

Metodologias para Transformação Genética de Plantas-Modelo

Termos para Indexação: transformação de plantas, planta transgênica, alface, fumo, banana.

Index Terms: Plant transformation, transgenic plants, lettuce, tobacco, banana.

A transformação genética de plantas tem sido empregada com os mais diversos objetivos. Por exemplo, plantas geneticamente modificadas (PGM) têm sido geradas na tentativa de identificar função de genes e gerar linhagens com características agrônômicas úteis para os programas de melhoramento. Embora a transformação de plantas seja rotina para muitas espécies vegetais ainda apresenta uma eficiência baixa para algumas espécies importantes, como feijão, café e algodão (Aragão 2002). Assim, estudos relacionados à determinação da função de genes ainda estão limitados para estas espécies e devem, quando possível, ser conduzidos em plantas modelo. Neste sentido a escolha da planta modelo é fundamental.

Plantas de fumo são largamente utilizadas por serem facilmente transformadas, terem ciclo curto e produzirem grande quantidade de sementes (centenas de sementes por cápsula) (Brasileiro 1998).

Plantas de alface podem ser utilizadas como modelo para expressão de antígenos (vacinas) em folhas, uma vez que é uma planta consumida *in natura*. Além disso, alface é uma planta de crescimento rápido, florescimento em condições de dia longo e produz muitas sementes por espigueta. Sua aclimação é relativamente fácil e em poucos meses pode-se obter sementes R1 de eventos de transformação. Além disso, pode ser usada para avaliação testes de toxicidade ambiental (Curtis *et al.* 1994; Bowers *et al.* 1997; Lovato *et al.* 1998).

Plantas de banana têm ciclo longo e podem ser utilizadas para estudo de genes em longo prazo e envolvidos com a formação de frutos. Apesar do longo tempo para obtenção do material inicial, a suspensão obtida é facilmente transformada e um grande número de eventos de transformação pode ser obtido. A bananeira apresenta outra vantagem na produção de grande quantidade de folhas (Matsumoto *et al.* 2002).

A seguir descrevemos um protocolo para obtenção de plantas-modelo geneticamente modificadas de alface, banana e fumo.

Metodologia para transformação genética da alface (*Lactuca sativa*): co-cultura de *Agrobacterium* e cotilédones

I - Germinação das sementes para obtenção dos cotilédones.

1. Esterilizar sementes de alface com hipoclorito 1% e Tween-20 por 15 minutos.
2. Enxaguar 6 vezes em água estéril e colocar as sementes para germinar em placa de Petri ou frascos Magenta contendo filtros de papel estéril umedecidos em meio MS líquido autoclavado. Deixar 2 dias sob luz constante para a germinação das sementes sob fotoperíodo de 16 horas.

II - Crescimento das bactérias para a co-cultura

1. Iniciar a um pré-inóculo oriundo de colônia isolada de *Agrobacterium* para crescer em 3 mL de meio LB a 27° C e 150 rpm durante o dia.
2. Ao final do dia adicionar 10 µL de pré-inóculo em 10 mL de meio LB contendo os antibióticos apropriados para crescer a 27° C e 150 rpm num Erlenmeyer de 50 mL por uma noite.

Brasília, DF
Dezembro, 2002

Autores

Francisco José Lima Aragão
PhD, Embrapa Recursos
Genéticos e Biotecnologia.

Marcelo de Oliveira Santos
M.Sc., Bolsista CAPES/
Doutorando – Universidade de
Brasília

Lucymeire Souza Moraes
M.Sc. Bolsista / Universidade
Católica de Brasília

Eduardo Romano
M.Sc. Embrapa Recursos
Genéticos e Biotecnologia

3. Medir a absorbância (A_{600}) em um espectrofotômetro que deve estar entre 0,5 – 0,6.
4. Neste ponto, transferir 3 mL da suspensão bacteriana para uma placa de Petri estéril.
5. Em seguida, retirar os cotilédones com o auxílio de uma pinça e bisturi estéreis. Transferir os cotilédones de 2 dias para co-cultura líquida por 15 minutos.
6. Transferir os cotilédones com o auxílio de uma pinça estéril para uma placa de Petri contendo meio MS suplementado com BAP (0,1 mg/L) e AIB (0,1 mg/L).
7. Deixar em co-cultura sólida por 2 dias sob fotoperíodo de 16 horas.

III - Seleção de transformantes

1. Depois de dois dias, transferir os cotilédones para MS sólido suplementado com 0,1 mg/L de BAP e 0,1 mg/L de AIB em placa de Petri contendo cefotaxima (200 mg/L) e higromicina * (10 mg/L) (* canamicina também poderá ser utilizada na concentração de 150 mg/L como agente seletivo). (Fig. 1).
2. Subcultivar os explantes a cada 15 dias no meio descrito no item III-1. Entre 30 e 40 dias, os primeiros calos transgênicos estarão visíveis. } Separar os mesmos com um bisturi e pinça estéreis e subcultivar em meio MS descrito acima até o surgimento das primeiras brotações sob fotoperíodo de 16 horas.

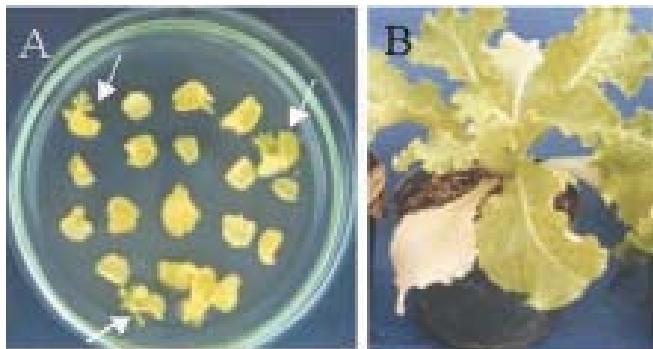


Fig. 1. Transformação genética de alface. A) Regeneração de brotos transgênicos em cotilédones (setas). B) Planta transgênica aclimatada.

IV – Elongação das brotações

1. Transferir os calos com brotações para frascos Magenta contendo meio MS suplementado com BAP (0,1 mg/L), cefotaxima (200 mg/L) e o agente seletivo para induzir a elongação a cada 15 - 30 dias sob fotoperíodo de 16 horas.

OBS: Neste momento é interessante usar frascos Magenta com tampa com poro para troca de gases a fim de evitar o acúmulo de etileno. Pode-se também usar 7 g/L de ágar para evitar vitrificação muito comum nesta fase.

V - Enraizamento das brotações *in vitro*

1. Transferir as brotações alongadas não vitrificadas entre 4 e 6 cm de comprimento para frascos Magenta contendo MS $\frac{1}{2}$ sob fotoperíodo de 16 horas.

OBS: Pode-se usar frascos Magenta de tampa com respirador para evitar o acúmulo de etileno melhora o vigor das plantas e ágar a 7 g/L. Estes procedimentos facilitam o enraizamento e conseqüentemente aclimação.

VI – Aclimação

A aclimação da alface deve acontecer quando as plantas tiverem emitido 2 pares de folhas novas e apresentar um sistema radicular com pelo menos 4 raízes vigorosas. Transferir para um pote plástico e substrato agrícola. Umedecer o substrato e transferir a plântula. Colocar um saco plástico cobrindo o copo e manter umedecida durante 1 ou duas semanas até que a planta se estabeleça (Fig.1).

Metodologia para obtenção de plantas transgênicas de Banana (*Musa spp.*) a partir de células embriogênicas em suspensão

I. Preparação da Suspensão celular

1. Cultivar o meristema apical da bananeira em meio contendo MS suplementado com picloram (414 μ M); 2ip (492 μ M); L-arginina (300 μ M); MES (15,3 mM); carvão ativado (0,2%) no escuro a $26 \pm 2^\circ$ C por 6 meses seguidos sem trocar de placa até formar um calo amarelado friável.
2. O calo formado deve ser subcultivado semanalmente em meio MS líquido no escuro, suplementado com 5 μ M de 2,4-D, 1 μ M de zeatina e 10mg/L de ácido ascórbico sob agitação de 120 rpm.
3. Utilizar células embriogênicas em suspensão de banana cv. Maçã (AAB) com 3 ou 4 dias após subcultura.
4. Ajustar a concentração das células para 6×10^4 clusters de células/mL utilizando um hematocítmetro.
5. Coletar 400ml da suspensão celular com uma micropipeta e colocadas em papel filtro sob meio MS sólido com 8 g/L Phytigel sem reguladores de crescimento antes do bombardeamento.

II- Preparação das partículas para bombardeamento (Aragão *et al.* 1996).

1. Suspender micropartículas de tungstênio M10 (60 mg/mL) misturando vigorosamente em "Vórtex" por 15 minutos.
2. Pipetar uma alíquota de 50 μ L de micropartículas em um tubo de microcentrifuga novo.
3. Adicionar 5-8 μ L de vetor * (1 μ g/ μ L) de bombardeamento as micropartículas. (* em geral são

usados plasmídios circulares ou linearizados de até 15 kb).

4. Adicionar 50 μL de CaCl_2 2,5M e homogeneizar rapidamente.
5. Adicionar 25 μL de espermidina (Sigma S-0266) 0,1 M e homogeneizar rapidamente.
6. Incubar sob agitação lenta em "Vórtex" durante 10 minutos.
7. Centrifugar por 10 segundos e descartar o sobrenadante cuidadosamente.
8. Adicionar 150 μL de etanol absoluto, resuspende e centrifugar 10 segundos. Descartar o sobrenadante e repetir o processo mais uma vez.
9. Suspender as partículas em 25 μL de etanol absoluto e aplicar uma alíquota de 3,8 μL dessa suspensão sobre a membrana carreadora e deixar secar por 30 minutos antes de bombardear.

III- Bombardeamento e seleção das células transformadas

1. Posicionar as placas contendo as células preparadas no item I, introduzir no aparelho de alta pressão de gás hélio e submetê-las ao bombardeamento de micropartículas recobertas com o vetor (1200 psi; 9 cm da membrana de retenção; vácuo).
2. Depois de bombardeadas as células devem ser transferidas para outra placa contendo meio com mesma composição do anterior, onde devem ser cultivadas por 10 dias ($28 \pm 2^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 16 horas).
3. Após este período, transferir para frascos Erlenmeyer contendo meio MS líquido suplementado com $5\mu\text{M}$ de 2,4-D, $1\mu\text{M}$ de zeatina e 10mg/L de ácido ascórbico, utilizando o herbicida imazapyr na concentração de $2\mu\text{M}$ para selecionar as células transformadas ($28 \pm 2^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 16 horas).
4. Subcultivar semanalmente com o agente seletivo sob agitação a 120 rpm em sala de crescimento ($28 \pm 2^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 16 horas), durante 4 semanas. Após este período surgem os pró-embriões (Fig. 2).

IV- Regeneração dos pró-embriões

1. Transferir os pró-embriões para meio MS sólido com 2 g/L de Phytigel suplementado com $2\mu\text{M}$ de BAP e $2\mu\text{M}$ de IAA para desenvolvimento da parte aérea (Fig. 2). Aproximadamente 2 meses após o período de seleção ocorre o desenvolvimento de embriões em multibrotações.
2. Os embriões devem ser individualizados em frascos Magenta para formarem plântulas (Fig. 2).
3. Após o período de dois meses, os embriões germinam e atingem o tamanho suficiente para retirada de folhas para serem analisadas por PCR.

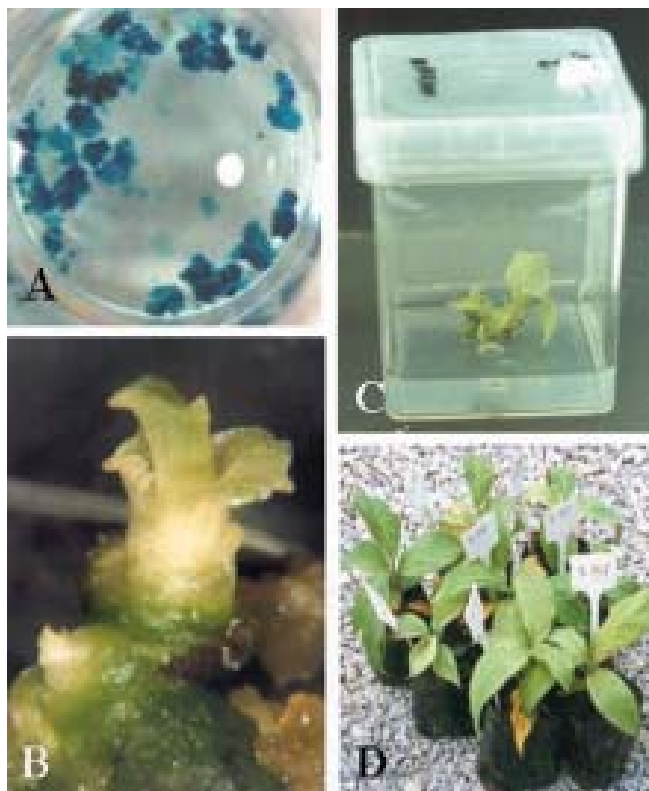


Fig. 2. Transformação genética de bananeira. A) Microcalos transgênicos oriundos de suspensão celular expressando o gene *gus*. B) Embriões de banana (cv. Maçã) que passaram pelo processo de seleção dando origem a brotos em meio de regeneração. C) Plântulas de banana regeneradas. D) Plantas aclimatadas.

IV – Aclimação das plantas transgênicas

A aclimação da bananeira deve acontecer quando as plantas apresentarem folhas e raízes vigorosas (Figura 2). Nesse ponto os embriões ocorrem em multibrotação e devem ser individualizados. Em seguida, transferir para um pote plástico e substrato agrícola. Umedecer o substrato e transferir a plântula. Colocar um saco plástico cobrindo o copo e manter umedecida até que a planta se estabeleça.

Metodologia para transformação genética de Tabaco (*Nicotiana tabacum*)

I – Preparação da cultura de *Agrobacterium*

1. Cem microlitros (100 μL) de cada linhagem de *Agrobacterium* EHA105 contendo os vetores binários contendo os genes para seleção (gene *bar* que confere resistência ao herbicida fosfinotricina ou glifosinato de amônio; gene *hpt* que confere resistência ao antibiótico higromicina; gene *nptII* que confere resistência ao antibiótico canamicina; Aragão & Brasileiro 2002), são inoculada em 10 mL de meio LB contendo os antibióticos 100 mg/L

rifampicina e 50 mg/L estreptomicina (ou outro antibiótico adequado para a cepa de *Agrobacterium* utilizada)

2. A cultura deve ser feita por 16 h a 28°C sob agitação a 100 rpm até a fase exponencial de crescimento ($A_{600nm} = 1,5$).
3. As culturas são então diluídas para uma $A_{600nm} = 0,1$.

II- Preparação das plântulas de fumo e co-cultura.

1. Esterilizar sementes de tabaco (cv. Wisconsin ou Xanthi *) com hipoclorito 1% e Tween-20 por 15 minutos. Enxaguar 6 vezes em água estéril. (* Outros cultivares podem também ser utilizadas com sucesso).
2. As sementes são colocadas para germinar em meio MS.
3. Cortar explantes foliares de folhas jovens em quadrados de 1 cm x 1 cm com o auxílio de uma lâmina de bisturi estéril, sobre uma placa de Petri umedecida com água deionizada estéril para manter os explantes hidratados.
4. Adicionar 1 mL da cultura diluída de *Agrobacterium* a 10 mL de LB líquido.
5. Adicionar os explantes foliares. Manter a co-culturas à temperatura ambiente por 5 minutos sob leve agitação. Transferir os explantes para placas de Petri com papel de filtro estéril para retirar o excesso de bactérias.
6. Transferir os explantes para placas contendo meio MS sólido suplementado com 1 mg/L de BAP por 48 horas a 28°C, no escuro, mantendo a face adaxial do explantes em contato com o meio.

III- Regeneração de plantas transformadas

1. Após a co-cultura, transferir os explantes para meio de regeneração (MS suplementado com 2 mg/L de BAP e 300 mg/L de cefotaxima). Manter as placas em câmara de crescimento sob fotoperíodo de 16 h à temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$. As placas com meio de regeneração devem conter agentes seletivos adequados (2,0 mg/L de fosfotricina (PPT), quando se usa o gene *bar*; 50 mg/L de higromicina-B, quando se usa o gene *hpt*; 50 mg/L de canamicina, quando se usa o gene *nptII*).
2. Cultivar os explantes por duas semanas. Separar os calos formados e transferir para novo meio de regeneração contendo agente seletivo.
3. Transferir os brotos regenerados, com aproximadamente 2 cm, para frascos contendo meio de enraizamento (meio MS suplementado com 0,1 mg/L de ANA contendo o agente seletivo adequado. Manter os brotos neste meio até que ocorra o enraizamento).
4. Após três semanas, transferir as plantas enraizadas (com 8-10 cm de comprimento) para sacos de terra

adubada e estéril (5 L).

5. Cobrir as plantas com sacos de plástico transparente, com furos, para permitir a aclimação em casa de vegetação com condições de temperatura (27-30°C) e umidade controladas (70-80%).
6. Após 4 dias remover os sacos plásticos. Manter a terra sempre úmida. As plantas devem ser mantidas sob estas condições até a floração.

Anexos

Meio de cultura para plantas MS (Murashige & Skoog, 1962).

Componentes	MS (mg/L)
Nitrato de amônio (NH_4NO_3)	1.650
Nitrato de potássio (KNO_3)	1.900
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (cloreto de cálcio)	440
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (sulfato de magnésio)	370
KH_2PO_4 (Fosfato de potássio)	170
ZnSO_4 (Sulfato de zinco)	8,60
H_3BO_3 (ácido bórico)	6,20
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Sulfato de manganês)	22,30
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Sulfato de cobre)	0,025
KI (Iodeto de potássio)	0,83
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Molibdato de sódio)	0,25
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Cloreto de cobalto)	0,025
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sulfato de ferro)	27,80
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (EDTA dissódico)	37,30
Inositol	100
Ácido nicotínico	0,50
Piridoxina-HCl	0,50
Tiamina-HCl	0,10
Glicina	2
Sacarose	30.000
Ágar	6.000

Ajustar o pH para 5,8.

Meio de cultivo de bactéria LB (Miller, 1972)

Extrato de levedura 5 g/L; Triptona 10 g/L; NaCl 10 g/L; pH 7,2. Autoclavar por 20 minutos a 120°C. Para meio sólido, acrescentar 1,7% (p/v) de ágar bacteriológico.

Dissolução de antibióticos e reguladores de crescimento

Nome	Solvente	Esterilização	Estocagem
Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)	NaOH 1N	Autoclavagem	0 a 5° C
Ácido indol butírico (AIB)	NaOH 1N	Autoclavagem	> 0° C
Ácido naftaleno acético (ANA)	NaOH 1N	Autoclavagem	0 a 5° C
2 isopentenil adenina (2ip)	NaOH 1N	Autoclavagem	> 0° C
6- benzilaminopurina (BAP)	NaOH 1N	Autoclavagem	0 a 5° C
Zeatina	NaOH 1N	Filtroesterilização	0 a 5° C
Cinetina (KIN)	NaOH 1N	Autoclavagem	0 a 5° C
Picloram	NaOH 1N	Autoclavagem	0 a 5° C
Canamicina (Sigma)	H ₂ O	Filtroesterilização	> 0° C
Higromicina-B (Sigma)	H ₂ O	Filtroesterilização	0 a 5° C
Fosfinotricina (PPT)	H ₂ O	Filtroesterilização	0 a 5° C
Estreptomina	H ₂ O	Filtroesterilização	> 0° C
Cefatoxima (Claforan [®])	H ₂ O	Filtroesterilização	> 0° C
Rifampicina	DMSO	Filtroesterilização	0 a 5° C

OBS: para dissolver colocar uma gota de NaOH sobre o pó e em seguida completar o volume para a concentração desejada.

Referências Bibliográficas

ARAGÃO F. J. L. Development of transformation methods toward producing transgenic plants with abiotic stress tolerance. **JIRCAS Working Report Genetic Engineering of Crop Plants for Abiotic Stress**, v. 23, p. 35-42, 2002.

ARAGÃO, F. J. L.; BARROS, L. M. G.; BRASILEIRO, A. C. M.; RIBEIRO, S. G.; SMITH, F. D.; SANFORD, J. C.; FARIA, J. C.; RECH, E. L. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 93, p. 142-50, 1996.

ARAGÃO, F.; BRASILEIRO, A. C. M. Positive, negative and marker-free strategies for transgenic plant cell selection. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Brasília, v. 14, p. 1-10, 2002.

BOWERS, N.; PRATT, J. R.; BEESON, D.; LEWIS, M. Comparative evaluation of soil toxicity using lettuce seeds and soil ciliates. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Elmsford, NY, v. 16, p. 207-213, 1997.

BRASILEIRO, A. C. M. Co-cultura com linhagens desarmadas de *Agrobacterium*. In: BRASILEIRO, A. C. M.;

CARNEIRO, V. T. de C (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI; EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 309 p.

CURTIS, I. S.; POWER J. B.; BLACKHALL, N. W.; LAAT, A. M. M.; DAVEY, M. R. Genotype-independent transformation of lettuce using *Agrobacterium tumefaciens*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, UK, v. 45, p. 1441-1449, 1994.

LOVATO, F. A.; BEZERRA I. C.; RESENDE, R. O.; FERREIRA, A. T.; TORRES, A. C. Genetic transformation of lettuce cv. Veronica by *Agrobacterium tumefaciens*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 10, p. 219-224, 1998.

MATSUMOTO, K.; MORAIS, L. S.; VIANNA, G. R.; ARAGÃO, F.; RECH, E. L. Genetic transformation of banana embryogenic cells through particle bombardment using a herbicide resistance gene as selectable marker. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 575, p. 61-67, 2002, 2002.

MILLER, J. H. **Experiments in molecular genetics**. New York: Cold Spring Harbor. 1972.

Circular
Técnica, 15

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Serviço de Atendimento ao Cidadão
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) -
Brasília, DF. CEP 70.770-900 - Caixa Postal 02372
PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624
<http://www.cenargen.embrapa.br>
e.mail: sac@cenargen.embrapa.br

1ª edição

1ª impressão (2002): 150 unidades

Comitê de
publicações

Presidente: José Manuel Cabral de Sousa Dias
Secretário-Executivo: Miraci de Arruda Câmara Pontual
Membros: Antônio Costa Allem

Marcos Rodrigues de Faria

Marta Aguiar Sabo Mendes

Sueli Correa Marques de Mello

Vera Tavares Campos Carneiro

Expediente

Supervisor editorial: Miraci de Arruda Câmara Pontual

Normalização Bibliográfica: Maria Alice Bianchi

Editoração eletrônica: Alysson Messias da Silva