

# Biotecnologia na agricultura

HELAINÉ CARRER, ANDRÉ LUIZ BARBOSA  
e DANIEL ALVES RAMIRO

## Histórico

EMBORA PENSEMOS a biotecnologia como uma tecnologia recente, sua origem pode ter ocorrido há mais de seis mil anos, a partir dos relatos de que os micro-organismos eram usados nos processos fermentativos para produção da cerveja e do pão. No entanto, as bases fundamentais da biotecnologia agrícola consideram a biologia molecular e as técnicas relacionadas como os eventos mais importantes da história da biotecnologia.

Num primeiro momento, a biotecnologia esteve centrada na questão da saúde humana e animal, em que se utilizou de micro-organismos para a fabricação de antibióticos. Relatos de culturas de células *in vitro* são datados da Segunda Guerra Mundial, quando cultura de *Penicillium notatum* era usada para a produção do antibiótico penicilina cuja ação como antibiótico foi descoberta por Alexander Fleming em 1929 (Bennett & Chung, 2001). Mas foi na década de 1970 que ocorreu o início das metodologias de uso do DNA recombinante e do sequenciamento do DNA que proporcionaram grandes avanços na ciência de plantas. A seguir, foram listados os principais eventos que marcaram os avanços da biotecnologia desde 1953 quando James Watson e Francis Crick descreveram a estrutura do DNA até os dias atuais.

É marcante como a biotecnologia tem revolucionado a agricultura com modernas tecnologias que nos permitem identificar e selecionar genes que codificam características benéficas para serem usados como marcadores moleculares nos processos de seleção assistida, ou ter a expressão de um determinado gene em outro organismo por transgenia e, assim, com maior precisão, obter novas características agrônômicas e nutricionais desejáveis nos cultivos de plantas.

### Ano Eventos históricos da biotecnologia

- 1953: A revista *Nature* publicou o manuscrito de James Watson e Francis Crick que descrevia a estrutura dupla-hélice do DNA. A descoberta da estrutura do DNA resultou em uma explosão de pesquisas em biologia molecular.
- 1956: Heinz Fraenkel-Conrat demonstrou como uma parte do vírus do mosaico do tabaco pode se remontar e ser funcional.
- 1957: Francis Crick e George Gamov elaboraram o “dogma central” sobre como funciona o DNA para produzir proteínas. Matthew Meselson e Frank Sthal demonstraram o mecanismo da replicação do DNA.

- 1958: O National Seed Storage Laboratory (NSSI) foi aberto em Fort Collins no Colorado (Estados Unidos), tornando-se a primeira instalação de armazenamento de longo prazo de sementes no mundo.
- 1965: Cientistas noticiaram que os genes que levam a resistência aos antibióticos em bactérias são frequentemente estruturas extracromossomais denominadas plasmídeos.
- 1966: Marshall Nirenberg, Heinrich Mathaei e Severo Ochoa demonstraram que uma sequência de três bases de nucleotídeos (códon) determina cada um dos 20 aminoácidos.
- 1970: Howard Temin e David Baltimore, trabalhando independentemente, isolaram a *transcriptase reversa*, uma enzima de restrição que corta a molécula do DNA em regiões específicas. O trabalho descreveu como o RNA viral que infecta uma bactéria hospedeira usa essa enzima para integrar sua mensagem dentro do DNA hospedeiro. Essa descoberta levou os cientistas a criar clones de bactérias e a observar seu funcionamento.
- 1972: Paul Berg isolou e empregou uma enzima de restrição para cortar o DNA e a DNA ligase para unir duas fitas de DNA e formar uma molécula circular híbrida. Esta foi a primeira molécula de DNA recombinante.
- 1973: Stanley Choen, Annie Chang e Herbert Boyer usaram setores de DNA viral e DNA bacteriano com as mesmas enzimas e produziram o primeiro plasmídeo com DNA recombinante, plasmídeo com dois genes de resistência a antibióticos.
- 1974: Stanley Choen e Herbert Boyer demonstraram a expressão de um gene implantado em bactéria por DNA recombinante.
- 1977: Genentech, Inc. mostrou a produção da primeira proteína humana (somatostatina) sintetizada em uma bactéria.  
Walter Gilbert e Allan Maxam, na Universidade de Harvard e Frederick Sanger, na Inglaterra, desenvolveram o método de sequenciamento de DNA.
- 1978: Genentech, Inc. e o Centro de Medicina Nacional anunciaram a produção de insulina humana usando a tecnologia do DNA recombinante em laboratório. David Botstein estabeleceu a técnica de RFLP para análise de polimorfismo
- 1980: Kary Mullis e outros desenvolveram a técnica de PCR (reações polimerase em cadeia).
- 1982: Genentech, Inc. recebeu aprovação da FDA para comercializar insulina humana modificada geneticamente.
- 1983: Patentes foram aprovadas para plantas geneticamente modificadas.
- 1985: Plantas geneticamente modificadas resistentes a insetos, vírus e bactéria foram testadas em campo pela primeira vez.
- 1986: O EPA aprovou a liberação da primeira planta de tabaco geneticamente modificada.
- 1987: Calgene, Inc. obteve a patente da sequência de DNA da poligalacturonase de tomate usada para produzir uma sequência de RNA antissenso que aumenta o tempo de longevidade dos frutos.

- 1990: Michael Fromm reportou transformação estável de milho utilizando bombardeador de gene.  
Consórcio internacional foi estabelecido para o sequenciamento do genoma humano
- 1994: A FDA aprova o primeiro produto alimentício geneticamente modificado (GM), o tomate FlavrSavr®
- 1995: O Comitê Assessor Australiano (Gmac) permite liberação comercial de cravos azuis geneticamente modificados.
- 1997: Pesquisadores do Instituto Roslin na Escócia clonaram a ovelha chamada Dolly.
- 1998: Quarenta milhões de hectares de culturas GM são plantadas globalmente. Predominantemente soja, algodão, canola e milho.  
Liberação comercial da soja transgênica tolerante a herbicida é concedida no Brasil e em seguida proibida por determinação judicial.
- 2000: O genoma da *Arabidopsis* é completamente sequenciado.  
É criada uma variedade de arroz GM com o gene precursor da vitamina A.
- 2001: Sequenciamento completo da bactéria fitopatogênica *Xyllela fastidiosa* por consórcio de pesquisadores brasileiros.  
Consortio do Genoma Humano e o grupo Celera publicam o genoma humano
- 2002: O sequenciamento completo do genoma do arroz é realizado por um consórcio internacional.  
A ovelha Dolly morre por problemas respiratórios.
- 2003: Plantas de canola tolerantes a herbicida e milho resistentes a lagartas são aprovadas nos Estados Unidos.  
Milho GM tolerante a herbicidas é aprovado para uso como alimento na Austrália.  
É estabelecida a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) com finalidade de prestar apoio técnico consultivo e assessoramento ao governo federal na formulação, atualização e implementação da Política Nacional de Biossegurança relativa a Organismos GM. Liberação da soja transgênica tolerante a herbicida no Brasil.
- 2006: Liberação nos Estados Unidos do arroz GM para consumo humano.  
Uvas geneticamente modificadas são testadas na África do Sul.
- 2007: Liberação experimental de cana transgênica com alto teor de açúcar no Brasil pela empresa Allelyx/Monsanto.  
Liberação comercial de milho GM resistente a inseto e tolerante a herbicida no Brasil.
- 2008: Pesquisadores australianos desenvolvem plantas com altos níveis de um ácido graxo (UFA) para produzir plásticos, tintas e cosméticos.  
Pesquisadores japoneses desenvolvem a primeira rosa azul GM.  
Liberação comercial de algodão GM tolerante a herbicida no Brasil.
- 2009: Liberação comercial da soja GM tolerante a herbicida e algodão resistente a inseto no Brasil.

Desenvolvimento da terceira geração de plantas GM com propriedades como tolerância a alta salinidade e seca, ou para produção de produtos farmacêuticos como vacinas orais, e produtos especializados como plástico biodegradável.

- 2010: Craig Venter cria “célula sintética” a partir de um genoma sintetizado em laboratório

### **Biotecnologia e agricultura**

O estabelecimento de uma agricultura sustentável, que preserve o meio ambiente e proporcione segurança alimentar futura, é um fator primordial para o desenvolvimento da humanidade ante as mudanças climáticas e o declínio das reservas energéticas não renováveis. Diante das previsões de crescimento populacional mundial, atingindo nove bilhões de habitantes em 2050 (Ash et al., 2010), existe o desafio de criar métodos avançados e eficientes para aumentar a produção de alimentos e energia renovável sem, contudo, esgotar os recursos naturais. Em 2050, o mundo provavelmente estará vivendo sob a influência de três grandes crises anunciadas: a diminuição das reservas de petróleo, a escassez de água potável e a falta de alimentos para grande parte da população. Nesse cenário, a biotecnologia de plantas ocupa papel central na busca de soluções para atenuar os problemas, atuais e futuros, causados pelo estilo de vida adotado pelo homem.

No Brasil, o desenvolvimento do etanol combustível mostrou ser uma alternativa viável para reduzir a dependência do petróleo. Entretanto, a maioria das regiões agriculturáveis do planeta não possui as condições edafoclimáticas necessárias para o cultivo de plantas com potencial para a produção de biocombustíveis. Em contrapartida, o cultivo extensivo e exclusivo de plantas para a produção de energia pode gerar problemas no abastecimento de alimentos para a população, como escassez e elevação de preços. Nesse contexto, a biotecnologia se insere como propulsora para o aumento da produtividade, da qualidade da produção e para o desenvolvimento de plantas adaptadas a diversas condições ambientais de espécies com potencial energético. Em adição, a biotecnologia atua no desenvolvimento de outras fontes de bioenergia como a produção de biocombustíveis a partir de algas transformadas geneticamente (Beer et al., 2009).

Atualmente, o Programa Fapesp de Pesquisa em Bioenergia (Bioen) fornece aporte financeiro para projetos que têm por objetivo promover o avanço do conhecimento e sua aplicação em áreas relacionadas à produção de bioenergia no Brasil (<http://bioenfapesp.org>). Entre esses projetos, estão em andamento estudos que visam à análise funcional de genes envolvidos na fotossíntese da cana-de-açúcar, ao aumento do teor de sacarose, à análise da biossíntese da parede celular, à obtenção de plantas que apresentem tolerância a seca, entre outros. O objetivo comum desses projetos é o desenvolvimento, em curto prazo, de tecnologias que permitam uma produção eficiente de energia renovável.

Segundo a Organização das Nações Unidas (ONU), estima-se que há no mundo mais de 1,2 bilhão de pessoas sem acesso à água potável, representando cerca de 20% da população mundial (Unesco, 2007). A agricultura é responsável

por cerca de 70% do consumo de água do planeta (Aquastat-FAO, 2010), e o uso descontrolado de pesticidas e fertilizantes contribui para a contaminação da água de lençóis freáticos e mananciais subterrâneos. Para aperfeiçoar a eficiência do uso da água na agricultura, a biotecnologia atua em duas frentes: no desenvolvimento de espécies tolerantes a seca, diminuindo a irrigação intensiva e conservando a água no solo, e no melhoramento genético de variedades para resistência a pragas e doenças, reduzindo a necessidade da utilização de produtos químicos nas lavouras.

Na produção de alimentos, a biotecnologia pode fornecer meios para o aumento da produção agrícola pela aplicação do conhecimento molecular da função dos genes e das redes regulatórias envolvidas na tolerância a estresse, desenvolvimento e crescimento, “desenhando” novas plantas (Takeda & Matsuoka, 2008). A transformação genética de plantas cultivadas possibilita a validação funcional de genes individuais selecionados, bem como a exploração direta dos transgênicos no melhoramento genético, visando à inserção de características agronômicas desejáveis.

Atualmente, a produção de transgênicos está difundida em praticamente todas as regiões agrícolas do planeta, e a adoção da biotecnologia pelos produtores atinge níveis nunca alcançados por outras tecnologias avançada, em toda história da agricultura. Em 2009, culturas modificadas geneticamente foram plantadas por mais de 14 milhões de agricultores, em 134 milhões de hectares, distribuídos em 25 países (James, 2010). O Brasil ocupa o segundo lugar entre os países com maior área cultivada com transgênicos no mundo, cerca de 21,4 milhões de hectares, atrás apenas dos Estados Unidos com 62,5 milhões de hectares (Isaaa, 2010). A razão desse indiscutível sucesso são os benefícios obtidos com a produção de plantas transgênicas resistentes a doenças e insetos, a redução no uso de defensivos e o aumento da produção.

Segundo a FAO (2010), a previsão de crescimento do setor agrícola brasileiro até o ano de 2019 é de 40%, quando comparado ao período-base 2007-2009. Nesse mesmo período, Rússia, China e Índia não passarão os 26% de crescimento no setor, enquanto crescimentos mais modestos são esperados para Estados Unidos e Canadá (entre 10% e 15%). A União Europeia não deve ultrapassar os 4% (OECD-FAO Agricultural Outlook 2010-2019). Essa previsão de crescimento acentuado da produção brasileira se deve, por um lado, às condições econômicas e ambientais favoráveis do país, e, por outro, à adoção massificada de culturas geradas com o auxílio da biotecnologia.

Em um futuro próximo, a redução dos custos para o desenvolvimento e a adoção dos produtos da biologia molecular pode aumentar a variedade de plantas transgênicas e a sua disponibilidade para pequenos e médios produtores. A inserção de características antes ausentes na planta pode agregar valor aos seus produtos, multiplicando a renda do agricultor e diminuindo o êxodo rural. A transformação genética pode ser o motor de uma transformação social.

Neste artigo, será apresentado um breve resumo de três ramos da biologia molecular utilizados no melhoramento genético de plantas: a genômica, a transgenia e os marcadores moleculares.

### **Genômica de plantas e expressão gênica**

Desde o estabelecimento da metodologia de sequenciamento do DNA por Walter Gilbert e Allan Maxam em 1977, o número de sequências disponíveis nos bancos de dados de genômica tem crescido exponencialmente, até mesmo nesses últimos anos com a nova geração de sequenciadores de alta eficiência, como Roche 454 GS System®, Illumina Genome Analyzer® e Life Technologies AB SOLiD System®.

Atualmente, está disponível no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) mais de 106 bilhões de nucleotídeos de 108 milhões de sequências individuais, e somente no ano passado foram adicionadas mais de 11 milhões de novas sequências nesse banco (Benson et al., 2010). Esse grande número de sequências nos leva a esperar com grande expectativa uma explosão no conhecimento e na inovação nas diversas áreas do conhecimento e especialmente na saúde e agricultura.

O sequenciamento completo do genoma de *Arabidopsis thaliana* foi publicado no ano 2000 (The Arabidopsis Genome Initiative) e é considerado um marco para a ciência de plantas. Esse genoma possui 120 Mbp, apresenta em geral uma cópia de cada gene e menos de 10% de sequências repetitivas (Mahalakshmi & Ortiz, 2001), sendo considerado um genoma pequeno quando comparado a outras espécies vegetais. Até o momento, somente outras duas culturas agrícolas tiveram seus genomas finalizados, o arroz (*Oryza sativa*) com 390 Mbp (Goff et al., 2002, International Rice Genome Sequence Program) em 2002 e o milho (*Zea mays*) com 2.400 Mbp (Wei et al., 2009, Maize Genome Project) em 2009. No momento, estão em fase de finalização 19 espécies de plantas (Tabela 1) e mais 74 outras estão em diferentes fases de sequenciamento e montagem ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/gpstat.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/gpstat.html)).

Desde que a genômica tem como objetivo entender como os genes e a informação genética estão organizados dentro do genoma, e ainda como essa organização determina a sua função, temos o grande desafio de buscar a função dos genes e entender essas sequências para reduzir a distância existente entre genótipo e fenótipo. Entretanto, um grande número de genes sequenciados possui função desconhecida.

Para auxiliar a decifrar a função dos genes, alguns programas têm sido estabelecidos. O National Science Foundation (NSF) nos Estados Unidos lançou em 2000 o projeto Arabidopsis 2010 com o objetivo de determinar a função de 25 mil genes dessa espécie (Sommerville & Dangl, 2000). No Brasil são várias as iniciativas de consórcios de pesquisadores nos projetos temáticos como os Sucest (Sugarcane ESTs), Forests (*Eucalyptus ESTs*) e CitEST (Citrus ESTs). Esses programas são financiados pelas agências federais (CNPq, Capes e Finep)

e estaduais (Fapesp, Fapemig e outras) junto com as universidades. Na área de bioenergia, projetos individuais e programas temáticos como o Bioen (<http://bioenfapesp.org>) e INCT de Biotecnologia do Bioetanol ([www.bioetanol.org.br](http://www.bioetanol.org.br)) têm como parte dos objetivos principais a análise funcional de genes da cana-de-açúcar com ênfase à produção do bioetanol.

Tabela 1 – Genomas de plantas em fase final de sequenciamento e o tamanho correspondente quando disponível

<b>Genomas completos</b>	<b>Tamanho (Mbp)</b>
<i>Amaranthus tuberculatus</i>	*
<i>Arabidopsis lyrata</i>	230
<i>Brachypodium distachyon</i> (braquipódio)	*
<i>Carica papaya</i> (mamão)	370
<i>Cucumis sativus</i> (pepino)	370
<i>Glycine max</i> (soja)	1200
<i>Lotus japonicus</i> (lótus)	470
<i>Malus domestica</i> (maçã)	750
<i>Oryza barthii</i> (arroz)	*
<i>Oryza glaberrima</i> (arroz)	810
<i>Phoenix dactylifera</i> (tamareira)	*
<i>Physcomitrella patens</i> (musgo)	510
<i>Populus trichocarpa</i> (álamo)	480
<i>Ricinus communis</i> (mamona)	400
<i>Selaginella moellendorffii</i>	100
<i>Solanum lycopersicum</i> (tomate)	950
<i>Sorghum bicolor</i> (capim-sudão)	760
<i>Vigna radiata</i> (feijão-mungo)	*
<i>Vitis vinifera</i> (videira)	500

Adicionalmente às informações obtidas pela análise do genoma, é preciso ter conhecimento, por exemplo, sobre quais proteínas estão realmente sendo expressas, quando e em quais são os níveis de expressão e, ainda, as eventuais modificações pós-transcricionais (Canovas et al., 2004). O fato de as células de um organismo terem o mesmo genoma, mas apresentarem as mais variadas funções e morfologias, que são resultado de diferentes composições de proteínas expres-

sas, ilustra a importância de estudar não só a sequência dos genes, mas também a sua expressão para podermos compreender as suas funções biológicas.

A análise da expressão gênica, também chamada de análise de transcriptoma, é uma metodologia significativa para identificar genes candidatos, predição da função de genes e regiões regulatórias (Mochida & Shinozaki, 2010). Esse método é baseado na hibridização nos microarranjos e gene *chips* que permitem analisar a expressão de dezenas de milhares de genes simultaneamente. Genes identificados com expressão diferencial são clonados e analisados funcionalmente no metabolismo celular, sendo a transgenia um dos métodos utilizados.

### **Transformação genética de plantas**

A transgenia converge com as técnicas de engenharia genética como solução biotecnológica para problemas que afetam a agricultura brasileira e mundial, como pragas, doenças e estresses ambientais. Além disso, pode beneficiar os setores de saúde, indústria e alimentação, contribuindo para agregar valor aos produtos agropecuário, unindo o agronegócio aos setores farmacêutico e industrial (Hansen & Wright, 1999). Essa tecnologia é uma potente ferramenta de auxílio ao melhoramento genético tradicional, que transpõe as barreiras do cruzamento entre diferentes espécies e acelera o processo de seleção de plantas.

### **Métodos de transformação genética**

Na década de 1980, a técnica de hibridação somática, baseada na fusão completa de duas células de espécies diferentes, permitiu a transferência de cromossomos e organelas de uma planta para outra. Na hibridação somática, ocorre a transferência de caracteres poligênicos para obtenção de células híbridas sem passar pela reprodução sexual. Entretanto, a técnica não fornece informações detalhadas sobre os genes inseridos (Matsumoto, 2001). Com os avanços da tecnologia do DNA recombinante, a introdução de genes exógenos em plantas se tornou realidade (Perani et al., 1986). Atualmente há diversos genes introduzidos estavelmente em muitas espécies vegetais, conferindo resistência a estresses ambientais, herbicidas, fungos, bactérias, vírus e insetos (Lakshmanan et al., 2005).

A produção de plantas transgênicas é realizada por meio de diferentes métodos que podem ser agrupados em duas categorias: transformação indireta e transformação direta. No método de transformação indireta, a transferência de genes é intermediada por bactérias do gênero *Agrobacterium*, as quais são capazes de infectar plantas naturalmente e produzir um tumor conhecido como galha da coroa (Chilton et al., 1977; Srisvastava et al., 2009). Essa bactéria possui um plasmídeo denominado Ti, que pode ser modificado artificialmente para não formar o tumor e transportar o gene de interesse até o interior da célula da planta receptora. A técnica de transformação consiste em colocar o tecido da planta em contato com a *Agrobacterium* contendo o gene de interesse (Hensel et al., 2009). As bactérias, assim, infectam o tecido vegetal, iniciando o processo de transferência e a transformação do genoma da planta (Brasileiro & Cançado, 2000). As *Agrobacterium* modificadas, que perderam todo ou parte de seu



DNA de transferência (T-DNA), passam a ser incapazes de produzir tumores nas plantas hospedeiras (Pitzschke & Hirt, 2010). A técnica de transformação indireta é limitada pela baixa suscetibilidade da maioria das monocotiledôneas e gimnospermas, e de algumas dicotiledôneas, à infecção pela *Agrobacterium* (Potrikus, 1990).

Os métodos de transformação direta variam em eficiência e praticidade. Nesses métodos são utilizados processos físicos e químicos para produzir alterações nas paredes e membranas celulares, facilitando a introdução do gene de interesse no genoma da planta receptora. Os métodos mais eficientes de transformação genética são a eletroporação de protoplastos, a transformação por polietilenoglicol (PEG) e o bombardeamento de micropartículas ou biolística (Fisk & Dandekar, 1993), sendo este último o mais importante entre os métodos diretos.

A transformação de plantas pela técnica de biolística consiste em bombardear o tecido-alvo com micropartículas de ouro ou tungstênio recobertas pelo plasmídeo no qual está o gene de interesse. Essa técnica foi designada biolística (biológico + balística) em razão da alta velocidade imprimida aos microprojéteis revestidos com DNA (Sanford et al., 1991). As micropartículas variam entre 0,6 a 1,5 µm de diâmetro e podem ser aceleradas com ar comprimido (hélio), onda de choque elétrico ou pólvora. Nesse método, as micropartículas são disparadas na direção do tecido-alvo para penetrar a parede celular e transferir o DNA exógeno para o interior das células. A biolística se diferencia da transformação via *Agrobacterium* por apresentar maior eficiência na transformação de plantas pertencentes a diferentes ordens, além de possuir maior plasticidade na utilização de diferentes tecidos de uma mesma planta (Brasileiro & Cançado, 2000).

### **A produção de transgênicos no mundo**

Em 2009, 14 milhões de agricultores em 25 países cultivaram comercialmente lavouras geneticamente modificadas, e mais de 90% eram de pequenos produtores rurais de países em desenvolvimento. Do total plantado, as variedades transgênicas resistentes a insetos (*Bt*) e tolerantes a herbicida (Glifosato) representavam mais de 99% da área cultivada (James, 2010).

Segundo Carpenter (2010), as diferenças significativas para aumentos de produção entre países desenvolvidos e em desenvolvimento decorrem, provavelmente, da falta de um manejo adequado de pragas e plantas daninhas nas lavouras convencionais nos países em desenvolvimento. Dessa maneira, para os agricultores desses países, a adoção da cultura transgênica foi muito mais vantajosa do que para os agricultores de países desenvolvidos. O Brasil não foi considerado nessa pesquisa, e os dados de adoção e produção de culturas transgênicas por pequenos produtores ainda são escassos no país.

### **A produção de transgênicos no Brasil**

Em 2009, o Brasil se tornou o segundo maior produtor de plantas geneticamente modificadas (GM) do mundo, atrás apenas dos Estados Unidos. O

plântio de soja, milho e algodão transgênicos alcançou a marca de 21,4 milhões de hectares semeados, superando em 100 mil hectares a área plantada na Argentina (Isaaa, 2010). Desse total, 16,2 milhões de hectares são plantados com soja Roundup Ready (tolerante ao herbicida glifosato), 5 milhões com milho *Bt* (resistente a pragas) e 145 mil hectares com algodão transgênico, destes 116 mil correspondem ao algodão *Bt* e 29 mil são tolerantes a herbicida (Figura 1).

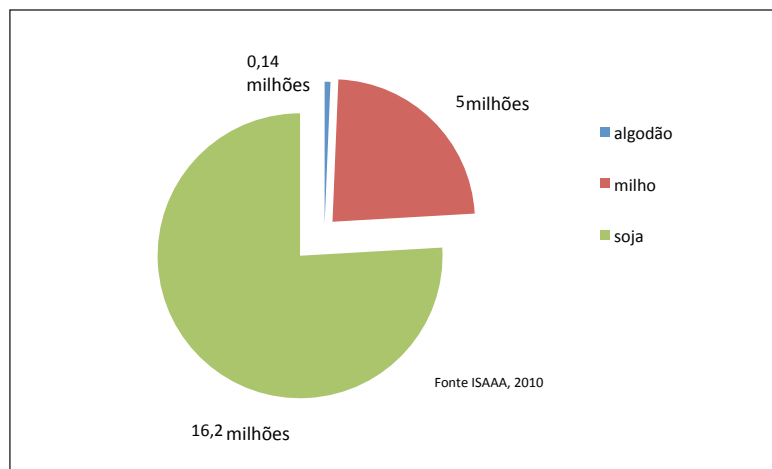


Figura 1 – Área plantada, em milhões de hectares, com lavouras transgênicas no Brasil.

Apesar do domínio da soja na produção de transgênicos no Brasil, o crescimento de lavouras geneticamente modificadas em 2009 foi liderado pelo milho. A produção do milho transgênico foi aprovada pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) em agosto de 2007, e, a partir de então, o plântio vem crescendo vertiginosamente. O aumento na produção de milho transgênico na safra de 2009 foi de 400%, em comparação ao ano de 2008 (Isaaa, 2010). Na safra 2010/2011, estão disponíveis para o produtor 136 cultivares de milho transgênico, e as perspectivas são de produção superior à safra passada (Embrapa, 2010).

### Marcadores moleculares em espécies vegetais

Nas últimas décadas, o desenvolvimento e a aplicação das técnicas de marcação molecular induziram transformações consideráveis em diversos ramos da biologia, notadamente a biologia molecular (clonagem posicional), a genética evolutiva (cartografia comparativa), a genética quantitativa (detecção e identificação de *locus* que controlam QTL), e o melhoramento genético (seleção assistida por marcadores) (Najimi et al., 2003).

No melhoramento genético, o desenvolvimento de marcadores ligados a genes de resistência contra pragas e agentes patogênicos, ou a sua utilização para acelerar a escolha do melhor parental, permite uma condução mais precisa dos programas de seleção quando comparado às seleções baseadas em outros

marcadores. Além disso, a seleção assistida por marcadores moleculares permite a construção de genótipos que seriam dificilmente produzidos apenas com a seleção fenotípica (Alzate-Marin et al., 2005).

Um marcador molecular é um *locus* polimórfico que informa sobre o genótipo do indivíduo que o possui. Dessa maneira, os marcadores correspondem ao polimorfismo presente no nível do DNA. A análise desse polimorfismo por meio da biologia molecular é endereçada ao genoma como um todo, traduzido ou não em proteínas, e é independente das condições ambientais. Contrariamente aos marcadores morfológicos e bioquímicos, os marcadores moleculares não dependem do tipo de tecido analisado, nem do estágio de desenvolvimento da planta. Atualmente, esses marcadores são utilizados com as mais diversas finalidades genéticas, desde testes de paternidade e identificação de parentesco até a construção de mapas genéticos complexos (Rocha et al., 2003).

O número de marcadores genéticos é teoricamente ilimitado, e o genótipo de uma planta pode ser determinado em um estágio de desenvolvimento precoce, assim que haja material suficiente para a extração do DNA. Em razão dessas características, os marcadores moleculares são uma ferramenta cada vez mais útil no melhoramento genético de culturas de valor agrônômico, sobretudo para características de difícil seleção fenotípica, sendo de grande utilidade para a aceleração de programas de melhoramento genético de espécies de ciclo de vida longo, onde um ciclo de seleção pode durar vários anos (Maluf et al., 2005)

Inúmeras técnicas de marcação molecular estão disponíveis atualmente (Langridge et al., 2001; Rafalski, 2002). As características de cada uma, seus domínios de aplicação, seus princípios e seus custos são bem descritos (Borém & Caixeta, 2006). Didaticamente, os métodos de marcação podem ser reunidos em duas grandes categorias: os marcadores do tipo RFLP (análise de restrição de fragmentos polimórficos ou *restriction fragment length polymorphism*, em inglês) e os marcadores baseados no método da reação em cadeia da polimerase (PCR).

A RFLP é uma técnica da primeira geração de marcadores, baseada na presença de variabilidade nas sequências de nucleotídeos do DNA genômico após digestão por enzimas de restrição (Botstein et al., 1980). Após a digestão do DNA, um grande número de fragmentos com tamanhos variados é gerado, os quais são hibridizados a uma sonda de DNA para a identificação de fragmentos homólogos. Mutações nos locais de restrição e/ou deleções/inserções de um fragmento de DNA na região reconhecida pela sonda são responsáveis pelo polimorfismo detectado.

Os principais marcadores baseados em PCR são a técnica *Randomly Amplified Polymorphic DNA* (Rapid), a *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) e os microssatélites ou *Simple Sequence Repeat* (SSR).

A técnica Rapid consiste na amplificação ao acaso de fragmentos de DNA (Williams et al., 1990). A utilização de um único *primer* curto (10 pb) permite

a amplificação de diversos pontos do genoma. Quando dois *primers* se ligam em distâncias que variam entre 200 e 2000 pb um do outro, em fitas opostas do DNA, a região delimitada entre ambos é amplificada na reação de PCR. O polimorfismo detectado se deve a mutações tanto nas regiões amplificadas, como nos locais de fixação dos *primers*.

A AFLP é a análise conjunta da presença de polimorfismo nos locais de restrição enzimática e na hibridização de *primers* não específicos (Vos et al., 1995). Essa técnica utiliza simultaneamente enzimas de restrição para clivagem do DNA e amplificação por PCR dos fragmentos obtidos na digestão. É a combinação enzima de restrição/*primers* que permite a identificação de polimorfismo entre indivíduos.

Os marcadores microssatélites ou SSR são constituídos de sequências repetidas em tandem de 1 a 6 nucleotídeos, encontradas dispersas em todo o genoma (Jarne & Lagoda, 1996). A análise da variação entre indivíduos é realizada por meio de amplificação em PCR, utilizando *primers* específicos construídos nas regiões que flanqueiam os microssatélites. É o par de *primers* (senso e antissenso) do microssatélite que constitui o marcador. O polimorfismo é representado pela variação no número de elementos repetidos que constituem o microssatélite, os quais produzirão alterações no comprimento dos fragmentos.

Outras técnicas de marcação molecular estão sendo desenvolvidas e utilizadas no estudo genético de espécies vegetais, porém ainda em menor escala quando comparadas a RAPD, AFLP e SSR e suas variáveis. Todas essas técnicas são baseadas na aplicação em géis e, de uma maneira geral, são trabalhosas e de custo elevado.

Os avanços consideráveis dos sequenciamentos genômicos permitiram a determinação de sequências completas do DNA de vários organismos e a possibilidade de compará-las. Talvez a metodologia para a marcação molecular mais promissora atualmente seja os marcadores do tipo *Single-Nucleotide Polymorphisms* (SNP), baseados na identificação de polimorfismo em sequências em que houve deleção/inserção ou mutação de apenas um nucleotídeo (Rafalski, 2002). Os marcadores SNP são mais abundantes que os microssatélites, aumentando a chance de sucesso em diversas aplicações, como a construção de mapas genéticos de alta resolução, o mapeamento de QTL, o diagnóstico genético, a análise da estrutura genética da população, a filogenia, entre outras (Choi et al., 2007). A identificação de SNP está mais avançada no genoma humano, com aproximadamente 30 milhões de SNP identificados no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information – SNP database), mas um aumento considerável na identificação de polimorfismos de base única está em andamento em diversas espécies vegetais (ibidem).

## **Conclusões**

O uso da biotecnologia para a produção de alimentos e bioenergia representa novas oportunidades, mas também muitos desafios. Enquanto as estraté-

gias para a produção de biocombustíveis devem ser adotadas de acordo com as possibilidades e necessidades de cada país, a produção de alimentos para a população deve ser priorizada a fim de evitar riscos à segurança alimentar, especialmente em países onde os níveis básicos de fornecimento de alimentos ainda são insuficientes. Nesse contexto, a biotecnologia pode auxiliar no desenvolvimento de plantas e métodos com maior potencial para a produção de combustíveis, sem a necessidade de aumento na área cultivada.

Em um futuro próximo, o desenvolvimento de biocombustíveis de segunda geração pode elevar os índices de produção de combustíveis por área plantada com culturas de potencial energético. No caso da cana-de-açúcar, os biocombustíveis de primeira geração são aqueles produzidos a partir da fermentação dos açúcares presentes no suco da cana, para a produção do etanol. Já os biocombustíveis de segunda geração são aqueles obtidos a partir da celulose presente no bagaço, que é utilizada na produção de álcool combustível. Assim, a biotecnologia pode auxiliar no desenvolvimento de variedades ricas em celulose, visando a uma maior eficiência na produção de etanol. Essa mesma estratégia pode ser usada em outras culturas, como o milho, cuja palha pode ser empregada na produção de biocombustível, enquanto os grãos são destinados para a alimentação.

O maior benefício da biotecnologia vegetal para a humanidade, entretanto, será, sem sombra de dúvidas, a produção de plantas melhoradas geneticamente, fornecendo suporte para as exigências atuais e futuras de segurança alimentar, para o desenvolvimento de uma agricultura sustentável e para a preservação dos recursos naturais.

## Referências

- ALZATE-MARIN, A. L. et al. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. *Fitopatologia Brasileira*, v.30, n.4, p.333-42, 2005.
- AQUASTAT – FAO. 2010. Disponível em: <<http://www.fao.org/nr/water/aquastat/main/index.stm>>.
- ASH, C. et al. Feeding the future. *Science*, v.327, p.797, 2010.
- BEER, L. L. et al. Engineering algae for biohydrogen and biofuel production. *Current Opinion in Biotechnology*, v.20, n.3, p.264-71, 2009.
- BENNETT, J. W; CHUNG, K.-T. Alexander Fleming and the discovery of penicillin. *Advances in Applied Microbiology*, v.49, p.163-84, 2001.
- BENSON, D. A. et al. GenBank. *Nucleic Acids Research*, v.38, p.D46-D51, 2010.
- BORÉM, A.; CAIXETA, T. E. *Marcadores moleculares*. Viçosa: UFV, 2006.
- BOTSTEIN, D. et al. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *The American Journal of Human Genetics*, v.32, p.314-331, 1980.

- BRASILEIRO, A. C. M.; CANÇADO, G. M. de A. Plantas transgênicas. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v.21, n.204, p.28-35, 2000.
- CANOVAS, F. et al. Plant proteome analysis. *Proteomics*, v.4, p.285-98, 2004.
- CARPENTER, J. E. Peer-reviewed surveys indicate positive impact of commercialized GM crops. *Nature Biotechnology*, v.28, p.319-21, 2010.
- CHILTON, M.-D. et al. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell*, v.11, p.263-71, 1977.
- CHOI, I. Y. et al. A soybean transcript map: gene distribution, haplotype and single-nucleotide polymorphism analysis. *Genetics*, v.2007, v.176, p.685-96, 2007.
- EMBRAPA. 2010. Disponível em: <<http://www.cnpms.embrapa.br/milho/cultivares/index.php>>.
- FAO. 2010. Disponível em: <<http://www.fao.org>>.
- FISK, H. J.; DANDEKAR, A. M. The introduction and expression of transgenes in plants. *Scientia Horticulture*, v.55, p.5-36, 1993.
- GOFF, S. A. et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). *Science*, v.296, p.92-100, 2002.
- HANSEN, G.; WRIGHT, M. S. Recent advances in the transformation of plants. *Trends in Plant Science*, v.4, p.226-31, 1999.
- HENSEL, G. et al. *Agrobacterium*-Mediated Gene Transfer to Cereal Crop Plants: Current Protocols for Barley, Wheat, Triticale, and Maize. *International Journal of Plant Genomics*, doi:10.1155/2009/835608, 2009.
- ISAAA. 2010. Disponível em: <<http://www.isaaa.org>>.
- JAMES, C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops. The First Fourteen Years, 1996 to 2009. In: *International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications*. Ithaca, New York, 2010.
- JARNE, P.; LAGODA, P. J. L. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution*, v.11, p.424-9, 1996.
- LAKSHMANAN, P. et al. Invited review: Sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. *In Vitro Cell Developmental Biology Plant*, v.41, p.345-63, 2005.
- LANGRIDGE, P. et al. Trends in genetic and genome analyses in wheat: a review. *Australian Journal of Agricultural Research*, n.52, p.1043-77, 2001.
- MAHALAKSHMI, V.; ORTIZ, R. Plant genomics and agriculture: From model organisms to crops, the role of data mining for gene discovery. *Electronic Journal of Biotechnology*, v.4, p.1-10, 2001.
- MALUF, M. P. et al. Genetic diversity of cultivated *Coffea arabica* inbred lines assessed by RAPD, AFLP and SSR marker systems. *Scientia Agricola*, v.62, p.366-73, July/Aug. 2005.
- MATSUMOTO, K. Híbridos somáticos. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, n.20, p.26, 2001.
- MOCHIDA, K.; SHINOZAKI, K. Genomics and Bioinformatics Resources for Crop Improvement. *Plant Cellular Physiology*, v.51, p.497-523, 2010.

NAJIMI, B. et al. Applications des marqueurs moléculaires dans l'amélioration du blé tendre pour la résistance aux maladies et aux insectes. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, v.7, n.1, p.17-35, 2003.

OECD-FAO. 2010. Disponível em: <<http://www.agri-outlook.org>>.

PERANI, L. et al. Gene Transfer Methods of Crop Improvement: introduction of foreign DNA into plants. *Physiologia Plantarum*, v.68, p.566-70, 1986.

PITZSCHKE, A.; HIRT, H. New insights into an old story: *Agrobacterium*-induced tumour formation in plants by plant transformation. *The EMBO Journal*, v.29, p.1021-32, 2010.

POTRYKUS, I. Gene Transfer to Plants: assessment and perspectives. *Physiologia Plantarum*, v.79, p.125-34, 1990.

RAFALSKI, J. A. Novel genetic mapping tools in plants: SNPs and LD-based approaches. *Plant Science*, v.162, n.3, p.329-33, 2002.

ROCHA, R. B. et al. O mapeamento genético no melhoramento de plantas. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, n.30, p.27-32, jan./jun. 2003.

SANDFORD, J. C. et al. An improved, helium-driven biolistic device. *Technique-A Journal of Methods in Cell and Molecular Biology*, v.3, p.3-16, 1991.

SRIVASTAVA, T. et al. A reliable protocol for transformation of *Catharanthus roseus* through *Agrobacterium tumefaciens*. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, v.15, p.93-8, 2009.

SOMMERVILLE, C.; DANGL, J. Genomics: Plant Biology in 2010. *Science*, v.290, p.2077-8, 2000.

TAKEDA, S.; MATSUOKA, M. Genetic approaches to crop improvement: responding to environmental and population changes. *Nature Reviews Genetics*, v.9, p.444-57, 2008.

UNESCO. International Symposium on 'New Directions in Urban Water Management, 2007. Disponível em: <[http://typo38.unesco.org/index.php?urban\\_water\\_07](http://typo38.unesco.org/index.php?urban_water_07)>.

VOS, P. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid Research Journal*, v.23, p.4407-14. 1995.

WEI, F. et al. Detailed analysis of a contiguous 22-Mb region of maize genome. *PLoS Genetics*, v.5, n.11, p.e1000728, 2009.

WILLIAMS, J. G. K. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research Journal*, v.18, p.6531-3, 1990.

*RESUMO* – A expectativa de o crescimento populacional atingir 9 bilhões de habitantes em 2050 em adição às questões da sustentabilidade e do aquecimento global nos desafiam a aumentar a oferta de alimentos. Uma metodologia alternativa que contribua para a redução do impacto desse cenário envolve a biotecnologia, que, nas últimas décadas, trouxe marcantes oportunidades tecnológicas na agricultura, resultando em relevante desenvolvimento na obtenção de novas variedades de plantas, na melhoria da qualidade de diversos alimentos e atualmente também na bioenergia. As técnicas biotecnológicas

envolvendo os marcadores moleculares, a genômica e a transformação genética estão transformando a agricultura e são discutidas neste artigo.

*PALAVRAS-CHAVE:* Marcadores moleculares, Transgênicos, Bioenergia, Genômica, Produção de alimentos.

*ABSTRACT* – The expected population growth to reach 9 billion by 2050 in addition to issues of sustainability and global warming challenges us to increase the supply of food. An alternative approach to help reducing the impact of this scenario involves biotechnology which in recent decades has brought remarkable technological opportunities in the agriculture that resulted in relevant development in obtaining new plant varieties, improved quality of different foods, and now also in bioenergy. The biotechnology techniques involving molecular markers, genomics and genetic transformation are transforming agriculture and will be discussed in this article.

*KEYWORDS:* Molecular markers, Transgenics, Bioenergy, Genomics, Food production.

*Helaine Carrer* é professora no Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Biotecnologia Agrícola, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. @ – [hecarrer@esalq.usp.br](mailto:hecarrer@esalq.usp.br)

*André Luiz Barbosa* é bolsista CNPq pelo Programa do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) do Bioetanol. @ – [abarbosa@esalq.usp.br](mailto:abarbosa@esalq.usp.br)

*Daniel Alves Ramiro* é pós-doutorando Fapesp, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. @ – [daramiro@esalq.usp.br](mailto:daramiro@esalq.usp.br)

Recebido em 9.10.2010 e aceito em 18.10.2010.