. Coimbra: Universidade de Coimbra. Dissertação de Mestrado.
- Tomé, M. A. (2001) *Isolamento, cultura e regeneração de plantas a partir de protoplastos de Solanum tuberosum L. cvs. Bintje e Desirée*. Coimbra: Universidade de Coimbra. Dissertação de Mestrado.
- Tomé, M.A. (2002). *Transformação genética de Anthurium scherzerianum por RNA antisense*. Coimbra: Universidade de Coimbra. Dissertação de Doutorado.
- Toonen, M. A. J. & de Vries, S. C. (1996). Initiation of somatic embryos from single cells. In: T. L. Wang & A. Cuming (Eds), *Embryogenesis the generation of a plant* (173-189). Oxford: Bios Scientific Publishers.
- Torp, A. M., & Andersen, S. B. (2009). Albinism in microspore culture. In: A. Touraev, B. P. Foster & S.M. Jain (Eds.), *Advances in haploid production in higher plants* (155-160). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

- Torres, K. C. (1989). Tissue culture techniques for horticultural crops. New York: Van Nostrand Reinhold.
- Touraev, A., Indrianto, A., Wratschko, I., Vicente, E., & Heberle-Bors, E. (1996). Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by starvation at high temperature. *Sex. Plant Rep* 9, 209-215.
- Trewavas, A. (1999). Much food, many problems. *Nature*, 402, 231-232.
- Trewavas, A. (2000). Signal perception and transduction. In: B.B. Buchanan, W. Gruissem & M. Mota (Eds.), *Biochemistry and molecular biology of plants* (pp. 930-987). Rockville: American Society of Plant Physiologists.
- Tsunewaki, K., & Mukai, Y. (1990). Wheat haploids through the salmon method. In: Y. P. S. Bajaj, (Ed.), *Biotechnology in agriculture and forestry*, Vol. 13, Wheat (pp. 460-478). Berlin: Springer-Verlag.
- Van Eenennaam, A. L., Lincoln, K., Durrett, T.P., Valentin, H. E., Shewmaker, C. K., Thorne G. M., Jiang, J., Basziz, S. R., Levering, C.K., Aasen, E. D. et al. (2002). Engineering vitamin E content: from *Arabidopsis* mutant to soy oil. *Plant Cell* 15, 3007-3019.
- Veilleux, R.E., Compton, M.E., & Saunders, J.A. (2005). Use of protoplasts for plant improvement. In: R.N. Trigiano & D.J. Gray (Eds.), *Plant development and biotechnology* (213-224). Boca Raton: CRC Press.
- Volkov, R. A., Panchuk, I. I., & Schöffl, F. (2005). Small heat shock proteins are differentially regulated during pollen development and following heat stress in tobacco. *Plant Mol. Biol.*, 57, 487-502.
- Von Arnim, A.G. (2005). Molecular approaches to the study of plant development. In: R.N. Trigiano & D.J. Gray (Eds.), *Plant development and biotechnology* (119-141). Boca Raton: CRC Press.
- Von Arnold, S. (2008). Somatic embryogenesis. In: E. F. George, M. A. Hall & G.-J. De Klerk (Eds.), *Plant propagation by tissue culture* (3rd ed). Vol. 1, Background (pp. 335-354). Dordrecht: Springer.
- Von Arnold, S., & Clapham, D. (2008). Spruce embryogenesis. In: M. F. Suárez & P. V. Bozhkov (Eds.), *Methods in molecular biology*, Vol 427, plant embryogenesis (pp. 31-47). Totowa: Humana Press.
- Von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J., & Filonova, L. (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tis. & Org. Cult.*, 69, 233-249.
- Walsh, G. (2007). *Pharmaceutical biotechnology – concepts and applications*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd.
- Watson, H.S., Myers, R. M., Caudy, A. A., & Witkowski, J. A. (2007). *Recombinant DNA. Genes and genomes – a short course* (3rd Ed.). New York: W. H. Freeman and Company and Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Wędzony, M., Forster, B. P., Żur, I., Golemic, E., Szechyńska-Hebda, M., Dubas, E., & Gotębiowska G. (2009). Progress in doubled haploid technology in higher plants. In: A. Touraev, B. P. Foster & S.M. Jain (Eds.), *Advances in haploid production in higher plants* (1-35). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Went, F. W. (1926). On growth accelerating substances in the coleoptiles of *Avena sativa*. *Proc. Kon. Neder. Akad. Wetensch*, 30:10.
- White, P. R. (1933). Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial nutrient. *Amer. J. Bot.*, 26, 59-64.
- White, P. R. (1939). Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. *Plant Physiol.*, 9, 585-600.

- Whitmer, S., van der Heijden R. & Verpoorte, R. (2002). Genetic engineering of the plant cell factory for secondary metabolite production: indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* as a model. In: K.-M. Oksman-Caldentey & W.H. Barz (Eds.), *Plant Biotechnology and Transgenic Plants* (373-403). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Williams, E. G., & Maheswaran, G. (1986). Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Ann. Bot.*, 57, 443-462.
- Wolyn, D.J., & Nichols, B. (2003). *Asparagus* microspore and anther culture. In: M. Malszynski, K. J. Kasha, B.P. Forster & I. Szaejko (Eds.), *Doubled haploid production in crop plants* (265-273). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Yang, X., & Zhang, X. (2010). Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 29, 36-57.
- Ye, X., Al-Babili, S., Klotti, A., Zhang, J., Lucca, P., Beyer, P. & Potrykus, I. (2000). Engineering provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science*, 287, 303-305.
- Yeung, E. C. (1995). Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. In: T.A. Thorpe (Ed.), *In vitro* embryogenesis in plants (pp. 205-247). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Z..B., Du, M. (2006). Hairy roots and its application in plant genetic engineering. *J. Int. Plant Biol.*, 48:121-127.
- Zale, T. (2008). Transgenic plant analysis. In: C. N. Stewart Jr. (Ed.), *Plant biotechnology and genetics – principles, techniques, and applications* (pp. 275-289). New Jersey: Wiley.
- Zhang, S., & Lemaux, P. G. (2005). Molecular aspects of *in vitro* shoot organogenesis. In: R. N. Trigiano & D. J. Gray (Eds.), *Plant Development and Biotechnology* (pp. 173-185). Boca Raton: CRC Press.
- Zhau, Y., He, X., Jinlian, W., & Liu, W. (1990). Anther culture 28 – a new disease-resistant and high-yielding variety of winter wheat. In: Y. P. S. Bajaj, (Ed.), *Biotechnology in agriculture and forestry*, Vol. 13, *Wheat* (pp. 353-362). Berlin: Springer-Verlag.
- Zhong, J.-J. & Yue, C.-J. (2005). Plant cells: secondary metabolite heterogeneity and its manipulation. *Adv. Biochem. Engin. & Biotechn.*, 100, 53-88.
- Zorn, H. & Berger, R. G. (2002). Flavors and fragrances from plants. In: K.-M. Oksman-Caldentey & W.H. Barz (Eds.), *Plant Biotechnology and Transgenic Plants* (pp. 323-346). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Zuzarte, M. (2007). *Lavandula pedunculata* (Miller) Cav.: estruturas secretoras, óleos essenciais e cultura *in vitro*. Coimbra: Universidade de Coimbra. Dissertação de Mestrado.
- Zuzarte, M., Gonçalves, M. J., Cavaleiro, C. A., Dinis, A. M., Canhoto, J. M., & Salgueiro, M. R. (2009). Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Lavandula pedunculata* (Miller) Cav. *Chem. & Biod.*, 6, 1283-1292.

(Página deixada propositadamente em branco)

ENDEREÇOS INTERNET

Na internet encontra-se uma quantidade apreciável de informação sobre assuntos relacionados com biotecnologia vegetal, em particular sobre plantas geneticamente modificadas. Uma parte considerável desse informação é puramente especulativa e sem grande fundamentação científica.

Os 30 locais que a seguir se apresentam foram seleccionados de acordo com algumas especificidades. Assim, decidiu-se incluir dois endereços de organizações ambientalistas, uma nacional e outra internacional. A ideia é dar a conhecer as posições destas organizações e os argumentos que apresentam contra a utilização de plantas geneticamente modificadas. Os locais internet de algumas empresas foram também incorporados. Trata-se de empresas do sector agroquímico que realizam grande parte da investigação que se faz nesta área. Endereços de associações científicas relacionadas com a cultura *in vitro* de plantas ou com a utilização de técnicas de engenharia genética foram também incorporados. Os endereços de instituições relacionadas com o controlo das plantas geneticamente modificadas estão igualmente disponibilizados. Seleccionaram-se os endereços das instituições americanas que fazem esse controlo, da instituição europeia e das instituições nacionais. Nesses locais pode ser encontrada a legislação que se aplica às plantas geneticamente modificadas. Os outros locais são de instituições que se dedicam à investigação ou à divulgação de assuntos relacionados com a biotecnologia vegetal. Muitos dos endereços têm ligações para outros locais de interesse.

- Agência Portuguesa do Ambiente – http://www.iambiente.pt/portal/page?_pageid=73,1&_dad=portal&_schema=PORTAL
Instituição que controla as PGMs em Portugal. Disponibiliza legislação sobre PGMs.
- American Society of Plant Biologists – <http://www.aspb.org/>
Associação científica americana que reúne cientistas interessados na Biologia das Plantas. Nas suas publicações periódicas e nos livros que edita a biotecnologia é um tema central.
- APBio – <http://www.apbio.pt/>
Associação Portuguesa de Bioindústrias que congrega os investidores e industriais do sector.
- Biocant – <http://www.biocant.pt/>
Parque tecnológico onde estão localizadas várias empresas do sector.
- Centro de Informação de Biotecnologia – <http://www.cibpt.org/>
Organização portuguesa dedicada à divulgação da biotecnologia. Possui um grande número de ligações para outras instituições dedicadas à biotecnologia e à utilização de PGMs.
- Direcção-Geral de Agricultura e do Desenvolvimento Rural – <http://www.dgadr.pt/>
Nesta Direcção-Geral do Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas pode encontrar-se informação sobre legislação relacionada com as PGMs.
- EFSA – <http://www.efsa.europa.eu/>
European Food Safety Authority. Agência europeia responsável pelo controlo dos alimentos.
- EPA – <http://www.epa.gov/>
Environmental Protection Agency. Agência americana envolvida em assuntos relacionados com o ambiente. Participa também no controlo da decisão sobre a libertação de PGMs.
- Encyclopedia of Life Sciences – <http://www.els.net/>
Enciclopédia disponível online onde se podem encontrar muitos artigos relacionados com a engenharia genética e com os mais diversificados temas na área da biologia.
- Europabio – <http://www.europabio.org/>
Associação Europeia de Bioindústrias. Criada em 1996 defende os interesses das indústrias biotecnológicas na Europa. Reúne associações de vários países europeus, Portugal incluído.
- FAO – <http://www.fao.org/biotech/>
Organização das Nações Unidas dedicada aos problemas da agricultura e alimentação. Uma parte do site é dedicada exclusivamente à biotecnologia.
- FDA – *Food and Drug Administration*
Agência Americana envolvida no controlo dos medicamentos e alimentos. É outra das agências americanas envolvida no controlo das PGMs.
- Florigene – <http://www.florigene.com/>
Empresa que utiliza a engenharia genética para alterar os padrões de coloração em plantas ornamentais.
- Glossário – <http://www.fao.org/DOCREP/004/Y2775E/Y2775E00.HTM#Contents>
Glossário da FAO sobre biotecnologia.
- Greenpeace – <http://www.greenpeace.org/international/>
Organização ambientalista internacional que se opõe à utilização de PGMs.
- Hormonas vegetais – <http://www.plant-hormones.info/>
Informação sobre as características dos diferentes tipos de hormonas vegetais.

- IRRI – <http://beta.irri.org>
International Rice Research Institute (Filipinas). Dedicado ao estudo do arroz com incidência particular no melhoramento genético
- ISAAA – <http://www.isaaa.org/>
International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications. Organização sem fins lucrativos dedicada à divulgação de informação relacionada com as PGMs. Disponibiliza dados sobre as áreas de cultura e comercialização.
- Molecular-Plant-Biotechnology-info – <http://www.molecular-plant-biotechnology.info/>
 Recursos disponíveis online sobre biotecnologia e biologia molecular.
- Monsanto – <http://www.monsanto.com/>
 Grande companhia americana do sector agrícola. Investiga, produz e comercializa plantas geneticamente modificadas.
- NCBE – <http://www.ncbe.reading.ac.uk/>
National Center for Biotechnology Education. Organização da Universidade de Reading com o objectivo de divulgar a biotecnologia.
- NCBI – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
National Center for Biotechnology Information. Organização que disponibiliza informação sobre a genómica de diferentes organismos. Neste local encontram-se várias bases de dados relacionados com investigação médica e biotecnológica.
- Pioneer – <http://www.pioneer.com/web/site/portal/>
 Grande companhia líder em investigação no sector agrícola. Investiga, produz e comercializa plantas geneticamente modificadas.
- Projecto Golden Rice – <http://www.goldenrice.org/>
 Trata-se de um projecto internacional resultante de uma iniciativa da Fundação Rockefeller (USA) que tem como objectivo a modificação genética dos alimentos com objectivos humanitários.
- Public Understanding of Biotechnology – <http://www.pub.ac.za/index.php>
 Iniciativa do Departamento de Ciência e Tecnologia da República Sul Africana com o objectivo de esclarecer a população sobre os processos biotecnológicos.
- SIV – <http://www.sivb.org/>
Society for In Vitro Biology. Sociedade internacional que reúne cientistas interessados em técnicas de cultura *in vitro* de animais ou plantas.
- SPBT – <http://www.spbt.pt>
 Sociedade Portuguesa de Biotecnologia. Sociedade científica que congrega cientistas e outros interessados nesta área.
- Syngenta – <http://www.syngentafoundation.org/>
 Grande companhia líder em investigação no sector agrícola. Investiga, produz e comercializa plantas geneticamente modificadas.
- Transgénicos Fora – <http://stopogm.net/>
 Segundo os próprios, movimento orientado para a defesa de uma agricultura sustentável de acordo com os valores da biodiversidade. Destaca-se pelo seu combate à utilização de PGMs.
- USDA – <http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome>
 Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. Possui uma agência envolvida no controlo de PGMs.

(Página deixada propositadamente em branco)

(Página deixada propositadamente em branco)

Série

Ensino

•

Imprensa da Universidade de Coimbra

Coimbra University Press

2010

