

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Ministério da Agricultura e do Abastecimento*

**Manual de Transformação Genética de**  
**PLANTAS**

**Editoras**  
**Ana Cristina Miranda Brasileiro**  
**Vera Tavares de Campos Carneiro**

*Serviço de Produção de Informação-SPI  
Brasília, DF  
1998*

*Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na*

**Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

SAIN Parque Rural — Av. W3 Norte (final)

CEP 70770-900 — Brasília, DF

Tel.: (061) 340-3600

Fax: (061) 340-3624

**Embrapa Produção de Informação**

SAIN Parque Rural — Av. W3 Norte (final)

Caixa Postal 040315

CEP 70770-901 — Brasília, DF

Tel.: (061) 348-4236

Fax: (061) 272-4168

**Coordenação editorial**

Embrapa Produção de Informação

**Tratamento editorial**

Zenaide Paiva do Rêgo Barros

**Revisão**

Corina Barra Soares

**Normalização bibliográfica**

Zenaide Paiva do Rêgo Barros

Maria Regina Jorge Soares

**Ilustrações**

Rodolfo Bezerra Batista

**Fotos do texto**

Arquivo da Embrapa Recursos Genéticos  
e Biotecnologia e Embrapa Hortaliças

**Capa e projeto gráfico**

Carlos Eduardo Felice Barbeiro

**1ª edição**

1ª impressão (1998): 2.000 exemplares

CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.  
Embrapa. Serviço de Produção de Informação-SPI.

Brasileiro, Ana Cristina Miranda.

Manual de transformação genética de plantas / editado por Ana Cristina  
Miranda Brasileiro ; Vera Tavares de Campos Carneiro. — Brasília: Embrapa-  
SPI/Embrapa-Cenargen, 1998.

309p. ; il.

ISBN 85-7383-030-1

1. Planta-Genética-Transformação. 2. Planta-Engenharia Genética. I. Carneiro,  
Vera Tavares de Campos, ed. II. Título.

CDD 581.87322

© Embrapa 1998

# Agradecimentos

*Este Manual é o resultado de um trabalho para o qual contribuíram muitas pessoas. A elas agradecemos o apoio irrestrito, e, em particular, ao Chefe Geral da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Dr. Afonso Celso Candeira Valois, pelo constante incentivo ao nosso projeto.*

*Nossa gratidão aos colegas que, com sua vasta experiência na área, participaram da revisão dos capítulos do livro: Anamélia Lorenzetti Bocca (UnB), Elisabeth Mansur (UERJ), Eugen Silvano Gander (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia), Jacqueline Gusmão (UFRJ), José Manuel Cabral de Sousa Dias (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia), Luzia Helena Correia Lima (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia), Márcio Alves Ferreira (UFRJ), Mauro Carneiro (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia) e Sofia Daher (CNPq/MCT).*

*Ao CNPq agradecemos reiteradamente as bolsas de pesquisa concedidas.*

*Os protocolos deste Manual foram reproduzidos por alguns estagiários e pesquisadores das áreas de Biologia Celular e Molecular da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. A eles, nosso reconhecimento pelo entusiasmo e pelo empenho com que realizaram a tarefa.*

*A Rodolfo B. Batista, estudante de Ciências da Computação da Universidade de Brasília (UnB), pela paciência e dedicação, ao transformar rabiscos em ilustrações.*

*A edição deste livro não seria possível sem o rigor e a competência com que os autores se dedicaram à redação dos capítulos, acatando de boa vontade as sugestões propostas. A eles, nossos agradecimentos.*

*Saudades do colega e amigo Roberto de Bem, que com todos nós compartilharia a satisfação de ver este trabalho realizado.*

*A Lúcio e Mauro, Marcos e Gabriel, pelo incentivo, compreensão e, principalmente, pelo tempo roubado, dedicamos este trabalho.*

# Apresentação

De uma maneira geral, o Brasil é considerado um país de megadiversidade biológica, ostentando cerca de 20% da variabilidade genética de plantas, animais e microorganismos existentes no planeta. Somente em relação às plantas superiores, nosso país possui cerca de 55 a 60 mil espécies, o que corresponde a algo em torno de 22% do total aproximado das 250 mil espécies que existem em todo o globo terrestre. Nos recursos genéticos componentes da biodiversidade reside a grande base biológica para a utilização de genes com vistas à geração de plantas transgênicas e de outras tecnologias de ponta doadas pela biotecnologia.

Essa enorme diversidade de indivíduos na natureza aliada às metodologias disponíveis, ao pessoal treinado e à infra-estrutura adequada colaboraram para o desenvolvimento da tecnologia da transformação genética de plantas, que permite que genes de interesse sejam introduzidos em diferentes espécies vegetais, independentemente da barreira de isolamento reprodutivo. O impacto dessa tecnologia sobre o melhoramento genético de plantas e sobre a pesquisa básica é considerável, pois novos genótipos podem ser criados de forma dirigida aos interesses da agricultura sustentável e em curto tempo. Plantas transgênicas, cultivadas em alguns países, em cerca de 13 milhões de hectares, vêm sendo comercializadas e utilizadas para a determinação de funções e a regulação de genes isolados.

Nos grandes centros de pesquisa agrônômica do mundo atual, diferentes grupos de pesquisadores estão voltados para a prospecção de genes de interesse, existentes em plantas, animais e microorganismos, e sua transferência principalmente para plantas importantes para a alimentação e a agricultura, visando melhorar a qualidade e a produtividade, e reduzir o impacto ambiental causado por produtos agroquímicos. Com essa perspectiva, desde 1981 a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia desenvolve pesquisas em biotecnologia agropecuária, tornando disponíveis tecnologias, produtos, processos e serviços inovadores para a agricultura brasileira.

Este livro reúne os métodos básicos de biologia celular e molecular utilizados na transformação genética de plantas, ao alcance da compreensão de estudantes e profissionais interessados no tema. Assim, é com grande satisfação que oferecemos este Manual à comunidade técnico-científica e às instituições públicas e privadas, na certeza de que o esforço despendido pelas editoras e pelos autores será da maior valia para o agronegócio brasileiro.

**Afonso Celso Candeira Valois**

Chefe-Geral

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

# Sumário

<b>Prefácio</b>	<b>11</b>	<b>Capítulo 5</b>	<b>75</b>
<b>Introdução à Transformação Genética de Plantas</b>	<b>13</b>	<b>Interação <i>Agrobacterium</i> - Hospedeiro</b>	<b>75</b>
Referências	16	1 Introdução	76
<b>Capítulo 1</b>		2 Inoculação <i>in planta</i> de <i>Agrobacterium</i>	79
<b>Isolamento de Vetores para Transformação Direta</b>	<b>17</b>	3 Co-cultura com linhagens selvagens de <i>A. tumefaciens</i>	83
1 Introdução	18	4 Inoculação de <i>A. rhizogenes</i> em cenoura	85
2 Preparação de células componentes de <i>Escherichia coli</i> e transformação por choque térmico	21	5 Detecção de opinas	86
3 Preparação de células componentes de <i>Escherichia coli</i> e transformação por eletroporação	22	6 Referências	89
4 Isolamento de plasmídeo	24		
5 Purificação por gradiente de cloreto de céσιο	26	<b>Capítulo 6</b>	
6 Purificação por precipitação com polietileno glicol (PEG)	29	<b>Transferência de Vetores para <i>Agrobacterium</i></b>	<b>93</b>
7 Verificação do perfil de restrição do DNA plasmidial	31	1 Introdução	94
8 Referências	31	2 Conjugação triparental	99
<b>Capítulo 2</b>		3 Eletroporação	101
<b>Eletroporação de Protoplastos</b>	<b>35</b>	4 Choque térmico	103
1 Introdução	36	5 Extração de DNA total de <i>Agrobacterium</i>	104
2 Isolamento e eletroporação de protoplastos de fumo	38	6 Miniextração de DNA plasmidial de <i>Agrobacterium</i>	106
3 Análise da expressão transiente de genes repórter	43	7 Referências	107
4 Cultura e regeneração dos protoplastos eletroporados	44		
5 Referências	47	<b>Capítulo 7</b>	
<b>Capítulo 3</b>		<b>Co-cultura com Linhagens Desarmadas de <i>Agrobacterium</i></b>	<b>111</b>
<b>Biobalística</b>	<b>51</b>	1 Introdução	112
1 Introdução	52	2 Co-cultura com fragmentos foliares de fumo	116
2 Preparação do material vegetal	54	3 Observações	121
3 Esterilização e precipitação de DNA sobre as micropartículas	55	4 Referências	123
4 Bombardeamento	59		
5 Desenvolvimento de plantas: seleção, cultura das brotações e aclimação das plântulas	61	<b>Capítulo 8</b>	
6 Referências	63	<b><math>\beta</math>-Glucuronidase (GUS)</b>	<b>127</b>
<b>Capítulo 4</b>		1 Introdução	128
<b>Cultivo e Conservação de <i>Agrobacterium</i></b>	<b>65</b>	2 Ensaio histoquímico	131
1 Introdução	66	3 Ensaio fluorimétrico	133
2 Cultivo da bactéria	68	4 Ensaio espectrofotométrico	136
3 Conservação a médio prazo	70	5 Cálculo da atividade específica de GUS	136
4 Conservação a longo prazo	71	6 Referências	139
5 Referências	72		
		<b>Capítulo 9</b>	
		<b>Neomicina Fosfotransferase II (NPT II)</b>	<b>143</b>
		1 Introdução	144
		2 Detecção da atividade da NPT II através do ensaio <i>dot blot</i>	146
		3 Referências	152

<b>Capítulo 10</b>			
<b>Cloranfenicol Acetiltransferase (CAT)</b>	<b>155</b>		
1 Introdução	156		
2 Detecção da atividade da CAT	158		
3 Referências	161		
<b>Capítulo 11</b>			
<b>Extração de DNA de Tecidos Vegetais</b>	<b>163</b>		
1 Introdução	164		
2 Método CTAB	167		
3 Miniextração para PCR	170		
4 Método Dellaporta modificado	171		
5 Purificação do DNA por gradiente de CsCl	172		
6 Quantificação de ácidos nucléicos	174		
7 Referências	175		
<b>Capítulo 12</b>			
<b>Identificação de Plantas Transgênicas por PCR</b>	<b>179</b>		
1 Introdução	180		
2 PCR e análise em gel de agarose	185		
3 Referências	188		
<b>Capítulo 13</b>			
<b>Preparação da Sonda</b>	<b>191</b>		
1 Introdução	192		
2 Marcação de sonda radioativa por <i>random primer</i>	197		
3 Marcação de sonda não-radioativa por <i>random primer</i>	200		
4 Referências	202		
<b>Capítulo 14</b>			
<b>Análise da Integração do DNA pela Técnica Southern Blot</b>	<b>205</b>		
1 Introdução	206		
2 Digestão do DNA total e separação em gel de agarose	210		
3 Transferência e fixação do DNA à membrana	212		
4 Pré-hibridização e hibridização	214		
5 Cálculo do número de cópias de transgenes	217		
6 Referências	221		
<b>Capítulo 15</b>			
<b>Análise de RNA pela Técnica Northern Blot</b>	<b>223</b>		
1 Introdução	224		
2 Isolamento de RNA total (método final)	227		
3 Eletroforese de RNA em gel desnaturante	230		
4 Transferência e fixação de RNA em membrana	232		
		5 Hibridização com sonda radioativa	233
		6 Hibridização com sonda não-radioativa	236
		7 Referências	237
		<b>Capítulo 16</b>	
		<b>Detecção de Proteínas pela Técnica ELISA</b>	<b>239</b>
		1 Introdução	240
		2 Extração de proteínas totais	243
		3 ELISA-indireta	244
		4 ELISA-direta	246
		5 ELISA-sanduiche	246
		6 Observações	247
		7 Preparação de anticorpo conjugado à fosfatase alcalina	248
		8 Referências	249
		<b>Capítulo 17</b>	
		<b>Detecção e Análise de Proteínas pela Técnica Western Blot</b>	<b>251</b>
		1 Introdução	252
		2 Extração e quantificação de proteínas	255
		3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)	256
		4 Transferência para a membrana	259
		5 Bloqueio, incubação com anticorpo e detecção	263
		6 Referências	266
		<b>Apêndice I - Meios para Crescimento de Bactéria</b>	<b>269</b>
		Referências	271
		<b>Apêndice II - Meios de Cultura de Plantas e Reguladores de Crescimento</b>	<b>273</b>
		Referências	276
		<b>Apêndice III - Antibióticos</b>	<b>277</b>
		Referências	278
		<b>Apêndice IV - Soluções e Tampões</b>	<b>279</b>
		Introdução	280
		<b>Apêndice V - Plantas Transgênicas</b>	<b>285</b>
		Referências	289
		<b>Apêndice VI - Normas da CIBio</b>	<b>295</b>
		<b>Apêndice VII - Plano de Radioproteção</b>	<b>301</b>
		Introdução	302
		<b>Apêndice VIII - Abreviaturas</b>	<b>307</b>

# Prefácio

*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](mailto: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**