

# Melhoramento genético de trevo vermelho para resistência a vírus por meio de biotecnologia

Fernando Adami Tcacenco

---

O melhoramento genético vegetal vem sendo praticado há bastante tempo e contribuído em muito para o aumento da produtividade da maioria dos produtos agrícolas de importância econômica. De um modo geral, o melhoramento se baseia no cruzamento de plantas com características superiores e seleção da progênie, gerando assim uma cultivar que combina as características desejáveis de ambos os pais. Mais recentemente, o melhoramento genético passou a contar com o auxílio de novas técnicas, notadamente aquelas ligadas à transformação genética, o que tornou possível a incorporação de genes provindos de espécies vegetais sexualmente incompatíveis com a espécie que se deseja melhorar. Há ainda a possibilidade de se utilizar genes provindos de outras classes de organismos, como por exemplo vírus e bactérias.

Assim, uma planta transgênica pode ser definida como aquela que sofreu o melhoramento genético por técnicas diferentes dos cruzamentos tradicionais. Os progressos obtidos na área de plantas transgênicas nos últimos anos têm sido fantásticos. As primeiras experiências foram realizadas em 1984 (1 e 2) e desde então uma gama bastante grande de plantas têm sido transformadas. Já se conta, hoje, com plantas resistentes a insetos, viroses, herbicidas e, ainda, com plantas com qualidade melhorada, tais como tomate com longa vida de prateleira, todas elas fruto de engenharia genética com genes ou seqüências gênicas novas.

Existem muitas técnicas para a transferência de genes em plantas, incluindo microinjeção de ácido desoxirribonucléico (ADN), que é o material genético dos seres vivos, a introdução de ADN assistida por *Agrobacterium tumefaciens*, ou o

microbombardeamento de ADN. Na microinjeção, tubos microcapilares são utilizados para injetar ADN diretamente nas células, sem destruí-las, sendo este método bastante comum em transformação de células animais (3). No entanto, a transformação de plantas por este método é muito difícil, devido à presença da parede celular e de enzimas nos vacúolos das células. O microbombardeamento, por outro lado, tem sido bastante usado em plantas. Neste procedimento, o ADN de interesse é aderido à parede de microprojéteis constituídos de partículas de ouro ou tungstênio, os quais são acelerados a altíssimas velocidades em equipamentos acionados por pólvora ou por gases como o hélio. Esta técnica vem sendo usada desde 1987 em várias espécies vegetais, como por exemplo milho, trigo e arroz (4 e 5).

No entanto é a técnica baseada em *A. tumefaciens* que tem sido a mais comumente utilizada na transformação de plantas. Essa bactéria tem a fantástica capacidade de, naturalmente, processar a transferência de seqüências de ADN para o núcleo das células vegetais, incorporando-as permanentemente nos cromossomos. O objetivo primário, para a bactéria, é a introdução de genes que farão com que as plantas passem a produzir certas substâncias que servirão como fonte de nutrientes para as bactérias. Essa transferência de ADN leva à formação de tumores, as chamadas galhas, caracterizadas como uma doença bacteriana, que pode ser mais ou menos séria, como por exemplo na região de produção de roseiras em Minas Gerais.

Para fins de utilização de *A. tumefaciens* para engenharia genética, são feitas várias modificações no genoma da bactéria. Inicialmente, os

genes responsáveis pela formação de tumores são removidos, de tal forma que as bactérias se tornem avirulentas, não sendo mais capazes de formar tumores. Em seguida, faz-se a introdução do gene ou dos genes de interesse, que passam a ocupar o lugar dos genes oncogênicos que haviam sido removidos. Tudo isso é feito através de sofisticadas técnicas de engenharia genética e de biologia molecular. Os resultados são bactérias benéficas, que podem, agora, ser usadas para a transformação de plantas com genes para resistência a doenças, ou outro tipo de gene que venha melhorar, agronomicamente, a espécie vegetal.

Um dos usos mais comuns dessas bactérias é na introdução de genes para resistência a vírus. Várias partes do genoma dos vírus podem ser usadas, indo desde o genoma completo até genes específicos, como aqueles que codificam a capa protéica ou proteínas de transporte intercelular, por exemplo. Algumas vezes se usam seqüências de anti-senso ou seqüências de satélites virais. De todas essas opções, a que tem resultado em maior sucesso é o uso do gene que codifica a capa protéica.

A transformação de plantas por esse método basicamente envolve os seguintes passos: alteração do plasmídeo, com a eliminação dos oncogenes e inclusão dos genes desejáveis; transformação de *A. tumefaciens* com esse novo plasmídeo; co-cultivo da agrobactéria com explantes vegetais, normalmente partes de folhas ou pecíolos; regeneração de plantas *in vitro* através de cultura de tecidos; seleção de plantas transformadas através do uso de antibióticos; testes para a presença e expressão dos genes de interesse; testes para resistência ao vírus específico.

Há alguns métodos para aumentar

a eficiência da transformação pela agrobactéria. Um desses métodos baseia-se na inclusão, no meio de cultura das bactérias, de certas substâncias que ativam a transferência e incorporação de ADN pelas células bacterianas. Acetosiringona (AS) é um composto freqüentemente usado para esse fim, posto que várias pesquisas já demonstraram que ele é um potente ativador de certos genes da bactéria que resultam em uma maior virulência. Normalmente se utiliza um meio ácido, com pH ao redor de 5,2, para aumentar ainda mais a virulência das bactérias.

Um outro método é o uso de antibióticos do tipo certo e nas dosagens adequadas. A importância desses aspectos está ligada ao fato de que, quando se delinea o plasmídeo contendo o gene de interesse, de origem viral, também se introduz um gene, normalmente de origem bacteriana, que venha a conferir resistência a um antibiótico. Esse gene é transferido para o genoma vegetal, e a planta transgênica passa a ser resistente ao mesmo, além de expressar resistência ao vírus. Canamicina é o antibiótico mais comumente utilizado para esse fim, mas vários outros, incluindo geneticina, podem ser superiores, dependendo de cada espécie vegetal e de cada situação específica no processo de transformação.

Considerando todos esses aspectos, foram desenvolvidas pesquisas nas áreas de bacteriologia, biologia molecular e cultura de tecidos, visando a obtenção de plantas de trevo vermelho transgênicas para o gene que codifica a proteína capsular do vírus do nanismo do amendoim, ou peanut stunt vírus (PSV), como é a sua denominação em inglês. As pesquisas foram desenvolvidas na Universidade da Flórida, em Gainesville, em laboratório e casa de vegetação. As pesquisas se concentraram em três áreas, descritas e discutidas a seguir.

## Experimentos conduzidos

1) Efeito de acetosiringona (AS) e do pH do meio de cultura na virulência de *Agrobacterium tumefaciens*. Foram conduzidos vários experimen-

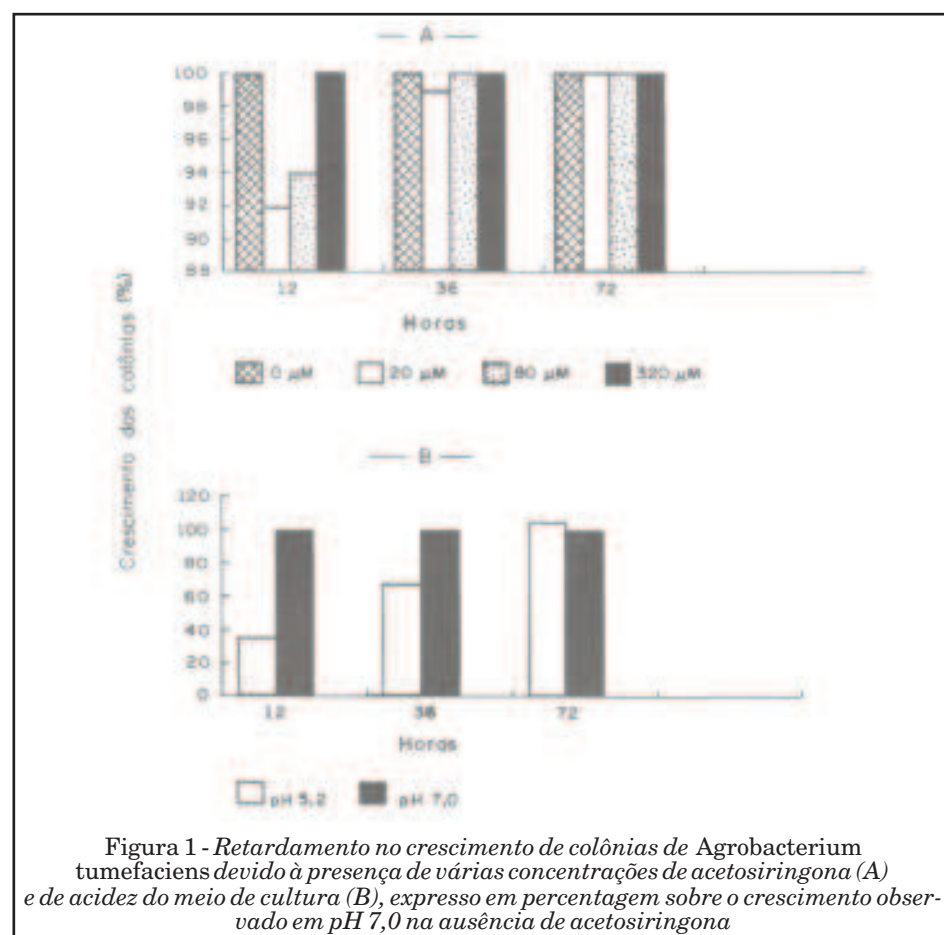
tos em laboratório, onde se utilizaram diversas concentrações desse composto, adicionadas ao meio de cultura de bactérias. As concentrações variaram desde cinco micromolares (mM) até 320mM. Utilizaram-se ainda dois níveis de pH do meio de cultura: 7,0 e 5,2. A metodologia previa o crescimento das bactérias, pertencentes a diferentes cepas, nos meios de cultura contendo as várias concentrações de AS nos dois níveis de pH, com avaliações do crescimento das células e do pH do meio a vários intervalos.

Também se avaliou o efeito da AS e da acidez do meio no desenvolvimento de calos em explantes de trevo vermelho e de fumo. Para tanto, utilizaram-se pedaços de pecíolos foliares (trevo) ou pedaços de lâminas foliares (fumo), os quais eram imersos nos meios de cultura e depois cultivados *in vitro* em meio sólido de Murashigue e Skoog (MS), que é o meio tradicio-

nalmente utilizado para fumo, ou Gamborg B5, tradicionalmente utilizado para trevo vermelho. Faziam-se avaliações do desenvolvimento dos calos a vários intervalos de tempo.

Os resultados dos experimentos indicam que o crescimento da agrobactéria foi retardado pela presença de AS. Isto se reflete no fato de que, nas fases iniciais, bactérias cultivadas em meio com altas doses de AS cresceram muito mais lentamente do que culturas com pouco AS ou sem esse composto, conforme se verifica na Figura 1. Pode-se observar, no entanto, que mesmo altas concentrações de AS no meio não afetaram o crescimento após 72 horas, o que vem a confirmar que esse composto apenas retarda o crescimento bacteriano.

Comportamento semelhante foi observado para pH do meio de cultura: meio ácido (pH 5,2) causou um retardamento no crescimento inicial das



bactérias, mas ao cabo de 72 horas o efeito já havia cessado, havendo inclusive um efeito positivo de pH ácido no crescimento, conforme se verifica na mesma figura.

O efeito de AS e pH na virulência de agrobactéria foi testado através do potencial de formação de calos em explantes de trevo vermelho e fumo, em meio de cultura contendo antibióticos seletivos. As análises de variância mostraram efeito acentuado de AS e pH em explantes de trevo vermelho,

sendo que o meio ácido, acoplado com altas concentrações de AS, resultou em um significativo acréscimo no crescimento de calos. Em fumo, os efeitos foram um pouco diferentes, posto que doses muito altas de AS afetaram negativamente o crescimento; desta forma, em fumo, os melhores resultados foram obtidos com doses intermediárias de AS, em meio ácido. A Figura 2 sumariza os resultados para as duas espécies.

#### 2) Efeito de várias concentrações

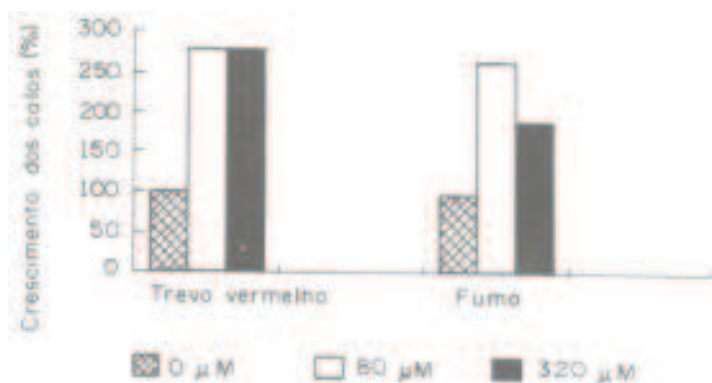


Figura 2 - Efeito de várias concentrações de acetosiringona, em micromolares (μM), sobre o crescimento de calos em explantes de trevo vermelho e de fumo, expresso em percentagem sobre o crescimento observado na ausência de acetosiringona. Ambas espécies foram transformadas por *Agrobacterium tumefaciens* sob várias concentrações de acetosiringona no meio de cultura

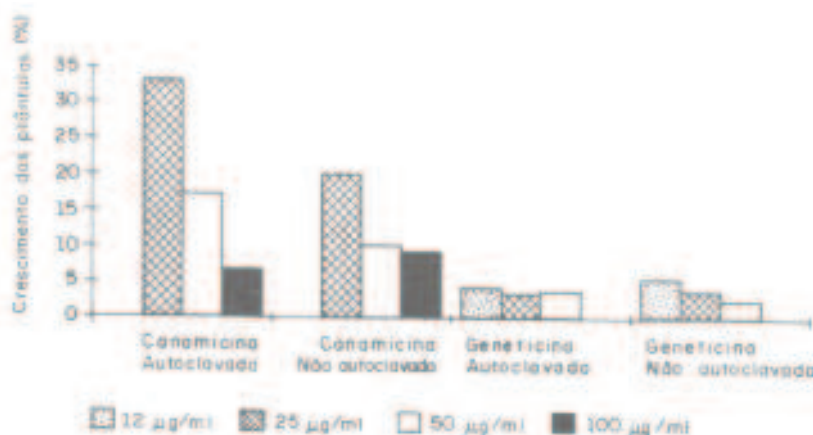


Figura 3 - Efeito de várias concentrações dos antibióticos canamicina e geneticina no meio de crescimento sobre o retardamento no crescimento de plântulas de trevo vermelho, expresso como a percentagem sobre o peso de plântulas que cresceram em meio de cultura sem os antibióticos. O meio de cultura foi autoclavado juntamente com o antibiótico ou antes da adição do antibiótico

de canamicina e geneticina, autoclavadas ou não, no crescimento de plântulas de trevo vermelho. Conforme descrito na introdução, o uso do tipo e concentração adequada de antibióticos pode influenciar grandemente nos resultados finais em experimentos com obtenção de plantas transgênicas. O antibiótico, neste particular, visa a seleção de plantas que sejam transformadas e que, portanto, tenham incorporado o gene que confere resistência ao antibiótico. Todas as plantas não-transformadas são eliminadas do meio de cultura. Nestes experimentos, utilizaram-se concentrações de canamicina e de geneticina variando de 3 microgramas por mililitro de meio de cultura (mg/ml) até 100mg/ml. Adicionalmente, foram aplicados tratamentos em que o anti-biótico era adicionado antes da auto-clavagem do meio, para testar possível desativação pelo calor.

A análise dos resultados indica diferenças significativas entre os dois diferentes tipos de antibióticos, e também entre doses de cada antibiótico. Houve também um efeito acentuado para autoclavagem, de tal forma que os tratamentos que continham o antibiótico canamicina, quando autoclavados, apresentaram uma significativa redução do efeito sobre o crescimento de plântulas de trevo vermelho. Já a geneticina teve o seu efeito potencializado pela autoclavagem, conforme pode ser visto na Figura 3.

A geneticina mostrou ser, também, bem mais potente do que a canamicina, já que doses mais baixas, da ordem de até 3mg/ml, tiveram um efeito que pode, sob certos aspectos, ser considerado similar ao apresentado por doses muito mais altas de canamicina (até 100mg/ml). Estes efeitos são mostrados na mesma figura.

3) Transformação genética de trevo vermelho com a proteína capsular de PSV. Nesta etapa da experimentação, procurou-se a obtenção de plantas de trevo vermelho que contivessem o gene que codifica a proteína capsular desse fitovírus, e que fossem capazes de expressá-lo em níveis detectáveis pelas técnicas disponíveis. Como controle, foi utilizado o fumo, que é uma planta padrão para este tipo de expe-



rimentação, posto que é mais facilmente transformada do que qualquer outra espécie vegetal.

As transformações foram feitas com duas cepas de *A. tumefaciens*, C58-Z707, e EHA101. Adicionalmente, utilizaram-se dois plasmídeos, um contendo o gene da proteína capsular do vírus (plasmídeo pMPSV4-43), e um outro que continha apenas genes marcadores e seletivos (plasmídeo pMON9793). Os explantes de trevo vermelho (pedaços de pecíolos foliares com cerca de 5mm) e de fumo (discos de lâminas foliares) foram co-cultivados com a agrobactéria por 48 horas, em meio sólido, e depois transferidos para um novo meio que continha carbenicilina, um antibiótico capaz de eliminar a agrobactéria.

No processo de regeneração de plantas, através da cultura de tecidos, utilizaram-se os meios MS para fumo e Gamborg B5 para trevo vermelho. Para a formação de calos em trevo, adicionou-se ao meio ácido naftalenoacético (ANA), ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) e cinetina. Já para o fumo, adicionaram-se apenas ANA e adenina. Após um período de quatro a seis semanas, o material de trevo foi transferido para meio contendo ANA e adenina, para facilitar a formação de embriões; o material de fumo foi transferido para meio puro, sem reguladores de crescimento, para a formação de plantas. Uma vez obtidas plantas a partir de cultura de tecidos, as mesmas foram enraizadas em solo, e finalmente, após aclimatização, transferidas para casa de vegetação.

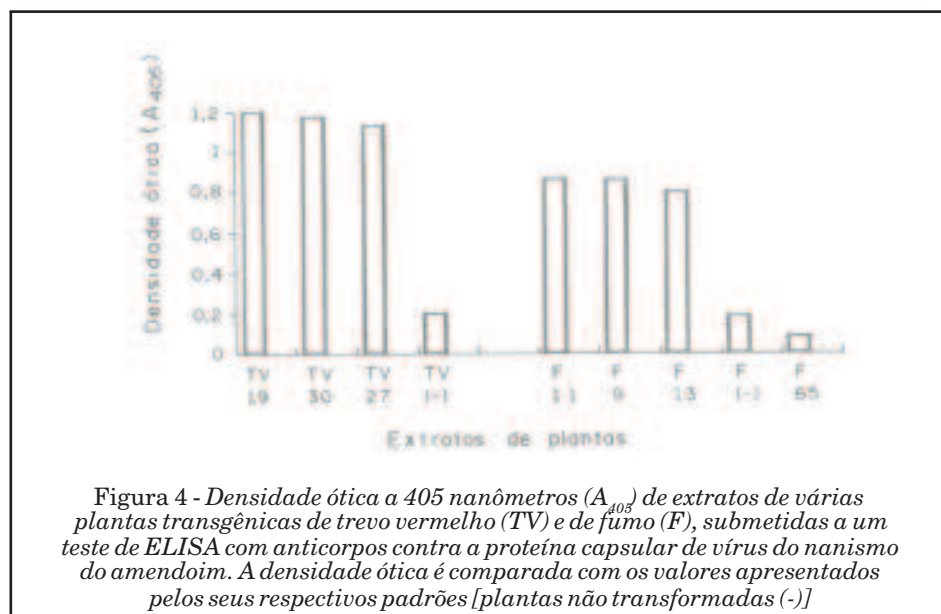


Figura 4 - Densidade ótica a 405 nanômetros ( $A_{405}$ ) de extratos de várias plantas transgênicas de trevo vermelho (TV) e de fumo (F), submetidas a um teste de ELISA com anticorpos contra a proteína capsular de vírus do nanismo do amendoim. A densidade ótica é comparada com os valores apresentados pelos seus respectivos padrões [plantas não transformadas (-)]

Para verificar se as plantas regeneradas eram transformadas, utilizaram-se várias técnicas moleculares e imunológicas. A presença do gene foi verificada através da reação de polimerase em cadeia (polymerase chain reaction, PCR), utilizando-se iniciadores (primers) específicos, e através de hibridação de ADN segundo a técnica de Southern (Southern blot), com sondas também específicas. Já para analisar a expressão do gene, utilizou-se a técnica de ELISA, com anticorpos para a proteína da capa do vírus.

Os protocolos adotados para a cultura de tecidos de ambas as espécies vegetais, fumo e trevo, mostraram-se eficientes, posto que um grande número de plântulas originadas *in vitro* foi recuperado. Fumo, como era de se esperar, mostrou-se mais prolífico em cultura de tecidos. As plantas foram testadas para a presença e expressão do gene de interesse, o da proteína capsular do PSV.

Os resultados de PCR e de hibridação de ADN segundo a técnica de Southern mostraram que o gene em questão havia realmente sido integrado no genoma vegetal. O ADN extraído de plantas testes foi capaz de amplificar uma banda correspondente à banda amplificada em ADN teste, extraído de agrobactérias ou de plantas sabidamente transgênicas. Os experimentos de hibridação também mostraram que as sondas utilizadas de-

tectaram bandas específicas para o gene da proteína capsular.

Resultados interessantes foram também obtidos com os experimentos de ELISA. A Figura 4 mostra alguns resultados representativos, indicando que várias plantas de fumo e de trevo vermelho apresentaram reações positivas aos anticorpos da proteína capsular, significando que essa proteína estava sendo produzida em altos níveis nessas plantas transgênicas.

As próximas etapas de experimentação serão conduzidas em casa de vegetação, onde as plantas transgênicas serão inoculadas com extratos do vírus do nanismo do amendoim (PSV), verificando-se assim o nível de proteção conferido às mesmas pela proteína capsular que está sendo constantemente produzida por essas plantas. Uma vez selecionadas as plantas de trevo vermelho com os mais altos níveis de proteção, serão feitos cruzamentos genéticos para se obter uma nova cultivar, resistente ao vírus estudado.

## Uso das técnicas em Santa Catarina

O Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Estação Experimental de Itajaí já vem desenvolvendo um



trabalho de micropropagação de mudas de bananeira, obtendo-se assim um material de propagação vegetativa de qualidade superior. As mudas produzidas vêm tendo uma excelente aceitação junto aos produtores de Santa Catarina e, mais recentemente, de vários outros Estados da Federação, tais como Minas Gerais, Espírito Santo, Paraná e Maranhão. Várias áreas podem ser identificadas, nas quais a transformação genética, aliada à cultura de tecidos vegetais, venha a redundar em um aumento de nossa produtividade agrícola.

O vírus da tristeza dos citros é um sério problema em todas as regiões produtoras de laranja do mundo, incluindo o Estado de Santa Catarina. Vários institutos de pesquisa nos Estados Unidos e Europa vêm desenvolvendo pesquisas visando a criação de plantas transgênicas de laranja, que incorporem genes para resistência a esse vírus. A metodologia utilizada baseia-se em *A. tumefaciens*, e pode ser facilmente transferida e adaptada às nossas condições, gerando-se assim cultiva-res locais resistentes à

tristeza dos citros.

A comunidade científica mundial está também desenvolvendo esforços para a criação de plantas transgênicas de mandioca e arroz, duas outras culturas de alta relevância para Santa Catarina. A resistência a vírus e insetos em mandioca, por exemplo, poderia ser incorporada nas cultivares tradicionalmente utilizadas aqui, possibilitando sensível redução nas quantidades de defensivos agrícolas aplicados. Em arroz, a incorporação de resistência a herbicidas permitiria o uso seletivo dos mesmos em aplicações pós-emergência, dando maior flexibilidade e eficiência aos programas de controle de ervas daninhas nessa cultura. A Estação Experimental de Itajaí está alerta para essas novas possibilidades, e deverá desenvolver novos projetos de pesquisa contemplando essas áreas.

## Literatura citada

1. DE BLOCK, M.I.; HERRERA-ESTRELLA, M.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J.; ZAMBRYNSKY, P. Expression of foreign genes in regenerated plants and their progeny. *EMBO Journal*, Oxford, v.3,

p.1681-1689, 1984.

2. HORSCH, R.B.; FRALEY, T.T.; ROGERS, S.G.; SANDERS, P.R.; LLOYD, A.; HOFFMANN, N. Inheritance of functional foreign genes in plants. *Science*, Washington, v.158, p.745-756, 1984.
3. JAENISH, R.; MINTZ, B. Simian vírus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocytes injected with viral DNA. *Proceedings of the National Academy of Science - USA*, Washington, v.71, p.1250-1254, 1974.
4. KLEIN, T.M.; WOLF, E.D.; WU, R.; SANFORD, J.C. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature*, London, v. 327, p.70-73, 1987.
5. OARD, J.H.; PAIGE, D.F.; SIMMONDS, J.A.; GRADZIEL, T.M. Transient gene expression in maize, rice and wheat cells using an airgun apparatus. *Plant Physiology*, Bethesda, v.92, p.334-339, 1990.

**Fernando Adami Tcacenco**, eng. agr., Ph.D., Cart. Prof. n° 25.131-D, CREA-RS, EPAGRI/Estação Experimental de Itajaí, C.P. 277, Fone (047) 346-5244, Fax (047) 346-5255, 88301-970 Itajaí, SC.

**Carpa comum** (*Cyprinus carpio*): **produção de alevinos**. Boletim Técnico n° 76. 75p.

O autor, Sérgio Tadeu Jurovski Tamassia, descreve neste boletim o sistema de produção em massa de alevinos de carpa comum praticado em Santa Catarina, e que se baseou na tecnologia desenvolvida por pesquisadores húngaros e israelenses, sendo também conhecida por método de propagação artificial de peixes.

**Coleta e produção de hipófises de carpa comum** (*Cyprinus carpio*). Boletim Técnico n° 78. 23p.

O autor, Sérgio Tadeu Jurovski Tamassia, apresenta neste trabalho as informações e procedimentos necessários para se obter hipófises a partir das carpas comuns oriundas de viveiros comumente encontrados em Santa Catarina.

**Avaliação da qualidade do esterco líquido de suínos da região Oeste Catarinense para fins de utilização como fertilizante**. Boletim Técnico n° 79. 46p.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar a qualidade fertilizante e as situações de manejo do esterco líquido de suínos nas propriedades da região Oeste de Santa

Catarina. Segundo os autores, Eloi Erhard Scherer, Celso Aita e Ivan Tadeu Baldissera, o esterco utilizado de forma equilibrada constitui um fertilizante capaz de substituir com vantagem parte ou, em determinadas situações, totalmente a adubação química das culturas. Entretanto, a utilização do esterco não deve ser feita sem o acompanhamento técnico, pois desta forma poderá provocar uma sobrecarga no solo e desencadear um processo de poluição difusa, pela contaminação das águas de drenagem.

**Parâmetros para a agricultura irrigada de Santa Catarina: evapotranspiração potencial**. Documentos n° 172. 32p.

A evapotranspiração é um fenômeno físico que é influenciado por fatores climáticos como radiação solar, temperatura, umidade relativa, vento, etc. Para cada condição climática a evapotranspiração agirá de forma distinta, de modo qualitativo, de acordo com o fator climático preponderante. Segundo os autores des-

te trabalho, Darci Antônio Althoff, Márcio Sônego e Augusto Carlos Pola, pesquisadores da Epagri, é essencial o conhecimento da evapotranspiração para se poder estimar a quantidade de água requerida para a irrigação.

**A Extensão Rural e o novo paradigma**. Documentos, n° 176. 26p.

De autoria de Álvaro Afonso Simon, esta publicação apresenta uma análise, de modo muito rápido, sobre a periodização histórica da extensão rural catarinense. Concentra-se principalmente nos anos 90, momento em que se operam grandes modificações no meio rural e nas instituições afins.

**Manual de referências de administração rural 1993 - Índices técnicos e econômicos de propriedades agrícolas típicas e de atividades**, SC. Livro. 180p.

Contém informações técnicas e econômicas dos principais tipos de propriedades e de atividades de Santa Catarina e que poderão ser úteis aos técnicos que orientam as propriedades agrícolas, bem como aos pesquisado-

res, consultores, assessores e planejadores e políticos que atuam no meio rural.

**Municipalização da agricultura**. Manual. 34p.

O autor, engenheiro agrônomo Glauco Olinger, elaborou esta publicação com a intenção de oferecer às autoridades e aos agentes de desenvolvimento municipal, com responsabilidade no setor agrícola, um roteiro simplificado das ações necessárias ao processo de municipalização da agricultura.

**Pragas da videira e seu controle no Estado de Santa Catarina**. Boletim Técnico n° 77. 52p.

O presente trabalho foi elaborado pelo pesquisador da Epagri Eduardo Rodrigues Hickel com o objetivo de fornecer elementos para o reconhecimento a campo das principais doenças da videira, reunir informações sobre a biologia destas pragas e orientar sobre as medidas de controle a serem tomadas.

Estas e outras publicações da EPAGRI podem ser adquiridas na Sede da Empresa em Florianópolis, ou mediante solicitação ao seguinte endereço: GED/EPAGRI, C.P. 502, Fone (048) 234-0066, 88034-901 - Florianópolis, SC.