



TRANSFORMAÇÃO DE CLOROPLASTOS

Helaine Carrer

Pesquisadora do Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC)
Professora doutora do Departamento de Química, ESALQ/USP

QUAIS AS VANTAGENS EM SE MODIFICAR ESTA ORGANELA?

Foto cedida pelos autores.

Cloroplastos são organelas intracelulares presentes em algas e plantas, responsáveis pelo processo fotossintético, desde a captação da energia luminosa até a formação de compostos orgânicos, participando também da assimilação do nitrogênio, na síntese e armazenamento de amido e na biossíntese de aminoácidos e lipídios. A estrutura desse centro fotossintetizador está representada na figura 1, onde se pode observar a presença da membrana dupla, a qual é característica da organela que se originou através do processo endossimbiótico de integração de uma

divisão celular, quando somente um nucleóide é transferido para a célula-filha. O DNA é encontrado em três compartimentos numa célula: no núcleo, nos cloroplastos e na mitocôndria. O núcleo é o local mais comum para estudos de engenharia genética de plantas com o objetivo de introduzir características agrônômicas desejáveis. Modificação no genoma de cloroplasto já é uma realidade enquanto que a mitocôndria de plantas permanece sem uma tecnologia de transformação. Entretanto, modificações genéticas nas mitocôndrias da alga *Chlamydomonas* e da levedura *S.*

seqüenciado por Sugiura et al. em 1986 (EMBO J. 5: 2043-2049). Atualmente esse genoma também foi seqüenciado em outras espécies vegetais: arroz, milho, *Arabidopsis*, *Pinus* e as algas fotossintetizantes *Chlamydomonas* e *Euglena*. O seqüenciamento do genoma tem importância fundamental para o conhecimento dos genes que participam dos caminhos metabólicos, no estudo da interação dos genes nucleares que se expressam nos cloroplastos e apresenta fundamentos para análise do sistema evolutivo da organela nos vegetais. Em plantas superiores, como o tabaco, o



Figura 1: Estrutura do cloroplasto.



Figura 2: Genoma do cloroplasto de tabaco com aproximadamente 120 genes.



Figura 3: Protocolo de transformação de cloroplasto utilizando biolística.

cianobactéria em uma célula eucarionte, dando origem ao cloroplasto (Gray, 1993. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3: 884-890). Há também membranas dos tilacóides e grana, e regiões denominadas nucleóides que se localizam no estroma e onde se encontram as cópias do genoma do cloroplasto (ptDNA). Esta região não é delimitada por uma membrana, existindo a presença de proteínas que mantêm algumas cópias do genoma agregadas. De certa forma, a presença de cópias do genoma nos nucleóides facilita o processo de transformação do cloroplasto durante a desdiferenciação celular na

cerevisiae já foram obtidas, acreditando-se que num futuro próximo, esta organela também será alvo de transformação genética em plantas superiores.

Estrutura do genoma de cloroplastos

O genoma do cloroplasto é circular, o tamanho varia entre 120 a 180kb, apresentando uma região duplicada com orientação invertida na maioria das espécies vegetais. A figura 2 mostra o genoma de cloroplasto de tabaco (*Nicotiana tabacum*), o qual possui 155.884 pares de bases e foi totalmente

genoma codifica em torno de 120 genes, um número pequeno quando comparado com o genoma da cianobactéria. Existem pelo menos de 500 a 1.000 genes nucleares que se expressam nos cloroplastos após síntese pré-protéica nos ribossomos do citoplasma. Dos genes codificados no plastídio, em torno de 50 estão envolvidos na transcrição dos genes plastidiais como: rRNA, tRNAs, genes de proteínas ribossomais e gene da RNA polimerase. Os genes relacionados com o metabolismo vegetal são aproximadamente 40 e formam complexos com genes nucleares, codificando compo-

nentes do sistema fotossintético, os quais compreendem os genes da enzima Rubisco (ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxidase), que é a principal proteína do cloroplasto; genes participantes do complexo do fotossistema I e II; do citocromo b/f e da enzima ATP sintase e NADH desidrogenase. Nas dicotiledôneas, o gene *accD* codifica uma subunidade da acetil-CoA carboxilase, enzima participante da biossíntese de lipídios, porém não está presente nas monocotiledôneas seqüenciadas até o momento. Este genoma também possui genes que codificam tRNA envolvidos na biossíntese de clorofilas, processo metabólico específico para cloroplastos e cianobactérias. Além destes genes com funções conhecidas, existem seqüências de quadros de leitura (ORFs) com potencial para serem genes cujas funções ainda não foram identificadas. Embora as cópias do

organela. O sucesso obtido com a transformação de cloroplastos exigiu: 1) desenvolvimento de um método de introdução dos transgenes (DNA transformante) através da membrana dupla do cloroplasto; 2) disponibilidade de genes marcadores seletivos com expressão na organela e 3) eficiente escolha do local de integração do transgene para não interferir com a função normal dos genes no genoma. Essa transformação foi obtida primeiramente em *Chlamydomonas reinhardtii*, uma alga unicelular, por Boyton et al., 1988 (Science 240: 1534-1538), e em plantas superiores a transformação foi obtida em tabaco (*Nicotiana tabacum*) por Svab et al. 1990 (PNAS 87: 8526-8530). Sistema de liberação do transgene no cloroplasto: Através do sistema de biolística (biologia + balística) desenvolvido por Klein et al., 1987 (Nature 327: 70-73) foi possível introduzir transgenes no interior dos

bombardeadas, as células são mantidas em meio de crescimento sem agente seletivo por dois dias para restabelecimento da divisão celular, sendo em seguida cortadas em pequenos segmentos e transferidas para meio de cultura contendo o agente seletivo. Após 5 a 6 semanas observam-se as brotações de novas plantas regeneradas a partir de uma única célula que possivelmente recebeu o transgene no cloroplasto. Esta planta é colocada em meio de enraizamento e analisada através de técnicas de biologia celular, como PCR (Polymerase Chain Reaction) ou análise de Southern para verificar a integração do transgene no genoma do cloroplasto. Para que as plantas transformadas sejam geneticamente estáveis, é necessário que todas as cópias do genoma sejam uniformemente transformadas. Uma planta primária (primeira brotação) em geral encontra-se na fase heteroplásmica, quan-

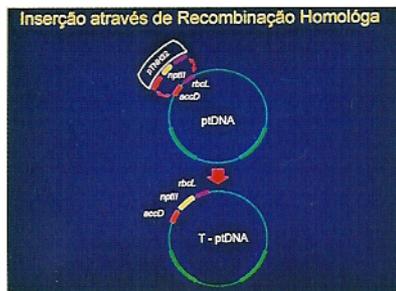


Figura 4: Integração do transgene em cloroplasto ocorre através de recombinação homóloga.

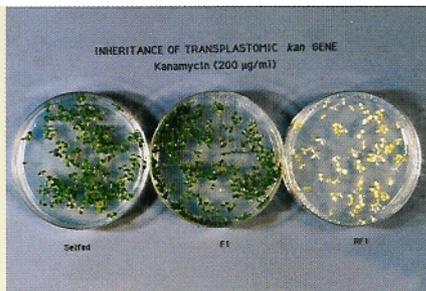


Figura 5: Sementes de tabaco de plantas transgênicas (transplastômicas) em meio seletivo com antibiótico canamicina demonstrando herança materna do cloroplasto na progênie. Self (autopolinizada); F1: planta transgênica (♀) e planta-controle (♂); RF1: planta-controle (♀) e planta transgênica (♂).



Figura 6: Folhas de tabaco-controle (*Nt*) e transgênicas (*Nt-pZS224-5*) expressando alta concentração da toxina do *Bacillus thuringiensis*, mostrando o efeito tóxico contra insetos.

genoma sejam idênticas dentro de uma espécie, o número de cloroplastos e do ptDNA é dependente do tipo de célula vegetal. Nas células meristemáticas encontra-se a forma indiferenciada chamada proplastídio, em número de 10 a 15, possuindo no máximo 50 cópias do ptDNA. Por sua vez, a célula foliar possui os proplastídios diferenciados em cloroplastos, os quais são fotossinteticamente ativos encontrados em número de aproximadamente 100, sendo que há em média 100 cópias do ptDNA, determina-se um total de aproximadamente 10.000 cópias do genoma por célula (Maliga et al. 1993. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 341, 449-454).

Transformação de cloroplastos

Através do desenvolvimento da tecnologia de manipulação de genes de cloroplastos in vivo criou-se uma nova ferramenta para estudar os aspectos da biologia celular e molecular desta

cloroplastos. Outro método que demonstrou resultados positivos foi descrito por Golds et al., 1994 (Biotechnology 11: 95-97) e O'Neill et al., 1993 (Plant J. 3: 729-738), utilizando tratamento com PEG (polietileno glicol), mas a eficiência de transformação é menor comparando-se com o método de biolística. A utilização de *Agrobacterium* vem sendo objeto de estudo em muitos laboratórios sem resultado satisfatório até o momento. O protocolo de transformação de cloroplasto de tabaco está apresentado na figura 3. A metodologia consiste em introduzir o transgene no interior dos cloroplastos através de biolística. Cópias do transgene ficam aderidas às partículas de ouro ou tungstênio de aproximadamente 1mm em tamanho, elas são aceleradas pelo gás de hélio em alta pressão em câmara de vácuo, são introduzidas no cloroplasto onde liberam o DNA. Inicialmente, somente uma ou poucas cópias do genoma são alteradas entre as 10.000 cópias presentes nas células do mesófilo foliar. Após serem

do as cópias do ptDNA não se apresentam uniformemente modificadas. Para que se torne uma planta transgênica homoplásmica, a qual possui todas as cópias do ptDNA uniformemente transformadas, são necessárias 3 a 4 subculturas transferindo pequenas seções da folha da planta primária em meio seletivo. Durante a subcultura, as células que não possuem os transgenes não se dividem, e se tornam cloróticas. As que possuem o transgene se dividem e voltam ao estado desdiferenciado, o qual possui somente um nucleóide com 2 a 10 ptDNA. A partir do sistema de recombinação obtém-se a uniformidade das cópias do ptDNAs, monitorando-se através de PCR. Seleção dos transformantes: O primeiro gene marcador seletivo expresso em cloroplasto de *Chlamydomonas* e tabaco foi um gene plastidial alelo ribossomal mutante do gene 16S rRNA. Mutações de algumas bases na seqüência desse gene resultam na resistência a inibidores da síntese de proteína de procariotos, como

os antibióticos espectinomina, estreptomicina e lincomicina. Entretanto, a frequência de transformação de cloroplastos utilizando este gene marcador seletivo foi muito baixa, em média entre 0.5 a 2 transformantes para cada 100 bombardeamentos (Svab e Maliga, 1991. *Mol. Gen. Gen.* 228: 316-319; Staub e Maliga, 1993. *EMBO J.* 12: 601-606). Existe sempre a necessidade de identificação de genes marcadores seletivos para facilitar a introdução dos transgenes com alta eficiência de seleção. Os genes bacterianos: *aadA* (Svab e Maliga, 1993. *PNAS* 90: 913-917) e *nptII* (Carrer et al., 1993. *Mol Gen Gen* 241: 49-56) conferem resistência aos antibióticos espectinomina e canamicina, respectivamente. Estes genes utilizados como marcadores seletivos apresentaram melhores resultados na eficiência de transformação, em torno de 2 a 10 transformantes por bombardeamento, sendo que o gene *nptII* apresentou menor frequência de transformação e também expressão nuclear. O gene de planta que confere resistência aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS) foi testado para utilização como marcador seletivo (Carrer e Maliga, resultados não publicados). Recombinação homóloga: A integração de um transgene no genoma de cloroplasto ocorre através de recombinação homóloga, como demonstrado na figura 4. Para tanto, na construção de um vetor de transformação, seqüências do ptDNA devem flanquear o gene de interesse, indo desta forma o transgene para o local de inserção no genoma. Quando o local de inserção é a região duplicada invertida do cloroplasto, existe a necessidade de "correção" da segunda cópia, podendo, então, ocorrer a correção para a forma original ou transformada. O transgene é expresso no cloroplasto sob controle de um promotor procariótico, o qual possui os sinais de expressão na organela.

Aplicações da tecnologia de transformação

Até o momento, o tabaco tem sido a única planta superior a ter o cloroplasto transformado, sendo utilizada como planta-modelo. Existe várias vantagens em se expressar os transgenes nessa organela do que no genoma nuclear. Herança materna: Análise de plantas variegadas revelou que os cloroplastos não apresentam segregação mendeliana, apresentando herança maternal dos genes devido ao fato de não serem transmitidos pelo pólen. Isto é observado na maioria das espécies de plantas cultiva-

das, como milho, arroz, trigo, algodão, feijão e outras. A figura 5 mostra sementes de tabaco de plantas transgênicas (transplastômicas) contendo o gene *nptII* germinadas em meio de seleção em presença de canamicina (200mg/ml). As sementes de planta autopolinizada (Self) e de F1, planta transgênica (feminino) fertilizada pelo pólen da planta-controle (masculino), apresentam-se todas resistentes à canamicina, enquanto as sementes providas de retrocruzamento (RF), em que a planta-controle (feminino) é fertilizada pelo pólen da planta transformada (masculino), apresentavam-se totalmente sensíveis ao antibiótico. Utilizando esta característica, quando um gene de resistência a herbicida, por exemplo, for introduzido no cloroplasto de uma planta de interesse comercial, pode-se garantir que não vai ocorrer disseminação deste gene de resistência para as espécies relacionadas no campo. Tem-se, assim, a possibilidade de controle da disseminação de transgenes no ambiente. Alta expressão de proteínas: Sendo o sistema genético de cloroplastos altamente poliplóide, os transgenes são amplificados para um grande número de cópias. A introdução do transgene sob corretos sinais de controle da tradução leva a proteína a ser expressa em alta concentração. Este potencial de alta expressão de proteína em cloroplastos foi demonstrado por McBride et al., 1995 (*Biotechnology* 13: 362-365). Os autores introduziram um gene modificado do *Bacillus thuringiensis* em cloroplastos via biolística e verificaram o acúmulo da protoxina com ação inseticida ao nível de 3 a 5% da proteína solúvel total. Tal nível de expressão não poderia ser conseguido utilizando-se o mesmo gene no núcleo. A figura 6 apresenta o resultado do efeito tóxico da protoxina nas folhas de tabaco transformadas para as larvas do inseto *Spodoptera exigua*. Efeito de local de integração do gene: Na transformação nuclear um mesmo transgene poderá apresentar diferentes níveis de expressão, dependendo do local de integração no genoma. Em contraste, a integração do transgene no genoma de cloroplasto ocorre em local específico, produzindo somente um único evento de integração, devido à transformação no cloroplasto ocorrer através de recombinação homóloga. Desta forma, fica eliminada a necessidade de se caracterizar um grande número de plantas transformadas independentemente. Utilizando esta particularidade, genes de cloroplastos podem ser trocados pelo mesmo gene mutado *in vitro* para estudo da função destes genes. O gene *ycf3*

(hypothetical chloroplast reading frame N°3) está relacionado ao fotossistema I, o que auxiliou nas elucidações de questões fundamentais da biologia de cloroplastos, incluindo também os mecanismos de regulação dos genes (Ruf et al., 1997, *J. Cell Biol* 139, 95-102). Ausência de co-supressão: Integração de várias cópias de um gene ou de um segmento do gene pode resultar em co-supressão, termo que se refere à inativação não-intencional do gene nuclear, devido à interferência entre os transgenes ou entre um transgene e um gene nativo. Como o sistema genético dos cloroplastos é naturalmente poliplóide, ocorre a falta de um mecanismo de inativação do gene. Integração de transgene sem marcador seletivo: Através de cotransformação foi estudada a integração de dois transgenes independentes sem haver seleção para um deles. Através da análise de Southern foi observada a presença do gene sem seleção em aproximadamente 20% dos eventos de transformação (Carrer e Maliga, 1995. *Biotechnology* 13: 791-794). Alta taxa de cotransformação demonstra a facilidade em integrar mais de um gene no ptDNA, não havendo a necessidade de estarem fisicamente ligados a um gene marcador seletivo. Estes resultados apontam para uma metodologia importante na manipulação de genes fotossintéticos, na qual o marcador seletivo poderia influenciar no funcionamento dos genes. Apesar de a tecnologia de transformação de cloroplastos ter apresentado resultados reprodutivos em plantas de tabaco, acreditamos ser de total importância a transferência desta tecnologia para outras espécies cultivadas. Isto vem sendo objetivo de estudo em vários laboratórios de pesquisa de universidades e empresas privadas como Monsanto e outras. O nosso laboratório mantém colaboração com o Dr. Pal Maliga, Waksman Institute, Rutgers University, EUA e Dr. Ralph Bock, University of Freiburg, Alemanha.

