



# **Biotecnologia Vegetal**



# **Biotecnologia Vegetal**

Stephanie Karenina Bajay  
Leonardo Soriano

© 2018 por Editora e Distribuidora Educacional S.A.  
Todos os direitos reservados. Nenhuma parte desta publicação poderá ser reproduzida ou transmitida de qualquer modo ou por qualquer outro meio, eletrônico ou mecânico, incluindo fotocópia, gravação ou qualquer outro tipo de sistema de armazenamento e transmissão de informação, sem prévia autorização, por escrito, da Editora e Distribuidora Educacional S.A.

**Presidente**

Rodrigo Galindo

**Vice-Presidente Acadêmico de Graduação e de Educação Básica**

Mário Ghio Júnior

**Conselho Acadêmico**

Ana Lucia Jankovic Barduchi

Camila Cardoso Rotella

Danielly Nunes Andrade Noé

Grasiele Aparecida Lourenço

Isabel Cristina Chagas Barbin

Lidiane Cristina Vivaldini Olo

Thatiane Cristina dos Santos de Carvalho Ribeiro

**Revisão Técnica**

Ana Cláudia Bensusaski de Paula Zurron

Sônia Aparecida Santiago

**Editorial**

Camila Cardoso Rotella (Diretora)

Lidiane Cristina Vivaldini Olo (Gerente)

Elmir Carvalho da Silva (Coordenador)

Letícia Bento Pieroni (Coordenadora)

Renata Jéssica Galdino (Coordenadora)

---

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Bajay, Stephanie Karenina  
B165b Biotecnologia vegetal / Stephanie Karenina Bajay,  
Leonardo Soriano. – Londrina : Editora e Distribuidora  
Educacional S.A., 2018.  
176 p.

ISBN 978-85-522-0533-3

1. Biotecnologia. 2. Genética vegetal. I. Bajay, Stephanie  
Karenina. II. Soriano, Leonardo. III. Título.

CDD 581.35

---

Thamiris Mantovani CRB-8/9491

2018  
Editora e Distribuidora Educacional S.A.  
Avenida Paris, 675 – Parque Residencial João Piza  
CEP: 86041-100 – Londrina – PR  
e-mail: editora.educacional@kroton.com.br  
Homepage: <http://www.kroton.com.br/>

# Sumário

<b>Unidade 1   Conceitos e aplicações da biotecnologia e da biossegurança</b>	<b>7</b>
Seção 1.1 - Aplicações da biotecnologia nas áreas humana, animal e vegetal	9
Seção 1.2 - Conceitos de biotecnologia e biossegurança	20
Seção 1.3 - Normas e leis de biossegurança	33
<b>Unidade 2   Ácidos Nucleicos e Síntese de Proteínas</b>	<b>51</b>
Seção 2.1 - Mecanismo de replicação do DNA	52
Seção 2.2 - Mecanismo de transcrição e tradução de proteínas	65
Seção 2.3 - Moléculas de DNA, RNA e proteínas	79
<b>Unidade 3   Cultura de tecidos vegetais</b>	<b>93</b>
Seção 3.1 - Características e propriedades de tecido meristemático vegetal e propriedades das células vegetais	94
Seção 3.2 - Conceitos e aplicações da cultura de tecidos vegetais	107
Seção 3.3 - Embriogênese somática; organogênese	120
<b>Unidade 4   Tecnologia do DNA recombinante</b>	<b>133</b>
Seção 4.1 - Clonagem	134
Seção 4.2 - Enzimas de restrição	145
Seção 4.3 - Mecanismo de transformação por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	158



## Palavras do autor

A disciplina de Biotecnologia vegetal permite a você, aluno, conhecer conceitos, esclarecer dúvidas, discutir, analisar, avaliar dados, elaborar relatórios técnicos com relação a um determinado conjunto de tecnologias que fazem uso de agentes biológicos (organismos, células, organelas, moléculas), de sistemas biológicos ou de seus derivados para a produção ou modificação de produtos e processos específicos, com a finalidade de obter bens ou assegurar serviços, assim como aplicar os princípios científicos para o processamento de materiais biotecnológicos.

É importante que você, caro aluno, dedique um tempo para o estudo da disciplina, organizando os conceitos, refletindo sobre os conteúdos, identificando as dúvidas e as dificuldades para que possa entender os assuntos abordados, desde as aplicações da biotecnologia e da biossegurança nas áreas humana, animal e vegetal, como também as normas e as leis da biossegurança, os mecanismos de ação dos ácidos nucleicos e síntese de proteínas e suas tecnologias, a cultura de tecidos vegetais (propriedades celulares e meristemáticas, embriogênese somática e a organogênese) até a tecnologia do DNA recombinante, processos de clonagem, a função das enzimas de restrição e a hibridação somática.

Note a importância de relacionar assuntos da biologia vegetal, biologia molecular, biotecnologia e as leis que regem a biossegurança ao fazer uso de toda essa tecnologia. Veja a relevância desses temas para a sua profissão e para a aplicação da saúde de plantas e organismos diversos. Vale a pena perceber que as inovações tecnológicas caminham com a biologia vegetal, para que se consiga o melhoramento vegetal.

Estudar não é uma tarefa fácil, exige comprometimento, dedicação, disciplina e muita perseverança; então foco no seu objetivo de vida e juntos iniciaremos esta caminhada de estudos.



# Conceitos e aplicações da biotecnologia e da biossegurança

## Convite ao estudo

Olá, seja bem-vindo à primeira unidade de ensino deste livro didático, em que você iniciará os estudos sobre os conceitos e as aplicações da biotecnologia e da biossegurança.

A biotecnologia (*bio* – vida; *tecno* – utilização prática da ciência; *logia* – estudo) reúne o conjunto de atividades que o ser humano desenvolve há milhares de anos, como a produção de alimentos fermentados (pão, cerveja, vinho e iogurte), transformando nossa vida cotidiana até os dias de hoje. Foi a partir da descoberta da estrutura do DNA por Watson e Crick, em 1953, e da técnica do DNA recombinante, na década de 1970, que se notou a grande contribuição científica na área da biotecnologia, permitindo aplicações diretas em diversas áreas do conhecimento, como saúde, agrônômica, vegetal, animal e ambiental.

Trata-se, dessa forma, de uma tecnologia baseada na biologia, abrangendo diferentes áreas do conhecimento que incluem a ciência básica, a ciência aplicada, sobretudo aquela empregada na agricultura, ciência dos alimentos e medicina. A biotecnologia apresenta ainda amplo espectro de aplicação, permitindo cultivar microrganismos para produzir os antibióticos, células de espécies de interesse agrônômico para a obtenção de mudas comerciais, produção de plantas resistentes a doenças, plásticos biodegradáveis, síntese de detergentes mais eficientes, desenvolvimento de biocombustíveis, aperfeiçoamento de processos industriais e agrícolas menos poluentes, até o tratamento de despejos sanitários pela ação de microrganismos, atingindo, assim, vários setores produtivos.

Ao término dos estudos deste livro, você adquirirá conhecimento sobre os fundamentos de genética, morfologia e anatomia vegetal aplicados ao melhoramento de plantas e terá domínio dos principais conceitos e aplicações da biotecnologia e da biossegurança. Para atingir essa expectativa, trabalharemos nesta unidade, com os seguintes temas: aplicações da biotecnologia nas áreas humana, animal e vegetal, conceitos de biotecnologia e biossegurança e normas e leis de biossegurança.

Em cada seção desta unidade, você resolverá situações-problema relacionadas ao setor tecnológico envolvendo pesquisa que enfatize o melhoramento vegetal diante de situações conceituais relacionadas à biotecnologia e à biossegurança. Então, vamos despertar os ânimos e iniciar os estudos! Vamos lá!

# Seção 1.1

## Aplicações da biotecnologia nas áreas humana, animal e vegetal

### Diálogo aberto

Seja bem-vindo à primeira seção de estudos desta unidade! A partir de agora você iniciará seus estudos sobre as aplicações da biotecnologia nas áreas humana, animal e vegetal. Nesta seção, faremos uma introdução à biotecnologia, bem como suas aplicações na área de saúde, meio ambiente, animal ou vegetal.

Agora relembremos a suposta situação que foi apresentada no "Convite ao estudo" com objetivo de aproximar os conteúdos teóricos da prática profissional.

Primeiramente, Carla relatou uma situação que ocorreu no início de sua carreira, enquanto estagiária em um laboratório de biotecnologia de fármacos, onde destinava materiais externos que recebia para as respectivas áreas de pesquisa voltadas à saúde humana, animal ou vegetal.

Carla recebeu uma amostra celular lacrada cuja orientação no rótulo indicava destinar-se a um experimento com suspensões celulares. Contudo, mesmo sem o devido conhecimento prévio da pesquisa e autorização para examinar o material, Carla deveria destinar o caminho correto da amostra. A única informação adicional que ela possuía descrita era que a amostra apresentava três enzimas: celulase, macerase e pectoliase.

Carla deveria encaminhar a amostra para qual setor especializado: animal, vegetal ou de saúde humana?

Para que você consiga responder a esses e outros questionamentos sobre os conceitos fundamentais em aplicações da biotecnologia nas áreas humana, animal e vegetal, será apresentada a teorização no item *Não pode faltar* com os conteúdos pertinentes a esse tema.

É interessante também que você leia todo o material indicado neste livro didático na forma de links, vídeos, leituras adicionais e que possa resolver a situação-problema apresentada no início desta seção.

### Conceitos e aplicações da biotecnologia

A biotecnologia faz uso de diferentes formas de seres vivos para conseguir desenvolver produtos de interesse biotecnológico, pensando sempre na melhoria da saúde das pessoas e do ambiente, assim como na tecnologia de melhoramento vegetal e animal. Esse conjunto amplo de tecnologias, tendo como matéria-prima organismos vivos, suas células ou suas partes replicáveis, expandiu nas últimas décadas do século XX, tanto com relação à aquisição de novos conhecimentos quanto ao desenvolvimento de processos tecnológicos. Os processos e produtos de origem vegetal, usando organismos vivos e tecnologia de vanguarda, são obtidos através do conhecimento científico e acadêmico de diferentes profissionais, como geneticistas, biólogos moleculares, bioquímicos, economistas, microbiologistas, engenheiros químicos, entre outros.



#### Assimile

A chamada biotecnologia "moderna" teve início através dos trabalhos de Kornberg, em 1967, quando diversos estudos com a síntese química do DNA (ácido desoxirribonucleico) trouxeram novas técnicas de manipulação genética, como a técnica do DNA recombinante e a hibridação somática.

### A biotecnologia na saúde, na agricultura e no meio ambiente

A biotecnologia está, muitas vezes, relacionada à modificação genética de alimentos, contudo, pode ser vista também como uma nova ciência que teve origem na medicina tradicional, trazendo soluções de grande impacto para os mais diversos problemas, como a manipulação de células e proteínas para a criação de vacinas, a produção de moléculas recombinantes de ácidos nucleicos, o manuseio de embriões humanos, a fecundação in vitro, a terapia molecular, entre outras. Vale ressaltar ainda que a biotecnologia aplicada à saúde envolve substancialmente a área de genômica, com sua extensão para a terapia gênica, diagnóstico, prognóstico, tratamento e prevenção de doenças e ainda a modulação e a melhoria de defeitos metabólicos (OLIVEIRA et al., 2010).

A tentativa de equalizar os interesses sociais e econômicos com o respeito ao ambiente em que vivemos deu origem à agricultura

sustentável, garantindo, assim, às gerações futuras, a capacidade de suprir as necessidades de produção e qualidade de vida no planeta.

O estabelecimento da agricultura sustentável torna-se fundamental, tendo em vista um processo de preservação do meio ambiente que proporcione uma segurança alimentar no futuro. Nesse sentido, existe um desafio agrícola que direciona seus esforços para a elaboração de métodos avançados e eficientes, a fim de aumentar a produção de energia renovável e de alimentos, sem, contudo, esgotar os recursos naturais.

No entanto, quando há crises relacionadas à escassez de água potável, à falta de alimentos disponível para a população, assim como à diminuição das reservas de petróleo, entra em cena a biotecnologia de plantas, ocupando papel central na busca por soluções para diminuir os atuais problemas e aqueles futuros, causados pelo modo de produção contemporâneo.

Assim, a biotecnologia é considerada a propulsora para o aumento da produtividade, da qualidade da produção e está relacionada ao desenvolvimento de plantas adaptadas às diferentes condições ambientais, quando se trata de espécies com potencial energético. Em adição, a biotecnologia pode ter outras fontes de bioenergia na produção de biocombustíveis a partir de algas transformadas geneticamente. Você já pensou nisso?



## Refleta

A agroenergia é a área de pesquisa relacionada ao desenvolvimento e à produção de biocombustíveis por meio da fermentação promovida por leveduras, e a biorremediação consiste em recuperar o solo contaminado por meio de enzimas ou microrganismos; ambos são áreas importantes que descendem também da biotecnologia e devem ser amplamente explorados. Assim como a agroenergia, a biorremediação pode trazer benefícios para o ambiente em que vivemos? Reflita!

Você sabia que a FAPESP, órgão que financia pesquisas no estado de São Paulo, tem um programa chamado BIOEN (Programa Fapesp de Pesquisa em Bioenergia), fornecendo suporte financeiro para projetos que objetivem promover o avanço do conhecimento e sua aplicação em projetos e áreas ligadas à produção de bioenergia no Brasil?



Gusmão, Silva e Medeiros (2017) publicaram a revisão "A Biotecnologia e os Avanços na Sociedade", no qual descrevem o estado da arte da biotecnologia e suas tendências e avanços no desenvolvimento de novas terapias biológicas; a estruturação de novas ferramentas analíticas; o desenvolvimento e a integração de ferramentas na bioinformática; a expansão das tecnologias de conversão de biomassa em biocombustível; a integração de novas plataformas de plantas à produção de fármacos; a proliferação da tecnologia transgênica para aumentar a produção agrícola e pecuária, entre outros. Disponível em: <<http://www.periodicoscientificos.ufmt.br/ojs/index.php/biodiversidade/article/view/4979/3357>>. Acesso em: 27 out. 2017.

Segundo o relatório lançado pelas Nações Unidas em 2017, a população mundial gira em torno de 7,2 bilhões de pessoas e projeta-se que atingirá cerca de 9,6 bilhões em 2050. Esses números endossam ainda mais a importância do desenvolvimento e da produtividade da agricultura mundial. Contudo, o sistema de produção agrícola corresponde a 70% do consumo de água no mundo (AQUASTAT-FAO, 2010), e o uso sem controle de fertilizantes e pesticidas acaba contaminando lençóis freáticos e mananciais subterrâneos. Assim, para contornar essa e outras dificuldades da agricultura, a biotecnologia traz duas importantes correntes vinculadas ao melhoramento genético de plantas: o desenvolvimento de espécies tolerantes à seca, havendo diminuição da irrigação intensiva e conservação da água no solo; e o melhoramento genético de variedades que resistem a pragas e doenças, diminuindo o uso de produtos químicos nas lavouras.

### **A redução da poluição ambiental e do desperdício através da biotecnologia**

A biotecnologia pode muitas vezes estabelecer o elo entre a indústria e a sociedade, aliando a tecnologia ao modo de produção, otimizando e aumentando o número de processos industriais que buscam recursos renováveis (combustíveis líquidos limpos), em substituição do consumo do petróleo, proporcionando qualidade de vida ao ambiente e à saúde de animais, vegetais e das pessoas. O desenvolvimento sustentável tem como objetivo a redução do desperdício e da poluição ambiental, garantindo o suprimento alimentar e a preservação continuada dos recursos naturais.

No campo agronômico, a biotecnologia tem posição de destaque através da produção e da aplicação de biopesticidas que, de forma menos agressiva que os agrotóxicos convencionais, protegem lavouras e florestas. Outro fator impactante do setor agrário é a utilização em larga escala de organismos geneticamente modificados (OGMs), que proporcionam vantagens, como o desenvolvimento de características genéticas desejáveis, o aumento da produtividade, a resistência a pragas e doenças e a melhoria da qualidade de determinado produto. Assim, é importante compreender e valorizar um avanço biotecnológico capaz de beneficiar a sociedade com relação ao ambiente, sem visar puramente o lado econômico.

### **A biotecnologia animal**

A biotecnologia animal está direcionada ao aumento da eficiência dos sistemas de produção de alimentos e da qualidade dos produtos. Dentre os produtos gerados com a utilização de técnicas biotecnológicas, destacam-se: o hormônio de crescimento bovino, que aumenta a produção de leite; as vacinas recombinantes para prevenção de doenças em suínos, ovinos, bovinos e aves e ainda a realização de testes genéticos de DNA na seleção de animais com genótipos superiores em programas de melhoramento.

No caso da seleção genômica, através do uso de marcadores moleculares, preconizada por painéis SNP (polimorfismo de nucleotídeo simples), verificam-se variações na sequência de DNA em apenas uma base nitrogenada do genoma escolhido para estudo. Esse fato tem contribuído significativamente para os programas de melhoramento genético de animais de produção comercial. Nesse sentido, novas fontes de informação molecular vêm sendo estabelecidas para o mapeamento de QTL (*quantitative trait loci*), que são regiões do genoma responsáveis pela expressão de caracteres fenotípicos, pois possuem distribuição contínua, incluindo o sequenciamento do genoma. Esse fato facilitará o desenvolvimento de padrões fenotípicos, tendo como resultado maior produção de leite, ovos, carne, entre outros produtos de origem animal.





Leia o artigo *Genômica animal*, de Luiz Lehmann Coutinho et al. (s.d.). Este conteúdo levará a uma reflexão sobre as aplicações da genômica no melhoramento animal. Disponível em: <[https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/genomica\\_animal\\_000fzfl2nmm02wx5ok0cpo06aipz2t68.pdf](https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/genomica_animal_000fzfl2nmm02wx5ok0cpo06aipz2t68.pdf)>. Acesso em: 18 set. 2017.

## A biotecnologia vegetal

O objetivo principal da biotecnologia vegetal é a melhoria de diferentes espécies para obter variedades vegetais com características desejáveis. O melhoramento genético de plantas de interesse agrônomo visa fundamentalmente obter variedades capazes de reunir características de interesse comercial e ambiental, como a resistência a fatores bióticos ou abióticos associados às condições de adaptação com elevada produtividade.

Com o desenvolvimento e a aplicação de novas tecnologias, tais como a biologia molecular e a cultura de tecidos, foi possível superar as barreiras impostas pelas características genéticas e reprodutivas de um determinado organismo vivo. Desse modo, a biotecnologia vem contribuindo em vários aspectos, favorecendo a variabilidade genética disponível, incorporando novas tecnologias em programas de melhoramento vegetal ou, até mesmo, realizando cruzamentos ou testes genéticos que venham a lançar diferentes variedades genéticas de organismos vegetais na pesquisa. Entre as ferramentas biotecnológicas incorporadas aos programas de melhoramento, destacam-se a hibridação somática por fusão de protoplastos e a transformação genética.

A hibridação somática consiste em processo aditivo de protoplastos, células vegetais sem parede celular devido à ação de enzimas que degradam celulose, hemicelulose e pectina, produzindo híbridos somáticos poliploides. A metodologia permite combinar espécies com características complementares, sem perda significativa de vigor, sendo uma ferramenta efetiva e consolidada no melhoramento genético de espécies vegetais economicamente importantes.



## Exemplificando

A transformação genética de plantas permite a introdução de genes exógenos de interesse agrônômico, reduzindo o período usado para obtenção de uma nova variedade agrônômica. Esse fato tem mostrado resultados promissores, principalmente visando a resistência às doenças, promovendo uma nova dimensão ao melhoramento genético de plantas. Atualmente, as plantas transgênicas têm grande importância na agricultura mundial, com vasta área cultivada de espécies de interesse agrônômico.



## Pesquise mais

A fermentação alcoólica é um processo biotecnológico, no qual açúcares, como a glicose, a frutose e a sacarose são convertidos pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* em energia celular com produção de etanol e dióxido de carbono. Vamos atentar à geração de energia e ao aumento da produtividade de etanol por meio do melhoramento genético da levedura. Leia o texto *Biotecnologia e desenvolvimento sustentável*. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/ea/v24n70/a02v2470.pdf>>. Acesso em: 18 set. 2017.

## Sem medo de errar

Após adquirir conhecimento sobre as aplicações da biotecnologia nas áreas humana, animal e vegetal, você é capaz de resolver a situação-problema de Carla? No início de sua carreira, ela tinha a função de selecionar o recebimento de material e destiná-lo até as devidas áreas de pesquisa, voltadas à saúde humana, animal ou vegetal, de acordo com a necessidade.

A estagiária recebeu uma amostra celular lacrada cuja orientação no rótulo indicava destinar-se a um experimento com suspensões celulares. Contudo, sem o devido conhecimento prévio da pesquisa e autorização para examinar o material, Carla observou que a amostra estava acompanhada por três enzimas: celulase, macerases e pectinase.

Carla deveria encaminhá-lo para qual setor especializado: animal, vegetal ou saúde humana?

Ao refletir sobre as enzimas anexas, ela concluiu que se tratava de uma amostra vegetal, pois somente células vegetais apresentam parede celular composta por celulose, hemicelulose e pectina, componentes-alvos das três enzimas supracitadas. Dessa forma, a

estagiária encaminhou corretamente a amostra recebida ao setor especializado.

## Avançando na prática

### *Aedes aegypti* geneticamente modificado

#### Descrição da situação-problema

O *Aedes aegypti* é o mosquito transmissor da dengue, febre amarela, Chikungunya e Zika. O macho alimenta-se exclusivamente de frutas e a fêmea prefere o sangue como fonte de proteína, sendo necessário para o seu processo de ovulação. Os ovos, por sua vez, são depositados pela fêmea primordialmente próximos a superfícies de água parada. Em média, cada mosquito vive em torno de 30 dias e a fêmea chega a colocar entre 150 e 200 ovos.

No Brasil, o combate ao *A. aegypti* é, sem dúvida, um dos maiores problemas enfrentados pelos órgãos de saúde pública.

Você é o responsável pelo Centro de Doenças Infectocontagiosas, ligado à secretaria municipal da saúde de sua cidade e recebeu uma proposta de uma empresa para combater o inseto. A empresa apresentou uma solução baseada em biotecnologia e garante que a população de *A. aegypti* selvagem pode ser reduzida em mais de 90% onde houver introdução de mosquito transgênico macho.

Como você conhece o ciclo de vida e reprodutivo do inseto e os mecanismos biotecnológicos que desenvolvem espécies transgênicas, o secretário de saúde solicitou-lhe que relate a possível estratégia molecular e fisiológica da empresa para a aprovação ou não da proposta na cidade. Qual a estratégia elaborada pelos pesquisadores?

#### Resolução da situação-problema

Em princípio, é necessário refletir que, ao liberar apenas mosquitos machos, os pesquisadores se voltaram para o ciclo reprodutivo do inseto. Dessa forma, ovos do *A. aegypti* foram modificados, com a inclusão de um gene que impede que os descendentes dos mosquitos geneticamente modificados cheguem à idade adulta. Em outras palavras, a prole morre em até oito dias após a eclosão dos ovos, impedindo que o ciclo de vida de trinta dias do mosquito seja completado.

## Faça valer a pena

**1.** A biotecnologia está relacionada à modificação genética de alimentos, além de ser considerada uma nova ciência que teve origem na medicina tradicional. No que diz respeito ao espectro de atuação das ferramentas biotecnológicas, analise as seguintes asserções:

I. A biotecnologia aplicada à saúde envolve substancialmente a área de genômica, com sua extensão para a terapia gênica, diagnóstico, prognóstico, tratamento e prevenção de doenças.

PORQUE

II. A genômica é também aplicada ao meio ambiente, com benefícios importantes à agricultura, desde o aumento de produtividade nas lavouras, a redução de perdas e custos na produção, a otimização do uso de agroquímicos, até a possibilidade de ganhos nutricionais nos alimentos.

Acerca dessas asserções, assinale a opção CORRETA:

- a) As duas asserções são proposições verdadeiras, e a segunda é uma justificativa correta da primeira.
- b) As duas asserções são proposições verdadeiras, mas a segunda não é uma justificativa da primeira.
- c) A primeira asserção é uma proposição verdadeira, e a segunda, uma proposição falsa.
- d) A primeira asserção é uma proposição falsa, e a segunda, uma proposição verdadeira.
- e) Tanto a primeira quanto a segunda asserções são proposições falsas.

**2.** Através da fermentação, os fungos, especialmente a levedura, são elementos essenciais na fabricação do pão francês e de bolos. A fermentação é um processo químico, no qual fungos e bactérias realizam a transformação de matéria orgânica em outros produtos e energia, na ausência de oxigênio. O crescimento da massa que ocorre na produção dos pães e bolos resulta da:

- a) Produção de monóxido de carbono.
- b) Liberação da água resultante da reação química.
- c) Concentração alcoólica elevada.
- d) Síntese de glicose e frutose pela levedura.
- e) Liberação de dióxido de carbono.

**3.** Os transgênicos são organismos geneticamente modificados (OGMs). Com o avanço da engenharia genética, surgiu a possibilidade de alterar o DNA de alguns seres vivos com o intuito de potencializar ou criar determinadas características que seriam inviáveis de serem produzidas pela natureza.

A respeito dos OGMs, avalie as afirmativas a seguir:

- I. São organismos majoritariamente estéreis.
  - II. Aumentam a qualidade e a produtividade dos alimentos.
  - III. Contribuem para o aumento da biodiversidade.
- Dentre as alternativas, é correto o que se afirma em:

- a) I, apenas.
- b) II, apenas.
- c) I e II, apenas.
- d) II e III, apenas.
- e) I, II e III.

## Seção 1.2

### Conceitos de biotecnologia e biossegurança

#### Diálogo aberto

Olá, aluno! Daremos continuidade aos estudos da disciplina de Biotecnologia vegetal. A partir de agora você aprenderá sobre os conceitos e as aplicações biotecnológicas, as inovações na biotecnologia vegetal no campo da ciência, as aplicações da biotecnologia vegetal e a biossegurança na agricultura. Para isso, relembremos a situação apresentada no início desta disciplina, aproximando os conteúdos teóricos com aquilo que podemos ver na prática.

Falaremos de Adriano, um consultor de uma empresa de soluções biotecnológicas que trabalha para o setor agrônomico. Essa empresa está interessada em novas fontes de alimentação para ruminantes e gostaria de investir no plantio de palmas forrageiras (espécies de plantas *Opuntia* e *Nopalea*). No entanto, devido à ocorrência de pragas e doenças na região destinada ao cultivo das espécies, existe uma restrição severa em sua propagação vegetativa e, conseqüentemente, há comprometimento da sua exploração. Sabendo que a empresa de consultoria de Adriano foi contratada para contornar esse problema, como deverá agir?

Para que você consiga responder a esses e outros questionamentos sobre as aplicações da biotecnologia vegetal, será apresentado um conteúdo aplicado à sua realidade, de forma contextualizada, no item *Não pode faltar*. Isso o ajudará a entender todo o conteúdo proposto e também a resolver as diferentes situações-problema da seção e suas aplicações. Preparados, vamos lá!

#### Não pode faltar

##### Conceitos e aplicações biotecnológicas

Como estudamos na seção anterior, o termo biotecnologia interliga diferentes áreas do conhecimento e consolida um importante setor estratégico, o biotecnológico. Esse estudo reúne diferentes técnicas e processos de vanguarda do conhecimento científico e tecnológico

a respeito da manipulação de seres vivos, contribuindo para inúmeras soluções significativas para a humanidade.

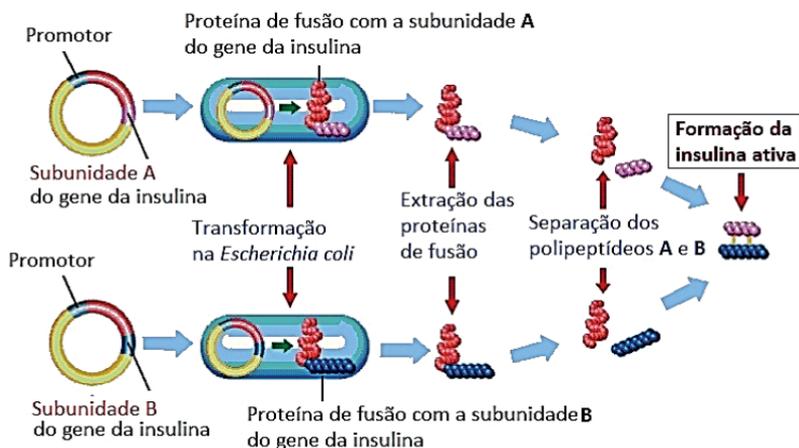
Nesse sentido, foi em 1957, que Skoog e Miller mostraram que a diferenciação de órgãos em vegetais era realizada pelo balanço de hormônios: a auxina e a citocinina. Hoje, hormônios como a auxina e a citocinina, em cultura de tecidos vegetais, regeneram plantas através da presença de material genético. Também se buscam alternativas em métodos de cultura de tecidos para regeneração de "plantas difíceis" em espécies que vivem em ambientes florestais.

Segundo Nabors (2012), foi em 1957 que foi realizada uma pesquisa onde inseriram um gene bacteriano em um sapo, concluindo a universalidade genética entre os seres vivos. Essa descoberta descortinou a ciência para inúmeras possibilidades. Já em 1971, nos Estados Unidos, foi patenteada uma bactéria geneticamente modificada, cuja ação estava ligada ao controle de petróleo derramado nos oceanos.

Em 1973, iniciou-se o estudo da expressão gênica da insulina humana em *Escherichia coli*. Esse fato foi de grande importância aos pacientes diabéticos que não produzem insulina naturalmente (NABORS, 2012). Ainda nesse mesmo campo, a inovação biotecnológica baseada no melhoramento genético que produziu os polipeptídeos de insulina forneceu avanços no que se refere à área médica com foco na indústria farmacêutica, através da criação da tecnologia do DNA recombinante. A técnica do DNA recombinante é o material genético, ou DNA, formado pela união de genes de organismos diferentes, que resultam na combinação de sequências variadas de DNA. Essa tecnologia é muito utilizada na produção da insulina artificial, obtida através da bactéria *Escherichia coli*, sendo geneticamente modificada e de forma muito positiva, capaz de sintetizar o próprio hormônio da insulina. No esquema a seguir, aparece como é feita a produção de insulina, por parte da transformação genética da bactéria *Escherichia coli*.

Figura 1.2 | Esquema do processo de produção de insulina humana via transformação genética de *Escherichia coli*, que produz os polipeptídeos essenciais para a formação da molécula ativa

### PRODUÇÃO DA INSULINA HUMANA



Fonte: Lima (2001, p. 29).

Essas e outras descobertas deram início a uma nova fase relacionada ao melhoramento genético, sendo este assunto classificado como:

- Melhoramento genético convencional: seleção de organismos através da reprodução via fecundação cruzada, sem manipulação genética direta, com base na avaliação fenotípica.
- Melhoramento genético biotecnológico: alteração precisa das características de um organismo ou introdução de novas, por meio da tecnologia do DNA recombinante.



Refleta

Apesar de saber que diferentes fatores biotecnológicos podem trazer um significativo avanço tecnológico e melhoria da saúde da população, devemos sempre lembrar que existe um fator de grande importância nesse assunto: a ética. Para refletir sobre esse assunto, leia o texto de Sanches e Feitosa, intitulado *O impacto ético e social da pesquisa em genética*. Disponível em: <<https://periodicos.pucpr.br/index.php/cienciaanimal/article/view/9303/0>>. Acesso em: 19 set. 2017.

## Inovações na biotecnologia vegetal no campo da ciência

Há aproximadamente 10.000 anos, o homem iniciou a realização de processos de seleção de plantas com base nos estudos do melhoramento genético vegetal. O objetivo principal desses estudos é aumentar a produtividade, a qualidade e a diversidade das espécies já exploradas ou aquelas com indícios de extinção. Devido ao contínuo processo de seleção de plantas para os estudos de melhoramento vegetal, buscava-se uma resposta de quais seriam as melhores e mais viáveis espécies para realização desse estudo, visando sempre ao melhoramento vegetal. Pensava-se, dessa forma, na redução da toxicidade e no aumento de vigor dos vegetais. Foi visto também que algumas plantas utilizadas para consumo tornaram-se mais suscetíveis a doenças e pragas, assim, houve a necessidade de uso de insumos agrícolas e desenvolvimento de tecnologias voltadas para o aumento da produtividade.

Embora existam dados de que a Revolução Verde só tenha surgido na década de 1970, ela representa o conjunto de técnicas propostas para aumentar significativamente a produtividade agrícola, através da redução do custo de manejo e tecnologia de plantio, novos insumos industriais e mecanização. Assim, a tecnologia desenvolvida através da genética vegetal ameniza a necessidade de inovações mecânicas e aplicações de insumos químicos, sobretudo por meio da utilização de sementes geneticamente modificadas em larga escala, com ganhos refletidos em toda a cadeia de produção agrícola e no ambiente. Todos esses fatores colaboram para a melhoria da produção vegetal, da produtividade e de novas técnicas para que se obtenham resultados cada vez melhores no campo, por exemplo: embriões formados em cultura de arroz, ou ainda, hormônios como a giberelina, que é pulverizada sobre uvas, causando alongamento caulinar e crescimento de frutos. O etileno, por sua vez, permite à planta responder ao estresse mecânico, controlando o amadurecimento de frutos e também a abscisão foliar. O melhoramento genético de plantas faz com que estas reajam ao estresse ambiental, no caso de seca, plantas que dificultam ou impedem a ação de herbívoros e patógenos, pois as plantas produzem metabólitos secundários que repelem animais e produzem doenças quando se trata de biotecnologia vegetal.

A cultura de tecidos de plantas é definida como o cultivo de células, tecidos ou órgãos, em condições de assepsia e meios de cultura artificiais, permitindo obter indivíduos resistentes a fatores de

estresse, biótico ou abiótico, ou ainda, com características desejáveis do ponto de vista agrônomo. Essa técnica deu origem a uma gama de aplicações biotecnológicas da área vegetal, tais como: a micropropagação vegetal, a embriogênese somática, o cultivo de meristemas e a variação somaclonal. Além disso, a cultura de tecidos tem um papel preponderante na engenharia genética, pois permite regenerar materiais com genomas inéditos na natureza, através da hibridação somática via fusão de protoplastos e da transformação genética de plantas.

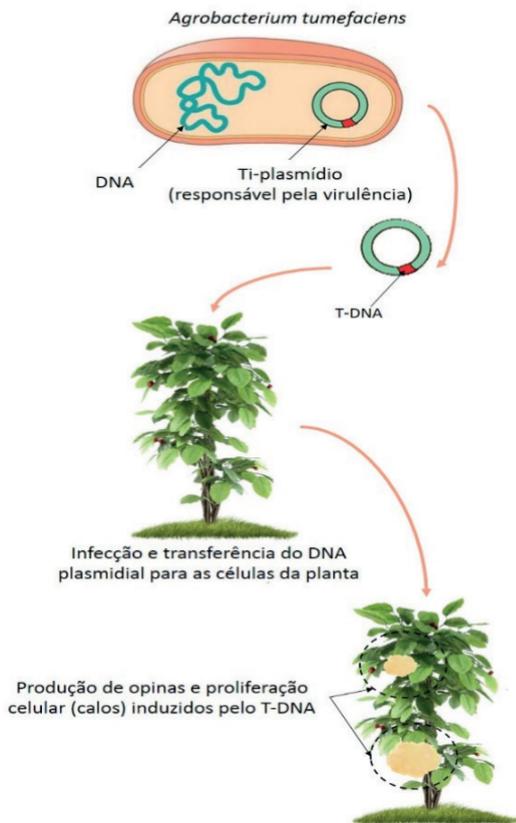


### Exemplificando

Segundo Andrade (2002, p. 14), "a técnica de cultura de tecidos consiste em cultivar meristemas livres de vírus e induzir a formação de material propagativo geneticamente idêntico aos parentais". Essa técnica é usada em espécies de difícil propagação, como plantas do cerrado e ainda se verificarmos exemplos mais perto de nosso dia a dia, podemos citar a limpeza clonal, que é possível em frutas como morango, abacaxi, batata e outras mudas livres de vírus.

Vale a pena mencionar que, em termos gerais, a transformação genética indireta, aquela que utiliza um vetor natural, faz uso de uma bactéria da família *Rhizobium*, a *Agrobacterium tumefaciens*. Assim, a espécie *A. tumefaciens* apresenta mecanismos que lhe permitem detectar e transferir para as células-alvo vegetais uma porção (partícula ou vetor) de DNA, a qual se integra no núcleo da célula vegetal. A partir de então, o fragmento de DNA inserido pela bactéria passa a comandar a maquinaria celular da planta, produzindo, assim, fontes de carbono e azoto (opinas) das quais a bactéria se alimenta. Em termos gerais, a região do DNA bacteriano que a *A. tumefaciens* possui consegue integrar-se na célula vegetal, sendo delimitada por sequências de bases nitrogenadas específicas. Dessa forma, se a região do referido material for removida por meio do uso de enzimas de restrição e no seu lugar forem colocados genes de importância biológica, a bactéria transmitirá à planta-alvo as características dos genes de interesse em questão, tais como resistência à seca ou produção de peptídeos antibacterianos. Essa técnica demonstra um exemplo do mecanismo de ação de transferência de genes por parte de *A. tumefaciens*, como veremos a seguir:

Figura 1.3 | Exemplificação do mecanismo de ação de transferência de genes realizado por *Agrobacterium tumefaciens* na natureza



Fonte: adaptada de Oliveira (2000).

## Aplicações da biotecnologia vegetal

Um dos grandes desafios para o desenvolvimento da agricultura com práticas sustentáveis se dá exatamente na incorporação, no dia a dia da rotina de laboratórios, escolas, empresas e campos, das práticas atuais de biotecnologia voltadas ao melhoramento genético. Nesse contexto, a biotecnologia vegetal apresenta um grande número de aplicações ligadas especialmente a três áreas de atuação: ambiente, saúde e segurança alimentar. A modificação de plantas visando maior resistência e tolerância aos estresses bióticos e abióticos, bem como a utilização eficaz de agroquímicos, a potencialização de produtos e a redução de gastos energéticos são aplicações extremamente relevantes.

Ainda nesse campo, o isolamento de genes provenientes de vírus, fungos, insetos, nematoides e, principalmente, bactérias é visto como estratégia promissora, ao conferir resistência às doenças em plantas. Um exemplo notório é o caso dos genes das endotoxinas, identificados a partir de uma bactéria do solo, *Bacillus thuringiensis*. As endotoxinas são consideradas pesticidas naturais e a sua produção pela planta transgênica pode garantir uma proteção ao ataque de pragas.

Outras estratégias empregadas no desenvolvimento de plantas transgênicas que merecem destaque referem-se ao enriquecimento nutricional de produtos alimentares utilizados em larga escala, e também aquelas ligadas à produção de polímeros biodegradáveis, ou seja, naturais, os quais representam uma justificativa ambiental, pois podem substituir polímeros artificiais, tais como os plásticos. Ainda de grande importância sustentável é a expressão de genes que codificam proteínas terapêuticas produzidas por plantas, sendo uma solução viável com a produção de biomoléculas por meio da cultura de células, usadas nas indústrias de fármacos. Vale lembrar que a manipulação de enzimas-chave em rotas metabólicas através do controle e da intensificação da síntese de moléculas bioativas e também aquelas relacionadas à produção de vacinas em alimentos é destinada às regiões com extremo déficit nutricional.



### Pesquise mais

Vamos pesquisar um pouco mais sobre a soja e a influência da biotecnologia? Leia o artigo *Perspectivas da aplicação da biotecnologia no sistema agroindustrial brasileiro: o exemplo da soja Roundup Ready*, de Zylbersztajn, Lazzarini e Machado Filho. Disponível em: <[http://www.fundacaofia.com.br/PENSA/anexos/biblioteca/26520087486\\_!etsoja.pdf](http://www.fundacaofia.com.br/PENSA/anexos/biblioteca/26520087486_!etsoja.pdf)>. Acesso em: 17 set. 2017.

## A biossegurança na agricultura

Caro aluno, você sabia que a agricultura tem grande relevância para a economia brasileira, pois gera um terço das exportações e do produto interno bruto? E ainda, que a tecnologia do DNA recombinante, também conhecida como engenharia genética, proporcionou uma verdadeira revolução em todo o mundo, inclusive no Brasil?

Nos últimos 35 anos, a aplicação das ferramentas biotecnológicas permitiu a produção de plantas com novas características que

não poderiam ser introduzidas pelas técnicas de melhoramento convencional. Nesse cenário, a biotecnologia tem sido considerada uma das áreas prioritárias para investimentos em pesquisa e inovação, surgindo uma necessidade da definição de critérios diversos quanto à sua regularização e comercialização.

Quando falamos de cultura de tecidos vegetais estamos trabalhando com seleção e reprodução de plantas, que podem produzir quantidades crescentes de alimentos e matéria-prima para uso na indústria.

Ainda no caso de tecidos e células cultivadas *in vitro*, podemos introduzir alterações que acontecem através da ação de agentes físicos ou químicos com maior eficiência do que aqueles encontrados em plantas inteiras. Assim, é notório que as taxas de alterações geradas possam ser grandemente aumentadas e, a partir dessas culturas, pode-se conseguir, por exemplo, a regeneração de plantas com características diferentes. (QUISEN; ANGELO, 2008). Também há a possibilidade de fusão de células dotadas de características diversas, possibilitando novos tipos de combinação, ou combinação de material genético de células oriundas de espécies diferentes. Uma das vantagens da técnica é que é possível obter o material clonado de modo mais rápido em maior quantidade, sendo indicada para a eliminação de doenças ou pragas vegetais.

Para o uso e a obtenção de diferentes tipos de estudos envolvendo clonagem, tornou-se necessária a implantação de normas e leis de biossegurança, que resultam em um conjunto amplo de ações padronizadas que visam à prevenção, à minimização ou à eliminação de riscos inerentes às atividades de pesquisa, produção, ensino, desenvolvimento tecnológico e prestação de serviços.

O termo biossegurança envolve um conjunto de práticas e ações técnicas, dispostas em regulamentações que se destinam à análise e ao manejo de riscos potenciais para o alimento, à saúde humana e animal, ao desenvolvimento saudável de plantas e também para o ambiente. O conceito holístico a que nos remete nesse momento está ligado à relevância do tema para a sustentabilidade da agricultura e dos produtos alimentares, assim como para a proteção dos organismos vivos geneticamente modificados e seus derivados, além do manejo de espécies invasoras exóticas.

De acordo com a Lei nº 11.105, de 2005, que estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvem

organismos geneticamente modificados (OGM e seus derivados), cria-se e define-se a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) como uma instância colegiada multidisciplinar, cuja finalidade é prestar apoio técnico e consultivo, bem como aquele ligado ao estabelecimento de normas técnicas de segurança e pareceres técnicos referentes à proteção da saúde humana, dos organismos vivos e do meio ambiente. Todos esses fatores seguem as regras envolvidas na CNTBio e trabalham com a construção, a experimentação, o cultivo, a manipulação, o transporte, a comercialização, o consumo, o armazenamento, a liberação e o descarte de OGM e derivados.

Segundo essa regulamentação, OGM é um organismo que foi geneticamente modificado, mas não recebeu nenhuma região de outro organismo. Por exemplo, se uma bactéria for modificada geneticamente para expressar um gene por várias vezes, isso não quer dizer que ela seja uma bactéria transgênica, mas apenas um OGM, já que não foi necessário inserir material externo (BRASIL, 2005a).

De acordo com o Decreto nº 5.591, de 22 de novembro de 2005, o organismo transgênico seria aquele que possui uma sequência de material genético DNA (ou parte dele) vindo de outro organismo, podendo ser até de uma espécie diferente. Somente ao inserirmos material genético (RNA/DNA) exógeno em um organismo, é que ele passa a ser considerado transgênico. Não se inclui na categoria de derivado de OGM a conhecida substância pura, obtida por meio de processos biológicos (quimicamente definida), e que não contenha OGM, proteína heteróloga ou o DNA recombinante. São considerados: mutagênese, hibridação de células somáticas e autoclonação natural de organismos não patogênicos.

É importante mencionar, no caso de células-tronco, que somente é permitido o uso de células-tronco embrionárias para fins de pesquisa e terapia, obtidas de embriões humanos produzidos por fertilização in vitro e não utilizados no respectivo procedimento. É mandatório que os embriões sejam inviáveis ou congelados há 3 (três) anos ou mais. Em qualquer caso, é necessário o consentimento dos genitores.

Com relação à utilização de células-tronco vindas de pré-embriões produzidos por reprodução assistida, via fertilização in vitro, ou através de técnicas emergentes de clonagem (clonagem terapêutica), é difícil pensar que estamos delimitados a um conjunto de células, pois estamos falando de vida. A retirada de células-tronco produz o que chamamos

de morte de um "conjunto de células"; a partir deste se produz pré-embriões com fim terapêutico, como fármacos contra patologias graves, por exemplo, a doença de Alzheimer, Parkinson, leucemias. O que torna essa terapia importante é a capacidade das células-tronco de formarem novos tecidos para compor órgãos vitalmente prejudicados.

Ainda nesta unidade enveredaremos de forma mais profunda nas disposições da Lei nº 11.105, bem como no panorama atual sobre a legislação brasileira de biossegurança e comercialização de plantas transgênicas, discutindo as questões de bioética, o processo de liberação de OGM, quais materiais biológicos se enquadram na lei e as perspectivas para o desenvolvimento da biotecnologia moderna aplicada ao setor agrícola.



### Pesquise mais

Caso queira pesquisar mais sobre a Lei nº 11.105, busque informações sobre engenharia genética, OGM, célula germinal humana, processo de clonagem, células-tronco, mutagênese, hibridoma animal, autoclavagem. Disponível em: <<http://www.camara.gov.br/sileg/integras/345638.pdf>>. Acesso em: 17 set. 2017.

## Sem medo de errar

Agora que você já conheceu algumas aplicações da biotecnologia vegetal, você é capaz de analisar a situação-problema sobre o caso de Adriano, um consultor de uma empresa de soluções biotecnológicas para o setor agrônomo? Essa empresa está interessada em novas fontes de alimentação para animais ruminantes e gostaria de investir no plantio de palmas forrageiras (*Opuntia* e *Nopalea*). No entanto, devido à ocorrência de pragas e doenças na região destinada ao cultivo das espécies há uma restrição severa em sua propagação vegetativa e, conseqüentemente, há comprometimento da sua exploração. A empresa de consultoria de Adriano foi contratada. Como será possível contornar esse problema?

Como solução, Adriano sugeriu o emprego da técnica de cultura de tecidos vegetais através da introdução *in vitro* de explantes assépticos oriundos das palmas forrageiras. Desse modo, a micropropagação desses materiais em larga escala, em condições laboratoriais, produz um material livre de patógenos. Após o desenvolvimento completo

in vitro e a sua rustificação em casa de vegetação, as mudas micropropagadas sadias devem ser introduzidas com sucesso na área de plantio da empresa, resolvendo o problema.

## Avançando na prática

### Determinação de plantas transformadas geneticamente para introdução no campo

#### Descrição da situação-problema

Letícia é engenheira agrônoma em uma empresa responsável pela introdução no campo de espécies vegetais que passaram por melhoramento vegetal, proveniente de técnicas biotecnológicas. A empresa tem à disposição uma área para plantio e condução no campo de espécies geneticamente modificadas, autorizada pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio).

Letícia recebeu da área de desenvolvimento e pesquisa em biotecnologia dois lotes:

1º lote: plantas de tomate transformadas com o gene de resistência ao antibiótico agrimicina, obtidas via transformação via *A. tumefaciens*.

2º lote: plantas de milho provenientes de fecundação cruzada via melhoramento genético convencional.

Nesse contexto, qual ou quais lotes deverão ser escolhidos e introduzidos por Letícia na área autorizada pela CTNBio para cultivo de transgênicos?

#### Resolução da situação-problema

Dentre os lotes a serem introduzidos no campo, Letícia autorizou o plantio apenas do 1º lote na área destinada aos transgênicos, visto que a manipulação genética com o vetor intermediário com *A. tumefaciens* caracteriza a obtenção de um OGM pela engenharia genética. O 2º lote trata-se de um processo de melhoramento genético por meio da seleção de genes evidenciados em cada geração, sendo uma atividade habitual para todas as culturas agrônômicas. Conhecendo essas definições e as técnicas biotecnológicas empregadas pela equipe de desenvolvimento e pesquisa, Letícia introduziu corretamente apenas o 1º lote na área resguardada CTNBio.

## Faça valer a pena

**1.** A cultura de tecidos de plantas é definida como o cultivo de células, tecidos ou órgãos, em condições de assepsia e meios de cultura artificiais, que permitem obter indivíduos resistentes a fatores de estresse, biótico ou abiótico, ou com características desejáveis do ponto de vista agrônomo.

De acordo com a definição apresentada, analise as seguintes asserções:

I. A técnica do cultivo *in vitro* de plantas deu origem a uma gama de aplicações biotecnológicas da área vegetal.

PORQUE

II. A micropropagação, a embriogênese somática, o cultivo de meristemas e a variação somaclonal, que são fenômenos e procedimentos inerentes à cultura de tecidos, permitem que o espectro de atuação da biotecnologia de plantas seja bem amplo.

Acerca dessas asserções, assinale a opção CORRETA:

- a) As duas asserções são proposições verdadeiras, e a segunda é uma justificativa correta da primeira.
- b) As duas asserções são proposições verdadeiras, mas a segunda não é uma justificativa da primeira.
- c) A primeira asserção é uma proposição verdadeira, e a segunda, uma proposição falsa.
- d) A primeira asserção é uma proposição falsa, e a segunda, uma proposição verdadeira.
- e) Tanto a primeira quanto a segunda asserções são proposições falsas.

**2.** Há algumas décadas, a biotecnologia vegetal se tornou uma ferramenta notável e criativa que desenvolveu uma série de novos materiais, expressando potenciais que jamais seriam obtidos por meio do melhoramento genético convencional.

Nesse contexto, podemos elencar as seguintes conquistas realizadas pela biotecnologia vegetal, sobretudo pela engenharia genética:

I. Desenvolvimento de cereais enriquecidos com proteínas e vitaminas e produção de vacinas em alimentos.

II. Produção de polímeros biodegradáveis.

III. Codificação de proteínas terapêuticas produzidas por plantas e síntese em larga escala de moléculas bioativas.

IV. Expressão de características fenotípicas desejáveis obtidas por sucessivos cruzamentos no campo.

Agora, assinale a alternativa CORRETA:

- a) Apenas as afirmativas I e III estão corretas.
- b) Apenas as afirmativas I e IV estão corretas.
- c) Apenas as afirmativas II e III estão corretas.

- d) Apenas as afirmativas I, II e III estão corretas.  
e) Apenas as afirmativas II, III e IV estão corretas.

**3.** A Lei de Biossegurança, Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005, estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam organismos geneticamente modificados. Para os fins dessa lei, considera-se atividade de uso comercial de OGM e seus derivados a que não se enquadra como atividade de pesquisa, e que trata do cultivo, da produção, da manipulação, do transporte, da transferência, da comercialização, da importação, da exportação, do armazenamento, do consumo, da liberação e do descarte de OGM e seus derivados para fins comerciais.

Analise as afirmativas a seguir sobre os itens considerados pela Lei de Biossegurança e marque V para verdadeiro ou F para falso:

- ( ) Organismo é toda entidade biológica capaz de reproduzir ou transferir material genético, inclusive vírus e outras classes que venham a ser conhecidas.  
( ) O DNA (ácido ribonucleico) e o RNA (ácido desoxirribonucleico) compõem o material genético que contém informações determinantes dos caracteres hereditários transmissíveis à descendência.  
( ) A engenharia genética é atividade de produção e manipulação de moléculas de DNA/RNA recombinante.  
( ) Organismo geneticamente modificado (OGM) é aquele cujo material genético inserido é amplamente expresso no fenótipo, e não somente aquele que tenha o seu genoma alterado.  
( ) A clonagem constitui o processo de reprodução assexuada, produzida artificialmente, baseada em um único patrimônio genético, com ou sem utilização de técnicas de engenharia genética.

Agora, assinale a alternativa que apresenta a sequência CORRETA:

- a) V; V; F; V; F.  
b) F; F; V; V; V.  
c) V; F; F; F; V.  
d) V; F; V; F; V.  
e) F; F; V; F; V.

# Seção 1.3

## Normas e leis de biossegurança

### Diálogo aberto

Olá, aluno! Seja bem-vindo à terceira seção de estudos desta unidade. A partir de agora você iniciará seus estudos sobre normas e leis de biossegurança. Conhecerá, nesta seção, suas definições, aspectos e atribuições que concernem à Lei nº 11.105, bem como suas características e instâncias institucionais.

Relembraremos a situação hipotética que foi apresentada no item Convite ao estudo, que visa aproximar os conteúdos teóricos com a prática profissional. Mariana, uma bióloga que trabalha na área de introdução no campo de OGMs (organismos geneticamente modificados) de uma empresa de biotecnologia do setor agrônomo, recebeu da área de desenvolvimento uma série de plantas transformadas de tomate (*Solanum lycopersicum*) para introdução do plantio no campo.

Dentre os genótipos de tomate a serem introduzidos no campo, Mariana notou que um grupo de plantas era composto por machos com florescências vistosas e o outro grupo não apresentava florescências, sendo composto por machos estéreis e fêmeas. Ao observar as normas e as leis de biossegurança impostas pela CTNBio para o manejo de risco de fluxo gênico, Mariana teve o cuidado de atender todas as condições, por exemplo, o isolamento espacial e temporal entre as espécies de tomate sexualmente compatíveis e o uso de bordaduras de plantas incompatíveis

Em razão disso, entre os materiais examinados por Mariana, quais deveriam ser autorizados para a introdução do plantio no campo?

Para que você consiga responder esses e outros questionamentos sobre as normas e as leis de biossegurança, serão apresentados de forma contextualizada no item Não pode faltar os conteúdos pertinentes a este tema.

Vamos lá, bons estudos!

## Não pode faltar

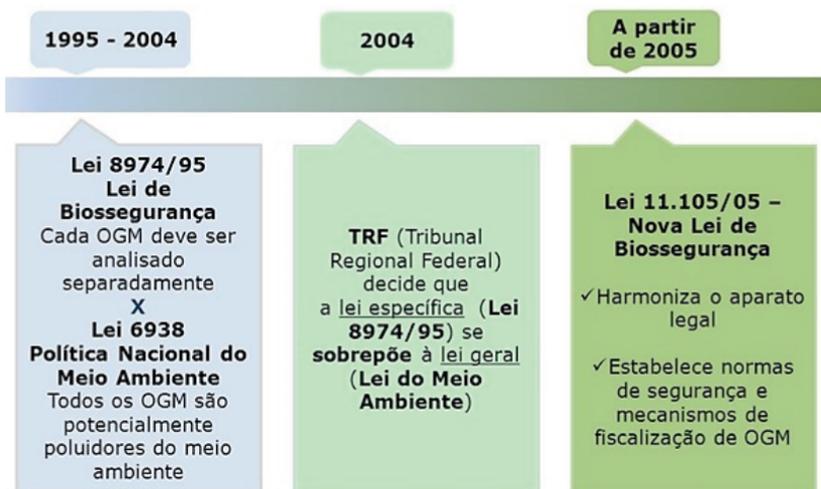
Caro estudante, como vimos na seção anterior, o conceito de biossegurança envolve um conjunto de práticas e ações técnicas, dispostas em regulamentações que se destinam à prevenção, à análise e ao manejo de riscos potenciais para o alimento, à saúde humana e animal, ao desenvolvimento adequado de plantas e também para a preservação do meio ambiente.

Visando ao avanço científico na área de biossegurança, a proteção à vida e à saúde humana, animal e vegetal em consonância com a necessidade do estabelecimento de normas regulatórias, surgiram nas últimas décadas, período em que a comunidade científica iniciou os debates quanto aos possíveis efeitos éticos, sociais e tecnológicos da biotecnologia, as técnicas relacionadas à tecnologia de DNA recombinante, envolvendo diferentes esferas da sociedade.

### A Lei nº 11.105

A Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005, também conhecida como Lei de Biossegurança, foi um marco regulatório da legislação nacional, a qual estabelece as normas de segurança e os mecanismos de fiscalização de atividades (a construção, o cultivo, a produção, a manipulação, o transporte, a transferência, a importação, a exportação, o armazenamento, a pesquisa, a comercialização, o consumo, a liberação no meio ambiente e o descarte), as quais envolvem organismos geneticamente modificados, os OGM, que visam à regulamentação do uso de organismos geneticamente modificados.

Figura 1.4 | Progressão regulatória até a consolidação da Lei nº 11.105 – Nova Lei de Biossegurança



Fonte: <<http://ctnbio.mcti.gov.br/leis/>>. Acesso em: 7 out. 2017.

A Lei de Biossegurança institui a criação e a reestruturação das instâncias colegiadas multidisciplinares: Conselho Nacional de Biossegurança – CNBS e a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio, ambas dispostas sobre a Política Nacional de Biossegurança – PNB. A finalidade da criação de tais instâncias é fornecer apoio técnico consultivo, bem como aquele ligado ao estabelecimento de normas técnicas de segurança e pareceres técnicos referentes à proteção da saúde humana, dos organismos vivos e do meio ambiente.

Um ponto importante a ser destacado com relação a esta Lei é a definição das atividades que são consideradas estritamente de pesquisa, diferenciando-as daquelas voltadas para o uso comercial de OGMs. De acordo com a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (BRASIL, 2005a), considera-se atividade de pesquisa aquelas realizadas em laboratório, sob regime de contenção ou campo, como parte do processo de obtenção de OGM e seus derivados ou de avaliação da biossegurança de OGM e seus derivados, o que engloba, no âmbito experimental, a construção, o cultivo, a manipulação, o transporte, a transferência, a importação, a exportação, o armazenamento, a liberação no meio ambiente e o descarte de OGM e seus derivados. Por outro lado, são consideradas atividades de uso comercial de OGM e seus derivados as atividades que tratam do cultivo, da produção,

da manipulação, do transporte, da transferência, da comercialização, da importação, da exportação, do armazenamento, do consumo, da liberação e do descarte de OGM e seus derivados para fins comerciais.

Desde que não impliquem a utilização de OGM como receptor ou doador de caracteres genéticos, alguns materiais provenientes de técnicas biotecnológicas não se enquadram nessa categoria. Os OGMs são aqueles resultantes de hibridação de células somáticas, autoclonagem natural e mutagênese. A lei que envolve pesquisa com OGM ainda contempla estudos com células-tronco embrionárias humanas para fins medicinais, produzidas *in vitro*.



### Exemplificando

Quantas vezes você já ouviu falar do uso de células-tronco embrionárias em humanos? A Lei nº 11.105, de março de 2015, autoriza a pesquisa com células-tronco embrionárias. Assim, o cultivo de células-tronco obtidas do cordão umbilical de uma criança, ou ainda do quadril de um adulto pode servir para que seja usada na ocorrência de doenças neurodegenerativas, pessoas com lesões na coluna cervical que deixaram de andar, podendo inocular essas células-tronco em pacientes debilitados, originando um novo tecido, órgãos, devolvendo as funções ora perdidas (ROCHA, 2008).

Segundo a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (BRASIL, 2005a), para os efeitos desta lei, entende-se por tecnologias genéticas de restrição do uso todo e qualquer processo de intervenção humana para geração ou multiplicação de plantas geneticamente modificadas para produzir estruturas reprodutivas estéreis, bem como qualquer forma de manipulação genética que vise à ativação ou desativação de genes relacionados à fertilidade das plantas por indutores químicos externos.

Agora, com base na Figura 1.5, conferiremos algumas definições presentes na Lei nº 11.105.

A Lei de Biossegurança – Lei nº 11.105/2005, de 24 de março de 2005, visa regulamentar os incisos II, IV e V do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam organismos geneticamente modificados (OGM) e seus derivados. Cria-se, dessa forma, o Conselho Nacional de Biossegurança (CNBS), reestruturando a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), dispendo sobre a Política Nacional

de Biossegurança (PNB), que revoga a Lei nº 8.974, de 5 de janeiro de 1995, e a Medida Provisória n. 2.191-9, de 23 de agosto de 2001, assim como os artigos. 5º, 6º, 7º, 8º, 9º, 10º e 16º da Lei nº 10.814, de 15 de dezembro de 2003, dando outras providências.

### **Seguem algumas definições sobre os principais conceitos biológicos presentes na Lei nº 11.105:**

**Organismo:** toda entidade biológica capaz de reproduzir ou transferir material genético, inclusive vírus e outras classes que venham a ser conhecidas.

**Ácido desoxirribonucleico – DNA, ácido ribonucleico – RNA:** material genético que contém informações determinantes dos caracteres hereditários transmissíveis à descendência.

**Moléculas de DNA/RNA recombinante:** moléculas manipuladas fora das células vivas mediante a modificação de segmentos de DNA/RNA natural ou sintético e que possam se multiplicar em uma célula viva.

**Engenharia genética:** atividade de produção e manipulação de moléculas de DNA/RNA recombinante.

**Organismo geneticamente modificado (OGM):** organismo cujo material genético-DNA/RNA tenha sido modificado por qualquer técnica de engenharia genética.

**Derivado de OGM:** produto obtido de OGM e que não possui capacidade autônoma de replicação ou que não contenha forma viável de OGM.

**Clonagem:** processo de reprodução assexuada, produzida artificialmente, baseada em um único patrimônio genético, com ou sem utilização de técnicas de engenharia genética.

**Célula-tronco embrionária:** células de embrião que apresentam a capacidade de se transformar em células de qualquer tecido de um organismo (BRASIL, 2005a).



### **Assimile**

O Conselho Nacional de Biossegurança (CNBS), criado pelo art. 8º da Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005, e regulamentado pelo Decreto nº 5.591, de 22 de novembro de 2005, é um órgão de assessoramento

superior, composto pelo presidente da República e seus ministros, sendo responsável pela implementação da Política Nacional de Biossegurança, também conhecida como PNB.

Compete ao CNBS definir as diretrizes que determinam as ações dos órgãos e entidades federais, analisar os pedidos de liberação para uso comercial de OGM e seus derivados e decidir, sobretudo com base em manifestação da CTNBio, sobre os processos relativos às atividades que envolvam o uso comercial de OGM e seus derivados.

### **Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio**

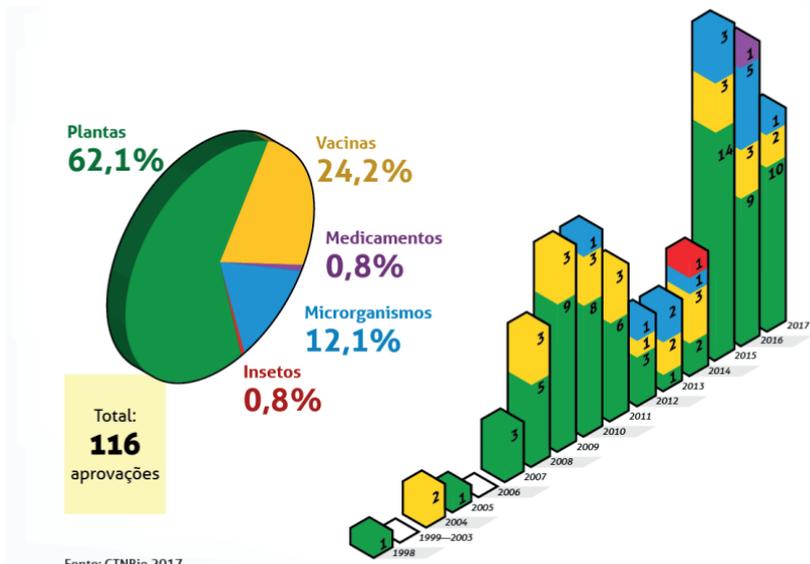
A Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) integra o Ministério da Ciência e Tecnologia. É a instância colegiada multidisciplinar que presta apoio consultivo e deliberativo ao Governo Federal. A CTNBio é a autoridade nacional competente que propõe a Política Nacional de Biossegurança, estabelece normas técnicas de segurança e pareceres técnicos referentes à autorização para atividades que envolvam pesquisa e uso comercial de OGM e seus derivados. Além disso, com o intuito de incrementar a capacitação para a proteção da saúde humana, dos animais, das plantas e do meio ambiente, a CTNBio é responsável pelo suporte, acompanhamento, desenvolvimento e progresso técnico/científico nas áreas de biossegurança, biotecnologia e bioética.

De acordo com a Lei nº 11.105 – Lei de Biossegurança, as principais atribuições da CTNBio são:

- Propor a Política Nacional de Biossegurança.
- Acompanhar o desenvolvimento e o programa técnico e científico na Biossegurança e em áreas afins, objetivando a segurança dos consumidores e da população em geral, com permanente cuidado à proteção do meio ambiente.
- Relacionar-se com instituições voltadas para a engenharia genética e a biossegurança a nível nacional e internacional.
- Propor o Código de Ética de Manipulações Genéticas.
- Estabelecer normas e regulamentos relativos às atividades e projetos que contemplam construção, cultivo, manipulação, uso, transporte, armazenamento, comercialização, consumo, liberação e descarte relacionados à OGM.

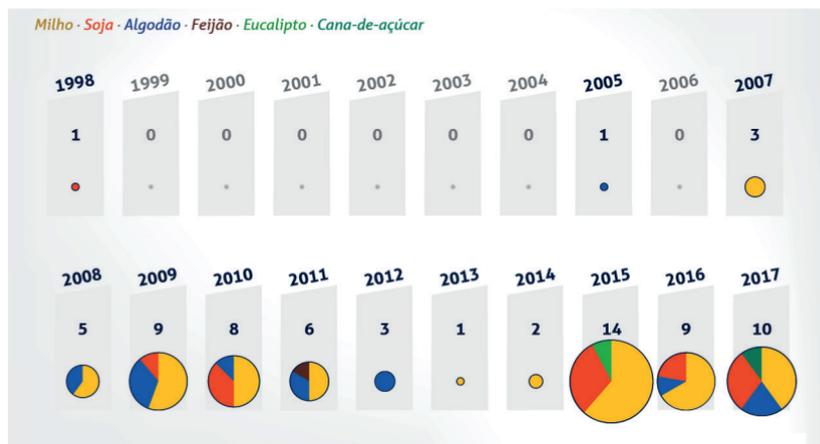
- Classificar os OGMs segundo o grau de risco, definindo os níveis de biossegurança a eles aplicados e às atividades consideradas insalubres e perigosas.
- Estabelecer os mecanismos de funcionamento das Comissões Internas de Biossegurança (CIBios) no âmbito de cada instituição que se dedique ao ensino, à pesquisa, ao desenvolvimento e à utilização das técnicas de engenharia genética.
- Emitir parecer técnico sobre os projetos relacionados a OGM pertencentes ao Grupo II, conforme definido no Anexo 1 da Lei nº 8.974, de 1995, encaminhando-o aos órgãos competentes.
- Apoiar tecnicamente os órgãos competentes no processo de investigação de acidentes e de enfermidades verificadas no curso dos projetos e das atividades na área de engenharia genética, bem como na fiscalização e monitoramento desses projetos e atividades.
- Emitir parecer técnico prévio conclusivo sobre qualquer liberação de OGM no meio ambiente, encaminhando-o ao órgão competente.
- Divulgar no Diário Oficial da União, previamente ao processo de análise, extrato dos pleitos que forem submetidos à sua aprovação, referentes à liberação de OGM no meio ambiente, excluindo-se as informações sigilosas de interesse comercial, objeto de direito de propriedade intelectual, apontadas pelo proponente e assim por ele consideradas.
- Emitir parecer técnico prévio conclusivo sobre registro, uso, transporte, armazenamento, comercialização, consumo, liberação e descarte de produto contendo OGM ou derivados, encaminhando-o ao órgão de fiscalização competente.

Figura 1.5 | Número de produtos desenvolvidos aprovados pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio entre 1998-2017



Fonte: <<http://cib.org.br/wp-content/uploads/2017/08/2017-08-grafico-ctnbio-aprovacoes-pt.png>>. Acesso em: 10 out. 2017.

Figura 1.6 | Aprovação de culturas geneticamente modificadas no Brasil entre 1998 e 2017



## Classificação de risco de OGMs

A Resolução Normativa da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança nº 2, de 27 de novembro de 2006, dispõe sobre a classificação de riscos de OGM e os níveis de biossegurança a serem

aplicados nas atividades e projetos com OGM e seus derivados em contenção. A classificação de risco de um determinado organismo, específica para cada país em decorrência da realidade epidemiológica regional, está baseada no potencial risco à saúde do ser humano, à sociedade e ao meio ambiente. A Resolução Normativa 2 aponta a classificação dos riscos dos OGMs, promovendo o agrupamento dos organismos em classes de 1 a 4, que aparecem a seguir:

### **Classificação de risco dos OGMs, de acordo com a Resolução Normativa 2.**

**Risco de Classe 1 (referente ao baixo risco individual e baixo risco para a coletividade):** o OGM que contém sequências de material genético DNA/RNA de organismo doador e receptor que não causem agravos à saúde humana e animal, além de efeitos adversos aos vegetais e ao meio ambiente.

**Classe de Risco 2 (moderado risco individual e baixo risco para a coletividade):** os OGMs que contém sequências de DNA/RNA de organismo doador ou receptor com moderado risco de agravo à saúde humana e animal, que tenha baixo risco de disseminação, causando efeitos adversos aos vegetais e ao meio ambiente.

**Classe de Risco 3 (alto risco individual e risco moderado para a coletividade):** o OGM que contém sequências de DNA/RNA de organismo doador ou receptor, com alto risco de agravo à saúde humana e animal, que tenha baixo ou moderado risco de disseminação e de causar efeitos adversos aos vegetais e ao meio ambiente.

**Classe de Risco 4 (alto risco individual e alto risco para a coletividade):** o OGM que contém sequências de DNA/RNA de organismo doador ou receptor com alto risco de agravo à saúde humana e animal, que tenha elevado risco de disseminação e de causar efeitos adversos aos vegetais e ao meio ambiente. Fonte: Disponível em: <<http://www2.fcfar.unesp.br/Home/CIBio/ResolucaoNormativa02.pdf>>. Acesso em: 22 out. 2017.



## Pesquise mais

Desde que foi sancionada a 1ª Lei de Biossegurança, em 1995, o Conselho Nacional de Saúde (CNS), o Conselho Nacional de Biossegurança (CNBS) e a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) divulgam Resoluções Normativas que visam adequar a Lei nº 11.105 às novas condições, desafios e inovações tecnológicas não previstas durante a sua criação. Para melhor compreensão, acesse o link da CTNBio e fique por dentro das **Resoluções Normativas**. Disponível em: <<http://ctnbio.mcti.gov.br/resolucoes-normativas>>. Acesso em: 11 out. 2017.



## Refleta

Como você verificou na leitura das características da Lei Brasileira de Biossegurança, apresentadas anteriormente, além de se tratar de um assunto muito polêmico, a lei concentra-se substancialmente na regulamentação dos organismos transgênicos destinados à agricultura e, em segundo plano, nas pesquisas que empregam células-tronco para fins medicinais. Será que todos os questionamentos da sociedade quanto à biossegurança estão de fato contemplados em nossa legislação?

A Lei nº 11.105 é muito restrita quando comparada às leis análogas de outros países que tratam o tema biossegurança. Tais leis contemplam de forma mais abrangente, não somente assuntos relacionados à bioproteção, mas também incorporando tecnologias emergentes, como as nanotecnologias.

Portanto, o refinamento da Lei Brasileira de Biossegurança passa a ser um expediente recorrente, sendo necessária a sua atualização constante, progredindo com relação à regulamentação desta lei no mesmo compasso das inovações tecnológicas e desafios contemporâneos.

## Sem medo de errar

Agora que você já adquiriu o conhecimento sobre as Normas e a Lei de Biossegurança (Lei nº 11.105), lembraremos o caso de Mariana, uma bióloga que trabalha na área de OGMs (organismos geneticamente modificados) de uma empresa de biotecnologia do setor agrônomo, que recebeu da área de desenvolvimento uma série de plantas transformadas de tomate (*Solanum lycopersicum*) para o seu plantio no campo.

Ao observar as Normas e as Leis de Biossegurança impostas pela CTNBio para o manejo de risco de fluxo gênico, Mariana teve o cuidado de atender todas as condições, por exemplo, o isolamento espacial e temporal entre as espécies de tomate sexualmente compatíveis e o uso de bordaduras de plantas incompatíveis.

Dentre os genótipos de tomate a serem introduzidos no campo, Mariana notou que um grupo de plantas era composto por machos com florescências vistosas e o outro grupo não apresentava florescência, com fêmeas e machos estéreis.

Em razão disso, entre os materiais examinados por Mariana, mesmo respeitando o isolamento espacial previsto, fluxo gênico e uso de bordaduras de plantas incompatíveis regulamentados pela CTNBio, somente o grupo composto por machos estéreis e fêmeas deveriam ser autorizados para a introdução no campo. A introdução do grupo de plantas de tomate composto por machos com florescências não é recomendada devido a possível dispersão de pólen proveniente desse material transgênico, o qual foi devolvido à área de desenvolvimento para as medidas corretivas adequadas.

## Avançando na prática

### Classificação de risco de eucalipto transgênico

#### Descrição da situação-problema

Cláudio, membro da Comissão Interna de Biossegurança (CIBio), é pesquisador de uma empresa de biotecnologia florestal que utiliza o método de transformação genética via agrobactéria, visando, sobretudo, a inserção de genes exógenos em espécies economicamente viáveis para o aumento da produtividade industrial (aumento da densidade da madeira e proporção de celulose, resistência e tolerância a patógenos).

A empresa de Cláudio desenvolveu uma planta transgênica a partir do híbrido de eucalipto (*E.grandis* x *E.urophylla*), após receber um gene de *Arabidopsis thaliana*, que faz com que as células do eucalipto depositem mais celulose na formação da parede celular, resultando em um maior volume de madeira.

Assim, para possibilitar uma melhor avaliação do material desenvolvido, Cláudio foi indicado para analisar se o híbrido de eucalipto geneticamente modificado pode ou não causar agravos à saúde humana e animal, e também evitar efeitos adversos aos vegetais e ao meio ambiente.

Com base na classificação de risco dos OGMs, regulamentada pela CTNBio, em qual classe o híbrido de eucalipto transgênico deve ser inserido por Cláudio?

### Resolução da situação-problema

Cláudio inseriu o material desenvolvido na Classe de Risco 1, pois, de acordo com a Resolução Normativa nº 2 da CTNBio, as atividades de pesquisa com o híbrido de eucalipto geneticamente modificado apresentam baixo risco, tanto na esfera individual quanto na coletiva, autorizando, assim, o processo de liberação a ser protocolado pela empresa à CTNBio.

### Faça valer a pena

**1.** A Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) integra o Ministério da Ciência e Tecnologia, é instância colegiada multidisciplinar que presta apoio consultivo e deliberativo ao Governo Federal.

Analise as afirmativas a seguir sobre as principais atribuições da CTNBio e marque V para verdadeiro ou F para falso:

( ) Propor a Política Nacional de Biossegurança.

( ) Acompanhar o desenvolvimento e o programa técnico e científico na biossegurança.

( ) Estabelecer normas e regulamentos relativos às atividades e projetos que contemplem ações e pesquisa relacionadas à OGM.

( ) Classificar os OGMs segundo o grau de risco.

( ) Emitir parecer técnico prévio conclusivo sobre qualquer liberação de OGM no meio ambiente.

Agora, assinale a alternativa que apresenta a sequência CORRETA:

a) V; V; F; V; F.

d) V; F; F; F; V.

b) F; F; V; V; V.

e) V; V; V; V; V.

c) V; F; V; F; V.

**2.** A Lei de Biossegurança institui a criação e a reestruturação das instâncias colegiadas multidisciplinares: Conselho Nacional de Biossegurança (CNBS) e a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), ambas dispostas sobre a Política Nacional de Biossegurança (PNB).

Analise as seguintes asserções:

I. A finalidade da criação do Conselho Nacional de Biossegurança (CNBS) e da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) é fornecer apoio técnico consultivo.

PORQUE

II. A Lei de Biossegurança tem por obrigação o estabelecimento de normas técnicas de segurança e pareceres referentes à proteção da saúde humana, dos organismos vivos e do meio ambiente.

Acerca dessas asserções, assinale a opção CORRETA:

- a) As duas asserções são proposições verdadeiras, e a segunda é uma justificativa correta da primeira.
- b) As duas asserções são proposições verdadeiras, mas a segunda não é uma justificativa da primeira.
- c) A primeira asserção é uma proposição verdadeira, e a segunda, uma proposição falsa.
- d) A primeira asserção é uma proposição falsa, e a segunda, uma proposição verdadeira.
- e) A primeira e a segunda asserções são proposições falsas.

**3.** A classificação de risco de um determinado organismo, específica para cada país em decorrência da realidade epidemiológica regional, está baseada no potencial risco direto à saúde do ser humano individualmente, à sociedade e ao meio ambiente. A classificação dos agentes etiológicos com base no risco apresentado promove o agrupamento dos organismos em classes de 1 a 4.

Associe a coluna 1, as classes de risco, com as respectivas definições, presentes na coluna 2:

Coluna 1:

- 1. Classe de risco 1.
- 2. Classe de risco 2.
- 3. Classe de risco 3.
- 4. Classe de risco 4.

Coluna 2:

- ( ) OGM que contém sequências de DNA/RNA de organismo doador e receptor que não causem agravos à saúde humana e animal e efeitos adversos aos vegetais e ao meio ambiente.
- ( ) OGM que contém sequências de DNA/RNA de organismo doador ou receptor, com alto risco de agravo à saúde humana e animal, que tenha elevado risco de disseminação e de causar efeitos adversos aos vegetais e ao meio ambiente.
- ( ) OGM que contém sequências de DNA/RNA de organismo doador ou receptor, com alto risco de agravo à saúde humana e animal, que tenha baixo ou moderado risco de disseminação e de causar efeitos adversos aos vegetais e ao meio ambiente.
- ( ) OGM que contém sequências de DNA/RNA de organismo doador ou receptor, com moderado risco de agravo à saúde humana e animal, que tenha baixo risco de disseminação e de causar efeitos adversos aos vegetais e ao meio ambiente.

Agora, assinale a alternativa que apresenta a sequência correta da associação:

- a) 1; 4; 3; 2.
- b) 3; 2; 4; 1.
- c) 2; 3; 1; 4.
- d) 4; 1; 2; 3.
- e) 1; 3; 2; 4.

# Referências

- AMBO, M. et al. Genetic linkage maps of chicken chromosomes 6, 7, 8, 11 and 13 from a Brazilian resource population. **Scientia Agricola**, [s.l.], v. 65, p. 447-52, 2008.
- AMORIM, H. V.; LEÃO, R. M. **Fermentação alcoólica**: ciência e tecnologia. Piracicaba: Fermentec, 2005.
- ANDRADE, S. R. M. **Princípio da cultura de tecidos vegetais**. EMBRAPA-Documento 58, 2002. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/546466/1/doc58.pdf>>. Acesso em: 17 nov. 2017.
- AQUASTAT – FAO. 2010. Disponível em: <<http://www.fao.org/nr/water/aquastat/main/index.stm>>. Acesso em: 2 out. 2017.
- ATLAS, R. M.; UNTERMAN, R. Bioremediation. In: DEMAIN, A. L.; DAVIES, J. E. (Ed.) **Industrial microbiology and biotechnology**. [s.l.]: ASM Press, 1999. p. 666-81.
- BIOTECNOLOGIA avança no Brasil. **Agroanalysis**, [s.l.], v. 31, n. 1, p. 29, jan. 2011.
- BRASIL. **Resolução Normativa nº 2, de 27 de novembro de 2006**. Disponível em: <<http://www2.fcfar.unesp.br/Home/CIBio/ResolucaoNormativa02.pdf>>. Acesso em: 23 nov. 2017.
- \_\_\_\_\_. **Decreto nº 5.591, de 22 de novembro de 2005**. Regulamenta dispositivos da Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005, que regulamenta os incisos II, IV e V do § 1º do art. 225 da Constituição, e dá outras providências. 2005c. Disponível em: <[https://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2004-2006/2005/Decreto/D5591.htm](https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2005/Decreto/D5591.htm)>. Acesso em: 17 nov. 2017.
- \_\_\_\_\_. Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005. Regulamenta os incisos II, IV e V do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam organismos geneticamente modificados – OGM e seus derivados, cria o Conselho Nacional de Biossegurança – CNBS, reestrutura a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio, dispõe sobre a Política Nacional de Biossegurança – PNB, revoga a Lei nº 8.974, de 5 de janeiro de 1995, e a Medida Provisória nº 2.191-9, de 23 de agosto de 2001, e os arts. 5º, 6º, 7º, 8º, 9º, 10 e 16 da Lei nº 10.814, de 15 de dezembro de 2003, e dá outras providências. Brasília, 24 de março de 2005a; 184º da Independência e 117º da República. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2004-2006/2005/lei/l11105.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/lei/l11105.htm)>. Acesso em: 20 set. 2017.
- \_\_\_\_\_. Ministério da Ciência e Tecnologia. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. **Cadernos de biossegurança**: legislação. Brasília, DF: MCT, 2005b.
- \_\_\_\_\_. Ministério do Meio Ambiente. **Convenção sobre diversidade biológica**. Brasília: MMA, 2000. Disponível em: <[http://www.mma.gov.br/estruturas/chm/\\_arquivos/cdbport.pdf](http://www.mma.gov.br/estruturas/chm/_arquivos/cdbport.pdf)>. Acesso em: 15 nov. 2017.
- BROOKES, G.; BARFOOT, P. **Co-existence of GM and non GM crops**: case study of maize grown in Spain. London: PG Economics Ltd., 2003.
- CARRER, H.; BARBOSA, A. L.; RAMIRO, D. A. Biotecnologia na agricultura. **Estud. av.**, São Paulo, v. 24, n. 70, 2010.

- CARTER, C. A.; GRUÉRE, G. P.. International approval and labeling regulations of genetically modified food in major trading countries. In: JUST, R.; ALSTON, J. M.;
- COLLIN, H. A. Secondary product formation in plant tissue cultures. **Plant Growth Regul.**, [s.l.] v.3 4, 2001. p. 119-134.
- COSTA, M. A. F. **Biossegurança**: segurança química básica para ambientes hospitalares e biotecnológicos. São Paulo: Santos, 1996.
- COSTA, M. A. F.; COSTA, M. F. B. **Biossegurança geral**: para cursos técnicos da área de saúde. Rio de Janeiro: Publit, 2009.
- CTNBIO. **Resolução Normativa nº 4**, de 16 de agosto de 2007. Disponível em: <<http://agrobiobrasil.org.br/wp-content/uploads/2013/11/RESOLU%C3%87%C3%83O-NORMATIVA-N%C2%BA-4-DE-16-DE-AGOSTO-DE-2007.pdf>>. Acesso em: 15 nov. 2017.
- DEMONTE, M. et al. Impact of new technologies on agricultural production systems: the cases of agricultural biotechnology and automatic milking. In: BOUQUIAUX, J. M.; LAUWERS, L.; VIAENE, J. (Ed.). **New technologies and sustainability**. Brussels: CLE-CEA, 2001. p. 11-38.
- DECRETO Nº 5.591, DE 22 DE NOVEMBRO DE 2005. Regulamenta dispositivos da Lei no 11.105, de 24 de março de 2005, que regulamenta os incisos II, IV e V do § 1o do art. 225 da Constituição, e dá outras providências Disponível em< [https://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2004-2006/2005/Decreto/D5591.htm](https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2005/Decreto/D5591.htm)> Acesso: 17 nov. 2017.
- DOMINGO, J. L.; GINÉBORDONABA, J. A. Literature review on the safety assessment of genetically modified plants. **Environ Int.**, v.4, n. 37, p. 734-742, 2011.
- DUNWELL, J. M. Transgenic approaches to crop improvement. **Journal of Experimental Botany**, 51, 2000.
- GARCIA, S. B. F. **A proteção jurídica das cultivares no Brasil**: plantas transgênicas e patentes. Curitiba: Juruá, 2004.
- GUSMÃO, A. O. M.; SILVA, A. R. S.; MEDEIROS, M. O. A biotecnologia e os avanços da sociedade. **Biodiversidade**, v.16, n. 1: p. 135-154. 2017.
- KALAITZANDONAKES, N.; BIJMAN, J. Who is driving biotechnology acceptance? **Nature Biotechnology**, n. 21, p. 366-369, 2003.
- LIMA, B. D. A produção de insulina humana por engenharia genética. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 4, n. 23, p. 28-31, 2001.
- MELO MOURA, W. Aspectos legais da proteção de cultivares transgênicos. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 30, n. 253, p. 33-43, 2009.
- NABORS, M. W. **Introdução à botânica**. Rio de Janeiro: ROCA, 2012.
- NAPOLEÃO, B. A. A biotecnologia e o futuro da agricultura brasileira. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 30, n. 253, p. 3, 2009.
- OLIVEIRA, C. S. et al. Avanços e aplicações da bioengenharia tecidual. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, 9(Supl.1):28-36, 2010.

OLIVEIRA, M. M. Aplicações e avanços na área da biotecnologia vegetal. **Boletim de Biotecnologia**, [on-line], n. 66, p. 22-27. 2000. Disponível em: <dequim.ist.utl.pt/bbio>. Acesso em: 10 nov. 2017.

PAIVA, R. **Biotecnologia animal**: método usado para produzir cabras transgênicas clonadas no Brasil. 2014. Disponível em: <<http://www.estadao.com.br/infograficos/cidades/biotecnologia-animal,169932>>. Acesso em: 3 out. 2017.

PEREIRA, S. R. A evolução do complexo soja e a questão da transgenia. **Revista de Política Agrícola**, [s.l.] Ano XIII, n. 2, 2004.

QUISEN, R.C.; ANGELO, P.C.S. **Manual de procedimento do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental**. Manaus: EMPRABA, 2008.

ROCHA, Renata da. **O direito à vida e a pesquisa com células-tronco**. Rio de Janeiro: Campus, 2008.

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures in vitro. **Symp. Soc. Exp. Biol.**, v. 11, p. 118-131, 1957.

SUJII, E. R. et al. **Manual de biossegurança em laboratórios e casas de vegetação da Embrapa Recurso Genéticos e Biotecnologia**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 40).

TEIXEIRA, P.; VALLE, S. **Biossegurança**: uma abordagem multidisciplinar. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1996.

TERRAMOTO, J. R. S.; TEIXEIRA, J. V. **Propriedade intelectual e proteção aos cultivares**. Campinas APTA/Departamento de Gestão Estratégica, 2008.

WILKINSON, J. **Biotecnologia e agronegócios**. Campinas: Unicamp/IE/NEIT, 2002.

ZILBERMAN, D. (Eds.) **Regulating agricultural biotechnology**. Economics and policies. New York: Springer Publishing, 2006. p. 459-480.



# Ácidos nucleicos e síntese de proteínas

## Convite ao estudo

Nesta unidade são apresentadas informações sobre o princípio científico do conteúdo genético e sua aplicação na biotecnologia. A biologia molecular está intimamente ligada à engenharia genética e à biotecnologia, permitindo grandes avanços, principalmente com o advento da tecnologia do DNA recombinante, da reação em cadeia de polimerase (PCR) e do sequenciamento automático do DNA. Técnicas de biotecnologia, como a clonagem, surgiram para o desenvolvimento de diferentes formas de analisar e produzir características e produtos biológicos de interesse. A partir do dogma central da biologia, conhecimentos científicos substanciais estão sendo gerados para o desenvolvimento de técnicas de caracterização, uso, manipulação e melhoramento de recursos biológicos e genéticos.

Na primeira seção da Unidade 2, estudaremos a importância das moléculas de DNA e RNA e suas aplicações, as enzimas de restrição e sua importância biotecnológica, o processo de clonagem e a biotecnologia, além das aplicações biotecnológicas dos ácidos nucleicos e proteínas, reação em cadeia polimerase – *Polymerase Chain Reaction*, PCR. Na segunda seção, a transcrição, sua importância e aplicação, e a tradução proteica, sua importância e aplicação. A formação de proteínas a partir de material nuclear, assim como a participação de fatores de transcrição na biotecnologia, e a genética. Na terceira seção, abordaremos as definições das Moléculas de DNA e RNA, genômica, proteômica, metabolômica.

O principal objetivo desta unidade é conhecer os principais conceitos moleculares e os mecanismos aplicados aos ácidos nucleicos e síntese de proteínas.

Bons estudos!

## Seção 2.1

### Mecanismo de replicação do DNA

#### Diálogo aberto

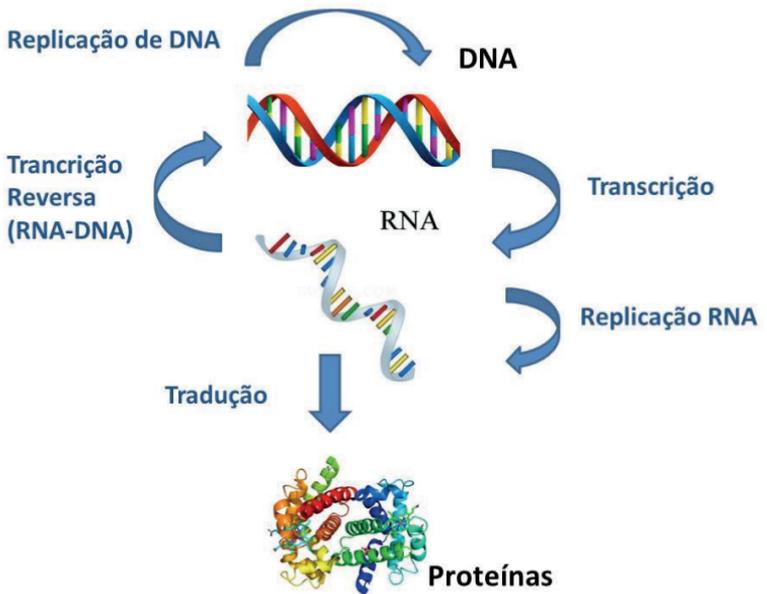
Uma parceria entre pesquisadores de institutos canavieiros, usineiros e empresas particulares construiu uma grande cooperação com a finalidade de aumentar a produção da cana-de-açúcar, gramínea que tornou o Brasil um dos maiores produtores de biocombustível do mundo. O grande objetivo da parceria é tornar essa planta mais adaptada e produtiva para aumentar a participação do bioetanol na matriz energética do país. Qual seria uma das maneiras de conseguirmos as chamadas “plantas melhoradas”, no sentido de maior produção por quantidade de hectare?

#### Não pode faltar

##### A importância das moléculas de DNA e RNA e suas aplicações

O aprimoramento da biotecnologia emerge com a consolidação dos conhecimentos a respeito do DNA. O DNA, ou ácido desoxirribonucleico, é o repositório bioquímico responsável pelo armazenamento da informação genética que coordena o desenvolvimento e funcionamento da vida de todos os seres vivos e de alguns vírus. O conhecimento científico sobre o conteúdo genético começou a ser construído a partir da descoberta da estrutura química dessas moléculas, elucidada somente em 1953. Com as descobertas no século XX foi possível observar a estrutura do DNA, composto por ácidos nucleicos que formam duas cadeias na forma de uma dupla hélice. Concomitantemente às descobertas estruturais, também foram elucidados os mecanismos envolvidos no processo da informação genética do DNA, até as proteínas e demais constituintes celulares. Em 1958, Francis Crick postulou o dogma central da biologia molecular (Figura 2.1), que explica o fluxo de informação do código genético: DNA → RNA → proteínas. Atualmente, com a aquisição de novos conhecimentos, como o de que algumas enzimas são capazes de utilizar o RNA para produzir RNA, esse modelo teve algumas mudanças. Resumidamente, esse modelo mostra que uma sequência de um ácido nucleico pode formar uma proteína, porém o contrário não é possível.

Figura 2.1 | Ilustração do fluxo de informação do código genético que constitui o dogma central da biologia molecular



Fonte: adaptada de Rosenberg (1986).

Os ácidos nucleicos são macromoléculas formadas por nucleotídeos. Há dois tipos de ácidos nucleicos, o ácido desoxirribonucleico (DNA) e o ácido ribonucleico (RNA). O DNA pode ser encontrado tanto no núcleo de uma célula (DNA nuclear) quanto nas mitocôndrias (DNA mitocondrial), ou no cloroplasto (DNA cloroplastidial), no caso de plantas. A partir de sequências molde em uma molécula de DNA, pode haver um processo de transcrição para a criação de uma molécula de RNA. Nessas moléculas de RNA estão presentes os códigos usados para organizar a sequência de aminoácidos e formar as proteínas, através de um processo denominado tradução. Há vários tipos de RNAs, envolvidos em diferentes partes do processo de transcrição, tradução e outros processos moleculares: RNA mensageiros, RNA ribossômico, RNA transportadores e microRNAs.



## Assimile

É através das informações genéticas que plantas, animais e seres humanos possuem a capacidade de se distinguirem uns dos outros. As sequências encontradas nas fitas de DNA são responsáveis pelas formas específicas de cada organismo, e tais sequências podem ser herdadas, passando as características armazenadas nessas moléculas de pais para filhos.

A descoberta de que o DNA é a estrutura responsável pela transmissão das características dos seres vivos (herdabilidade) veio com um estudo de Avery e colaboradores, em 1944, quando descobriram que o princípio transformante das bactérias pneumococos era o DNA. Antes dessa descoberta pensava-se que as proteínas eram as responsáveis pela herança de características.

Atualmente observou-se um avanço muito grande das técnicas de sequenciamento de DNA, resultante do avanço da biologia molecular, gerando grandes e novas quantidades de informações genéticas. Essas sequências de DNA, RNA e proteínas de diversas espécies são compartilhadas em bancos de dados públicos. Estes bancos de dados têm a tarefa de armazenar e disponibilizar uma quantidade enorme de sequências produzidas. Também foram desenvolvidos programas computacionais para a manipulação da informação genética contida nas sequências de ácidos nucleicos, através dos recursos da bioinformática.

O GenBank (Nacional Center for Biotechnology Information – NCBI) é o maior banco de dados de livre acesso existente, contendo milhares de sequências de DNA e RNA de diversas espécies depositadas por pesquisadores (NEJAR, 2017).



## Pesquise mais

A partir da obtenção de sequências de nucleotídeos ou aminoácidos, é possível fazer comparações com as demais sequências depositadas em bancos de dados, com a finalidade de encontrar homologias e, possivelmente, atribuir funções a essas sequências. Essa comparação entre as sequências é realizada através de um alinhamento dessas comparações e a principal ferramenta disponível nos dias de hoje, o BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Através do BLAST você pode comparar uma sequência de interesse com todas as sequências existentes no GenBank quanto a suas identidades e similaridades. Acesso: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>>. Acesso em: 30 nov. 2017.

Podemos enxergar as sequências de DNA como um tipo de software ou linguagem de programação que a célula usa para produzir e regular todos os produtos necessários para a vida.

As sequências de DNA que contêm regiões reguladoras, que codificam uma proteína e são herdáveis, podem ser chamadas de regiões gênicas. Muitas sequências no DNA de um organismo estão fora dessa definição de gene, chamadas de regiões de espaçamento. Grande parte do DNA de uma planta ou animal não seria considerada como parte de um gene, por não transcrever um RNA ou proteína, mas também é importante para descrever a estrutura da informação genética de organismos e populações. Não há um consenso sobre a definição do que é um gene, e a adoção de uma definição para a terminologia genética pode se adequar ao motivo de estudo do DNA, seja em termos de função ou estrutura.

### **Atenção**

A sequência de DNA de um gene e sua presença e papel dentro do genoma são muito importantes. Ao longo do seu comprimento são incorporadas sequências de "reconhecimento", às quais as proteínas se ligam para converter essas informações em um organismo vivo.

A própria sequência determina como um gene funciona e impacta na expressão de uma característica do organismo.

As proteínas, por sua vez, regulam processos bioquímicos, como transcrição, replicação de DNA e divisão celular, recombinação e reparação gênica, modificações epigenéticas e provavelmente outras modificações ainda para ser descobertas. O reconhecimento de determinada sequência é central para muitos processos celulares. As proteínas envolvidas na leitura de sequências têm um árduo trabalho de identificação e especificidade da região onde vão se ligar. Entre todas as proteínas que se ligam à sequência de DNA estão as enzimas de restrição, as quais são consideradas as mais exigentes.

## **As enzimas de restrição e sua importância biotecnológica**

As enzimas de restrição (endonucleases do tipo II) são proteínas encontradas em bactérias e arqueias, e apresentam a capacidade de clivar moléculas de DNA por meio da quebra da fita dupla. Essas enzimas se ligam às sequências curtas de pares de base de DNA e

catalisam a clivagem das duas cadeias de DNA nas proximidades do sítio de ligação, quebrando o DNA em fragmentos. Essa divisão pode ser detectada com grande sensibilidade *in vitro*, e, portanto, a frequência com que as enzimas se ligam e cortam as sequências pode ser medida com precisão.



## Vocabulário

*In vitro* é uma expressão de origem latina que designa que os processos biológicos são desenvolvidos fora dos sistemas vivos, ou seja, em ambientes controlados, como laboratórios. A expressão ganhou amplo uso com o crescimento da fertilização *in vitro*, técnica de reprodução assistida.

As bactérias fazem uso das enzimas de restrição para se protegerem da infecção por vírus e organismos parasitas, cortando as moléculas de DNA destes e impedindo assim a sua replicação. A biotecnologia faz uso dessas enzimas como ferramentas moleculares precisas que cortam e reorganizam as moléculas de DNA no laboratório. Cada enzima reconhece uma sequência específica de nucleotídeo (sítio de corte ou sítio de restrição) e apenas as moléculas de DNA que apresentem essa sequência serão cortadas.

O isolamento da primeira dessas novas ferramentas moleculares se deu no início de 1970, com os cientistas Werner Arbour e Stewart Linn, quando identificaram duas enzimas que impediram o crescimento de vírus na bactéria. A primeira enzima de restrição purificada, a chamada "EcoKI" obtida da bactéria *Escherichia coli* K12 (MESELSON; YUAN, 1968), chamada "nuclease de restrição", cortou o DNA em diversos pontos ao longo do comprimento da cadeia de DNA, sendo denominada, mais tarde, de enzima do tipo I. Enzimas desse tipo são muito grandes, com aproximadamente 4000 aminoácidos no total e uma massa molecular superior a 400 kDa. Compreendem ainda cinco subunidades de três proteínas diferentes, e caracteristicamente reconhecem sequências descontínuas de DNA – no caso de EcoKI, AACNNNNNNGTGC, onde "N" seria considerada uma determinada base nitrogenada.

No entanto, as enzimas que cortam a molécula de DNA em locais aleatórios não atendiam as necessidades de estudo das estruturas moleculares, sendo necessário o desenvolvimento de uma ferramenta que pudesse reduzir o DNA em locais específicos de forma consistente, tipos II e III de enzimas. As enzimas do tipo II reconhecem uma

sequência particular de genes e cortam as duas vertentes do DNA perto ou dentro do local determinado. O tipo III cortará os dois fios de DNA a uma distância predeterminada do local de reconhecimento.

Os esforços para desenvolver essa ferramenta se multiplicaram nos últimos 40 anos, com a descoberta de milhares de enzimas de restrição, reconhecendo centenas de diferentes sequências de DNA com extrema precisão e "fidelidade" de restrição enzimática.

Dessa forma, pode-se observar que o DNA é, talvez, o substrato enzimático mais complexo que a natureza desenvolveu, com um número surpreendente de formas diferentes.



Refleta

Essa precisão com que uma enzima de restrição é capaz de escolher/identificar regiões específicas (regiões-alvo) do DNA entre todas as formas possíveis é uma questão que intriga os biotecnólogos até os dias atuais. Como essas enzimas sabem a quais sequências devem se ligar? Que mecanismo molecular é o responsável por esse grau de discriminação notavelmente alto?

Observe que o necessário para identificar quais regiões-alvo do DNA devem ser envolvidas em um processo de reconhecimento molecular que medeia a seletividade específica de ligação proteína-DNA é um dos desafios mais interessantes em biologia estrutural, e está ligado à sequência de DNA que foi relatada por McClarin et al. (1986). Segundo os autores, o reconhecimento de sequências de DNA é considerado um processo único, embora seja "uma nuance" que tem múltiplas facetas e variações (ROHS et al., 2010; ROHS et al., 2009a; ROHS et al., 2009b). Foi a aplicação de bioquímica, e em particular a purificação de proteínas para o campo de restrição e modificação molecular, que, no final dos anos 1960, impulsionou inovações significativas na biotecnologia. Hoje em dia, a indústria de biotecnologia emprega enzimas de restrição para mapear o DNA, bem como cortar o DNA para uso na engenharia genética. Ao verificar os locais onde as enzimas de restrição irão se anexar no genoma, fazem com que os cientistas possam atribuir essa região a uma determinada sequência de DNA. Os extremos desiguais que resultam do corte da enzima são "re-juntados" pela enzima ligase, que favorece o prosseguimento da análise do DNA. Essa técnica de mapeamento de DNA, conhecida como polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP), pode ser útil na tipagem de DNA.



## Exemplificando

O RFLP é uma técnica que surgiu em 1984, quando foi inventada pelo cientista inglês Alec Jeffreys durante uma pesquisa sobre doenças hereditárias. Essa técnica é usada para a análise de testes padrão de diversidade de fragmento de DNA, a fim de diferenciar organismos geneticamente modificados. Algumas outras aplicações da técnica do RFLP são:

- Determinação do estado de doenças genéticas, tais como a fibrose cística, em um indivíduo.
- Determinação ou confirmação da fonte de uma amostra de DNA, como em testes criminais ou investigações de paternidade.
- Determinação, no traço genético, das taxas de recombinação gênica que mostram a distância genética existente entre os "locus", ou onde estão localizados os cromossomos.
- Identificação de um indivíduo ou organismo portador de uma mutação em uma família.

A união entre a engenharia genética e a descoberta dessas enzimas revolucionou a biologia molecular, possibilitando que os pesquisadores manipulassem o DNA com extrema precisão, podendo até montar novas moléculas de DNA recombinante.

DNA recombinante é o termo usado para descrever algumas técnicas modernas em biologia molecular, a fim de mudar a constituição genética das células vivas de tal modo que estas possam produzir novas substâncias. O uso de enzimas de restrição para "tricotar" fragmentos de DNA de dois organismos não relacionados pode gerar DNA recombinante de interesse. Na maioria dos casos, um plasmídeo (DNA bacteriano) é combinado com um gene de um segundo organismo. Durante esse processo, as enzimas de restrição vão digerir ou cortar o DNA tanto da bactéria quanto de outro organismo, resultando em fragmentos de DNA com extremidades compatíveis. Essas extremidades serão coladas juntas através do uso de outra enzima, conhecida como ligase. O importante da engenharia genética é que esta não se limita a organismos de uma mesma espécie, ou seja, a compatibilidade sexual torna-se irrelevante, além de ser possível fazer modificações em uma única geração, o que antes levaria dezenas ou centenas de gerações.

## O processo de clonagem e a biotecnologia

Uma vez que temos consciência da importância do conteúdo genético presente no DNA, tal como o conhecimento de algumas técnicas para acessar esse conteúdo genético, como o sequenciamento e o uso de enzimas de restrições, o aprendizado sobre clonagem, um processo muito utilizado na biotecnologia, é facilitado.

A clonagem de DNA, ou clonagem gênica, é um procedimento para fazer cópias múltiplas e idênticas de um determinado pedaço de DNA. Usualmente, esse procedimento acontece ao inserir um gene ou outro fragmento de DNA de interesse em um fragmento circular de DNA, chamado plasmídeo. Primeiramente, é preciso isolar um trecho de DNA que vai ser clonado, esse isolamento é feito a partir da fragmentação pelas enzimas de restrição. Uma vez isolado, os trechos são unidos com a molécula de DNA de um organismo denominado genericamente de vetor. Para a inserção do DNA de estudo são utilizadas enzimas que "cortam e colam" o DNA vetor e é produzida uma molécula de DNA recombinante, ou o DNA da associação vetor + fragmento de estudo.

Os micro-organismos do DNA vetor se reproduzem e assim multiplicam as moléculas recombinantes, dando origem a um grande número de cópias idênticas. Essas moléculas recombinantes construídas através de técnicas de clonagem são usadas para muitas finalidades, como:

- A biofarmacêutica: produção de proteínas humanas com aplicações biomédicas, como insulina e hormônios de crescimento humano.
- A terapia gênica: construção de plasmídeos contendo cópias saudáveis de genes de interesse.
- A análise de genes: construção de versões artificiais e recombinantes de genes para entender melhor as suas funções no organismo, analisar como as mutações podem afetar a função de um gene, estudar dosagem gênica.

Assim, além da clonagem de DNA, há também a clonagem por processos que envolvem a reprodução assexuada, tanto de animais quanto de vegetais, bem como a formação de gêmeos idênticos (univitelinos). A clonagem reprodutiva consiste no processo em que o núcleo de uma célula não sexual de um doador é transmitido para um

óvulo receptor, do qual o núcleo foi removido. Esse óvulo é estimulado quimicamente para o início da divisão celular e para a formação do embrião, que será então implementado no útero do receptor. Dessa forma, o embrião gerado é um clone do doador, possuindo o mesmo material genético.

Há também um outro tipo de clonagem, chamada terapêutica, na qual são criadas células-tronco embrionárias. Apesar da particularidade de cada técnica, todos os processos de clonagem apresentam uma mesma finalidade: a produção de organismos geneticamente idênticos.

### **Aplicações biotecnológicas dos ácidos nucleicos e proteínas. Reação em cadeia polimerase – *polymerase chain reaction*, PCR**

Nós temos a pressuposição, baseada no dogma central da biologia molecular, de que diferenças genéticas no DNA significam diferenças nas proteínas codificadas, as quais, em conjunto, podem ser observadas como fenótipos. Dessa forma, há várias tecnologias disponíveis para observação dessas variações no DNA. Para acessar as diferenças genéticas, nós podemos desenvolver marcadores moleculares, que podem ser definidos como marcadores genéticos baseados na detecção de isoenzimas ou sequências de DNA.

Para estudos de diversidade genética, mapeamento genético, taxonomia e análises filogenéticas, é preciso fazer um estudo mais aprofundado sobre as sequências de DNA e seus marcadores moleculares. Existem inúmeras metodologias de obtenção e análise de marcadores moleculares, com diferentes demandas de recursos financeiros, de infraestrutura e recursos humanos.

Para obtenção de marcadores genéticos, é preciso primeiramente amplificar as regiões de interesse do DNA. Essa amplificação é feita através da síntese enzimática *in vitro*, usando milhões de cópias de um segmento específico de ácidos nucleicos, na presença da enzima DNA polimerase. Essa técnica é conhecida como reação em cadeia polimerase, popularmente chamada de PCR, sigla do inglês *polymerase chain reaction*. Essa reação foi concebida em 1983 por Kary Mullis (Prêmio Nobel em 1993), publicada em 1985, mas utilizada de forma rotineira a partir de 1988. A técnica foi vendida sob direitos de todas as patentes envolvidas no processo de PCR (inclusive as relacionadas aos termocicladores convencionais) à Roche Molecular Systems (valor da compra: US\$ 300.000.000,00). Porém, a tecnologia tornou-se tão

difundida que o custo de pagamento da patente tornou-se acessível a outras empresas que produzem uma grande variedade de reagentes e aparelhos da área da biologia molecular, genética, e para o mercado.

As aplicações da PCR envolvem a identificação de mutações pontuais; de alelos de DNA genômico; análise de sequências virais, bacterianas ou de protozoários; RHD fetal; sexagem fetal; avaliação molecular de paciente com doenças genéticas. A técnica consiste em vários ciclos repetidos baseados em anelamento e extensão enzimática de pequenas moléculas de DNA de fita simples (par de oligonucleotídeos de aproximadamente 10 nucleotídeos) utilizados como indicadores (chamados "*primers*"). Estes primers indicam a sequência de dupla fita de DNA que será amplificada. Essa é uma técnica poderosa que dobra a quantidade da sequência específica a cada ciclo.

Um ciclo de PCR envolve três etapas:

- Desnaturação: a desnaturação da dupla fita de DNA-específico ocorre com a elevação da temperatura para 92 °C a 95 °C.
- Anelamento: hibridização do DNA primer com as sequências de DNA complementares que flanqueiam a região alvo. Para que ocorra isso a temperatura é reduzida rapidamente para 35 °C a 60 °C (dependendo do tamanho e sequência do *primer*). A amplificação do *primer* ocorre com o anelamento de sua sequência com as sequências complementares e invertidas em relação às duas fitas.
- Extensão: a extensão é realizada a partir da adição de nucleotídeos utilizando como molde a sequência-alvo em cada terminal 3' da sequência de primer, através da ação da enzima DNA polimerase a uma temperatura de 72 °C. Neste processo é gerado uma cópia da sequência de primer e é repetido em ciclos por algumas dezenas de vezes. A amplificação segue uma progressão geométrica, dobrando a quantidade de DNA da sequência alvo a cada ciclo. Em apenas vinte ciclos é possível se produzir mais de um milhão de vezes a quantidade inicial de sequência-alvo. Diante desta escala de amplificação é possível se iniciar este processo com quantidades mínimas de DNA (da ordem de nanogramas) e terminar a reação com grandes quantidades de DNA de uma sequência específica de interesse.

A PCR permite amplificar um fragmento de DNA, geralmente de até 4000 pb, mas até 30 kb em condições especiais, com a utilização de DNA polimerases de alta eficiência e fidelidade.

Através da técnica de eletroforese em gel (agarose ou poliacrilamida) é possível detectar a olho nu o produto de uma PCR. A PCR gera uma grande quantidade de sequências específicas de DNA que possibilita o maior entendimento de processos biológicos e biotecnológicos fundamentais. Essa tecnologia levou a uma revolução na biologia e na pesquisa, principalmente em áreas como melhoramento genético de plantas e animais domésticos.



### Refleta

No início, a aplicação da PCR apresentou algumas limitações, pois ela depende do conhecimento prévio das sequências de nucleotídeos que flanqueiam a sequência de DNA de interesse para construção de *primers* de amplificação.

O conhecimento prévio dessas sequências pode ser obtido por clonagem ou sequenciamento da região, como vimos anteriormente. Sendo assim, com exceção de alguns genes de sequência conhecida, a PCR apresentou, de início, um uso limitado como técnica para a obtenção de marcadores moleculares. Mas hoje em dia, com banco de dados de sequências cada vez mais amplo e acurado, há muitos avanços que podem ser obtidos apenas com o uso de PCR.

## Sem medo de errar

Voltando à nossa situação-problema apresentada no início da seção, qual seria uma das maneiras de conseguirmos as chamadas “plantas melhoradas”, no sentido de maior produção dessas plantas por quantidade de hectare? Uma maneira clássica de chegar a “plantas melhoradas” seria plantar uma grande diversidade de plantas e, ao longo de anos de cultivo, ir selecionando as plantas tolerantes ao estresse, mais fáceis de colher, aquelas resistentes a doenças ou de maior produção de açúcar, e outras características vantajosas. Porém, a descoberta de pragas repentinas, o aumento do preço dos combustíveis fósseis e a pressão política e econômica para o desenvolvimento dos biocombustíveis requerem uma aceleração nesse processo de melhoramento da cana-de-açúcar.

Ainda através do conhecimento das sequências e códigos genéticos de organismos complexos, como a cana-de-açúcar, é possível aprofundar o conhecimento sobre a herança e o desenvolvimento de características de interesse agrícola. O sequenciamento e as técnicas de DNA recombinante podem acelerar e aprimorar os resultados do melhoramento animal e vegetal, conciliando o chamado melhoramento genético com o melhoramento clássico em campo. Através da técnica de clonagem, nós podemos ter acesso mais rapidamente às sequências específicas da cana-de-açúcar referentes à produção de açúcar ou produção de celulose, por exemplo.

## Avançando na prática

### Buscando informações em bancos de dados

#### Descrição da situação-problema

Diante do recente corte abrupto de recursos para educação e pesquisa no país, o desenvolvimento de experimentos *in situ* se encontra ameaçado pela falta de verba. Apesar do barateamento dos sequenciamentos de nova geração, os cortes recentes ameaçam até a manutenção dos experimentos em andamento. Enquanto essa situação de crise se perpetua, a pesquisa não pode parar. O grande desafio é encontrar novas maneiras de aproveitar o que temos disponível, por exemplo, resultados de pesquisas anteriores, e continuar produzindo novos resultados para comprovar a importância da ciência para o desenvolvimento do país. Como poderíamos usar a biotecnologia a nosso favor, nesse caso?

#### Resolução da situação-problema

Com o barateamento dos sequenciamentos dos ácidos nucleicos, há uma quantidade enorme de dados de sequências geradas no mundo todo, a respeito de espécies modelos e não modelos, depositadas em bancos de dados. O que se pode fazer é pesquisar genes de interesse encontrados em plantas modelo ou plantas filogeneticamente próximas, que podem estar presentes no genoma de cana-de-açúcar. Com uma simples PCR podemos testar se uma sequência identificada no NCBI (ou outras fontes de dados da literatura), em sorgo ou arroz, por exemplo, está presente na cana-de-açúcar. Dessa forma, a bioinformática pode auxiliar muito a biotecnologia e as técnicas de melhoramento genético.

## Faça valer a pena

**1.** Um modelo simplificado de como o código genético é mantido e transmitido na célula constituindo o dogma central da biologia molecular. Esse modelo foi atualizado com os conhecimentos da biologia molecular, mas mantém suas bases, possuindo uma ampla aplicação didática para explicar a base da genética em termos gerais.

O Dogma Central da Biologia Molecular explica como o fluxo de informações do código genético ocorre. De acordo com esse dogma, o fluxo da informação genética ocorre no sentido:

- a) DNA → RNA → Proteínas.
- b) Proteínas → RNA → DNA.
- c) RNA → DNA → Proteínas.
- d) Proteínas → DNA → RNA.
- e) DNA → Proteínas → RNA.

**2.** Os plasmídeos são muito utilizados em técnicas de biotecnologia, constituindo uma ferramenta importante em laboratórios de manipulação genética animal e de plantas. Eles são usados rotineiramente para multiplicar genes específicos.

Com base nas informações obtidas, como você acredita que os plasmídeos de bactérias podem ser descritos observando as colocações das afirmativas a seguir?

- a) Os plasmídeos possuem DNA linear.
- b) Os plasmídeos são utilizados como uma ferramenta de biologia molecular para expressar outros genes de forma eficiente na bactéria hospedeira.
- c) Os plasmídeos naturalmente possuem DNA recombinante.
- d) Os plasmídeos não se replicam.
- e) Os plasmídeos são seres do reino vegetal, somente.

**3.** Quando consideramos as chamadas enzimas de restrição e a DNA ligase, podemos afirmar que essas são enzimas frequentemente usadas para inserir genes e outros pedaços de DNA montados em plasmídeos durante a clonagem de DNA e no processo de recombinação gênica.

Como as enzimas de restrição e a enzima DNA ligase são usadas na biotecnologia?

- a) As enzimas de restrição cortam o DNA em locais específicos, produzindo extremidades que podem ser ligadas de volta em conjunto com a DNA ligase.
- b) Somente as enzimas de restrição que produzem extremidades sem corte podem ser ligadas com DNA ligase após o corte de DNA.
- c) Somente enzimas de restrição que produzem extremidades pegajosas no DNA podem ser ligadas com DNA ligase.
- d) As enzimas de restrição podem cortar o DNA em locais específicos e ligá-los novamente.
- e) As enzimas de restrição cortam aleatoriamente o DNA e os fragmentos cortados podem ser ligados de volta com a DNA ligase.

## Seção 2.2

### Mecanismo de transcrição e tradução de proteínas

#### Diálogo aberto

Uma parceria entre pesquisadores de institutos canavieiros, usineiros e empresas particulares construiu uma grande cooperação com a finalidade de aumentar a produção da cana-de-açúcar, gramínea que tornou o Brasil um dos maiores produtores de biocombustível do mundo. O grande objetivo da parceria é tornar essa planta mais adaptada e produtiva, para aumentar a participação do bioetanol na matriz energética do país.

A partir do sequenciamento de genótipos da cana-de-açúcar, seria necessário o desenvolvimento da montagem da sequência do genoma dessa planta, mas levando-se em conta que essa gramínea é poliploide, haveria uma maior dificuldade para as análises genéticas e genômicas dessa espécie? Como proceder então?

#### Não pode faltar

##### Transcrição: importância e aplicação

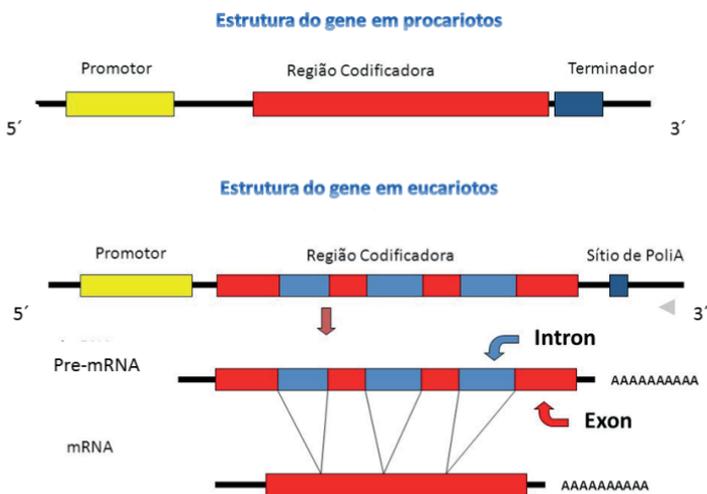
Assim como vimos nos tópicos anteriores, o fluxo da informação genética é o fluxo que se dá do DNA até a síntese de proteína via participação de RNAs. O RNA mensageiro é o carregador da informação genética presente no DNA através da transcrição do código genético. A transcrição é fundamental para a vida e entender como ela funciona é importante para compreender melhor a saúde de plantas e dos animais.

As unidades do DNA capazes de constituir ao menos uma cadeia polipeptídica, conceituadas aqui como gene, são compostas por regiões (Figura 2.2):

- Promotora: regiões que normalmente são ricas em bases nucleicas adenina e timina, em que se associam proteínas como fatores de transcrição e também a enzima RNA polimerase.
- Exon: apresenta informação para constituir cadeias polipeptídicas.

- Intron: ainda existem dúvidas com relação a sua real função ou a necessidade da sua presença nos genes, mas pode estar associada à regulação da expressão gênica.
- Terminadoras: em que há presença do códon de término de tradução e transcrição. Os códons apresentam um padrão específico muito conservado nos seres vivos.
- Reguladoras: parte reguladora da expressão dos genes e podem estar presentes em cis (áreas adjacentes ao gene, na região promotora, nas regiões de INTRON e terminadoras), ou podem estar em trans (próximas ao gene considerando o ponto de vista tridimensional, mas afastadas quando considerada a estrutura linear do DNA).

Figura 2.2 | Esquema representativo indicando a estrutura do gene a ser transcrito em procaríotos e eucariotos



Fonte: adaptado de <<http://images.slideplayer.com.br/1/50886/slides/slide>>. Acesso em: 5 dez. 2017.

Para que ocorra o processo de transcrição de uma sequência de DNA em RNA, primeiramente é necessário que a dupla hélice de DNA se desenrole próximo à região do gene que será transcrito. A expressão dessas regiões gênicas é a principal função relacionada com os RNAs mensageiros, transcritos do DNA.

Para que ocorra a etapa da transcrição, são usadas uma das duas fitas de DNA como fita molde. Veja que o local onde o primeiro nucleotídeo de RNA é transcrito, formando uma fita complementar

à fita molde (pré-mRNA), é chamado de sítio de iniciação, ou seja onde se dá o início da transcrição. Os mRNAs nos eucariotos (organismos com núcleo definido) passam por modificações pós-transcricionais antes de serem traduzidos em proteínas, passando de pré-mRNA para o mRNA. Primeiramente é feita a deleção ou retirada das sequências intrônicas (saem os íntrons), através de um mecanismo chamado “*splicing*”. Após o processo “*splicing*” é adicionada uma cauda conhecida como cauda poliA na extremidade 3’ de determinada sequência de do mRNA (RNA mensageiro). Já nos animais procariotos (organismos sem núcleo definido), essa cauda poliA não existe. Como nos procariotos, não existe envoltório nuclear, a transcrição ocorre no mesmo lugar onde ocorre a tradução proteica, de forma que a transcrição do RNA e sua tradução podem ocorrer quase que simultaneamente. Já nos eucariotos, a transcrição ocorre no núcleo da célula e a tradução desse RNA ocorre no citoplasma, ou seja existem diferenças entre os dois grupos animais, sendo que nos procariotos tradução e transcrição podem ocorrer ao mesmo tempo, nos eucariotos não, esse processo acontece em locais diferentes da célula e em velocidade distintas (conteúdo disponível em [http://www.uel.br/pessoal/rogerio/genetica/respostas/pratica\\_03.html](http://www.uel.br/pessoal/rogerio/genetica/respostas/pratica_03.html)).



### Assimile

Uma enzima denominada RNA polimerase é essencial para iniciar o processo de transcrição. Ela deve reconhecer um local específico, região promotora, onde começará a síntese. Esse reconhecimento da RNA polimerase aos genes promotores se dá graças ao “fator sigma”, que se liga à RNA polimerase fazendo com que esta tenha maior afinidade com as sequências promotoras.

Os genes conhecidos como promotores são formados por sequências consenso localizadas antes do início da fase da transcrição. Os genes promotores procarióticos e procariotos possuem uma distância específica do início da transcrição; sendo que em organismos procariotos geralmente isso acontece exatamente na região -10 e -35 do início da transcrição, e as sequências consenso mais conhecidas são o TATA box na região -10 (TATAAT) e a sequência TTGACA na região -35. A diversidade de genes promotores e fatores sigma correspondentes, permite que as funções celulares possam ser reguladas mantendo-se o equilíbrio das atividades celulares.

Nos eucariotos, o processo de iniciação e regulação da transcrição é tida como uma sequência complexa, envolvendo um número e uma maior diversidade de sequências promotoras e de fatores de transcrição celular (disponível em [http://cursosextensao.usp.br/pluginfile.php/46749/mod\\_resource/content/1/Aula%20Introdu%C3%B3ria.pdf](http://cursosextensao.usp.br/pluginfile.php/46749/mod_resource/content/1/Aula%20Introdu%C3%B3ria.pdf)).

A RNA polimerase é a principal enzima de transcrição, que irá se ligar na sequência promotora da fita molde, de forma direta ou com o auxílio de outras proteínas, e transcrevendo-a em uma molécula de RNA nova, complementar. A transcrição acaba em um processo chamado de terminação. Se essa região gênica transcrita codificar uma proteína, a molécula de RNA será lida para originar uma proteína em um processo de tradução.

Um dos grandes objetivos da biotecnologia é a obtenção de níveis de expressão significativos de genes e proteínas de interesse e isso é possível através de altos níveis de transcrição desses genes. O perfil das proteínas nas células e sua diferenciação dependem do processo de transcrição. Para alcançar esse objetivo, é possível fazer uso de genes promotores na construção de vetores de expressão para aprimorar o processo de transcrição desses genes. As células transformadas com os vetores contendo o promotor de interesse são cultivadas até o início da transcrição, com a ativação do operador.

Também é possível clonar cópias múltiplas dos genes de interesse no vetor de expressão. Nesse caso, chamamos essas cópias múltiplas sequenciais de sequências em tandem. Porém, no caso de clonagem, é importante atentar a cada passo na multiplicação da cultura celular, pois pode haver uma confusão entre a orientação para transcrição e tradução de todas as sequências clonadas.

Outra opção ainda é a obtenção de altos níveis de expressão através do aumento do número de cópias do vetor utilizado, através da replicação do vetor. Dessa forma, a transcrição e a expressão gênica são processos fundamentais na engenharia genética. A partir do desenvolvimento e aprimoramento de técnicas biotecnológicas, pode-se isolar e caracterizar genes e funções mais relevantes em células específicas, por exemplo, genes ligados à produção de anticorpos para produção de vacinas, genes relacionados ao crescimento celular, genes de reação a estresses bióticos e abióticos

e genes de formação de compostos fenólicos em plantas utilizadas em fármacos.

### Tradução proteica – importância e aplicação

A formação das macromoléculas proteicas se dá a partir da tradução do material nuclear da molécula da vida, o DNA. As proteínas são compostas por moléculas menores de aminoácidos, existindo inúmeros tipos de proteínas, tendo, cada uma, determinada função específica.



#### Exemplificando

Há uma diversidade enorme de tipos e funções de proteínas nos mais variados organismos, observe, a seguir, alguns tipos de proteínas e suas descrições:

- Enzimas: são proteínas fundamentais para produzir a quantidade de energia necessária para a célula desempenhar suas funções; que são as proteínas estruturais.
- Proteínas transportadoras: ligam-se a íons ou moléculas específicas para transportá-los de um órgão a outro.
- Proteínas nutrientes e de armazenamento: necessárias para a germinação e o crescimento de brotos de plantas. Por exemplo: ovoalbumina.
- Proteínas de motilidade: habilitam a capacidade de células e organismos de se contraírem, mudarem de forma ou se deslocarem no ambiente, por exemplo, a actina e a miosina nos músculos esqueléticos.
- Proteínas estruturais: participam da organização celular e fornecem proteção ou resistência às estruturas biológicas.
- Proteínas reguladoras: ajudam a regular a atividade celular ou fisiológica, como os hormônios, por exemplo.
- Proteínas de defesa: defendem os organismos de ferimentos ou invasão de outras espécies.

O ribossomo é o *locus* da síntese de proteínas no citoplasma, formado por várias proteínas e RNA ribossomais livres no citoplasma. Ele é dividido em duas subunidades, uma subunidade menor (30S

em bactérias e 40S em eucariotos) e uma subunidade maior (50S em bactérias e 60S em eucariotos). O ribossomo converte a informação que se encontra na forma de trincas de nucleotídeos em aminoácidos, que darão origem à proteína. O início da tradução se dá quando a subunidade menor se liga ao códon de iniciação (geralmente o códon de iniciação é AUG, correspondente a uma metionina), e logo em seguida a subunidade maior liga-se ao completo do mRNA e subunidade menor. Toda a formação desse complexo de ribossomo e mRNA acontece com o auxílio de fatores de transcrição; discutiremos melhor sobre os fatores de transcrição a seguir. A trinca correta da metionina, a iniciadora, é reconhecida através do pareamento de uma sequência do RNA ribossomal com uma sequência do mRNA, que fica próxima ao início da tradução (essa sequência é chamada *Shine-Dalgarno*).

O ribossomo possui os sítios de entrada do RNA transportador para peptídeo e outro de aminoácido. O ribossomo vai se deslocando sucessivamente para um códon a frente, através de um processo chamado de translocação, até encontrar um códon de terminação, que não codifica nenhum aminoácido (são eles: UGA, UAG e UAA) e terminar a tradução da proteína.



### Pesquise mais

Este vídeo, disponível no YouTube, é muito didático e traz uma ilustração clara sobre a transcrição do DNA e tradução proteica: <<https://www.youtube.com/watch?v=mUZXF0k8gsw>>. Acesso em: 30 nov. 2017.

O aperfeiçoamento de estratégias que permitem aumentar a tradução proteica tem o objetivo de subir os níveis de expressão de proteínas de interesse, ou mesmo aumentar a estabilidade proteica. Proteínas estáveis são mais fáceis de lidar e reproduzir de acordo com sua própria estrutura, sendo possível produzir maior quantidade dos produtos desejados.

A produção de enzimas como a DNA polimerase, para reação em PCR, a enzima DNA ligase, para ligar fragmentos de DNA, já teve sua importância discutida em tópicos anteriores. Através do conhecimento da tradução proteica pode-se melhorar os mecanismos de produção e utilização dessas enzimas, auxiliando em diversos processos usados na engenharia genética. Outras enzimas muito utilizadas são as chamadas polinucleotídeos quinases, para marcação radioativa, e a transcriptase

reversa, enzima produzida em bactérias, que consegue polimerizar (transformar moléculas simples de monômeros em macromoléculas, chamadas de polímeros) a cadeia de DNA a partir do RNA mensageiro. A enzima transcriptase reversa é muito utilizada em estratégias que envolvem seleção de genes a partir da transcrição gênica.

A compreensão dos processos de síntese proteica, desde a transcrição até a tradução, tem inspirado técnicas ousadas de manipulação do material genético dos organismos, como o CRISPR (Conjunto de Repetições Palindrômicas Regularmente Espaçadas). Essa ferramenta está revolucionando as pesquisas biotecnológicas em todo o mundo pela capacidade de edição do DNA sem alterar características dos organismos. O CRISPR foi descoberto em bactérias que utilizam o seu próprio DNA para reconhecer o DNA viral e criar mecanismos de defesa, que são transmitidos para as futuras gerações. Ele pode ser inserido em células usando vírus ou por meio de injeções de DNA. Uma molécula de RNA é sintetizada especialmente para servir de guia e atingir o gene que se pretende alterar. As técnicas CRISPR permitem a modificação de genes específicos, sem alterar os outros, esclarecendo, assim, a associação entre um determinado gene e sua consequência para o organismo (PENNISI, 2013).

As sequências genéticas CRISPR e suas funções são bastante vantajosas para os processos industriais que utilizam culturas bacterianas na investigação científica. A imunidade baseada em CRISPR pode ser utilizada para fazer essas culturas mais resistentes ao ataque viral. Essa técnica tem sua relativa importância para que se façam alterações precisas nos genes de diversos organismos, como peixes, ratos, plantas e até mesmo células humanas.

Uma outra importante aplicação dessa técnica envolve o tratamento de doenças genéticas. A CRISPR pode ser usada para corrigir um gene mutante e reverter os sintomas da doença em um animal vivo, podendo em um futuro próximo ser estudado em humanos para doenças ainda sem cura (PARREIRA; RESENDE, 2014).

### **A participação de fatores de transcrição na biotecnologia**

As moléculas proteicas denominadas de fatores de transcrição são essenciais para que ocorra a transcrição. Essas moléculas apresentam sítios de ligação ao DNA, reconhecendo e se ligando a uma sequência específica (região promotora) de um gene. Desse modo, os fatores de

transcrição são capazes de interagir com elementos regulatórios de sequências nucleotídicas do próprio DNA (*cis*). Sua ação se dá através da ativação ou repressão dos genes aos quais se ligam. Os fatores de transcrição podem ser de dois tipos:

- Gerais: se ligam a elementos *cis* presentes na maioria das sequências promotoras.
- Específicos: designam quais genes deverão ser ativados ou reprimidos, reconhecendo uma sequência *cis* dentro de cada grupo de promotores. Os fatores de transcrição específicos determinam quando e onde os genes deverão ser transcritos ou não, em resposta aos sinais endógenos ou exógenos.

Há famílias de fatores de transcrição exclusivos de plantas, como as *Dof* (*DNA binding with one finger*), que são alvos de estudos biotecnológicos em trigo, soja, cevada, arroz, sorgo, alfafa e aveias. Os *Dof* agem como ativadores ou repressores de transcrição gênica associada ao controle da expressão de genes de processos característicos de plantas.

Geralmente cada gene codifica um domínio e, conseqüentemente, cada proteína codificada apresenta apenas um motivo de ligação ao DNA. Alguns experimentos biotecnológicos, como a utilização de agentes quelantes de metal, mostram que a inibição da ligação de fatores de transcrição pode levar a alterações estruturais e na expressão dos genes. Sendo assim, alterações nas estruturas das proteínas determinam modificações em vários processos e funções nas plantas, como germinação, florescimento, desenvolvimento vascular, resposta a reguladores de crescimento, entre outras.

A superexpressão ou repressão de alguns fatores de transcrição pode alterar o metabolismo de plantas e animais. A aplicação de técnicas para alterar a expressão de genes endógenos (do próprio organismo) ou a inserção de genes exógenos (de outros organismos) em plantas tem grande eficácia para atingir diversos objetivos, como a redução de florescimento precoce, maior concentração de carotenoides em frutos, resistência à alta salinidade, produção de sementes maiores, entre outras características vantajosas. Em batata, por exemplo, a superexpressão da proteína *Dof* SRF1 levou a modificações no metabolismo de carboidratos, resultando em maiores concentrações de amido e reduzida concentração de monossacarídeos (TANAKA et al., 2009).

## A biotecnologia e a genética

A biotecnologia surgiu com o desenvolvimento de técnicas de manipulação de seres vivos, como a cultura de tecidos, fixação biológica de nitrogênio e o controle biológico de pragas. A transformação dessa biotecnologia tradicional para a molecular veio com o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante e suas inúmeras aplicações.

A aplicação do DNA recombinante para o aprimoramento da expressão de proteínas de interesse na medicina e na agropecuária tornou a genética grande aliada da produção de bens de interesse. O conjunto de técnicas de análises moleculares que abordam os conceitos genéticos vem permitindo grandes avanços nos estudos de caracterização, expressão e modificação do material genético (DNA e RNA) de diversos organismos. As propriedades e os elementos genéticos têm possibilitado aumentar a quantidade e melhorar a qualidade dos bens produzidos através de atividades biotecnológicas.

Porém, mesmo sem as modernidades dos avanços da biologia molecular, a biotecnologia tradicional também usufruiu, de certo modo, dos conceitos da genética, como “evolução”, que começou com Charles Darwin no século XIX, as leis que regem a herdabilidade de caracteres morfológicos, instituídas por Mendel, até chegar ao início do século XX com a caracterização do material genético por Avery, Leod e Carty.

A curiosidade em decifrar as inúmeras questões sobre o funcionamento e a estrutura do nosso conteúdo genético, levou a grandes avanços nos estudos bioquímicos a partir de então. Chargaff determinou a constituição dos ácidos nucleicos e Watson e Crick deduziram a estrutura do DNA em dupla-hélice, em 1953. Na mesma década também foram descobertas as enzimas DNA polimerase, por Arthur Kornberg, e os primeiros experimentos de controle da expressão gênica, com Although, Jacob e Monod.

Logo em seguida foi descoberta a replicação semiconservativa e bidirecional do DNA, por Meselson e Stahl. Em 1960, o RNA mensageiro foi descrito como carregador da mensagem armazenada no DNA, expressa em proteínas no citoplasma, e na década seguinte foram descobertas várias enzimas de restrição usadas até hoje em processos eletroforéticos de análise, técnicas de hibridização, clonagem e outras metodologias moleculares. Em 1985, foi descrita pela primeira vez a PCR, levando a grandes avanços na descoberta de doenças e melhoramento de plantas.

E finalmente, no início do século XXI, teve início a era do sequenciamento do genoma, inicialmente com o sequenciamento do genoma humano e, hoje em dia, havendo genoma de inúmeras espécies, modelos e não modelos, de plantas e animais. A biotecnologia vem fazendo uso da genética para desenvolver métodos de produção e implementação de processos em escala industrial, desde culturas de células a expressão de proteínas em células animais e vegetais.

A genética também contribui muito para ampliar a busca por novos usos de espécies com potencial agroenergético. Através de técnicas moleculares podem ser conhecidos óleos e compostos interessantes para a produção de energia "limpa", como biodigestores.

Muitas técnicas básicas para caracterização de genes são utilizadas para conhecer os genes associados diretamente ou indiretamente a dado mecanismo fisiológico de um tecido ou célula. Alterações no código genético, seja por alteração na expressão de genes endógenos ou pela inserção de genes exógenos em plantas, têm sido usadas na biotecnologia para atingir diversos objetivos, como o aumento de produção e tolerância a mudanças climáticas globais.

Desse modo, finalizamos esses tópicos mostrando algumas das muitas metodologias desenvolvidas na biotecnologia, com grande impacto nos estudos sobre genética funcional. Algumas dessas estratégias são:

- Construção de Biblioteca Genômica: obtenção de um conjunto contendo todas as informações genético-moleculares de um ser vivo.
- Construção de biblioteca de cDNA: obtenção de um conjunto de sequências gênicas que são expressadas em uma situação fisiológica específica em que o ser vivo se encontra.
- Sequenciamento de DNA: obtenção das bases nitrogenadas correspondentes a genes e regiões intergênicas.
- Técnicas para estudo de caracterização e expressão de genes, *Southern blotting*: reconhecimento de sequências de DNA iguais ou semelhantes em genomas.
- Hibridização subtrativa e *Differential Display*: seleção de genes com significado fisiológico para o organismo, que são expressos diferencialmente em tecidos ou células.

- *Northern blotting*: caracterização da presença e níveis de expressão de genes em determinados tecidos ou células.
- Análises em microarranjos: sequências representativas de uma biblioteca genômica ou de cDNA e que, por meio de hibridização específica, pode-se investigar padrão de expressão gênica.



## Refleta

Você já pensou sobre o porquê de hoje em dia termos tantos incentivos à agricultura orgânica? É claro que há conceitos políticos e econômicos envolvidos, mas no aspecto biológico e da saúde, as principais críticas com relação à agricultura extensiva têm sido a respeito dos agrotóxicos, não é mesmo? Com o uso da biotecnologia e da engenharia genética, podemos elaborar estratégias de controle biológico através do maior conhecimento fisiológico das pragas e patógenos à nível genético. Na fase de produção de um produto, podemos beneficiar culturas permitindo a seleção de genótipos mais resistentes a doenças.



## Vocabulário

**Genótipo:** composição genética de um indivíduo, mais frequentemente usada a respeito de um gene ou grupo de genes que caracterizem uma linhagem de indivíduos.

**Progênie:** conjunto de descendentes; descendência, prole.

## Sem medo de errar

Voltando à questão sobre como proceder com relação ao sequenciamento de genótipos de cana-de-açúcar, seria necessário o desenvolvimento da montagem da sequência do genoma dessa planta. Levando em conta que essa gramínea é poliploide, haveria uma maior dificuldade para as análises genéticas e genômicas dessa espécie?

Espécies de plantas poliploides são espécies de indivíduos que possuem vários genomas. O genoma humano e de outros organismos, em sua maioria, apresentam duas cópias para cada cromossomo, cada cópia provida por um dos genitores. Porém, na cana-de-açúcar, por exemplo, o número de cromossomos homólogos varia de oito a 14. Essa complexidade genômica aumentada dificulta muito a compreensão dos processos moleculares da espécie, pois é difícil entender como o

genoma se organiza para acomodar e harmonizar essa multiplicação de cromossomos homólogos. Com o aumento do número de cromossomos, aumenta o número de genes proporcionalmente. Desse modo, a planta deve desenvolver mecanismos para integrar e estabilizar essa grande quantidade de genes. É um desafio considerável entender como os genes, especialmente os de regulação, controlam o momento de florescimento da planta, ou a resposta da planta ao estresse ambiental, pois eles precisam ter um nível de expressão controlado para não causar danos. Para esse controle na expressão dos genes, alguns cromossomos podem ter seus genes ativados enquanto outros continuam silenciados. Para a compreensão desses mecanismos é necessário o desenvolvimento de ensaios e estudos biotecnológicos mais aprofundados. Para a própria montagem do genoma de cana-de-açúcar, é muito complicado saber a posição de cada sequência, uma vez que há tanta variação entre os cromossomos. A montagem do genoma dessa e de outras espécies poliploides tem sido um grande desafio da bioinformática.

## Avançando na prática

### A biotecnologia e a engenharia genética

#### Descrição da situação-problema

A biotecnologia e a engenharia genética podem estar envolvidas em diversas etapas no ciclo produtivo de uma cultura de importância agrônômica. Em um programa de melhoramento, podemos aplicar diversas técnicas para auxiliar na seleção de plantas superiores, em relação a características como resistência a doenças, pragas e fatores abióticos. Dependendo da finalidade do programa de melhoramento, podemos estudar a caracterização de genes expressos em um dado sistema. Como esses genes são segregados e passados para as próximas progênes, e as fases de manejo das culturas são estudadas, principalmente, no âmbito de manejo de pragas e controle biológico, como pensar em uma estratégia de melhoramento de um produto em sua fase de comercialização, ou seja, agregar alguma melhoria que torne o produto agrícola mais interessante para o comerciante e o comprador? O que poderia ser feito através das técnicas biotecnológicas vistas até o momento?

## Resolução da situação-problema

A biotecnologia pode beneficiar uma cultura permitindo a seleção de genótipos que produzam frutos com formas, aromas e colorações mais interessantes para o consumidor. Através da técnica de PCR e análise da segregação de genes relacionados a essas características, podemos chegar a genótipos mais atrativos para a venda. Outro fator que pode ser considerado na seleção de genótipos que sejam beneficiados na etapa de comercialização é o quanto aquele produto tem de durabilidade na prateleira, ou seja, selecionar genótipos que não estraguem facilmente pode ser muito vantajoso.

### Faça valer a pena

**1.** A transcrição é um processo que ocorre com ácidos nucleicos e que é essencial para o funcionamento de todas as células, procariontas ou eucariotas. Esse processo ainda é fundamental para que ocorra a descodificação do conteúdo genético contido no DNA.

Quais dos seguintes itens são importantes para a transcrição?

- a) Promotor.
- b) Enzima polimerase.
- c) Terminação 5' e 3'.
- d) ORF (sequências de leitura aberta, ou sequências codificantes).
- e) Promotor, enzima polimerase, terminação 5 e 3, ORF.

**2.** Sem a transcrição do DNA em RNA não ocorre síntese de proteínas. Nos eucariontes, as enzimas RNA polimerases requerem a assistência de fatores de transcrição para começar a síntese de uma cadeia de RNA.

Qual característica sobre os fatores de transcrição eucarióticos é útil para a pesquisa em biotecnologia?

- a) Eles têm dois domínios, os quais se ligam ao DNA.
- b) Eles têm dois domínios, ambos ligados a proteínas separadas.
- c) Eles têm dois domínios: um domínio se liga ao DNA e o outro se liga a alguma parte do aparelho de transcrição.
- d) Eles têm apenas um domínio que se liga à enzima polimerase.
- e) Eles têm dois domínios, mas nenhum dos domínios pode ser projetado e, portanto, não é útil para pesquisa em biotecnologia.

**3.** A transcrição consiste na síntese de RNA e é realizada de maneira diferente em seres eucariontes e procariontes, isso interfere de maneira direta em quais abordagens ou metodologias biotecnológicas aplicar dependendo do organismo de estudo.

De que forma a transcrição eucariótica é mais complexa do que a transcrição procariótica?

- a) Os eucariotas possuem três ARN polimerases diferentes, enquanto os procariotas possuem apenas uma ARN polimerase.
- b) A iniciação da transcrição eucariótica é muito mais complexa do que a iniciação procariótica devido à presença de diferentes fatores de transcrição envolvidos.
- c) Elementos ascendentes são necessários para a transcrição eficiente em células eucarióticas, mas esses elementos não são geralmente necessários em procariotas.
- d) O mRNA eucariótico é feito no núcleo.
- e) Todas as declarações acima descrevem formas em que a transcrição eucariótica é mais complexa.

## Seção 2.3

### Moléculas de DNA, RNA e proteínas

#### Diálogo aberto

Uma parceria entre pesquisadores de institutos canavieiros, usineiros e empresas particulares construiu uma grande cooperação com a finalidade de aumentar a produção da cana-de-açúcar, gramínea que tronou o Brasil um dos maiores produtores de biocombustível do mundo. O grande objetivo da parceria é tornar essa planta mais adaptada e produtiva, a fim de aumentar a participação do bioetanol na matriz energética do país. Uma maneira clássica de chegar a plantas melhoradas, no sentido de maior produção por quantidade de hectare, é plantar uma grande diversidade de plantas e, ao longo de anos de cultivo, ir selecionando as plantas tolerantes ao estresse, mais fáceis de colher, resistentes a doenças, com maior produção de açúcar, e outras características vantajosas. Porém, a descoberta de pragas repentinas, o aumento do preço dos combustíveis fósseis e a pressão política e econômica para o desenvolvimento dos biocombustíveis impõem uma aceleração a esse processo de melhoramento da cana-de-açúcar.

Em 2017 foi aprovada a primeira linhagem de cana-de-açúcar transgênica liberada para comercialização no Brasil. Para uma empresa lançar uma nova linhagem de cana transgênica, em quais desafios e objetivos ela deveria focar?

#### Não pode faltar

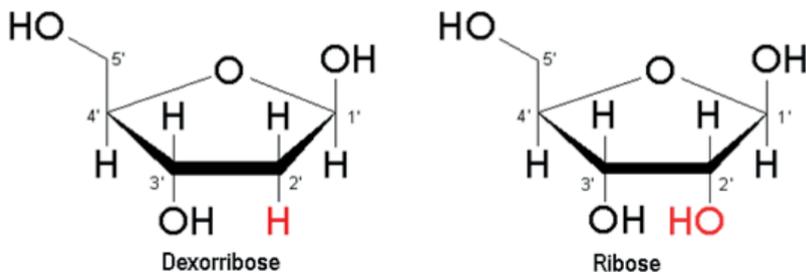
##### Definição de moléculas de DNA e RNA

Nas sessões anteriores pudemos aprender como uma célula faz a leitura das suas instruções genéticas. Através de uma porção particular de sequência de nucleotídeos de DNA, chamadas regiões gênicas, é feita a transcrição do DNA em uma sequência de nucleotídeo de RNA, que, por fim, faz a tradução da informação genética em uma proteína. Tanto o DNA, ácido desoxirribonucleico, quanto o RNA, ácido ribonucleico, são moléculas de ácidos nucleicos. Os ácidos nucleicos são polímeros lineares de nucleotídeos conectados entre si por ligações fosfodiéster (covalente).

A informação da molécula de DNA e de RNA, embora sejam moléculas com formas químicas distintas, é constituída essencialmente da mesma linguagem: sequência de nucleotídeos. Os nucleotídeos são as unidades básicas dos ácidos nucleicos e são constituídos por uma pentose (açúcar com cinco carbonos), uma base nitrogenada e um grupo fosfato. A pentose é um elo entre a base nitrogenada e o grupo fosfato. A base nitrogenada é um composto orgânico cíclico contendo átomos de nitrogênio e pode ser de dois tipos: purinas (9 átomos que se formam pela fusão de dois anéis heterocíclico, de 5 e 6 átomos) ou pirimidina (6 átomos formados por apenas um anel heterocíclico). As bases Adenina e Guanina são purinas e a Timina, Citosina e Uracila são pirimidinas.

O nitrogênio das bases nitrogenadas liga-se ao carbono 1 da pentose e o grupo carboxila do átomo carbono 5 da pentose participa da ligação éster com o grupo fosfato, formando a ligação fosfodiéster.

Figura 2.3 | Estrutura do açúcar (pentose) que compõe os nucleotídeos



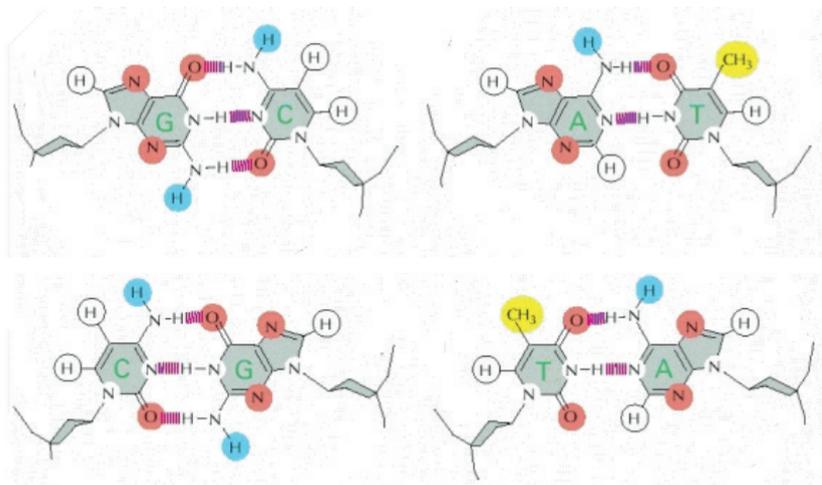
**O açúcar que compõe o DNA é a Pentose desoxirribose e o RNA é a Pentose Ribose**

Fonte: <<http://geneticavirtual.webnode.com.br/genetica-virtual-home/prefacio/estrutura>>. Acesso em: 20 nov. 2017.

A estrutura dos monômeros constituintes dos ácidos nucleicos é o que distingue quimicamente o DNA do RNA. No RNA, a pentose é uma ribose, daí o nome de ácido ribonucleico, com a presença de um grupo hidroxila no carbono 2 da pentose em vez de desoxirribose. Já o DNA é uma pentose, com uma 2-desoxirribose se ligando ao carbono 2 da pentose. Além dessa diferença, há também a distinção dessas macromoléculas pelas suas bases nitrogenadas. No DNA as bases são: Adenina, Guanina, Citosina e Timina. Já no RNA, as bases são: Adenina, Guanina, Citosina e Uracila. A Timina e a Uracila apresentam diferença no grupo metila (CH<sub>3</sub>) no átomo carbono cinco do anel pirimídico da Timina.

As propriedades complementares de emparelhamento das bases nitrogenadas no DNA são: Adenina sempre pareia com Timina e Guanina com Citosina; já no RNA a Adenina pareia com Uracila e Guanina com Citosina.

Figura 2.4 | Configurações das bases nitrogenadas no DNA. Os doadores de ligações de hidrogênio estão indicados em azul e os receptores de ligação de hidrogênio estão em vermelho



Fonte: Alberts, Johnson e Lewis (2002, p. 1226).

Além dessas diferenças entre os monômeros dos ácidos nucleicos, também podemos visualizar uma diferença na estrutura da molécula de DNA e de RNA.

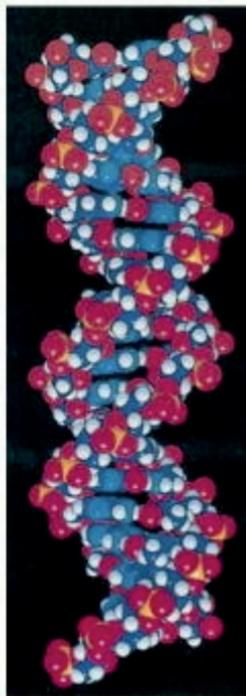
O DNA é uma molécula de polinucleotídeos formada a partir de unidades de desoxirribonucleotídeos ligadas covalentemente. Ele forma uma longa dupla hélice de nucleotídeos, mantida por pontes de hidrogênio, com uma estrutura secundária regular e simples.



Refleta

Toda essa estrutura do DNA deve ter um sentido evolutivo para chegar a essa conformação e ter perpetuado até hoje. Essa conformação da molécula de DNA em dupla hélice possibilita uma maior estabilidade e regularidade estrutural do que a molécula de RNA. Essa estabilidade é importante para que o DNA consiga cumprir com sua função: armazenamento de informações hereditárias, transportando-as entre gerações.

Figura 2.5 | Estrutura do DNA em dupla hélice. A coloração dos átomos que compõem a estrutura do DNA segue o padrão: carbono, azul escuro; azoto, azul claro; hidrogênio, branco; oxigênio, vermelho; fósforo, amarelo



Fonte: Alberts, Johnson e Lewis (2002, p. 600).

O RNA, por sua vez, é uma molécula de fita única de nucleotídeos. Essa molécula apresenta uma enorme diversidade de estruturas, uma vez que pode se dobrar e fazer pareamentos intra-moleculares das bases, gerando estruturas complexas com segmentos de dupla hélice. Essa flexibilidade do RNA é importante para a execução de suas múltiplas tarefas dentro de uma célula.

A descoberta da estrutura do DNA e do RNA possibilitou um grande crescimento no estudo do conteúdo genético dos seres vivos. A partir do conhecimento químico e bioquímico dessas estruturas, pode-se entender como a informação genética se organiza e realiza as funções metabólicas da célula. Tendo conhecimento sobre como essas moléculas são constituídas, podemos então estudar o genoma de qualquer ser vivo que tivermos o interesse de conhecer.

## Genômica

O genoma de um ser vivo carrega a totalidade da sua informação genética, em particular aquela que estaria presente no DNA que transporta essa informação. A genômica é a ciência que surgiu para estudar o conteúdo presente no genoma a partir do sequenciamento completo do DNA de vários tipos de organismos. O objetivo dessa ciência é compreender a estrutura, organização e função do material genético.

O sequenciamento do genoma de um organismo animal, vegetal ou de bactérias e fungos visa desvendar o código genético através do seu mapeamento. Estudos envolvendo genômica têm tido grande impacto na pesquisa em diversas áreas, como no projeto Genoma Humano, em que foi sequenciado o primeiro genoma humano depois de muitos anos de estudos e aprimoramento de técnicas de sequenciamento. Em um sequenciamento, o DNA do organismo de estudo é fragmentado em milhões de pedaços, que serão lidos por máquinas de sequenciamento automático.

Nos últimos anos, houve um rápido aumento e grande avanço e barateamento das tecnologias de sequenciamento, tornando possível o sequenciamento de várias espécies não modelo. Com a facilidade para gerar dados de sequências genômicas, o grande desafio da atualidade está com a bioinformática e suas aplicações para análise e interpretação da grande quantidade de dados que temos gerado. A montagem do genoma nem sempre é uma tarefa fácil, uma vez que muitos algoritmos e estatísticas são necessários para realizar a união de um grande número de sequências de DNA, que são agrupadas para criar uma representação do cromossomo original do DNA. Esse processo computacional é complexo, pois, dependendo da espécie estudada, o genoma pode apresentar um grande número de sequências idênticas.

A genômica possui três vertentes, que, apesar de separadas, se complementam:

- Genômica estrutural: estudo da organização e estrutura dos genes.
- Genômica funcional: estudo das funções gênicas, através do transcriptoma, por exemplo. Nessa vertente, o foco dos estudos direciona a compreensão de mudanças para as respostas e o funcionamento do genoma em diferentes condições ambientais ou estágios de desenvolvimento.

- Genômica comparativa: estudo que, fazendo uso da genômica estrutural e funcional, busca compreender as relações entre os genomas, determinando grau de sintonia de espécies correlacionadas. Nesse estudo também são buscadas homologias entre as sequências de genes.

A genômica tornou-se uma grande ferramenta que permite entender mecanismos moleculares e que determina a diversidade e adaptação das plantas em diferentes ambientes. Essa compreensão tem grande impacto em programas de melhoramento genético, proporcionando avanços no aumento da produtividade sustentável nas indústrias de alimentos, produção de energia ou aplicações biotecnológicas.

A comunidade científica tem investido cada vez mais no entendimento do conteúdo genético, buscando aplicações em diversos programas de melhoramento. Hoje em dia temos uma diversidade grande de genomas de plantas completamente sequenciados, com o objetivo de explorar as vantagens e as oportunidades que a genômica pode oferecer às ciências das plantas. O genoma de uma pequena planta modelo, *Arabidopsis thaliana*, representou um marco na ciência, identificando essa espécie como referência para a genômica vegetal. Os genomas de plantas apresentam organizações peculiares e muitas regiões duplicadas, tornando muito complexa a sua compreensão. Essa alta complexidade, maior do que a encontrada em muitos genomas de mamíferos, revela histórias evolutivas complexas, envolvendo eventos de redução de genes, poliploidização e diploidização.



### Assimile

O sequenciamento de genomas completos de plantas vem contribuindo ainda mais para identificar genes e entender sua função. Ao desvendar as relações entre os alelos que controlam traços de interesse, conseguimos desenvolver novos métodos e ferramentas para a elaboração de culturas mais diversificadas geneticamente, gerenciando essa variação genética para o desenvolvimento de novas cultivares.

A diversidade e heterogeneidade genômica das plantas, decorrente de mutações e seleção, pode ser melhor compreendida através da arquitetura genética. Existem vários marcadores genéticos que podem auxiliar nesses estudos. Com as facilidades de sequenciamento, as análises baseadas em mapas de marcadores de DNA utilizam marcadores microssatélites e marcadores de polimorfismos de

nucleotídeos únicos, possibilitando a identificação de genes com grandes efeitos, ou ainda, de dezenas de genes que representam algumas das variantes fenotípicas. A análise de dados genéticos e fenotípicos com softwares específicos tornou possível mapear e avaliar a variação quantitativa complexa.



### Exemplificando

Os polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNP) são os melhores marcadores moleculares para avaliação de populações de plantas através da construção de mapas genéticos. Os marcadores SNPs aumentam a precisão das estimativas de relacionamentos entre os indivíduos e também podem revelar heterogeneidade ao longo do genoma da planta (RÍOS, 2015).

Outra abordagem que pode ser adotada no estudo da genômica é focar apenas as regiões traduzidas no genoma, através do sequenciamento do transcriptoma. Essa técnica é baseada no sequenciamento de bibliotecas de DNA complementares, que produzem matérias-primas para descoberta de genes, identificação de polimorfismos para o desenvolvimento de marcadores de DNA de regiões transcritas. Além disso, a pesquisa comparativa do transcriptoma demonstrou o papel-chave da família de genes que codificam o núcleo de ligação de nucleotídeos.

### Proteômica

A palavra "proteoma" tem origem em PROTEÍNAS expressadas por um genoma. Tal como a genômica compõe todo o conjunto de DNA de um organismo, a proteômica é a ciência que descreve a caracterização do conjunto completo de proteínas presentes em um momento específico da célula. As ciências OMICAS são derivadas do sufixo "oma", que quer dizer "conjunto de", e, no caso da proteômica, surgiu como uma tecnologia de ponta para investigar as proteínas traduzidas, visando entender a expressão de genes globais e seus mecanismos funcionais.

O proteoma possui capacidades dinâmicas, então de forma diferente do genoma, que é de natureza estática, nos revela quais mecanismos funcionais estão envolvidos para mediação de processos celulares específicos. Ao analisar as proteínas produzidas em uma dada condição, nós avaliamos as modificações pós-traducionais, que

desempenham importantes papéis no crescimento e desenvolvimento das plantas e não podem ser identificadas em sequenciamento de genomas ou transcriptomas. Analisar as modificações pós-transcricionais nos permite compreender as funções biológicas e seus processos (como as vias e rotas metabólicas que estão sendo mais expressas em determinadas condições).

A bioinformática vem conectando a genômica funcional, tal como a proteômica e outras ciências OMICAs aos dados fisiológicos, possibilitando novos métodos para estudos de melhoramento genético.

A proteômica desempenha um importante papel ao ampliar as capacidades da biotecnologia vegetal, sendo uma das principais tecnologias para descoberta de genes novos, estando presente em muitos programas de melhoria de culturas. O conhecimento de proteínas-chave que desempenham papéis importantes no bom crescimento e desenvolvimento de plantas permite melhorias genéticas em culturas de alimentos e biocombustíveis, incluindo qualidade alimentar, segurança e valores nutricionais, tolerância a estresses abióticos e bióticos, fabricação de vacinas baseadas em plantas.

As proteínas-chave são aquelas que mantêm a homeostase celular em um determinado meio, controlando caminhos fisiológicos e bioquímicos. Os dois métodos proteômicos mais utilizados para catalogar e identificar essas proteínas-chaves em diferentes estados ou ambientes proteômicos são: eletroforese bidimensional (2-DE) e a espectroscopia de massa (MS).

A seleção de plantas utilizando marcadores de DNA em conjunto com técnicas de proteômica pode ser aplicada para identificação de locais de genes que expliquem a variação na quantidade de proteínas observada. O estudo de proteínas ajuda a traçar correlações entre genes responsivos e fenômenos de tolerância ao estresse observados, sendo possível selecionar os genes para melhorar características de interesse em programas de melhoramento.

## **Metabolômica**

A ciência metabolômica envolve a análise abrangente e de alta velocidade da mistura de metabólitos complexos. Através dos estudos de metabólitos é possível identificar e quantificar cada metabólito individual, produtos finais das atividades regulatórias celulares. Estudos metabolômicos aliados com estudos de genômica ou proteômicos

podem refletir mudanças no fenótipo e na função de um tecido ou organismo específico.

A metabolômica surge como uma ciência que utiliza técnicas analíticas baseadas em espectroscopia de massa, espectrometria de ressonância magnética nuclear e fluorescência induzida por laser para análise do conjunto de todos os compostos de baixa massa molar que são sintetizados ou modificados por um organismo. A identificação de metabólitos exige uma instrumentação sofisticada, e a escolha de qual “ferramenta” usar varia com o objetivo do estudo, sendo necessário avaliar a necessidade de sensibilidade, seletividade e rapidez da análise.

Os experimentos para identificação quantitativa e qualitativa dos metabólitos fornecem resultados importantes para melhorar a compreensão das informações biológicas relacionadas à genômica funcional.

Há uma diversidade enorme de propriedades físicas e químicas entre os metabólitos, uma vez que estes formam um conjunto heterogêneo de arranjos atômicos. A análise de metabólitos vai desde a caracterização e quantificação de etanol, isopreno, até a análise de carboidratos, terpenoides e lipídeos.

A depender da complexidade da amostra, é necessário definir se a análise é direcionada para moléculas-alvo que já são previamente conhecidas ou se será analisado um perfil total dos metabólitos presentes. Existem vários bancos de dados, como dados de expressão gênica, que podem auxiliar nos estudos metabolômicos em espécies de plantas. Alguns desses bancos de dados também fornecem aos usuários uma ferramenta poderosa que lhes permite identificar estruturas. O *International Chemical Identifier* (InChI) é um banco desenvolvido pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) e pelo Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST), que permite essas identificações estruturais. Também existem bancos e bases de dados específicos para espécies de plantas, por exemplo, o banco de dados do Metaboloma de Tomate (BHADAURIA, 2017).

Aliar as ciências OMICAs da genômica, proteômica e metabolômica fornece grande subsídio para a compreensão de processos e informações biológicas fundamentais para o melhoramento genético. Todas as ciências OMICAs e suas tecnologias possibilitam um entendimento cada vez mais global de um sistema biológico, sendo assim, esse conhecimento pode ser direcionado e aplicado em inúmeras áreas da biotecnologia, tal como o melhoramento de plantas.



Esta matéria mostra um vídeo muito atual sobre a técnica de edição de genoma mais comentada do momento (CRISPR-Cas9): <<https://super.abril.com.br/ciencia/video-mostra-uma-cadeia-de-dna-sendo-editada-em-tempo-real/>>. Acesso em: 13 dez. 2017.

## Sem medo de errar

Desde 1990 há um crescimento nos estudos e cultivos de culturas transgênicas que resultou de trabalhos pioneiros sobre a engenharia genética. Com os avanços na tecnologia de genômica, proteômica e metabolômica, podemos investigar quais produtos gênicos e metabólitos são de interesse para o produtor de cana, identificar à qual sequência/gene eles estão ligados, e selecionar regiões de inserção em novos cultivares.

## Avançando na prática

### Estudo de estresse por seca em canaviais do estado de São Paulo

#### Descrição da situação-problema

Tendo em vista o aumento dos períodos de seca no estado de São Paulo, e com os baixos níveis dos reservatórios de água, não há como produzir cultivares de cana-de-açúcar com baixa resistência à seca, pois aumentaria a necessidade de irrigação da plantação. Fazendo-se uso das ciências OMICAs, qual abordagem nós poderíamos adotar para identificação de genes de resposta à seca?

#### Resolução da situação-problema

Com o sequenciamento do conteúdo genômico expresso em cana-de-açúcar, através do sequenciamento do transcriptoma, nós poderíamos obter as regiões gênicas que são expressas e que têm ligação com as categorias funcionais de genes de resposta a seca. Dessa forma, poderíamos identificar essas regiões transcritas, sintetizar marcadores moleculares com essas sequências, e, através de uma PCR em tempo real, analisar quais cultivares expressam ou não aquele gene de resistência à seca.

## Faça valer a pena

**1.** A genômica trouxe um substancial avanço nas aplicações de marcadores moleculares com utilidade em programas de melhoramento genético, possibilitando gerar novas marcas a partir do sequenciamento do DNA de organismos de interesse.

Qual dos seguintes marcadores moleculares é utilizado na pesquisa genômica?

- a) Polimorfismo de microssatélites e análise de metabolitos.
- b) Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição e polimorfismo de microssatélites.
- c) Polimorfismo de nucleotídeo único e análise de metabólitos.
- d) Número variável de repetição em tandem e análise de metabólitos.
- e) Análise de metabolitos e polimorfismo de microssatélites.

**2.** A genômica vegetal tem o grande desafio de decifrar a alta complexidade da arquitetura genética de espécies vegetais. Para auxiliar no desafio da montagem de novos genomas de espécies de plantas, nós podemos nos basear em organismos modelos, que já possuem muita informação a respeito do seu conteúdo genético em diversos bancos de dados.

Qual dos organismos a seguir é a espécie considerada modelo para a genômica vegetal?

- a) *H. sapiens*.
- b) *D. melanogaster*.
- c) *O. sativa*.
- d) *P. trichocarpa*.
- e) *A. thaliana*.

**3.** Os transgênicos de plantas são organismos geneticamente modificados, nos quais é inserido material genético, com a finalidade específica de melhorar alguma característica de interesse agrícola ou de energia.

Qual das características abaixo não pode ser conferida a uma planta por transgenia?

- a) Resistência a doenças.
- b) Melhorar o valor nutricional.
- c) Resistência a um inseto.
- d) Proteção contra herbicidas.
- e) Compatibilidade de cruzamento com outras espécies.

# Referências

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J. **Molecular biology of the cell**. 4. ed. New York: Garland Science, 2002.
- BHADAURIA, Vijai. **Next-generation sequencing and bioinformatics for plant science**. [s.l.]: Ed. Caister Academic Press, 2017.
- BROWN, T. A. **Gene cloning & DNA analysis**. An introduction. 5. ed. [s.l.]: Blackwell Publishing, 2006.
- CRICK, F. H. C. On protein synthesis. **Symp. Soc. Exp. Biol.**, XII, 1958, p. 139-163.
- GLICK, B. R.; PASTERNAK, J. J.; PATTEN, C. L. **Molecular biotechnology**: principles and applications of recombinant DNA. 4. ed. [s.l.]: ASM Press, 2010.
- GRIFFITHS, A. J. F.; WESSLER, S. R.; LEWONTIN, R. C.; CARROLL, S. B. **Introdução à genética**. Trad. Motta, P. A. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 744p.
- KREUZER, H.; MASSEY, H. A. **Engenharia genética e biotecnologia**. 2. ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2002. 434p.
- McCLARIN, J. A. et al. **Science**, 234, 1986, p. 1526-1541.
- MESELSON, M.; YUAN, R. **Nature**. Lond., 217, 1968, p. 111-114.
- NEJAR, Bruno Alessandra. **Biotecnologia II: aplicações e tecnologias**. Porto Alegre: Artmed Editora Ltda., 2017. v. 1.
- Parreira RC, Resende RR. NOSSO CORPO NOS PROTEGE, MAS PODE TAMBÉM NOS MATAR! **Nanocell News**. 2014;1(8).
- PENNISI E. The CRISPR craze. **Science**, v. 341, n. 6148, pp. 833-6, 2013.
- PRIMROSE, S. B.; TWYMAN, R. M.; OLD, R. W. **Principles of gene manipulation**: an introduction to genetic engineering. 6. ed. [s.l.]: Blackwell Publishers, 2006.
- RÍOS, Rodomiro Ortiz. **Plant breeding in the omics era**. [s.l.]: Ed. Springer, 2015.
- ROHS, R. et al. Nuance in the double-helix and its role in protein-DNA recognition. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 19, n. 2, p. 171-177, 2009.
- ROHS, R. et al. The role of DNA shape in protein DNA recognition. 2009 **Nature** 461: 1248–1253 [PubMed]
- ROHS R, JIN X, WEST SM, JOSHI R, HONIG B, MANN RS. Origins of specificity in protein-DNA recognition. **Annu Rev Biochem**. 2010. 79: 233–269
- ROHS, R.; SKLENAR, H.; SHAKKED, Z. Structural and energetic origins of sequence-specific DNA bending: Monte Carlo simulations of papillomavirus E2-DNA binding sites. **Structure**, v. 13, n. 10, 2005, p. 1499-1509.
- SASSON, A. **Plant and agricultural biotechnology**. Achievements, prospects and perceptions. Mexico: Ciencia y Tecnologia, 2006. 444p.

TANAKA M. et al. Altered carbohydrate metabolism in the storage roots of sweet potato plants overexpressing the SRF1 gene, which encodes a Dof zinc finger transcription factor. **Planta**, v. 230, n. 4, pp. 737-46, set. 2009.



# Cultura de tecidos vegetais

## Convite ao estudo

Nesta unidade são apresentados os conceitos básicos das células vegetais e sua aplicação em técnicas biotecnológicas utilizadas para o aumento do desenvolvimento vegetativo e da biomassa de plantas. A cultura de células é utilizada no melhoramento de plantas com a finalidade de aumentar as características de interesse econômico que tornem as plantas cada vez mais produtivas e adaptadas às condições distintas de cultivos, sendo resistente a pragas e doenças. O conhecimento morfológico, bioquímico e fisiológico das células vegetais é essencial para o desenvolvimento de técnicas de cultivo capazes de “melhorar plantas” com o mínimo de alteração do genoma.

Na primeira seção da Unidade 2 estudaremos: biotecnologia e célula vegetal; célula vegetal como potente participante do melhoramento genético vegetal; hormônios vegetais e biotecnologia; e características de tecido meristemático vegetal. Na segunda seção estudaremos totipotência; importância e aplicabilidade da cultura de células vegetais; organogênese direta e indireta: funções e aplicações biotecnológicas; e poliembriogênese. Na Seção 3 abordaremos a definição de embriogênese: embriogênese somática e importância tecnológica; condições do cultivo *in vitro* e tipos de explantes; micropropagação; biorreatores; e, para concluir nosso estudo desta seção, conservação *in vitro* de germoplasma. Assim o principal objetivo desta unidade é conhecer os principais conceitos fisiológicos e as aplicações do cultivo *in vitro* dos tecidos vegetais.

## Seção 3.1

### Características e propriedades de tecido meristemático vegetal e propriedades das células vegetais

#### Diálogo aberto

Os avanços da biotecnologia no melhoramento de plantas se faz notar nos últimos anos e, no Brasil, principalmente as culturas mais importantes no setor agrícola estão sendo favorecidas. Novos experimentos e novas técnicas geram cada vez mais resultados, tais como manipulação genética para obtenção e criação de novas linhagens de plantas, levando a um grande aumento na produção de produtos agrícolas e industriais. O melhoramento genético deve trazer benefícios tanto pela redução na extensão das áreas que essas plantas ocupam, como pelo alto consumo de fertilizantes. O conhecimento das células vegetais – por exemplo os processos biológicos envolvidos – devem beneficiar o melhoramento genético de plantas.

As áreas de cultivo de plantas de interesse agrícola só tendem a aumentar, conseqüentemente elevando o consumo de fertilizantes nitrogenados, que passarão de 2,5 milhões de toneladas em 2030. Como a aplicação do conhecimento da célula vegetal pode auxiliar o melhoramento de plantas?

#### Não pode faltar

##### Biotecnologia e a célula vegetal

Na Unidade 2 nós pudemos compreender a importância dos ácidos nucleicos no armazenamento e na transmissão do conteúdo genético de uma célula vegetal. A biotecnologia atual tem grande enfoque nas abordagens e técnicas moleculares, devido ao grande salto dado na aquisição de conhecimento e na aplicação nos últimos anos, mas o estudo de genótipos melhorados de espécies vegetais só é possível se tivermos a compreensão e o domínio de conceitos básicos em morfologia, fisiologia e bioquímica

de plantas. A construção da biotecnologia moderna e todo seu contexto genômico de aplicações foi possível graças ao caráter multidisciplinar dessa ciência, sendo possível alcançar uma ampla abrangência sobre o estudo dos produtos e processos envolvidos nos sistemas biológicos.

A morfologia tem por finalidade estudar as formas e a estrutura das partes subterrâneas (raízes) e aéreas (folhas, caules, flores, frutos e sementes) das plantas, enquanto a fisiologia é voltada ao entendimento do metabolismo, desenvolvimento e reprodução vegetal. Com a junção dessas vertentes com o conhecimento químico das estruturas e do funcionamento vegetal (bioquímica vegetal), podemos então compreender os processos celulares em plantas.

As plantas, como seres eucarióticos, possuem células cujo núcleo é delimitado por membrana nuclear, além de possuírem outras estruturas celulares específicas, como parede celular, plastídeos (cloroplasto) e vacúolos (ausentes em células animais). As células vegetais variam pouco quanto a sua forma e tamanho.

A parede celular, envoltório de celulose que cerca as células das plantas, essencialmente para proporcionar-lhe rigidez, suporte, resistência e proteção, é localizada fora da membrana celular (formando um revestimento exterior à célula). A celulose é seu principal constituinte, mas também é composta por pectinas, glicoproteínas, hemiceluloses e lignina, formando três camadas: a parede celular primária, secundária e a lamela média.

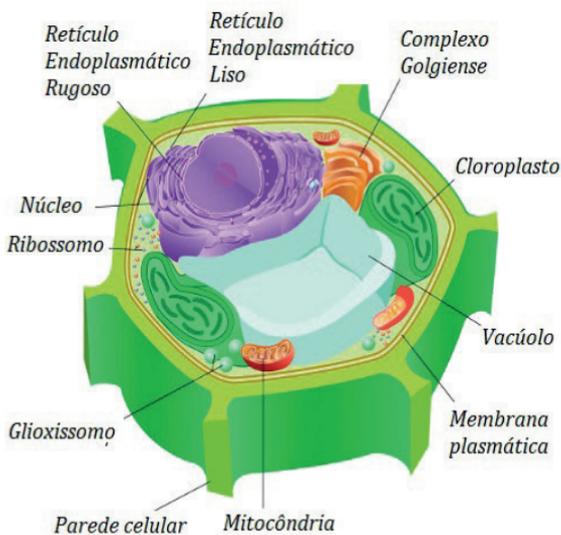
Essa constituição química e estrutural da parede celular varia conforme a especialização das células da planta. Cada tecido vegetal possui células especializadas, com paredes celulares de espessuras, composição química e organizações distintas, determinando a forma e a função de cada célula. Algumas células vegetais são capacitadas para fabricar e armazenar moléculas orgânicas, como células de parênquima, células de colênquima e outras, que transportam nutrientes em toda a planta, como células condutoras de água e alimentos.

A parede celular possibilita a interação célula a célula e em conjunto com a membrana celular, protegem e organizam as moléculas de entrada e saída da célula, tendo a permeabilidade seletiva. A membrana celular também reveste a célula vegetal, porém dentro da parede celular, envolvendo o citoplasma e as organelas celulares. Essa membrana é semipermeável, gerenciando

a passagem e o bloqueio de substâncias específicas para a sobrevivência da célula.

Os plastídeos são organelas que ajudam no armazenamento de produtos vegetais. Há três grandes grupos de plastídeos: os cloroplastos, cromoplastos e leucoplastos. O cloroplasto é o plastídeo mais importante, por ser responsável pela fotossíntese e por ter DNA específico que codifica algumas proteínas para executar as funções específicas dessa organela. Suas atividades estão ligadas ao processo de fotossíntese para produzir alimentos para as plantas. Sua estrutura consiste em uma organela alongada com formação de uma pilha de membranas em forma de disco (os granus), onde está a clorofila química (pigmento verde que absorve a energia da luz do sol), promovendo o processo de fotossíntese.

Figura 3.1 | Estrutura de uma célula vegetal



Fonte: <<http://brasilescola.uol.com.br/biologia/celula-vegetal.htm>>. Acesso em: 5 fev. 2018.

Os vacúolos são organelas delimitadas por uma membrana chamada tonoplasto e contêm em seu interior: água, açúcares, proteínas e alguns compostos fenólicos. Essas organelas estão ligadas às membranas que armazenam substâncias úteis para o metabolismo da célula e também têm função no processo lisossômico.

O citoplasma é a matriz dentro da membrana celular onde ficam suspensas todas as outras organelas celulares. O núcleo é

a organela responsável pelo controle central das reações químicas das células e pelo armazenamento do material hereditário da célula (DNA). São os ribossomos, as estruturas de RNA e as proteínas que juntam os aminoácidos do citoplasma para montar as proteínas. Essas proteínas das células são ordenadas e embaladas por meio das atividades do complexo de Golgi.

As organelas mitocondriais realizam respiração celular e liberação de energia para o trabalho da célula, enquanto o retículo endoplasmático é uma organela que regula a pressão osmótica, sintetiza lipídios e atua no transporte de materiais, comunicando-se com a membrana celular.

As diferentes estruturas celulares desempenham funções essenciais à sobrevivência e ao desenvolvimento dos tecidos do organismo. A biotecnologia aplica técnicas para compreender essa gama de operações dentro de uma célula vegetal, sendo possível entender como ocorre a produção de hormônios, enzimas e todas as atividades metabólicas da célula vegetal.



Pesquise mais

Este vídeo de uma célula vegetal 3D traz os principais conceitos vistos aqui sobre os componentes celulares e sua estrutura. Este material visual pode facilitar a compreensão de como se estrutura uma célula vegetal.

ALMEIDA, P. R. A. de. **Animação célula 3D**. Disponível em: <[https://www.youtube.com/watch?v=gyGWN\\_Vk2ps](https://www.youtube.com/watch?v=gyGWN_Vk2ps)>. Acesso em: 5 fev. 2018.

## A célula vegetal como potente participante do melhoramento genético vegetal

Desde a época de Gregor Mendel, considerado o pai da genética, temos estudado as características e os processos de uma planta, atribuindo as variações aos componentes genéticos. As diferenças entre plantas altas, plantas anãs, ervilhas verdes e amarelas, sementes lisas e rugosas, são todas oriundas de características encontradas nas células vegetais de cada planta, que estão sob controle de características genéticas. Na seção anterior, vimos que as informações para o funcionamento celular de uma planta estão contidas no material genético, no DNA. Com a finalidade de se obter plantas com características desejadas, o melhoramento genético vegetal começou com o cruzamento de plantas da mesma espécie que apresentavam características de interesse para produzir plantas-

filhas melhoradas, porém não se podia garantir que as gerações seguintes continuariam apresentando as mesmas características de interesse.



### Refleta

As técnicas de melhoramento evoluíram no sentido de manipular as características de interesse de uma célula vegetal por meio das inovações alcançadas com a engenharia genética, ao invés de seguir somente os fundamentos das duas leis mendelianas e a herdabilidade (1ª lei: lei da segregação dos fatores – que diz respeito à separação dos alelos de um gene; 2ª lei: segregação independente dos alelos que determinam características distintas).

Desse modo, o melhoramento genético de plantas começou a fazer uso de outras técnicas baseadas em engenharia genética para se alcançar as características de interesse. Dentre as técnicas biotecnológicas que utilizam as células e os tecidos vegetais para a engenharia genética, destacam-se a cultura de tecidos vegetais e a transferência de genes de organismos diferentes para a incorporação de características de interesse no genoma de uma determinada planta – organismos geneticamente modificados (OGM).



### Exemplificando

As características selecionadas para a transferência de genes podem ser as mais variadas, de acordo com o interesse agrônomo. Essas características podem ser relacionadas a: resistência a patógenos, resistência a fatores estressantes abióticos; aumento de eficiência fotossintética, aumento da produção de metabólitos, entre outras características.

A adoção de estratégias como a fixação de ganhos genéticos, propagação clonal e outras técnicas para gerar variação genética é um requisito importante ao melhoramento vegetal. A cultura de tecidos vegetais pode trazer ganhos substanciais ao melhoramento de plantas, capturando e fixando características interessantes da variância genética pela propagação clonal. A cultura de tecidos é baseada na totipotencialidade das células vegetais, tornando-se uma ferramenta poderosa para a conservação e a fixação de ganhos genéticos a partir de genótipos que apresentem características relevantes.

## Hormônios vegetais e a biotecnologia

Para o desenvolvimento de uma planta, seu crescimento e diferenciação celular, além da composição genética e dos fatores ambientais, há um outro fator de grande importância: os hormônios. Para ocorrer qualquer atividade de um determinado processo é necessária a sinalização celular específica por reguladores de crescimento em seus sítios reguladores. Essa comunicação intracelular é mediada com compostos químicos, e grande parte deles é atribuída aos hormônios. Os hormônios vegetais são moléculas sinalizadoras, com locais específicos de síntese, onde são produzidas pequenas concentrações de sua substância para ação local ou com capacidade de regular locais distantes do seu ponto de síntese.

Esses hormônios vegetais, também chamados de fitohormônios, são biomoléculas responsáveis por inúmeros efeitos no desenvolvimento estrutural e funcional de uma planta, desde a divisão celular no interior de um tecido até os fenômenos mais externos, como alongamento do caule, frutificação, floração e produção de borracha.

Os fitohormônios têm seu mecanismo de ação iniciado pela ligação com substâncias extracelulares localizadas na membrana plasmática, onde existem proteínas receptoras. Essas substâncias são proteínas que formam complexos hormônio-receptor, desencadeando a ação de mensageiros secundários, expressão de alguns genes e síntese de enzimas que promoverão alterações metabólicas e estruturais na célula. Cada classe de hormônio é responsável por respostas distintas na célula vegetal, que variam processos como diferenciação, crescimento e morfogênese da célula. Alguns hormônios que se destacam nesses processos de desenvolvimento da célula vegetal são: auxinas, giberelinas, etileno, ácido abscísico e citocininas.

Mediante técnicas biotecnológicas, a indústria vem conseguindo sintetizar substâncias quimicamente similares a esses hormônios, com o objetivo de promover mudanças no metabolismo das plantas, promovendo ou inibindo processos de interesse da planta, assim como seu crescimento. Essas substâncias sintéticas são empregadas, em geral, em concentrações mais elevadas do que a dos hormônios presentes nos tecidos.

Em experimentos com cultura de calos de tabaco em modelo in vitro, foram identificados inibição na formação de gemas por auxina

e estímulo de brotação utilizando adenina e fosfato inorgânico. Sendo assim, o controle bioquímico da diferenciação da parte aérea e o processo de organogênese in vitro foram atribuídos às substâncias hormonais, mais especificamente ao balanço entre auxinas e citocininas. Uma alta razão auxinas/citocininas favorece o enraizamento e o balanço inverso, promovendo a formação de parte aérea das plantas. Concentrações iguais de auxinas e citocininas promovem a formação de calos.

Os reguladores de crescimento da classe das auxinas mais abundantes e utilizadas em meios de cultura são ácido indol-3-acético e ácido indol-3-butírico. As substâncias sintéticas quimicamente parecidas com as auxinas e muito comercializadas pelo fato de serem estáveis são: ácido naftalenoacético; ácido diclorofenoxiacético, ácido triclorofenoxiacético e picloram. Essa classe de hormônios é associada a alongação dos tecidos vegetais, assim como ocorre no fototropismo (curvatura de crescimento da planta em direção a luz) (BARRUETO, 2000).

O etileno é um gás considerado hormônio por ser produto natural do metabolismo de plantas, atuando em concentrações muito baixas e afetando a regulação de processos fitofisiológicos diversos, como crescimento e diferenciação das plantas. A produção elevada desse gás está associada aos fatores de estresse em plantas, por exemplo a exposição a temperaturas baixas, ataque de parasitas ou baixo potencial de água nos tecidos.

As citocininas são derivadas da adenina (aminopurina) e iniciam a divisão e a proliferação celular em muitas células vegetais, sendo associada a diversos processos fisiológicos que controlam o desenvolvimento vegetal. Esses hormônios têm um papel fundamental na diferenciação e na regeneração de plantas na maioria das espécies (SANTIAGO, 2001). As citocininas mais usadas na cultura de tecidos são a cinetina, zeatina, 2-isopentenil adenina, benzilaminopurina e thidiazuron.

A classe hormonal das giberelinas também estão associadas ao crescimento das plantas, porém, da parte do caule, pode gerar um significativo aumento na altura da planta. A síntese natural de giberelinas está associada aos fatores genéticos e ambientais, sendo identificados muitos mutantes com déficit desse hormônio. O ácido giberélico é usado, em alguns casos, tais como a cultura de ápices

caulinares, para estimular o crescimento de brotações na fase de alongamento da organogênese e para promover a conversão de embriões somáticos em plântulas.

O ácido abscísico (ABA) é um hormônio que pode ser encontrado em todas as partes das plantas vasculares. Caracteriza-se por um composto de 15 carbonos e está envolvido na dormência e na abscisão de folhas ou queda de frutos. Na cultura de tecidos está envolvido principalmente na maturação de embriões somáticos. Esse composto é produzido nos cloroplastos e outros plastídeos e é sensível à luz e à temperatura.

### **Características de tecido meristemático vegetal**

As plantas crescem e se desenvolvem por meio da atividade das regiões formadoras de órgãos, onde são multiplicadas células indiferenciadas (semelhantes às células do embrião) e com potencial para se dividir em diferentes células e tecidos. As plantas adultas estão constantemente crescendo e se desenvolvendo após as divisões das células indiferenciadas, porém essa formação de novas células e tecidos é restrita a certos locais do tecido vegetal, denominado de meristema. As novas células são adicionadas pela atividade desse tecido, cujas células são pequenas, isodiamétricas, com núcleo central, atividade metabólica muito intensa e embalada com organelas e membranas.

O grupo de células imaturas que compõe o tecido meristemático tem capacidade de divisão e redivisão (aumento o tamanho das células) e possui características importantes para a divisão celular, tais como: ausência de espaços intercelulares, forma oval, arredondada ou poligonal das células; células sempre vivas e de paredes finas; células ricas em citoplasma, mas com pequenos vacúolos; célula diploide; divisão celular mitótica; célula desprovida de materiais alimentares de reserva e plastídios (NAGELI, 1858).

Dentre as principais funções do meristema, destacam-se: dividir ativamente os tecidos da planta, ser responsável pelo crescimento primário (alongamento) e secundário (espessura) da planta e ser responsável pela formação de todos os novos órgãos pela divisão do tecido meristemático.

Os diferentes tipos celulares e diversos tecidos que compõem a estrutura de uma célula vegetal dependem da atividade precoce

do meristema em formar uma célula de característica única a partir da célula não diferenciada. Esse processo de diferenciação celular é conhecido como morfogênese. O termo morfogênese vem de *morfe* = forma e *genese* = criar).

Há vários tipos de células a serem formadas em uma planta, tanto células de sustentação como de revestimento ou condução. Uma planta, dependendo da sua fase de crescimento e das suas características de desenvolvimento, pode ter uma demanda específica de certos tipos de células a serem produzidas no processo de diferenciação de células meristemáticas.



### Assimile

O processo de diferenciação celular se caracteriza pela distinção entre si das células meristemáticas originais em células de função e características únicas. Na maturidade, quando a diferenciação celular está completa, há morte de algumas células diferenciadas por envelhecimento, enquanto outras permanecem vivas.

Os meristemas são encontrados em várias posições no corpo da planta: ápice do caule, raiz, começo da folha, cambio vascular, etc. Os tecidos maduros exibem diferentes graus de diferenciação celular, envolvendo alterações químicas, morfológicas e fisiológicas que transformam a célula meristemática em células derivadas. As células do xilema, do floema e das fibras apresentam elevado grau de diferenciação, ao passo que células do parênquima são menos diferenciadas (pois o parênquima é um tecido menos especializado).

Os meristemas podem ser classificados de acordo com sua localização na planta e suas funções especiais. Uma distinção importante seria entre os meristemas persistentes ou iniciais e suas células-filhas, os meristemas com uma vida limitada ou meristema derivado.

Os meristemas da posição apical – aqueles que ocupam o ápice da raiz, do caule ou todas as suas ramificações, sendo considerados meristemas de crescimento longitudinal, onde há um crescimento primário da planta – é o responsável pela formação dos tecidos primários. No ápice do caule, na parte mais alta temos o pro-meristema, abaixo do qual há uma zona de paredes celulares precoces orientadas transversalmente. O procâmbio é um tecido meristemático

preocupado com o fornecimento dos tecidos primários do sistema vascular. Já o câmbio vascular e da casca, ou meristemas laterais, é um cilindro contínuo de células meristemáticas responsáveis por produzir os novos tecidos vasculares em hastes maduras e raízes. São responsáveis pelo crescimento secundário da planta, ou seja, a espessura e a formação de tecidos secundários da planta.

## Sem medo de errar

A fixação de nitrogênio é um processo de grande importância às plantas, devido à conversão do nitrogênio (como forma inerte de molécula) em uma molécula de amônia (utilizada para nutrição e síntese de proteínas em plantas). A possibilidade de as células vegetais terem em seu material genético os códigos necessários para a realização da fixação de nitrogênio seria muito útil à produtividade da planta. Desta forma, podemos avaliar a possibilidade de transgenia em plantas com a finalidade de produzir genótipos que fixem nitrogênio pelas suas células vegetais. O aumento da disponibilidade de nitrogênio necessário para suprir as demandas da planta pode reduzir muito os custos de produção de um produtor. O produtor também se beneficia de maneira direta dessa tecnologia, aumentando a produtividade e preservando a qualidade do solo e das águas.

## Avançando na prática

### **Aplicação do conhecimento de estruturas bioquímicas de células vegetais no auxílio do melhoramento genético de plantas**

#### **Descrição da situação-problema**

Quando trabalhamos com genótipos de plantas muito suscetíveis à invasão de espécies de insetos e patógenos, toda vez que surge uma nova espécie de invasor, precisamos estudar e entender como ocorre a interação planta-patógeno dessa nova espécie. Como nós podemos entender essa interação planta-patógeno mediante o estudo de respostas bioquímicas desse genótipo?

#### **Resolução da situação-problema**

Para lidar com a resposta geral das células vegetais de defesa, poderíamos estudar maneiras de se aumentar a produção de

ácido jasmônico. O ácido jasmônico é um regulador vegetal endógeno produzido por várias plantas para atuar nos mecanismos de sinalização de estresse e defesa da planta. Há cientistas que classificam essas substâncias de crescimento e resposta vegetal como hormônios, baseando-se em seus mecanismos de ação. A atividade dessa substância varia de acordo com o tecido vegetal. No melhoramento genético de plantas é possível estudar genes que codificam essas substâncias, visando incrementar as concentrações de ácido jasmônico como mecanismo de defesa.

## Faça valer a pena

**1.** As células vegetais, tal como as células animais, são eucariotas, possuindo um núcleo delimitado por membrana nuclear. Apesar dessa semelhança, as células vegetais possuem algumas estruturas e organelas celulares específicas que as diferenciam dos animais. Dessa forma, há estruturas únicas das células vegetais responsáveis por executar uma ou mais funções fundamentais para o funcionamento celular. Nos vegetais há organelas que até mesmo possuem DNA próprio e são de grande importância para a realização de processos fundamentais à sobrevivência das plantas. Também há estruturas exclusivas de plantas, responsáveis pela regulação do pH adequado às células, garantindo a sua regulação osmótica.

Qual das opções a seguir representa as organelas celulares presentes em células vegetais e tem correspondência correta com suas funções?

- a) Mitocôndria – respiração; centríolos – orientação da divisão; cloroplasto – síntese proteica.
- b) Vacúolo – acúmulo de água; ribossomo – respiração; cloroplasto – fotossíntese.
- c) Ribossomo – digestão; cloroplasto – fotossíntese; mitocôndria – respiração.
- d) Mitocôndria – fotossíntese; ribossomo – síntese proteica; cloroplasto – respiração.
- e) Membrana celular – revestimento; mitocôndria – respiração; cloroplasto – fotossíntese.

**2.** A adaptação dos vegetais ao meio ambiente e as situações de estresse a que eles podem estar expostos são resultado de um eficiente mecanismo metabólico, no qual os hormônios desempenham papel fundamental. Os hormônios são substâncias orgânicas produzidas em baixas concentrações e com funções e locais específicos de atuação. Eles podem ser produzidos por demanda de fatores climáticos, sendo que, à medida que mudam as estações do ano, as frações de hormônios podem também ser alteradas. Os hormônios podem inibir ou modificar processos fisiológicos específicos de divisão e crescimento celular, estímulo a germinação de sementes, alongamento de caule, inibição de germinação, amadurecimento de frutos, entre outras funções.

Dois experimentos clássicos são feitos com vegetais para análise de comportamento hormonal em resposta às condições ambientais. No primeiro experimento, uma planta é colocada para crescer em uma caixa com bloqueio de entrada solar, onde a planta tem contato com a luz por um buraco lateral, norteando o sentido de crescimento da planta. Já no segundo experimento, a planta é submetida ao estresse hídrico e a abertura dos estômatos é analisada. Escolha a seguir a opção que indica, respectivamente, os hormônios vegetais envolvidos com os resultados dos experimentos observados.

- a) Auxina e giberelina.
- b) Auxina e etileno.
- c) Auxina e ácido abscísico.
- d) Citocinina e giberelina.
- e) Ácido abscísico e etileno.

**3.** Todas as células que compõem as diferentes espécies de plantas têm origem nos tecidos meristemáticos. As células do meristema são consideradas responsáveis pelo crescimento vegetal, sendo suas principais características o pequeno tamanho e a habilidade em dividir suas células pelo processo de mitose. No tecido meristemático, as células são, em sua maioria, indiferenciadas, sendo exatamente onde ocorre a diferenciação celular em tecidos e células específicas. Nas plantas adultas, somente as células meristemáticas conservam a capacidade de divisão, permitindo que a planta sempre possa produzir novos tecidos ao longo do seu ciclo de vida. Há muitas técnicas que utilizam o tecido meristemático para manipulação e cultivo das células vegetais, até mesmo para o melhoramento genético.

As células meristemáticas possuem algumas características específicas que as tornam interessantes para a utilização de seus tecidos em técnicas

biotecnológicas. Qual a principal característica que é possível observar nessas células?

- a) Células vivas com parede celular espessada com celulose.
- b) Citoplasma parietal.
- c) Figuras mitóticas.
- d) Divisão meiótica.
- e) Tecido lenhoso.

## Seção 3.2

### Conceitos e aplicações da cultura de tecidos vegetais

#### Diálogo aberto

São notáveis os avanços da biotecnologia no melhoramento de plantas nos últimos anos e, em se tratando do Brasil, principalmente, as culturas mais importantes no setor agrícola estão sendo favorecidas. Novos experimentos e novas técnicas geram cada vez mais resultados, tais como manipulação genética para obtenção e criação de novas linhagens de plantas, levando a um grande aumento na produção de produtos agrícolas e industriais. O melhoramento genético deve trazer benefícios tanto pela redução na extensão das áreas que essas plantas ocupam, como pelo alto consumo de fertilizantes. O conhecimento das células vegetais, por exemplo os processos biológicos envolvidos, deve beneficiar o melhoramento genético de plantas.

Dentre a diversidade de milhos cultivados pelos agricultores, pudemos verificar que alguns são mais resistentes à ação de determinadas pragas, enquanto outros apresentam alto teor de amido. É possível utilizar, portanto, os avanços técnico-científicos para unir essas duas características de interesse econômico, embora aconteçam em processos celulares distintos dentro de um mesmo organismo?

#### Não pode faltar

##### Totipotência

Na seção anterior aprendemos sobre as principais características das células vegetais, tais como suas organelas exclusivas e a importância de seus hormônios e do tecido meristemático. Nós aprendemos ainda sobre o processo de diferenciação celular, no qual as células sofrem especialização para realizar determinadas funções ou para que formem determinados tecidos. Qualquer célula vegetal cujo sistema de membrana esteja intacto e com núcleo viável, tem a capacidade de se regenerar para um estado meristemático. Esse potencial celular em uma planta pode ser classificado em três

principais fenômenos: totipotência, pluripotência e multipotência.

A totipotência surgiu da observação de um fisiologista vegetal alemão, Haberlandt, em 1902, de que os tecidos vegetais lesados podiam se regenerar. Cada célula vegetal possui potencial genético para reproduzir um organismo completo a partir de si mesmo. A totipotência pode ser descrita como a habilidade de regeneração de um tecido a partir de uma célula. Esse potencial inerente da célula vegetal para dar origem a uma planta inteira é o que diferencia as células de plantas de células animais. Essa capacidade de regeneração de uma célula vegetal se mantém mesmo depois que a célula sofreu uma diferenciação final (células altamente maduras).

O fenômeno pelo qual uma célula madura retorna ao estado meristemático formando um tecido de calo indiferenciado é chamado de dediferenciação. A conversão do tecido de calo e suas células competentes em órgãos especializados ou plantas inteiras é chamado de rediferenciação.



### Assimile

Os calos são obtidos mediante um fragmento de um tecido altamente especializado em planta (raiz, cotilédone, endosperma, tecidos reprodutivos, mesófilo foliar, etc.), também chamado de explante caulinar, e transferidos para um meio (sintético ou não) onde sofrerá indução para formação de uma massa celular não diferenciada.

A expressão da totipotência depende da capacidade das células de serem induzidas ao longo de uma determinada via de desenvolvimento e diferenciação, onde se tornam irreversivelmente comprometidas com um caminho particular. Para expressar a totalidade de uma célula diferenciada madura, ela é submetida à dediferenciação seguida de rediferenciação.

## Importância e aplicabilidade da cultura de células vegetais

A partir da descoberta da totipotência, o alemão Haberlandt elaborou previsões de que as células, os tecidos e os órgãos vegetais podem ser mantidos indefinidamente em cultura. Deste modo surgiu a cultura de tecido como uma maneira de desenvolvimento de células e tecidos em sistema *in vitro*. A cultura de tecidos é uma importante técnica utilizada no melhoramento genético,

reproduzindo tecidos separadamente do organismo de origem do material em um meio de cultura rico em carboidratos, hormônios, sais minerais, vitaminas e outros nutrientes necessários para o desenvolvimento dos tecidos cultivados.

A composição dos meios de cultura pode variar bastante, não existindo um meio padrão. A composição dos meios deve conter todos os minerais essenciais para a nutrição das plantas, além de fornecer carbono, usualmente em forma de carboidrato, para suprir a reduzida capacidade fotossintética dos segmentos vegetais cultivados.

Os segmentos de plantas cultivados em meio de cultura adequado são, posteriormente, retirados do tubo de ensaio, aclimatados e levados a campo para se desenvolverem normalmente. A partir desses segmentos de planta cultivados, que podem ter origem tanto de folhas, raízes, gemas, ápices caulinares, entre outros, são obtidas milhares de plantas idênticas.

As técnicas de cultura de tecidos oferecem várias aplicações práticas utilizadas amplamente na agricultura, desde a clonagem vegetal como melhoramento genético produção de mudas. Também possibilitam estudar os fatores que provocam a toxidez das células assim como permitir a investigação de fatores que controlam a diferenciação citológica e histológica.

Há inúmeras aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético, tais como:

- Ampliação da variação genética por meio de variação somaclonal.
- Introdução de novos genes de interesse agrônômico via resgate de embriões.
- Limpeza viral ou indexação, recorrendo a meio de cultura de meristemas.
- Obtenção de variedades geneticamente modificadas mediante regeneração de plantas completas a partir de células transformadas.
- Ampliação do número de genes disponíveis e conjunto gênico das espécies, via transformação gênica.
- Desenvolvimento de novos cultivares em menor tempo, por meio de cultura de anteras.
- Conservação de recursos genéticos.

- Superação da esterilidade das sementes.
- Produção de linhagens homozigóticas por meio de dihaploides.



### Exemplificando

Um exemplo simples de meio de cultura com tecido de plantas pode ser realizado com raízes de cenoura. Primeiro cortam-se pequenas e finas fatias de raiz de cenoura contendo células de floema especializadas para o transporte de nutrientes. Essas células diferenciadas são então cultivadas em meio nutriente líquido. O tecido deve crescer ativamente, e as células individuais vão se dividir para formar aglomerados de células indiferenciadas conhecidas como corpos embrionários. Os corpos embrionários progridem para formar brotos e raízes embrionárias. Os tecidos embrionários são então transferidos para um meio nutritivo semissólido para formar pequenas plantas denominadas plântulas, que então se desenvolverão em plantas maduras.

## Organogênese direta e indireta: funções e aplicações biotecnológicas

Em cultura de tecidos, o desenvolvimento da planta prossegue como um processo iterativo de iniciação de órgãos a partir de meristemas. Esse processo de desenvolvimento de órgãos é conhecido como organogênese. As técnicas biotecnológicas que abordam o desenvolvimento e a diferenciação em plantas são capazes de manipular a arquitetura de uma célula e de um tecido vegetal por meio da forma (morfogênese), da organização de estruturas (organogênese) e da diferenciação das células em diversos tecidos vegetais (histogênese).

Os tecidos acima do solo são originários do meristema apical, iniciando os órgãos laterais juntamente com um meristema axilar. Os órgãos laterais produzidos a partir do meristema apical podem ser folhas simples, folhas dissecadas que mantêm a capacidade organogênica ao longo de suas margens. Na fase reprodutiva do desenvolvimento, os meristemas de inflorescência produzem meristemas florais, que produzem órgãos florais. A capacidade de organogênese permite que a arquitetura da planta seja flexível e responda às mudanças nas condições ambientais, resultando em plantas da mesma espécie, muitas vezes diferindo bastante em número de órgão ou tamanho de órgão.

A organogênese in vitro dos explantes ocorre mediante a desdiferenciação e a rediferenciação celular, submetido à retomada da atividade meristemática em células maduras diferenciadas ou em um tecido calogênico desorganizado. Esse processo abrange a atuação de múltiplos fatores externos e internos envolvendo interação entre fonte de explante, meio de cultura e fatores do ambiente. Além disso conta com a ação de reguladores de crescimento exógenos, principalmente auxinas e citocininas, além da habilidade do tecido em responder a essas mudanças hormonais durante o período de cultivo (ALVES et al., 2004).

Alguns fatores que afetam a organogênese estão listados a seguir:

1. Reguladores de crescimento de plantas: a organogênese é determinada pela interação quantitativa dos produtos químicos. A presença de hormônios no meio pode levar à promoção da diferenciação e do desenvolvimento de broto e raiz, por exemplo. Há diferenciação qualitativa (crescimento de brotos ou raiz) com base na relação de auxina/citocinina exógena. Isso pode ser devido ao grau de sensibilidade de uma célula para reguladores de crescimento de plantas, aos níveis endógenos de regulador de crescimento ativo e sua absorção, ao grau de glicosilação e hidrólise, ao tipo de auxinas e citocininas utilizadas e seu modo de ação e à atividade de auxina e citocininas oxidases.

2. Tipo de explantes: quase todas as partes das plantas podem ser usadas para a regeneração de plântulas in vitro em algumas plantas, enquanto que, em outros, apenas certos tecidos são capazes de regeneração. Explantes diferentes têm potencial de regeneração diferente, a depender do tipo de órgão a partir do qual é derivado, incluindo o estado fisiológico dos explantes e o tamanho.

3. Genótipo da planta de origem: o genótipo da planta também desempenha um papel importante na diferenciação in vitro. Diferentes variedades respondem de forma distinta à regeneração, mesmo quando submetem o mesmo ambiente de cultura.

4. Fatores físicos: o tipo de meio, sólido ou líquido, e a intensidade da luz também influenciam a diferenciação in vitro.

5. Estimulação elétrica: a aplicação de corrente elétrica fraca pode aumentar a diferenciação organogênica na cultura de tecidos. A corrente aplicada ajuda a alinhar as polaridades fisiológicas das

células do calo para promover o transporte polar da auxina.

A organogênese compreende duas vias de proliferação celular, que podem ser:

- **Direta:** quando ocorre a partir de tecidos do explante ou de pequenas proliferações destes, não acarretando na formação de calo.
- **Indireta:** acontecendo a partir dos calos isolados do explante inicial. O processo de organogênese acarreta na diferenciação de brotações e raízes durante o desenvolvimento vegetal.

Órgãos jovens como brotos, raízes ou embriões podem ser induzidos a formar-se em tecidos vegetais que não possuam meristemas prévios. Esses órgãos recentemente originados são considerados acidentais. Na organogênese, dependendo da natureza dos hormônios de crescimento no meio, o caule ou a raiz podem se formar primeiro. A formação de caule e raiz do explante recebe o termo calogênese e rizogênese, respectivamente.

Quanto aos explantes, geralmente a taxa de sucesso é maior ao utilizar tecidos jovens, porque estes apresentam maior competência organogenética. A composição do meio de cultura também influenciará na capacidade organogenética. Outros componentes do meio de cultura que afetam a regeneração são os reguladores hormonais, sendo as auxinas e citocininas os mais utilizados. As condições ambientais também têm grande influência sobre a organogênese, principalmente a luz, a qual pode causar oxidação nos explantes durante o estabelecimento. Por conta disso, os procedimentos de regeneração são realizados no escuro.

A organogênese exige grandes mudanças na fisiologia celular, nas redes reguladoras da transcrição e nos hormônios. As células que transicionam para o início do órgão estão dentro da zona periférica (zona morfogenética), enquanto as células que reabastecem as células meristemáticas estão na zona central. À medida que os órgãos se desenvolvem, estabelecem-se diversas assimetrias que determinam a identidade do tecido nos eixos proximal/distal, abaxial/adaxial e medial/lateral. O estabelecimento de um limite entre o órgão iniciador e o resto do meristema é essencial para a manutenção da organogênese e de meristemas (SLUIS, 2015).

## Poliembriogênese

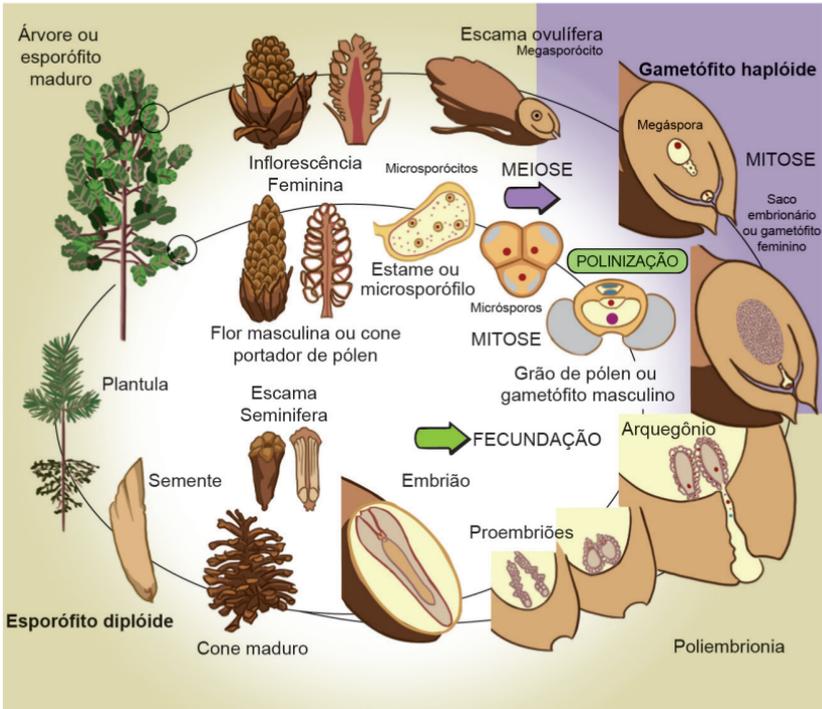
A poliembriõnia é a presença de mais de um embrião (podendo variar de dois a algumas dezenas) em uma semente e ocorre em mais de 100 famílias de plantas. Em geral apenas um dos embriões é de origem híbrida; os demais são de origem nucelar, portanto clones da planta-mãe.

A poliembriõnia por clivagem (embriõnia adventícia esporofítica) é um tipo de reprodução assexual por apomixia, comum em genótipos cujo controle genético é complexo, envolvendo pelo menos um gene de apomixia e sendo influenciado por vários fatores bióticos e abióticos, como polinização e clima. Na poliembriõnia por clivagem, cada embrião formado se divide por processos de clivagem em vários outros embriões.

A apomixia é um modo de reprodução assexuada em plantas por meio de sementes. A apomixia pode ocorrer de diferentes formas dependendo da planta, mas de modo geral funciona como uma clonagem natural por sementes. O desenvolvimento dos óculos das plantas apomíticas é diferenciado das demais plantas, pois não ocorre o processo da meiose para formação do gameta feminino. Não há fecundação do gameta feminino e o embrião se desenvolve de modo autônomo, apenas com os cromossomos somáticos maternos. Desta forma, a progênie desse tipo de planta é idêntica à planta-mãe. Essa característica representa uma grande promessa em aplicações biotecnológicas, visando a reprodução de genótipos híbridos de alto valor agregado, de maneira padronizada e com custos reduzidos de reprodução.

Também há um processo de poliembriõnia no qual há fecundação. Tal processo é chamado de poliembriõgênese polizigótica e é muito observado em coníferas. Esse fenômeno corresponde à formação de dois ou mais óvulos fecundados em um mesmo megametófito, produzindo proembriões separadamente, de modo que cada arquegônio produz um único proembrião.

Figura 3.2 | Ciclo de vida de um pinheiro



Fonte: <<http://www.biologia.edu.ar/botanica/animaciones/ciclos/pino/pinobrasil/bra-ciclo%20pino.htm>>. Acesso em: 5 fev. 2018.

No processo de poliembrionia de pinheiros demonstrado na Figura 3.2, é possível visualizar as ossferas de todos os arquegônios fecundadas, iniciando a formação dos respectivos embriões, dos quais somente um deles se desenvolve completamente. Na parte inferior de cada arquegônio há divisão longitudinal e separação lateral de quatro fileiras de células e são gerados quatro embriões geneticamente idênticos.

A poliembriogênese é um processo de interesse agrônomo para algumas espécies de plantas porta-enxertos, como os citros, ao passo que quanto mais alta é a taxa de poliembrionia, maiores são as chances de se obter plantas de origem nucelar, clones da planta-matriz.

A enxertia é uma técnica muito importante para a multiplicação vegetativa e a reprodução assexuada. Esse método consiste na junção de partes de plantas que unidas darão origem a uma única planta. O

porta-enxerto serve para criação de mudas de plantas, principalmente plantas perenes, servindo de porção inferior da planta enxertada, que vai constituir o sistema radicular de outra planta. Na enxertia, duas plantas são unidas e desenvolvem-se formando uma única planta. O porta-enxerto é a parte de baixo da planta enxertada, e a porção superior da planta é chamada enxerto, que vai constituir a copa.

Os porta-enxertos podem ser obtidos por sementes, como em citros, abacate e manga, ou por multiplicação vegetativa, como em uva, pera e maçã. Os enxertos, por sua vez, podem ter origem tanto de plantas matrizes, com interesses agrônômicos, como banco de germoplasmas.



Refleta

A utilização de porta-enxertos é muito importante para a perpetuação de clones que têm dificuldade de se propagar por outros métodos, além de possibilitar manipulação da copa em plantas adultas. Porta-enxertos de qualidade podem trazer inúmeros benefícios à planta enxertada.

Figura 3.3 | Imagens que ilustram a metodologia de propagação de plantas por enxertia – em marrom, a planta que compõe o porta-enxerto; e em verde, a planta enxerto; juntas, produzirão uma planta única



Fonte: <<https://www.istockphoto.com/br/foto/poda-de-mudas-de-laranja-gm699207642-129507227>>. Acesso em: 5 fev. 2018.



Neste vídeo podemos compreender melhor o processo de enxertia por meio das instruções para enxertia de citros:

Casa do Produtor Rural - ESALQ. **Instruções para enxertia de citros** (borbulhia T invertido). Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=o1SVUhfHHY>>. Acesso em: 5 fev. 2018.

A alta poliembrionia é uma característica agrônômica muito vantajosa para seleção de variedades porta-enxerto comerciais. Essas altas taxas de poliembrionia asseguram que a multiplicação das variedades com as quais pretende-se trabalhar resultarão em plantas com mesma constituição genética.

Por outro lado, se o interesse agrônômico é a produção de híbridos em programas de melhoramento genético, quanto menor for o grau de poliembrionia do parental, maior será a frequência de híbridos obtidos.

Em gimnospermas, os modelos de poliembriogênese zigótica e somática têm se mostrado extremamente promissores para estudos básicos em biologia celular, fisiologia e bioquímica, propagação vegetativa em larga escala e estabelecimento in vitro de bancos de germoplasma.

A poliembriogênese somática é uma forma de multiplicação da cultura embriogênica, na qual as massas celulares cultivadas in vitro têm origem no primeiro estágio de embriogênese zigótica. Esse sistema permite a clonagem em larga escala dessas células, em um ciclo repetitivo. As técnicas de manipulação da poliembriogênese permitem manipular o ciclo de maturação dos embriões de interesse, com obtenção de um grande número de embriões somáticos que podem ser encapsulados em sementes artificiais e sintéticas. Esse processo não necessita da desdiferenciação e posterior rediferenciação como na organogênese.

## Sem medo de errar

Voltando à pergunta inicial da seção e estudando os conteúdos até aqui elaborados, podemos verificar que a diversidade de milhos cultivados pelos agricultores é mais resistente à ação de determinadas

pragas, enquanto outros tipos de milho apresentam alto teor de amido. Assim é possível utilizar os avanços técnico-científicos para unir essas duas características de interesse econômico, embora aconteçam em processos celulares distintos dentro de um mesmo organismo? Mediante a cultura de tecidos vegetais, nós podemos manipular os genótipos de milhos de maior interesse agrônomo, seja pela introdução de novos genes de interesse agrônomo ou por meio de resgate de embriões, até se chegar a uma cultivar resistente a praga e com alta produção de amido; ou ainda implantar genes de resistência a praga no conjunto gênico das espécies produtoras de amido, via transformação gênica.

## Avançando na prática

### Produção de plantas porta-enxerto

#### Descrição da situação-problema

Para a produção de plantas porta-enxerto, normalmente são empregadas gemas apicais, hipocótilos e cotilédones que regeneram novas plantas por meio de processos de restauração e regeneração dos tecidos. Esses processos são dependentes de desdiferenciação, indução e rediferenciação das células, o que acaba implicando em riscos de ocorrer variações genéticas. Essas variações, quando estamos trabalhando com clonagem, não são desejáveis. Dessa forma, que técnica alternativa poderíamos aplicar para evitar essas variações genéticas?

#### Resolução da situação-problema

A aplicação do método de poliembriogênese consiste justamente na multiplicação de células do proembrião zigótico sem a necessidade de induzir a desdiferenciação e a posterior rediferenciação. As células do complexo celular embrião suspensor originam em condições *in vitro* novos embriões com os mesmos estágios sequenciais observados na embriogênese zigótica. A adequada manipulação *in vitro* dessas massas celulares embrionárias permitem o estabelecimento de ciclos repetitivos de formação de novos complexos celulares embrionários mediante clivagem e gemação, sem ocorrência de alterações genéticas.

## Faça valer a pena

**1.** As células de uma planta podem ser consideradas totipotentes, tendo a capacidade de gerar um novo indivíduo. As células totipotentes têm capacidade de multiplicação e especialização, podendo formar novos tecidos e até outros indivíduos completos.

Levando-se em conta os tecidos e as células vegetais, quais são os tecidos com maior capacidade totipotente?

- a) Tecido meristemático.
- b) Tecido de revestimento.
- c) Epiderme.
- d) Colênquima.
- e) Parênquima.

**2.** A contaminação bacteriana é o tipo mais comum de contaminação por microrganismos e interfere de forma negativa no estabelecimento de explantes *in vitro*. Sua detecção, muitas vezes, é difícil. Uma forma de evitar ou amenizar a contaminação por esse tipo de microrganismo seria o uso de antibióticos em meios de cultura, sendo a maioria de ação bacteriostática. Outra alternativa seria o uso de desinfetantes para impedir ou minimizar esse tipo de contaminação.

A desinfestação e a inoculação dos explantes utilizando instrumentos sob condição assépticas são de grande importância nos trabalhos de cultura de tecidos vegetais, \_\_\_\_\_.

- a) pois auxiliam no cultivo *in vitro* de apenas um tipo de explante.
- b) pois buscam o melhor controle possível da contaminação nas culturas.
- c) pois auxiliam na eliminação de gemas e plantas não desejadas.
- d) pois garantem que microrganismos adequados sejam cultivados com as culturas.
- e) pois garantem que o manipulador das culturas não se contamine.

**3.** Mediante a técnica de cultura de tecidos e suas aplicações na agricultura, podemos isolar pequenos fragmentos de organismos vegetais, desinfetados, e cultivá-los de maneira asséptica, por períodos indefinidos em meios de cultura específicos. Esses fragmentos são denominados explantes e podem ter origem de folha, raiz, caule ou qualquer outro tecido que responda às condições de indução do meio de cultura.

A obtenção de uma planta por regeneração por meio da cultura de tecidos *in vitro* sem que seja feita a realização de transformação genética gera um organismo \_\_\_\_\_.

- a) geneticamente modificado, uma vez que seu material genético não é idêntico ao de sua planta-mãe.
- b) clone geneticamente modificado, uma vez que não é idêntico à sua planta-mãe.
- c) geneticamente modificado, uma vez que não nasceu por vias naturais.
- d) clone, uma vez que seu material genético não é idêntico ao de sua planta-mãe.
- e) clone, uma vez que seu material genético é idêntico ao de sua planta-mãe, exceto por variações conhecidas por "variações epigenéticas".

## Seção 3.3

### Embriogênese somática; organogênese

#### Diálogo aberto

São notáveis os avanços da biotecnologia no melhoramento de plantas nos últimos anos e, em se tratando do Brasil, principalmente, as culturas mais importantes no setor agrícola, como cana-de-açúcar, café, soja, laranja, trigo, castanha-de-caju, batata, amendoim, entre outros, estão sendo favorecidas (IBGE, 2017). Novos experimentos e novas técnicas geram cada vez mais resultados – por exemplo manipulação genética para obtenção e criação de novas linhagens de plantas –, levando a um significativo aumento na produção de produtos agrícolas e industriais. O melhoramento genético traz benefícios tanto pela redução na extensão das áreas que essas plantas ocupam, como pelo alto consumo de fertilizantes. O conhecimento das células vegetais, tal como os processos biológicos envolvidos, pode beneficiar o melhoramento genético de plantas.

O Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) vem passando por sérias dificuldades de manter seus bancos de germoplasma de café, tanto pela demanda por estrutura e espaço, quanto pelos gastos de manutenção. Qual é o principal problema com os bancos de germoplasma de café do IAC? A implementação de banco de germoplasma *in vitro* seria uma alternativa com menor custo?

#### Não pode faltar

#### Embriogênese: definição; embriogênese somática e sua importância tecnológica

Embriogênese é o nome dado ao processo pelo qual uma única célula vegetal é transformada em um indivíduo multicelular com uma organização característica. Em geral, a embriogênese ocorre dentro do óvulo no interior dos carpelos da flor de uma planta, formando uma semente madura.

Há algumas variações nesse processo de acordo com o tipo de planta, mas usualmente ele tende a seguir uma sequência de

desenvolvimento embrionário padrão para organismos vegetais, o que acaba garantindo o desenvolvimento vegetativo básico para todas as espécies. Ao longo do processo de embriogênese, uma planta investe na arquitetura organizada das suas formas celulares (morfogênese, como vimos da Seção 3.1), que está associada à funcionalidade específica de suas estruturas (organogênese). A embriogênese está presente nas duas fases do desenvolvimento vegetal: a fase vegetativa e a fase reprodutiva, sendo que, na fase reprodutiva, esse processo possui cinco estágios:

- Estágio zigoto: primeiro estágio diploide que se inicia com a fusão da oosfera e do gameta masculino, formando um zigoto unicelular. A polarização no crescimento dessa célula forma uma pequena célula apical e uma célula basal alongada.
- Estágio globular: formação de um embrião de oito células, com forma globular esférica e simetria radial, que é formado após uma série de divisões da célula apical. Após mais divisões celulares, acontece o aumento do número de células no embrião globular, com formação de uma camada externa denominada protoderme, que dará origem à camada da epiderme.
- Estágio de coração: formação do embrião com simetria bilateral a partir de múltiplas divisões celulares em duas regiões que formam os dois cotilédones.
- Estágio torpedo: alongamento e diferenciação celular ao longo do eixo embrionário, com distinções claras entre os tecidos adaxiais e abaxiais dos cotilédones.
- Estágio maduro: formação da casca da semente ao final da embriogênese, onde posteriormente o embrião e a semente perdem água e inativam seu metabolismo (estado de dormência da semente). Em sementes que entram em dormência, é comum haver acúmulo de compostos de reserva nas células em estágio maduro. Cada órgão da planta se origina de regiões específicas do embrião.

O embrião zigótico apresenta duas polaridades, a apical-basal, onde o crescimento é direcionado verticalmente, e a radial, onde o crescimento é horizontal. Durante o processo de embriogênese, a

estrutura na qual as células se diferenciam depende da posição dessas células no embrião. Alguns grupos celulares desenvolvem funções especializadas para formar tecidos corticais, epidérmicos e vasculares, enquanto outro grupo celular, conhecido como meristemas apicais, estão presentes nos eixos de caules e raízes, sendo fundamentais para sustentar os padrões indeterminados de crescimento. Essas células do meristema mantêm a característica de divisão indeterminada, conservando o desenvolvimento mesmo na fase vegetativa.



### Assimile

O processo de multiplicação celular é composto por mitoses, que se caracterizam pela reprodução de uma célula gerando duas idênticas ao final do processo.

Já formação dos gametas é um processo reducional chamado de meiose.

O embrião, ao final da embriogênese, passa por inúmeras modificações fisiológicas que os tornam aptos a resistir às condições ambientais adversas e aos períodos de dormência. Existem moléculas, denominadas de morfógenos, cuja síntese e transporte geram um gradiente de concentração que também desencadeia respostas específicas no crescimento e desenvolvimento da planta durante a embriogênese. Os hormônios, como a auxina, são morfógenos importantes em plantas (TAIZ, 2016).

A maior parte das espécies de plantas possui reprodução por embriogênese zigótica, como a descrita anteriormente, na qual há um processo de divisões celulares assimétricas partindo do zigoto, dando origem ao primórdio radicular e ao caule. Nesse caso de reprodução, há a fusão de gametas, mas também existe a embriogênese somática, na qual há um processo de desenvolvimento das células haploides de acordo com a expressão da totipotencialidade das células das plantas. Os embriões somáticos se desenvolvem de forma assexuada e livre de correlações genéticas e fisiológicas com a planta-mãe, podendo apresentar um desenvolvimento anormal. Os embriões somáticos apresentam desenvolvimento físico independente, uma vez que possuem um sistema vascular fechado, sem conexão vascular com os tecidos do explante que teve origem.

Esse modelo morfogenético de desenvolvimento forma embriões

somáticos a partir de tecidos somáticos, podendo ter constituição idêntica à planta-mãe, caso a embriogênese somática seja direta; se for indireta, forma calos e embriões com variabilidade genética. Para que ocorra esse processo, é necessário haver uma desdiferenciação via desprogramação gênica das células diferenciadas, de forma que elas passem a ser células embriogênicas após a divisão celular. Essa desdiferenciação e o processo de embriogênese somática são complicados em muitas espécies vegetais, especialmente em árvores frutíferas tropicais. Algumas limitações dessas técnicas para determinadas espécies ocorrem pela dificuldade em obter embriões a partir de partes adultas da planta; assim, somente tem sido possível obter embriões a partir de plântulas ou sementes. Outra dificuldade é com relação ao número baixo de plantas desenvolvidas em condições controladas de campo.

Embora haja essas limitações, essa técnica constitui muitas vantagens, como:

- Desempenho de um significativo papel na transformação genética.
- Capacidade de manifestar o potencial embriogênico.
- Desenvolvimento individualizado dos embriões.
- Desenvolvimento dos embriões diretamente em plantas.
- Hibridização somática.
- Utilização dos embriões na continuação da propagação *in vitro*.
- Utilização dos embriões na produção de sementes sintéticas.
- Capacidade de produzir grande número de embriões em espaço limitado.

Já são conhecidos alguns genes associados à embriogênese somática que são essenciais para o estabelecimento do padrão apical-basal (como *MONOPTERO*, *GURKE*) ou radial (*SHORT-ROOT*, *WOODEN LED*). O conhecimento genético é um recurso importante para o entendimento das interações fundamentais à sinalização e regulação das respostas embriogênicas, podendo contribuir para a caracterização desse processo em plantas.

## Condições de cultivo in vitro e tipos de explantes

O princípio do cultivo in vitro, como já vimos em seções anteriores, é a obtenção de uma nova planta a partir do isolamento de algum fragmento ou tecido vegetal (chamada de explante). É essencial que haja assepsia nos cultivos in vitro de qualquer tipo de tecido e em qualquer técnica que for usada. Além disso, são componentes essenciais no meio nutritivo o explante e os fatores ambientais, como luz, temperatura, oxigênio ( $O_2$ ) e dióxido de carbono ( $CO_2$ ). Para evitar contaminações, também é importante que todos os sais minerais utilizados na preparação dos meios sejam de qualidade analítica. Como o explante possui metabolismo heterotrófico, ou seja, é incapaz de fotossintetizar e produzir seu próprio alimento, necessita de água e carboidrato na forma de carbono e macro/micronutrientes.

O estabelecimento de uma cultura in vitro adequada para a tecnologia que se pretende desenvolver depende da escolha do tipo de explante e do meio nutritivo ideal.



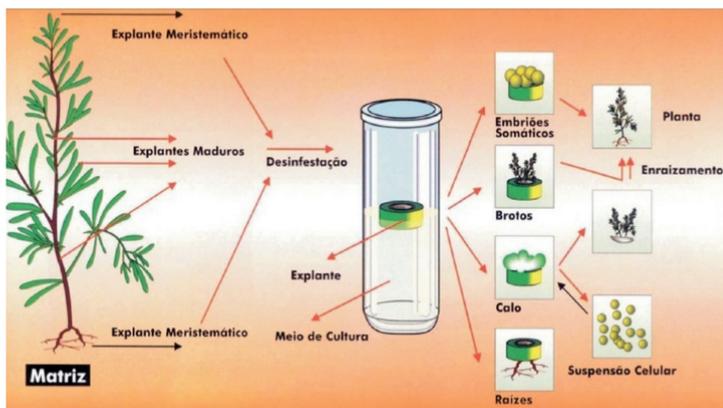
### Exemplificando

Cada tipo de explante acaba sendo indicado dependendo da técnica adotada ou da espécie de planta. O "hidrogel", por exemplo, é utilizado em inúmeros estudos na produção de sementes sintéticas por encapsulamento do embrião somático. Mas outros tipos de explantes com capacidade de também se desenvolver em plantas, como ápices caulinares e agregados de células, são recomendados para tecnologias de semeadura.

O explante pode ser desde uma célula individual até órgãos maduros, como gemas axilares e apicais, anteras, fragmentos de hipocótilo, caule, nucele (porção central do óvulo), folhas, raízes, órgãos de armazenamento e até segmentos de frutos. Teoricamente, qualquer tecido pode ser fonte de explante, mas alguns aspectos devem ser considerados e testados para que se faça a escolha do explante mais adequado aos processos morfogênicos de interesse.

O tempo de formação da planta a partir do cultivo de explante depende da espécie, mas em geral é muito menor que o ciclo de vida normal em natureza. Em cultura in vitro, o explante pode apresentar a regeneração de uma planta semelhante à planta-mãe doadora do explante, produzindo o que chamamos de clone.

Figura 3.4 | Princípios gerais da cultura de tecido segundo Kerbauy (1997)



Fonte: <<http://lctv-ufrrj.blogspot.com.br/>>. Acesso em: 5 fev. 2018.

As distintas formulações dos meios nutritivos devem ser ajustadas para cada tipo de explante ou espécie de estudo. Um dos tipos mais utilizados é o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), que é uma diluição que serve para muitos grupos de plantas, mas também existem formulações mais específicas, como o meio WPM (LLOYD; MCCOWN, 1981), que é comumente usado em espécies lenhosas.

A cultura de células, tecidos e protoplastos de plantas constitui uma das áreas de maior sucesso e aplicação na biotecnologia, com destacada posição na propagação comercial e industrial de plantas, pesquisas em fisiologia vegetal e produção industrial in vitro de compostos secundários, no intercâmbio, no manejo e na conservação de germoplasmas e no melhoramento genético. Outra aplicação muito utilizada por empresas e pesquisadores é a obtenção de plantas regeneradas, livres de vírus, a partir de meristemas. Por cultivo de tecido é possível obter material livre de vírus a partir de células isoladas ou massa de tecidos desdiferenciados (calo), selecionando plantas resistentes às condições adversas.

O cultivo in vitro apresenta grande potencial na obtenção de novos genótipos e híbridos que não poderiam ser obtidos na natureza, por causa das barreiras reprodutivas na hibridação sexual.

### Micropropagação: biorreatores

Uma das técnicas de aplicação da propagação in vitro é a micropropagação vegetal, também conhecida como clonagem,

utilizada para obtenção de uma grande quantidade de plantas geneticamente uniformes e saudáveis, em um tempo reduzido. Essa é uma técnica amplamente usada na propagação de plantas difíceis de se multiplicar em métodos convencionais, na limpeza clonal e na produção de mudas de espécies ornamentais arbustivas e ornamentais.



### Pesquise mais

Para se familiarizar com esse processo, assista ao vídeo da Embrapa Agroindústria Tropical sobre a aplicação de micropropagação in vitro de bananeiras:

VASCONCELOS, G. **Micropropagação in vitro de bananeiras**. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=pZiH9SwWGT0>>. Acesso em: 5 fev. 2018.

A propagação de orquídeas por meio da sucessiva divisão de protocormos e cultura de ápices caulinares foi o primeiro registro de aplicação comercial da micropropagação. Para o desenvolvimento de protocormos e plantas inteiras a partir de meristemas apicais, é preciso preparar um meio contendo sais minerais e vitaminas, enriquecido com reguladores de crescimento. Um sistema geral de micropropagação segue os seguintes estágios:

Estágio I - seleção de explantes, desinfestação e cultivo em meio nutritivo, sob condições assépticas.

Estágio II - multiplicação dos explantes mediante sucessivas subculturas, em meio apropriado.

A multiplicação de explantes ocorre pela regeneração de brotos de explantes. Alguns brotos individuais se desenvolvem a partir da região apical e são usados para absorver vários explantes nodais. Meios de cultivo ricos em citocinina são utilizados para inocular explantes nodais, por embriogênese somática ou organogênese, podendo produzir vários brotos durante esse processo. Cada explante produz de cinco a seis brotos em um período de quatro a cinco semanas. A produtividade chega a 600 plantas em um ano, caso todos os explantes sobrevivam.

Estágio III – ocorre a transferência das partes aéreas obtidas para substrato do solo. Primeiro é feito um alongamento das partes aéreas, enraizamento in vitro e transplante das plantas em substrato do

solo. As variações em cada estágio correspondem aos tratamentos dados à planta-matriz, de onde são retirados os explantes.

Para a realização da micropropagação clonal e massal de plantas, comumente é utilizada uma ferramenta chamada de biorreator, que é uma estrutura de metal com prateleiras projetadas para armazenar os frascos de cultivo *in vitro* e todos os componentes para automação como sistema de iluminação, unidades de controle de tempo e frequência de imersão e distribuição de ar. O objetivo do uso de biorreatores como método para micropropagação é a imersão temporária ou permanente de cultura de células ou tecidos vegetais no meio líquido, melhorando o crescimento e resultando em rendimentos superiores para a maioria das espécies vegetais. O propósito de se utilizar essa ferramenta é facilitar o trabalho rotineiro, por meio da utilização de mais frascos, e melhorar as condições do processo, uma vez que uniformiza as mudas cultivadas. Por se tratar de um processo muito aplicado em indústrias, os biorreatores contam com um acurado sistema de oxigenação, monitoramento do pH, temperatura, formação de espuma e agitação mecânica do meio líquido, melhorando assim as condições de cultivo e assegurando que os microrganismos sobrevivem em ambiente abiótico artificial. Esse menor estresse gasoso e mecânico acaba aumentando o rendimento (biomassa, metabólicos secundários, antibióticos). Essa ferramenta surgiu com os avanços da biotecnologia da fermentação, visando produzir mudas de forma automatizada em larga escala. O grande controle sobre as condições de cultivo, monitoramento e menor manipulação das culturas representa vantagens consideráveis na aplicação do cultivo *in vitro* de tecidos e células vegetais.

### **Conservação *in vitro* de germoplasma**

Apesar de grandes avanços na biotecnologia e no desenvolvimento de estudos e técnicas de manipulação genética e de características fisiológicas em plantas, um dos grandes desafios da atualidade é justamente a conservação de espécies nativas e domesticadas de plantas. A manutenção da diversidade genética das plantas é essencial para o avanço de qualquer tecnologia de manipulação de plantas.



A conservação das espécies de plantas em seu habitat natural ou em seu meio de domesticação e cultivo vem sendo uma alternativa cada vez mais inviável. O desmatamento e a destruição do habitat e a transformação dos ambientes naturais, tal como as consequências das mudanças climáticas globais, têm levado a grandes perdas de populações, espécies e composições ecossistêmicas. Essas extinções ou grandes declínios populacionais levam a perdas irreversíveis de biodiversidade.

Algumas abordagens alternativas de conservação surgem nesse contexto para salvar a biodiversidade de plantas ameaçadas. O armazenamento em bancos de sementes, jardins botânicos, coleções de genes e coleções *in vitro*, são estratégias viáveis de conservação fora dos habitats naturais.

Os avanços na cultura *in vitro* de tecidos vegetais fornecem uma ferramenta poderosa ao melhoramento da gestão da diversidade de plantas e sua conservação. Essa metodologia tem sido essencial para a conservação de espécies raras, ameaçadas, florestais, espécies ornamentais e medicinais, permitindo a conservação desse material livre de patógenos. A conservação *in vitro* é especialmente importante para a propagação vegetativa, para espécies não ortodoxas de plantas de sementes e para conservação de populações de elite geneticamente puras e diversidade genética para curto, médio e longo prazo.

Além disso, as técnicas *in vitro* oferecem um meio seguro de intercâmbio internacional de material vegetal, permitindo o estabelecimento de extensas coleções que usam espaço mínimo, permitindo o fornecimento de material valioso para a recuperação da população selvagem e facilitando as investigações moleculares e os estudos ecológicos.

### **Sem medo de errar**

O melhoramento genético traz benefícios tanto pela redução na extensão das áreas que essas plantas ocupam, como pelo alto consumo de fertilizantes. O conhecimento das células vegetais, tais como os processos biológicos envolvidos, podem beneficiar o melhoramento genético de plantas.

O Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) vem passando por sérias dificuldades de manter seus bancos de germoplasma de café, tanto pela demanda por estrutura e espaço, quanto pelos gastos de manutenção. Qual é o principal problema com os bancos de germoplasma de café do IAC? A implementação de banco de germoplasma in vitro seria uma alternativa com menor custo?

Um dos grandes problemas da conservação de germoplasma de café no IAC consiste no fato de a maior parte dos exemplares para conservação estar plantada em árvores, e a manutenção desse tipo de conservação, além de demandar muitos gastos, demanda muito espaço. Como o instituto tem perdido espaço de plantio, alguns exemplares de cafés não têm espaço para serem mantidos. Nesse caso, a biotecnologia vem facilitando e criando novas perspectivas de conservação de recursos genéticos de espécies vegetais usando técnicas de conservação in vitro sob criopreservação, ou seja, a conservação de sementes em nitrogênio líquido (em temperaturas ultrabaixas), interrompendo o metabolismo celular e possibilitando a conservação em longo prazo.

## Avançando na prática

### Contaminação da água em meio de cultura

#### Descrição da situação-problema

A água é um componente básico de todos os meios de cultura. A qualidade da água é a condição fundamental para se obter sucesso na cultura de tecidos; ela deve ser destilada e deionizada, ou bidestilada, para prover pureza suficiente para uso nos meios de cultura. Mais do que qualquer outro constituinte dos meios, a água pode contribuir com impurezas, tais como sais minerais, compostos orgânicos, óleos, produtos corrosivos, metais pesados. Para evitar os problemas com contaminação na formulação de meio de cultura, como devemos proceder para purificar a água utilizada?

#### Resolução da situação-problema

Alguns métodos de purificação de água que devemos utilizar para preparação de meio de cultura são: **desmineralização**, obtendo-se água livre de sais minerais por meio da passagem da água em

uma coluna de resinas de troca catiônica e aniônica; **destilação**, consistindo em um processo clássico de purificação da água que permite eliminar os compostos orgânicos, ainda que não seja 100% eficaz para a remoção dos componentes minerais; **osmose inversa ou reversa**, processo de separação em que um solvente é separado de um soluto de baixa massa molecular por uma membrana permeável ao solvente e impermeável ao soluto. Isso ocorre quando se aplica uma grande pressão sobre esse meio aquoso, o que contraria o fluxo natural da osmose – por essa razão, osmose reversa. Na osmose inversa, as membranas retêm partículas cujo diâmetro varia entre 1 e 10 Å. As partículas retidas são consideradas solutos de baixa massa molecular, como sais ou moléculas orgânicas simples.

### Faça valer a pena

**1.** A cultura in vitro consiste no crescimento e na multiplicação de células, tecidos, órgãos ou parte de órgãos de uma planta sobre um meio nutritivo e em condições assépticas. Os principais objetivos da técnica são: obtenção de uma planta idêntica à original mediante a clonagem vegetal (propagação assexuada de células ou organismos); ou obtenção de novo indivíduo, mantendo-se o genótipo idêntico àquele do ancestral comum.

Essa técnica da cultura in vitro de tecidos é baseada principalmente no aproveitamento de qual propriedade das células vegetais?

- a) Totipotência.
- b) Fotossíntese.
- c) Resistência.
- d) Plasticidade.
- e) Divisão celular.

**2.** Dentre as aplicações da cultura de tecidos, podemos citar: reprodução clonal do genótipo de interesse; plantas livres de infecções virais; metabólitos secundários (usado em indústrias farmacêutica e alimentícia); obtenção de haploides e duplo-haploides; transposição de barreiras de incompatibilidade à obtenção de híbridos; produção de transgênicos; regeneração de plantas a partir de células GM; conservação de recursos genéticos em programas de melhoramento.

Tendo em vista as mais variadas aplicações do cultivo in vitro, qual dos tipos de tecidos de planta a seguir pode ser utilizado para o cultivo?

- a) Somente ápice caulinar e meristema.
- b) Meristema e ovários.
- c) Ovário e embriões.
- d) Embriões, meristemas, ápice caulinar.
- e) Ápice caulinar, meristema, ovário e embriões.

**3.** A cultura dos tecidos tornou-se uma técnica bem estabelecida para cultivar e estudar o comportamento fisiológico de órgãos, tecidos, células, protoplastos e até organelas celulares isolados em condições físicas e químicas controladas com precisão. A maioria das plantas com sementes ou sem sementes não germinam no solo. Além disso, as plantas derivadas de calos exibem uma enorme variação genética que poderia ser explorada para o desenvolvimento de clones/variedades superiores, particularmente em espécies de plantas propagadas vegetativamente.

Qual tecnologia que utiliza cultura de células e tecidos vegetais in vitro é associada com a produção em grande escala a preços competitivos?

- a) Manipulação genética.
- b) Conservação in vitro.
- c) Micropropagação.
- d) Microencapsulação.
- e) Embriogênese somática.

# Referências

ALVES, E. C. S. C.; XAVIER, A.; OTONI, W. C. Organogênese de explante foliar de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v.39 n.5 p.421-430, maio 2004.

APEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia vegetal**. Viçosa: Ed. UFV, 2003.

BARRUETO CID, L. P. **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília: Embrapa recursos genéticos e biotecnologia, 2000. 180 p.

HABERLANDT, G. Culturversuche mit isolierten. **Pflanzenzellen. Sitzungsberichte der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften. Mathematisch-Naturwiss. Kl, Abt I**, 69-92, 1902.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola**: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. Rio de Janeiro, v. 30, n. 1, p. 1-81, jan. 2017.

KERBAUY, R. Procrastinação: adiamento de tarefas. In: BANACO, R. A. (Org.). **Sobre o comportamento e cognição**: aspectos teóricos, metodológicos e de formação em análise do comportamento clínico e terapia cognitiva. Santo André, SP: ESETec Editores Associados, 1997. p. 393-398.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of montain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Com. Proc. Int. Plant Prop. Soc.**, v. 30, p. 421-327, 1981.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

NAGELI, K. W. **Beiträge zur wissenschaftlichen Botanik**. Leipzig: Wilhelm Engelmann, 1858.

SLUIS, A; HAKE, S. Organogenesis in plants: initiation and elaboration of leaves. **Trends Genet.**, v. 31, n. 6, p. 300-6, 2015.

TAIZ, L. et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

# Tecnologia do DNA recombinante

## Convite ao estudo

Nesta unidade abordaremos como assunto principal informações sobre a tecnologia do DNA recombinante, o que vai demandar a utilização dos conhecimentos adquiridos desde a Unidade 1, envolvendo os conceitos básicos da biotecnologia aplicada ao melhoramento genético vegetal, passando pelos conhecimentos aplicados de genética e genômica apresentados na Unidade 2 e associando as propriedades físicas, químicas e biológicas das células vegetais que aprendemos na Unidade 3.

Na primeira seção da Unidade 4, estudaremos o processo da clonagem: sua definição e contexto histórico; a importância e os exemplos práticos da clonagem; as aplicações da clonagem e as tecnologias avançadas em clonagem.

Na segunda seção, aprenderemos sobre enzimas de restrição: definição e aplicações na biotecnologia; transformação genética direta via biobalística; histórico da transformação genética de plantas e transformação genética indireta via *Agrobacterium tumefaciens*, assim como a transformação por *Agrobacterium tumefaciens*. Na terceira e última seção deste conteúdo, abordaremos os achados inovadores com uso de enzimas de restrições; as aplicações agronômicas a partir da transformação genética de plantas; o uso e as aplicações biotecnológicas de *Agrobacterium tumefaciens*; definição, isolamento e cultivo de protoplastos.

O principal objetivo desta unidade é conhecer e ser capaz de aplicar as principais técnicas biotecnológicas aplicadas à tecnologia do DNA recombinante e ao cultivo de células e tecidos vegetais.

Bons estudos!

# Seção 4.1

## Clonagem

### Diálogo aberto

Em maio de 2017, tivemos a temática dos transgênicos discutida em um filme participante da competição do Festival de Cannes, *Okja*, uma produção Netflix que atingiu enorme repercussão ao abordar temas polêmicos como a indústria alimentícia mundial, a situação de consumo saturado em que vivemos, as associações de proteção animal e a produção de alimentos transgênicos. A trama do filme contrapõe o superpoder de uma grande corporação de produção de carne animal, que cria uma linhagem de porcos gigantes transgênicos, à vida simples de uma menina coreana, que cuida de um desses porcos em uma floresta nativa. Em várias partes do filme é possível identificar um preconceito com a produção de alimentos geneticamente modificados, tal como a associação desta técnica a impactos depreciativos à natureza.

Neste contexto do filme, a indústria cinematográfica critica o consumo desenfreado de carnes e a indústria alimentícia, e a temática de alimentos geneticamente modificados é colocada como pano de fundo, de forma superficial e negativa. Uma das principais mensagens do filme poderia ser entendida como um incentivo ao vegetarianismo. Atualmente nós sabemos que a modificação genética, tal como a clonagem e outras técnicas, é aplicada desde a animais até a plantas. Desta forma, quais seriam os motivos para haver um maior preconceito a respeito de modificações genéticas em animais do que em plantas?

### Não pode faltar

#### Clonagem: definição e contexto histórico

O termo "clonagem" é derivado da palavra grega klón, que significa algo entre broto de um vegetal e estacas de um galho. A escolha desse termo é muito adequada para a propriedade e a aplicação do processo de clonagem desde os primórdios da

agricultura, quando muitas plantas eram clonadas a partir de estacas de caules ou divisões de plantas inteiras. O processo de clonagem se caracteriza pela criação de uma nova árvore a partir de um galho de árvore adulta sem o uso de sua semente, análoga à clonagem de mamíferos de células adultas. Este mecanismo de reprodução tem sido amplamente utilizado na agricultura por séculos.

Este é um método de propagação de plantas utilizado para multiplicar inúmeras espécies de plantas por meio da produção de uma célula, de um componente celular ou de uma planta geneticamente idêntica à unidade ou ao indivíduo a partir do qual foi derivado. A clonagem pode ocorrer naturalmente ou pela aplicação de métodos como estacas de caule, que podem ser plantadas ou enxertadas em outra planta. A propagação vegetativa é um modo de reprodução assexuado das plantas, dando origem a descendentes idênticos à planta-mãe.

A clonagem está presente na nossa sociedade desde o século VI, quando seus princípios já eram cultivados em campo e nas mentes de antigos pensadores. É importante destacar e relembrar alguns comentários do filósofo de Alexandria Joannes Philoponus, a respeito da ocorrência e dos motivos da semelhança entre proles e genitores:

**Se alguém corta um galho de uma noz em Atenas e juntar com a planta em Patras (que ficam a 200 km de distância), dois ou três anos mais tarde, teremos nozes que são iguais em todos os aspectos (tamanho, sabor e cor) às nozes em Atenas... Então, as semelhanças entre as plantas não se originam porque as sementes vêm do mesmo lugar, como foi provado, e sim por algum outro motivo, que também se aplica aos animais. (RABE, 1899, p. 699)**



Esta discussão, inspirada por Aristóteles em seu livro *On Animal Generation*, já indicava o entendimento da sociedade sobre a existência de uma parte mínima do corpo de um organismo que contém toda a informação para a sua criação ou reprodução. Aristóteles provou que a informação para a criação de um animal existia em todas as partes do corpo, mas que, em oposição às crenças de outros pensadores, o sêmen não veio de todo o corpo para conter essa informação: "As crianças são como seus antepassados

mais remotos de quem nada veio", escreveu Aristóteles (1885, p. 1121), "pois as semelhanças se repetem em um intervalo de muitas gerações, como no caso da mulher de Elis, que teve relações sexuais com um Etiópia; Sua filha não era um Etiópia, mas o filho daquela filha era. O mesmo se aplica às plantas".

Com a constatação de que "semelhanças se repetem em um intervalo de muitas gerações", Aristóteles antecedeu em muitos séculos as proposições de Mendel sobre a propagação da informação genética em plantas e humanos.

Aristóteles já sugeria a existência de algo com potencial para se tornar uma planta ou animal e que o sêmen seria apenas o suporte de propagação deste "algo". Após muitos anos de estudos, descobrimos que este "algo" é o DNA, molécula fundamental para a vida.

Philoponus se baseou nas ideias de Aristóteles sobre a transmissão de informações de pai para filho, sugerindo que um tipo de clonagem é possível em animais, podendo ser destacado como o primeiro uso relatado da palavra clone para esse processo (DIAMANDOPOULOS et al., 2000).

Em um salto grande de anos entre as reflexões dos filósofos e as descobertas científicas, em 1838, os cientistas alemães Matthias Schleiden e Theodor Schwann apresentaram sua teoria celular. Nesta teoria, considerada a base do conceito de totipotência, foi destacado o fato de que toda a vida é composta de células que surgem de células preexistentes e que estas células devem conter toda a informação genética necessária para criar um organismo inteiro e multicelular, de forma que todas as células de um organismo multicelular mantêm o potencial para recriar ou regenerar a organismo inteiro.

A partir desta teoria celular e do reconhecimento da totipotência, surgem então as primeiras pesquisas com cultura de tecidos de plantas, com pesquisadores como o botânico austríaco Gottlieb Haberlandt, no início do século XX em culturas de calos. Calo é definido como a massa não organizada de células em divisão, como na resposta de uma ferida. O primeiro registro formal de planta inteira regenerada, ou clonada, de uma única célula vegetal adulta ocorreu em 1954 por W. H. Muir. Nas próximas duas décadas seguintes, em 1970 e 1980, foram registrados os avanços rápidos nas tecnologias

de cultura de tecidos e células vegetais, havendo clonagem de muitas espécies de plantas e isolamento de células com intuito de estudar a totipotência. Por meio de uma maior compreensão em fisiologia vegetal, busca-se entender especialmente o papel dos hormônios no crescimento e desenvolvimento das plantas.

Em 1994, tivemos a primeira cultura de alimentos geneticamente modificados, que foi o tomate Flavr Savr de Calgene, em que um dos genes do fruto envolvido na sua maturação foi revertido, inativando-o. O tomate Flavr Savr demonstrou o impacto da engenharia genética no movimento da agricultura moderna no período da Revolução Verde, para o que foi denominado Revolução de Genes.

Atualmente são inúmeros os exemplos de alimentos modificados geneticamente, como a semente de soja chamada Roundup Ready (patenteada pela Monsanto), projetada para resistir ao herbicida usado em ervas daninhas que crescem junto ao cultivo de soja. Outro exemplo é a variedade transgênica de milho, chamado BT Corn, amplamente produzida e comercializada no Brasil por conter um gene bacteriano que leva ao aumento da resistência a pragas.

### **A clonagem: importância e exemplos práticos**

A clonagem teve um grande destaque na comunidade científica e nas mídias, possibilitando a reprodução artificial em laboratório. O exemplo mais clássico e conhecido mundialmente foi o da clonagem da ovelha Dolly, processo em que foi aplicado um procedimento complexo para reprodução por clonagem em ambiente de laboratório.



#### **Assimile**

Além desta reprodução artificial, há formas de clonagem natural, que ocorre em organismos que se reproduzem sem a união de gametas femininos e masculinos, ou seja, ocorre assexuadamente. A bipartição é um exemplo de reprodução assexuada que ocorre em bactérias, gerando células idênticas à célula-mãe; são produzidos clones das estrelas-do-mar a partir da perda de um dos braços do organismo, gerando um outro indivíduo idêntico que se desenvolve a partir do braço rompido; como exemplo de clonagem natural também há a reprodução entre as leveduras, em que os brotos se formam dando origem a novos organismos clones do original.

Além da clonagem animal e humana, muito discutida ética, filosófica e politicamente, a clonagem das plantas também ganhou visibilidade no cenário mundial. A clonagem de plantas vem conquistando espaço no mercado agrícola graças à praticidade e ao potencial. A clonagem é realizada de várias maneiras, como estacaria, enxertia ou por corte e transferência de folhas, botões e flores para outras plantas.

A clonagem vegetal continua criando novas oportunidades na agricultura, fitorremediação, produção de biocombustíveis, medicina, biologia ambiental e produção química. O desenvolvimento de culturas geneticamente modificadas com características valiosas inclui o uso de técnicas de clonagem. Essas técnicas visam ao desenvolvimento de plantas resistentes a herbicidas e pragas, tolerantes à seca e ao sal.

Ferramentas avançadas de clonagem são essenciais na engenharia genética. O uso de montagem de elementos de DNA por clonagem possibilita a expressão de genes estrangeiros nas plantas. Existem desafios técnicos mais extensos nos sistemas de plantas do que aqueles encontrados em outros sistemas de expressão heterólogos.

Manter a consistência da planta é a principal razão para clonar uma planta. Como as plantas clonadas são idênticas geneticamente à planta-mãe, é possível saber exatamente o que estamos reproduzindo em termos de características das folhas, frutas ou flores. A clonagem nos garante que a produção de um clone gere uma planta com todas as mesmas propriedades genéticas para criar essas mesmas características. Plantar uma semente da mesma planta não garantirá esta consistência; já um clone de macieira, por exemplo, produzirá a mesma fruta que a planta original, garantindo a consistência no sabor dos frutos.

Um clone de uma planta resultará em um indivíduo saudável e crescido muito mais rapidamente do que uma semente plantada, uma vez que não precisamos fornecer as condições necessárias para a semente brotar e ir em direção à luz. Ao plantarmos as sementes, nem todas resultarão em uma plântula; já os clones, por outro lado, são porções totalmente desenvolvidas de plantas, tornando o trabalho muito mais fácil para o jardineiro e para as plantas.



## Exemplificando

A clonagem de plantas por enxerto de uma parte de uma planta em outra planta hospedeira tem sido frequentemente utilizada e pode ser realizada simplesmente para fins decorativos, de modo a alcançar uma árvore florida com dois tipos diferentes de flores em seus galhos. A clonagem de plantas por meio do enxerto também é usada para manter a produção de frutos saudáveis em uma árvore que se tornou "doente" ou infestada de insetos. A fruta saudável pode ser enxertada em uma árvore saudável, mantendo a tensão viva.

A micropropagação é uma aplicação da clonagem muito utilizada e que é considerada aliada à sustentabilidade ambiental, uma vez que influencia diretamente na economia e no meio ambiente, permitindo a produção em massa de organismos com as qualidades desejadas e necessárias. Com a clonagem, é possível produzir plantas saudáveis evitando que elas acumulem doenças, transmitidas por pulgas e agrotóxicos em campo.

Além disso, a clonagem permitiu a padronização genética do vegetal, evitando, dessa forma, o extrativismo predatório de espécies medicinais nativas, como o fornecimento de matéria-prima vegetal produzida *in vitro* para os referidos fins.

Os cultivos geneticamente modificados, geralmente frutas ou vegetais, também são uma aplicação da clonagem para produção de vacinas orais. Esses cultivos são projetados para transportar proteínas antigênicas de patógenos infecciosos, que desencadeiam uma resposta imune quando ingerida.



## Pesquise mais

Assista a uma reportagem sobre o sucesso de novos clones na produção de cacau (disponível em: <<http://g1.globo.com/bahia/bahia-rural/videos/v/novos-clones-de-cacau-podem-aumentar-a-producao-nas-rocas/3249058/>>. Acesso em: 3 abr. 2018). O cacau é uma cultura que vem enfrentando muitos problemas nos últimos anos com doenças causadas por fungos, como a "podridão parda" e a "vassoura de bruxa". A produção de novos cultivares e clones tem sido a solução para que as plantações não fossem dizimadas.

## Aplicações da clonagem

Há muitas aplicações e técnicas de clonagem na biotecnologia agrícola, desde estudos para combater doenças e melhorar a qualidade dos alimentos até algumas aplicações puramente estéticas, como o uso de técnicas de identificação e transferência de genes para melhorar a cor, o cheiro, o tamanho e outras características das flores. Também utilizamos a clonagem para melhorar algumas plantas ornamentais, em particular arbustos e árvores, por meio do aumento da resistência ao frio de plantas tropicais, por exemplo, possibilitando que ela possa ser cultivada em jardins do norte.

A indústria de horticultura está entre os maiores impactos da clonagem de plantas, principalmente utilizando a tecnologia das plantas *in vitro*. As tecnologias de cultura *in vitro* de tecidos produziram milhões de plantas economicamente importantes por clonagem desde a década de 1980 até os dias de hoje. A propagação por cultura de tecidos inclui culturas de vegetais (como a batata), frutas (como manga, morangos), espécies de floricultura (como orquídeas, lírios, rosas, samambaias) e até espécies lenhosas (como uvas e pinheiros). As vantagens da clonagem por cultura de células de plantas incluem uma maior produção dessas espécies, pois ela leva semanas de cultivo, em vez de meses ou anos, ocupa menor espaço e possibilita uma produção contínua de plantas durante todo o ano, além de haver uma redução nas limitações econômicas, políticas e ambientais que dificultam a propagação de espécies de plantas regionais ou ameaçadas.

Mas é necessário estarmos atentos ao risco de monocultivos, pois o cultivo de campos inteiros de plantas geneticamente idênticas pode deixar toda a cultura vulnerável às infestações de pragas e doenças. Além disso, é importante ressaltar que, ao gerar populações inteiras de clones, especialmente usando tecnologias de cultura de tecidos, há um alto potencial para a introdução de anormalidades genéticas, que estão presentes em toda a população de plantas produzidas, um processo denominado variação somaclonal.

A clonagem induzida é o processo de clonagem manipulada pelo homem, que pode ser tanto uma clonagem de DNA quanto uma clonagem reprodutiva. Este é um dos processos mais utilizados na engenharia genética. A clonagem induzida em animais é baseada na reprodução assexuada. Este é um tipo de clonagem reprodutiva,

que consiste em uma técnica que permite criar uma cópia de um indivíduo a partir da fusão de uma célula somática (diferenciada) com um óvulo que teve seu núcleo original previamente retirado. Essa fusão gera um embrião que é inserido no útero do animal para seu desenvolvimento. O animal gerado possui o conteúdo genético do doador da célula somática.

Já em plantas, a clonagem induzida pode ser realizada por processos diversos, como: plantio de parte da planta no solo, para que ela nasça a partir deste pedaço; estacaria, para que a planta cresça com apoio; enxertia ou manipulação genética, para produção de sementes.

A clonagem do DNA em células vegetais é um passo-chave para a engenharia genética, estudos de genes e outras aplicações na pesquisa de plantas. O DNA de plantas possibilita a descoberta de novas informações e características importantes, como a sua aplicação para maior produção agrícola, produção de combustíveis e produção de antibióticos para uso humano e animal. A expressão de proteínas antibióticas em plantas é menos dispendiosa do que a produção tradicional de antibióticos. A produção de antibióticos para humanos em plantas requer custos reduzidos devido à maior quantidade de produto que pode ser produzido a partir de plantas a uma unidade de fermentação. Além disso, há uma maior facilidade na purificação e risco reduzido de contaminação em comparação com o uso de meios de cultura e células animais.

### **Tecnologias avançadas em clonagem**

As técnicas mais recentes de clonagem estão relacionadas à manipulação genética e montagem de DNA. As tecnologias para a clonagem de elementos de DNA complexos ocorrem simultaneamente. Existem diferentes estratégias para aplicação da clonagem, tais como a construção de vetores de DNA, vetores para bombardeamento de partículas ou eletroporação em células de plantas. É possível criar vetores múltiplos para testar o efeito de sequências reguladoras em plantas de interesse no mesmo vetor de expressão para o aprimoramento de colheita. Essas ferramentas impulsionam a pesquisa para responder as questões que importam e potencializar a biotecnologia vegetal.

Os protocolos mais atuais de clonagem são voltados para clones

de genótipos de plantas selecionadas na utilização de marcadores moleculares e no melhoramento e seleção assistida de plantas. No entanto, por mais atualizada que seja a técnica, todas elas são baseadas nas atividades básicas de descontaminação de explantes, limpeza clonal, embriogênese somática, resgate de embriões e micropropagação.



**Refleta**

Os protocolos mais atuais de clonagem são voltados a clones de genótipos de plantas selecionadas para utilização de marcadores moleculares no melhoramento e seleção assistida de plantas. Mas, por mais atualizada que seja a técnica, todas elas são baseadas nas atividades básicas de descontaminação de explantes, limpeza clonal, embriogênese somática, resgate de embriões e micropropagação.

## **Sem medo de errar**

Há muito preconceito a respeito de organismos geneticamente modificados, envolvendo desde animais a plantas. As pesquisas e técnicas para desenvolver esses organismos visam produzir modificações em um organismo com o objetivo de aperfeiçoar características consideradas boas qualitativa e quantitativamente. Para o desenvolvimento dessas pesquisas, é exigida uma série de condições que garanta tanto o comprometimento com o bem-estar na sociedade quanto da natureza. O maior preconceito com modificações em animais está associado a maus tratos e a forma como o filme aborda essa situação, que por sua vez não condiz com a maior parte dos laboratórios que desenvolvem esse tipo de pesquisa. Não podemos ver os cientistas como inimigos da natureza pois isso fere o princípio crucial para o desenvolvimento dessas pesquisas, que é minimizar os impactos ambientais e melhorar a produção e a qualidade de vida, tanto de animais, quanto da sociedade.

## Avançando na prática

### Novos horizontes para criação de raças de porcos

#### Descrição da situação-problema

Além do desenvolvimento de estratégias genéticas para criação de raças de porcos maiores e com enfoque em produtividade de carne para indústria alimentícia, há outras finalidades que podem se beneficiar da clonagem desses animais. Exemplifique uma finalidade promissora para a clonagem de porcos.

#### Resolução da situação-problema

Uma finalidade inovadora que utiliza a modificação genética em porcos e a clonagem de embriões é a criação de raças de porcos que podem ajudar no transplante de órgão para serem utilizados por humanos. Há um grupo de pesquisa dos Estados Unidos que vem desenvolvendo essa tecnologia com experimentos de edição de genoma utilizando a “técnica de Crispr” e depois a clonagem de embriões (disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/ciencia/2016/04/1764258-conheca-o-crispr-tecnica-de-edicao-do-dna-que-promete-mudar-o-mundo.shtml>>. Acesso em: 3 abr. 2018). Esta pesquisa ainda está em fase de desenvolvimento, mas já foram publicados resultados em revistas científicas.

## Faça valer a pena

**1.** Existem vários processos de clonagem, desde a clonagem natural, a reprodutiva, induzida e terapêutica. A clonagem natural é o processo de reprodução em que os organismos são originados por reprodução assexuada, sem intervenção de células sexuais.

Tanto no reino vegetal quanto animal é muito importante a reprodução por clonagem. Qual dos processos a seguir se refere a este tipo de reprodução?

- a) Brotamento; fragmentação; bipartição.
- b) Fragmentação; propagação vegetativa.
- c) Bipartição; brotamento; fragmentação.
- d) Propagação vegetativa; brotamento; fragmentação.
- e) Propagação vegetativa; brotamento; fragmentação; bipartição.

**2.** O conhecimento científico e a produção de clones vegetais têm proporcionado grandes avanços para a humanidade. As plantas clonadas dão origem a uma população geneticamente idêntica que se origina pela multiplicação assexuada de um genitor promissor ou pela manipulação citogenética.

Porque as tecnologias e os avanços científicos ligados à produção de clones vegetais têm sido mais fáceis de se obter e menos controversos que a manipulação de clones em animais?

- a) A complexidade e os mecanismos de regulação gênica nos vegetais são mais simples.
- b) A clonagem em vegetais produz embriões mais resistentes às modificações ambientais do que em clonagem de animais.
- c) A capacidade de propagação vegetativa presente na maioria dos vegetais facilita a continuidade do processo.
- d) Os cientistas têm maior facilidade de controlar a regulação hormonal da reprodução nos vegetais do que em animais.
- e) A maior quantidade de embriões produzida por indivíduo em clonagens vegetais diminui a perda em caso de rejeição.

**3.** A demanda de mudas de plantas ornamentais de qualidade incentivou o surgimento de viveiros especializados na propagação de plantas em escala industrial. A respeito do assunto, considere as seguintes afirmativas:

Considerando V para as frases verdadeiras e F para as frases falsas, assinale a alternativa correspondente à correta avaliação das frases a seguir:

- ( ) Os reguladores de crescimento AIB e giberilina favorecem o desenvolvimento de raízes em estacas.
  - ( ) Qualquer tipo de árvore ou arbusto que não se propague bem por estaquia pode ser clonada por mergulhia.
  - ( ) É possível clonar por propagação vegetativa plantas ornamentais com genótipos superiores.
  - ( ) Na estaquia, ocorre um processo de formação de raízes adventícias.
- a) V – F – F – F.
  - b) F – F – F – V.
  - c) F – V – F – V.
  - d) F – V – V – V.
  - e) F – F – V – V.

## Seção 4.2

### Enzimas de restrição

#### Diálogo aberto

Em maio de 2017, tivemos a temática dos transgênicos discutida em um filme participante da competição do Festival de Cannes, Okja, uma produção Netflix que atingiu enorme repercussão ao abordar temas polêmicos como a indústria alimentícia mundial, a situação de consumo saturado em que vivemos, associações de proteção animal e produção de alimentos transgênicos. A trama do filme contrapõe o superpoder de uma grande corporação de produção de carne animal, que cria uma linhagem de porcos gigantes transgênicos, à vida simples de uma menina coreana, que cuida de um desses porcos em uma floresta nativa. Em várias partes do filme é possível identificar um preconceito com relação à produção de alimentos geneticamente modificados, tal como a associação desta técnica a impactos depreciativos à natureza. Como a visão crítica do filme pode impactar a sociedade quanto a sua resposta aos investimentos em pesquisas de melhoramento genético, como aplicações de clonagem e transgenia?

#### Não pode faltar

### Enzimas de restrição: definição e aplicações na biotecnologia

Como vimos na Seção 4.1, a clonagem envolve várias técnicas e procedimentos que são de grande importância para a biotecnologia desde seu primórdio até suas aplicações mais atuais, como a clonagem de genes. As enzimas de restrição são essenciais para que ocorra a clonagem gênica, sendo usadas em biotecnologia para cortar o DNA em cadeias de tamanhos menores.

A nomenclatura dada às enzimas de restrição segue uma convenção proposta por Smith e Nathans (1973), modificada posteriormente por Roberts et al. (2003): a primeira letra escrita em maiúsculo da enzima é

relativa ao nome do gênero do organismo que faz a enzima, e a segunda e a terceira letras, escritas em minúsculo, derivam do nome da espécie do organismo de origem. As três letras são seguidas por identificadores de tensão e depois por números romanos em maiúsculas para distinguir entre diferentes enzimas feitas por um mesmo organismo. A descrição da sequência reconhecida pela enzima de restrição apenas relata uma das cadeias daquela sequência com direção 5' -> 3', indicando também o local de corte.

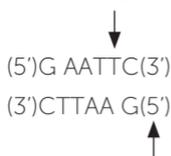
A bactéria *Escherichia coli*, por exemplo, deu origem a uma das primeiras enzimas de restrição a ser isolada, a enzima 53k, que é chamada Eco53kI. Já oriundas da bactéria *Deinococcus radiophilus* temos três enzimas de restrição chamadas DraI, DraII e DraIII, em que temos a primeira letra D relativa ao gênero seguida pelas primeiras duas letras da espécie, 'ra', para identificação das enzimas. E as enzimas de restrição feita pela bactéria relacionada *Deinococcus radiodurans* são chamadas de DrdI.

As enzimas de restrição são sequências que são capazes de reconhecer oligonucleotídeos específicos de quatro, seis ou oito nucleotídeos no DNA e então clivam a molécula em sítios de restrição específicos. Estas enzimas pertencentes a um grande grupo de endonucleases sintetizadas em diferentes cepas de bactérias têm função biológica na defesa celular e são capazes de destruir um DNA estranho, como o DNA viral, ao invadirem a célula procariota. Elas podem ser do tipo I, II ou III, com especificidade muito elevada, reconhecendo pequenas sequências não metiladas de DNA ou regiões próximas a elas. Ao reconhecer essas regiões específicas, as enzimas promovem rupturas em determinadas ligações fosfodiéster, originando fragmentos com extremidades coesivas ou com extremidades coincidentes 5'-fosfatadas e 3'-hidroxiladas.



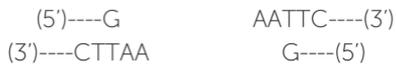
### Assimile

Sequências palindrômicas, como a seguinte:



apresentam a mesma sequência de nucleotídeos, na orientação 5' -> 3' em ambas as fitas de DNA. De modo geral, as enzimas de

restrição fazem um corte assimétrico dentro desta sequência, gerando extremidades coesivas capazes de estabelecer ligações tipo ponte de hidrogênio com uma sequência complementar:



As enzimas que digerem o DNA gerando extremidades coesivas são muito empregadas na tecnologia do DNA recombinante. Neste processo duas moléculas de DNA distintas são digeridas com a mesma enzima de restrição, de modo que ambas as moléculas produzirão fragmentos com as mesmas sequências terminais complementares e coesivas, tornando possível a formação de quimeras de DNA.

As enzimas de restrição também podem gerar terminações abruptas quando cortam ambas as fitas do DNA no mesmo ponto:



As células hospedeiras das enzimas de restrição têm um sistema de proteção do seu conteúdo genético, metilando seu próprio DNA em locais específicos para suas respectivas enzimas de restrição, protegendo-os da clivagem. Esse sistema conta com a ação de outro tipo de enzima, a metilase, que modifica o sítio de clivagem por meio da adição de um grupo metil em uma ou mais bases, normalmente dentro do próprio sítio de restrição.

A unidade de medida de atividade de uma endonuclease de restrição é definida como a quantidade da enzima que é necessária para digerir 1 µg de Lambda de DNA em um volume total de 50 µg no tempo de 1 hora e sob condições ótimas de experimento.

Existem mais de 800 enzimas de restrição conhecidas, as quais reconhecem mais de 100 sequências de nucleotídeos diferentes. As enzimas do tipo I ocorrem como um complexo com atividade metilase e um polipeptídeo que se liga à sequência reconhecida no DNA de maneira não muito específica, promovendo ruptura em ligação fosfodiéster em um local distante daquela sequência. Ou seja, essas enzimas cortam o DNA em locais aleatórios, podendo se distanciar mais de mil pares de bases de distância do sítio de reconhecimento.

Já as enzimas de restrição do tipo II, componente de um grupo de enzimas menores e mais simples, predominantemente utilizadas

na biotecnologia, reconhecem especificamente uma determinada sequência segundo um eixo de simetria. Elas cortam o DNA dentro da sequência reconhecida sem a necessidade de ATP. Elas podem se distinguir em classes A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, L, M, N, O, P, Q, R, S, T ou U. As designações deste tipo de enzimas de restrição derivam do nome da bactéria onde foi encontrada a enzima, como descrevemos anteriormente.

As enzimas do tipo III cortam aproximadamente 25 pares de bases do sítio de ligação e, assim como as enzimas do tipo I, requerem ATP para realizar o corte e podem ser grandes enzimas com múltiplas subunidades.

As enzimas de restrição ambíguas não reconhecem com especificidade um ou mais nucleotídeos da sequência-alvo, ou seja, tolera a variação nucleotídica na sequência reconhecida, tal como é o caso, por exemplo, da BsiYI, que reconhece e degrada a sequência ambígua, sendo diferentes entre si, mas todas iniciadas por CC e terminadas por GG.

As enzimas de restrição relaxadas não distinguem um nucleotídeo púrico de um pirimidínico em determinadas posições da sequência por ela reconhecida, tal como da Eco HI.

As enzimas de restrição cortam uma amostra de DNA puro em um conjunto de fragmentos consistentes e reproduzíveis que podem ser separados facilmente em um gel de eletroforese, formando um perfil de restrição. Essas enzimas são usadas na biotecnologia para cortar o DNA em pequenas cadeiras com a finalidade de se estudar as diferenças de comprimento dos fragmentos entre os indivíduos, o que chamados de polimorfismos.



### Exemplificando

O polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição (RFLP) tem sido usado para determinar que indivíduos, ou grupos de indivíduos, têm diferenças distintivas nas sequências de genes e padrões de clivagem de restrição em certas áreas do genoma. Além disso, as enzimas de restrição também são usadas em outras técnicas cuja base é a identificação de impressões digitais no DNA, como a clonagem de genes, a tecnologia do DNA recombinante e as bibliotecas de sequências de DNA para sequenciamento.

## Transformação genética direta via biobalística

A transferência controlada de genes para o genoma de um organismo vivo de modo não sexual é chamada de transformação genética. Este é um método de melhoramento genético que trouxe muitos avanços para a obtenção de novas cultivares vegetais. A transformação genética possibilita a obtenção de plantas com genes diferentes de seu genoma original por meio da aplicação de engenharia genética.

As etapas da transformação consistem em: 1) identificar um gene de interesse; 2) realizar o isolamento do gene de interesse; 3) realizar a construção do cassete gênico (construto) com o transgene de interesse; 4) preparar o vetor de transferência; 5) transferir para o genoma-alvo; 6) "escolher o método de transformação"; 7) realizar a regeneração de plantas transgênicas; 8) realizar as análises moleculares; 9) realizar a avaliação em casa de vegetação e campo.

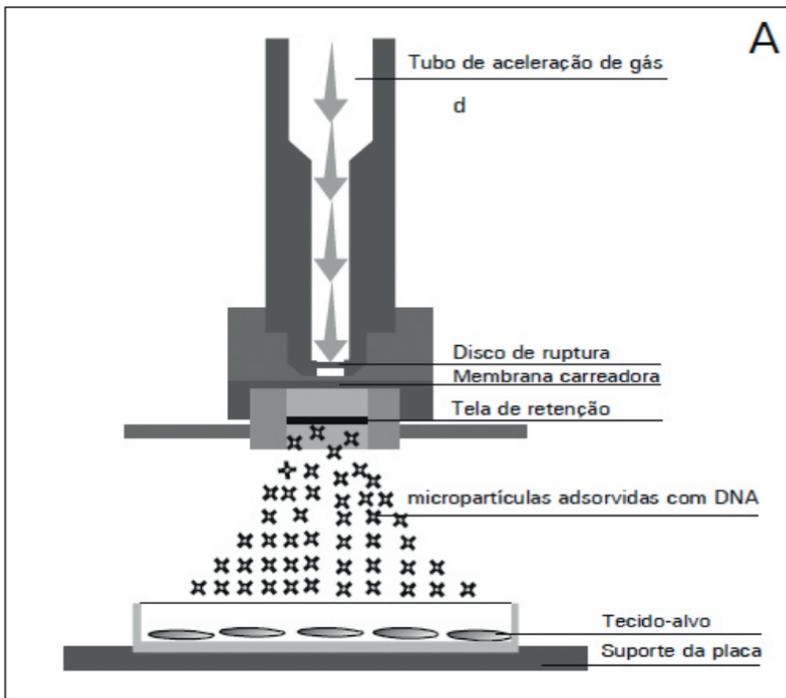
Existem diversos métodos de transformação, e a escolha do melhor depende da seleção do material transformado, se é célula, protoplasto ou tecido. Este fato depende também da disponibilidade de material e da capacidade de regeneração do explante utilizado. Os principais métodos são biobalística, transformação mediada por *Agrobacterium* e eletroporação, e eles consistem basicamente em:

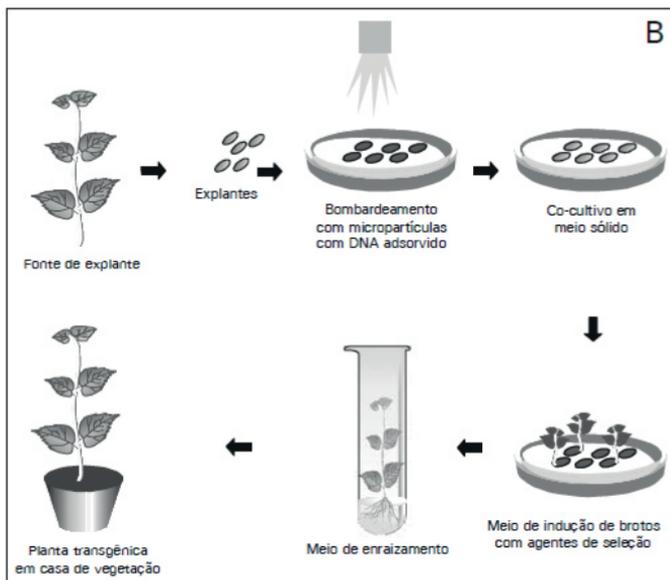
- a) Integração do transgene ao genoma da planta.
- b) Regeneração de plantas a partir da célula transformada.
- c) Expressão do transgene introduzido nas plantas regeneradas.
- d) Transmissão do transgene introduzido de geração em geração.

Os métodos de transformação que não dependem do genótipo são considerados métodos diretos, em que princípios químicos e físicos são utilizados para que ocorra a transferência de DNA. A biobalística e a eletroporação de protoplastos são métodos de transformação direta extensivamente adotados na biotecnologia. Há outros métodos com menor eficiência, portanto menos utilizados, como micro e macroinjeção; raios laser; microfibras de carboneto de silício; ultrassom. Eles consistem em modificações nas paredes e membranas celulares e não requerem a utilização de vetores biológicos. A eficiência e praticidade variam de acordo com a espécie em estudo, o tecido usado e os parâmetros otimizados para cada técnica.

A biobalística ou aceleração de partículas é uma das técnicas de alta eficiência que consiste no bombeamento de células ou tecidos com micropartículas de tungstênio ou ouro carregando o DNA exógeno. O mecanismo de bombeamento se dá por meio de um acelerador que lança as micropartículas em uma câmara especial em condições de vácuo, a fim de que estas penetrem na parede celular e na membrana plasmática da célula vegetal, permitindo a transferência direta de DNA. O DNA precipitado das micropartículas, ao entrar na célula vegetal, se dissocia das micropartículas pela ação do líquido celular e se integra ao genoma do organismo a ser modificado.

Figura 4.1 | Transformação por biobalística: (A) desenho esquemático do aparelho de bombardeamento por pressão de gás; (B) protocolo de transformação por biobalística





Fonte: adaptada de Aragão et al. (1998).

O processo todo acontece pela ação de uma fonte que produz uma onda de choque para acelerar as partículas. Essa onda pode ser gerada por explosão química, descarga de hélio a alta pressão (processo com maior eficiência) ou pela vaporização de uma gota de água. Qualquer tipo de célula pode ser utilizado para esse tipo de transformação.



Pesquise mais

A eletroporação também é um método de transformação genética direta muito utilizado, desenvolvido como alternativa à transformação por *Agrobacterium* em cereais, tendo sido depois estendido para a transformação de outras espécies vegetais. Neste vídeo você é apresentado aos principais conceitos da técnica (disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=KjRd-c-LzMo>>. Acesso em: 3 abr. 2018).

## Histórico da transformação genética de plantas: transformação genética indireta via *Agrobacterium tumefaciens* e a transformação por *Agrobacterium tumefaciens*

A transformação indireta é um método também muito utilizado na biotecnologia, embora dependa de um vetor para mediar a transferência de genes, tal como *Agrobacterium tumefaciens* e *Agrobacterium rhizogenes*. Este é um método com baixa eficiência na maioria das monocotiledôneas e gimnospermas. Por outro lado, é muito importante pois consiste na capacidade natural de introduzir DNA em plantas hospedeiras, e o DNA integrado passa a ser expresso como parte do genoma da planta.

As bactérias do gênero *Agrobacterium* são fitopatógenas e possuem capacidade natural para transferir DNA para algumas espécies de dicotiledôneas a partir da formação de um “tumor” conhecido como galha-da-coroa.

Para a formação desse tumor deve haver um ferimento pelo qual a agrobactéria vai reconhecer a planta e iniciar a infecção e transferência do DNA. Mesmo após a desinfecção das plantas, os sintomas permanecem, pois a agrobactéria deixa um fragmento de DNA, denominado DNA de transferência (T-DNA), que é integrado ao genoma do vegetal e se expressa de maneira estável. Esse mecanismo de manipulação genética foi descoberto pelos fitopatologistas em 1977, dando origem ao primeiro método de transformação.

O uso de *Agrobacterium* como vetor inclui duas etapas:

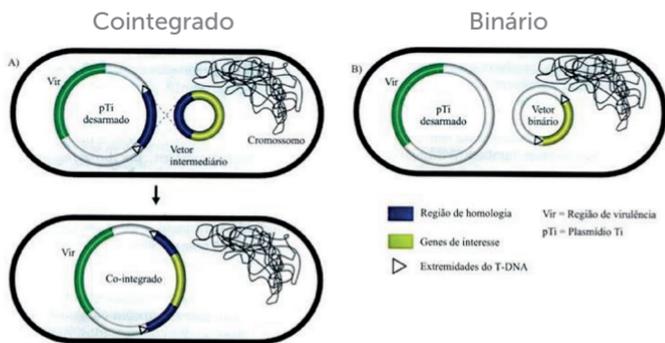
- 1ª - obter as linhagens desarmadas: ou seja, obtenção de um plasmídeo Ti desarmado. Os plasmídeos bacterianos são sequências de DNA de fita dupla, com formato circular, que carregam genes. O T-DNA faz parte do plasmídeo da agrobactéria e carrega tanto genes oncogênicos, que causam tumor e são indesejados para transferência, como genes relacionados à transferência e à replicação de plasmídeos. Pela manipulação genética, os oncogênes são deletados e produzem-se linhagens desarmadas.
- 2ª - preparação do vetor contendo o T-DNA com os genes de interesse.

As bactérias *Agrobacterium tumefaciens* apresentam o plasmídeo Ti, enquanto que as do tipo *Agrobacterium rhizogenes* apresentam

plasmídeo do tipo Ri. O mais utilizado por abranger maior número de espécies hospedeiras é o plasmídeo Ti. Por causa do seu tamanho (~200pb), o plasmídeo Ti não pode ser manipulado diretamente. Desta forma são utilizados plasmídeos menores (vetores), mais fáceis de manipular, com as extremidades do T-DNA, e entre elas é feita a clonagem. Estes vetores podem ser do tipo binário ou cointegrado.

Figura 4.2 | (A) Vetores cointegrados: são originados de vetores intermediários, geralmente possuem origem de replicação do tipo ColE 1 e não se replicam em *Agrobacterium*; (B) vetores binários: podem se replicar tanto em *E. coli* quanto em *Agrobacterium* e mantêm-se de forma independente do plasmídeo Ti

### Sistema de vetores de *Agrobacterium* para transformação



Fonte: adaptada de <<http://slideplayer.com.br/slide/49875/>>. Acesso em: 4 abr. 2018.

Os vetores intermediários podem integrar-se ao plasmídeo Ti graças a um processo de recombinação simples, por uma região de homologia com o T-DNA da linhagem desarmada, formando o vetor cointegrado.

A eficiência de transferência do T-DNA para as células vegetais é a mesma nos dois sistemas. No entanto, o sistema de vetores binários tem sido mais utilizado, pois a eficiência na obtenção de linhagens recombinantes de *Agrobacterium* é cerca de 100 vezes maior do que em sistemas cointegrados. A limitação desta técnica é que *Agrobacterium* só é eficiente para transformar plantas dicotiledôneas.

### Achados inovadores com uso de enzimas de restrições

### Aplicações agrônômicas a partir da transformação genética de plantas

As enzimas de restrição são utilizadas atualmente em praticamente todos os processos que envolvam pesquisas, manipulações, análises e criação de novas combinações de sequências de DNA. Entre as aplicações mais utilizadas estão a clonagem de DNA, o teste de paternidade, a genômica, o diagnóstico de doenças hereditárias, a produção de organismos geneticamente modificados e a epigenética.



### Refleta

Em 2018, após 48 anos da primeira enzima de restrição purificada, podemos ter a certeza de que, sem a descoberta das enzimas de restrição, a tecnologia de DNA recombinante, todos os campos das ciências ÔMICAS e a biotecnologia não estariam tão avançadas como estão atualmente.

Em 2010 uma equipe de pesquisa que já usava enzimas para construir a primeira célula bacteriana sintética usou máquinas para sintetizar quimicamente o genoma bacteriano *Mycoplasma mycoides* de um milhão de pares de bases em 1.080 pedaços de pares de bases que foram então unidos para formar um genoma sintético completo. Estes cientistas usaram enzimas de restrição para ajudar a clonar e analisar o genoma sintético e acabaram transplantando o genoma sintético de *M. mycoides* para uma célula bacteriana de *Mycoplasma capricolum*, provando que as células receptoras que abrigavam apenas o genoma sintético de *M. mycoides* eram capazes de reproduzir e exibir características de células normais de *M. mycoides*. Neste exemplo podemos ter uma ideia de como as enzimas de restrição afetaram o campo da biologia molecular e a nossa capacidade de manipular o DNA, bem como a forma serve ainda como se fosse uma ferramenta inestimável para pesquisadores.

A transformação genética também tem sido de fundamental importância na evolução da engenharia genética, tal como no melhoramento genético. Inúmeras espécies agrícolas já foram beneficiadas com o uso destas técnicas, como a família de plantas *Solanaceae* (de vegetais como a berinjela e o tomate), que foram submetidas com sucesso à transformação genética com vários propósitos usando diferentes abordagens. No tomate, a transformação mediada por *Agrobacterium* de explantes de

cotilédones foi alcançada, assim como a transformação por meio de protocolos de protoplastos.

Em legumes pertencentes à família de plantas *Brassicaceae* também foram desenvolvidos protocolos de transformação, geralmente obtida por inoculação de explantes de mudas com *Agrobacterium*, mas também são utilizados protocolos com transferência direta de genes usando protoplastos e regeneração por organogênese.

Podemos citar outros muitos exemplos de famílias de plantas que dependem da transformação genética para o seu melhoramento genético vegetal, pois a baixa eficiência da seleção fenotípica, especialmente para traços agrônômicos herdados quantitativamente, vem sendo superada pelo uso da transformação genética e de marcadores moleculares que melhoraram a eficiência de seleção e a detecção de regiões específicas do genoma com características de interesse.

A transformação genética e a edição de genomas possibilitam o controle de características fenotípicas interessantes ao agronegócio, tal como estudar o papel dos genes responsáveis por cada característica, aumentando a possibilidade de gerar genótipos de elite e acelerar a taxa de reprodução das plantas.

## Sem medo de errar

Como aprendemos nesta seção e ao longo de todas as seções estudadas até o momento sobre os avanços biotecnológicos, a ciência evoluiu muito nos últimos anos, e isso se deve não só ao aumento das tecnologias disponíveis, mas também ao melhor entendimento que os cientistas têm hoje sobre fisiologia, morfologia, genética e todo o funcionamento de uma célula, seja ela vegetal, animal ou procariótica. Deste modo, qualquer experimento de clonagem ou transgenia que é realizado hoje em dia é baseado em inúmeros experimentos mais básicos que geraram muito conhecimento prévio e que ajudaram na construção dos protocolos e métodos adotados. Por isso, uma visão preconceituosa sobre a transgenia e a falta de esclarecimentos sobre como o trabalho dos cientistas é feito podem gerar uma aversão da população a esse tipo de pesquisa, embora haja uma grande cautela e ética dos cientistas para a produção de qualquer experimento.

### Transformação em milho

#### Descrição da situação-problema

Tendo acesso à identificação e ao isolamento de uma grande quantidade de genes que auxiliam na produtividade e na reprodução de milho, qual método de transformação você utilizaria para testar a utilidade desses genes?

#### Resolução da situação-problema

Tendo em vista que o milho é uma angiosperma monocotiledônea, havia uma grande dificuldade de se utilizar transferência de genes mediada por *Agrobacterium*, porém este cenário mudou desde a década de 1990, com a evolução dos estudos de regeneração de plantas transgênicas férteis por meio de metodologias de transformação genética por cepas de *Agrobacterium*. A transformação mediada pela bactéria *Agrobacterium* em tecido meristemático é uma excelente alternativa, pois já existem inúmeros protocolos, descritos até mesmo para espécies de monocotiledôneas como arroz e aspargo. Em dicotiledôneas essa técnica sempre foi muito utilizada pelo fato de a infecção por *Agrobacterium* neste grupo de plantas ocorrer com facilidade e naturalmente.

## Faça valer a pena

**1.** Uma das principais limitações do uso de transformação indireta por *Agrobacterium* para a maior parte das plantas não é muito bem conhecida, mas atribui-se a algumas possíveis razões, como a ausência de sítios de reconhecimento entre as bactérias e a superfície de algumas plantas, a inibição da indução de genes de transferência por algumas plantas ou a inibição pelo balanço hormonal de auxinas e citocininas em algumas categorias de plantas. Sendo assim, é essencial estabelecer a melhor combinação patógeno-hospedeiro para determinar a espécie a ser transformada por este método.

Qual é a principal limitação da transformação indireta por *Agrobacterium*?

a) É um método químico.

- b) Os genes integrados ao genoma hospedeiro são transmitidos às progênes.
- c) Coloniza apenas dicotiledôneas.
- d) Apresentam plasmídeo do tipo Ti.
- e) São virulentas.

**2.** Para a transferência direta de genes, não há necessidade de se construir um vetor particular. Isso tem um duplo significado. Por um lado, os plasmídeos contendo um gene a ser transferido para plantas podem ser de tamanho pequeno e podem ser construídos e cultivados inteiramente em *E. coli* ou outros hospedeiros adequados. Por outro lado, o DNA não clonado também pode ser introduzido diretamente em protoplastos de plantas.

Qual dos métodos listado a seguir é considerado mais eficiente em termos de transformação gênica direta?

- a) Ultrassom.
- b) Biobalística.
- c) Raios laser.
- d) Microfibras de carboneto de silício.
- e) Micro e macroinjeção.

**3.** A incorporação de genes via transformação genética é muito utilizado no melhoramento vegetal, com a finalidade de incorporar genes com características de interesse entre plantas distintas, podendo assim fazer com que novos genótipos expressem fenótipos de interesse agrônomico.

Todo método de transformação genética depende da cultura de células?

- a) Sim, todos os métodos de transformação utilizam cultura de células e tecidos de planta *in vitro*.
- b) Não, somente biobalística.
- c) Não, somente por transformação indireta.
- d) Não, somente por transformação direta.
- e) Sim, com exceção do método de biobalística, que não utiliza.

## Seção 4.3

### Mecanismo de transformação por *Agrobacterium tumefaciens*

#### Diálogo aberto

Em maio de 2017, tivemos a temática dos transgênicos discutida em um filme participante da competição do Festival de Cannes, *Okja*, uma produção da Netflix que atingiu uma enorme repercussão ao abordar temas polêmicos como a indústria alimentícia mundial, a situação de consumo saturado em que vivemos, as associações de proteção animal e produção de alimentos transgênicos. A trama do filme contrapõe o superpoder de uma grande corporação de produção de carne animal, que cria uma linhagem de porcos gigantes transgênicos, à vida simples de uma menina coreana, que cuida de um desses porcos em uma floresta nativa. Em várias partes do filme é possível identificar um preconceito com relação à produção de alimentos geneticamente modificados, tal como a associação desta técnica relacionada aos impactos depreciativos à natureza.

Além dos princípios éticos, políticos, ambientais e sociais sobre a manipulação genética em animais e plantas, existem várias características biológicas que distinguem os transgênicos animais e vegetais. Com base nesse assunto, como uma característica que é única de célula vegetal pode possibilitar o uso de técnicas específicas de manipulação genética em plantas?

#### Não pode faltar

#### ***Agrobacterium tumefaciens*: uso e aplicações biotecnológicas e usos práticos**

Como vimos na Seção 4.2, *Agrobacterium tumefaciens* é um grupo de bactérias muito utilizado para a transformação genética indireta, principalmente para a transferência de genes em espécies de dicotiledôneas. Essas bactérias de solo têm sido muito utilizadas em experimentos de biologia molecular, pois são responsáveis

pela formação de tumores (conhecidos como *galls*) em plantas (principalmente angiospermas dicotiledôneas), formando tecidos e células que se multiplicam descontroladamente devido à transferência de genes da bactéria para as células vegetais. A infecção da planta por *Agrobacterium* requer um ferimento no tecido vegetal e a excreção de compostos fenólicos reconhecidos pela bactéria. Assim como todos os plasmídeos usados como vetor de clonagem, parte do plasmídeo de *Agrobacterium*, principalmente em regiões Ti (*Tumor-inducing*), T-DNA ou DNA de transferência, deve ter capacidade de autorreplicação e ainda possuir marcador de seletividade e sítio de clonagem. Essa parte do plasmídeo é transferido para a célula vegetal e integrado ao genoma da planta. A inserção do DNA no plasmídeo é feita com enzimas de restrição que inativam ou ativam os genes de interesse.

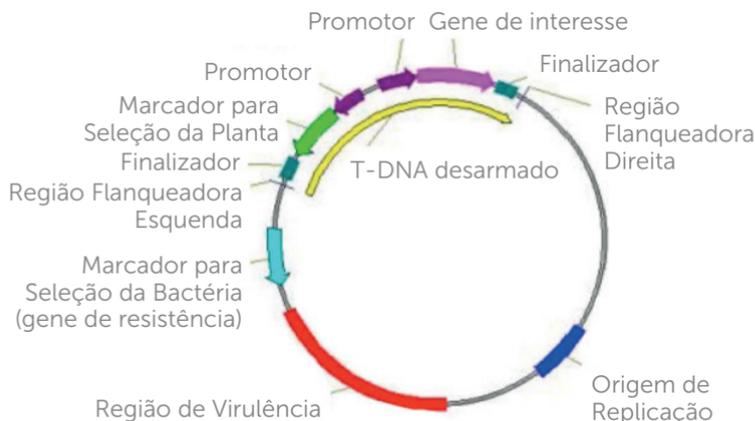
O processo de montagem do plasmídeo é muito importante para o sucesso da cotransformação. Um único ou dois plasmídeos separados são clonados em células competentes para a obtenção de inúmeras cópias, dando seguimento aos métodos e aplicações da transformação propriamente dita em plantas.

Em cada passo de clonagem, o gene ou conteúdo gênico deve ser controlado por diferentes enzimas, e estes, por sua vez, controlam os fragmentos gerados com marcadores de DNA.

O plasmídeo Ti em *Agrobacterium* apresenta duas regiões essenciais: a região do T-DNA, que é transferida, e a região de virulência (*vir*), que codifica proteínas responsáveis pelo processo de transferência do T-DNA para as células vegetais. Os genes do T-DNA da espécie *A. tumefaciens* são expressos somente em células vegetais, sendo que seus genes passam a codificar enzimas envolvidas na biossíntese de hormônios vegetais como a auxina e citocininas, tendo assim uma produção e um crescimento excessivo de células que receberam o T-DNA, caracterizando o tumor. Após a transferência, o T-DNA aumenta a sensibilidade das células vegetais, levando à formação de tumores e à produção de opinas (aminoácidos ou carboidratos modificados), que são catabolizadas somente pelo patógeno. Como os genes do T-DNA em células ou tecidos transformados podem impedir a regeneração de plantas normais, é feito o desarmamento da *Agrobacterium* por remoção ou inativação desses genes. A transferência do T-DNA para as

células vegetais é semelhante à conjugação bacteriana, sendo que os genes responsáveis pela transferência são localizados na região de virulência (vir) do plasmídeo Ti.

Figura 4.3 | Esquema ilustrativo do plasmídeo T-DNA desarmado



Fonte: adaptada de <<http://felix.ib.usp.br/pessoal/marcos/minhaweb3/Docs%20aulas%20teoricas/transformacao%201.pdf>>. Acesso em: 4 abr. 2018.

As células que são transformadas podem ser identificadas pela inclusão de genes marcadores no T-DNA ou pela inclusão de genes de resistência aos antibióticos. A interação que acontece entre a bactéria e a parede celular vegetal se dá no período de cultivo, durante a divisão e a diferenciação. Primeiro há a síntese de novas paredes celulares enquanto a bactéria produz grandes quantidades de material celulósico. Ocorre então a interação entre os polissacarídeos da parede celular vegetal e as fibrilas de celulose produzidas pela bactéria, onde há ativação dos genes (região vir) seguida de mudanças no T-DNA, e a transferência para o núcleo da célula vegetal se completa. A incorporação do T-DNA no genoma da planta se estabelece de maneira aleatória. Sugere-se que a incorporação ocorra devido a um evento de recombinação ilegítima ou não homóloga, por um fenômeno natural.



Os genes constituintes do T-DNA naturalmente podem ser substituídos por outros genes de interesse, como marcas de seleção, por exemplo genes que expressam resistência a um antibiótico. Este processo de transformação genética é muito bem elucidado em plantas, mas também tem sido aplicado em fungos, animais e até células humanas. A aplicação de mutações aleatórias de genes utilizando a transformação genética pode ajudar a elucidar a função de muitos genes ainda desconhecidos.

A conjugação triparental é um método indireto de transformação que utiliza a *Agrobacterium*. O método consiste em um processo simples, pois não requer equipamentos específicos, e eficiente. É feito por meio de cocultivo, em que após a transferência são selecionadas apenas as linhagens recombinantes de *Agrobacterium*, contendo os antibióticos apropriados. O gene codificador da característica de interesse é expresso em um plasmídeo auxiliar. A desvantagem deste método é que ele dura quatro dias e podem ocorrer alterações no plasmídeo introduzido, em função da recombinação com o plasmídeo auxiliar (conhecido como *helper*), o que leva à perda das linhagens. O plasmídeo *helper* não se replica em *Agrobacterium* e é eliminado no processo.

O método de choque térmico já é um processo de transferência direta em que são aplicados vetores de *Agrobacterium*. Seu princípio é a alteração da permeabilidade da membrana em condições extremas de temperatura (de -80 ou em nitrogênio líquido), para que haja passagem do vetor, binário ou intermediário (cointegrado), para a *Agrobacterium* receptora. A vantagem é que o método tem duração de três dias e, quando comparado com conjugação, as chances de recombinação e alteração do DNA são mínimas.

### **Protoplastos: definição, isolamento e cultivo**

Protoplastos são células somáticas desprovidas de parede celular. Esta parede pode ser removida por processos mecânicos ou processos enzimáticos. Nos protoplastos isolados, a membrana plasmática encontra-se totalmente exposta. A parede celular é composta por polissacarídeos e proteínas de estrutura, tais como a celulose e a hemicelulose, proporcionando rigidez à célula vegetal, e a pectina, que por sua vez proporciona a agregação celular.

Figura 4.4 | Diferença entre uma célula vegetal normal e protoplasto, onde é possível observar a ausência da parede celular



Fonte: adaptada de <<https://pt.slideshare.net/DanielaRamirez33/estructura-y-composicin-quimica-de-las-bacterias/18>>. Acesso em: 9 abr. 2018.

As soluções enzimáticas utilizadas para a degradação da parede celular são compostas por celulases e pectolases. As enzimas celulolíticas, hemicelulolíticas e pectocelulolíticas são isoladas de microrganismos simbióticos, parasitas ou saprofiticos que degradam naturalmente a parede celular. As preparações comerciais dessas enzimas constituem-se de frações parcialmente purificadas de extratos destes microrganismos. As principais enzimas utilizadas no isolamento de protoplastos são: **cellulase Onozuka R10** (2.0%) ou **cellulase Onozuka RS** (2.0%), isolada de *Trichoderma viride* e cuja atividade celulolítica permite a descristalização de cadeias e despolimerização da celulose; a **pectinase Macerozyme R10**, isolada de *Thylopus sp* e cuja atividade endopoligalacturonase permite o desdobramento da pectina; a **celulase Driselase**, isolada de *Irpex lacteus* e com atividade pectinolítica e celulolítica; a **celulose Cellulysin**, também isolada da espécie *Trichoderma viride* e com atividade de hidrólise das ligações glicosídicas B1,4 da celulose; e a **pectinase Pectolyase Y23**, que é isolada de *Aspergillus japonicus* e tem atividade pectinase.

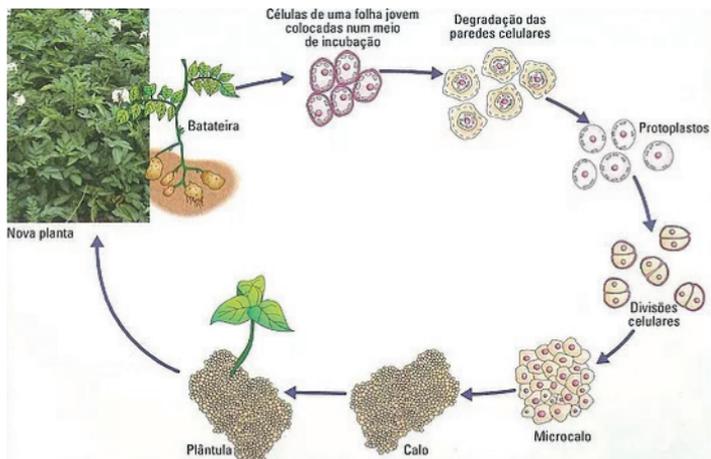
As condições da solução para o isolamento dos protoplastos depende de um meio líquido com os principais componentes, pH da solução que favoreça a ação enzimática (que compreende algo em torno de 5,4 a 6,2), com uma pressão osmótica que propicie estabilidade aos protoplastos liberados, redução da pressão hidrostática (equivalente ao potencial de pressão) da célula com

substâncias como manitol, sorbitol, sacarose (0,3 a 0,8 M) e adição de fenóis como Polivinilpirrolidone (PVPP) com concentração de 0 a 2% p/v em monocotiledôneas.

O processo de obtenção de uma plântula pela produção de protoplastos segue os seguintes passos:

- Esterilização superficial das folhas.
- Remoção da epiderme abaxial (inferior) com fita adesiva.
- Incubação das folhas com fita ainda aderida à face adaxial em solução enzimática.
- Digestão das paredes celulares pelas enzimas e liberação dos protoplastos no fundo da placa.
- Obtenção dos protoplastos derivados de folhas.
- Remoção da solução enzimática.
- Lavagem dos protoplastos.
- Ressuspensão em meio contendo sacarose.
- Ressuspensão em meio de cultura.
- Contagem celular (amostra) por hemacitômetro.
- Ressuspensão em meio de cultura, ajustando-a corretamente por densidade celular.

Figura 4.5 | Obtenção de batateiras a partir de protoplastos



Fonte: <<http://biacosta-6.wixsite.com/biocontrole/regenerao-a-partir-de-protoplastos>>. Acesso em: 4 abr. 2018.

Há vários tipos de meio de cultura que podem ser utilizados para o cultivo de protoplastos, como cultura em meio líquido, cultura em meio sólido de agarose, meio líquido e sólido e cultura nutritora com membrana de papel milipore ou nylon sobre cultura celular nutritora.



**Refleta**

As vantagens de se utilizar protoplastos em comparação às demais células normais constituídas de parede celular refere-se principalmente à facilidade de se introduzir o material genético, como a transferência de genes. Com o uso de protoplastos, também é possível produzir novos cruzamentos interespecíficos e intergenéricos entre plantas difíceis ou impossíveis de hibridar convencionalmente e estudar a atividade dos genes citoplasmáticos e suas funções bem como os processos que ocorrem com os genes citoplasmáticos, produzindo combinações de genes nucleares e citoplasmáticos únicos.

Por meio da cultura de protoplastos é possível remover a parede celular vegetal deixando a membrana intacta, gerando protoplastos, os quais podem ser cultivados regenerando células, órgãos e plantas completas.

### **Hibridação somática via fusão de protoplastos**

A hibridação somática ou fusão de protoplastos é uma das primeiras técnicas consideradas como introdutórias da engenharia genética, sendo inicialmente descrita por Carlson em 1972. A técnica consiste em isolar protoplastos fundidos, envolvendo interações nucleares e citoplasmáticas. A hibridação somática produz híbridos nucleares ou híbridos citoplasmáticos (cibridos), e sua eficiência depende do controle dos vários estágios da técnica – a saber: isolamento e fusão; identificação e seleção dos heterocariontes e células híbridas; regeneração das plantas).

A fusão de protoplastos entre dois genomas diferentes pode ser espontânea (intraespecífica ou intergenérica) ou induzida (por fusão química, mecânica ou eletrofusão). Fusão espontânea pode ocorrer durante o isolamento de protoplastos devido ao contato físico das células, mas ela não é eficiente pois acontece em taxas muito baixas. A fusão química (induzida) já ocorre com a indução por agentes químicos fusogênicos, como polietilenoglicol (PEG), nitrato de sódio, cálcio ou álcool polivinil (PVA).



## Exemplificando

A fusão química de protoplasto usando o polietilenoglicol (PEG) é normalmente o mais utilizado. Devido à carga negativa existente na superfície das células (efeito dos grupos fosfato e proteínas de membrana), há uma tendência natural de repulsão entre elas. O PEG, que é um polímero de elevado peso molecular, contraria este efeito de repulsão e permite que os protoplastos se aglutinem e estabeleçam uma espécie de ponte molecular entre as membranas plasmáticas de dois protoplastos adjacentes, os quais acabam se fundindo.

A fusão mecânica (induzida) é uma fusão física de protoplastos usando micromanipulação e micropipeta de perfusão sob microscópio. Esta é uma fusão controlada, enquanto as demais que vimos até agora acontecem espontaneamente. A eletrofusão também é uma fusão induzida, por estímulo elétrico, e ocorre de maneira aleatória.

A fusão entre duas células não implica necessariamente na fusão de seus núcleos. No entanto, a formação de um núcleo híbrido é absolutamente necessária para se verificar a hibridação somática. Na fusão de duas espécies (A e B) podemos obter:

- Homocarions (núcleos iguais): fusão de protoplastos A X A ou fusão de protoplastos B X B.
- Heterocarions com núcleos diferentes: fusão de protoplastos A X B sem fusão nuclear.
- Heterocarions formando híbridos somáticos: fusão de protoplastos A X B com fusão nuclear.
- Cíbridos ou híbridos citoplasmáticos: fusão de protoplastos A X B – porém o núcleo de um dos protoplastos é segregado, resultando em um protoplasto com o núcleo de um dos progenitores e um citoplasma híbrido.



## Pesquise mais

Os cíbridos são importantes do ponto de vista agrônomo e requerem a aplicação de procedimentos específicos, como a utilização de protoplastos sem núcleo (citoplastos) ou a eliminação de um dos núcleos após a fusão. A segregação de um dos núcleos pode ocorrer espontaneamente, mas isso é raro.

Ensaio deste tipo permitem a obtenção de linhas com núcleo em um citoplasma estranho, permitindo a combinação do genoma nuclear de um progenitor com o genoma citoplasmático de outro.

Por métodos clássicos, essas linhas podem ser obtidas pelos retrocruzamentos sucessivos entre híbridos e a linha que funciona com o progenitor feminino. Vocês podem ler mais a respeito na publicação da Embrapa, *Hibridação somática*, disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPA/20840/1/DOC181.pdf>>. Acesso em: 4 abr. 2018.

### **Transformação genética de protoplastos**

A transformação genética utilizando protoplastos pode ocorrer com a aplicação da fusão de protoplastos. O produto da fusão dos híbridos somáticos permite obter combinações que não se encontram na natureza.

Nos híbridos obtidos por cruzamento sexual ocorre mistura dos genomas dos progenitores, mas os genes do citoplasma – presente nas mitocôndrias e nos cloroplastos – são herdados do progenitor feminino. Já nos híbridos somáticos obtidos por fusão de protoplastos, entre duas espécies, o resultado é diferente, pois, além de ter a mistura de genomas nucleares, sabe-se que os genes citoplasmáticos também são provenientes dos dois progenitores. Entretanto também pode acontecer de, após sucessivas divisões celulares em protoplastos, as organelas celulares de um dos progenitores serem eliminadas. Neste caso, apenas o genoma citoplasmático de um dos progenitores é presente no híbrido.

A fusão somática permite a manipulação de características extracromossômicas interessantes ao estudo do melhoramento genético, como a macho-esterilidade. A hibridação somática também pode ser empregada para superar algumas limitações inerentes aos cruzamentos entre espécies ou gêneros diferentes. A confirmação da hibridação somática pode ser obtida pela análise da morfologia foliar, por contagem do número de cromossomos ou pelo uso de marcadores moleculares.

A grande limitação desta técnica é referente a um possível desbalanceamento genômico, perda de cromossomos não pareados ou falta de fusão nuclear. A perda seletiva de cromossomos pode

ocorrer mesmo quando acontece a fusão, e o desbalanceamento nuclear resultante pode reduzir a viabilidade e o potencial regenerativo da planta. Esta tem sido a principal limitação desta técnica para o melhoramento genético de plantas.

## Sem medo de errar

Para a clonagem de espécies de plantas monocotiledôneas, por exemplo, não seria interessante implementar a transformação genética e a própria clonagem, utilizando-se de vetores de *Agrobacterium*, mesmo porque estas bactérias não conseguem infectar com eficiência esse grupo de plantas. Outra característica importante quando pensamos em manipulação genética e clonagem é saber em que parte do genoma da planta a característica de interesse se encontra. A macho-esterilidade, por exemplo, é uma característica do DNA citoplasmático e, portanto, a melhor forma de se obter linhagens puras com essa característica é pela fusão somática de protoplastos gerando híbridos cíbridos.

## Avançando na prática

### Transformação genética

#### Descrição da situação-problema

Pesquisadores de um centro de pesquisa de batatas estudam dois cultivares de plantas, distintos entre si com relação a características de produtividade. Estes pesquisadores têm por objetivo o intercruzamento desses cultivares para gerar um híbrido com características intermediárias. Porém há uma grande dificuldade em realizar esse cruzamento. Diante deste entrave, como os pesquisadores poderiam aplicar alguma técnica biotecnológica para a obtenção de um cultivar híbrido, produto de um cruzamento “forçado”?

#### Resolução da situação-problema

Neste caso, eles poderiam aplicar a fusão de protoplastos para realizar este cruzamento dificultoso, pois, uma vez que há ausência de parede celular nas células vegetais, é possível obter-se maior facilidade para introdução de DNA exógeno, tal como a

realização de fusão entre duas células distintas. Essa transformação genética depende da introdução estável dos genomas de ambas as células em um organismo híbrido. Este organismo híbrido então irá expressar os genes e as características de interesse de ambos os genes parentais.

Agora que finalizamos os conteúdos da disciplina, você deve construir um relatório descritivo da reação em cadeia polimerase na identificação de plantas geneticamente modificadas.

## Faça valer a pena

**1.** *Agrobacterium* é um grupo de bactérias do solo que foi descrito em 1907 como causador de uma doença em plantas capaz de levar à formação de tumores, no entanto somente em 1930 as *Agrobacterium* foram caracterizadas como os agentes causadores da doença. Em 1970 constataram a correlação entre a doença e um plasmídeo e em meados de 1979 foi realizada a transferência de um fragmento de DNA da bactéria para a célula vegetal.

Escolha a alternativa a seguir que corresponde a uma peculiaridade da interação entre *Agrobacterium* e as células vegetais em monocotiledôneas?

- a) Transferência de um fragmento de DNA, o T-DNA, do plasmídeo Ti no genoma vegetal.
- b) Inserção em posição aleatória dentro do genoma.
- c) Indução à proliferação celular, originando tumores ou raízes a partir da célula transformada.
- d) Síntese de substâncias chamadas opinas, que são a fonte de C e N das bactérias, a partir das células vegetais transformadas.
- e) A bactéria não consegue infectar de forma eficiente a maioria das plantas deste grupo.

**2.** A fusão somática permite aos melhoristas a manipulação de características extracromossômicas, como a macho-esterilidade, que são inviáveis por cruzamento sexual. A aplicação desta técnica pode ajudar na manipulação de espécies e gêneros que possuem limitações em seus cruzamentos.

Qual tem sido a principal limitação da aplicação da técnica de hibridação somática no melhoramento genético vegetal?

- a) Perda seletiva de cromossomos e desbalanceamento nuclear.

- b) Manipulação de características extracromossômicas.
- c) Segregação de um dos núcleos.
- d) Obtenção de linhas aloplásmicas.
- e) Mistura de genomas nucleares.

**3.** A macho-esterilidade genético-citoplasmática ocorre em alguns organismos híbridos de plantas, como no caso do milho. Essa pode ser uma característica agrônômica importante ao melhoramento genético para a obtenção de plantas cuja produção de gametas masculinos não é viável, apesar de os órgãos florais femininos serem saudáveis e as estruturas vegetativas não apresentarem qualquer anomalia. Essa é uma característica muito valorizada para a produção comercial de sementes de milho, que já foi identificada em outras espécies vegetais, sendo um componente estratégico para a produção de híbridos em culturas como girassol, soja, arroz e sorgo. A macho-esterilidade pode ser empregada como estratégia para evitar que ocorram autofecundações nas fêmeas das linhagens em que estão sendo produzidas sementes.

Que tipo de fusão de protoplastos é utilizada por melhoristas para a obtenção da característica de macho-esterilidade em plantas?

- a) Heterocarions com fusão nuclear.
- b) Cíbridos.
- c) Heterocarions sem fusão nuclear.
- d) Homocarions.
- e) Fusão por cruzamento sexual.

# Referências

- ARAGÃO, C. A. et al. Classificação e quantificação de tricomas foliares em duas espécies de tomateiro. In: **Congresso Nacional De Botânica**, XLIX, 1998, Salvador, BA, Resumos. Salvador: Sociedade de Botânica do Brasil, 1998. p. 24.
- ARISTÓTELES. **History of Animals; On the Parts of Animals; On the Motion of Animals; On the Gait of Animals; On the Generation of Animals; Nicomachean Ethics; Politics; The Atenian Constitution; Rhetoric; On Poetics**. Chicago, London, Toronto, Geneva: Encyclopaedia Britannica, Inc., Ed. W. D. Ross, 1952.
- CARLSON, P. S.; SMITH, H. H.; DEARING, R. D. Parasexual interspecific plant hybridization. **Proceedings of the National Academy Science of the United States of America**, Washington, v. 69, p. 2292- 2294, 1972.
- CARVALHO, J. M. F. C.; SENA, D. V. A. **Hibridação somática**. Campina Grande, PB: Embrapa Algodão, 2007.
- DIAMANDOPOULOS, A. A.; GOUDAS, P. C. Cloning's not a new idea: the Greeks had a word for it centuries ago. **Nature**, v. 408, n. 6815, p. 905, dez. 2000.
- HABERLANDT, G. **Physiologische pflanzenanatomie**. 3. ed., neubearb. und verm. aufl. Leipzig: W. Engelmann, 1904.
- MUIR, W. H.; HILDEBRANDT, A. C.; RIKER, A. J. Plant Tissue Cultures Produced from Single Isolated Cells. **Science**, v. 119, 1954.
- RABE, H. (Ed.). **Joannes Philoponus de aeternitate mundi contra Proclum**. [S.l.], University of Michigan Library, 1899.
- ROBERTS R. J. et al. A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. **Nucleic Acids Research**, 2003, v. 31, n. 7, p. 1805-1812.
- SCHWANN, T.; SMITH, H. **Theory of the Cells**: Microscopical Researches Into the Accordance in the Structure and Growth of Animals and Plants. London: The Sydenham Society, 1839.
- SMITH, H.; NATHANS, D. A suggested nomenclature for bacterial host modification and restriction systems and their enzymes. **Journal of Molecular Biology**, 1973, v. 81, p. 419-423.



ISBN 978-85-522-0533-3



9 788552 205333 >