

**Universidade de São Paulo**  
**Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**  
**Disciplina: Genética Molecular (LGN0232)**

**Roteiro de Aula Prática**

**I. Observação de células bacterianas previamente transformadas pelo método de choque térmico e eletroporação.**

**II. Transformação genética de *Arabidopsis thaliana* pelo método *Floral-dip***  
Clough & Bent (1998), *The Plant Journal* 16:735-743

1. Crescer *Agrobacterium tumefaciens* em meio líquido contendo antibiótico de seleção até a fase estacionária de crescimento ( $OD_{600} = 0,8-1,0$ )
2. Centrifugar cultura de *A. tumefaciens* por 5 min a 4000 rpm
3. Descartar sobrenadante e ressuspender *pellet* em solução contendo 5% sacarose e 0,02% Silwet L-77 (surfactante)
4. Mergulhar flores em estágio inicial de desenvolvimento na suspensão de *A. tumefaciens*
5. Manter plantas no escuro em câmara úmida por 24 h e repetir todo procedimento após 7 dias

**III. Transformação genética de tomateiro via *Agrobacterium tumefaciens***

**Material vegetal:** Para os ensaios de transformação genética de tomateiro empregando o gene GUS serão empregados os genótipos Micro-Tom (MT).

**Plasmídeos e condições de cultura de *A. tumefaciens*:** o protocolo de Pino et al. (2010) é o recomendado. Colônias de *Agrobacterium* EHA105 (pCAMBIA2301 – foto 1), crescidas por dois dias em placas serão inoculadas em 50 mL do meio LB suplementado com kanamicina ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ) e rifampicina ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), e crescidas sob agitação constante de 120 rpm a 28°C overnight. Após esse período, a suspensão será colocada num tubo estéril e sedimentada a 1.900 rpm a 20°C por 15 min. Em seguida, o sobrenadante será descartado e a *Agrobacterium* ressuspensa em meio MS líquido, suplementado com sacarose ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ) e a  $OD_{600\text{nm}}$  ajustada para 0,2-0,3. 10 min antes do co-cultivo,  $100 \mu\text{M}$  de acetosiringona foi adicionado à suspensão de *Agrobacterium*.

**Inoculação e co-cultura:** Explantes cotiledonares serão retirados de plântulas com 8 dias de idade e colocados em placas de Petri contendo meio MS suplementado com vitaminas B5; sacarose ( $30 \text{ g L}^{-1}$ );  $0,4 \mu\text{M}$  de ANA;  $100 \mu\text{M}$  de acetosiringona. Uma ou duas gotas da suspensão bacteriana serão colocadas sobre os explantes. Após 10 min, a suspensão será removida, e para a retirada do excesso de *Agrobacterium*, duas folhas de papel filtro estéril serão colocadas sobre os explantes. O co-cultivo será conduzido em

meio

MS sólido suplementado com vitaminas B5; sacarose ( $30 \text{ g L}^{-1}$ );  $0,4 \text{ }\mu\text{M}$  de ANA;  $100 \text{ }\mu\text{M}$  de acetosiringona por 2 dias no escuro a  $25^\circ\text{C}$ .

**Seleção e obtenção das plantas transformadas:** Após esse período, os explantes serão transferidos para meio MS suplementado com vitaminas B5; sacarose ( $30 \text{ g L}^{-1}$ );  $5 \text{ }\mu\text{M}$  de BAP e antibióticos ( $25 \text{ mg L}^{-1}$  meropenem, para controle da *Agrobacterium*, e  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de kanamicina, para seleção das plantas) e serão mantidos em sala de luz sob fotoperíodo de 16 h a  $25^\circ\text{C}$ . A cada duas semanas, os explantes serão transferidos para meio de regeneração novo, suplementado com antibióticos. Quando as gemas adventícias formadas nos explantes estiverem com tamanho maior que 5 mm, elas serão isoladas e transferidas para frascos contendo meio MS suplementado com os mesmos antibióticos. Os brotos serão mantidos in vitro até a formação de raízes e foram aclimatizados.

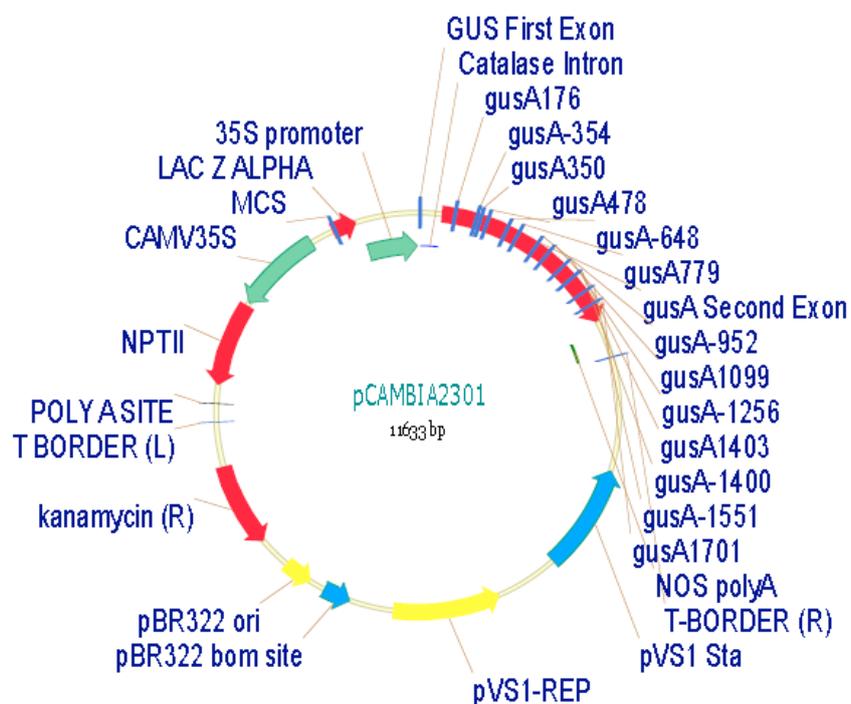


Foto 1. Plasmídeo pCAMBIA 2301.