



BIOTECNOLOGIA VEGETAL

INTRODUÇÃO DE UM GENE DE INTERESSE NUM VETOR BINÁRIO UTILIZANDO A TECNOLOGIA GATEWAY

Protocolo das aulas práticas

Ano letivo 2024/25

Patrick Materatski

Carla Varanda

TÍTULO:

BIOTECNOLOGIA VEGETAL: INTRODUÇÃO DE UM GENE DE INTERESSE NUM VETOR BINÁRIO UTILIZANDO A TECNOLOGIA GATEWAY, Protocolo das aulas Práticas, Ano letivo 2024/25

AUTORES:

Patrick Materatski

Carla Varanda

ENDEREÇO:

Instituto Politécnico de Santarém, Escola Superior Agrária de Santarém – ESAS

Quinta do Galinheiro – S.Pedro, 2001-904 Santarém,

EDITOR: INSTITUTO POLITÉCNICO DE SANTARÉM

COPYRIGHT © 2025

ISBN:

Ano Letivo 2024/25

Unidade Curricular de Biotecnologia Vegetal

Autores:

Carla Varanda

Professora Adjunta

Departamento de Tecnologia Alimentar, Biotecnologia e Nutrição, Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Santarém

Investigadora integrada

CERNAS—Research Centre for Natural Resources, Environment and Society

E-mail: carla.varanda@esa.ipsantarem.pt

Ciência Vitae: <https://www.cienciavitae.pt/061E-C9D5-C76E>

Orcid ID: <http://orcid.org/0000-0002-6915-1793>

Patrick Materatski

Investigador Auxiliar

MED—Instituto Mediterrâneo para a Agricultura, Ambiente e Desenvolvimento & CHANGE—Global Change and Sustainability Institute, IIFA—Instituto de Investigação e Formação Avançada, Universidade de Évora,

E-mail: pmateratski@uevora.pt

Website institucional: <https://www.uevora.pt/pessoas?id=37663>

Ciência Vitae: <https://www.cienciavitae.pt/portal/9010-F718-9E95>

Orcid ID: <https://orcid.org/0000-0001-5769-1963>

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	5
ÍNDICE DE TABELAS.....	6
LISTA DE ACRÓNIMOS.....	7
INTRODUÇÃO.....	8
ETAPA 1 – ORIENTAÇÕES PARA O DESENHO DE PRIMERS ATTB.....	10
ETAPA 2 – PCR PARA INTRODUIR EXTREMIDADES ATTB NO GENE DE INTERESSE...	11
ETAPA 3 – REAÇÃO BP.....	15
ETAPA 4 – REAÇÃO LR.....	19

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do processo de amplificação do gene da GFP por PCR e introdução das sequências attB1 e attB2 nas extremidades da GFP. _____ **Erro! Marcador não definido.**

Figura 2. Ligação BP: introdução da sequência attB1 e attB2 nas extremidades 5' e 3' da GFP no vetor pDONR221. O resultado após esta reação é o vetor pDONR221 com a sequência attL1 e attL2 nas extremidades 5' e 3' da GFP. **Erro! Marcador não definido.**

Figura 3. Ligação LR: transferência da sequência attL1 e attL2 + GFP presentes no vetor pDONR221 para o vetor pK7WG2. O resultado após esta reação é o vetor pK7WG2 com a sequência attR1 e attR2 nas extremidades 5' e 3' da GFP. _____ 18

INDICE DE TABELAS

Tabela 1. Sequências dos primers attB e attB+GFP. Nas sequências GFPattB1 e GFPattB2 os nucleótidos em negrito indicam a sequência attB, os nucleótidos sublinhados são aqueles escolhidos fundir o seu produto de PCR em 'frame' e os nucleótidos em itálico são aqueles referentes as sequências do gene de interesse (GFP). _____ ***Erro! Marcador não definido.***

LISTA DE ACRÓNIMOS

PCR	<i>Reação em Cadeia da Polimerase</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)</i>
GFP	<i>'Green Fluorecence Protein'</i>
LB	<i>Luria Bertani</i>
dNTP	<i>Desoxirribonucleotídeos Fosfatados</i>

INTRODUÇÃO

A Unidade Curricular (UC) de Biotecnologia Vegetal (LBBA1250), é uma UC obrigatória para o 2º ano da Licenciatura em Biologia e Biotecnologia Alimentar. Esta UC compreende, para além das aulas teóricas, uma componente teórico-prática e uma componente de prática-laboratorial, nas quais se pretende que os alunos aprofundem conhecimentos e obtenham competências no método de clonagem, mais especificamente na tecnologia Gateway®, que é um método de clonagem universal baseado nas propriedades de recombinação em local-específico do bacteriófago lambda (Landy, 1989). Esta tecnologia fornece uma forma rápida e altamente eficaz a capacidade de mover sequências de DNA para vários sistemas de vetores para análise funcional de genes e expressão de proteínas (Hartley et al., 2000). Pretende-se ainda que os alunos dominem técnicas de introdução de genes para a expressão de proteínas e silenciamento de genes em plantas indicadoras através de agroinfiltração, tecnologias estas que sustentam os vários domínios da biotecnologia em plantas e seus sistemas e processos. Assim, os protocolos aqui descritos, incluem as principais etapas realizadas num laboratório de biotecnologia vegetal, e uma vez que são transversais em biotecnologia, os estudantes aprendem de forma simples, as principais metodologias usadas rotineiramente num laboratório de biotecnologia vegetal.

Este manual descreve os protocolos a realizar nas aulas práticas no ano letivo de 2024/25.

BIOTECNOLOGIA VEGETAL

Código: LBBA1250

5 ECTS

Área de Ensino: Ciências biológicas

Área Científica: Biologia e Bioquímica

Objetivos de Desenvolvimento Sustentável



REFERÊNCIAS:

Landy, A. (1989). Dynamic, Structural, and Regulatory Aspects of Lambda Site-specific Recombination. *Ann. Rev. Biochem.* 58, 913-949.

Hartley, J. L., Temple, G. F., and Brasch, M. A. (2000). DNA Cloning Using in vitro Site-Specific Recombination. *Genome Research* 10, 1788-1795.

ETAPA 1 – ORIENTAÇÕES PARA O DESENHO DE PRIMERS ATTB

INTRODUÇÃO

Para gerar produtos de PCR adequados para utilização como substratos numa reação de recombinação gateway® bp com um vetor dador, terá de se incorporar locais attB no produto de PCR, neste caso, tal será realizado para o gene da ‘Green Fluorescence Protein’ (GFP) (Haseloff, et al., 1997). Abaixo são fornecidas orientações para ajudar no desenho dos primers de PCR. As sequências attB contém 29 nucleótidos (B1 – forward e B2 – reverse). As sequências attB1 e attB2 são específicas para a introdução da sequência alvo (GFP no nosso caso) no vetor pDONR™221 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Para se introduzir a sequência attB completa no gene da GFP, serão necessários dois PCRs sequenciais.

No primeiro PCR, o primer de PCR, ‘forward’ e ‘reverse’, deve conter cerca de 12 nucleótidos da sequência attB1 ou B2, na extremidade 5’ (forward) e 3’ (reverse), respetivamente, seguido das sequências específicas da GFP (Tabela 1).

A sequência attB1, por exemplo, termina com uma timidina (T). Se se pretender fundir o produto de PCR em ‘frame’ com uma etiqueta N-terminal, o primer deve incluir dois nucleótidos adicionais para manter a grelha de leitura adequada com a região attB1. Estes dois nucleótidos não podem ser AA, AG ou GA, porque estas adições vão criar um codão de terminação.

Tabela 1. Sequências dos primers attB e attB+GFP. Nas sequências GFPattB1 e GFPattB2 os nucleótidos em **negrito** indicam a sequência attB, os nucleótidos sublinhados são aqueles escolhidos fundir o produto de PCR em ‘frame’ e os nucleótidos em *itálico* são referentes às sequências do gene de interesse (GFP).

Nome do primer	Sequência (5'-3')
attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT
attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT
GFPattB1	AAAAAGCAGGCT <u>G</u> <i>CATGGTGAGCAAGGGCGCCGA</i>
GFPattB2	AGAAAGCTGGGT <u>G</u> <i>TCACTTGTACAGCTCATCCATGCC</i>

REFERÊNCIAS:

Haseloff, J.; Siemering, K.R.; Prasher, D.C.; Hodge, S. (1997). Removal of a Cryptic Intron And Subcellular Localization of Green Fluorescent protein are required to mark transgenic arabidopsis plants brightly. Proc. Natl. Acad. Sci. Usa, 94, 2122–2127.

ETAPA 2 – PCR PARA INTRODUIZIR EXTREMIDADES ATTB NO GENE DE INTERESSE

INTRODUÇÃO

O PCR é a técnica que permite amplificar um segmento de DNA, podendo fazer milhões de cópias desta sequência em poucas horas. Uma reação de PCR apresenta três etapas caracterizadas por diferentes temperaturas: (1) desnaturação (90–95 ° C), que separa as duas cadeias de DNA, (2) hibridação de primers específicos (45–60 ° C), que permite o emparelhamento dos primers às suas bases complementares do novo DNA de cadeia simples e (3) extensão do primer usando uma polimerase de DNA que vai fazer uma cópia do DNA alvo a 72 ° C.

O primeiro PCR será realizado para introduzir as sequências parciais attB nas extremidades 5' e 3' (GFPattB1 e GFPattB2, respectivamente) como demonstrado na tabela 1, para o gene da GFP.

O segundo PCR será realizado para introduzir o restante da sequência attB1 e attB2 nas extremidades 5' e 3' (tabela 1), respectivamente, com os primers (attB1 e attB2) do fragmento que foi amplificado no passo anterior com os primers GFPattB1 e GFPattB2. Estes dois PCRs sequenciais permitem que as sequências completas do attB1 e attB2 sejam introduzidas no gene da GFP.

Todas as reações de PCR serão realizadas num volume de 50 µL, contendo 30–80 ng de DNA genómico contendo o gene da GFP ou produto de PCR amplificado com os primers GFPattB1 e GFPattB2.

Todos os produtos dos PCRs serão purificados utilizando o kit de purificação Nzytech (Nzytech, Lisboa, Portugal), conforme as diretrizes do fabricante. As concentrações dos DNAs purificados serão determinadas utilizando um microespectrofotómetro Quawell Q9000 (Quawell Tecnologia, Pequim, China). Os produtos dos resultados dos PCR serão revelados em eletroforese em gel de agarose a 1% para confirmar a amplificação através do tamanho dos fragmentos amplificados nos dois PCRs.

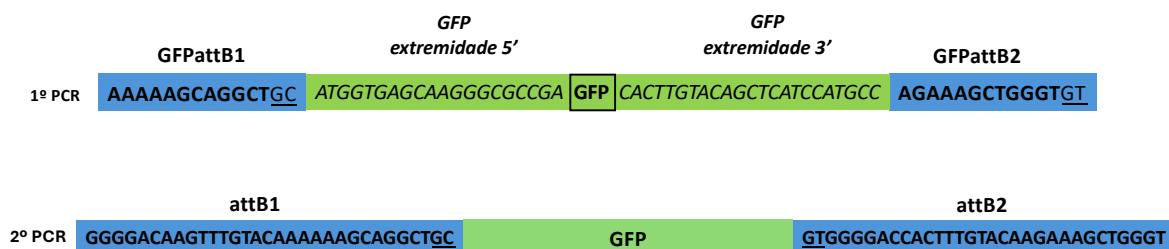


Figura 1. Representação esquemática do processo de amplificação do gene da GFP por PCR e introdução das sequências attB1 e attB2 nas extremidades da GFP.

MATERIAL, REAGENTES E EQUIPAMENTO:

- Centrífuga de bancada

- Espectrofotômetro
- Gelo
- Micropipetas
- Termociclador
- Equipamento de eletroforese

- Água ultrapura
- dNTPs
- DNA total com o gene da GFP e produto do primeiro PCR
- Enzima DNA polimerase (DreamTaq)
- Primer GFPattb1 e attb1 (ambos forward) e GFPattb2 e attb2 (ambos reverse)
- Tampão '10X DreamTaq Green Buffer' (NZYTech)
- 'Greensafe' (NZYTech)
- Agarose
- Tampão TBE 0,5X

PROCOLO EXPERIMENTAL 1:

PCR com primers GFPattb1 e GFPattb2

1. Adicionar:

- 36 μ L água ultrapura
- 5 μ L tampão dream taq 10X
- 1,5 μ L dNTPs
- 2,0 μ L Primer 5' (GFPattb1)
- 2,0 μ L Primer 3' (GFPattb2)
- 1 μ L do DNA extraído contendo GFP
- 0,5 μ L *DreamTaq*

1. Programa de amplificação

Programação da reação no termociclador primers GFPattb1 e GFPattb2.

- 1X: Desnaturação inicial: 95°C, 2 min
- 25X: Desnaturação: 95°C, 30 seg; Hibridação: 55 °C, 40 seg; Extensão: 72 °C, 45 seg
- 1X: Extensão final: 72 °C, 10 min

2. Visualização dos produtos amplificados

Colocar 10 μ l da amostra em gel de agarose 1% em TBE 0,5X preparado com 'greensafe', 1 hora a 80V.

Observar o gel sob luz UV para visualização dos fragmentos amplificados em PCR.

Resultados esperados:

No gel de agarose realizado, espera-se a observação de uma banda única no caso dos primers attB + gene da GFP de ± 717 pb correspondente à amplificação do gene da GFP delimitada pelos pares de *primers* específicos usados nas reações.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL 2:

PCR com primers attb1 e attb2

2. Adicionar:

- 33 μ L água ultrapura
- 5 μ L tampão dream taq 10X
- 1,5 μ L dNTPs
- 4,0 μ L Primer 5' (GFPattb1)
- 4,0 μ L Primer 3' (GFPattb2)
- 2 μ L do DNA extraído contendo GFP
- 0,5 μ L *DreamTaq*

3. Programa de amplificação

Programação da reação no termociclador primers attb1 e attb2.

- 1X: Desnaturação inicial: 95°C, 2 min
- 25X: Desnaturação: 92°C, 30 seg; Hibridação: 55 °C, 40 seg; Extensão: 72 °C, 45 seg
- 1X: Extensão final: 72 °C, 10 min

4. Visualização dos produtos amplificados

Colocar 10 μ l da amostra em gel de agarose 1% em TBE 0,5X preparado com '*greensafe*', 1 hora a 80V.

Observar o gel sob luz UV para visualização dos fragmentos amplificados em PCR.

Resultados esperados:

No gel de agarose realizado, espera-se a observação de uma banda única no caso dos primers attB1 e attB2 de ± 751 pb correspondente à amplificação do gene da GFP delimitada pelos pares de *primers* específicos usados nas reações.



Dicas

- ✓ **As enzimas são fornecidas em tampões com base em glicerol. Para uma correta pipetagem da enzima deve-se, no momento da pipetagem, mergulhar a ponta no mínimo volume possível, para evitar a aderência da enzima na parte exterior da ponta, evitando o desperdício e alterações de concentração.**
- ✓ **O tampão 10X dream taq deve sempre ser cuidadosamente agitado sempre antes da pipetagem**
- ✓ **Não se esperam diferenças nos tamanhos do fragmentos amplificados nos dois PCRs detetáveis em gel**

REFERÊNCIAS:

Landy, A. (1989). Dynamic, Structural, and Regulatory Aspects of Lambda Site-specific Recombination. *Ann. Rev. Biochem.* 58, 913-949.

Hartley, J. L., Temple, G. F., and Brasch, M. A. (2000). DNA Cloning Using in vitro Site-Specific Recombination. *Genome Research* 10, 1788-1795.

ETAPA 3 – REAÇÃO BP

INTRODUÇÃO

A reação de recombinação BP possibilita a transferência de um gene de interesse num produto de PCR attB1 e attB2 (passo anterior) para um vetor dador (pDONR™221) contendo attP que é uma entrada específica do nosso fragmento de interesse (GFP+attB) (Bernard et al., 1993). Depois de criar uma sequência de entrada (attB1+GFP+attB2), o gene de interesse pode ser facilmente transferido para uma grande seleção de vetores alvo utilizando a reação de recombinação LR (Varanda, et al., 2018).

MATERIAL, REAGENTES E EQUIPAMENTO:

- Centrífuga de bancada
- Espectrofotômetro
- Gelo
- Micropipetas
- Termociclador
- Banho seco
- Agitador orbital com control de temperatura
- Palitos (para picar colônias) autoclavados

- pDONR 221
- TE buffer, pH 8
- GFP + attB produto de PCR (passo anterior)
- BP clonase II
- Placas de Petri com meio LB + kanamicina
- Meio LB líquido (sem agar) + kanamicina
- células competentes (one shot OmniMax2T1 phage-resistant cells)
- SOC

Ligação

3. Adicionar:

1-7 µL attB produto de PCR

1 µL pDONR 221 (150 ng/µL)

X µL TE buffer, pH 8 (para volume final de 10 µL)

2,0 µL BP clonase II

4. Programa de ligação

- Incubação 25°C, 2h30min

5. Adicionar

Juntar 0,5 uL de proteinase K

- Incubação 37 °C, 10 min

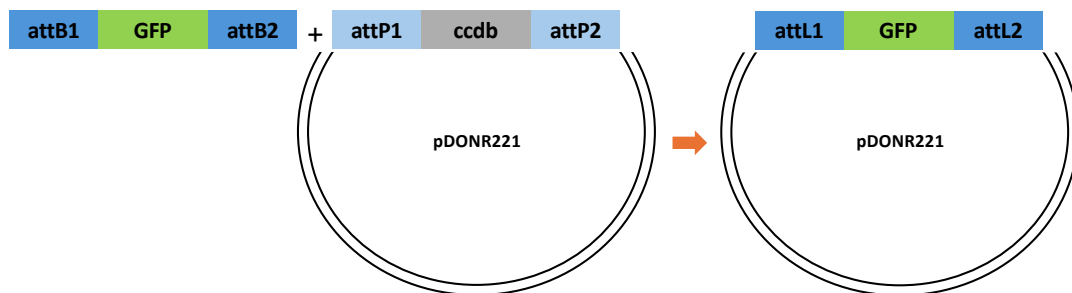


Figura 2. Ligação BP: introdução da sequência attB1 e attB2 nas extremidades 5' e 3' da GFP no vetor pDONR221. O resultado após esta reação é o vetor pDONR221 com a sequência attL1 e attL2 nas extremidades 5' e 3' da GFP.

Transformação: Vetor + Bactéria (E. coli)

6. Transformar:

4 µL da reação BP

50 µL de células competentes (one shot OmniMax2T1 phage-resistant cells)

7. Programa de ligação

- Incubar em gelo 30 min
- Choque térmico 42°C, 45 seg
- Incubar em gelo 2 min

8. Adicionar

150 µL SOC (Incubado 37 °C, 10 min)

- Incubar a 37°C por 1 hora em agitador orbital com controlo de temperatura a 225 rpm

9. Adicionar

100 µL da reação de transformação em placas de Petri com meio LB + Kanamicina

- Incubar 'overnight' (±18h)

PCR de confirmação reação BP

1. Adicionar:

40 µL água ultrapura

5 µL tampão dream taq 10X

1,5 µL dNTPs

1,5 µL Primer 5' (GFPattb1)

1,5 µL Primer 3' (GFPattb2)

DNA (picar colonia com uma ponta de pipeta)

0,5 µL *DreamTaq*

2. Programa de amplificação

Programação da reação no termociclador com primers attb1 e attb2.

- 1X: Desnaturação inicial: 96°C, 2 min
- 25X: Desnaturação: 92°C, 30 seg; Hibridação: 55 °C, 40 seg; Extensão: 72 °C, 45 seg
- 1X: Extensão final: 72 °C, 10 min

3. Visualização dos produtos amplificados

Colocar 20 µl da amostra em gel de agarose 1% em TBE 0,5X preparado com 'greensafe', 1 hora a 80V.

Observar o gel sob luz UV para visualização dos fragmentos amplificados em PCR.

Resultados esperados:

No gel de agarose realizado, espera-se a observação de uma banda única no caso dos primers attB1 e attB2 de ± 751 pb correspondente à amplificação do gene da GFP delimitada pelos pares de *primers* usados nas reações, indicando assim o sucesso da reação BP e da transformação.

Crescimento das colónias em meio líquido

1. Adicionar:

Picar colónias (colocar o palito dentro do LB líquido)

5 mL LB meio líquido + kanamicina

2. Crescer:

- Crescer colónias (em agitador orbital) em meio líquido com 37°C 'overnight' (± 18 h)

Extrair o DNA plasmídico da reação BP

*Para a extração do DNA plasmídico deve-se utilizar o kit de extração disponível no laboratório seguindo as instruções do fabricante.



Dicas

- ✓ Deve-se usar esferas de vidro autoclavadas para espalhar a reação BP no meio LB sólido para uma correta homogeneização em placa de Petri.
- ✓ As células competentes devem ser sempre descongeladas em gelo para não danificar as mesmas.
- ✓ Os meios sólidos e líquidos devem ser preparados previamente.

REFERÊNCIAS:

Bernard, p., kezdy, k. E., melderer, l. V., steyaert, j., wyns, l., pato, m. L., higgins, p. N., and couturier, m. (1993). The f plasmid ccdB protein induces efficient atp-dependent dna cleavage by Gyrase. J. Mol. Biol. 234, 534-541.

Varanda, C.M.; Materatski, P.; Campos, M.D.; Clara, M.I.E.; Nolasco, G.; Félix, M.D.R. (2018). Olive Mild Mosaic Virus Coat Protein And P6 Are Suppressors Of Rna Silencing, And Their Silencing Confers Resistance Against Ommv. Viruses, 10, 416.

ETAPA 4 – REAÇÃO LR

INTRODUÇÃO

A reação de recombinação LR facilita a transferência de um gene de interesse que já foi introduzido num vetor dador (pDONRTM221) contendo attL (reação anterior) para um vetor de expressão (pK7WG2), vetor este que é compatível com células competentes de *E. coli* ou *Agrobacterium tumefaciens* (Karimi et al., 2002). Este protocolo permitirá a realização, a jusante, de diversos estudos, como estudos funcionais de expressão de genes e silenciamento de genes, por exemplo permitirá estudos de genes virais relacionados com a supressão de silenciamento ou a introdução de genes em plantas. As *A. tumefaciens* podem ser utilizadas em diversas plantas modelo, como por exemplo *Nicotiana benthamiana*, plantas de tomate, entre outras.

MATERIAL, REAGENTES E EQUIPAMENTO:

- Centrífuga de bancada
- Espectrofotómetro
- Gelo
- Micropipetas
- Termociclador
- Banho seco
- Agitador orbital com controlo de temperatura
- Palitos (para picar colónias) autoclavados

- DNA plasmídico extraído no protocolo anterior
- TE buffer, pH 8
- LR clonase II
- Placas de Petri com meio LB + spectinomicina
- Meio LB líquido (sem agar) + spectinomicina
- Células competentes de *E. coli*
- SOC

Ligação

1. Adicionar:

1 µL DNA plasmídico da reação BP

0,5 µL pK7WG2

2,5 µL TE buffer, pH 8

2,0 µL LR clonase II

2. Programa de ligação

- Incubação 25°C por 4h

Adicionar

Juntar 0,5 µL de proteinase K

- Incubação 37 °C, 10 min

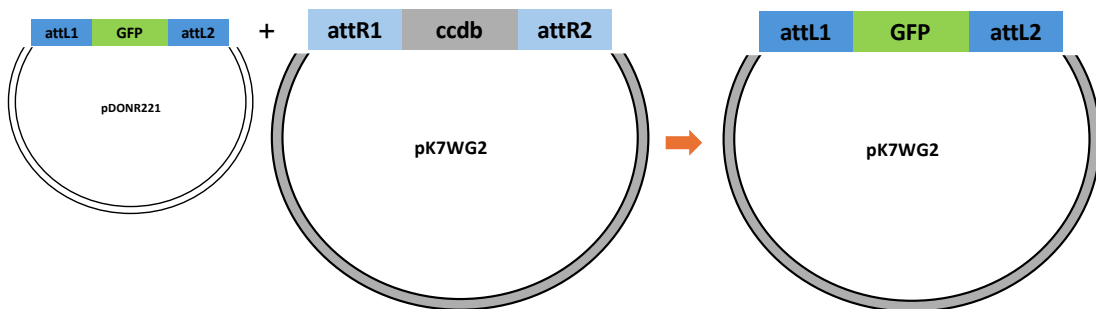


Figura 3. Ligação LR: transferência da sequência attL1 e attL2 + GFP presentes no vetor pDONR221 para o vetor pK7WG2. O resultado após esta reação é o vetor pK7WG2 com a sequência attR1 e attR2 nas extremidades 5' e 3' da GFP.

Transformação: vetor pK7WG2 (+ GFP) + *E. coli*

3. Transformar:

4 µL do produto da reação LR

100µL de células competentes de *E. coli*

4. Programa de ligação

- Incubar em gelo 30 min
- Choque térmico 42°C, 45 seg
- Incubar em gelo 2 min

5. Adicionar

150 µL SOC (Incubado 37 °C, 10 min)

- Incubar a 37°C por 1 hora em agitador orbital com control de temperatura com 225 rpm

6. Adicionar

100 μ L da reação de transformação em placas de Petri com meio LB + spectinomomicina

- Incubar 'overnight' (\pm 18h)

PCR de confirmação reação LR

4. Adicionar:

40 μ L água ultrapura

5 μ L tampão dream taq 10X

1,5 μ L dNTPs

3 μ L Primer 5' (GFPattB1)

3 μ L Primer 3' (GFPattB2)

DNA (picar colônia com uma ponta de pipeta)

0,5 μ L *DreamTaq*

5. Programa de amplificação

Programação da reação no termociclador primers attb1 e attb2.

- 1X: Desnaturação inicial: 96°C, 2 min
- 25X: Desnaturação: 92°C, 30 seg; Hibridação: 55 °C, 40 seg; Extensão: 72 °C, 45 seg
- 1X: Extensão final: 72 °C, 10 min

6. Visualização dos produtos amplificados

Colocar 20 μ L da amostra em gel de agarose 1% em TBE 0,5X preparado com 'greensafe', 1 hora a 80V.

Observar o gel sob luz UV para visualização dos fragmentos amplificados em PCR.

Resultados esperados:

No gel de agarose realizado, espera-se a observação de uma banda única no caso dos primers attB1 e attB2 de \pm 751 pb correspondente à amplificação do gene da GFP delimitada pelos pares de *primers* usados nas reações, indicando assim o sucesso da reação LR e da transformação.

Crescimento das colônias em meio líquido

3. Adicionar:

Picar colónias (colocar o palito dentro do LB líquido)

5 mL LB meio líquido + spectinomicina

4. Crescer:

- Crescer colónias (em agitador orbital) em meio líquido com 37°C 'overnight' (± 18 h)

5. Armazenar:

- Pode-se armazenar o vetor pK7WG2 (com a GFP) + *E. coli* em meio LB líquido e glicerol (50/50) e congelar a -80°C para o próximo protocolo de agroinfiltração.

Extrair o DNA plasmídico da reação LR

*Para a extração do DNA plasmídico deve-se utilizar o kit de extração disponível no laboratório seguindo as instruções do fabricante.



Dicas

- ✓ Deve-se usar esferas de vidro autoclavadas para espalhar a reação LR no meio LB sólido para uma correta homogeneização em placa de Petri.
- ✓ As células competentes devem ser sempre descongeladas em gelo para não danificar as mesmas.
- ✓ Os meios sólidos e líquidos devem ser preparados previamente.

REFERÊNCIAS:

Karimi, M.; Inze, D.; Depicker, A. (2002). Gateway vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. Trends Plant Sci., 7, e193–e195.