



Manual de transformação genética de plantas

2ª edição revista e ampliada

Ana Cristina Miranda Brasileiro
Vera Tavares de Campos Carneiro

Editoras Técnicas

Embrapa

***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento***

Manual de transformação genética de plantas

2ª edição revista e ampliada

*Ana Cristina Miranda Brasileiro
Vera Tavares de Campos Carneiro*

Editoras Técnicas

Embrapa
Brasília, DF
2015

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Parque Estação Biológica (PqEB)
Av. W5 Norte (final)
70770-917 Brasília, DF
Fone: (61) 3448-4700
Fax: (61) 3340-3624
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Unidade responsável pelo conteúdo

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Comitê Local de Publicações

Presidente

João Batista Teixeira

Secretário-executivo

Thales Lima Rocha

Membros

Jonny Everson Scherwinski Pereira

Lucília Helena Marcellino

Lígia Sardinha Fortes

Marcio Sanches

Samuel Resende Paiva

Vânia Cristina Rennó Azevedo

Daniela Aguiar de Souza Kols (suplente)

João Batista Tavares da Silva (suplente)

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Informação Tecnológica

Manual de transformação genética de plantas / Ana Cristina Miranda Brasileiro, Vera Tavares de Campos Carneiro, editoras técnicas. – 2. ed. rev. ampl. – Brasília, DF : Embrapa, 2015.
453 p. : il. color. ; 23,0 cm x 20,5 cm.

ISBN 978-85-7035-452-5

1. Planta. 2. Biotecnologia. 3. Engenharia genética. 4. Agricultura. 5. Melhoramento genético vegetal. I. Brasileiro, Ana Cristina Miranda. II. Carneiro, Vera Tavares de Campos. III. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

CDD 631.5233

© Embrapa, 2015

Embrapa Informação Tecnológica

Parque Estação Biológica (PqEB)
Av. W3 Norte (final)
70770-901 Brasília, DF
Fone: (61) 3448-4236
Fax: (61) 3448-2494
www.embrapa.br/livraria
livraria@embrapa.br

Unidade responsável pela edição

Embrapa Informação Tecnológica

Coordenação editorial

Selma Lúcia Lira Beltrão

Lucilene Maria de Andrade

Nilda Maria da Cunha Sette

Supervisão editorial

Juliana Meireles Fortaleza

Wyviane Carlos Lima Vidal

Revisão de texto

Ana Maranhão Nogueira

Normalização bibliográfica

Iara Del Fiaco Rocha

Projeto gráfico e capa

Carlos Eduardo Felice Barbeiro

1ª edição

1ª impressão (1998): 2.000 exemplares

2ª edição

1ª impressão (2015): 1.000 exemplares

Autores



1) Ana Cláudia Guerra Araujo

Bióloga, doutora em Ciências Biológicas (Biofísica), pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

2) Ana Cristina Meneses Mendes Gomes

Bióloga, mestre em Ciências Agrárias, analista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

3) Ana Cristina Miranda Brasileiro

Engenheira-florestal, Ph.D. em Biologia Molecular e Celular Vegetal, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

4) Angela Mehta

Bióloga, Ph.D. em Genética e Biologia Molecular, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

5) Cristiano Lacorte

Biólogo, doutor em Biologia Celular e Molecular de Plantas, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

6) Diva Maria de Alencar Dusi

Engenheira-agrônoma, Ph.D. em Ciências de Plantas, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

7) Eduardo Romano

Biólogo, Ph.D. em Biologia Molecular, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

Foto: Claudio Bezerra Melo



8) Elíbio Leopoldo Rech

Engenheiro-agrônomo, Ph.D. em Biologia Molecular e Celular Vegetal, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

9) Érika Valéria Saliba Albuquerque

Bióloga, Ph.D. em Biologia Celular e Molecular Vegetal, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

10) Francisco José Lima Aragão

Engenheiro-agrônomo, Ph.D. em Biologia Molecular, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

11) Giovanni Rodrigues Vianna

Engenheiro-agrônomo, doutor em Biologia Molecular, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

12) Gláucia Barbosa Cabral

Engenheira-agrônoma, doutora em Ciências (Energia Nuclear na Agricultura), pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

13) Guy de Capdeville

Engenheiro-agrônomo, Ph.D. em Fitopatologia, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

14) Isabel Cristina Bezerra

Engenheira-agrônoma, Ph.D. em Biologia Celular e Molecular, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

15) Júlio Carlyle Macedo Rodrigues

Biólogo, Ph.D. em Biologia Molecular Vegetal, analista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

16) Leila Maria Gomes Barros

Bióloga, doutora em Ciências Biológicas (Biologia Molecular), pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

17) Luciano Paulino da Silva

Biólogo, Ph.D. em Biologia Animal, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

18) Lucília Helena Marcellino

Bióloga, doutora em Ciências Biológicas (Biologia Molecular), pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

19) Marcelo Porto Bemquerer

Biólogo, doutor em Bioquímica, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

20) Maria Cristina Mattar da Silva

Bióloga, doutora em Biologia Molecular, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

21) Maria Fátima Grossi de Sá

Bióloga, Ph.D. em Biologia Molecular, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

22) Maria Imaculada Conceição dos Santos Gama

Bióloga, Ph.D. em Biologia Molecular, pesquisadora aposentada da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

23) Patrícia Messenberg Guimarães

Engenheira-agrônoma, doutora em Bioquímica, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

24) Rosana Falcão

Bióloga, mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia, analista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

25) Simone da Graça Ribeiro

Bióloga, doutora em Virologia Molecular, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

26) Soraya Cristina de Macedo Leal-Bertioli

Bióloga, Ph.D. em Biologia Molecular de Microrganismos, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

27) Thales Lima Rocha

Biólogo, Ph.D. em Bioquímica e Biologia Molecular, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

28) Vera Tavares de Campos Carneiro

Bióloga, Ph.D. em Biologia Molecular e Celular Vegetal, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

Agradecimentos

Gostaríamos primeiramente de agradecer à chefia-geral e às chefias-adjuntas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pelos incentivo e apoio à reedição deste Manual. Reconhecemos e agradecemos igualmente o trabalho e a dedicação da equipe da Embrapa Informação Tecnológica.

Tal como aconteceu na primeira edição, todos os capítulos foram analisados por especialistas nos diversos assuntos. Esses colaboradores nos repassaram críticas e sugestões que muito contribuíram ao aprimoramento do *Manual*. Agradecemos aos colegas de instituições parceiras de ensino e pesquisa que dedicaram bastante atenção a este trabalho: Pierre Marraccini, Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (França); Maria Cristina Falco, Centro de Tecnologia Canavieira; Eni Braga e Marcelo C. Dornelas, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp); Diana Fernandez, Institut de Recherche pour le Développement (França); Janice de A. Engler, Institut National de la Recherche Agronomique (França); Stephan Nielen, International Atomic Energy Agency (Áustria); Érica D. Silveira, Pontificia Universidad Católica Argentina (Argentina); Goran Robic, Lek Pharmaceuticals d.d., Menges (Eslovênia); Antônio Américo, Nicolau Brito, Octávio L. Franco e Simoni Dias, Universidade Católica de Brasília (UCB); Carlos André O. Ricart, Robert Miller, Rosana Blawid e Wagner Fontes, Universidade de Brasília (UnB); Maria Magdalena Rossi, Universidade de São Paulo (USP); Elisabeth A. Mansur de Oliveira, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ); André Luís L. Vanzela, Universidade

Estadual de Londrina (UEL); Karina Proite, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG); Poliane A. Zerbini, Universidade Federal de Viçosa (UFV); Márcio Alves Ferreira, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ); Maria Helena B. Zanettini e Márcia Pinheiro Margis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Nosso agradecimento vai também para colegas das Unidades da Embrapa: Adilson Kenji Kobayashi e Betânia Ferraz Quirino, Embrapa Agroenergia; Rosângela Bevitori, Embrapa Arroz e Feijão; Rodrigo da R. Fragoso, Embrapa Cerrados; Abi S. dos Anjos Marques, Embrapa Quarentena Vegetal; Ana Luiza M. Lacerda, André S. T. Irsigler, Andréa del Pilar de S. Penaloza, Juliana D. de Almeida, Kazumitsu Matsumoto, Larissa A. Guimarães, Lilian H. Florentino, Márcio M. Sanches, Marcos A. Gimenes, Marília de C. R. Pappas, Osmundo Brilhante, Sérgio A. Figueiredo e Vânia C. R. Azevedo, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia; Carolina V. Morgante, Embrapa Semiárido; Francismar C. Guimarães, Embrapa Soja; e Vera Maria Quecini, Embrapa Uva e Vinho.

Agradecemos à desenhista Laura de Alencar Dusi, que realizou os esquemas apresentados na segunda edição do Manual. Este trabalho baseou-se, em alguns momentos, nas ilustrações da primeira edição, de Rodolfo B. Batista, a quem somos gratas por ter disponibilizado os desenhos.

Nossos agradecimentos aos autores pela dedicação e pelo rigor com que redigiram seus capítulos, pelo empenho em nos atender prontamente e por todas as demonstrações de entusiasmo e incentivo.

Finalmente, dedicamos este trabalho a nossas famílias, sempre presentes e compreensivas.

Apresentação

O melhoramento genético das culturas agrícolas no Brasil é um dos resultados mais contundentes das pesquisas desenvolvidas pelas instituições de pesquisas brasileiras, inclusive a Embrapa. Os impactos obtidos por meio da genética levaram a um novo desenho da agricultura do País.

Assim, o desenvolvimento científico e tecnológico permite, hoje, sinalizar uma nova época, associando a produção agropecuária às novas exigências da sociedade por padrões nutricionais, ambientais e de saúde. Entre os desenvolvimentos científicos e tecnológicos está a biotecnologia, que, na Embrapa, teve seu início na década de 1980.

A biotecnologia possui uma série de ferramentas que podem ser utilizadas nas estratégias de melhoramento genético. A engenharia genética (transformação genética de plantas pela transferência de genes), por exemplo, evoluiu rapidamente na última década e está presente, efetivamente, no cenário da produção de sementes de vários cultivos no País.

As oportunidades de utilização de organismos geneticamente modificados (OGMs) são infinitas e podem estar associadas às mais diversas áreas da produção agropecuária. Talvez, a mais importante delas seja no desenho e na implementação de novos processos visando à sustentabilidade da produção, por meio do aumento de produtividade, com qualidade, a um custo menor e

sem necessidade de aumentar a área de cultivo, e com redução do uso de insumos agrícolas.

Na Embrapa, essa área de pesquisa busca, principalmente, reduzir a necessidade de irrigação e de insumos agrícolas e abrir as fronteiras do conhecimento com uma equipe de pesquisadores que, em 1998, lançou o *Manual de transformação genética de plantas*. Esse manual teve como principal objetivo descrever as principais estratégias utilizadas para a transformação de plantas, beneficiando estudantes, profissionais e demais interessados em técnicas de biologia celular e molecular utilizadas para a transformação genética de plantas.

Em 2014, completam-se duas décadas do desenvolvimento do primeiro produto alimentar geneticamente modificado no mundo – um tomate com maior durabilidade criado na Califórnia, Estados Unidos. Vinte anos depois, o mercado de transgênicos na agricultura é cada vez mais expressivo. A cada 100 ha plantados com soja hoje no planeta, 80 ha são de sementes com genes alterados. No caso do milho, são 30 ha para cada 100 ha.

Nessas duas décadas, a área com culturas transgênicas subiu 100 vezes, de 1,7 milhão de hectares para 175,2 milhões. Os Estados Unidos lideram o plantio, seguidos pelo Brasil e Argentina. Entre os OGMs vegetais estão a soja, o milho, o algodão e a canola.

Para comemorar as duas décadas de OGMs no mercado mundial, a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia lança, em 2015, a segunda edição do *Manual de transformação genética de plantas*, que, além

de revista e ampliada, apresenta novas técnicas desenvolvidas e adotadas neste período, com a colaboração de novos pesquisadores.

É com satisfação que oferecemos à comunidade técnico-científica e às instituições públicas e privadas os conhecimentos necessários para a transformação genética de plantas. Esperamos que as aplicações dessas

tecnologias contribuam para o desenvolvimento sustentável do agronegócio brasileiro e para a alimentação, a nutrição e a saúde de nosso povo.

Mauro Carneiro

Chefe-geral da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Prefácio

Quando publicamos, em 1998, a primeira edição do *Manual de transformação genética de plantas*, o Brasil e o mundo ainda viviam um intenso debate sobre os benefícios e os riscos potenciais associados à tecnologia dos transgênicos. Nosso principal propósito, ao lançarmos a primeira edição naquela ocasião, era que o *Manual* se tornasse “um bom companheiro de bancada” para todos aqueles que desejam se iniciar ou se aperfeiçoar na pesquisa em biotecnologia. Acreditamos que conseguimos alcançar nosso objetivo, pois a primeira edição do *Manual* está esgotada há mais de 10 anos e a encontramos facilmente espalhada pelas bancadas de laboratórios de Norte a Sul do País. Temos inúmeros depoimentos de estudantes de iniciação científica, mestrado e doutorado, e de profissionais de todos os níveis que realmente tiveram, e ainda têm, o *Manual de transformação genética de plantas* como um companheiro inseparável. Hoje, quase 20 anos depois do lançamento da primeira edição, a adoção dos transgênicos é uma realidade, com 175 milhões de hectares plantados com cultivos geneticamente modificados em 27 países. Sentimos, então, a necessidade de atualizá-lo, aportando novas técnicas, excluindo aquelas obsoletas e revisando as publicadas na primeira edição.

A segunda edição vem, então, preencher a lacuna deixada pela primeira e oferecer à comunidade científica um material didático de qualidade em língua portuguesa. Nele, são apresentadas: as principais técnicas para clonagem de genes de interesse em vetores de

expressão para transformação de plantas (Capítulos 1 a 3); as principais metodologias atualmente utilizadas para a transformação genética de plantas envolvendo estratégias de transformação direta (Capítulos 4 e 5) e do sistema *Agrobacterium* (Capítulos 6 e 7); e a análise da atividade de genes repórteres no monitoramento da eficiência de transformação (Capítulo 8). Uma vez obtida uma planta geneticamente modificada, análises moleculares são necessárias para avaliar a introdução e integração do transgene (Capítulos 9 a 13), a sua correta transcrição (Capítulos 14 a 16), e a tradução e o endereçamento das proteínas codificadas (Capítulos 17 a 21). No final desta obra, há seis anexos contendo a descrição de meios para crescimento de bactérias e de cultura de plantas, preparo de soluções e tampões utilizados nos capítulos, assim como informações técnicas gerais que ajudarão o leitor a realizar seus experimentos.

Em cada capítulo, o leitor encontrará um breve embasamento teórico e a descrição metodológica detalhada da técnica abordada, com dicas e observações práticas para facilitar a compreensão das diferentes etapas do protocolo. A equipe de pesquisadores da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia utiliza essas técnicas rotineiramente em seus laboratórios e procurou descrevê-las com o maior detalhamento possível, permitindo ao leitor adaptar o protocolo apresentado a outros laboratórios ou materiais vegetais.

Entregamos, assim, a toda a comunidade científica brasileira, a segunda edição do *Manual de transformação*

genética de plantas, revista e ampliada, esperando que este continue espalhado pelas bancadas dos laboratórios, como um “bom companheiro” de alunos e profissionais em suas rotinas de trabalho.

As Editoras

Prefácio à 1ª edição

Em 1995, organizamos pela primeira vez o curso *Métodos de transferência e expressão de genes em plantas*, que a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia oferece regularmente a estudantes de pós-graduação e pesquisadores que atuam na área. Naquela ocasião, sentimos a enorme carência de material didático em língua portuguesa. Para supri-la, tivemos a iniciativa de redigir este *Manual*. Nele, são apresentadas diferentes técnicas utilizadas na transformação genética de plantas: transferência de genes através da eletroporação de protoplastos e biobalística ou por vetores baseados no sistema *Agrobacterium*. Experimentos para a detecção da expressão de genes repórteres e análises moleculares da integração e da expressão de genes exógenos em plantas encontram-se também descritos. No final do *Manual*, foram adicionados oito apêndices contendo a descrição de meios de cultura e soluções utilizadas nos capítulos, uma relação das principais plantas transgênicas já obtidas, normas para constituição das Comissões Internas

de Biossegurança (CIBio) e um exemplo de plano de radioproteção.

Em cada capítulo, os autores forneceram o embasamento teórico da técnica abordada, que pode ser adaptada para outras espécies ou materiais vegetais. As técnicas apresentadas são utilizadas por pesquisadores da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e da Embrapa Hortaliças em sua rotina de laboratório, contribuindo, assim, com dicas e observações que facilitam a compreensão e a repetição dos protocolos. Qualquer sugestão sobre os protocolos descritos neste *Manual* será bem-vinda no seguinte endereço eletrônico: manual@cenargen.embrapa.br.

Nosso propósito é que este *Manual* acompanhe, como um bom companheiro de bancada, todos aqueles que desejam se iniciar ou se aperfeiçoar na pesquisa em biotecnologia.

As Editoras

Sumário

Introdução à transformação genética de plantas	15
<i>Ana Cristina Miranda Brasileiro e Vera Tavares de Campos Carneiro</i>	
Capítulo 1	
Cultivo e conservação de <i>Escherichia coli</i> e <i>Agrobacterium</i> spp.	21
<i>Ana Cristina Miranda Brasileiro e Patrícia Messenberg Guimarães</i>	
Capítulo 2	
Isolamento de vetores para transformação direta	39
<i>Francisco José Lima Aragão e Elíbio Leopoldo Rech</i>	
Capítulo 3	
Transferência de vetores para <i>Agrobacterium</i> spp.	55
<i>Cristiano Lacorte e Eduardo Romano</i>	
Capítulo 4	
Eletroporação de protoplastos.....	73
<i>Leila Maria Gomes Barros e Vera Tavares de Campos Carneiro</i>	
Capítulo 5	
O sistema biobalístico.....	89
<i>Giovanni Rodrigues Vianna, Francisco José Lima Aragão e Elíbio Leopoldo Rech</i>	
Capítulo 6	
Transformação de plantas-modelo via <i>Agrobacterium</i> spp.	105
<i>Ana Cristina Miranda Brasileiro, Glaucia Barbosa Cabral e Maria Cristina Mattar da Silva</i>	
Capítulo 7	
Expressão transiente e indução de silenciamento utilizando <i>Agrobacterium</i> spp. e vetores virais	137
<i>Cristiano Lacorte e Simone da Graça Ribeiro</i>	
Capítulo 8	
Genes repórteres: <i>gus</i> (β -glucuronidase) e <i>gfp</i> (proteína verde-fluorescente).....	147
<i>Cristiano Lacorte e Leila Maria Gomes Barros</i>	
Capítulo 9	
Extração e quantificação de DNA de tecidos vegetais	165
<i>Eduardo Romano e Soraya Cristina de Macedo Leal-Bertioli</i>	
Capítulo 10	
Análise de plantas transgênicas por reação em cadeia da polimerase (PCR)	181
<i>Júlio Carlyle Macedo Rodrigues, Maria Imaculada Conceição dos Santos Gama e Francisco José Lima Aragão</i>	
Capítulo 11	
Preparação de sondas.....	199
<i>Simone da Graça Ribeiro e Ana Claudia Guerra Araujo</i>	
Capítulo 12	
Análise da integração de transgenes pela técnica de <i>Southern blot</i>	215
<i>Eduardo Romano e Giovanni Rodrigues Vianna</i>	
Capítulo 13	
Hibridização in situ por fluorescência (FISH).....	233
<i>Ana Claudia Guerra Araujo, Rosana Falcão e Guy de Capdeville</i>	
Capítulo 14	
Análise de RNA total e RNA interferente pela técnica <i>Northern blot</i>	261
<i>Patrícia Messenberg Guimarães, Isabel Cristina Bezerra e Francisco José Lima Aragão</i>	

Capítulo 15

Quantificação gênica pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa 283
Júlio Carlyle Macedo Rodrigues e Érika Valéria Saliba Albuquerque

Capítulo 16

Hibridização in situ para detecção da expressão de genes em tecidos vegetais 303
Diva Maria de Alencar Dusi

Capítulo 17

Detecção de proteínas pela técnica de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*)..... 329
Francisco José Lima Aragão e Simone da Graça Ribeiro

Capítulo 18

Imunocitoquímica..... 343
Ana Claudia Guerra Araujo e Ana Cristina Meneses Mendes Gomes

Capítulo 19

Detecção e análise de proteínas pela técnica *Western blot*.... 359
Lucília Helena Marcellino e Maria Fátima Grossi de Sá

Capítulo 20

Análise proteômica por eletroforese bidimensional e espectrometria de massa 377
Angela Mehta, Thales Lima Rocha e Maria Fátima Grossi de Sá

Capítulo 21

Análise de peptídeos e proteínas por espectrometria de massa 391
Luciano Paulino da Silva e Marcelo Porto Bemquerer

Apêndice 1

Meios para crescimento de bactérias 407

Apêndice 2

Meios de cultura de plantas e reguladores de crescimento..... 411

Apêndice 3

Antibióticos 417

Apêndice 4

Soluções e tampões 421

Apêndice 5

Informações técnicas gerais 431

Apêndice 6

Abreviaturas 437

Índice

..... 441

Introdução à transformação genética de plantas

Ana Cristina Miranda Brasileiro
Vera Tavares de Campos Carneiro

A incorporação da biotecnologia aos programas de melhoramento genético de plantas, tão debatida nas décadas passadas, é hoje uma realidade e permitiu acelerar o processo de obtenção de variedades com características superiores, de uma maneira mais acurada e eficiente. A partir de 1996, a adoção da tecnologia dos transgênicos impôs uma reestruturação da cadeia produtiva em todo o mundo, com uma área de 181 milhões de hectares em 2014 plantada com cultivos geneticamente modificados em 28 países.

O Brasil, após os Estados Unidos, é hoje o segundo maior produtor de transgênicos no mundo, com cerca de 40 milhões de hectares plantados com plantas geneticamente modificadas (PGMs) de soja (*Glycine max*), algodão (*Gossypium hirsutum*) e milho (*Zea mays*). Na safra 2014/2015, estima-se que, pela primeira vez no Brasil, a área plantada com cultivares transgênicas será maior do que com cultivares convencionais. A maioria dos países que cultiva PGM criou uma legislação própria de biossegurança, e, no Brasil, todas as etapas de produção de uma PGM devem atender às exigências de biossegurança e à aprovação pela Comissão Técnica de Biossegurança (CTNBio), descritas nas leis nº 8.974/1995 e 11.105/2005.

O desenvolvimento de uma PGM envolve várias áreas de conhecimento, em particular a biologia celular e molecular, e utiliza processos que vão desde a prospecção e o isolamento de genes de interesse até a fenotipagem a campo dos eventos transgênicos mais promissores. A tecnologia dos transgênicos permite que genes oriundos de

qualquer organismo possam ser introduzidos e expressos de forma controlada no genoma vegetal receptor, de modo independente da fecundação, tornando ilimitado o *pool* gênico a ser explorado por essa tecnologia. Assim, a prospecção e a caracterização de genes e moléculas que possam conferir novas características às plantas, e sua disponibilização para programas de melhoramento genético, têm sido prioridade para diferentes equipes. Em particular, nos últimos anos, o sequenciamento e a análise em larga escala do genoma e do transcrito de várias espécies vegetais e de outros organismos têm possibilitado a identificação de novos genes de interesse. Entretanto, até o momento, ainda é relativamente pequena a lista de genes que sejam comprovadamente efetivos e que já tenham sido introgrididos com sucesso em variedades comerciais. A grande maioria das culturas comerciais de transgênicos do mundo contém duas características: resistência a insetos ou tolerância a herbicidas, ou a combinação delas.

Após a prospecção e identificação de um gene de interesse, ele deve ser clonado em um vetor de expressão, e sua função deve ser validada in planta para obtenção da prova de conceito. O gene-candidato pode ser superexpresso ou silenciado em plantas-modelo, como *Arabidopsis thaliana*, fumo (*Nicotiana tabacum*) ou arroz (*Oryza sativa*) ou diretamente na planta-alvo. Para tal, é necessário o uso de protocolos eficientes de transformação, a incorporação adequada do transgene no genoma da planta e sua correta expressão nos tecidos-alvo. Uma posterior avaliação fenotípica acurada dos eventos transgênicos que se mostrarem