



Batata Transgênica

*Antonio Carlos Torres**
torres@cnpb.embrapa.br
*Adriana Teixeira Ferreira**
*Paulo Eduardo Melo**
*Eduardo Romano***
*Magnólia Araújo Campos***
*José Antonio Peters****
*José Amauri Buso**
*Damarcos de Castro Monte***

PLANTAS TRANSGÊNICAS DE BATATA ACHAT RESISTENTES AO VÍRUS DO MOSAICO (PVY)

*Embrapa Hortaliças, C. P. 218, 70359-970 Brasília, DF

**Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, C. P. 02.372, 70849 Brasília, DF

***Universidade Federal de Pelotas/Depto. de Botânica, C.P 354, 96010-9000 Pelotas, RS

Fotos cedidas pelos autores

Considerações Gerais

Nos últimos anos, vários métodos de transferência de genes para células de plantas foram publicados, dentre esses: a utilização de *Agrobacterium tumefaciens*, aceleração de partículas (biolística), polietilenoglicol, eletroporação, sonicação, micropartículas de carboneto de sílica, microlaser, micro e macroinjeção e a aplicação direta de DNA. Os dois primeiros citados são os mais empregados.

Uma das limitações desses métodos é a falta do controle da integração do DNA no genoma, que ocorre ao acaso. Outra, seria o processo de silenciamento de genes e a interação entre diferentes transgenes, resultando em padrões não esperados de expressão dos genes introduzidos. Várias transformações independentes, com uma construção específica, seriam necessárias para a obtenção de uma planta transgênica com um padrão de expressão desejável (Siemens & Schieder, 1996).

Em 1994, o tomate FLAVR SAVR, da Calgene, foi o primeiro produto oriundo da engenharia genética de plantas a ser comercializado nos EUA. Desde então, houve uma expansão nessa área e, atualmente, vários materiais transgênicos se encontram nos mercados da América do Norte, China e do Reino Unido (Tabela 1).

Na América Latina, nos últimos 5 anos, ocorreu um aumento considerável do número de laboratórios com pesquisa em plantas transgênicas, conforme os trabalhos apresentados na reunião da REDBIO de 1998, em Cuba (REDBIO, 1998). Foram publicados resumos desses trabalhos: da Argentina (batata, girassol, *Lupinus* e trigo), do Brasil (alface, amendoim, batata, cana-de-açúcar, eucalipto e fumo), do Chile (batata e pimentão), da Colômbia (arroz e mandioca), da Costa Rica (arroz e milho), de Cuba (arroz, banana, batata, batata-doce, café, cana-de-açúcar, fumo e mamão), do México (milho), do Peru (batata), de Trindade (cacau e *Anturium*), da Vene-

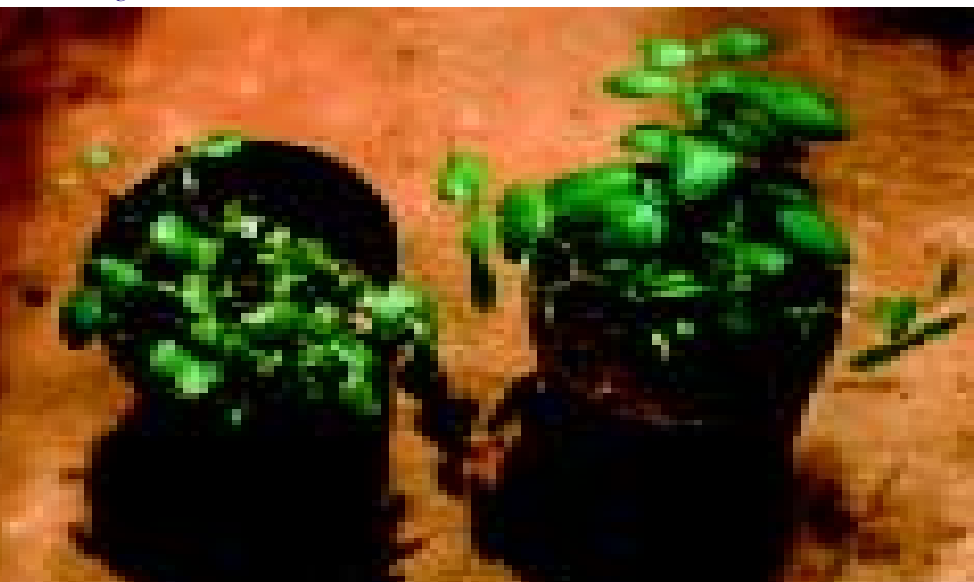
zuela (batata) e do Uruguai (batata).

Vários países da América do Sul têm em comum pesquisa com transformação de plantas de batata, visando resistência a vírus, fungos e bactérias. No Brasil, plantas de batata Achat com resistência a PVY foram desenvolvidas como resultado de um trabalho de parceria entre a Embrapa Hortaliças, a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, a Universidade Federal de Pelotas e o Instituto de Ingeniería Genética y Biotecnología (INGEBI-Argentina), com apoio do CNPq, programa RHA/E/Biotecnologia, do Centro Brasileiro Argentino de Biotecnologia, e da FAP/DF.

Importância da transformação genética da cultivar Achat

Atualmente, essa cultivar é uma das mais importantes no Brasil, com cerca de 45.000 hectares plantados (aproximadamente, 25% da área total cultivada com batata no país), sendo muito produtiva, com tubérculos de excelente aspecto comercial (formato alongado, pele lisa, "olhos" superficiais). Esse genótipo é um dos mais facilmente encontrados comercialmente. Entretanto, essa cultivar é suscetível a algumas doenças, entre elas o mosaico, causado pelo vírus denominado de PVY. O efeito direto desse vírus se traduz na redução da produtividade da lavoura e, o indireto, se reflete no aumento dos custos de produção pela necessidade dos produtores de comprarem, a cada plantio, tubérculos-sementes de batata para instalar suas lavouras. Isso eleva o preço final da batata entregue ao consumidor, além de prejudicar o produtor na competição com a batata-semente importada. Caso existisse, à disposição dos agricultores brasileiros, uma cultivar resistente ao

Figura 1: Plantas de batata desenvolvendo em condições de casa de vegetação. A esquerda, planta não transgênica inoculada com o vírus PVY. A direita planta transgênica desafiada com o vírus PVY



mosaico, os produtores poderiam adquirir os tubérculos-sementes em um ano e só voltarem a comprá-los dois a três anos depois, diluindo o alto custo em várias safras. Nesse intervalo, para instalar suas lavouras, os produtores poderiam utilizar, como material de multiplicação, uma parte das batatas colhidas em seu próprio campo.

Para contornar esse problema, foi conduzido um projeto de pesquisa com o objetivo de transformar plantas de batata da cultivar Achat com o gene da capa proteica do próprio vírus. As plantas portadoras desse gene mostram resistência ao vírus, com eliminação da doença e, conseqüentemente, de todos os seus prejuízos.

Proteção mediada pela capa proteica

A estratégia mais utilizada na obtenção de plantas transgênicas resistentes a vírus é a expressão do gene da capa proteica, já tendo sido demonstrada para mais de 20 vírus diferentes (Braun *et al.*, 1991).

No caso do vírus Y da batata, tem sido sugerido que o transcrito, e não a proteína das plantas transgênicas, seja responsável pela resistência.

Plantas transgênicas expressando o gene da CP sem codon de iniciação de tradução e, portanto, sem potencial para produção de proteína, resultaram em diferentes graus de resistência que variaram desde atrasos de sintomas até a imunidade total. É interessante observar que, nesses casos, não houve correlação entre a quantidade de mRNA da CP e a resistência (van der Vlugt *et al.*, 1992; Farinelli *et al.*, 1992). Esses resultados são comuns para os vírus do grupo dos potivírus (Lindbo *et al.*, 1993). Três mecanismos foram propostos para explicar esses fenômenos: o transcrito do transgene (fita positiva) pode hibridizar com a fita de RNA complementar negativa, que é produzida pelo vírus durante a replicação, bloqueando, assim, a replicação viral; alternativamente, os transcritos podem competir com o RNA genômico do vírus, sequestrando fatores do hospedeiro necessários ao processo de replicação viral (van der Vlugt *et al.*, 1992). O terceiro modelo pressupõe que um nível anormalmente alto do transcrito do transgene dispare um processo de defesa na planta, que levaria à degradação do RNA derivado do transgene e do RNA viral que, por ser homólogo, seria também alvo do mecanismo de defesa disparado, conferindo assim resistência ao vírus desafiante (Dougherty *et al.*, 1994).

Tabela 1. Desregulamentação de produtos transgênicos. (Adaptado de Redenbaugh, 1997).

1994	1997
Estados Unidos Calgene, tomate FLAVR SAVR	Argentina Monsanto, milho e algodão com gene Bt Monsanto, algodão tolerante ao glyphosate Monsanto, algodão com tolerância ao bromoximil
China Fumo, resistência a vírus Tomate, resistência a vírus	
1995	1998
Estados Unidos Asgrow, abóbora com resistência a vírus Calgene, algodão BXN Calgene, canola com maior teor de ácido laurico DNAP, tomate com gene que codifica para a ACC sintase	Brasil* Monsanto, soja tolerante ao herbicida glyphosate
Canada AgrEvo, canola tolerante ao herbicida glufosinato	1998-1999 possíveis
México Calgene, tomate FLAVR SAVR	Estados Unidos AgrEvo, milho tolerante ao herbicida glufosinate Canada Monsanto, canola tolerante ao herbicida glyphosate Europa AgrEvo, milho tolerante ao herbicida glufosinate Ciba-Geigy, milho Bt Mogen, rapeseed baixo fitato Monsanto, canola tolerante ao herbicida glyphosate. PGS, canola tolerante ao herbicida glufosinato Japão Ciba-Gleigy, milho com gene Bt Monsanto, soja tolerante ao herbicida glyphosate Australia Florigene, plantas de violeta e cravo com maior período pós-colheita
1996	
Estados Unidos Ciba-Geigy & Micogen, milho Bt Monsanto, milho Bt, batata Bt, Monsanto, soja tolerante ao herbicida glyphosate Pioneer, milho, Egg white avidin gene	
Canada Calgene, tomate FLAVR SAVR Monsanto, batata Bt	
Inglaterra Zeneca, pasta tomate baixo PG	
Europa AVEBE, batata com modificação no teor de amido Monsanto, soja tolerante ao herbicida glyphosate	
Argentina Monsanto, soja tolerante ao herbicida glyphosate	

*Brasil: Até 12 de dezembro de 1998, foram solicitadas a CTNBio 299 liberações planejadas de OGM

O processo de transformação genética

As plantas de batata Achat foram transformadas via *Agrobacterium tumefaciens*, usando a estirpe LBA4404, contendo o vetor binário pBI-PVY, com os genes que codificam para a proteína da capa proteica do vírus PVY da batata e o gene *npt II* que codifica para neomicina fosfotransferase II, que confere resistência à canamicina. As culturas foram crescidas, por 16 a 20 horas, em meio líquido LB (5 g.l⁻¹ de extrato de levedura, 10 g.l⁻¹ de triptona, 10 g.l⁻¹ de cloreto de sódio), suplementado com 50 mg.l⁻¹ de canamicina e 100 mg.l⁻¹ de spectinomomicina, a 26-28°C, até atingirem uma densidade ótica (OD₆₀₀) de 0.7. Aliquotas de 15 ml da cultura foram centrifugadas a 5.000 rpm (Beckman J2-21, rotor 20), a 4°C, por 10 minutos, e o sedimento ressuspendido em meio LB.

Cocultivo e seleção: segmentos nodais

foram colocados em placa de Petri de 4,0 cm de diâmetro e imersos na suspensão bacteriana, por 10 minutos. Em seguida, o excesso de inóculo foi retirado, colocando os explantes sobre papel de filtro estéril. Então, os explantes foram transferidos para meio de cocultivo, por 48 horas. Após, os segmentos nodais foram imersos, por 30 minutos, em meio com sais minerais e vitaminas MS, 3% de sacarose e, em mg.l⁻¹: i-inositol, 100; cefotaxima, 100 e carbemicilina, 500. Em seguida, foram cultivados em meio seletivo com sais minerais e vitaminas MS, 3% de sacarose, 100 mg.l⁻¹ de i-inositol, 3 mg.l⁻¹ de zeatina, 100 mg.l⁻¹ de cefotaxima, 500 mg.l⁻¹ de carbemicilina, 50 mg.l⁻¹ de canamicina e 2 g.l⁻¹ de gelrite. As brotações formadas foram enraizadas e as plantas desenvolvidas foram levadas para casa de vegetação onde foram desafiadas pelo vírus causador do mosaico, mediante inoculações mecânica.



Figura 2: Planta transgênica de batata Achat inoculada mecanicamente com o vírus PVY

Dentre cerca de 40 plantas regeneradas após o processo de transformação genética, duas plantas distintas apresentaram-se resistentes ao vírus Y. A análise do DNA desses dois clones mostrou a presença no genoma da batata 'Achat', dos genes introduzidos (PVY-*cpe npt II*). Os tubérculos dessas duas plantas foram colhidos,

plantados e testados em quatro épocas, por inoculações mecânica com o vírus. Em todos os testes, as plantas mantiveram o padrão de resistência (Figuras 1, 2 e 3).

Para que o resultado desse trabalho chegue ao mercado, muitos estudos ainda necessitam ser realizados. O primeiro é a confirmação, em condições de campo, do

Figura 3: Planta não transgênica de batata Achat (controle) inoculada mecanicamente com o vírus PVY



nível de resistência obtida em casa de vegetação. Assim, caso essas plantas apresentem, em campo, a reação de resistência que vem sendo observada em casa de vegetação, mantendo ao mesmo tempo as características agrônômicas inerentes à cultivar Achat, a Embrapa e seus parceiros terão desenvolvido uma tecnologia que poderá ter impactos socioeconômicos significativos para os bataticultores. Estudos recentes do impacto de batatas transgênicas com resistência aos vírus PVX, PVY e PLRV, no México, mostram que essa tecnologia reduz em 13% os custos de produção, em grandes plantios e, em 32% para pequenos produtores, nas condições mexicanas (Qaim, 1998). No Brasil, espera-se que esse genótipo com resistência a vírus Y venha garantir ao produtor brasileiro a alta produtividade de suas lavouras, porém com um custo de produção menor. Isso significa aumento de renda no setor agrícola e da qualidade de vida dos produtores de batata. Para o consumidor, essa tecnologia poderá representar queda no preço da batata. Para o país, a utilização de uma cultivar com essas características constitui, além da economia de divisas pela redução nas importações de batata-semente, uma grande possibilidade de melhoria na qualidade da dieta do brasileiro, já que, com a redução do preço, uma

maior parte da população passará a consumir a batata, um alimento de grande valor nutricional.

Biossegurança

Recentemente, a Embrapa submeteu à CTNBIO pedido de permissão para realização dos ensaios de campo com os dois clones de batata Achat que apresentaram resistência ao PVY, em casa de vegetação. Existe hoje, uma certa preocupação com os riscos inerentes à introdução de plantas transgênicas no ambiente e no seu consumo pelo homem. Os riscos de liberação de planta transgênica no campo têm sido amplamente discutido no mundo. Há consenso nos países que já permitem a comercialização desses produtos de que os riscos têm de ser considerados caso a caso. O uso de vários genes já foram inclusive desregulamentados nos Estados Unidos, como é o caso daqueles que codificam para a proteína do capsídeo e replicase de vírus que afeta a batata.

Os principais riscos detectados especificamente em relação aos produtos gerados utilizando-se a tecnologia de resistência derivada do patógeno via engenharia genética são os seguintes: a) ocorrência de cruzamento entre a planta transgênica com parentes silvestres da sua espécie, possibilitando assim o fluxo gênico (Hannemann, 1994). Entretanto, devido ao fato de a batata se propagar vegetativamente, a fertilidade do pólen é geralmente muito baixa. No caso específico desta liberação no campo, a batata 'Achat' é totalmente estéril e parentes silvestres da batata (*Solanum tuberosum*) não são encontrados na área do Distrito Federal, onde deverá ocorrer a liberação (Melo & Fontes, no prelo), já aprovada pela CTNBio; b) criação de novos tipos de vírus, mediante recombinação de genomas virais ou por um fenômeno de heteroencapsulamento (Tepfner, 1993). A possibilidade de ocorrência de um evento de recombinação entre um transgene e um vírus foi estudada por Ghislain e Golmirzale (1998) tendo verificado que a probabilidade de um evento de recombinação dessa natureza é muito menor que a recombinação natural que ocorre entre dois vírus infectando a mesma planta; c) preocupações com aspectos de segurança alimentar. Esse aspecto deve ser considerado sempre para todos os tipos de alimentos consumidos pelo homem e pelos animais. Os clones de batata Achat que serão liberados no campo, contêm o gene da proteína da capa do vírus Y e o

gene *npt II*. Esse último gene é encontrado hoje na grande maioria dos produtos transgênicos presentes no mercado e os potenciais riscos para a saúde humana e animal já foram bastante estudados. Flavell *et al.* (1992) fizeram extensa revisão da documentação de estudos realizados sobre o potencial de risco do gene *npt II*, dos quais se conclui que a liberação desse para o consumo alimentício e para o meio ambiente é segura. Com relação ao gene da proteína da capa do vírus, também foram feitas extensas avaliações do potencial de risco de batatas transgênicas portando genes do capsídeo bem como da replicase de vírus de batata, sendo que nenhum risco à saúde foi identificado. Os transgenes são isolados de vírus que sempre infectam o tubérculo da batata. Assim, muitas vezes o homem, naturalmente, ingere genes e proteínas virais durante o consumo de plantas não transgênicas. Nos Estados Unidos, o FDA (Food and Drug Administration), órgão encarregado de deliberar sobre aspectos sanitários dos alimentos já desregulamentou a liberação desses genes.

A sociedade brasileira está começando a tomar conhecimento dos avanços e mudanças geradas nos vários setores produtivos com o progresso da biotecnologia. Essa é uma das primeiras plantas transgênicas a ser testada em condições de campo pela Embrapa. O que vai determinar se ela chegará ao consumidor final é a confirmação do seu benefício para o setor produtivo e para o consumidor, assegurando-se o equilíbrio do meio ambiente.

Agradecimentos:

Agradecemos ao CNPq pelas bolsas concedidas.

Referências

BRAUN, C.J.; JILKA, J.M.; HEMENWAY, C.L. & TUNER, N.E. Interactions between plants, pathogens and insects: possibilities for engineering resistance. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 2, p.193-198, 1991.

Dougherty, W.G.; Lindbo, J.A.; Smith, H.A.; Parks, T.D.; Swaney, S. & Proebsting, W.M. RNA-mediated virus resistance in transgenic plants: exploitation of a cellular pathway possibly involved in RNA degradation. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v. 7, p. 544-552, 1994.

FARINELLI, L.; MALNOE, P. & COLLET, G.F. Heterologous encapsidation of potato virus y strain o

(PVY_o) with the transgenic coat protein of PVY strain n (PVY_n) in *Solanum tuberosum* cv Bintje. **Bio/Technology**, v.10, p.1020-1025, 1992.

FLAVELL, R.B.; DART, E.; FUCHS, R.L. & FRALEY, R.T. Selectable marker genes: safe for plants? **Bio/Technology**, v.10, p.141-144, 1992.

GHISLAIN, M. & GOLMIRZALE, A.. Genetic engineering for potato improvement. In: KHURANA, P. (ed.) **Comprehensive potato biotechnology**. India, 1998.

HANNEMAN, R.E. JR. The Testing and release of transgenic potatoes in the North American center of diversity. In: KRATTIGER, A.F. & ROSEMARIN, A.. (eds.). **Biosafety for sustainable agriculture: sharing biotechnology regulatory experiences of the Western hemisphere**. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA), Stockholm Environment Institute (SEI), Ithaca and Stockholm, p.47-49, 1997.

LINDBO, J.A.; SILVA-ROSALES, L.; PROEBSTING, W.M. & DOUGHERTY, W.G. Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: implications for regulation of gene expression and virus resistance. **Plant Cell**, v.5, p.1749-1759, 1993.

MELO, P.E. & FONTES, E.G. Avaliação de riscos na introdução no ambiente de plantas transgênicas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. & BUSO, J.A. (eds). **Cultura de tecidos e transformação de plantas**. Vol. II, Brasília:SPI Embrapa, no prelo.

QAIM, M. Transgenic virus resistant potatoes in Mexico: potential socioeconomic implications of North-South biotechnology transfer. ISAAA: Briefs No. 7, 1998.

REDBIO 1998. **III Encuentro Latinoamericano de biotecnologia vegetal**. Havana: Palcograf, 1-5 de junho de 1998.

REDENBAUGH, K. Legal and public aspects of biotechnology. **Acta Hort.**, v. 447, p.627-636, 1997.

SIEMENS, J. & SCHIEDER, O. Transgenic plants: genetic transformation - recent developments and the state of the art. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, v.2, p.66-75, 1996.

TEPFER, M. Viral genes and transgenic plants: what are the potential risks? **Bio/Technology**, v. 11, p.1125-1132, 1993.

VAN DER VLUGT, R.A.A.; RUITER, R.K. & GOLDBACH, R. Evidence for sense RNA-mediated protection to PVY_n in tobacco plants transformed with the viral coat protein cistron. **Plant Molecular Biology**, v.20, p. 631-639, 1992.