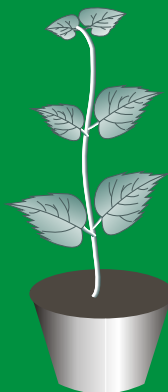
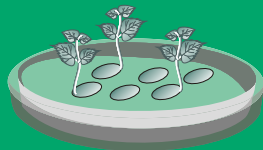
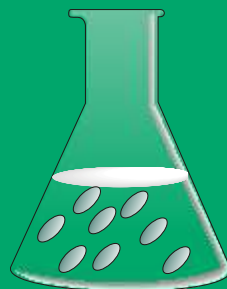
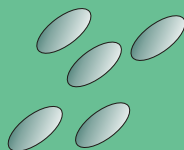
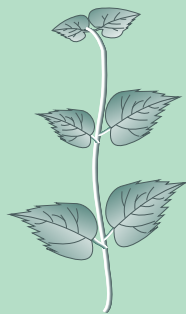


Transformação de Plantas





*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Cerrados
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

ISSN 1517-5111

Dezembro, 2003

Documentos 102

Transformação de Plantas

Solange Rocha Monteiro de Andrade

Planaltina, DF
2003

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Cerrados

BR 020, Km 18, Rod. Brasília/Fortaleza

Caixa Postal 08223

CEP 73310-970 Planaltina - DF

Fone: (61) 388-9898

Fax: (61) 388-9879

http\www.cpac.embrapa.br

sac@cpac.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Dimas Vital Siqueira Resck*

Editor Técnico: *Carlos Roberto Spehar*

Secretária-Executiva: *Nilda Maria da Cunha Sette*

Supervisão editorial: *Jaime Arbués Carneiro*

Revisão de texto: *Jaime Arbués Carneiro*

Maria Helena Gonçalves Teixeira

Normalização bibliográfica: *Shirley da Luz Soares*

Editoração eletrônica: *Jussara Flores de Oliveira*

Ilustrações: *Chaile Cherne Soares Evangelista*

Capa: *Chaile Cherne Soares Evangelista*

Editoração eletrônica: *Jussara Flores de Oliveira*

Wellington Cavalcanti

Impressão e acabamento: *Divino Batista de Souza*

Jaime Arbués Carneiro

Impresso no Serviço Gráfico da Embrapa Cerrados

1ª edição

1ª impressão (2003): tiragem 100 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

CIP-Brasil. Catalogação na publicação.

Embrapa Cerrados.

A553t Andrade, Solange Rocha Monteiro de.

Transformação de plantas / Solange Rocha Monteiro de Castro.

– Planaltina, DF : Embrapa Cerrados, 2003.

28 p.— (Documentos / Embrapa Cerrados, ISSN 1517-5111; 102)

1. Melhoramento vegetal. 2. Transformação de plantas.
3. Transformação genética. I. Título. II. Série.

631.5233 - CDD 21

© Embrapa 2003

Autora

Solange Rocha Monteiro de Andrade

Biól., Doutora em Genética e Melhoramento de Plantas

Embrapa Cerrados

solange@cpac.embrapa.br

Apresentação

A transformação de plantas é uma ferramenta com alto potencial para aplicação no melhoramento vegetal e em outras áreas, como na medicina e na nutraceutica. Os métodos de transformação permitem a obtenção de cultivares com novas características, nem sempre possíveis de serem alcançadas por métodos convencionais.

Alguns exemplos de cultivares com essas características são o milho e o algodão Bt, resistentes aos insetos; a soja RR, tolerante ao herbicida glifosato; o arroz dourado, com maior conteúdo de β -caroteno, visando diminuir a deficiência de vitamina A. Todos esses materiais já estão disponíveis aos produtores. Entretanto, as pesquisas continuam e novos transgênicos estão sendo desenvolvidos contendo outras características como melhoria da qualidade nutricional e produção de biofármacos.

A polêmica a respeito das plantas transgênicas ocorre, principalmente, devido ao desconhecimento da população sobre o assunto. A publicação de documentos relativos a transgênicos evidenciando os métodos e suas aplicações é fundamental para informar a população e diminuir essa polêmica. A Embrapa, com a publicação dos livros *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*, tem ajudado nesse sentido. No entanto, ainda existe a necessidade de publicações de caráter mais básico, visando atingir o público leigo, mas curioso sobre o assunto.

Esta publicação teve como objetivo apresentar os conceitos básicos da transformação de plantas, explicando cada um deles de forma clara e concisa, além de descrever cada etapa do processo, sua aplicação e a utilização de transgênicos no mundo.

Roberto Teixeira Alves

Chefe-Geral da Embrapa Cerrados

Sumário

Introdução	9
Etapas da Transformação	10
Identificação, clonagem e isolamento do gene	10
Métodos de Transformação	13
Transformação indireta	13
Transformação via <i>Agrobacterium</i>	13
Transformação direta	16
Biolística	16
Eletroporação	19
Outras metodologias	20
Microinjeção	20
Transformação de Pólen	21
Lipossomos	21
Histórico da Comercialização de Transgênicos no Mundo	21
Aspectos Futuros	23
Referências Bibliográficas	23
Abstract	28

Transformação de Plantas

Solange Rocha Monteiro de Andrade

Introdução

Durante séculos o homem, por meio de cruzamentos intra-específicos, vem manipulando geneticamente plantas para obter cultivares com características superiores aos genitores. No entanto, os métodos convencionais de melhoramento apresentam limitações como a ligação gênica, a incompatibilidade sexual, além de longos períodos de seleção para a obtenção da expressão da característica desejada. O desenvolvimento de métodos de transformação gerou possibilidades de grandes avanços no melhoramento vegetal, pois, oferece a oportunidade de introduzir genes de origem vegetal, animal ou microrganismo em cultivares elites, quebrando barreiras interespecíficas impossíveis no método convencional, diminuindo o efeito das ligações gênicas e o tempo de obtenção de novas cultivares.

A transformação genética é a transferência controlada de genes para o genoma de um organismo vivo por via não sexual ([TORRES et al., 2000](#)). Pode-se definir plantas transgênicas como aquelas que apresentam genes diferentes do genoma original obtidos por técnicas de engenharia genética ([GANDER; MARCELLINO, 1997](#); [TORRES et al., 2000](#)). A obtenção de plantas transgênicas abre novo caminho a ser explorado no melhoramento vegetal e também permite estudos de desenvolvimento e crescimento vegetal, metabolismo, bioquímica, regulação e expressão de genes. As plantas

transgênicas podem ser utilizadas para extração de produtos medicinais, vacinas transgênicas e produção de anticorpos e metabólitos de interesse específico ([BRASILEIRO; DUSI, 1999](#)).

As etapas de transformação consistem na identificação do gene de interesse, seu isolamento e clonagem, introdução em células ou tecidos vegetais, seleção *in vitro* de células transformadas, regeneração de plantas transgênicas, análises moleculares, avaliação em casa de vegetação e campo ([Figura 1](#)). Embora a manipulação do DNA abra diversas frentes para o melhoramento, vários fatores podem afetar o sucesso da obtenção das plantas transformadas, como: a integração do DNA no genoma hospedeiro, a expressão, a herança e a estabilidade desse DNA exógeno; problemas de regeneração do explante; disponibilidade de genes de interesse e aspectos relacionados à biossegurança ([BRASILEIRO; DUSI, 1999](#)).

Existem diversos métodos de transformação, porém, a escolha depende da espécie a ser transformada, do tipo de explante utilizado (célula, tecido, protoplastos), da capacidade de regeneração do explante, da disponibilidade de materiais. Entre os principais métodos estão:

- 1) transformação mediada por *Agrobacterium*;
- 2) biolística;
- 3) eletroporação.

Etapas da Transformação

Identificação, clonagem e isolamento do gene

A identificação e a localização de genes de interesse na agricultura são um dos entraves para a obtenção de transgênicos. Programas de seqüenciamento de genomas de diversas espécies vegetais, animais e microrganismos têm sido realizados em todo o mundo com o intuito de identificá-los. No entanto, ainda é pequeno o conhecimento dos genes relacionados ao aumento de produtividade, resistência a estresses bióticos e abióticos, qualidade nutricional e outras características de interesse.

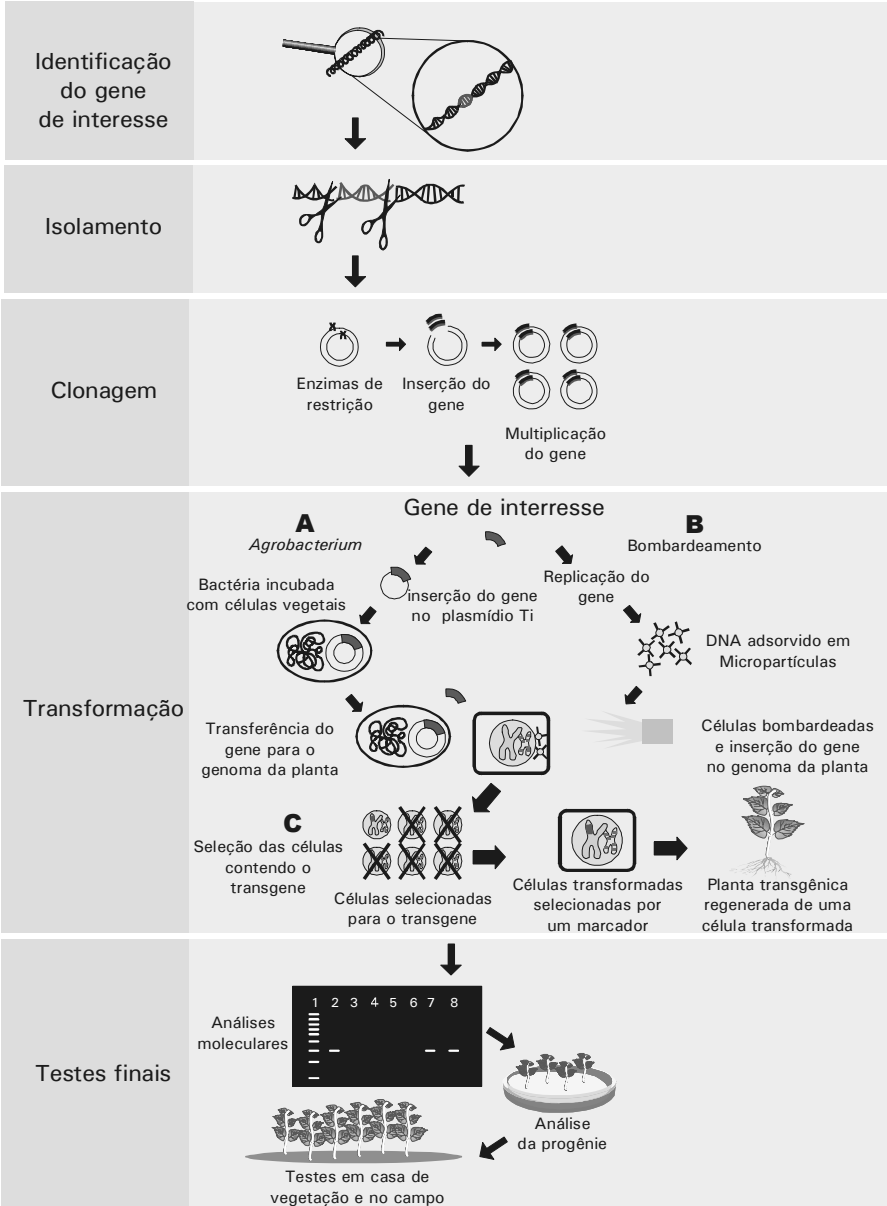


Figura 1. Etapas da transformação: Identificação dos genes, isolamento, clonagem, transformação genética e avaliação da transformação.

Nesta primeira etapa (Figura 2) que precede à clonagem (amplificação em bactérias vetores), é necessária uma série de modificações do gene antes que seja utilizado por um método de transformação. Nesse processo, empregam-se técnicas de engenharia genética nas quais enzimas de restrições e DNA ligases são amplamente empregadas como ferramentas para manipular o DNA. Essas enzimas são capazes de cortar o DNA de diferentes origens e, por meio da união dos fragmentos resultantes gerar moléculas novas, denominadas de DNA recombinante. Existe uma especificidade das enzimas de restrição, pois o DNA sempre é cortado em locais precisos (em determinada seqüência de bases), e reconhece o sítio de corte do DNA em qualquer espécie, tanto vírus, quanto plantas ou animais ([GANDER; MARCELLINO, 1997](#); [DELU FILHO et al., 1999](#)).

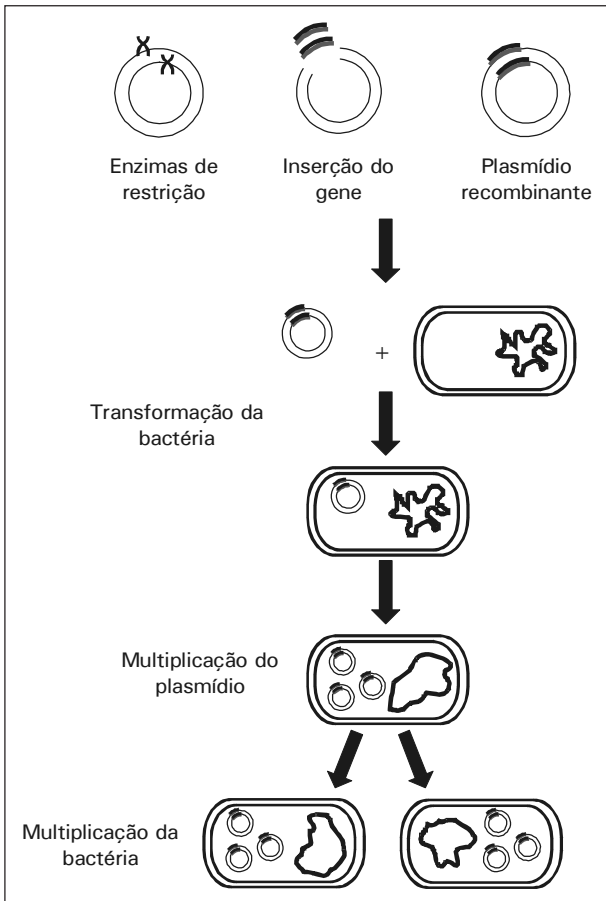


Figura 2. Isolamento e clonagem do gene.

Geralmente, o gene assim obtido contém uma seqüência promotora – o gene de interesse – uma seqüência terminadora e um gene marcador de seleção (Figura 3). A seqüência promotora é necessária para a correta expressão do gene, pois as enzimas responsáveis pela transcrição do gene reconhecem essa região e se acoplam a ela para que ocorra o processo. A seqüência terminadora é importante para finalizar o processo de transcrição do gene. E, para seleção das células transformadas, é preciso um marcador de seleção, em geral, um gene de resistência a antibióticos ou a herbicidas.

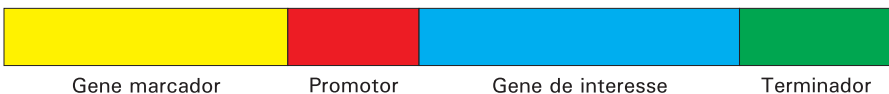


Figura 3. Esquema da construção de um gene para transformação genética.

Métodos de Transformação

Transformação indireta

A transformação indireta consiste no uso de um vetor, como a *Agrobacterium*, para intermediar a transferência de DNA.

Transformação via Agrobacterium

As bactérias do gênero *Agrobacterium* são fitopatógenos com a capacidade natural de transferir DNA para algumas espécies de dicotiledôneas, induzindo a formação de um tumor conhecido como galha-da-coroa (crown gall) ou a síndrome da raiz em cabeleira (hairy root). Para haver a infecção é necessário algum tipo de ferimento, por meio do qual a agrobactéria vai reconhecer a planta e iniciar a transferência do DNA. Fitopatologistas descobriram que, mesmo depois da desinfecção das plantas, os sintomas permaneciam, sugerindo a presença de um fator determinante nas plantas infectadas. Mais tarde, esse fator foi identificado como um fragmento do DNA oriundo da agrobactéria, denominado T-DNA ou DNA de transferência. Esse fragmento era integrado ao genoma vegetal e se expressava de maneira estável. Assim, foi descoberto e, por meio de manipulação genética, desenvolvido o primeiro método de transformação ([Figura 4](#)) ([CHILTON et al., 1977, 1982](#); [HERRERA-ESTRELLA et al., 1993](#); [WHITE, 1993](#); [BRASILEIRO, 1993](#); [VAN SLUYS, 1999](#)).

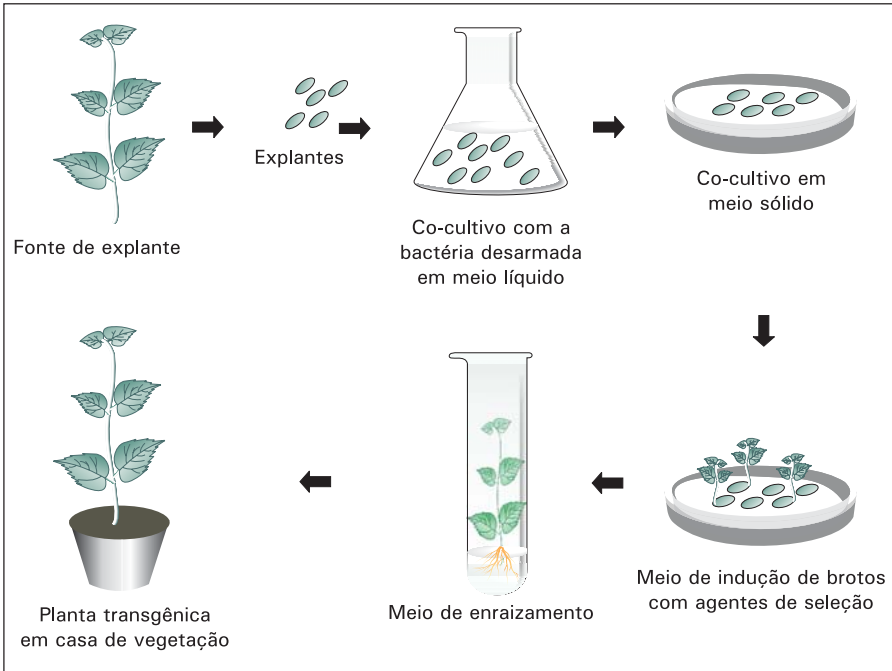


Figura 4. Transformação por *Agrobacterium*.

Adaptado de Aragão et al. (1998).

Plasmídios bacterianos são seqüências de DNA de fita dupla, com formato circular, que apresentam duplicação autônoma e carregam alguns genes.

O T-DNA faz parte do DNA plasmidial da agrobactéria e, por meio da engenharia genética, foi possível sua manipulação para a integração de genes de interesse.

Essa manipulação consiste, basicamente, na deleção dos genes oncogênicos (que causam o tumor) do T-DNA e a manutenção dos genes relacionados à transferência e à replicação do plasmídio, isto é, a região *vir* e as extremidades do T-DNA. Com isso, produzem-se linhagens desarmadas, ou seja, ainda virulentas, mas não mais patogênicas. Assim, genes de interesse podem ser introduzidos dentro da planta através de ligação com a região desarmada do T-DNA em substituição à região T-DNA original (CHILTON et al., 1977, 1982; WALDEN et al., 1990; HOOYKAAS; BEIJERBERGEN, 1994; ZUPAN; ZAMBRYSKI, 1995).

Com isso, produzem-se linhagens desarmadas, ou seja, ainda virulentas, mas não mais patogênicas. Assim, genes de interesse podem ser introduzidos dentro da planta através de ligação com a região desarmada do T-DNA em substituição à região T-DNA original (CHILTON et al., 1977, 1982; WALDEN et al., 1990; HOOYKAAS; BEIJERBERGEN, 1994; ZUPAN; ZAMBRYSKI, 1995).

As bactérias da espécie *Agrobacterium tumefaciens* apresentam o plasmídio tipo T_i (tumor-inducing) e as da espécie *Agrobacterium rhizogenes*, o plasmídio R_i (root-inducing). Tanto o plasmídio T_i (pT_i) quanto o R_i (pR_i) podem ser

integrados ao genoma da planta, sendo o sistema pT_i o mais conhecido e efetivo, pois abrange maior número de espécies hospedeiras ([BRASILEIRO, 1993](#); [GANDER; MARCELLINO, 1997](#); [VAN SLUYS, 1999](#)).

Embora aparentemente simples, essa técnica possui algumas limitações. A principal refere-se ao tipo de hospedeiro. A *Agrobacterium* pode colonizar amplo espectro de espécies de dicotiledôneas, porém, coloniza poucas espécies de monocotiledôneas. Mesmo entre as dicotiledôneas, a susceptibilidade difere muito entre as espécies e dentro delas, variando em função da interação com o hospedeiro. A razão dessa limitação não é bem conhecida, mas pode ser devida à ausência de sítios de reconhecimento para a bactéria na superfície da planta ou inibição da indução dos genes de transferência (genes *vir*), ou ao efeito inibitório do balanço hormonal de auxinas e citocininas das monocotiledôneas ([GRANT et al., 1993](#)). Portanto, uma etapa inicial importante para obtenção de transformantes por meio de *Agrobacterium* é a determinação da melhor combinação patógeno-hospedeiro para determinada espécie ([DRAPER et al., 1988](#); [LACORTE; MANSUR, 1993](#)).

Estudos mais recentes relatam a susceptibilidade de espécies consideradas recalcitrantes à *Agrobacterium*, como: o milho, o arroz e o feijoeiro ([BRASILEIRO; LACORTE, 1998](#)). Segundo [Trick e Finer \(1997\)](#), tanto a bactéria quanto o tecido-alvo podem ser manipulados para obter a transformação dessas plantas. Modificações no vetor binário da *Agrobacterium* capacitaram a transformação eficiente do arroz e do milho. A adição de antioxidantes no meio de co-cultivo aumentou as taxas de transformação pela redução da resposta hipersensível, assim como, diferentes métodos de ferimento do tecido-alvo também têm sido empregados para aumentar a infecção por *Agrobacterium* ([GODWIN et al., 1992](#); [SONGSTAD et al., 1995](#)).

Havendo interesse em ajustar a interação entre *Agrobacterium* e um hospedeiro no qual não existem descrições prévias de transferência do T-DNA, deve-se levar em consideração os seguintes fatores: a) cepa da bactéria; b) genótipo do hospedeiro e fisiologia do explante; c) condições de co-cultivo; d) marcadores de seleção utilizados. Parâmetros-chave para a transferência por *Agrobacterium* incluem o genótipo da bactéria e da planta; tratamento com indutores dos genes *vir* (acetoceringona, extrato de células feridas, células alimentadoras, açúcares), pH, temperatura, concentração das células, condições de luminosidade, duração do tempo de co-cultivo, tipo de explante, qualidade da pré-cultura, tratamento com fito-hormônios ([GODWIN et al., 1992](#); [GRANT et al., 1993](#); [BIRCH, 1997](#)).

Outro ponto limitante da técnica é a capacidade de regeneração do tecido transformado. A eficiência da transferência via *Agrobacterium* varia drasticamente para diferentes espécies vegetais, cultivares ou tecidos. É freqüente obter culturas de células *in vitro* com alta capacidade de transformação, porém, elas não são competentes, isto é, não são capazes de regenerar novas plantas. Como exemplo, podem-se citar células derivadas de protoplastos ou suspensões bem estabelecidas de cultura celular de tecido. Essa ampla variação na eficiência pode ser devida ao regime de cultura de tecido, às condições nas quais as plantas estão crescendo ou mesmo à cepa de *Agrobacterium* utilizada ([DRAPER et al., 1988](#); [HOOYKAAS, 1995](#)).

Por fim, o tamanho e a complexidade do plasmídeo T₁ também interferem nessa capacidade de transformação. Genes destinados à transferência são, primeiramente, manipulados *in vitro* e, em seguida, incorporados em um simples plasmídeo transportador (sistema co-integrativo) ou, num plasmídeo mais complexo e sofisticado e com maior limite de hospedeiros (sistema binário) ([DRAPER et al., 1988](#)).

No entanto, as vantagens relacionadas à habilidade natural da *Agrobacterium* em transferir seqüências definidas de DNA podem ser exploradas com o intuito de desenvolver novas variedades de plantas transformadas. Além do mais, depois da transformação e obtenção de plantas adultas, os novos genes integrados ao genoma hospedeiro são transmitidos às progênies seguindo uma herança mendeliana.

Transformação direta

Com o intuito de obter métodos de transformação independentes do genótipo, várias técnicas de transferência direta de DNA foram desenvolvidas. A transformação direta consiste no uso de métodos químicos ou físicos e, atualmente, as duas principais são a biolística e a eletroporação.

Biolística

A biolística é também conhecida como gene gun (arma de genes), aceleração de partículas ou bombardeamento com micropartículas ([CHRISTOU, 1992](#); [DE BLOCK, 1993](#); [BIRCH, 1997](#)). O método descrito pelo grupo do Dr. Sanford da Universidade de Cornell ([KLEIN et al., 1987](#); [SANFORD et al., 1987](#)), consiste em bombardear células ou tecidos com micropartículas de tungstênio ou ouro carregando o DNA exógeno, lançadas a partir de um acelerador e por meio de uma câmara especial em condição de vácuo ([Figura 5](#)). O mecanismo visa penetrar na parede celular e na membrana plasmática as duas principais barreiras à transferência direta de DNA ([SANFORD, 1990](#)).

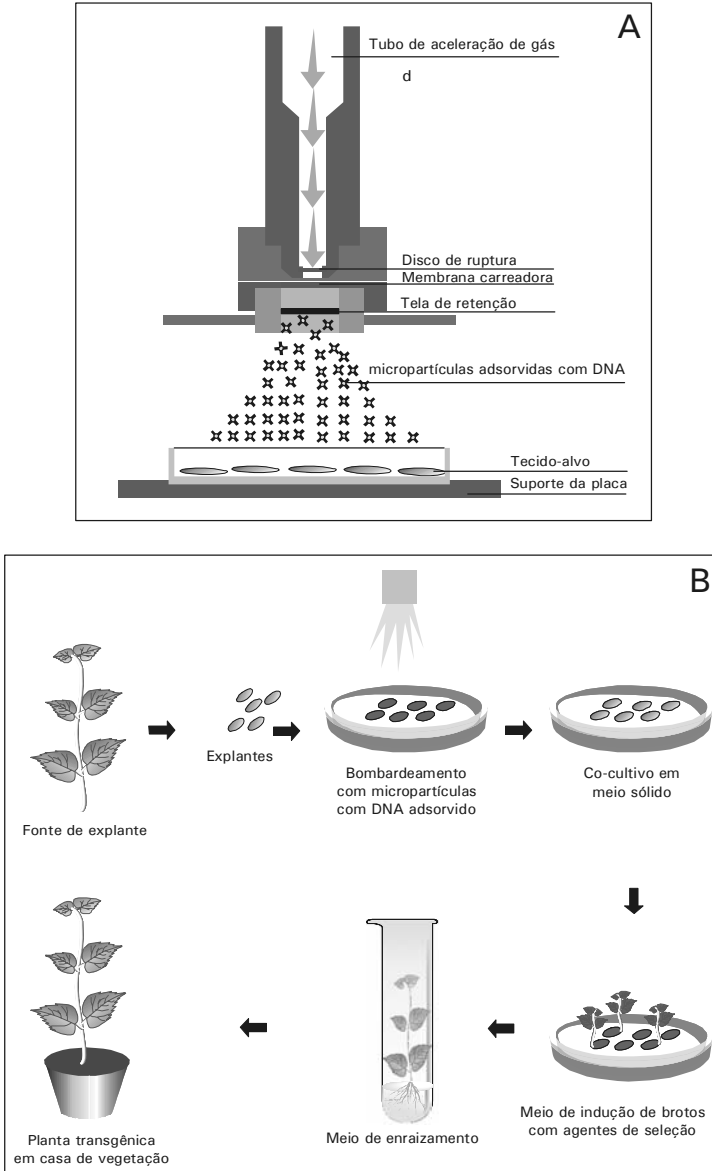


Figura 5. Transformação por bombardeamento de micropartículas.
A: Desenho esquemático do aparelho de bombardeamento por pressão de gás;
B: Protocolo de transformação por bombardeamento de micropartículas.
 Adaptado de Aragão et al. (1998).

As micropartículas (0,2 a 4 µm de diâmetro) cobertas com seqüências de ácidos nucleicos a velocidades superiores a 1.500 km.h⁻¹ penetram na parede e na membrana celular de maneira não letal, localizando-se aleatoriamente nas organelas celulares. Uma vez dentro da célula, o DNA precipitado sobre as partículas é dissociado delas através da ação do líquido celular e integrado ao genoma do organismo a ser modificado ([POTRYKUS, 1990](#); [SANFORD, 1990](#); [RECH; ARAGÃO, 1998](#)).

O processo consiste numa fonte que produz uma onda de choque para acelerar as partículas. Essa onda pode ser gerada por explosão química (pólvora seca), descarga de hélio a alta pressão ou pela vaporização de uma gota de água ([SANFORD et al., 1987](#); [SANFORD et al., 1991](#); [CHRISTOU, 1995](#)).

Diferentes sistemas foram desenvolvidos com intuito de acelerar as partículas; no entanto, os sistemas que utilizam gás hélio sob alta pressão e descarga elétrica têm demonstrado maior eficiência na obtenção dos transformantes ([RECH; ARAGÃO, 1998](#); [LACORTE et al., 1999](#)).

Nesse processo efetivo e simples, podem-se bombardear embriões, hipocótilos, cotilédones, discos foliares, calos ou suspensões celulares. Virtualmente, qualquer tipo de célula ou tecido pode ser utilizado para transformação. É, também, um método útil na introdução e expressão de genes em animais in vivo, e na indução da resposta imune utilizando DNA, por meio do processo denominado imunização genética ([RECH; ARAGÃO, 1998](#); [LACORTE et al., 1999](#)).

A grande vantagem da biolística é que ela permite a transformação de células, tecidos e espécies de forma direta, simples e rápida, sendo aplicável para transferência de genes a espécies em que os outros métodos são falhos. A eficiência na obtenção de transformantes estáveis é cerca de 1 a 5% dos transformantes transientes ([SANFORD, 1990](#); [POTRYKUS, 1990](#)).

O explante bombardeado tem de ser criteriosamente selecionado. Para isso utiliza-se um gene-repórter que possa ser facilmente detectado. Esse cuidado deve ser tomado, pois, às vezes, são obtidas quimeras dos genes introduzidos devido ao bombardeamento randômico de um pequeno número de células num sistema múltiplo ([SANFORD, 1990](#)). Outra desvantagem refere-se ao número de cópias, pois é freqüente a integração de cópias múltiplas, em geral, fortemente ligadas. Essas cópias podem estar fragmentadas com os genes e vetores em

diferentes posições no genoma, o que pode alterar ou silenciar a expressão dos genes exógenos ([SANFORD, 1990](#); [DE BLOCK, 1993](#)).

Eletroporação

A eletroporação é um método desenvolvido como alternativa à transformação via *Agrobacterium*, foi inicialmente proposto para transformação de cereais e, posteriormente, a metodologia foi estendida a outras espécies vegetais. Esse método consiste no emprego de pulsos elétricos curtos de alta voltagem que modificam, temporariamente, a estrutura da membrana plasmática, induzindo a formação de poros ao longo de sua superfície. Dessa maneira, é possível aumentar a permeabilidade da membrana, possibilitando a entrada do gene exógeno (Figura 6) ([LINDSEY; JONES, 1990](#); [POTRYKUS, 1990](#); [SONGSTADT et al., 1995](#); [JONES, 1995](#)).

A carga imposta sobre a membrana plasmática resulta em forças eletrostáticas que levam à compressão e à formação de poros nessa membrana. Aumentando a força do campo, observa-se sua formação primeiramente no equador do protoplasma. O número e o tamanho dos poros podem aumentar até as membranas estarem irreversivelmente danificadas. No entanto, as condições de eletroporação precisam ser escolhidas de modo que a formação de poros seja reversível e haja recuperação dos protoplastos depois do tratamento ([JONES, 1995](#)).

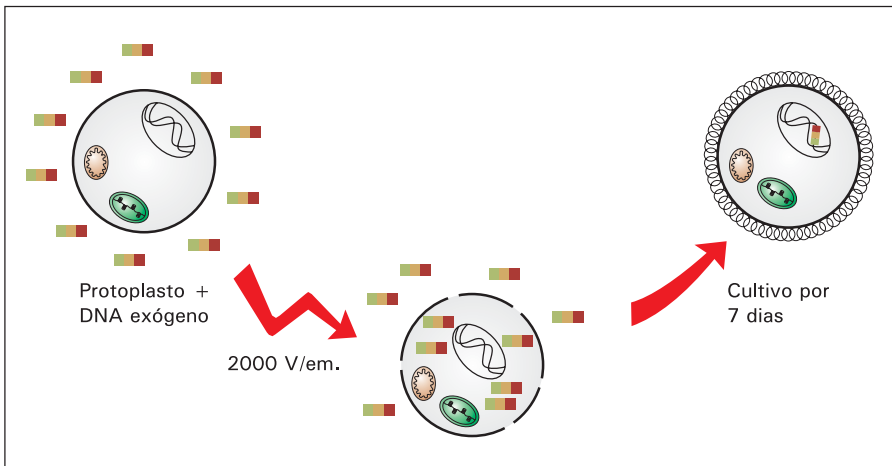


Figura 6. Transformação por eletroporação.

Os parâmetros ótimos de qualquer tipo particular de protoplasto são determinados empiricamente e dependem do diâmetro; qualidade (sobrevivência a altas voltagens, fase do ciclo da célula); fonte (por exemplo, células do mesófilo ou de uma suspensão celular); meio de eletroporação (pH, condutividade elétrica, poder do tampão); estado fisiológico e composição da membrana; forma do DNA introduzido (superenrolado, lineares ou relaxados); e do plasmídeo utilizado. Em geral, o número de pulsos elétricos consecutivos a ser administrado, bem como sua intensidade e duração devem inviabilizar 50% das células (DL50), pois, assim considera-se que dessa maneira a formação dos poros e a absorção de material exógeno seriam maximizadas ([JONES, 1995](#)).

Na eletroporação é possível introduzir moléculas de vários tamanhos em protoplastos ou células intactas, como por exemplo, DNA e RNA. Além disso, esse método, pode ser utilizado para a extração de metabólitos secundários de uma suspensão celular ([POTRYKUS, 1990](#)).

As limitações referentes a esse método são: obtenção de protoplastos, regeneração do material transformado, tampão de transferência que pode afetar a eficiência da transferência do gene, bem como a sobrevivência do protoplasto ([POTRYKUS, 1990](#)). No entanto, os métodos estão sendo aprimorados para transformação de células intactas ou digeridas parcialmente. A parede celular, embora não impeça a permeabilidade da membrana é uma barreira para as moléculas maiores que 5 kb ([LINDSEY; JONES, 1990](#)).

Outras metodologias

Microinjeção

A microinjeção é um processo preciso e específico para a introdução de macromoléculas dentro de uma célula ou compartimentos específicos dela, de maneira não letal. As células podem estar intactas ou desprovidas parcial ou totalmente de suas paredes celulares. Para introdução do material exógeno, utilizam-se microscópio, micromanipuladores (micropipetas de vidro e microseringas), câmara asséptica que não sofra vibrações, com temperatura e umidade relativa controlada ([NEUHAUS; SPANGENBERG, 1990](#); [POTRYKUS, 1990](#); [NEUHAUS, 1995](#)).

As principais vantagens do método são: a introdução de macromoléculas dentro da célula ou de um compartimento celular de maneira precisa; a possibilidade de controlar o volume introduzido na célula e a alta frequência de transformação

(15% a 26%). A desvantagem do método é ser trabalhosa, requerer instrumentos caros e grande habilidade de manuseio. É um método que consome muito tempo, não sendo indicado quando se deseja um grande número de transformantes. Por essa razão, a microinjeção é pouco utilizada para transformação vegetal ([NEUHAUS; SPANGENBERG, 1990](#); [POTRYKUS, 1990](#); [NEUHAUS, 1995](#); [BRASILEIRO; DUSI, 1999](#)).

Transformação de Pólen

Por esse método, o pólen maduro é embebido em solução com DNA e efetua-se a polinização das flores femininas da planta. Detectam-se os transformantes logo na fase inicial da plântula mediante o emprego de um gene marcador. Porém, é um método de baixa eficiência, difícil de reproduzir e necessita mais estudos para aumentar a eficiência ([POTRYKUS, 1990](#); [BRASILEIRO; DUSI, 1999](#)).

Lipossomos

Esse método baseia-se na utilização de vesículas lipídicas artificiais como veículos para introdução de partículas ou material exógeno dentro de protoplastos. A vesícula visa proteger o DNA que se encarrega do ataque de endonucleases. O método requer a digestão da parede celular e incubação desses protoplastos com lipossomos na presença de agentes fusogênicos como o PEG ou o PVA com lavagem subsequente em elevado pH saturado em íons de cálcio ([CABOCHE, 1990](#); [BRASILEIRO; DUSI, 1999](#)).

Embora pareça haver maior dificuldade de incorporação de moléculas maiores, o método pode ser empregado para encapsular e introduzir plasmídios e DNAs recombinantes e RNA viral em protoplastos. No entanto, apresenta baixa eficiência de transformação estável ([CABOCHE, 1990](#); [BRASILEIRO; DUSI, 1999](#)).

Histórico da Comercialização de Transgênicos no Mundo

Em 1986, nos EUA e na França, foi liberado o primeiro teste em campo de um vegetal transgênico. Era uma variedade de tabaco contendo um gene de resistência a herbicida ([JAMES; KRATTIGER, 1996](#)). A partir desse evento, vários países iniciaram seus testes, em campo, com vegetais transgênicos e, no período de 1986 a 1995, foram conduzidos 3500 testes, em 34 países, com 56 culturas. A maioria dos estudos foi conduzida nos EUA, Canadá, França, Inglaterra, Holanda, Bélgica, Argentina, Itália, China, Alemanha, Austrália, Chile e

México. As principais culturas estudadas foram: milho, tomate, soja, canola, batata e algodão, e as características introduzidas foram tolerância a herbicida, resistência a insetos, qualidade de produtos e resistência a vírus ([JAMES; KRATTIGER, 1996](#)).

O primeiro país a comercializar transgênicos foi a China quando liberou, no início dos anos 90, o plantio e a comercialização do tabaco resistente a vírus seguido pelo tomate resistente a vírus ([JAMES, 1997](#)). O tomate longa vida (Flavr Savr™) da Calgene foi, em 1994, o primeiro transgênico aprovado comercialmente nos EUA. Esse processo evoluiu rapidamente e, em 1996, aproximadamente 2,8 milhões de hectares de sete culturas (tabaco, algodão, soja, milho, canola, tomate, batata) estavam sendo plantados em seis países (USA, China, Canadá, Argentina, Austrália, México) ([JAMES, 1997](#)).

Em 2003, a área plantada com transgênicos foi de 67,7 milhões de hectares, incluindo os três milhões de hectares de soja plantados no Brasil; isso equivale ao crescimento mundial de 40 vezes de 1996 a 2003 (Figura 7). O plantio ocorre principalmente nos países desenvolvidos, entretanto, está havendo aumento substancial de plantio em países em desenvolvimento (Figura 7). Dos quatro principais países produtores de OGMs ([Figura 8](#)) dois são industrializados (EUA e Canadá) e dois são países em desenvolvimento (Argentina e China), sendo que os países em desenvolvimento foram responsáveis pela ampliação de cerca de 30% da área plantada em 2003 ([JAMES, 2003](#)).

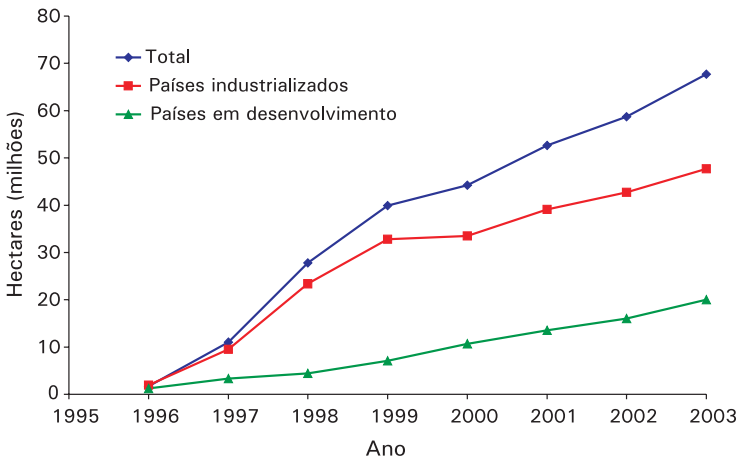


Figura 7. Crescimento do plantio de transgênicos no mundo de 1996 a 2003.

Fonte: Adaptado de [James \(2003\)](#).

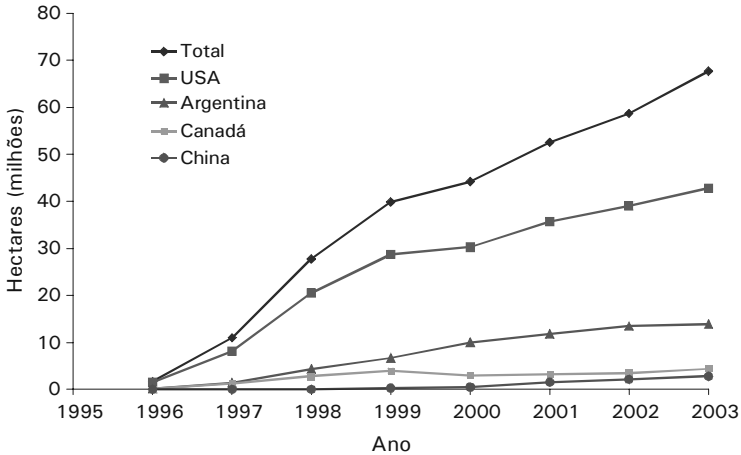


Figura 8. Crescimento do plantio de transgênicos nos principais países produtores.

Fonte: Adaptado de [James \(2003\)](#).

Aspectos Futuros

Os métodos de transformação abrem novas fronteiras para o melhoramento de plantas, uma vez que, permitem a redução no tempo de obtenção de variedades com novas características, bem como a transferência de características de interesse entre espécies que, em geral, são sexualmente incompatíveis. Em outras palavras, as barreiras naturais entre as espécies podem ser derrubadas, o que oferece a possibilidade de obter novas variedades na forma de plantas transgênicas. Além disso, é possível, com os métodos da biologia molecular moderna, isolar e manipular genes específicos, o que não acontece no melhoramento clássico, em que o melhorista é obrigado a trabalhar com genomas inteiros.

Referências Bibliográficas

BIRCH, R. G. Plant transformation: problems and strategies for practical application. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, p. 297-326, 1997.

BRASILEIRO, A. C. M. Biologia de *Agrobacterium* sp. **ABCP Notícias**, Brasília, DF, v. 20, p. 2-6, 1993.

BRASILEIRO, A. C. M.; DUSI, D. M. A. Transformação genética de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**: volume 2. Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPq, 1999. p. 679-735.

BRASILEIRO, A. C. M.; LACORTE, C. Interação *Agrobacterium*-hospedeiro. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI, 1998. p. 75-92.

CABOCHE, M. Liposome-mediated transfer of nucleic acids in plant protoplasts. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 79, p. 173-176, 1990.

CHILTON, M. D.; DRUMMOND, M. H.; MERLO, D. J.; SCIANKY, D.; MONTOYA, A. L.; GORDON, M. P.; NESTER, E. W. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plants cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. **Cell**, Cambridge, v. 11, p. 263-271, 1977.

CHILTON, M. D.; TEPFER, D. A.; PETTIT, A.; DAVID, C.; CASSE-DELBART, F.; TEMPÉ, J. *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into genomes of the host-plant root cells. **Nature**, London, v. 295, p. 432-434, 1982.

CHRISTOU, P. Genetic transformation of crops using microprojectile bombardment. **Plant Journal**, Oxford, v. 2, p. 275-281, 1992.

CHRISTOU, P. Strategies for variety-independent genetic transformation for important cereals, legumes and woody species utilizing particle bombardment. **Euphytica**, Wagnigen, v. 85, p. 13-27, 1995.

DE BLOCK, M. The cell biology of plant transformation: current state, problems, prospects and the implications for the plant breeding. **Euphytica**, Wagnigen, v. 17, p. 1-14, 1993.

DELU FILHO, N.; CASCARDO, J. C. M.; FONTES, E.P.B. Clonagem molecular e isolamento de genes de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**: volume 2. Brasília: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPq, 1999. p. 653-677.

DRAPER, J.; SCOTT, R.; KUMAR, A.; DURY, G. Transformation of plants cells by DNA-mediated gene transfer. In: DRAPER, J. et al. (Ed). **Plant genetic transformation and gene expression: a laboratory manual**. Oxford: Blackwell Scientific, 1988. p. 161-198.

GANDER, E. S.; MARCELLINO, L. H. Plantas transgênicas. **Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, DF, v. 1, n. 1, p. 34-37, 1997.

GODWIN, I. D.; FORDLLOYD, B. V.; NEWBURY, H. J. *In vitro* approaches to extending the host-range of *Agrobacterium* for plant transformation. **Australian Journal of Botany**, Victoria, v. 40, p. 751-763, 1992.

GRANT, J. E.; DOMMISSE, E. M.; CRHISTEY, M. C.; CONNER, A. J. Gene transfer to plants using *Agrobacterium*. In: MURRAY, D. R. (Ed.). **Advanced methods in plant breeding and biotechnology**. Oxon: CAB. International, 1993. v. 4, p. 50-73.

HERRERA-ESTRELLA, L.; DEPICKER, A.; Van MONTAGU, M.; SCHELL, J. Expression of chimeric genes transferred into plant cells using Ti-plasmid derived vector. **Nature**, London, v. 303, p. 209-213, 1993.

HOOYKAAS, P. J. J. Introduction I: *Agrobacterium tumefaciens*, a natural vector system. In: POTRYKUS, I.; SPANGENBERG, G. (Ed.). **Gene transfer to plants**. Berlim: Springer-Verlag, 1995. p. 3-4.

HOOYKAAS, P. J. J.; BEIJERBERGEN, A. G. M. The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 32, p. 157-179, 1994.

JAMES, C. Global status of transgenic crops in 1997: *ISAAA Briefs* n. 5. Ithaca: ISAAA, 1997. p. 31.

JAMES, C. Preview: status of transgenic crops in 2003. *ISAAA Briefs* n. 30. Ithaca: ISAAA, 2003. p. 26.

JAMES, C.; KRATTIGER, A. F. Global review of the field testing and commercialization of transgenic plants: 1986 to 1995: the first decade of crop biotechnology: *ISAAA Briefs* n. 1. Ithaca: ISAAA, 1996. p. 31.

JONES, M. G. K. Electroporation-mediated gene transfer to protoplast an regeneration of transgenic plants. In: POTRYKUS, I.; SPANGENBERG, G. (Ed.). **Gene transfer to plants**. Berlim: Springer-Verlag, 1995. p. 88-92.

KLEIN, T.M.; WOLF, E. D.; WU, R.; SANFORD, J. C. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. **Nature**, London, v. 327, p. 70-73, 1987.

LACORTE, C.; ARAGÃO, F. J. L.; VAINSTEIN, M. H.; RECH, E. L. Biobalística. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**: volume 2. Brasília: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPQ, 1999. p. 761-781.

- LACORTE, C.; MANSUR, E. Transferência de genes através de *Agrobacterium tumefaciens*: avaliação de compatibilidade patógeno-hospedeiro. **ABCP Notícias**, Brasília, v. 21, p. 2-7, 1993.
- LINDSEY, K.; JONES, M. G. K. Electroporation of cells. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 79, p. 168-172, 1990.
- NEUHAUS, G. Introduction V: microinjection into plant cells: methodology and applications. In: POTRYKUS, I.; SPANGENBERG, G. (Ed.). **Gene transfer to plants**. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p. 173-175.
- NEUHAUS, G.; SPANGENBERG, G. Plant transformation by microinjection techniques. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 79, p. 213-217, 1990.
- POTRYKUS, I. Gene transfer to plants: assessment and perspectives. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 79, p. 125-134, 1990.
- RECH, E. L.; ARAGÃO, F. J. L. Biolística. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. de C. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI, 1998. p. 51-64.
- SANFORD, J. C. Biolistic plant transformation. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 79, p. 206-209, 1990.
- SANFORD, J. C.; DEVIT, M. J.; RUSSEL, J. A.; SMITH, F. D.; HARPENDING, P. R.; ROY, M. K.; JOHNSTON, S. A. An improved, helium-driven biolistic device. **Technique**, v. 3, p. 13-16, 1991.
- SANFORD, J. C.; KLEIN, T. M.; WOLF, E. D.; ALLEN, N. Delivery of substances into cells tissues using a particle bombardment process. **Particulate Science Technology**, v. 5, p. 27-37, 1987.
- SONGSTAD, D. D.; SOMERS, D. A.; GRIESBACH, R. J. Advances in alternative DNA delivery techniques. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v. 40, p. 1-15, 1995.
- TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T.; SÁ, F. G.; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S.; NASCIMENTO, A. S.; BRÍGIDO, M. M.; ROMANO, E. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: Embrapa-CNPQ, 2000. p. 128.
- TRICK, H. N.; FINER, J. J. SAAT: sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation. **Transgenic Research**, Philadelphia, v. 6, p. 329-336, 1997.

VAN SLUYS. *Agrobacterium*: um vetor natural para transformação em plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**: volume 2. Brasília: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPq, 1999. p. 737-759.

WALDEN, R.; KONCZ, C.; SCHELL, J. The use of gene vectors in plant molecular biology. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, New York, v. 1, p. 175-194, 1990.

WHITE, F. F. Vectors for gene transfer in higher plants. In: KUNG, S.; WU, R. (Ed.). **Transgenic plants**: engineering and utilization. San Diego: Academic Press, 1993. p. 15-48, v. 1.

ZUPAN, J. R.; ZAMBRYSKI, P. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 107, p. 1041-1047, 1995.

Plant Transformation

Abstract – *During centuries mankind manipulate plants to obtain cultivars with superior characteristics. However, conventional methods of plant breeding present limitations. The development of transformation methods created possibilities of great progresses in plant breeding because it offers the opportunity to introduce exogenous genes into superior cultivars to obtain new varieties. Genetic transformation is the controlled transfer of genes to the target organism using non sexual methods. Transgenic plants can be defined as those that present genes different from the original genoma obtained by techniques of genetic engineering. The transformation stages consist of the identification isolation, cloning and introduction of the gene into the cells. There are several transformation methods, and the choice depends on the species to be transformed, the type of the explant (cell, tissue, protoplasts) and the capacity of explant regeneration. Among the principal methods are: 1) transformation mediated by Agrobacterium; 2) biolistic; 3) eletroporation.*

Index terms: Agrobacterium, plant transformation, transgenic, biolistic, eletroporation.