

18

CAPÍTULO

PLANTAS TRANSGÊNICAS: FUNDAMENTOS, MÉTODOS DE PRODUÇÃO E APLICAÇÕES

Andrea Soares-Costa
Vanessa Karine Schneider
Darlan Gonçalves Nakayama
Ariel D. Arencibia
Flavio Henrique-Silva

18.1 INTRODUÇÃO

As plantas transgênicas são organismos geneticamente modificados, ou seja, passam por um processo de transferência de um ou mais genes de um organismo para o vegetal sem que ocorra fecundação. Esse processo é denominado transformação genética de plantas. Os vegetais transformados geneticamente são chamados de transgênicos. Essa tecnologia advém de uma área específica chamada biotecnologia vegetal.

O termo biotecnologia foi utilizado pela primeira vez, em 1919, pelo húngaro Karl Ereky, que o definiu como sendo a aplicação de técnicas biológicas em organismos vivos, para obtenção de um produto, processo ou serviço

para fins práticos ou industriais¹. Esta tecnologia pode englobar abordagens variadas, desde a utilização de micro-organismos fermentadores para a produção de alimentos e bebidas (pães, cerveja, vinho e outros) como é realizado há milhares de anos, até abordagens mais contemporâneas de manipulação genética que resultem, por exemplo, na produção de plantas transgênicas para produção de proteínas recombinantes de interesse farmacológico. Desta maneira, a Biotecnologia Vegetal é uma área que engloba procedimentos que permitem a manipulação de plantas para obtenção de novas características de interesse agrícola ou a sua utilização para obtenção de produtos ou a realização de determinadas funções.

Com a elucidação da estrutura do DNA por Watson e Crick em 1953², a biotecnologia passou a atuar no campo da genética molecular. Em 1969, a descoberta das endonucleases de restrição³, que são enzimas capazes de reconhecer uma pequena sequência de pares de bases no DNA e então clivar neste sítio de reconhecimento, tornou possível a manipulação do material genético. Em 1973, Stanley Cohen e Herbert Boyer, considerados os inventores da tecnologia do DNA recombinante, realizaram, pela primeira vez, a recombinação de moléculas de DNA de diferentes espécies *in vitro*⁴. Surgia então a engenharia genética, sendo que o primeiro produto derivado de um organismo transgênico chegaria ao mercado em 1982. Tratava-se da insulina, produzida por uma linhagem de *Escherichia coli* geneticamente modificada com um gene humano⁵.

A tecnologia do DNA recombinante permitiu aos cientistas identificar e inserir, no genoma de um determinado organismo, um ou mais genes responsáveis por características particulares ao invés de promover o cruzamento entre organismos relacionados, como ocorre no melhoramento clássico, onde o melhorista é obrigado a trabalhar com genomas inteiros. O melhoramento genético clássico é baseado em cruzamentos entre espécies sexualmente compatíveis, de modo a selecionar as características desejadas quando observadas na progênie, estando, entretanto, limitado às características já existentes. Antes do advento da engenharia genética, só era possível selecionar recombinações que ocorriam ao acaso entre os blocos gênicos dos cromossomos dos genitores. Este processo pode levar muito tempo até atingir os resultados esperados e, frequentemente, as características de interesse podem não estar presentes na próxima geração. A biotecnologia vegetal proporcionou uma redução no tempo para obtenção de novas variedades de plantas, além de permitir a transferência de características entre espécies que normalmente são sexualmente incompatíveis.

As primeiras plantas transgênicas foram obtidas em 1983 por quatro grupos de investigação distintos: o grupo do cientista M. D. Chilton da

Universidade de Washington que transformou células de uma variedade de tabaco, *Nicotiana plumbaginifolia*, utilizando um gene quimérico para conferir resistência ao antibiótico canamicina; o grupo de J. Schell da Universidade de Gent na Bélgica, que regenerou plantas de tabaco resistentes ao metrotexato e a canamicina; o grupo da Universidade de Wisconsin, liderados por J. Kemo e T.Hall que transformaram plantas de girassóis; e o grupo da empresa Monsanto que obtiveram plantas de petúnias transformadas com um gene quimérico que conferia resistência a canamicina⁶.

Do ponto de vista agrônomo, estas plantas possuíam um potencial limitado, porém o estudo demonstrou ser possível a transferência de genes de outros organismos para as plantas, transpondo as barreiras genéticas, e que estes genes eram funcionalmente estáveis quando integrados no genoma das células vegetais. Somente 11 anos mais tarde, em 1994, a primeira variedade de planta geneticamente modificada (PGM) seria liberada para cultivo e comercialização pela Food and Drug Administration (FDA), a autoridade de segurança alimentar dos Estados Unidos: o tomate *Flavr savr*®. Este apresentava no seu genoma a inserção do gene codificador da poligalacturonase (do próprio tomate) no sentido antissenso. Esta enzima está envolvida na degradação de elementos pécnicos da parede celular e conseqüentemente no processo de amadurecimento do fruto. A produção de um RNA anti-senso na planta transgênica resultou na redução da expressão desta enzima e o conseqüente atraso no processo de maturação⁷.

Atualmente, já existe uma grande variedade de plantas geneticamente modificadas e estas plantas têm como principais características uma maior tolerância a herbicidas e pesticidas, maior resistência a um determinado tipo de fator, seja ele biótico (insetos-praga, ervas daninhas, agentes patogênicos) ou abiótico (acúmulo de poluentes no solo, *stress* hídrico e salino), com o objetivo de reduzir o dano nas culturas e conseqüentemente aumentar o rendimento dos agricultores. Todavia, o potencial de transformação genética das plantas vai além do melhoramento das características de importância agrônoma, permitindo também sua utilização como biofábricas para a produção de compostos com aplicações na indústria farmacêutica ou até mesmos gêneros alimentícios com maior valor nutritivo ou que possuam período prolongado de comercialização⁶.

O número de plantas transgênicas autorizadas para cultivos em larga escala, seja pela sua importância agrícola ou industrial é muito reduzido quando comparado aos estudos com PGMs obtidas em condições laboratoriais. Isso se deve a inúmeros fatores, que incluem dificuldades técnicas em se obter as PGMs; elevados investimentos e altos riscos; a normalização sob

as severas leis de biossegurança em relação aos produtos transgênicos (que acabam por limitar a disponibilização das PGMs e de seus produtos derivados tanto no campo quanto para fins comerciais)⁶.

Apesar destas limitações, verificou-se um aumento consistente dos cultivos de plantas transgênicas pelo mundo desde que as primeiras PGMs foram autorizadas. Segundo os últimos dados fornecidos pela ISAAA, *International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications*, relativos a 2012, as principais plantas transgênicas cultivadas são a soja, o milho, o algodão e a canola, cujas principais características relacionam-se a sua tolerância a herbicidas e/ou resistência a insetos-praga⁸.

Em 2012, cerca de 170 milhões de hectares de PGMs foram cultivados mundialmente. O Brasil ocupa o segundo lugar em hectares de PGMs cultivados, com 36,6 milhões de hectares, o que equivale a 21% de toda área cultivada, estando atrás apenas dos EUA, com 61,2 milhões (36%)⁸. Nosso país já aprovou a primeira soja resistente a insetos-praga e tolerante a herbicidas para comercialização em 2013 e notadamente a Embrapa, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, obteve a aprovação perante a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) para comercializar um feijão geneticamente modificado resistente ao vírus da doença conhecida como mosaico dourado⁹. A expectativa da Embrapa é que o feijão transgênico chegue às mãos dos agricultores em 2014.

A transformação genética é a introdução controlada de ácidos nucleicos em um genoma receptor por um processo assexual¹⁰. O sucesso da produção de PGMs depende da introdução do DNA no genoma vegetal e da regeneração de plantas que expressam o gene inserido¹¹. Vários métodos para a transferência de genes em plantas têm sido propostos e atualmente protocolos podem ser encontrados na literatura científica para a transformação das plantas de maior importância agrônômica no mundo^{12,13}. O estabelecimento de uma estratégia eficiente para a transferência de genes é fundamental para o sucesso de todo o processo¹⁴.

18.2 MÉTODOS DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE PLANTAS

18.2.1 Método de transferência indireta via *Agrobacterium*

A transferência indireta de genes necessita de um vetor para intermediar o processo de transformação. O biólogo molecular Luis Herrera-Estrela e o

geneticista Robert B. Horsh foram os pioneiros a transformar com sucesso plantas de tabaco com *Agrobacterium*, demonstrando que esta bactéria poderia servir como um vetor natural para a transformação de vegetais, possibilitando a transferência de genes de interesse biotecnológico para as plantas transformadas¹².

Este processo foi desenvolvido com base na *Agrobacterium tumefaciens*, uma bactéria tipicamente de solo, gram-negativa, pertencente à família Rhizobiaceae, que infecta naturalmente células vegetais lesionadas (lesões causadas por práticas agrícolas, geadas ou atividade de organismos como insetos, mamíferos e nematoides). A bactéria transfere um fragmento de DNA que se integra no genoma das células hospedeiras¹⁵. Esse DNA é chamado de T-DNA, e contém genes envolvidos na produção de reguladores de crescimento vegetal e opinas. O DNA transferido é integrado no genoma das células vegetais hospedeiras e passa a ser expresso alterando o padrão normal de expressão, sendo responsável pela manifestação de uma doença denominada “*crown gall*” ou galha-da-coroa¹⁶. Esta doença caracteriza-se pela proliferação anômala de células na zona de contato entre o caule e a raiz, originando uma espécie de tumor vegetal (galha). Foi demonstrado que a formação das galhas induzidas por *Agrobacterium tumefaciens* estava diretamente associada à presença de um plasmídeo de alto peso molecular (120 kb a 250 kb), denominado plasmídeo *Ti* (do inglês *Tumor inducing*) (Figura 18.1).

Análises moleculares permitiram identificar duas regiões do plasmídeo *Ti* que estão diretamente envolvidas no processo de indução tumoral: a região-T, que corresponde ao segmento de DNA transferido para a célula vegetal durante o processo infeccioso, e a região de virulência (região *vir*), que contém operons co-regulados responsáveis pelo controle dos processos de separação da região-T do plasmídeo *Ti*, seu transporte e integração no genoma das células vegetais¹⁷.

A região-T encontra-se situada entre duas extremidades (esquerda e direita), que são curtas sequências repetitivas de 25 pares de bases, que quando integrada no genoma da célula vegetal, passa a ser chamada de T-DNA (do inglês “*transferred DNA*”). O T-DNA possui genes responsáveis pela síntese de opinas e de hormônios reguladores de crescimento (auxinas e citocininas). As opinas são compostos formados pela condensação de aminoácidos ou açúcares modificados que servem como fonte de nutrientes que são exclusivamente catabolizadas por sua linhagem indutora, conferindo assim uma vantagem seletiva a esta estirpe. A expressão destes genes interfere no padrão de expressão das células transformadas, resultando na sua

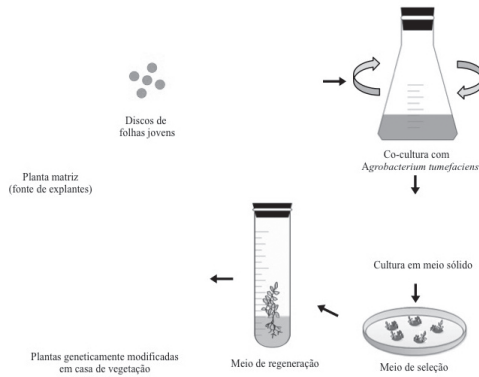


Figura 18.1 Esquema geral das etapas de transformação de plantas por co-cultura com uma linhagem de *Agrobacterium tumefaciens*.

multiplicação descontrolada, culminando na formação da galha, ou tumor, nos locais infectados do vegetal^{18,19}.

O primeiro passo no processo de infecção das plantas pela *Agrobacterium tumefaciens* é a liberação pelas células vegetais lesionadas de moléculas (essencialmente compostos fenólicos, aminoácidos e monossacarídeos) que atraem quimiotaticamente as bactérias para o local da lesão¹⁸. A ligação entre bactérias e tecido danificado é estabilizada pela formação de filamentos de celulose pelas bactérias propiciando uma melhor fixação das células hospedeiras. Esta ligação é fundamental para o início do processo de infecção, visto que, sem este contato a transferência do T-DNA seria inviável.

Estando a ligação inicial estabilizada, as moléculas-sinal exsudadas em resposta ao ferimento no vegetal também irão ativar a expressão dos genes de virulência que estão localizados na região *vir* do plasmídeo *Ti*. Esta região possui um conjunto de operons co-regulados pelas mesmas proteínas onde as unidades transcricionais denominadas *vir A*, *vir B*, *vir C*, *vir D*, *vir E* e *vir G* estão localizadas adjacente a extremidade esquerda do T-DNA²⁰. Estes genes codificam enzimas que são responsáveis pelo processamento, excisão, transferência e proteção do T-DNA contra nucleases da célula vegetal. Primeiramente uma molécula de T-DNA cadeia única é excisada do plasmídeo *Ti* para ser incorporada nas células vegetais. Esta molécula de T-DNA é envolvida por proteínas sintetizadas pelo complexo policistrônico *vir*, cuja função é proteger o T-DNA contra a ação de nucleases durante o processo de transporte até o núcleo da célula vegetal. Até sua inserção no DNA das

células das plantas, o T-DNA atravessa uma série de barreiras físicas (membranas interna e externa da bactéria a parede celular, membrana celular e nuclear das células vegetais). Varias proteínas sintetizadas pela região *vir* estão associadas à formação de um canal de transferência associado a um sistema de conjugação (formação de um *pillus* de conjugação) que possibilita que o transporte do T-DNA ocorra²¹. Muitas destas proteínas sintetizadas pela região *vir* possuem função estrutural enquanto outras parecem ser importantes nos processos de interação e reconhecimento de receptores nas células vegetais⁶. O processo de integração do T-DNA no genoma das células vegetais é controlado por uma diversidade de fatores. Alguns aspectos do processo de infecção já foram compreendidos, porém ainda existem diversas lacunas a se preencher para a sua completa elucidação.

A preparação de uma linhagem de *Agrobacterium tumefaciens* para ser utilizada como vetor de transformação de plantas exige primeiramente que ela esteja “desarmada”, isto é, sem a presença dos oncogenes presentes no T-DNA original. A deleção dos oncogenes se dá por meio de um processo de dupla recombinação em que um vetor contendo regiões de homologia como T-DNA é introduzido na agrobactéria. Este vetor se integra ao plasmídeo *Ti*, causando uma deleção. Os plasmídeos desarmados recombinantes são selecionados por apresentarem uma marca de resistência enquanto a região deletada, contendo os oncogenes, não se mantém na bactéria por não apresentar uma origem de replicação²². Numa segunda etapa, no local dos genes retirados serão inseridos os genes de interesse e/ou marcadores de seleção, que serão integrados no genoma da planta tida como hospedeira^{23,24,25}. Devido ao seu tamanho (120 kb a 250 kb), o plasmídeo *Ti* não pode ser manipulado diretamente, exigindo a utilização de vetores menores, mais fáceis de se manipular. Estes vetores possuem as extremidades do T-DNA entre as quais os genes de interesse serão clonados e podem ser de dois tipos: binários ou co-integrados. Vetores binários são aqueles capazes de se replicarem tanto em *Escherichia coli* quanto em *Agrobacterium*, e se mantêm de forma independente do plasmídeo *Ti*^{26,27}. Os vetores co-integrados são originados a partir de vetores intermediários, que apresentam uma origem de replicação do tipo ColE1, que se replicam em *E. coli* mas não em *Agrobacterium*. Ocorre uma recombinação homóloga entre o vetor intermediário e o T-DNA da linhagem desarmada por apresentarem regiões de homologia, gerando um vetor cointegrado²³. Em uma última etapa, o vetor, binário ou co-integrado, deve ser transferido para a linhagem desarmada de *Agrobacterium* o que pode ser feito por métodos de transformação via conjugação triparental, eletroporação ou choque térmico.

Protocolo de transformação genética via *Agrobacterium*

Um dos protocolos mais utilizados na transformação genética de plantas envolve a co-cultura de explantes com potencial regenerativo com cepas de *Agrobacterium* possuidoras do vetor de transformação, o qual possui o gene de interesse e/ou marcadores de seleção (Figura 18.2). Neste protocolo é necessário que a cultura de agrobactérias que possui o vetor em questão fique em contato com explantes com potencial regenerativo (como segmentos de folhas jovens, embriões zigóticos, entrenós, etc) em um meio de cultura sem qualquer agente seletivo para que as bactérias possam se manter e iniciar o processo de transferência e integração do T-DNA no genoma vegetal²⁸.

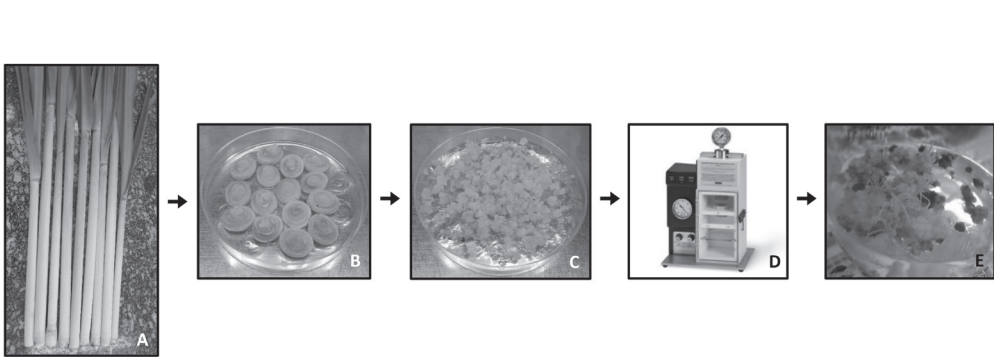


Figura 18.2 Etapas de transformação de cana-de-açúcar via biolística. (A) Extremidades de plantas de cana-de-açúcar que darão origem aos explantes. (B) Discos de folhas jovens de cana-de-açúcar. (C) Calos embriogênicos de cana-de-açúcar produzidos por meio de sub-cultivos dos discos foliares em meio contendo reguladores de crescimento. (D) Bombardeamento de partículas contendo DNA adsorvido utilizando o equipamento – Biolistic® PDS-100/He Bio Rad. (E) Regeneração de calos embriogênicos transformados.

A transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* tem sido frequentemente aplicada por não requerer uso de calos embriogênicos ou de um sistema complexo de regeneração a partir de protoplastos²⁹. Todavia, verificou-se que o uso de calos embriogênicos obtidos a partir de explantes com potencial regenerativo, têm se mostrado muito mais eficientes para a transformação de espécies que dificilmente seriam suscetíveis a esta técnica como cana-de-açúcar, soja, cassavas, entre outras.

A seguir o tecido ou calos são cultivados em meio de regeneração contendo antibiótico para eliminação das agrobactérias e um agente seletivo para plantas, geralmente genes que conferem resistência a antibióticos ou herbicidas. Finalmente é necessário que as células transformadas sejam induzidas a formarem plantas. Dessa maneira, o meio de cultura deve conter combinações hormonais adequadas para a regeneração e indução de organogênese ou de embriogênese somática. As plantas transformadas são regeneradas *in vitro* e logo em seguida aclimatadas em casa de vegetação²⁸.

Apesar desta técnica ser muito eficiente para transformar plantas dicotiledôneas como tomate, batata, tabaco, cenoura, *Arabidospis thaliana*, ela é limitada para monocotiledôneas. As plantas monocotiledôneas não são consideradas hospedeiras naturais para a infecção com *Agrobacterium tumefaciens*³⁰. No entanto, nos últimos anos foram desenvolvidos protocolos eficazes de transformação de monocotiledôneas utilizando agrobactérias. Embriões zigóticos imaturos de arroz³¹ e milho^{32,33} foram transformados eficientemente, tecidos transgênicos de trigo foram produzidos a partir do cocultivo de embriões com *Agrobacterium tumefaciens*³⁴ e, calos embriogênicos de cana-de-açúcar também foram obtidos a partir da técnica de cocultivo³⁵, dentre outros.

18.2.2 Método de transferência via biolística

O método de transformação genética via biolística (balística biológica – biobalística) foi descrito por Sanford em 1987. É conhecido por método de microprojéteis, aceleração de partículas ou biolística e consiste na aceleração de partículas carregadas com DNA, RNA ou proteínas a uma velocidade que permita a passagem das mesmas através da parede celular e membranas, de modo não letal³⁶. As partículas alojam-se aleatoriamente no interior da célula e, então, o DNA é dissociado e integrado ao genoma do receptor³⁷.

A biolística é um método de transformação simples e rápido, que permite a transferência de genes para numerosas células e tecidos, sendo necessário apenas um único aparelho para todos os bombardeamentos³⁸. Além de células vegetais, a biolística também pode ser utilizada para a introdução de genes em fungos, bactérias, protozoários, algas, insetos e em tecidos de animais³⁷.

Nos primeiros experimentos realizados, foram testados diferentes dispositivos de aceleração: descarga de gás, impulso mecânico, macroprojétil e placa parada, sistema de aceleração centrípeta e também campos eléctricos. Todos estes mecanismos de aceleração foram eficazes para a aceleração

de microprojéteis a velocidades suficientes para permitir a penetração das partículas nas células³⁶. Porém, o método foi melhorado e, atualmente o procedimento utiliza a pressão do gás hélio para acelerar as micropartículas revestidas com DNA a diferentes velocidades para transformar de modo eficiente diferentes tipos de células. O bombardeador consiste basicamente em uma câmara de bombardeamento, uma tubulação conectora à fonte de vácuo, regulador de hélio, válvula solenoide e tubos conectivos. A pressão do gás é liberada pela ruptura de um disco (disco de ruptura), e, então, um macrocarreador, contendo um disco com as partículas e DNA precipitados, é impulsionado a uma curta distância até uma tela de parada, de onde as micropartículas passam e atingem as células. Durante a operação, é formado vácuo, para reduzir o atrito das partículas com o ar, evitando desvios e redução de velocidade⁴⁰.

Os parâmetros de pressão do gás hélio, vácuo, distância do disco de ruptura e o macrocarreador, distância do disco microcarreador até a tela de bloqueio e também a distância entre a tela de bloqueio e as células alvo podem ser ajustados, para transformar eficientemente diferentes tipos de células⁴⁰.

As micropartículas utilizadas são geralmente de ouro ou tungstênio. As partículas de ouro são consideradas biologicamente inertes, mas seu custo é elevado, enquanto partículas de tungstênio são tóxicas para alguns tipos de células, embora o custo seja reduzido⁴¹. O diâmetro das micropartículas varia de acordo com a célula alvo, estando entre 0,2 a 4 μm ³⁷.

Protocolo de transformação genética de plantas por biolística

Com o objetivo de servir como guia geral, esta seção descreve brevemente um protocolo para a transformação genética de calos embriogênicos de cana-de açúcar via biolística, visando obter plantas transgênicas⁴¹.

Os passos para a obtenção de uma planta transgênica são: (1) isolamento e clonagem de um gene de interesse; (2) transferência do gene de interesse para a célula vegetal; (3) regeneração das plantas transformadas; (4) análise e expressão do gene introduzido nas plantas regeneradas.

- **Passo 1:** Isolamento e clonagem de um gene de interesse. A fase aberta de leitura que codifica uma proteína de interesse é obtida por meio de amplificação por PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para o gene. O produto de amplificação é então clonado em um vetor para expressão em plantas.

- **Passo 2:** Transferência do gene de interesse para a célula vegetal. O plasmídeo para expressão em plantas contendo o gene de interesse será introduzido nas células vegetais. As células vegetais que serão utilizadas no bombardeamento são geralmente oriundas de plântulas crescidas em casa de vegetação. Posteriormente, são realizados cortes transversais de 3 mm no cartucho de folhas jovens (palmito) situado 10 cm acima do meristema apical e estes cultivados em meio de cultura Cl-3 (meio Murashige e Skoog suplementado com 5% de água de coco, 6-Benziladenina (BAP), 35ml/L de antibiótico gentamicina e 8g/L de ágar para solidificação), acrescido de hormônio indutor de calogênese e antibiótico para evitar eventuais contaminações. Estes explantes são mantidos em placas de Petri em sala de crescimento, no escuro, a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por trinta dias, quando a primeira repicagem é realizada. Os calos são repicados a cada três semanas. Entre os calos que se desenvolvem, serão selecionados os que apresentam potencial embriogênico para o bombardeamento das micropartículas com o DNA recombinante. Para o bombardeamento, as micropartículas de tungstênio são preparadas com a precipitação do vetor contendo o gene de interesse utilizando CaCl_2 e espermidina associados com as partículas.

Para o bombardeamento, utilizou-se partículas de tungstênio (1,2 μm de diâmetro) envolvidas com o DNA transformante de acordo com o método descrito por³⁶. Cerca de 5 μg do DNA plasmidial (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) são co-precipitados junto a partículas de tungstênio acrescidas de espermidina (0,1M) e cloreto de cálcio (2,5M)⁴². Essa mistura é centrifugada e o pellet lavado duas vezes com etanol 95% e ressuspenso em etanol 100%. Dois microlitros da suspensão obtida serão utilizados no bombardeamento de uma placa de Petri contendo os calos embriogênicos posicionados no centro da mesma. Utilizou-se a pressão recomendada pelo fabricante do equipamento, neste caso, 784.5 kPa, para um equipamento PDS-1000/He, da BioRad).

- **Passo 3:** Regeneração das plantas transformadas. Após o bombardeamento das células vegetais, os calos embriogênicos transformados devem ser transferidos para uma placa de Petri contendo meio de cultura MS e mantidos em sala de crescimento. Após 10 dias os calos serão transferidos para um novo meio de cultura Cl-3 contendo o antibiótico para seleção das células transformadas com o plasmídeo. Estes calos serão mantidos em sala de crescimento a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 12 horas para a regeneração dos transformantes durante um período de três meses até serem obtidas as primeiras plantas com raízes.

- **Passo 4:** Análise da integração e expressão do gene de interesse. Pequenos fragmentos de folhas deverão ser coletados para extração de DNA, RNA e proteínas, a fim de se realizar a análise de integração e expressão do gene de interesse no genoma das plantas. Estas análises podem ser realizadas via PCR, *Southern blotting* e *Western blotting*.

18.2.3 Método de transferência via eletroporação de protoplastos

O método de transformação genética de protoplastos vegetais via eletroporação foi desenvolvido por Fromm e colaboradores em 1995. Ele se baseia na transferência de genes para as células por meio de um pulso elétrico curto de alta voltagem é aplicado a uma solução que contém DNA e protoplastos (células cuja parede celular foi removida). Devido ao pulso elétrico de alta voltagem, há indução da formação de poros na membrana da célula, o que permite a passagem do DNA para o seu interior⁴³. O pulso elétrico não deve ser muito intenso, pois a formação de poros acaba sendo irreversível, o que impede a regeneração das células⁴⁴.

No trabalho desenvolvido por Fromm, foram utilizados protoplastos de cenoura, pois são facilmente isolados e obtidos em grande quantidade. O gene utilizado codifica a enzima cloranfenicolacetiltransferase (CAT). A eficiência de transferência do gene foi diretamente influenciada pela concentração de DNA, amplitude e duração do pulso elétrico e composição do tampão de eletroporação. A técnica foi eficiente para transformar tabaco e milho, mostrando que pode ser utilizada tanto para mono quanto para dicotiledôneas⁴³.

18.3 GENES MARCADORES

A transformação genética vegetal implica não apenas na transferência de um gene específico para a planta, mas também na transferência de outros elementos que estão relacionados desde a eficácia do processo de expressão recombinante deste gene a identificação e/ou seleção das plantas transformadas. São denominados genes marcadores aqueles responsáveis pela síntese de fatores que permitam a identificação ou seleção das células transformadas. Os genes marcadores podem ser de dois tipos: genes repórteres ou genes de seleção^{6,10}.

Genes repórteres codificam proteínas cuja presença ou atividade enzimática são facilmente detectáveis e mensuráveis denotando a condição transgênica das células, tecidos ou organismos transformados. Existem diversos tipos de genes repórteres. Nas plantas os mais utilizados são o gene *uidA* ou *GUS*, isolado de *Escherichia coli* e que codifica a enzima β -glucuronidase, o gene da proteína GFP (do inglês *Green Fluorescent Protein*) e com uma frequência menor, genes envolvidos na síntese de antocianinas, genes envolvidos na síntese de opinas e genes das luciferases, que catalisam reações que liberam luz (genes *lux* e *luc*).

A grande aceitação do gene *uidA* ou *GUS* como gene marcador em plantas decorre da simplicidade e versatilidade do método para detecção de sua atividade enzimática e do fato das plantas não apresentarem atividade endógena significativa⁴⁵. O produto da enzima β -glucuronidase pode ser detectado por meio de ensaios histoquímicos e fluorimétricos⁴⁶. O ensaio histoquímico é um método qualitativo, onde primeiramente os explantes transformados são imersos no substrato chamado X-Gluc (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-glucoronídeo), onde na presença da enzima β -glucuronidase forma um precipitado de coloração azulada, permitindo a localização visual do local da expressão do gene⁴⁷. Uma das limitações da técnica reside no fato dos ensaios histoquímicos e fluorimétricos serem destrutivos, não possibilitando a recuperação do material *in vivo*⁴⁸.

A GFP é uma proteína constituída de 238 aminoácidos produzida pelos cnidários *Aequorea victoria* e *Renilla reniformis* que, quando submetida a radiação ultra-violeta emite uma fluorescência no campo visual correspondente a coloração verde⁴⁹. Recentemente, a utilização do gene da GFP como gene repórter tornou-se o método mais eficiente para avaliar a expressão de genes em ensaios de transformação gênica. Nos ensaios de detecção, a fluorescência pode ser mensurada sem que seja necessário adicionar qualquer substrato, sendo necessário apenas um comprimento de onda adequado e oxigênio. A GFP pode ser ligada a proteínas de interesse, formando proteínas de fusão⁴⁹ sem que seja alterada suas propriedades fluorescentes ou a função biológica da proteína em questão⁵⁰. Como sua atividade pode ser monitorada *in vivo*, estas proteínas fluorescentes são comumente utilizadas para determinar a localização e dinâmica de proteínas, assim como para avaliar a capacidade de expressão de diferentes promotores. Devido a sua aplicabilidade esta proteína tem sido alvo de muitos estudos que visam a obtenção de GFPs modificadas no que diz respeito aos seus picos de excitação, luminosidade e níveis de expressão⁵¹.

A utilização de genes de seleção associados ao gene de interesse a ser incorporado nas células vegetais tornou-se imprescindível já que eles

possibilitam a seleção das células que de fato incorporaram o gene preterido. O princípio do uso dos genes de seleção é baseado na capacidade destes conferirem uma característica adequada a um processo de seleção artificial. Estes marcadores na maioria das vezes são genes que conferem resistência a antibióticos ou herbicidas, permitindo a sobrevivência somente das células vegetais que possuem esta marca de resistência e eliminando as células sensíveis. O processo de seleção dos transformantes pode ser realizado por meio da inclusão de antibióticos ou herbicidas no meio de cultura ou via pulverização das plantas que foram transformadas.

Entre os genes que conferem resistência a antibióticos mais usados em vetores de transformação de células vegetais destacam-se o da neomicina fosfotransferase II (*nptII*) e o gene da higromicina fosfotransferase (*hpt*). O gene *nptII* confere resistência à neomicina e seus análogos estruturais, como a canamicina, gentamicina (418) e paramomicina¹². O gene *hpt* confere resistência ao antibiótico higromicina B. Este antibiótico é mais tóxico do que a canamicina podendo ser utilizado em concentrações menores⁵².

Dentre os genes que conferem resistência a herbicidas destacam-se o gene da fosfinotricina-acetiltransferase (*ppt*, *pat* ou *bar*) e o gene da 5-enol-piruvil-shiquimato-3-fosfato-sintase (*aroA* ou *epsps*). O gene *ppt*, *bar* ou *pat*, isolados de *Streptomyces hygroscopicus*, codifica a enzima fosfinotricina-acetiltransferase (PAT) que acetila o grupo amino livre do herbicida fosfinotricina (PPT) impedindo sua ligação com a enzima glutamina-sintase. O herbicida PPT ao inibir a enzima glutamina-sintase, ocasiona um acúmulo de amônia nos tecidos vegetais que é extremamente tóxicos para estas células⁵³. O gene *aroA* ou *epsps*, inicialmente isolado de *Petuniahybrida* e *Arabidopsis thaliana*, codifica uma forma da enzima 5-enol-piruvil-shiquimato-3-fosfato-sintase (EPSPS) não inibida por glifosato, base dos herbicidas como o *Round-Up*, produzido pela Monsanto. A inibição da EPSPS resulta no acúmulo de shiquimato, que interrompe a síntese de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano) e metabolitos secundários, ocasionando a morte das células vegetais⁵⁴.

18.4 PESQUISAS RELACIONADAS A APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS DE PLANTAS TRANSGÊNICAS

As proteínas recombinantes de interesse biotecnológico são produzidas geralmente em micro-organismos e em células de mamíferos. Cada um destes sistemas oferece vantagens e desvantagens. Micro-organismos podem não

ser muito eficientes para produzir proteínas eucarióticas, ao passo que células de mamíferos possuem capacidade limitada e também um alto custo. A produção de proteínas em plantas oferece a vantagem da produção em larga escala e também permite que medicamentos, por exemplo, sejam produzidos no próprio local onde a demanda é requerida. Por isso, a produção dos mais diversos compostos e proteínas de interesse medicinal em plantas transgênicas tem se tornado uma solução atrativa. Embora o custo de desenvolvimento e crescimento de plantas transgênicas não seja tão reduzido em relação aos micro-organismos, as plantas são capazes de enovelar e montar proteínas complexas e realizar modificações pós-traducionais de modo semelhante aos mamíferos. Além disso, não apresentam endotoxinas encontradas em bactérias e não são hospedeiras de patógenos humanos, como ocorre em células de mamíferos⁵⁵. Baseado nestas premissas, o desenvolvimento de plantas transgênicas visando à produção de proteínas de interesse médico vem sendo alvo de muitas pesquisas.

A primeira proteína terapêutica humana a ser produzida em plantas foi o hormônio de crescimento humano em calos celulares de girassol e tabaco⁵⁶. Posteriormente, a albumina, tradicionalmente isolada a partir de sangue, foi produzida em tabaco e batata transgênicos⁵⁷. Desde então, uma série de proteínas de interesse medicinal tem sido produzida em plantas, sendo que em 2004, o primeiro produto recombinante produzido em plantas foi comercializado pela ProdiGene – EUA. A empresa isolou uma sequência do gene da tripsina bovina e a inseriu em plantas de milho passando, então, a produzir a tripsina em larga escala, sendo comercialmente chamada de *TrypZean*®. A tripsina é utilizada na digestão e processando proteínas, na separação de células em cultura e também como parte de formulações de detergentes e meios de cultura para bactérias. A ausência de patógenos humanos consiste na principal vantagem em se utilizar a tripsina proveniente de vegetais⁵⁸. Na próxima seção, descreveremos alguns exemplos de pesquisas realizadas em relação à produção de proteínas e compostos de interesse medicinal e industrial.

18.4.1 Produção recombinante de antígenos para vacinas em plantas

Dentre as principais aplicações de plantas transgênicas para a área da saúde, pode-se citar a produção de vacinas. Inúmeras pesquisas vêm sendo desenvolvidas, tanto no enfoque da produção e purificação de antígenos

produzidos a partir de plantas quanto da administração direta de alimentos transgênicos, sem a necessidade de purificação e processamento.

Uma vacina é baseada em um antígeno que induz o organismo receptor a aumentara produzir anticorpos específicos contra uma determinada doença. Ao se produzir uma vacina em plantas, exclui-se o risco, por exemplo, de vacinas formuladas a partir da atividade patogênica atenuada ou inativada de vírus, pois para a produção recombinante do antígeno, utiliza-se somente uma porção do organismo que se acredita ser capaz de induzir a produção de anticorpos. Além disso, em relação aos métodos tradicionais de produção de antígenos em bactérias, leveduras e células de mamíferos, as plantas apresentam a vantagem da produção em larga escala, reduzido custo de produção e possibilidade de administração oral de alimentos contendo a concentração suficiente de antígenos⁵⁹.

Zheng-jun Guan e colaboradores (2010) apresentaram uma revisão de pesquisas relacionadas à produção de um antígeno em plantas transgênicas para o posterior desenvolvimento de vacinas contra a Hepatite B. Trata-se da produção de um antígeno de superfície (HBsAg) do vírus HBV, causador da hepatite B. HBsAg desempenha papel crucial na montagem e liberação do vírus completo, de forma que é utilizado na detecção da infecção e é o principal componente de vacinas preventivas. A vacina recombinante contra HBV existente é principalmente expressa em leveduras, porém o custo final é elevado e não pode ser utilizada para vacinação em larga escala. O gene que codifica o antígeno de superfície foi eficientemente integrado e expresso em tabaco, batata, tomate, banana, soja, cenoura, alface, maçã, dentre outras plantas, porém, a quantidade do antígeno HBsAg produzida é insuficiente para que ocorra imunização⁶⁰.

Um grande número de trabalhos publicados relata a produção recombinante em plantas da subunidade B da toxina da cólera. Esta toxina é produzida pela bactéria *Vibrio cholerae*, causadora da cólera, que se caracteriza por sintomas de diarreia aguda. A subunidade B da toxina não é tóxica e tem como função ligar a toxina a receptores da mucosa, sendo uma das primeiras moléculas selecionadas para a produção de vacinas contra esta doença. Foi possível verificar a expressão do gene recombinante em plantas transformadas de tabaco (*Nicotianatabacum*), tomate (*Solanumlycopersicum*) e arroz (*Oryza sativa*). De forma semelhante, há relato de produção recombinante da subunidade B de uma enterotoxina termolábel (LT) da bactéria *Escherichia coli* (ETEC), que também provoca diarreia aguda. A LT-B desempenha papel crucial na ligação da toxina aos gangliosídeos das células epiteliais. Os estudos foram realizadas inserindo o gene codificador da

LTB fusionado com outras proteínas no genoma de tabaco, batata, milho, tomate, *Arabidopsisthaliana*, soja e cenoura⁶¹. Ambas as linhas de pesquisas apresentaram resultados preliminares satisfatórios em testes de imunização em camundongos, demonstrando que, futuramente, com maior esforço em pesquisas, vacinas comerciais contra a diarreia podem ser desenvolvidas.

Segundo Tiwari e colaboradores (2009), para que a produção de um antígeno seja eficiente, deve-se observar uma série de características em relação à planta e ao tecido onde a expressão do gene heterólogo será induzida: i) o método de transformação deve ser adaptado e deve ser eficiente para a planta que se deseja trabalhar; ii) caso o antígeno seja termosensível, a planta/órgão deve ser consumida sem passar por cozimento; iii) a região da planta a ser utilizada deve ser rica em proteínas, pois a relação de concentração da proteína de interesse em relação à quantidade de proteína total será baixa, e não deve produzir moléculas tóxicas; v) a planta deve ser capaz de realizar todas as modificações pós-traducionais e o correto enovelamento das proteínas⁶¹.

18.4.2 Produção recombinante de antioxidantes em plantas

Adam Matkowski (2008) relatou a produção de antioxidantes de valor medicinal em plantas transgênicas transformadas com a bactéria *Agrobacterium rhizogenes*. A bactéria induz a proliferação de raízes secundárias, chamadas de raízes em cabeleira, o que aumenta a produção de metabólitos secundários. Muitas espécies da família Lamiaceae foram transformadas para uma maior produção de antioxidantes polifenólicos, como o ácido rosmarínico. Além disso, raízes transformadas de *Saussurea involucrata* superexpressando um gene heterólogo de uma chalconaisomerase, de uma espécie próxima, apresentaram aumento da produção da flavona apigenina. Raízes transformadas de *Fagopyrum esculentum* e de *Beta vulgaris* apresentaram uma maior concentração de rutina e betalaína, respectivamente⁶².

18.4.3 Enriquecimento de alimentos

Outra abordagem em relação à produção recombinante de produtos de valor medicinal em plantas baseia-se no enriquecimento de alimentos, ou seja, a inserção de genes que acentuam a produção de compostos benéficos à saúde humana.

Os seres humanos são capazes de sintetizar vitamina A a partir do β -caroteno ingerido e, por isso, uma quantidade suficiente de β -caroteno na alimentação ajuda a prevenir as doenças causadas por deficiência de vitamina A, principalmente a cegueira, que neste caso é chamada de cegueira noturna. Porém, em muitos países onde a população não possui acesso a uma alimentação em quantidade suficiente e rica em nutrientes, a incidência de cegueira causada pela falta de vitamina A é alta, principalmente em crianças (Xudong Ye, 2000). Para tentar resolver o problema, pesquisadores introduziram, em arroz, genes que codificam enzimas envolvidas na biossíntese de β -caroteno: fitoenosintase (gene *psy*) e licopeno β -ciclase (gene *lcy*) de *Narcissus pseudonarcissuse*, fitoenodessaturase (gene *crtl*) proveniente da bactéria *Erwinia uredovora* e o gene *aphIV* que confere resistência a higromicina. A expressão foi direcionada para o endosperma, ou seja, a expressão ocorre nas sementes. Este arroz foi chamado de arroz dourado, devido à presença de carotenoides que conferem coloração amarelo-laranja^{63,64}. Alguns anos depois, surgiu a segunda geração do arroz dourado, no qual o gene *psy* de *Narcissus pseudonarcissuse* foi substituído pelo gene correspondente de milho. Desta forma, o arroz dourado de segunda geração passou a apresentar 23 vezes mais carotenoides do que o arroz anterior. Em relação à quantidade de β -caroteno que deveria ser ingerida por uma criança 1 a 3 anos, 1,72 g do arroz dourado de segunda geração, contendo 25 microgramas de carotenoides por grama de arroz seco, seria suficiente para suprir o equivalente a 50% da necessidade diária⁶⁴.

Pesquisas que utilizam estratégias de transgenia para aumentar o nível de β -caroteno em milho também estão sendo desenvolvidas. Cientistas introduziram os genes bacterianos CRTB (codifica a fitoenosintase) e CRTI (catalisa quatro passos da via de dessaturação de carotenoides), utilizando um promotor específico para expressão no endosperma. Como resultado, o teor de carotenoides totais aumentou para 33,6 mg/g de peso seco. Além disso, uma abordagem de transformação genética combinada foi utilizada não somente para aumentar o nível de β -caroteno, mas também no sentido de produzir outros carotenoides importantes como luteína, zeaxantina, astaxantina e licopeno, que também são conhecidos por apresentarem benefícios nutricionais e medicinais⁶⁵.

A ferritina é uma proteína que pode armazenar até 4.500 átomos de Fe^{3+} em sua cavidade interior. Esta proteína serve como armazenador primário do ferro em animais, mas pode desempenhar papel na prevenção de danos oxidativos causados por excesso de ferro em plantas. A superexpressão do gene codificador da ferritina de soja ou feijão em sementes de arroz resultou em um aumento de duas a três vezes na concentração de ferro em relação às plantas não transformadas. Também em arroz, aumento de seis vezes

na concentração de ferro foi obtida com a superexpressão não só do gene codificador da ferritina no endosperma, mas também do gene codificador da nicotianamina sintase de forma constitutiva. Esta enzima desempenha função importante no transporte de ferro até os grãos através do floema⁶⁵.

O nível de folato também foi acentuado por meio de engenharia genética em plantas transgênicas de tomate, arroz e milho, sendo que nesta última, a concentração de folato mais do que duplicou em relação às plantas não transformadas. O folato possui extrema importância durante o desenvolvimento neural de fetos humanos, sendo que sua deficiência acentua a incidência de defeitos no tubo neural⁶⁵.

O aumento da concentração de vitaminas também tem sido alvo de diversos estudos. A expressão constitutiva da enzima dehidroascorbato redutase em plantas transgênicas de milho duplicou o nível de vitamina C e, quando o promotor utilizado dirigiu a expressão somente para o endosperma, o aumento foi de seis vezes em relação às plantas selvagens. Além disso, cientistas produziram um milho transgênico superexpressando simultaneamente genes envolvidos na via biossintética de três vitaminas: ácido fólico, vitamina C e β – caroteno (pró-vitamina A), sendo que o conteúdo destas vitaminas aumentou 2, 6 e 169 vezes, respectivamente, nas sementes de milho transgênico em comparação às sementes não transformadas⁶⁵.

18.4.4 Produção recombinante de enzimas de aplicação terapêutica/diagnóstico em plantas transgênicas

Dentre os exemplos de enzimas humanas produzidas de forma recombinante em plantas pode-se citar a transglutaminase tecidual humana, que pode ser utilizada no diagnóstico da doença celíaca e a enzima lisossomal α -iduronidase, que possui aplicação como enzima de reposição no tratamento de mucopolissacaridose I (MPS I), ambas expressas em células de cultura BY-2 de tabaco. A enzima glucocerebrosidase foi produzida de modo recombinante em cultura de células de cenoura e é utilizada para tratamento da doença de Gaucher⁶⁶.

18.4.5 Produção recombinante de enzimas/proteínas industriais em plantas

Além de aplicações medicinais, as plantas transgênicas estão sendo cada vez mais utilizadas para a produção de enzimas e outras proteínas de alto

valor industrial. Como exemplo pode-se citar a produção de lacases de fungos, que são utilizadas para aumentar a eficiência do processamento de lignina como branqueador e anti-microbiano e também na clarificação de bebidas e tratamento de resíduos. Essas enzimas foram expressas de forma recombinante em uma variedade de micro-organismos, incluindo *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Trichoderma reesei* e *Aspergillus oryzae*, porém em baixas concentrações. A expressão em larga escala de lacases recombinantes em plantas de milho transgênico elevou os níveis de produção, além de poder ser extraída por meio de um procedimento simples, sem a necessidade de purificação, o que reduz o custo de produção. Além da produção de lacase, outras enzimas de interesse industrial foram produzidas em milho, como celulase, β -glucuronidase, avidina e α -amilase – produzida também em tabaco⁶⁵.

Biopolímeros de aplicação industrial também foram produzidos de forma recombinante em plantas. Como exemplo, pode-se citar as proteínas fibrosas de seda de aranha que forma expressas em tabaco, batata e *Arabidopsis thaliana*. Este material possui grande flexibilidade, elasticidade, tenacidade, sendo cinco vezes mais forte do que o aço. Estas características possibilitam diversas aplicações na indústria⁶⁷.

18.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Para uma maior eficiência de transformação e expressão de proteínas heterólogas em plantas, deve-se levar em consideração a planta na qual será produzida a proteína recombinante, a fim de se trabalhar com a que apresentar as características mais favoráveis ao objetivo final. Escolher cuidadosamente o tipo de tecido onde a expressão da proteína será induzida para que haja a maior concentração da proteína em relação à biomassa do tecido e o promotor adequado para que a expressão seja maximizada podem fazer muita diferença no resultado final do processo. Além disso, caso a produção recombinante for de um antígeno para vacinas, a adição de adjuvantes pode aumentar a eficácia da vacina⁶¹.

Observa-se uma grande quantidade de pesquisas relacionadas a aplicações tanto industriais quanto terapêuticas de proteínas produzidas em plantas transgênicas, porém poucas são as pesquisas que realmente geram produtos para o mercado consumidor. Dessa forma, são necessárias mais pesquisas e testes para que possamos incorporar cada vez mais produtos recombinantes benéficos ao nosso cotidiano, com a certeza do benefício e segurança.

REFERÊNCIAS

1. Bud R. *The Uses of Life: A History of Biotechnology*. Cambridge: Cambridge University Press; 1993. p. 27, 301p.
2. Watson JD, Crick FHC. Molecular structure of nucleic acids. *Nature*. 1953;171:737-8.
3. Arber W, Linn S. DNA modification and restriction. *Annual Review of Biochemistry*. 1969;38:467-500.
4. Cohen SN, Chang ACY, Boyer HW, Helling RB. Construction of Biologically Functional Plasmids In Vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1973;70:3240-4.
5. Kosaka K. Biosynthetic human insulin (BHI) by genetic recombination. *Nihon Rinsho*. 1982;8:1979-806.
6. Canhoto JM. *Biotecnologia Vegetal da Clonagem de Plantas à Transformação Genética*. Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra; 2010. 407p.
7. Ju R, Tian Y, Shen Q, Liu C, Mang K: Cloning of polygalacturonase (PG) cDNA and inhibition effects of its antisense RNA on the expression of PG gene in transgenic tomato plants. *Chinese Journal of Biotechnology*. 1994;2:67-74.
8. James, C. *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2012*. ISAAA Brief No. 44. Ithaca: ISAAA; 2012.
9. Aragão FJ, Nogueira EO, Tinoco ML, Faria JC. Molecular characterization of the first commercial transgenic common bean immune to the Bean golden mosaic virus. *Journal of Biotechnology*. 2013;166:42-50.
10. Brasileiro ACM, Dusi DMA. *Transformação Genética de Plantas*. In: Torres AC, Caldas LS, Buso, JA. *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Brasília: ABTCP/Embrapa-CNPq;1998. p. 679-735.
11. Droste A, Pasquali G, Bodanese-Zanettini MH. Integrated bombardment and Agrobacterium transformation system: an alternative method for soybean transformation. *Plant Molecular Biology Reporter*. 2000;18:51-9.
12. Herrera-Estrella L, de Block M, Messens E, Hernalsteens JP, Montagu M van, Schell J. Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. *The EMBO Journal*. 1983;2(6):987-95.
13. Potrykus I, Shillito RD, Saul MW, Paszkowski J. Direct gene transfer: state of the art and future potential. *Plant Molecular Biology Reporter*. 1985;3:117-28.
14. Machado LOR, Andrade GM, Barreto CID, LP, Penchel RM, Brasileiro ACM. Agrobacterium strain specificity and shoot tumour formation in eucalypt (*Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*). *Plant Cell Reports*. 1997;16:299-303.
15. Lee HS, Kim SW, Lee KW, Eriksson T, Liu JR. Agrobacterium-mediated transformation of ginseng (*Panax ginseng*) and mitotic stability of the inserted beta-glucuronidase gene in regenerants from isolated protoplasts. *Plant Cell Reports*. 1995;14:545-9.

16. Lipp-Nissinen, K. Molecular and Cellular Mechanisms of Agrobacterium-mediated Plant Transformation. *Ciência e Cultura – São Paulo*. 1993;45:104-11.
17. Stachel SE, Messens E, Van Montagu M, Zambryski P. Identification of signal molecules produced by wounded plant cells which activate the T-DNA transfer process in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature*. 1985;318:624-9.
18. Tzfira T, Citovsky V. From host recognition to T-DNA integration: the function of bacterial and plant genes in the *Agrobacterium*-plant cell interaction. *Molecular Plant Pathology*. 2000;1:201-12.
19. Zupan J, Muth TR, Draper O, Zambryski P. The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *The Plant Journal*. 2000;23:11-28.
20. Hooykaas PJJ, Beijersbergen AGM. The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. *Annual Reviews Phytopathology*. 1994;32:157-79.
21. Sluys MA van, Hashimoto RY, Scortecchi KC. Gene transfer from *Agrobacterium* to plants. *Ciência e Cultura*. 1992;44:296-300.
22. Zambryski P, Hoos H, Genetello C, Leemans J, Montagu M van, Schell J. Ti Plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO Journal*. 1983;2:2143-50.
23. Lacorte C, Romano E. Transferência de Vetores para *Agrobacterium*. In: Brasileiro ACM, Carneiro VTC, editors. *Manual de transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa-Cenargen; 1998. p. 93-110.
24. Brasileiro ACM, Dusi DMA. Transformação Genética de Plantas. In: Torres AC, Caldas LS, Buso, JÁ, editors. *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Brasília: Embrapa; 1999.
25. Klee H, Yanofsky MF, Nester EW. Vectors for transformation of higher plants. *Biotechnology*. 1985;3:637-42.
26. Bevans MW, Flavell RB, Chilton MDA. Chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature London*. 1983;304:184-7.
27. Hoekema A, Hirsch PR, Hooykaas PJJ, Schilperoot RAA. A binary vector strategy based on separation of vir and T region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature*. 1983;303:179-80.
28. Brasileiro ACM. Co-cultura com Linhagens Desarmadas de *Agrobacterium*. In: Brasileiro ACM, Carneiro VTC, editors. *Manual de transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa-Cenargen; 1998. p. 111-125.
29. Fleming GH, Olivares-Fuster O, Del-Bosco S, Grosser JW. An alternative method for the genetic transformation of sweet orange in vitro. *Cellular & Developmental Biology – Plant*. 2000;36:450-5.
30. De Cleene M, Deley J. The host range of crown gall. *Botanical Review*. 1976;42:389-466.

31. Chan MT, Chang HH, Ho SL, Tong WF, Yu SM. Agrobacterium-mediated production of transgenic rice plants expressing a chimeric α amylase promoter/ β -glucuronidase gene. *Plant Molecular Biology*. 1993;22:491-506.
32. Frame BR, Shou HS, Chikwamba RK, Zhang Z, Xiang C, Fonger TM, Pegg EK, Li B, Nettleton DS, Pei D, Wang K. Agrobacterium tumefaciens – Mediated Transformation of Maize Embryos Using a Standard Binary Vector System. *Plant Physiology*. 2002;129:13-22.
33. Ishida Y, Saito H, Ohta S, Hiei Y, Komari T, Kumashiro T. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by Agrobacterium tumefaciens. *Nat Biotechnol*. 1996;14:745-50.
34. Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by Agrobacterium and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant Journal*. 1994;6:271-82.
35. Arencibia AD, Carmona ER, Téllez P, Chan MT, Yu SM, Trujillo LE, Oramas P. An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum* spp. L.) transformation mediated by Agrobacterium tumefaciens. *Transgenic Research*. 1998;7:213-22.
36. Sanford JC, Klein TM, Wolf ED, Allen N. Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *Particulate Science and Technology*. 1987;5:27-37.
37. Rech EL, Aragão FJL. Biolística. In: Brasileiro ACM, Carneiro VTC, editors. *Manual de Transformação Genética de Plantas*. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen; 1998. p. 51-64.
38. Sanford JC. The biolistic process. *Trends in Biotechnology*. 1988;6:299-302.
39. Kikkert JR. The Biolistic® PDS-1000/He device. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 1993;33:221-6.
40. Lacorte C, Aragão FJL, Vainstein MH, Rech EL. Biobalística. In: Torres AC, Caldas LS, Buso JA, editors. *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq; 1999. p. 761-781.
41. Henrique-Silva F, Soares-Costa A. Production of a His-tagged Canecystatin in Transgenic Sugarcane Transgenic plants. In: Dunwell JM, Wetten AC, editors. *Trangenic Plants Methods and Protocols*. 2. ed. Totowa: Humana Press; 2012. p. 437-50.
42. Birch RG, Franks T. A gene transfer into intact sugarcane cells using microprojectile bombardment. *Australian Journal of Plant Physiology*. 1991;18:471-80.
43. Fromm M, Taylor LP, Walbot V. Expression of genes electroporated into monocot and dicot plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985;82:5824-8.
44. Brasileiro ACM, Dusi DMA. Transformação genética de plantas. In: Torres AC, Caldas LS, Buso JA, editors. *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq; 1999. p. 679-736.

45. Tor M, Mantell SH, Ainsworth C. Endophytic bacteria expressing β -glucuronidase cause false positive in *Discorea* species. *Plant Cell Reports*. 1992;11:452-6.
46. Lacorte C, Romano E. β -glucuronidase (GUS). In: Brasileiro ACM, Carneiro VTC. Manual de transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen. 1998;8:127-41.
47. Jefferson RA. The Gus reporter gene system. *Nature*. 1989;342:837-8.
48. Naleway JJ. In: Gallagher SR, editor. GUS Protocols: Using the GUS gene as a Reporter Expression. New York: Academic Press; 1992. 61-76.
49. Chen Y, Muller JD, Ruan Q, Gratton E. Molecular brightness characterization of EGFP in vivo by fluorescence fluctuation spectroscopy. *Biophysical Journal*. 2002;82:133-44.
50. Kain SR, Adams M, Kondepudi A, Yang TT, Ward WW, Kitts P. Green fluorescent protein as a reporter of gene expression and protein localization. *Biotechniques*. 1995;19:650-5.
51. Yang TT, Cheng L, Kain SR. Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein. *Nucleic Acids Research*. 1996;24:4592-3.
52. Van Den Elzen PJM, Townsend J, Lee KY, Bedbrook JRA. Chimaeric hygromycin resistance gene as a selectable marker in plant cells. *Plant Molecular Biology*. 1985, 5:299-305.
53. De Block M, Botterman J, Vandewiele M, Dockx J, Thoen C, Gosselé V, Movva NR, Thompson C, Van Montagu M, Leemans J. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *EMBO Journal*. 1987;6(9):2513-8.
54. Comai L, Facciotti D, Hiatt WR, Thompson G, Rose RE, Stalker DM. Expression in plants of a mutant *aroA* gene from *Salmonella typhimurium* confers tolerance to glyphosate. *Nature*. 1985;317:741-4.
55. Ramessar K, Sabalza M, Capell T, Christou P. Maize plants: An ideal production platform for effective and safe molecular pharming. *Plant Science*. 2008;174:409-19.
56. Barta A, Sommergruber K, Thompson D, Hartmuth K, Matzke MA, Matzke AJM. The expression of a nopaline synthase – human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. *Plant Molecular Biology*. 1986;6:347-57.
57. Sijmons PC, Dekker BMM, Schrammeijer B, Verwoerd TC, van den Elzen PJM, Hoekema A. Production of Correctly Processed Human Serum Albumin in Transgenic Plants. *Nature Biotechnology*. 1990;8:217-21.
58. Woodard SL, Mayor JM, Bailey MR, Barker DK, Love RT, Lane JR, Delaney DE, McComas-Wagner JM, Mallubhotla HD, Hood EE, Dangott LJ, Tichy SE, Howard JÁ. Maize (*Zea mays*)-derived bovine trypsin: characterization of the first large-scale,

- commercial protein product from transgenic plants. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2003;38:123-30.
59. Obembe OO, Popoola JO, Leelavathi S, Reddy SV. Advances in plant molecular farming. *Biotechnology Advances*. 2011;29:210-22.
60. Guana Z, Guoa B, Huoc Y, Guand Z, Weia Y. Overview of expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Vaccine*. 2010;28:7351-62.
61. Tiwari S, Verma PC, Singh PK, Tuli R. Plants as bioreactors for the production of vaccine antigens. *Biotechnology Advances*. 2009;27:449-67.
62. Matkowski A. Plant in vitro culture for the production of antioxidants – a review. *Biotechnology Advances*. 2008;26:548-60.
63. Ye X, Al-Babili S, Klöti A, Zhang J, Lucca P, Beyer P, Potrykus I. Engineering the Provitamin A (B-Carotene) Biosynthetic Pathway into (Carotenoid-Free) Rice Endosperm. *Science*. 2000;287:303-5.
64. Zhao F, Shewry PR. Recent developments in modifying crops and agronomic practice to improve human health. *Food Policy*. 2011;36:S94-S101.
65. Naqvi S, Ramessar K, Farré G, Sabalza M, Miralpeix B, Twyman RM, Capell T, Zhu C, Christou P. High-value products from transgenic maize. *Biotechnology Advances*. 2011;29:40-53.
66. Xu J, Ge X, Dolan MC. Towards high-yield production of pharmaceutical proteins with plant cell suspension cultures. *Biotechnology Advances*. 2011;29:278-99.
67. Xu J, Dolan MC, Medrano G, Cramer CL, Weathers PJ. Green factory: Plants as bioproduction platforms for recombinant proteins. *Biotechnology Advances*. 2012;30:1171-84.

