

Técnicas de manipulação genética em plantas: Uma análise crítica

Ernesto Paterniani¹

¹ *Professor Titular, ESALQ/USP - E-mail: epater@merconet.com.br.*

Palavras-chave: Melhoramento convencional, Biotecnologia, transgênese, mutagênese, seleção.

Resumo

Desde o seu início, a agricultura vem alcançando crescentes níveis de eficiência, graças em grande parte aos progressos da Genética e suas aplicações no desenvolvimento de técnicas de manipulação genética. Praticamente todo o melhoramento genético até o presente momento foi obtido utilizando-se os métodos identificados como convencionais. Com a moderna Biotecnologia, novas técnicas foram disponibilizadas, ampliando as possibilidades de manipulação genética, como no caso das cultivares transgênicas, cujo cultivo vem aumentando anualmente, embora enfrentando ainda forte oposição de certos setores. Entretanto, é cada vez mais evidente que os transgênicos são tão ou mais seguros do que os correspondentes não transgênicos para a saúde humana ou animal e nesse sentido devem ser considerados como coadjuvantes do melhoramento convencional. A complexidade técnica para a obtenção de cultivares transgênicas, aliada à demora das aprovações das comissões de biossegurança e da justiça, conduz a um significativo atraso na sua utilização pela sociedade. Uma comparação entre a mutagênese e a transgênese, mostra diferenças evidentes, relativas à biossegurança dessas tecnologias. Embora técnicas da biotecnologia representem uma importante contribuição na incorporação de características desejáveis às cultivares, técnicas convencionais de seleção, em especial os esquemas de seleção recorrente em suas várias modalidades, com eficiência comprovada, ainda apresentam um grande potencial a ser explorado para o melhoramento genético das plantas.

Introdução

A alimentação é, sem dúvida, a necessidade mais essencial do ser humano. Graças à invenção da agricultura há 10.000 anos, de maneira independente, pelo menos em duas regiões, no Velho e no Novo Mundo, a humanidade passou a depender menos da imprevisível caça e coleta de alimentos. A eficiência da agricultura atingiu níveis surpreendentes, pois, enquanto a caça exigia 2500 ha para alimentar uma pessoa, uma agricultura com tecnologia moderna consegue, em 250 ha alimentar 4000 pessoas (Stork e Teague, 1952 e Borlaug, 1972). Por isso é que, atualmente, toda a área dedicada à agricultura no mundo é

igual à área da América do Sul, mas, se a produtividade agrícola fosse igual à de 1950, para se obter a mesma produção seria necessário cultivar uma área equivalente a todo o Hemisfério Ocidental (Avery, 1994). Todo esse progresso foi obtido graças aos contínuos conhecimentos da natureza das plantas e de técnicas do seu cultivo. Inicialmente, com a domesticação e seleção empírica, foi possível desenvolver cultivares da quase totalidade das espécies hoje cultivadas. Após a redescoberta das leis mendelianas em 1900, e o subsequente desenvolvimento da Genética, o melhoramento das plantas passou a ser cada vez mais eficiente, graças a uma série de tecnologias desenvolvidas ao longo do século XX. Devem ser mencionadas ainda, contribuições significativas dos avanços da Agronomia, destacando-se as áreas de nutrição e adubação das plantas, fitopatologia, entomologia, engenharia agrícola, plantio direto, entre outras. Há, entretanto, necessidade de contínuos progressos para se conseguir uma agricultura cada vez mais eficiente na produção de alimentos e fibras, elevando a produtividade por hectare, preservando o ambiente e conservando ou mesmo aumentando a fertilidade do solo para as gerações futuras, o que corresponde a uma agricultura sustentável.

O melhoramento genético tem sido um componente altamente significativo na contribuição para o progresso da agricultura. Inúmeras técnicas de manipulação genética estão hoje disponíveis, podendo ser classificadas, de forma abrangente, como convencionais e biotecnológicas. Não se pretende efetuar uma revisão das metodologias genéticas dessas técnicas, uma vez que isso está amplamente disponível na literatura especializada, além de fugir do escopo deste trabalho.

O objetivo deste é discutir a utilização das técnicas convencionais e biotecnológicas, em especial com relação às suas potencialidades, limitações, críticas relacionadas à biossegurança e perspectivas de aplicação nos programas de melhoramento das plantas.

Técnicas de manipulação genética

As técnicas de manipulação genética mais amplamente empregadas, visando ao melhoramento, têm-se baseado na reprodução sexual em suas várias modalidades,

o que tem sido considerado por certos críticos da biotecnologia como formas mais naturais e mais aceitáveis de manipulação genética. A Tabela 1 relaciona, de forma genérica, as técnicas disponíveis, em função do emprego ou não da reprodução sexual.

As técnicas mencionadas relativas à reprodução estão extremamente resumidas, pois envolvem uma grande gama de modificações, destacando-se a seleção massal e suas modificações, as várias formas de seleção recorrente e seleção recorrente recíproca, incluindo o emprego de progênies específicas como meios irmãos, irmãos germanos, progênies endogâmicas (S1, S2, etc.), além das combinações dos diferentes tipos de progênies. Uma revisão desse assunto, incluindo os diferentes tipos de milho híbrido, as diversas modalidades de obtenção de linhagens e suas avaliações, pode ser apreciada em Paterniani (1990), Hallauer e Miranda Filho (1995), Paterniani (2001) e Souza Jr. (2001). Genericamente, essas técnicas têm sido identificadas como convencionais, em contraposição às consideradas biotecnológicas, estas no sentido mais restrito.

Tabela 1. Técnicas disponíveis de manipulação genética em plantas

1. Com reprodução sexual

- Seleção – Intra e interpopulacional
- Hibridação – Intra e Interspecífica
- Heterose – Vigor de híbrido
- Retrocruzamento

2. Sem reprodução sexual

- Ploidia – Alterações no número de cromossomos
- Transgênese – Transferência de genes exógenos
- Mutagênese – Indução artificial de mutações
- Variação somaclonal – Reprodução de indivíduos a partir de células somáticas
- Hibridação somática – Fusão de protoplastos
- Cíbridos – Citoplasma e organelas da espécie A e núcleo da espécie B
- Transplastomia – Transferência de plastídeos exógenos

Dentre as técnicas que são independentes da reprodução sexual, a ploidia, iniciada por volta de 1920 e a mutagênese descoberta por Muller (1927) e Stadler (1930), são relativamente antigas em relação às demais. Nem todas essas técnicas têm sido empregadas com intensidade semelhante. Ploidia, mais utilizada no passado, é pouco empregada atualmente. A variação somaclonal, inicialmente considerada bastante promissora, tem hoje pouca aplicação devido ao reduzido sucesso obtido. A hibridação somática e os cíbridos, encontram-se ainda em estágios essencialmente experimentais. As técnicas mais empregadas, atualmente, são a mutagênese e a transgênese. De grande repercussão, os transgênicos crescem de importância a cada ano, ao mesmo tempo que enfrentam fortes oposições. Os

transplastômicos oferecem a possibilidade de transferência interespecífica de plastídeos, não afetando, assim, o genoma, o que pode reduzir pelo menos em parte as oposições aos transgênicos. Muito embora o termo Biotecnologia na acepção mais ampla possa ser empregado para designar todo e qualquer processo envolvendo tecnologias relativas aos seres vivos, tem sido mais usual empregar o termo na sua acepção mais restrita, indicando as técnicas laboratoriais de manipulação genética *in vitro*. A obtenção de plantas haplóides pode empregar reprodução com genes marcadores, bem como as técnicas de cultura de anteras, polinização e fertilização *in vitro* e hibridação somática podem empregar uma combinação de processos reprodutivos e não reprodutivos.

Existe uma vasta literatura sobre as técnicas biotecnológicas mencionadas, cuja revisão não é o propósito deste trabalho, podendo-se, no entanto, mencionar Larkin e Scowcroft (1983), Collins *et al.* (1984), Cocking (1984), Bedbrook (1984), Hiatt (1992), Lindsey (1998), Silva-Filho e Falco (2001), Gewolb (2002) e, com especial referência ao milho, Oliver *et al.* (1994).

Potencialidades, limitações e críticas

O contínuo desenvolvimento da Genética tem proporcionado uma série de técnicas de manipulação genômica, como pode ser apreciado pelo resumo contido na Tabela 1. Sendo o melhoramento de plantas uma ciência essencialmente aplicada, é natural que os melhoristas procurem experimentar, avaliar e utilizar efetivamente as técnicas disponíveis. Embora todas as alternativas indicadas devam ter, em graus variáveis, suas potencialidades de sucesso, na prática os resultados obtidos dependem, em primeiro lugar, do estágio de sua aplicação ao melhoramento (experimental ou avançado) e, em segundo lugar, da intensidade de utilização, que muitas vezes não explora a potencialidade máxima da técnica. Com uma tal diversidade de técnicas, muitas delas ainda em fase experimental, é fácil constatar por que a maioria ainda não foi suficientemente avaliada e adotada pelos programas de melhoramento. Face ao exposto, serão considerados, a seguir, o melhoramento convencional amplamente empregado, a mutagênese e a transgênese, que está em grande evidência.

Praticamente todo o melhoramento das plantas conseguido até o presente se deve ao melhoramento convencional, pela intensidade e extensão do seu emprego. Progressos substanciais têm sido obtidos em todo o mundo, sendo talvez o milho a espécie na qual o melhoramento genético atingiu o mais alto nível. No Brasil, Vencovsky e Ramalho (2000) relatam ganhos anuais obtidos por vários autores, em períodos diferentes, que vão de 31 a 123 kg/ha, com uma estimativa conservadora de um ganho contínuo de 60kg/ha/ano a partir de 1946. De especial significado é a constatação de que os atuais métodos convencionais não esgotaram as suas potencialidades, podendo-se prever subseqüentes progressos desde que sejam empregados com a intensidade requerida.

Os transgênicos, iniciados a partir da década de 70, foram, logo no início, bastante discutidos pelos geneticistas quanto à segurança. Dentre as várias conferências realizadas, destaca-se a de Asilomar que recomendou uma série de procedimentos de biossegurança a serem adotados para as pesquisas com DNA recombinante (Berg *et al.* 1975). Atualmente contam-se centenas de espécies com cultivares transgênicas, destacando-se pela magnitude do cultivo, a soja, o milho e o algodão. Mais de 20 países cultivam transgênicos, destacando-se os Estados Unidos, a Argentina e o Canadá como maiores produtores, e a China com significativo incremento anual de algodão transgênico (James 2000). Dentre os milhos transgênicos, os mais empregados têm sido vários eventos do tipo Bt (*Bacillus thuringiensis*), que conferem resistência a insetos, em especial da ordem lepidóptera, como a lagarta do cartucho *Spodoptera frugiperda*.

Embora a área com transgênicos esteja em constante crescimento em vários países, e apesar da sua aprovação por milhares de pesquisadores, em especial geneticistas, e da ausência de qualquer efeito prejudicial à saúde humana, animal e ao meio ambiente, decorrente dos milhões de pessoas consumidoras desses produtos desde 1996, persiste ainda uma forte oposição aos transgênicos. Está cada vez mais evidente que os transgênicos são tão ou mais seguros do que os correspondentes não transgênicos para a saúde humana e animal. A significativa redução do uso de agroquímicos associados aos transgênicos mais cultivados atualmente, resistentes a insetos, pragas e a herbicidas, contribui sobremaneira para maior proteção do meio ambiente. Transgênicos com características nutricionais superiores estão disponíveis, bem como para inúmeras outras qualidades. Milhares de documentos e depoimentos têm sido elaborados sobre essa controvérsia.

Com o surgimento dos transgênicos, uma nova ciência no século XX passou a ocupar papel de grande destaque: a Biossegurança, voltada para o controle e a minimização de riscos advindos da prática de diferentes tecnologias, sejam elas realizadas em laboratório ou quando aplicadas ao meio ambiente. Em consequência, vários países criaram comissões específicas de biossegurança, com a finalidade de estabelecer normas de experimentação, liberação no meio ambiente e eventualmente elaborar pareceres relativos à aprovação de organismos transgênicos para uso comercial.

Tais procedimentos constituem uma inovação na liberação de cultivares geneticamente melhoradas, uma vez que as milhares de novas cultivares continuamente desenvolvidas pelos melhoristas, sempre foram avaliadas primeiramente pelos próprios pesquisadores e, posteriormente, pelos órgãos competentes das áreas da agricultura, da saúde e do meio ambiente. Evidentemente, essa regulamentação constitui uma complicação adicional que retarda a utilização das novas cultivares transgênicas, representando um ônus para o país, sendo a sua existência de discutível necessidade e mesmo conveniência. Tecnicamente, parece não haver razão para essa discriminação específica, uma vez que outras manipulações genéticas até mais exógenas, como é o caso das mutações

artificialmente induzidas, estão isentas das avaliações das comissões de biossegurança. Os procedimentos utilizados pelos pesquisadores e órgãos competentes têm garantido a segurança das novas cultivares, inclusive as mais de 2000 cultivares atualmente cultivadas, resultantes de mutações artificialmente obtidas. Deve-se destacar que os Estados Unidos adotam para os transgênicos, os mesmos procedimentos empregados para a aprovação das novas cultivares obtidas pelos métodos convencionais, não havendo portanto necessidade de qualquer regulamentação específica para os transgênicos. Em função do uso a que se destina a nova variedade, a análise e eventual aprovação é efetuada pelos órgãos FDA (Administração de Alimentos e Medicamentos), USDA (Departamento de Agricultura) e EPA (Agência de Proteção Ambiental). A regulamentação imposta relativa aos transgênicos, além de ser discriminatória, pois não contempla as demais técnicas biotecnológicas, representa, ainda, uma certa falta de credibilidade para com os melhoristas e demais órgãos que, desde longa data, vêm prestando uma significativa folha de serviços em benefício da humanidade.

Melhoramento convencional e transgênese

Do ponto de vista do melhoramento genético, é importante salientar que os métodos convencionais e a transgênese, não são mutuamente excludentes: ao contrário, são complementares, e é neste contexto que devem ser considerados. Na verdade, todo o progresso genético para produtividade e demais atributos quantitativos, foi obtido pelos métodos convencionais. A transgênese apenas incorporou, nas variedades superiores, um ou poucos genes responsáveis por características específicas que conferem certas vantagens adicionais, como resistência a insetos pragas, herbicidas, entre outras. O emprego dos QTLs (quantitative trait loci) embora vislumbrado pela transgênese, continua uma expectativa indefinida. Sem dúvida, os transgênicos são importantes como elemento coadjuvante para aumentar a eficiência da produção agrícola, trazendo benefícios para a instituição detentora, para o agricultor e, a médio prazo, também para o consumidor, que deverá contar com produtos mais acessíveis e de melhor qualidade. Face ao exposto, vários programas de melhoramento têm dirigido consideráveis recursos para a obtenção dos transgênicos resultando em certa limitação nas atividades com métodos convencionais. Como os recursos para pesquisa sempre são limitados, é importante estabelecer um equilíbrio que contemple de forma adequada as tecnologias disponíveis e que melhor atenda as perspectivas de melhoramento genético.

A presente situação tem certa semelhança com a época do advento do milho híbrido, quando os programas passaram a atuar quase exclusivamente na obtenção de híbridos, paralisando o melhoramento populacional, que mais tarde foi retomado inclusive para garantir futuros progressos do milho híbrido. Percebe-se que a ênfase dada à biotecnologia parece ignorar o papel da seleção na manipulação genética. Atualmente, mesmo distinguidos geneticistas não mais consideram a seleção como fator

relevante no melhoramento genético. Isso é surpreendente, pois é a seleção o fator preponderante pela grande variabilidade dos seres vivos e pelo melhoramento obtido, além de que, a própria transgênese depende fortemente da seleção. Como se sabe, na transgênese os genes são inseridos nos cromossomos ao acaso, resultando em um certo número de eventos não previsíveis. A seguir, as células cujos marcadores indicam a presença do gene inserido, devem regenerar as plantas correspondentes a serem avaliadas e selecionadas para eventual escolha de um evento promissor. Uma vez obtido o evento desejável, o gene em questão pode ser transferido a outros genótipos pelo conhecido método convencional do retrocruzamento. Embora teoricamente, a transgênese pode ser considerada rápida; na prática, a obtenção do produto final leva vários anos. Adicionando o tempo requerido pelas comissões de biossegurança e, em casos específicos, a demora das análises na justiça, o tempo para que o produto possa ser efetivamente utilizado pela sociedade pode chegar a uma dezena ou mais de anos.

Conforme mencionado acima, inúmeros esquemas de melhoramento convencional, tanto para a obtenção de linhagens como para o melhoramento populacional, têm sido propostos ou utilizados com resultados consagrados e eficiência comprovada, destacando-se os esquemas de seleção recorrente e recorrente recíproca em suas várias modalidades (Paterniani, 1990; Hallauer e Miranda Filho, 1995; Paterniani (2001) e Souza Junior, 2001). Cabe salientar que tais esquemas não vêm sendo empregados com intensidade suficiente, indicando que o seu potencial ainda deve ser bastante elevado. Acrescente-se ainda que, com os registros de germoplasma, seus direitos e patentes, há cada vez menos intercâmbio desses materiais entre os geneticistas, o que restringe a variabilidade genética disponível. A seleção, promovendo maior recombinação gênica, fator primordial para aumento da variabilidade genética, compensa, em grande parte, as restrições de acesso a germoplasmas. Além disso, o estudo da seleção poderá esclarecer melhor o seu mecanismo genético, pois, como mostram Wang *et al.* (1999) e Paabo (1999), na domesticação do milho a partir do teosinte, a seleção atuou mais nas regiões reguladoras do que nas regiões codificadoras de proteínas, além da participação da recombinação gênica.

Face às considerações expostas, considera-se que, atualmente, ainda é oportuna e desejável a condução de programas de melhoramento de plantas empregando-se as técnicas convencionais já consagradas como eficientes e ainda não suficientemente exploradas.

Há de se considerar que as técnicas ditas biotecnológicas e as convencionais não são excludentes. As biotecnológicas, incorporando genes específicos nos genótipos superiores melhorados, já comprovaram a sua grande contribuição ao melhoramento, produzindo cultivares menos exigentes em insumos agroquímicos, além

de incorporar melhoramento qualitativo nutricional e outras características desejáveis.

As técnicas convencionais, de eficiência amplamente comprovada, de execução relativamente mais simples e menos custosas do que as biotecnológicas e de resultados mais contínuos, ao longo dos anos ou gerações, deverão continuar produzindo resultados altamente compensadores.

Mutagênese e Transgênese

Dentre as técnicas de manipulação genética sem reprodução sexual, a mutagênese e a transgênese são as mais empregadas no melhoramento das plantas. Sendo o objetivo de ambas as técnicas semelhante, isto é, a incorporação no genoma de uma cultivar, de gene ou genes não existentes na espécie, e havendo enorme questionamento sobre a segurança dos transgênicos, parece apropriada uma comparação entre as duas tecnologias, como a apresentada na tabela 2. Além das características indicadas, na transgênese, os genes envolvidos são molecularmente identificados, o que não ocorre com a mutagênese. Não se trata de duvidar da segurança das mutações artificialmente induzidas, mas parece bem evidente, que, tecnicamente, não há elementos para questionar a segurança dos transgênicos.

Tabela 2. Características comparativas entre a mutagênese e a transgênese

| Características | Mutagênese | Transgênese |
|--------------------------------|-----------------|------------------------------------|
| Objetivos | Novo gene | Novo gene |
| Início | Anos 30 | 1970 |
| Obtenção do novo gene | Aleatória | Determinada |
| Herança do novo gene | Mendeliana | Mendeliana |
| Legislação | Não | Sim |
| Avaliações | Agronômicas | Agronômicas, saúde e meio ambiente |
| Genes aprovados comercialmente | Mais de 2000 | Cerca de 10 |
| Genes experimentais | Mais de 200.000 | Cerca de 300 |
| Benefícios p/ agricultor | Sim | Sim |
| Benefícios p/ meio ambiente | Neutro | Sim |
| Danos à saúde ao meio | Não | Não |

Literatura Citada

- EVERY, D. T. Saving the planet with high-yield farming. Proceedings of 49th Annual Corn & Sorghum Industry Research Conference, 1994. p.1-12.
- BEDBROOK, J. R. Perspectives on genetic manipulation in plants. p.627 – 636. , 1984. In: T. Kossuge; C. P. Meredith; A. Hollaender (Eds.) Genetic Engineering in Plants. Plenum Press, N. Y., 1984.
- BERG, P. D.; BALTIMORE, S.; BRENNER, R. O.; ROBLIN, I.I.; SINGER, M. F. Asilomar conference on re-

- combinant DNA molecules. *Science*, v.188, p.991 – 994, 1975.
- BORLAUG, N. E. Human population, food demands and wildlife needs. *North American Wildlife and Natural Resource Conference*, 37, mimeo, 1972. 27 p.
- COCKING, E. C. Use of protoplasts: potentials and progress. p.415 – 425. In: J. P. Gustafson (Ed.) *Gene Manipulation in Plant Improvement*. Plenum Press, N. Y., 1984.
- COLLINS, G. B., TAYLOR, N.L.; DE VERNA, J. W. 1984. In vitro approaches to interspecific hybridization. p.323 – 383. In: J. P. Gustafson (Ed.) *Gene Manipulation in Plant Improvement*. Ed. Plenum Press, N. Y. 1984.
- GEWOLB, J. Plant scientists see big potential in tiny plastids. *Science*, v.295, p.258 – 259, 2002.
- HALLAUER, A. R.; MIRANDA FILHO, J.B. *Quantitative Genetics in Maize Breeding*. Ames: Iowa State University Press, 1995. 468 p.
- HIATT, A. (Ed.) *Transgenic Plants – Fundamentals and Applications*. Marcel Dekker, Inc. N. Y., 1992. 340 p.
- JAMES, C. *Global Review of Commercialized Transgenic Crops*, 2000. ISAAA AmeriCenter, Cornell University, Ithaca, NY, 15 p.
- LARKIN, P. J. E W. R. SCOWCROFT. 1983. Somaclonal variation and crop improvement. In: T. Kossuge; C. P. Meredith; A. Hollaender (Eds.) *Genetic Engineering in Plants*, Plenum Press, N. Y. 289 p.
- LINDSEY, K. (Ed.). *Transgenic Plant Research*. Harwood Academic Publishers. The Netherlands, 1998. 296 p.
- MULLER, H. J. Artificial transmutation of the gene. *Science* v. 66, p. 84 – 87, 1927.
- MALUSZYNSKY, M. Induced mutations – An integrated tool in genetics and plant breeding. p.127 – 162. In: J. P. Gustafson (Ed.) *Gene Manipulation in Plant Improvement II*. Plenum Press, N. Y, 1990.
- OLIVER, J. L.; MARIN, A.; MARTINEZ-ZAPATER, J. M.. Maize chloroplast gene transfer to nucleus. In: Y. P. S. Bajaj (Ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry 25 – Maize*. Springer – Verlag, N. Y., 1994, p.431 – 444.
- PAABO,S. Neolithic genetic engineering. *Nature*, v.398, p.194 – 195, 1999.
- PATERNIANI, E. Maize breeding in the tropics. In: *Critical Reviews in Plant Sciences*, v.9, p.124-154, 1990.
- PATERNIANI, M.E.A.G.Z. Use of heterosis in maize breeding: History, Methods and perspectives – a review. *Crop Breeding and applied Biotechnology*, v.1, n.2, p. 159-178, 2001.
- SILVA-FILHO, M. C.; FALCO, M.C. Plantas transgênicas no melhoramento. p.1011-1056. In: L. L. Nass; A.C.C. Valois; I. S. Melo; M. C. Valadares-Inglis (Eds.) *Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas*. Fundação Rondonópolis, MT, 2001.
- SOUZA JUNIOR., C. L. Melhoramento de espécies alógamas. p.159-199. In: L. L. Nass; A.C.C. Valois; I. S. Melo; M. C. Valadares-Inglis (Eds.) *Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas*. Fundação Rondonópolis, MT, 2001.
- STADLER, L. J. Some genetic effects of X-rays in plants. *Journal of Heredity* v.30, p.3-19, 1930.
- VENCOVSKY, R.; RAMALHO, M. A. P. 2000. Contribuição do melhoramento genético de plantas no Brasil. p.57-89. In: E. Paterniani (Ed.) *Agricultura Brasileira e Pesquisa Agropecuária*. Ed. EMBRAPA, Brasília, 2000.
- WANG, R.; STEC, A.; HEY J.; LUKENS, L.; DOEBLEY, J. The limits of selection during maize domestication. *Nature*, v.398, p.236 – 238, 1999.