



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

AMANDA ALVES DE PAIVA ROLLA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO DE
DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS TRANSGENES
NO GENOMA DA SOJA POR PCR QUANTITATIVO**

Londrina
2009

AMANDA ALVES DE PAIVA ROLLA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO DE
DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS TRANSGENES
NO GENOMA DA SOJA POR PCR QUANTITATIVO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dr. Alexandre Lima Nepomuceno

Londrina
2009

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais De Catalogação-Na-Publicação (Cip)

R749d Rolla, Amanda Alves de Paiva.

Desenvolvimento e validação de um método de determinação do número de cópias transgenes no genoma da soja por PCR quantitativo / Amanda Alves de Paiva Rolla. – Londrina, 2009.
ix, 86 f. : il

Orientador: Alexandre Lima Nepomuceno.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2009.

Inclui bibliografia.

1. Genética vegetal – Teses. 2. Plantas geneticamente modificadas – Teses. 3. Reação em cadeia de polimerase – Teses. I. Nepomuceno, Alexandre Lima. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Instituto Agrônomo do Paraná. IV. EMBRAPA. V. Título.

CDU 581.169

AMANDA ALVES DE PAIVA ROLLA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO DE
DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS TRANSGENES NO
GENOMA DA SOJA POR PCR QUANTITATIVO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof Dr. Alexandre Lima Nepomuceno
EMBRAPA Soja – Londrina – PR

Prof. Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira
IAPAR – Londrina - PR

Profa. Dra. Francismar Corrêa Marcelino
EMBRAPA Soja – Londrina - PR

Londrina, 26 de fevereiro de 2009.

DEDICO

Aos meus amados pais,
Carlos Magno e Lusimar e minha irmã Samantha
pelo imenso amor e apoio
em todos os momentos de minha vida.

OFEREÇO

Aos meus avós Manoel Pedro Sobrinho, Leopoldina Lino Silva, José Rodrigues Rolla e Natali Duque de Paiva, exemplos de humildade, simplicidade, força e fé.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre presente em todos os momentos de minha vida, me abençoando e guiando.

À Universidade Estadual de Londrina, pela oportunidade de enriquecer meu conhecimento, usufruir de sua estrutura e da competência dos docentes.

À Coordenadora do Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular a professora Dra. Ilce Mara de Syllos Cólus aos professores e funcionários, pela ajuda prestada em especial a Secretária da Pós Graduação Sueli, pela atenção sempre pronta a atender com profissionalismo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

À Embrapa Soja de Londrina, por toda infra-estrutura laboratorial e técnica, imprescindível para a realização deste trabalho.

Ao, meu orientador Dr. Alexandre Lima Nepomuceno pela oportunidade oferecida e por acreditar em meu potencial, pela orientação, confiança e credibilidade fundamental para o desenvolvimento desse trabalho.

À Dra. Francismar Corrêa Marcelino por toda ajuda, paciência e pelos valiosos e preciosos conselhos, confiança, credibilidade e pela grande amizade. Muito obrigada por tudo!

Ao Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira por participar da banca, contribuindo com sugestões para a finalização deste trabalho.

Aos meus queridos pais, Carlos Magno e Lusimar pelo amor incondicional, por todo apoio, carinho, por compreender meus momentos de ausência, por acreditarem em meu potencial e que nunca mediram esforços em me ajudar a alcançar meus objetivos. Sem vocês, eu não conseguiria. Muito obrigada!

À minha querida irmã Samantha e meu cunhado Leandro por todo amor, apoio, carinho e incentivo em todos os momentos.

À minha tia Dra. Luzinete Alves Silva por todos os conselhos e incentivo na busca de meus ideais.

Ao meu namorado Antonio Alberto dos Santos pelo amor, pela amizade, paciência e por estar sempre ao meu lado em todos os momentos.

À querida amiga Dra. Renata Fuganti, pelos conselhos e ensinamentos, por me ajudar em todos os momentos, principalmente os “mais difíceis”. Muito obrigada!

À amiga Selma Pereira dos Santos, companheira nos estudos, obrigada pela amizade, apoio de sempre em todos os momentos.

À minha amiga irmã Águida Morales, um anjo em minha vida, que mesmo estando longe, nunca deixou de dar o seu apoio, carinho e incentivo. Muitas saudades!

Às amigas, Magda A. Beneventi e Lizandra Catelli por toda ajuda e amizade em todos os momentos.

Aos técnicos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal e Bioinformática da Embrapa Soja, César A. Silveira e Nilson Vieira, pelo apoio, companheirismo e incentivo em especial a Silvana R. R. Marin, pelo profissionalismo, por toda ajuda, paciência e incentivo. Muito obrigada!

À Vera Lúcia Pierotti, um verdadeiro anjo, obrigada por suas orações e conselhos.

Às minhas amigas do Laboratório de Biotecnologia Vegetal e Bioinformática da Embrapa Soja, pela amizade, apoio e momentos inesquecíveis.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal e Bioinformática da Embrapa Soja, pela amizade, apoio e companheirismo;

Enfim, a todos que, de algum modo, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!!!

ROLLA, Amanda Alves de Paiva. **Desenvolvimento e validação de um método de determinação do número de cópias transgenes no genoma da soja por pcr quantitativo**. 86 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

RESUMO

As ferramentas de biotecnologia têm proporcionado nos dias atuais o desenvolvimento de organismos geneticamente modificados (OGMs), sejam microorganismos, plantas ou animais. Plantas geneticamente modificadas (PGM) possibilitam a solução de problemas na produção, agregando valor aos produtos agrícolas e em várias situações, oferecendo alternativas importantes para a melhoria na qualidade de vida humana e do ambiente. Após a obtenção de plantas GM, a caracterização molecular dos eventos constitui uma etapa essencial para a identificação das linhagens mais promissoras, que venham constituir o evento GM elite, a ser utilizado como linhagem parental no programa de melhoramento. A caracterização molecular quanto ao número de cópias do transgene, bem como do sítio de inserção, permite inferir sobre a estabilidade do genoma receptor após a transformação gênica. Este trabalho teve como principal objetivo avaliar a eficácia da quantificação do número de cópias transgenes no genoma da soja utilizando a metodologia de PCR quantitativo (qPCR) comparando-a à técnica pioneira de *Southern blotting*. Foram testados 2 sistemas de quantificação por qPCR por quantificação relativa, baseados em DNA genômico, um que empregou a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, utilizando uma amostra com número de cópias do transgene conhecida como calibradora; e outro, que utilizou a própria referência endógena como calibrador, através da fórmula $2^{-\Delta Ct}/2$. Além destes, plasmídeos recombinantes, contendo as regiões de interesse (transgene) e parte do gene da lectina clonados, foram utilizados para a construção de curvas de calibração para determinação do número absoluto de cópias do transgene no genoma da soja. Para determinação da exatidão dos diferentes sistemas os resultados foram comparados com os obtidos através da técnica de *Southern blot*. Nove eventos GM contendo o gene *DREB1A* tiveram o número de cópias dos cassetes transgenes quantificados via qPCR por quantificação relativa. De acordo com os resultados, 9 eventos tiveram o número de cópias dos cassetes determinados pelas duas metodologias de qPCR por quantificação e confirmados por *Southern blot*. Os resultados demonstraram que ambos os métodos de quantificação relativa possibilitaram a quantificação exata do número de cópias do transgene no genoma das amostras testadas. O emprego da própria referência endógena como calibradora foi mais precisa, uma vez que elimina variações na amplificação que possam ocorrer entre amostra/calibrador. Tais resultados indicam a potencialidade, além da praticidade e rapidez, do emprego da técnica de qPCR para realizar o *screening* inicial de plantas GM na seleção de eventos com baixo número de cópias, e, conseqüentemente, na aceleração do desenvolvimento de eventos GM elites.

Palavras-chave: Número de cópias. PCR quantitativo. Eventos GM. *Southern blot*.

ROLLA, Amanda Alves de Paiva. **Development and validation of a method of determining the number copy of transgenes into the genome of soybean by PCR quantitative**. 86 f. Dissertation (Master's degree in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

ABSTRACT

Biotechnology has allowed the development of genetically modified organisms (GMOs) permitting the solution of many production problems aggregating values to agriculture products and offering, in many situations, important alternatives in human life and environment quality. After obtain a GM plant, events molecular characterization is an essential step to identity more promising lines, which is the GM elite event, to be used as parental line in a breeding program. Molecular characterization of number of transgene copies and also insertion site allows inferring the stability of receptor genome after genetic transformation process. This work had as principal objective to develop and to evaluate the efficiency on quantification of transgene cassettes insertion in soybean genome and the number of copies utilizing the quantitative PCR methodology compared to a pioneer technique Southern blotting. Two systems were tested to quantify the number of copies by quantitative PCR, one based in genomic DNA, which used the relative quantification by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formula and other using the endogenous reference as calibrator. Recombinant plasmids, containing the interested region (transgene) and part of lectin gene, which was used as endogenous reference, were cloned to construct calibration curves to determine the absolute number of copies of the transgene in soybean genome together with genomic DNA. To determine the precision of the different systems, results obtained were compared to the Southern blotting technique. Nine GM events containing the *DREB1A* gene had the number of transgene copies quantified, using PCR QT by relative quantification. According to the results nine events had the number of cassettes determinate by two methodologies of PCR QT and confirmed by Southern blotting. Results demonstrated that both relative quantification methods allowed to exact quantification of transgene copy number in the genome of the tested samples. The use of the endogenous reference as calibrator sample was more precise, once variations on sample/calibrator amplification are eliminated. These results indicates the potential besides the practical and fastness of qPCR technique to make the initial screening of GM plants for selection of events with lower copy numbers and consequently the acceleration of development of GM elite events.

Keywords: Copy numbers. Quantitative PCR. GM events. *Southern blot*.

LISTA DE TABELAS

Artigo

- Tabela 1** – Seqüências dos conjuntos de *primers GmLec*, *DREB1A* e suas respectivas sondas *Taqman®*..... 41
- Tabela 2** – Nove eventos transgenes nas gerações T₁, T₂ e T₅ avaliados técnicas de por *Southern blot* e PCR em tempo real 50
- Tabela 3** – Determinação do número de cópias do transgene em amostras GM, geração T₁ e T₂, via qPCR por quantificação relativa pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, utilizando a amostra BR16 como calibradora..... 54
- Tabela 4** – Análise do número de cópias do cassete transgene em amostras GM, geração T₂ e T₅, analisadas em três corridas independentes via qPCR por quantificação relativa, pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, utilizando a amostra BR16 como calibradora..... 54
- Tabela 5** – Determinação do número de cópias do cassete transgene em amostra GM, geração T₂ e T₅, analisadas em três corridas independentes, via qPCR por quantificação relativa, pela fórmula $2^{-\Delta Ct}/2$, utilizando o gene lectina como calibrador..... 55
- Tabela 6** – Quantificação dos eventos quanto ao número de cópias. Metodologias quantificadas por PCR em tempo real comparadas à técnica de *Southern blot*..... 55
- Tabela 7** – Repetibilidade das curvas de calibração baseadas em pDreb e pLec. Os valores médios de Ct, que representa triplicada de pontos (Ct) obtidos em cada corrida, desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV(%)) para cada um dos padrões baseados em pDNA 58
- Tabela 8** – Repetibilidade das curvas de calibração baseadas em pDreb diluídos em gDNA da amostra BR 16. Os valores médios de Ct que representa triplicada de cada corrida, desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV(%)) para cada uma das diluições do pDNA em gDNA 58

Tabela 9 –	Quantificação do número de cópias dos eventos GM em T ₂ e T ₅ pelo método curva padrão baseadas em pDreb e pLec. Os valores do número de cópias, desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV(%)) para cada um dos eventos quantificados.....	59
Tabela 10 –	uantificação do número de cópias dos eventos GM em T ₂ e T ₅ pelo método curva padrão baseadas em pDreb diluídas em DNA genômico. Os valores do número de cópias, desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV(%)) para cada um dos eventos quantificados.....	59
Tabela 11 –	Repetibilidade das curvas de calibração baseadas em gDNA Dreb e gDNA lectina. Os valores médios de Ct que representa triplicada de cada corrida, desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV(%)) para cada uma das diluições	61
Tabela 12 –	Quantificação das amostras utilizando as curvas baseadas em gDNA. Os valores de número de cópias, desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV(%)) para cada um dos eventos.....	61

LISTA DE FIGURAS

Artigo

- Figura 1** – Representação esquemática da construção gênica *rd29:DREB1A*, em laranja região promotora, em amarelo região codante DREB1A, em azul região nos terminal48
- Figura 2** – Determinação do número de cópias do cassete DREB1A em amostras GM por Southern blot. O DNA das amostras foi digerido com as enzimas EcoRI e HindIII, transferidos para uma membrana de náilon e posteriormente hibridizados com a sonda DREB, fragmento de 1,92 kb marcada com ³²P, liberado do cassete transgene após clivagem com as mesmas enzimas. A – Número de inserções (em verde) e cópias (em amarelo) do cassete transgene no genoma da soja nos eventos em T₁ P59 B-12A, 45A- 48 A, 345A- 61 A, 382 B -97; B – Número de inserções (em verde) e cópias (em amarelo) do cassete transgene no genoma da soja nos eventos em T₂, 1333 A- v.30, 1333 A – v.37, 1333 – v. 25, P58 – v. 46, P58 – v. 4). Uma amostra não transgênica BR16 foi utilizada como controle negativo, além de DNA plasmidial em quantidades correspondentes a 1, 5, 10 e 20 cópias do genoma da soja como padrão de número de cópias. Ladder – padrão de tamanho 1k.....51
- Figura 3** – Determinação do número de cópias do cassete DREB1A em amostras GM por Southern blot. O DNA das amostras foi digerido com as enzimas EcoRI e HindIII, transferidos para uma membrana de náilon e posteriormente hibridizados com a sonda DREB, fragmento de 1,92 kb marcada com ³²P, liberado do cassete transgene após clivagem com as mesmas enzimas. Eventos geração T₂ 3075, 3069 (4) B1, 3058 (6)A1 e eventos em geração T₅ P58, P58 12(2), P58 32(1) e P58 32(2). Uma amostra não transgênica BR16 foi utilizada como controle negativo, além de DNA plasmidial em quantidades correspondentes a 1, 5, 10 e

20 cópias do genoma da soja como padrão de número de cópias. Ladder – padrão de tamanho 1kb52

Figura 4 – Determinação da eficiência do sistema *multiplex TaqMan* para os alvos lectina e *DREB1A*. A amostra GM P58T₅ foi diluída serialmente 4X e as diferentes diluições foram amplificadas em sistema multiplex para os alvos *DREB1A* e lectina. Os valores de Ct foram plotados em função do logaritmo da diluição. O eixo y corresponde aos valores de Ct e eixo x log da diluição. Gráfico A – Estimativa da eficiência do gene Dreb com *slope*=-3,195. B - estimativa da eficiência do gene da lectina como referência endógena com *slope*=-3,22053

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg	microgramas
μL	microlitros
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> - Ferramenta de base local para pesquisa de alinhamento
BSA	Albumina bovina
CaCl₂	Cloreto de cálcio
CTAB	Brometo de trimetil N-cetil amônio
Ct	<i>Cycle Threshold</i>
CV %	Coefficiente de variação
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> - Ácido desoxirribonucléico
dNTP's	dinucleotídeos
DREB1A	<i>Dehydration Responsive Element Binding Protein</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra acético
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
gDNA	DNA genômico
HCl	Ácido clorídrico
LB	Triptona, extrato de levedura e NaOH
M	molar
mg	miligramas
MgCl₂	Cloreto de magnésio
min	minutos
mL	mililitros
mM	milimolar
mmol	milimol
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> - Centro Nacional de Informações Biotecnológicas
ng	nanogramas
nt	nucleotídeos

°C	graus Celsius
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> - Reação de polimerização em cadeia
pDNA	DNA plamidial
pLec	plasmídeo lectina
pg	picogramas
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
qPCR	PCR quantitativo
SD	Desvio padrão
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SOC	Extrato de levedura, Triptona, NaCl, KCl, MgCl ₂ , MgSO ₄ e glicose
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris base, ácido bórico e EDTA
TBPs	<i>TATA binding proteins</i> - Proteínas que se ligam a TATA
TE	Tris-HCl e EDTA
Tris	Tris-(hidroximetil)- aminometano
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UV	Ultravioleta
VBP	Valor Bruto da Produção
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-D-galactopiranosidase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	20
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
3.1	PLANTAS GENETICAMENTE MODIFICADAS: SITUAÇÃO ATUAL NO BRASIL E NO MUNDO	21
3.2	MÉTODOS DE TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS GENETICAMENTE MODIFICADAS	23
3.2.1	Métodos de Transformação	24
3.2.1.1	Agrobacterium tumefaciens	24
3.2.1.2	Biobalística	26
3.3	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR	27
A	Identificação dos eventos positivos	27
B	Avaliação da expressão gênica	29
C	Avaliação dos sítios de inserção	30
D	Técnicas para a determinação do número de cópias do transgene inserido	31
3.4	PCR QUANTITATIVO NA QUANTIFICAÇÃO DE INSERÇÕES TRANSGENE EM GENOMAS	33
3.4.1	Metodologia Sybr Green®	34
3.4.2	Metodologia Taqman®	34
3.5	QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA PARA A DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DE INSERÇÕES TRANSGENE	35
3.6	QUANTIFICAÇÃO RELATIVA PARA A DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DE INSERÇÕES TRANSGENE	37
4	ARTIGO – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS TRANSGENE NO GENOMA DA SOJA POR PCR QUANTITATIVO	38
	REFERÊNCIAS	66
	ANEXOS	71

1 INTRODUÇÃO

A soja é o principal produto do agronegócio brasileiro, sendo que o total de área cultivada com essa leguminosa vem crescendo a cada ano, com conseqüente aumento de produção (SCHUSTER et al., 2007), o que tem contribuído para que o Brasil seja o segundo maior produtor mundial do grão. Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), a safra de 2007/08 foi de 60,05 milhões de toneladas, superior à safra passada em 2,8% (1,66 milhões de toneladas) (CONAB, 2008).

Apesar dos aspectos positivos relacionados à sojicultura no Brasil, estresses abióticos, como a seca, afetam a produção reduzindo consideravelmente o rendimento final na lavoura (FARIAS et al., 1993). Estresses abióticos constituem a primeira causa de diminuição da produção mundial, reduzindo os rendimentos médios da maioria das culturas em mais de 50% (BOYER, 1982; BRAY et al., 2000).

Os estados do sul do Brasil, responsáveis por mais de 40% da produção nacional de soja perderam mais de 25% de sua produção nas safras 2003/2004 e 2004/2005. Somente na safra 2004/2005, que foi marcada por condições climáticas mais severas ocasionadas por períodos de estiagem, as perdas diretas nesses estados atingiram mais de U\$ 2,32 bilhões. Somente no Rio Grande do Sul, as perdas foram acima de 70% na cultura da soja (FARIAS et al., 2005).

Atualmente, com o advento da biotecnologia, é possível a obtenção de respostas rápidas e seguras na resolução de questões importantes, como a susceptibilidade e sensibilidade vegetal a pragas e estresses ambientais. E ainda, o desenvolvimento de espécies mais produtivas e com maior valor nutricional. Um dos principais frutos da biotecnologia é o desenvolvimento dos organismos geneticamente modificados (OGMs), que passaram a oferecer alternativas importantes na resolução de vários problemas de caráter econômico e relacionados à melhoria na qualidade de vida humana e do ambiente (MARCELINO, 2006). As técnicas de engenharia genética aliadas a técnicas de transformação vegetal têm permitido alterar a composição de componentes individuais de plantas no sentido de aumentar as defesas contra estresses bióticos e abióticos, indo além do que se consegue através de práticas de melhoramento convencional (BENEVENTI, 2006).

BENEVENTI (2006), com o objetivo obter plantas de soja com maior tolerância ao déficit hídrico, introduziu em embriões de uma cultivar suscetível, via biobalística, a construção *rd29A:DREB1A*, de *Arabidopsis thaliana*, contendo o promotor estresse induzido *rd29A* e a região codante *DREB1A* (*Dehydration Responsive Element Binding Protein*), além do gene *ahas*, para a seleção dos transformantes. Dos mais de 1500 eventos obtidos, um total de 941 foram testados por PCR convencional, utilizando *primers* específicos para amplificar o cassete transgene. Destes, 17 eventos foram identificados como positivos, sendo que, em 10 foi confirmada a presença do transgene na geração T₁, e destas, apenas 7 apresentaram segregação mendeliana (3:1) (BENEVENTI, 2006).

Após a obtenção de plantas GM, a caracterização molecular é uma etapa importante para seleção dos eventos mais promissores, do ponto de vista da seqüência do DNA inserido, número de cópias do transgene inserido no genoma, a identificação do seu(s) sítio(s) de inserção, níveis de expressão do transgene, segregação mendeliana, avaliação fenotípica, entre outras. Esta etapa é essencial para a identificação das linhagens promissoras, que constituem o evento GM elite, a ser utilizado como linhagem parental em programas de melhoramento.

Na avaliação molecular, são conduzidos ensaios de caracterização da construção gênica introduzida na espécie receptora, focando sua seqüência, presença de genes marcadores que conferem resistência a antibióticos e/ou herbicidas e genes que possam restringir a viabilidade da semente ou de estruturas reprodutivas. Após a avaliação dos parâmetros moleculares quanto à caracterização do cassete transgene propriamente dito, a caracterização molecular visa ainda avaliar se a inserção do transgene não provocou algum tipo de desestabilização no genoma (rearranjos, deleções, silenciamento gênico, entre outros) da espécie receptora. Neste sentido, é de suma importância determinar o número de cópias do cassete que foram inseridas no genoma, o sítio de inserção, além de uma avaliação do padrão de expressão do transgene, e de outros genes, a fim de se garantir que não houve alterações em consequência da introdução do cassete. Avaliar a estabilidade dos transgenes, tanto estrutural quanto funcional, também é importante do ponto de vista da biossegurança (ARAGÃO et al., 1998).

Dentro deste contexto, o presente trabalho visa à caracterização molecular quanto ao número de cópias do alvo transgene *A_tDREB1A* inseridos no genoma da soja, em eventos GM tolerantes à seca, utilizando a técnica de PCR

quantitativo. Para atingir tal objetivo, o estudo foca a padronização de um sistema de quantificação do número de cópias através do desenvolvimento de padrões de calibração baseados em DNA genômico e plasmidial, seguida da construção de curvas de calibração para quantificação absoluta utilizando tais padrões, e ainda um sistema de quantificação relativa pelo método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e $2^{-\Delta Ct}/2$ que utiliza como calibrador a referência endógena. Ambos os sistemas de quantificação propostos pela técnica de PCR quantitativo foram comparados com os resultados obtidos por *Southern blot*.

2 OBJETIVOS

Desenvolver e validar um método para determinação do número de cópias de inserções transgenes no genoma da soja por PCR quantitativo.

Caracterizar molecularmente linhagens de soja GM quanto ao número de cópias do transgene através de PCR quantitativo.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desenvolver padrões de calibração baseados em DNA genômico e plasmidial para quantificação do número de cópias ou inserções do transgene no genoma dos eventos de soja *AtDREB1A* positivo, pela técnica de PCR quantitativo por quantificação absoluta;

Construir curvas de calibração com padrões baseados em DNA genômico e plasmidial para quantificação de cópias de transgenes no genoma da soja pela técnica de PCR quantitativo por quantificação absoluta;

Desenvolver um sistema para quantificação do número de cópias ou inserções do transgene no genoma dos eventos de soja *AtDREB1A* positivo, pela técnica de PCR quantitativo por quantificação relativa pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e $2^{-\Delta Ct}/2$;

Avaliar a precisão na quantificação do número de cópias do transgene no genoma dos eventos de soja *AtDREB1A* pela técnica de PCR quantitativo comparado resultados obtidos com a técnica de *Southern blot*.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 PLANTAS GENETICAMENTE MODIFICADAS: SITUAÇÃO ATUAL NO BRASIL E NO MUNDO

A partir das descobertas de Watson e Crick, geneticistas começaram a desenvolver processos de laboratório para manipular e interferir nas seqüências de DNA, iniciando ao que ficaria conhecido como engenharia genética (LEITE, 1999).

As possibilidades abertas nas áreas de saúde humana e agropecuária logo ficaram evidentes: modificar genes (blocos funcionais de DNA responsáveis pela codificação de uma proteína ou característica hereditária) para corrigir “defeitos”, como doenças, ou introduzir características desejadas. Uma das formas de fazê-lo é transferir genes de um organismo para outro, quando então o OGM é dito “transgênico”, pois adquire uma característica que nunca fizera parte do repertório de sua espécie e, mais do que isso, a capacidade de transmiti-la para sua progênie, uma vez que o traço genético é definitivamente incorporado ao genoma do organismo. Portanto, o que caracteriza as plantas transgênicas é a inserção de um gene exógeno (transgene) proveniente de outra planta, ou qualquer outro organismo ou ainda sintetizado em laboratório, por métodos não naturais (LEITE, 1999).

Esta metodologia obteve maior crescimento a partir da década de 80, sendo que, na China, em 1994, já eram comercializadas variedades de fumo resistentes ao vírus TMV (*Tabacco Mosaic Virus* – vírus do mosaico do tabaco). Hoje, a utilização de plantas transgênicas com características diferentes e desejáveis sob diversos aspectos (agronômicos, nutricionais, etc.) já ultrapassa uma área de cultivo de 143,7 milhões de hectares, sendo que desse total, 50% da produção foi proveniente de colheitas geneticamente modificadas (GM) plantadas nos EUA. (JAMES, 2008). Do ponto de vista agrônomo, os principais usos desta técnica concentram-se nas culturas da soja, milho, canola, batata e algodão, com genes que conferem resistência a herbicidas, a insetos, vírus, e ainda conjuntamente a insetos e vírus (HUFFMAN, 2004).

Assim, retrospectivamente, em 1994, a tecnologia estreou no mercado consumidor norte-americano com a liberação do primeiro vegetal GM, o

tomate *Flavr Savr*, que teve o gene que codifica a proteína poligalacturonase, responsável pela hidrólise de componentes da parede celular foi inativado pela técnica de RNA anti-senso, levando ao amadurecimento tardio do fruto (KRAMMER et al., 1994) que participa da rota ativada por etileno silenciado, de modo que tais frutos passaram a resistir mais tempo nas prateleiras dos supermercados ao apodrecimento. Um longo período de tempo foi requerido para que se pudessem realizar todos os testes de biossegurança desta variedade. Somente após comprovada sua segurança, este fruto foi liberado para consumo humano. O mesmo procedimento é adotado para todos os demais OGM em diferentes países no mundo. Deste modo, logo após o seu desenvolvimento, os eventos transgenes precisam passar por vários ensaios e experimentação visando comprovar sua segurança ambiental e alimentar (HUFFMAN, 2004).

Dados recentes do Serviço Internacional para Aquisição de Aplicações de Agrobiotecnologia (*International Service for the Acquisition of Agribiotech Applications – ISAA*), ligado às indústrias norte-americanas, indicaram que, em 2002, a área mundial cultivada com transgênicos estaria ao redor de 58 milhões de hectares. Em 2007, o número de países que cultivam culturas biotecnológicas aumentou para 23, e incluiu 12 países em desenvolvimento e 11 países industrializados. Os quatro países principais plantadores de lavouras transgênicas são EUA com 57, 7 milhões de hectares, seguidos pela Argentina com 19,1 milhões ha, pelo Brasil com 15 milhões de hectares e Canadá com 7 milhões de ha. Os principais cultivos seriam, por ordem decrescente, a soja, o milho, o algodão e a canola (JAMES, 2008).

Durante o período de 1996 a 2007, a proporção da área global cultivada com culturas GM, nos países em desenvolvimento, tem aumentado consistentemente a cada único ano. Em 2007, 43% da área global das culturas biotecnológicas (com aumento de 40% em relação ao ano de 2006), equivalente a 49,4 milhões de hectares, foi cultivada nos países em desenvolvimento, onde o crescimento foi substancialmente mais elevado (8,5 milhões de hectares ou 21% de crescimento (JAMES, 2008).

O Brasil iniciou sua corrida na era da biotecnologia em 1995, quando foi criado o mecanismo legal para regulamentar as atividades ligadas a este setor, com a aprovação da Lei de Biossegurança (Lei 8974/1995) e a criação da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) do Ministério da Ciência e Tecnologia

(MARCELINO et al., 2003). No território nacional, apenas cinco eventos transgênicos foram liberados para plantio e comércio, a soja resistente herbicida glifosato em 2003, o algodão resistente a inseto, em 2005, e três eventos de milho resistentes a inseto em 2007, variedade algodão tolerante ao herbicida glufosinato de amônio em 2008, milho resistente a inseto e tolerante ao glufosinato de amônia em 2009 (AGBIOS, 2008). Estima-se que, a área atual cultivada com OGMs no Brasil seja de aproximadamente 15 milhões de hectares entre as culturas da soja e de algodão (CTNBIO, 2009).

3.2 MÉTODOS DE TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS GENETICAMENTE MODIFICADAS

A transformação genética é a transferência (introdução) de uma seqüência de DNA (ou mais especificamente de um gene) em um organismo sem que ocorram os processos de fecundação ou cruzamento (DESTRO e MONTALVÁN, 1999). Essa tecnologia tem contribuído significativamente para a introdução de genes visando características de interesse agrônomo em importantes culturas. (DANG et al., 2007).

Vários métodos de transferência direta de DNA para plantas e animais têm sido descritas, incluindo o bombardeamento de partículas (SANFORD et al., 1987), microinjeção (CROSSWAY et al., 1986), a transformação de protoplastos (NEGRUTIU et al., 1987;) eletroporação (SHILLITO et al., 1985) e transformação utilizando fibras de silicone *Whisker* (THOMPSON et al., 1995).

Dentre os diversos métodos de transformação gênica em plantas hoje utilizados, dois tem obtido melhores resultados: a transformação mediada via *Agrobacterium* e transformação por bombardeio de micropartículas, cada um apresentando méritos específicos e limitações. Outros métodos também têm sido estudados, porém, com menor emprego em larga escala. Cabe ressaltar que não existe um método definido com potencial para resolver os vários e distintos problemas práticos encontrados quando se trabalha com as diversas espécies agrônômicas (DANG et al., 2007).

Apesar da otimização das técnicas de transformação genética, os sítios de integração do DNA exógeno e o número de cópias, a princípio, as

moléculas são integradas no genoma da planta, embora haja indicações de que se integrem em regiões com alta atividade transcricional (BRASILEIRO e DUSI, 1999).

O número de cópias dos transgenes inseridos no genoma varia de acordo com a metodologia empregada na transferência de genes. Com os métodos diretos como biobalística, foram detectadas múltiplas cópias, como também a fragmentação e recombinação do transgene (HADI et al., 1996; SIEMENS e SCHIEDER, 1996). Por sua vez, a transformação por *Agrobacterium* é considerada um processo mais preciso, com integração de uma ou poucas cópias no genoma da planta (DE BLOCK, 2003).

Há uma variação considerável na expressão dos transgenes em plantas transformadas, que não decorre necessariamente da diferença no número de cópias. Assim, a atividade do gene não é exclusivamente determinada pelos níveis de transcrição. Diversos fatores podem influenciar os níveis de expressão, podendo levar à inativação do gene por inibição da transcrição ou do acúmulo do RNAm. Entre estes o silenciamento de genes pode ser influenciado pelo local de inserção do transgene e está associado à metilação do DNA receptor. Os MicroRNAs (miRNAs) representam uma nova classe de RNAs endógenos de aproximadamente 22 nucleotídeos, não codificadores de proteínas, que agem como potentes reguladores pós-transcricionais da expressão gênica em plantas e animais. Atuam como silenciadores pós-transcricionais, que inibem a tradução de RNAs mensageiros-alvo influenciando múltiplas vias de sinalização concomitantemente e apresentando enorme potencial regulatório (KIM et al., 2005).

3.2.1 Métodos de Transformação

3.2.1.1 *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens é uma bactéria gram-negativa do solo que possui a capacidade de infectar células vegetais e provocar em muitas espécies de dicotiledôneas uma doença conhecida como galha-da-coroa (*crown gall*). De modo geral, às bactérias penetram na planta através de uma lesão no caule

(BROWN, 2003). O desenvolvimento da doença está associado à presença, na *Agrobacterium*, de um plasmídeo de alto peso molecular (150 a 250 kb) conhecido como plasmídeo Ti (do inglês *Tumor-inducing*) (BRASILEIRO e CARNEIRO, 1999). A expressão de genes presentes no T-DNA, os oncogenes, interfere na biossíntese de hormônios pela planta, levando à formação da galha (ou tumor) (LACORTE e ROMANO, 1998).

Moléculas-sinal liberadas pela planta no momento da infecção, ativam genes que estão localizados em uma região do plasmídeo Ti, chamada de região de virulência (região *vir*). As diversas proteínas codificadas pelos genes da região *vir* vão promover a transferência de outra região do plasmídeo Ti da bactéria para o núcleo da célula vegetal. Essa região, denominada T-DNA (do inglês *transferred DNA*). Uma vez no núcleo da célula, o T-DNA é integrado ao genoma vegetal e aí expresso de forma estável (BRASILEIRO e CARNEIRO, 1999).

O mecanismo de infecção baseia-se em moléculas-sinal que são liberadas pela planta no momento da infecção, e ativam genes localizados em uma região do plasmídeo Ti, chamada de região de virulência (região *vir*). As diversas proteínas codificadas por estes genes promovem a transferência de outra região do plasmídeo Ti denominada T-DNA (do inglês *transferred DNA*) para o núcleo da célula vegetal. Uma vez no núcleo da célula, o T-DNA é integrado ao genoma vegetal e expresso de forma estável (BRASILEIRO e CARNEIRO, 1999).

A preparação de uma linhagem de *Agrobacterium* para ser utilizada como vetor de transformação em plantas inclui duas etapas distintas: inicialmente é preciso obter linhagens “desarmadas”, isto é, linhagens nas quais o T-DNA original foi deletado e; a seguir, inserir no vetor T-DNA, os genes de interesse (BRASILEIRO e CARNEIRO, 1999). Uma vez construído o vetor, este deve ser transferido para a *Agrobacterium*. Para tanto, três métodos de transferência têm sido mais utilizados: conjugação, eletroporação e choque térmico.

A transformação por *Agrobacterium* resulta em um baixo número de inserção de cópias do transgene, mas é comum encontrar cópias em *tandem* de T-DNAs integrados em um único locus, o que torna difícil a obtenção de uma planta com uma única cópia do transgene (TANG et al., 1999).

A insensibilidade de certas espécies vegetais, especialmente Angiospermas monotiledôneas, à infecção por *Agrobacterium* limita a utilização dessa bactéria como vetor de transformação genética. Assim, sistemas de

transformação direta, baseados em métodos químicos ou físicos, foram desenvolvidos paralelamente ao sistema *Agrobacterium*.

3.2.1.2 *Biobalística*

A biobalística foi desenvolvida primeiramente por Sanford e colaboradores (1992). É uma técnica tem como objetivo introduzir material genético no genoma de plantas superiores. Esta metodologia também tem sido denominada aceleração de microprojéteis, bombardeio de microprojéteis, *Gene Gun* (arma de genes) etc (ARAGÃO, 2000).

Esta metodologia de transferência direta vem sendo utilizada mais amplamente no desenvolvimento e geração de culturas transgênicas de interesse comercial, sendo que a grande maioria das culturas transgênicas liberadas hoje para consumo foram transformadas por bombardeamento por partícula (JAMES, 2003).

Resumidamente, a biobalística baseia-se no uso de micropartículas ou microprojéteis de ouro ou tungstênio com cerca de 1 µm de diâmetro, envoltos pelo DNA exógeno que penetram na parede e a membrana celular de maneira não letal, alojando-se aleatoriamente nas organelas celulares. Posteriormente o DNA é dissociado das micropartículas pela ação do líquido celular e integrado no genoma nuclear do organismo receptor (ARAGÃO et al., 1992). Esses metais apresentam elevada massa específica e permitem que os microprojéteis adquiram momento inercial requerido para penetrar na parede celular em baixa velocidade (ARAGÃO et al., 2000; ARAGÃO et al., 2002).

Os microprojéteis revestidos com o DNA que será introduzido na espécie a ser transformada são acelerados a uma velocidade de aproximadamente 1.500 km/h, pelo acelerador de partículas, em direção ao tecido alvo. Ao final do percurso, a micropartícula é retida por uma placa de policarbonato. As micropartículas então se desprendem e atingem o tecido ou as células-alvo. Este processo ocorre sob pressão negativa (vácuo) para evitar a redução da velocidade das micropartículas. Os danos causados pelo bombardeio são considerados pouco expressivos, o que faz com que a maioria das células atingidas sobreviva (ARAGÃO et al., 2000; ARAGÃO, 2002; LACORTE et al., 1999).

Após o bombardeamento, os tecidos são cultivados em *in vitro* e regenerados, originando as plantas geneticamente modificadas (ARAGÃO et al., 2000; ARAGÃO, 2002; RECH e ARAGÃO, 2008). O processo de transformação de soja foi patenteado pela EMBRAPA Pat. nº WO09918223A1, que se define para a seleção dos transformantes.

3.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

A caracterização molecular de um organismo geneticamente modificado é uma etapa essencial que visa identificar os melhores eventos, tanto quanto ao número de cópias no genoma, como a adequada inserção dos elementos introduzidos, para identificar aqueles que tenham melhor potencial para avançar gerações e ser mais intensivamente trabalhado em programas de melhoramento genético. Variedades com integração de múltiplas cópias podem ter o gene silenciado por mecanismos de silenciamento gênico pós transcricional (VAUCHERET et al., 1998) ou apresentarem maiores dificuldades no desenvolvimento de variedades comerciais geneticamente estáveis.

Eventos transgênicos podem sofrer rearranjos antes ou durante a integração no genoma hospedeiro (KOHLI et al., 1999b) e no sítio de inserção no genoma (MAKERAVITCH et al. 2003; SAWASAKI et al. 1998; SVITASHEV et al. 2002).

A – Identificação dos eventos positivos

A capacidade de identificar os eventos positivos é uma das principais estratégias moleculares na caracterização inicial dos transformantes, detectando-se e identificando-se ou não a presença do transgene. Esta identificação pode ser analisada em nível de DNA, RNAm, proteína, metabólito ou um através de um fenótipo respectivo (BRASILEIRO e CARNEIRO, 1998; LUBECK, 2002). Para isso utilizam-se várias técnicas, entre elas a PCR convencional, ensaios imunológicos ou bioensaio com herbicidas, dependendo do tipo de molécula que se deseja utilizar. (LUBECK, 2002). O método conhecido como bioensaio com

herbicidas, que permite à caracterização fenotípica, testa a presença ou ausência de resistência a alguns herbicidas, e consiste na germinação de sementes em meio contendo o herbicida específico, onde sementes transgênicas e não transgênicas apresentaram respostas distintas (LUBECK, 2002).

Os imunoenaios, como por exemplo, ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) (ENGVALL e PERLMAN, 1971), são métodos de detecção e quantificação das proteínas (exógenas ou não) expressas. Essa técnica tem a vantagem de ser rápida e permitir a análise de um grande número de amostras, possibilitando a análise de populações de plantas transgênicas (BRASILEIRO e CARNEIRO, 1999). É uma técnica bastante sensível, detectando alguns nanogramas da proteína de interesse. A metodologia é simples, direta e reprodutível. É considerado um método preciso e tem sido utilizado por diversos laboratórios na identificação de amostras transgênicas. (ARAGÃO e RIBEIRO, 1998; LUBECK, 2002).

O principal componente de um imunoensaio é um anticorpo com especificidade elevada a uma molécula alvo (proteína exógena). Os imunoenaios podem ser altamente específicos e as amostras necessitam apenas de uma simples preparação antes de serem analisadas (ARAGÃO e RIBEIRO, 1998; LUBECK, 2002).

A reação de polimerização em cadeia da DNA polimerase (PCR - *Polymerase chain reaction*) foi desenvolvida na década de 1980, por Kary Mullis (1987). Nesta técnica, a síntese enzimática, *in vitro*, de milhares de cópias de seqüências específicas de DNA, inicialmente utilizado como molde, é realizada. Cada ciclo de amplificação envolve três etapas: inicialmente, o DNA molde é submetido a uma temperatura de 92°C a 95°C para desnaturação da molécula e abertura da fita dupla; na próxima etapa, ocorre o anelamento dos *primers*, um par de oligonucleotídeos específicos que se ligam a seqüências complementares no DNA molde, delimitando a seqüência que será copiada e amplificada e, finalmente, a temperatura é elevada a 72°C para a enzima DNA polimerase realizar a extensão das fitas de DNA a partir de cada terminal 3' OH livre. Esta extensão compreende a adição de nucleotídeos, utilizando como molde a seqüência alvo de DNA, ou seja, a seqüência da qual se deseja obter grande número de cópias. Este ciclo é repetido algumas vezes e, a cada ciclo, a quantidade de DNA alvo segue aumentando em

progressão geométrica e, no final, a quantidade de DNA alvo produzido é mais de um milhão de vezes a inicial (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

O processo todo possui três fases: a fase exponencial, quando exatamente o dobro do produto é acumulado a cada ciclo assumindo 100% de eficiência da reação; a fase seguinte, denominada linear, em que os componentes da reação estão sendo consumidos e a reação é mais lenta e; na fase final de platô, a síntese não ocorre mais de modo exponencial, há acúmulo de inibidores e escassez de reagentes. A detecção dos produtos amplificados é realizada nesta fase, no final dos ciclos de reação. Para isso, os fragmentos amplificados são separados por tamanho por eletroforese em gel, que é corado com brometo de etídio, para visualização. O PCR tradicional é uma técnica de baixa precisão e resolução, permitindo apenas uma discriminação de tamanhos de fragmento, e não é quantitativo, uma vez que seus resultados não são emitidos com valores absolutos e a quantidade dos fragmentos amplificados são visualizados na fase platô (KUBISTA et al., 2006).

B - Avaliação da expressão gênica

Uma vez identificado o evento positivo para a construção gênica exógena inserida no material biológico, a próxima etapa consiste na análise da expressão do cassete, uma vez que o local de inserção no genoma no processo de transformação é ao acaso, podendo ou não o DNA de interesse ter se inserido em sítios de expressão.

Metodologias para análise da expressão gênica têm sido desenvolvidas nos últimos anos. A técnica de *Northern blot* é uma opção metodológica no estudo da expressão no nível de RNA mensageiro (ALWINE et al., 1977). O ensaio de proteção de ribonuclease (RPA - *Ribonuclease Protection Assay*) detecta qualitativamente a expressão de um determinado gene, podendo ser utilizado para identificação de mais de um mRNA alvo (AMBION, 2006). Já os microarranjos de DNA (*microarrays*) consistem em uma metodologia que analisa a expressão gênica em escala genômica, testando milhares de genes simultaneamente (EISEN e BROWN, 1999). Outras metodologias, como *Differential Display* (DD) (MATZ e LUKYANOV, 1998), permitem o estudo de diversos genes, porém, com desenvolvimento limitado quando comparadas aos microarranjos de

DNA (FREEMAN et al., 2000). A principal limitação de todas essas técnicas é a baixa sensibilidade comparativa. Atualmente, o PCR em tempo real tem sido o método mais empregado na quantificação de níveis de expressão gênica em menor escala. Nesta metodologia, o acúmulo do produto amplificado é detectado a cada ciclo da reação de polimerização em cadeia da DNA polimerase, os dados são coletados na fase exponencial desta reação (APPLIED BIOSYSTEMS, 2004).

C - Avaliação dos sítios de inserção

Para a avaliação do sítio de inserção do fragmento GM é necessária à obtenção de informações sobre a seqüência de DNA na junção entre o genoma da planta e o inserto, bem como da seqüência do próprio inserto, e fim de se verificar a presença de rearranjos (WINDELS et al., 2001). A caracterização do sítio de inserção nos eventos que possuam uma cópia (por genoma haplóide) do transgene facilita o processo.

A identificação do sítio de inserção é de extrema importância para saber se o gene inserido no organismo sofreu ou ainda provocou no genoma receptor algum tipo de rearranjo ou perdas. A ocorrência de “*open reading frames*” (ORFs) ou promotores incompletos pode provocar o aparecimento de proteínas fundidas, ou ainda, se este gene exógeno está inativando ou alterando qualquer padrão de expressão gênica, ou sofrendo efeito de posição. As conseqüências (efeitos) não intencionais podem ser classificadas como efeitos inseridos, ou seja, relacionados à posição de inserção do gene de interesse, ou como efeitos secundários, associados com a interação entre os produtos expressos do gene introduzido e as proteínas endógenas e metabólitos. De modo geral, a avaliação de efeitos não intencionais deve ser estudada caso-a-caso, utilizando-se métodos adequados e considerando fatores tóxicos e antinutricionais não intencionais, através de uma análise dos constituintes e das características GM (MARIN, 2007).

Uma técnica utilizada para caracterizar sítio de inserção é a conhecida como *Tail-PCR (Thermal Asymmetric Interlaced Polymerase Chain Reaction)*, e constitui um método rápido e eficiente para amplificar seqüências desconhecidas adjacente à sítios de inserção. *Nested*, que são *primers* seqüência específica são utilizados juntamente com primers degenerados arbitrários (AD *primers*), que diferem em suas temperaturas de anelamento. Alterando ciclos com

temperaturas de anelamento menores e maiores os produtos específicos são delimitados pelo *primer* inserção específico e pelo *primer* degenerado. A crescente disponibilidade de seqüenciamento de todo o genoma confere a *Tail-PCR* uma ferramenta interessante para identificar facilmente sitio inserção em grandes genomas, através de seqüenciamento diretos dos produtos da *Tail-PCR*. Para a análise em escala genômica, em que se deseja obter seqüências flanquiadoras de cada indivíduo da uma população de uma maneira rápida e de custo acessível, tal técnica seria interessante (SINGER e BURKE, 2003).

D – Técnicas para a determinação do número de cópias do transgene inserido

Plantas transgênicas com múltiplas cópias de DNA demonstraram ser mais propensas a apresentar silenciamento gênico. Conseqüentemente, como um meio de melhorar a eficiência de produção plantas GM, os eventos transgênicos com múltiplas cópias devem ser eliminados o quanto antes do processo, de modo que os esforços possam ser concentrados em eventos de baixo número de cópias (VAUCHERET et al., 1998).

Historicamente, o *Southern blot* constitui o método mais tradicional para esta análise para determinação do número de cópias de um gene no genoma de uma espécie. Foi desenvolvida por Edwin Southern, em 1975, e se baseia em hibridizações entre as moléculas de DNA alvo com sondas marcadas com isótopos radioativos ou quimiofluorescência. O protocolo consiste na digestão do DNA por uma ou mais enzimas de restrição, separação do produto obtido por eletroforese em gel de agarose, transferência do DNA desnaturado para uma membrana de náilon ou nitrocelulose, fixação do DNA à membrana seguida da hibridização com uma sonda contendo a seqüência de interesse. Embora esta metodologia seja mais demorada e trabalhosa, ainda é utilizada para confirmação e caracterização molecular dos eventos elite GM. No entanto, como no desenvolvimento inicial de plantas GMs são gerados um grande número de linhagens faz-se necessário a utilização de métodos mais rápidos e confiáveis para seleção e triagem dos eventos potenciais (ROMANO, 1998). Sendo assim o emprego desta técnica em análises de rotina, pois o método é laborioso e demorado (MASON et al., 2002), o que torna impraticável a utilização para a em larga escala. Deste modo, utilização dos recursos

de uma perspectiva simples e confiável para a rápida determinação do número de cópias seria altamente desejável para a eliminação eventos com múltiplas inserções.

A possibilidade de monitorar níveis de quantificação em tempo real de trouxe uma evolução significativa ao processo de quantificação de fragmentos de ácidos nucleicos através da técnica de PCR em tempo real ou PCR quantitativo. Essa técnica proporciona altos níveis de precisão, especificidade e sensibilidade com maior reprodutibilidade de maneira precisa, porque determina valores durante a fase exponencial da reação.

Através da PCR quantitativo, a quantificação do fragmento amplificado pode ser realizada através da quantificação relativa, normalmente utilizada para quantificação dos níveis de expressão gênica, ou absoluta, que determina o número exato de moléculas ou cópias do fragmento alvo.

Na quantificação relativa para determinar o número de cópias do transgene, o gene alvo é comparado ao número de cópias de um gene endógeno, que tenha seu número de cópias na espécie em questão determinado e, preferencialmente, que apresente baixo número de cópias. Deste modo, o número de cópias do gene alvo é determinado em relação a um gene endógeno que pode funcionar como próprio calibrador na própria amostra, ou ainda se utilizar uma amostra não transgênica como calibradora (MARCELINO, 2006).

Na quantificação absoluta, o número de cópias do gene alvo é dado em termos absolutos e requer quantidades absolutas de um padrão a ser utilizado na preparação da curva de calibração. Para este tipo de quantificação os padrões absolutos os mais utilizados são baseados em DNA plasmidial, genômico e RNA sintetizado *in vitro*, para a construção de curvas padrão.

O ponto que detecta o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado de *Cycle Threshold* (Ct). Este ponto permite a quantificação exata da fluorescência. Através da emissão da luz pelos compostos fluorescentes (moléculas que absorvem e emitem luz em comprimento de onda específico) gera um sinal que aumenta na proporção direta da quantidade de produto da PCR. Com isso, os valores da fluorescência são gravados durante cada ciclo e representam a quantidade do produto amplificado. Os compostos fluorescentes mais utilizados são o *SYBR Green*[®] e *TaqMan*[®].

3.4 PCR QUANTITATIVO NA QUANTIFICAÇÃO DE INSERÇÕES TRANSGENES EM GENOMAS

O PCR em tempo real ou PCR quantitativo (qPCR) possibilita o monitoramento ciclo a ciclo na reação de amplificação, fato que revolucionou o processo de quantificação de fragmentos de DNA e RNA. Na qPCR realiza-se a quantificação destes ácidos nucléicos de maneira precisa e com maior sensibilidade e reprodutibilidade, pois a mesma é realizada durante a fase exponencial da reação, através da medição da intensidade de fluorescência emitida pelos fluoróforos, à medida que os mesmos vão sendo incorporados às fitas recém sintetizadas. (NOVAIS et al., 2004). O valor denominado limiar ou *threshold* é calculado em função da quantidade de fluorescência basal (*background*). Neste ponto, o sinal de fluorescência gerado pela amostra é significativamente maior que a fluorescência basal. A quantidade de ciclos de PCR requerida para que cada amostra emita fluorescência suficiente para alcançar este ponto é definido *cycle threshold* ou Ct. O Ct é específico para cada amostra e é inversamente proporcional à quantidade inicial do alvo presente na reação. Este valor é a base para a quantificação pela PCR quantitativo (KUBISTA et al., 2006).

A emissão dos de compostos fluorescentes gera um sinal que aumenta na proporção direta da quantidade de produto da PCR amplificado e conseqüentemente da amostra inicial. Sendo assim, os valores da fluorescência são captados e gravados durante cada ciclo da reação e representam a quantidade de produto gerado. Os compostos fluorescentes atualmente nas pesquisas utilizando qPCR mais utilizados são o *dye* intercalante *Sybr[®]Green* e a sonda de hidrólise *TaqMan[®]* (NOVAIS et al., 2004).

Durante a fase exponencial de amplificação é possível determinar um valor de intensidade de fluorescência, na qual todas as amostras podem ser comparadas. Este valor é denominado Limiar ou *threshold* e é calculado em função da quantidade de fluorescência basal (*background*). Neste ponto, o sinal de fluorescência gerado pela amostra é significativamente maior que a fluorescência basal. A quantidade de ciclos de PCR requerida para que cada amostra emita fluorescência suficiente para alcançar este ponto é definido *cycle threshold* ou Ct. O Ct é específico para cada amostra e é inversamente proporcional à quantidade

inicial do alvo presente na reação. Este valor é a base para a quantificação pela PCR quantitativo (HIGUCHI et al., 1993).

Esta técnica tem sido utilizada para determinar cópia número do gene inserido (CHIANG et al., 1996), níveis de mRNA (LEUTENEGGER et al., 1999), bem como para a detecção de DNA viral (TANAKA, et al., 2000) e entre outras aplicações.

3.4.1 Metodologia *Sybr[®] Green*

O *dye* intercalante *Sybr[®] Green* possui alta afinidade pela molécula fita dupla de DNA. Esta molécula emite pouca fluorescência em solução, mas quando ligado a uma molécula fita dupla de DNA emite um forte sinal e sob excitação emite luz. Assim, com o acúmulo do produto amplificado na PCR, a fluorescência aumenta proporcionalmente e é então detectada. É um método simples e econômico, pois não necessita de síntese de sondas específicas, de baixo custo, facilidade de uso e sensibilidade, podendo ser utilizado em laboratório para análise de um grande número de genes. A desvantagem da técnica é que a molécula do *dye Sybr[®] Green* pode se ligar a qualquer fita dupla de DNA na reação, como produtos inespecíficos de amplificação e/ou dímeros de *primers*, superestimando o resultado final, uma vez que o sinal de fluorescência emitido pode corresponder a ambos, os fragmentos específicos ou não (KUBISTA et al., 2006).

3.4.2 Metodologia *TaqMan[®]*

A metodologia *TaqMan[®]* utiliza além dos *primers*, uma sonda interna duplamente marcada, na extremidade 3' com uma molécula *dye quencher* e na extremidade 5', com uma molécula *dye repórter*. formada por uma sonda de 20-30 nucleotídeos se hibridiza na parte interna da seqüência entre os *primers forward* e *reverse* da PCR. Esta sonda possui um *dye quencher* na extremidade 5' que captura

a fluorescência emitida pelo *dye* repórter, localizado na extremidade 3', que quando ocorre a separação das moléculas pela atividade exonuclease 5' da enzima *Taq* (HOLLAND et al., 1991) clivando a sonda, o *repórter* e o *quencher* são separados e a emissão do repórter não é mais capturada pelo *quencher*, resultando em um aumento da emissão da fluorescência, sendo os produtos da PCR detectada pelo sistema óptico do aparelho e interpretada como amplificação positiva e quantificável (KUBISTA et al., 2006). Esse processo ocorre em cada ciclo e não interfere na acumulação exponencial do produto de PCR (GIULIETTI et al., 2001).

A emissão de fluorescência é contida pelo FRET (FRET - *Fluorescence Resonance Energy Transfer* - Transferência de Energia Ressonante por Fluorescência), que resulta na distância entre os *dyes* (fluoróforos), que dependente entre os estados excitados eletrônicos de duas moléculas *dyes* na qual os íons excitados são transferidos de uma molécula doadora (*dye repórter*) a uma molécula receptora (*dye quencher*), sem a emissão de um fóton. Quando as moléculas *dyes* estão próximas, ocorre transferência de energia e não ocorre emissão de fluorescência, que só acontece quando os fluoróforos estão distantes espacialmente, inibindo a transferência de energia e permitindo a emissão da fluorescência (VALASEK e REPA, 2005).

Esse tipo de químico apresenta um custo elevado, pois a síntese de sondas específicas é necessária. No entanto, este sistema pode ser utilizado em reações *multiplex*, ou seja, reações onde mais de um par de *primers* pode ser usado, detectando diferentes seqüências alvos Além disso, apresenta maior especificidade que a metodologia *Sybr[®] Green*, uma vez que, além dos *primers* utilizados serem específicos para o gene de interesse, sondas específicas também são utilizada na reação de amplificação (KUBISTA et al., 2006).

3.5 QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA PARA DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DE INSERÇÕES DE TRANSGENE

A quantificação absoluta determina o número exato de número de cópias, onde usualmente utiliza-se o método curva padrão. Trabalhos realizados por Niesters em 2001, utilizou a quantificação absoluta para determinar o aumento de

carga viral em amostra de humanos. Uma abordagem para quantificação absoluta requer a construção de curvas com padrões conhecidos, cuja quantidades sejam determinadas com precisão (NIESTERS et al., 2001).

Na quantificação absoluta, o número de cópias do alvo de interesse é dado em termos absolutos e requer quantidades absolutas de um padrão a ser utilizado na preparação da curvas padrão. DNA plasmidial ou genômico são normalmente utilizados para preparar padrões absolutos. A concentração das amostras são medidas três vezes em espectrofotômetro ($A_{260\text{ nm}}$) sendo a média entre elas e convertida em número de cópias, usando o peso molecular do DNA. Por isso, uma das etapas mais importante é o preparo dos padrões de calibração, onde a quantificação deve ser precisa. Essas quantidades conhecidas devem ser inicialmente determinadas por métodos independentes e, então, serem utilizadas para a construção da curva padrão. Neste tipo de quantificação, normalmente não é empregada uma referência endógena, utilizando apenas uma curva para amplificação do gene alvo, de modo que erros na quantificação do número de cópias são facilmente observados, pois as variações são obtidas em função de variações de quantidade de DNA inicial utilizado na reação e não devido à variação do número de cópias presente no genoma. Deste modo, para eliminar tais possíveis erros, sugere-se sempre utilizar além da curva padrão para o gene, uma para uma referência endógena, que irá servir para normalizar os resultados em função da quantidade de DNA adicionado na reação (MARCELINO, 2006).

Estudos de PCR quantitativo usando a quantificação absoluta propõem o emprego de padrões de DNA plasmidial para o desenvolvimento de curvas de calibração para se obter estimativas de uma quantidade de DNA desconhecida, resultado da amplificação. No entanto, o efeito de matriz decorrente de se utilizar curvas baseadas em DNA plasmidial para quantificar amostras de DNA genômico são muitas vezes ignorados e, em alguns casos, impossíveis de se caracterizar.

3.6 QUANTIFICAÇÃO RELATIVA PARA DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DE INSERÇÕES DE TRANSGENE

A quantificação relativa pode ser realizada pelo método da curva padrão ou empregando a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK et al., 2001). Inicialmente é necessária a validação do experimento para demonstrar que as eficiências de amplificação do alvo e da referência interna são aproximadamente iguais. Isto deve ser realizado para qualquer tipo de quantificação em PCR em tempo real (LIVAK et al., 2001).

Assim como na quantificação absoluta, na quantificação relativa pelo método da curva padrão é necessário a construção de curvas de calibração, tanto para o gene alvo como para a referência endógena. O número de cópias do alvo, normalizado pela referência endógena, é comparado ao do calibrador. Em todas as amostras experimentais, as quantidades do alvo e da referência endógena são determinadas a partir de suas respectivas curvas padrão. A quantidade do alvo é normalizada por sua divisão pela quantidade de cópias da referência endógena, ambos amplificados em cada amostra, no mesmo tubo ou placa de reação. O valor normalizado é dividido pelo valor do calibrador. Assim, o calibrador torna-se 1X da quantidade do alvo, e todas as outras quantidades são expressas como nX da diferença relativa ao calibrador. No caso da quantificação do número de cópias da inserção de um cassete transgene, a referência endógena, utilizada como calibrador, deve ser de preferência um gene com baixo número de cópias (MARCELINO, 2006).

Pelo fato da quantidade da amostra ser dividida pela quantidade do calibrador, a unidade da curva padrão desaparece. Portanto, o pré-requisito principal é que as diluições do padrão utilizado sejam conhecidas. Para a quantificação relativa, qualquer estoque de RNA ou DNA contendo um alvo apropriado pode ser usado no preparo de padrões (MARCELINO, 2006).

A quantificação relativa pelo emprego da fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK et al., 2001) é similar ao da curva padrão, mas utiliza uma fórmula aritmética para alcançar o mesmo resultado de quantificação relativa. Não há necessidade de curva padrão, desde que se tenha validado a eficiência de amplificação do alvo e da referência endógena. A quantidade do alvo, normalizada para uma referência endógena e em relação ao calibrador é dada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK et al., 2001).

4 ARTIGO

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DO
NÚMERO DE CÓPIAS TRANSGENES NO GENOMA DA SOJA POR PCR
QUANTITATIVO**

Artigo a ser submetido à revista: *BioTechniques*

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS TRANSGENES NO GENOMA DA SOJA POR PCR QUANTITATIVO

INTRODUÇÃO

A adoção do cultivo de plantas geneticamente modificadas (PGMs) é uma realidade no mundo atual. De modo geral, após a obtenção de plantas GM, a caracterização molecular é uma etapa importante e essencial para seleção dos eventos mais promissores, que constituem o evento GM elite, que será utilizado como linhagem parental em programas de melhoramento.

A determinação do número de cópias do transgene no genoma da espécie e de alterações nos níveis de expressão de genes em eventos GM constitui em avaliações moleculares iniciais e de grande impacto na definição dos eventos mais promissores. Os métodos tradicionais para estas análises se baseiam em hibridizações entre as moléculas de DNA alvo com sondas marcadas com isótopos radioativos, sendo o *Southern blot* a técnica considerada padrão nesse tipo de estudo. Embora tais técnicas sejam mais demoradas e trabalhosas (MASON et al., 2002), ainda são utilizadas para confirmação dos resultados de caracterização molecular dos eventos elite, que são encaminhados para programas de melhoramento e análises de biossegurança. No entanto, como no desenvolvimento inicial de uma PGM são gerados um grande número de linhagens faz-se necessário o desenvolvimento de métodos rápidos e confiáveis para seleção dos eventos potenciais.

Dentro deste contexto, o presente trabalho visa à caracterização molecular quanto ao número de cópias do alvo transgene *DREB1A* inseridos no genoma da soja, em eventos GM tolerantes à seca, utilizando a técnica de PCR quantitativo. Para atingir tal objetivo, o estudo foca a padronização de um sistema de quantificação do número de cópias através do desenvolvimento de padrões de calibração baseados em DNA genômico e plasmidial, seguida da construção de curvas de calibração para quantificação absoluta utilizando tais padrões, e ainda um sistema de quantificação relativa pelos métodos $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e $2^{-\Delta Ct}/2$. Ambos os sistemas

de quantificação propostos pela técnica de PCR quantitativo foram o comparados com os resultados obtidos por *Southern blot*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Biológico

Diferentes eventos de soja geneticamente modificados (GM), P58, P1333, P59 B, 382 B, 345 B, 45 A, 3058, 3075, 3069, obtidos por BENEVENTI (2006) através da técnica de biobalística, contendo a construção *rd29:AtDREB1A*, cultivados nas gerações T₁, T₂ e T₅, foram utilizados como amostras teste para a escolha da metodologia que apresenta maior precisão e exatidão na quantificação das inserções do transgene no genoma da soja. Após a transformação e obtenção das plantas, os eventos positivos foram confirmados por PCR convencional com *primers* específicos. Como controle não transgênico, foi utilizada a cultivar BR16, sendo esta a mesma utilizada no processo de transformação para obtenção do evento positivo.

Extrações de DNA

Para as análises de qPCR e *Southern blot*, o DNA total foi extraído de discos foliares das plantas transformadas e controle, de acordo com o método CTAB de DOYLE e DOYLE (1990) com modificações.

Primers e sondas

A sequência do gene *DREB1A* e lectina (No acesso no *GeneBank* K00821.1) foram utilizadas para o desenho de *primers* e sondas específicos para emprego nos ensaios de quantificação por PCR quantitativo (Tabela 1). Todos oligonucleotídeos foram desenhados utilizando-se o software *Primer Express* (*Applied Biosystems*) e marcados com diferentes fluoróforos. Os oligonucleotídeos foram desenhados para o emprego da metodologia *TaqMan*[®], sendo que as sondas específicas desenhadas para o gene *DREB1A* tiveram como repórter o fluoróforo FAM, enquanto para o gene endógeno lectina, o fluoróforo TET.

Tabela 1 – Sequências dos conjuntos de *primers GmLec*, *DREB1A* e suas respectivas sondas *Taqman*[®].

Alvo	Primers	Sequências (5'-3')	Amplicon
Gene da Lectina	GmLec F	TCC CGA GTG GGT GAG GAT AG	65pb
	GmLec R	CAT GCG ATT CCC CAG GTA TG'	
	Sonda	TCT CTG CTG CCA CGG GAC TCG	
<i>DREB1A</i>	DREB-S1DF	GCCGAGTTTGTGGCTAATATGG	87pb
	DREB-S1DR	TCGCCGTCGACTTCATGATTATG	
	Sonda	ATGCTTTTGCCGCTTCC	

PCR em tempo real

As reações de PCR quantitativo foram conduzidas em equipamento ABI PRISM[®] 7300 *Sequence Detection System (Applied Biosystems)*. A amplificação do fragmento DREB1A e lectina foram realizadas em reações *multiplex* utilizando-se a tecnologia *TaqMan*[®]. As amostras foram quantificadas por quantificação absoluta pelo método da curva padrão, utilizando-se curvas baseadas em DNA plasmidial e genômico, e por quantificação relativa pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK et al., 2001) e $2^{-\Delta Ct}/2$, apresentado neste trabalho.

Diferentes quantidades de DNA foram adicionadas ao tampão *TaqMan*[®] *master mix*, que contém todos os componentes necessários para a reação de amplificação (enzimas uracil N-glicosilase e AmpliTaq Gold, MgCl₂, dNTP's e KCl), em um volume final de 25µL. As concentrações ideais dos *primers* e das sondas para cada alvo foram padronizadas, de acordo com a eficiência de amplificação de cada sistema.

As condições de termociclagem utilizadas foram 50°C por 2 min, para permitir a ação da uracil N-glicosilase, 95°C por 10 min para a ativação da DNA polimerase, seguidos de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 s, 58°C - 60°C por 1 min, para anelamento dos *primers* e extensão da fita.

Cada amostra foi quantificada em triplicata em três corridas independentes. Os valores médios do número de cópias de cada amostra foram comparados com os resultados obtidos por *Southern blot*. A variação dos valores de

número de cópias de cada amostra foi expressa calculando-se os valores de desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV(%)).

Padronização do sistema

Reação *simplex*

A determinação da quantidade de *primers* a ser utilizada nas reações foi inicialmente avaliada em um ensaio *simplex*. Este visou determinar a melhor concentração destes reagentes que permitisse o menor valor de Ct e a máxima fluorescência obtida concomitantemente em cada sistema. Para o gene endógeno lectina a concentração final de 300nM da sonda *taqman* foi fixada e os *primers* *GmLecR* e *GmLecF* variaram em concentração de 50nM à 600nM.

Após o ajuste das concentrações de cada *primer* e sonda, a eficiência de amplificação de cada sistema foi avaliado nas reações *simplex*. Para o cálculo da eficiência ($E = 10^{-1/\text{slope}} - 1$) de amplificação de cada sistema foi realizada uma diluição seriada, variando de 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} , tanto com os plasmídeos recombinantes como para o DNA genômico.

Reações *multiplex*

Após a determinação da eficiência de cada sistema em reações independentes, foram realizadas amplificações em reações *multiplex*, contendo o gene lectina como referência endógena e o gene alvo *DREB1A*. Uma vez que cada sistema, alvo e referência endógena, estão sendo amplificados no mesmo tubo, pode haver competição entre os reagentes ou até mesmo favorecimento devido à maior prevalência de sequências de um dos genes. Sendo assim, as eficiências de cada sistema foram novamente determinadas e as concentrações de cada componente ajustados de modo a garantir a maior similaridade entre os mesmos.

Quantificação do número de cópias de inserções de transgenes por QT relativa

Quantificação relativa pelo método do $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Para a determinação do número de cópias do transgene por quantificação relativa pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK et al., 2001; INGHAM et al., 2001) o gene lectina foi utilizado como referência endógena e parte da região codificadora do gene *DREB1A* como gene alvo. A utilização do gene lectina foi proposta uma vez que, este gene é espécie específico e apresenta uma cópia no genoma da soja. A cultivar BR16 não transgênica foi utilizada como calibradora. O cálculo do ΔCt , cujo valor é utilizado na fórmula para cálculo do número de cópias, é dado pela diferença dos valores de Ct do gene alvo pelo do gene endógeno. O valor de ΔCt é subtraído do valor de ΔCt do calibrador, a cultivar BR16 não transgênica. Este cálculo remove qualquer variação que contribua amplificação desigual das amostras, e, portanto, permite que os ensaios sejam realizados sem prévia determinação das concentrações do DNA. Como o número de cópias do gene endógeno por genoma permanece constante, qualquer mudança na quantidade (de cópias) do gene de interesse pode ser determinada (INGHAM et al., 2001).

Quantificação relativa utilizando a referência endógena como calibrador $2^{-\Delta Ct}/2$

Para a determinação do número de cópias do transgene por quantificação relativa, outra estratégia foi utilizar como calibrador o próprio gene lectina, utilizado como referência endógena. Os valores de Ct do alvo *DREB1A* são subtraídos pelo Ct da referência endógena lectina em cada amostra, resultando no valor de ΔCt . O cálculo final para o número de cópias é 2, correspondente à somatória da eficiência do gene alvo (100%=1) e do controle endógeno (100%=1), elevado a média de $-\Delta Ct$ ($2^{-\Delta Ct}$). Posteriormente, os resultados são divididos por 2, uma vez que a soja apresenta genoma diplóide ($2n=4x=40$), logo em cada cópia do genoma existe 2 cópias do gene lectina, uma em cada cromossomo. Sendo assim, ao final dos cálculos, o valor total de cópias das amostras deve ser dividido por 2, tendo como fórmula final dos cálculos $2^{-\Delta Ct}/2$.

Quantificação do número de cópias de inserções de transgenes por QT absoluta

1 OBTENÇÃO DE PADRÕES DE CALIBRAÇÃO BASEADOS EM DNA PLASMIDIAL (PDNA) E EM DNA GENÔMICO (GDNA)

a) Clonagem de parte do gene lectina (pLec)

O produto de amplificação de parte do gene lectina de soja foi obtido pela amplificação do DNA genômico da soja BR 16 com *primers* específicos. Após a amplificação, o fragmento de interesse foi purificado utilizando o kit *Invitrogen Pure Link™*, conforme instruções do fabricante e clonado no vetor de clonagem pGEM-T *Easy Vector* da Promega.

Após a transformação, via eletroporação de bactérias *E. coli*, as células foram plaqueadas em meio LB (Luria Bertani) contendo ampicilina (100 µg/placa) e incubadas overnight para crescimento das colônias. Após a seleção dos clones recombinantes foi feita a extração de DNA plasmidial. O seqüenciamento foi conduzido, utilizando-se o kit *ABI Prism Big Dye Terminator Cycle sequencing*, versão 2 (*Applied Biosystems*).

A seqüência de boa qualidade foram organizadas em um banco de dados e clusterizadas (BLASTn e BLASTx; ALTSCHUL *et al.*, 1990), utilizando um espelho do *GenBank* em um servidor local. O resultado seqüenciamento foi de 67 pares de base que, quando submetido ao *Genbank* para comparação com seqüências depositadas, mostrou similaridade com seqüência de outras espécies de *Glycine max*.

b) Plasmídeo de DREB1A

Os plasmídios contendo as construções gênicas (*rd29A::AtDREB1A*) com o promotor estresse-induzido *rd29A* (YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. e SHINOZAKI, K., 1993 e YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. e SHINOZAKI, K., 1994) utilizados na geração de plantas transgênicas tolerantes á seca, foram obtidos através do acordo de parceria firmado entre as empresas, Empresa Brasileira de

Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), sediado no Brasil e *Japan International Research Center for Agricultural Sciences* (JIRCAS), sediada no Japão.

Para a multiplicação e estoque, esses plasmídeos foram inseridos em *E. coli* (cepa DH5α), segundo o protocolo de MILLER e NICKOLOFF (1995) em eletroporador modelo *Micro pulser*, *Bio-Rad*. A purificação plasmidial foi realizada em larga escala utilizando-se o Kit *Wizard Plus Maxipreps DNA Purification System* (*Promega Corporation, Madison, Wi, USA cat. A.7270*) seguindo recomendações do fabricante.

O tamanho de cada plasmídeo acrescido do inserto foi utilizado para estimar o peso médio de uma cópia do mesmo. O plasmídeo DREB1A possui o tamanho de 4838pb e o plasmídeo contendo parte do gene da lectina 3079pb. A determinação da massa de uma cópia de cada plasmídeo foi estimada considerando-se o tamanho do genoma e seu peso molecular (HERNANDEZ et al., 2003; APPLIED BIOSYSTEMS, 2003), onde n = número de par de bases, plasmídeo + inserto bp; m = massa (g); número de Avogrado = $6,023 \times 10^{23}$ moléculas e valor estimado de 1 mol de par de bases = 660g/mol. O peso de uma cópia dos plasmídeos pDREB e pLec foram 5,3 pg e 3,37 pg, respectivamente.

Para a construção dos padrões de calibração baseada em DNA genômico é preciso uma amostra com o valor de número de cópias pré-determinado. Os cálculos para determinação da massa do DNA genômico presente em cada diluição é estimada considerando-se o tamanho do genoma da soja (1,115Mb) e seu peso molecular

$$m = n \text{ (pb)} \times \frac{\text{(1 mole)}}{6,023 \times 10^{23} \text{ moléculas (pb)}} \times \frac{\text{(660 g)}}{\text{mole}}$$

$$m = 1,115 \times 10^9 \text{ pb} \times \frac{\text{(1,095 } \times 10^{-21} \text{ g)}}{\text{(pb)}} = 1,22 \text{ pg}$$

Assim, a massa de uma cópia do genoma da soja equivale a 1,22 picogramas (pg) do DNA genômico da soja, valor utilizado das diluições que contenham as quantidades desejadas para construção da curva, baseada na

amostra de DNA genômico com o número de cópias pré-determinado. As diluições foram feitas variando de 1000, 500, 100, 50, 25, 10, 5, 1 cópia.

Para a construção das curvas de calibração baseadas no número de cópias de plasmídeos recombinantes, o DNA plasmidial e genômico foram cuidadosamente quantificados por espectrofotômetro Nano Drop, em triplicata, sendo que a média da concentração de cada amostra utilizada para construção dos padrões.

1.2 OBTENÇÃO DE PADRÕES DE CALIBRAÇÃO BASEADOS NA MISTURA DE DNA GENÔMICO (GDNA) E PLASMIDIAL (PDNA)

Padrões alternativos, oriundos da mistura pDreb e DNA genômico, foram obtidos a fim de verificar a interferência do *background* na quantificação por qPCR. Para a diluição das amostras de gDNA e pDNA, de modo a apresentarem quantidades específicas de cópias do genoma ou do DNA plasmidial, as amostras foram quantificadas em triplicata em espectrofotômetro e em gel de agarose. Os valores médios foram utilizados para determinar de forma precisa a concentração de cada amostra a ser utilizada no preparo das diluições. Os padrões baseados em pDNA diluídos em DNA genômico foram preparados de modo a conterem 1000, 500, 100, 50, 25, 10, 5 e 1 cópia de cada plasmídeo (1:1).

2 CONSTRUÇÃO DAS CURVAS DE DNA PLASMIDIAL (PDNA) E GENÔMICO (GDNA)

A determinação do número de cópias do cassete transgene no genoma da soja GM pela quantificação absoluta necessita da construção de curvas de calibração. Tais curvas foram construídas a partir dos padrões de calibração baseados em DNA plasmidial (pDNA) e genômico (gDNA), previamente elaborados. O plasmídeo recombinante pDREB e gDNA foram utilizados para construção das curvas de calibração para o gene alvo, e o plasmídeo contendo parte do gene da lectina da soja como referência endógena.

Para construção de cada curva, o logaritmo do número inicial de cópias de cada diluição será plotado em função dos valores de Ct e, deste modo, a equação que descreve a variação dos valores de Ct em função do número de cópias

amplificadas é gerada. Cada diluição da curva será amplificada em duplicata, em três reações independentes, de modo que, são geradas três diferentes curvas para cada um dos genes alvos.

Para todas as amostras experimentais, as quantidades do gene alvo e da referência endógena são determinadas a partir de suas respectivas curvas padrão. A quantidade do gene alvo é normalizada por sua divisão pela quantidade de cópias da referência endógena, valores obtidos através da curva de calibração realizada com quantidades de moléculas conhecidas.

Os padrões baseados em DNA genômico foram obtidos através da diluição seriada de uma amostra positiva para o evento DREB1A, contendo baixo número de cópias. O DNA genômico GM a ser utilizado para construção dos padrões de calibração deverá ser previamente caracterizado quanto ao número de inserções do cassete em seu genoma, para que a proporção do número de cópias do transgene e a número de cópias do gene de referência endógena seja corrigida ou mantida 1:1, caso o haja 1 cópia do transgene no genoma da amostra.

A qualidade das curvas é demonstrada pela comparação dos valores médios de Ct obtidos, em cada diluição, entre as três curvas geradas, e seus respectivos valores de desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV (%)). Foram ainda determinados o coeficiente de correlação (R^2), índice de inclinação da reta, valor em que a reta cruza o eixo y (y-intercepto) e a eficiência de amplificação de cada alvo, parâmetros considerados relevantes nas análises de quantificação por PCR em tempo real.

Southern blot

Extração de DNA Genômico

Foram extraídos cerca de 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de DNA de tecido foliar das plantas geneticamente modificadas de soja utilizado o protocolo de DOYLE e DOYLE (1987), com modificações. Foi utilizado cerca de 5mL de material macerado em nitrogênio líquido, adicionados 20mL de tampão de extração (2% CTAB, 2% PVP, 100 mM de TRIS-HCl, 25 mM de EDTA, 20 mM de NaCl, 2% de β -mercaptoetanol). O material foi incubado a 65°C por 45 min, em seguida centrifugar. Após esse período foi adicionado o mesmo volume de clorofórmio (1:1), seguido de

homogenização por 10 min e centrifugação a 7.500 rpm durante 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente, a fase aquosa foi transferida para novo tubo onde foi adicionado 0,6X volume de isopropanol, e incubar em -20°C por 1 hora em seguida, as amostras foram centrifugadas a 7.500 rpm por 30 min a 4°C e o sobrenadante descartado. Em seguida o pellet foi ressuscitado em 200 µL de TE e 2 µL de RNase (5mg/mL), deixado a 37°C por 1h e armazenado a -20°C.

Para verificar a qualidade da extração do DNA, as amostras foram submetidas a eletrofose com tampão SB 1X (NaOH 500 mM) em gel de agarose 0,8% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 µg/ml) e visualizadas sob luz UV em aparelho transluminador. A quantificação do DNA foi feita em Nano Drop.

Para a digestão das amostras de DNA, visando a análise do número de cópias do gene *DREB1A*, foram usadas as enzimas *EcoRI* e *HindIII* (50U/ul), que realizam cortes no início da região promotora e no final da região terminadora do plasmídeo *DREB1A*, liberando o cassete transgene com tamanho de 1,92kb. Para analisar do número de inserções, foi utilizada a enzima *HindIII* (50U/ul), que realiza corte único no plasmídeo, linearizando-o (Figura 1). As reações foram incubadas a 37°C em estufa. Os DNAs digeridos foram separados em gel de agarose a 0,8%, por um período de 16 horas. Após eletroforese, o gel foi incubado por 10 min em solução de depurinação. Em seguida, o gel foi transferido para a solução de desnaturação, por dois períodos de 30 min cada, sendo que o mesmo processo foi aplicado para a solução seguinte, de neutralização (REED e MANN, 1985).

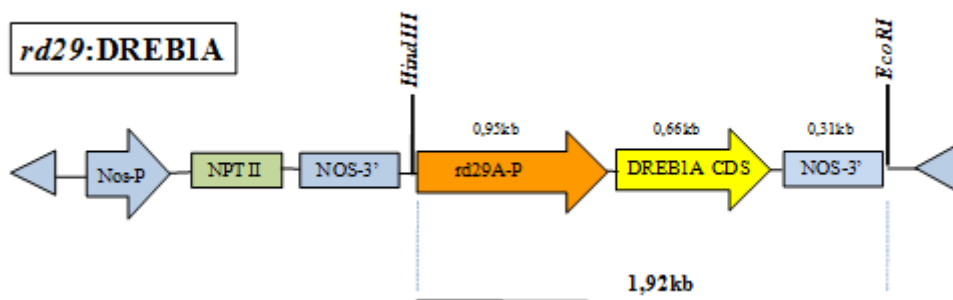


Figura 1 – Representação esquemática da construção gênica *rd29:A::DREB1A*, em laranja região promotora, em amarelo região codante *DREB1A*, em azul região NOS terminal.

Após as lavagens o DNA foi transferido por capilaridade para uma membrana de nylon ou nitrocelulose em SSC 20X, por 18 horas. Após a

transferência, a membrana foi lavada em SSC 2X por 5 min, e seca em estufa, à 80°C. A membrana foi então pré-hibridizada com a solução de hibridização *ULTRAhyb™Ambion* (NaCl 0,5 M, reagente de bloqueio 4%) a 42°C, por 2 horas. Para o preparo da sonda foi utilizado uma sequência específica do gene alvo. O DNA plasmidial alvo foi digerido com as enzimas (10U/ul) *EcoRI* e *HindIII* em uma reação incubada a 37°C por 16 horas. Após esse período, foi realizada uma eletroforese em agarose 0,8% e o fragmento de interesse separado e purificado com o Kit *Pure Link™* (Invitrogen).

A reação de hibridização foi conduzida a 42°C, por no mínimo 18 horas, em solução de hibridização, contendo aproximadamente 30 ng/mL de sonda. A sonda foi marcada seguindo-se as recomendações do fabricante, realizada utilizando-se [$\alpha^{32}\text{P}$]d-CTP, pela técnica de "*random priming*". Após o período de incubação, a membrana foi lavada na solução de lavagem primária (uréia 2 mol/L; SDS 0,1%; fosfato de sódio 50 mM pH 7,0; NaCl 150 mM; MgCl₂ 10 mM e reagente de bloqueio 0,2%) duas vezes durante 10 min, a 42°C.

A sonda foi hibridizada *overnight* com o DNA presente na membrana, incubando-se membrana mais a sonda, a 42°C, em estufa. Após este processo, as membranas foram lavadas com tampões específicos para a retirada do DNA não hibridizado e excesso de sonda e por fim, e colocadas para exposição em filme fotográfico **Kodak BioMax**.

RESULTADOS

Dezoito amostras geneticamente modificadas de soja tolerantes a seca (Tabela 2), resultantes de 9 eventos contendo o gene *DREB1A*, foram avaliadas quanto ao número de cópias do cassete inserido em seu genoma pelas técnicas de *Southern blot* e PCR em tempo real. Pela técnica de qPCR foram utilizadas a quantificação relativa e absoluta, utilizando-se o gene lectina como referência endógena e calibrador interno, além da amostra BR16 não transgênica.

Os 9 eventos estão distribuídos em diferentes gerações T₁, T₂ e T₅, encontram-se listados na Tabela 2.

Tabela 2 – Nove eventos transgenes nas gerações T₁, T₂ e T₅ avaliados técnicas de por *Southern blot* e PCR em tempo real.

Geração	T ₁	T ₂	T ₅
	45 A- 48 A	1333 A- v. 30	P58
Amostras analisadas	59 B-12A	1333 A - v. 37	P58 (1)
	345 A- 61 A	1333 - v. 25	P58 32 (1)
	382 B -97 B	P 58 - v. 41	P58 32 (2)
		P 58 - v. 46	
		P 58 - v. 51	
		3075	
		3069	
		3069 (4) B1	
		3058 (6) A1	

Determinação do número de cópias por *Southern blot*

Nove eventos foram quantificados quanto ao número de cópias pela técnica de *Southern blot*. De acordo com a Figura 1a e 1b, entre os eventos na geração T₁, pode-se observar que as amostras 59 B-12A T₁ e 382 B -97 B T₁ apresentaram elevado número de cópias determinadas em ambas as metodologias, por qPCR foi 18, enquanto *Southern blot* foi estimado em torno de 20 cópias. Nas amostras 45A- 48 A T₁, 345A- 61 A T₁ não foi detectado o sinal de hibridização do transgene em seu genoma, em ambas as metodologias.

Nos eventos em geração T₂, na amostra 1333 A- v.37 também não foi detectado sinal de hibridização, enquanto em outra amostra do mesmo evento, 1333 – v. 25 T₂, apresentou cerca de 5 a 6 número de cópias. Todas as amostras do evento P58 T₂ apresentaram mesmo padrão de bandas após a revelação das membranas, sendo que as amostras P58 – v. 41 T₂, P58 – v. 51 T₂ apresentaram em torno de 5 a 8 cópias, enquanto a P 58 – v.46 teve as bandas reveladas mais intensas, indicando a presença um número de cópias superior a 5 (Figura 1b). De acordo com a figura 2, pode-se observar que a amostra 3075 T₂ apresenta de 1 a 2 cópias, 3069 T₂ (4) e 3069 T₂ apresentaram de 2 a 4 cópias e a amostra 3058 T₂ apresentou de 1 a 2 cópias (figura 2).

Os eventos P58 geração T₅, apresentaram aproximadamente de 2 a 3 cópias do transgene, ocorrendo uma diminuição no número de cópias detectadas quando comparadas às amostras dos mesmos eventos avaliadas em T₂.

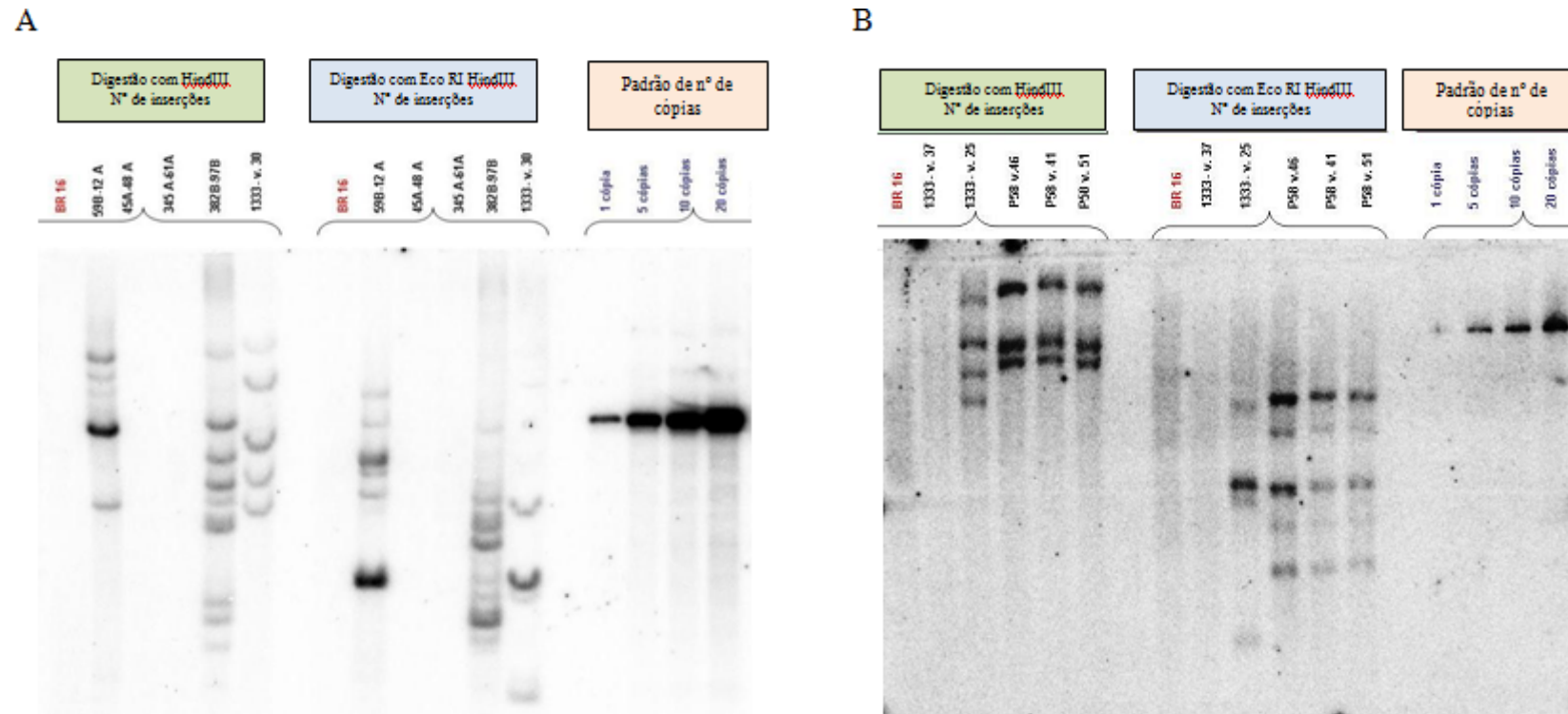


Figura 2 – Determinação do número de cópias do cassete DREB1A em amostras GM por Southern blot. O DNA das amostras foi digerido com as enzimas EcoRI e HindIII, transferidos para uma membrana de náilon e posteriormente hibridizados com a sonda DREB, fragmento de 1,92 kb marcada com ^{32}P , liberado do cassete transgene após clivagem com as mesmas enzimas. A – Número de inserções (em verde) e cópias (em amarelo) do cassete transgene no genoma da soja nos eventos em T₁, P59 B-12A, 45A- 48 A, 345A- 61 A, 382 B -97; B – Número de inserções (em verde) e cópias (em amarelo) do cassete transgene no genoma da soja nos eventos em T₂, 1333 A- v.30, 1333 A – v.37, 1333 – v. 25, P58 – v. 46, P58 – v. 41. Uma amostra não transgênica BR16 foi utilizada como controle negativo, além de DNA plasmidial em quantidades correspondentes a 1, 5, 10 e 20 cópias do genoma da soja como padrão de número de cópias. Ladder – padrão de tamanho 1kb.

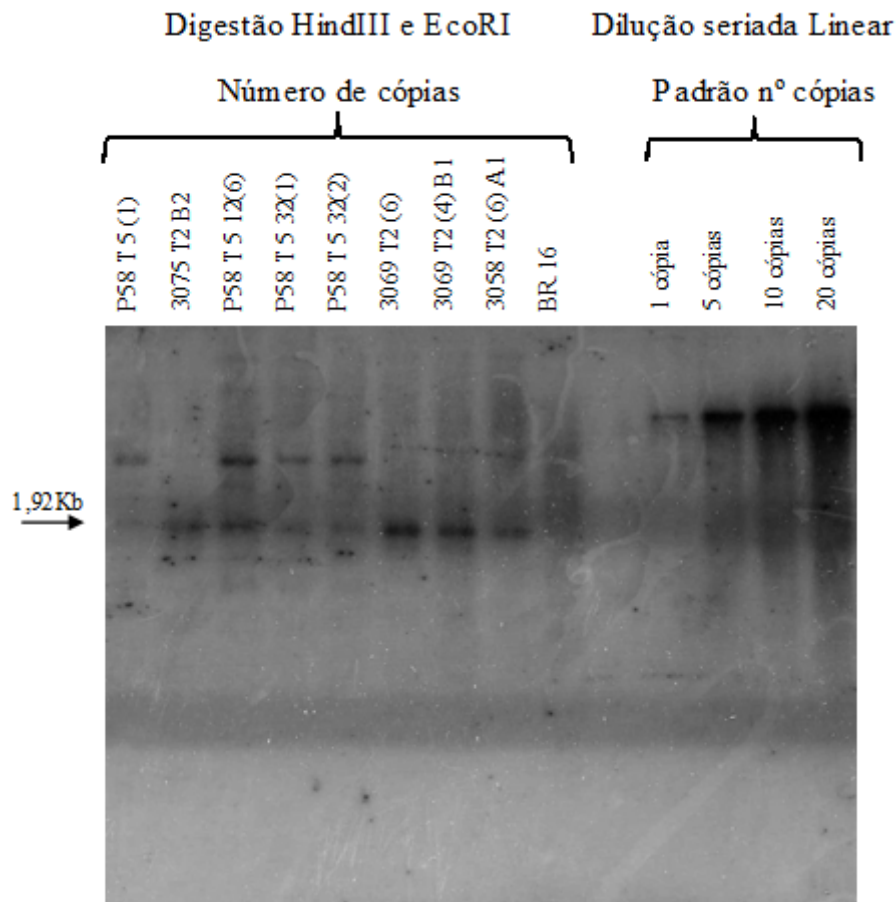


Figura 3 – Determinação do número de cópias do cassete DREB1A em amostras GM por Southern blot. O DNA das amostras foi digerido com as enzimas EcoRI e HindIII, transferidos para uma membrana de náilon e posteriormente hibridizados com a sonda DREB, fragmento de 1,92 kb marcada com ^{32}P , liberado do cassete transgene após clivagem com as mesmas enzimas. Eventos geração T₂ 3075, 3069 (4) B1, 3058 (6)A1 e eventos em geração T₅ P58, P58 12(2), P58 32(1) e P58 32(2). Uma amostra não transgênica BR16 foi utilizada como controle negativo, além de DNA plasmidial em quantidades correspondentes a 1, 5, 10 e 20 cópias do genoma da soja como padrão de número de cópias. Ladder – padrão de tamanho 1kb.

Como são mantidos indivíduos heterozigotos em todas as gerações, não é possível dizer se houve redução no número de cópias presentes no genoma do evento P58 ou simplesmente que as amostras que estão apresentando diferentes números de cópias por efeito de segregação de cópias diferentes do transgene não ligadas.

Determinação do número de cópias por quantificação relativa pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Primeiramente foi realizada a padronização dos *primers* e da sonda utilizados para a amplificação das amostras, sendo que as melhores concentrações foram de 400nM para os *primers* e 300nM para a sonda lectina. O *assay* DREB1A foi sintetizado com a concentração adequada para o uso. Os resultados indicaram que a eficiência ($E=10^{-1/\text{slope}-1}$) no ensaio *multiplex* foi de 94% para o gene alvo *DREB1A* e 95% para referência endógena. As curvas utilizadas para calcular os valores das eficiências podem ser observadas na Figura 4.

Após ter garantido a eficiência do sistema, as amostras foram corridas em triplicata, sendo que uma amostra não transgênica BR 16, foi utilizada como calibradora. Os resultados da quantificação das amostras podem ser visualizados nas Tabelas 3 e 4.

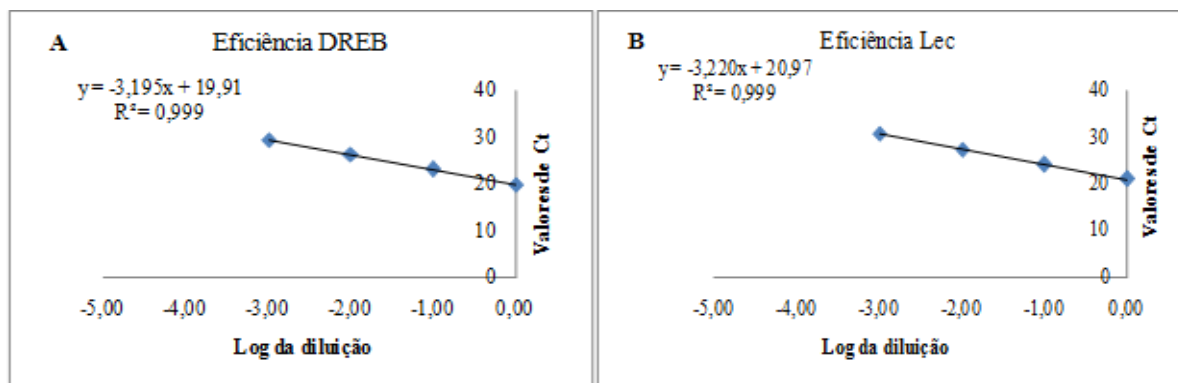


Figura 4 – Determinação da eficiência do sistema *multiplex TaqMan* para os alvos lectina e *DREB1A*. A amostra GM P58T₅ foi diluída serialmente 4X e as diferentes diluições foram amplificadas em sistema *multiplex* para os alvos *DREB1A* e lectina. Os valores de Ct foram plotados em função do logaritmo da diluição. O eixo y corresponde aos valores de Ct e eixo x log da diluição. Gráfico A – Estimativa da eficiência do gene Dreb com *slope*=-3,195. B - estimativa da eficiência do gene da lectina como referência endógena com *slope*=-3,220.

Tabela 3 – Determinação do número de cópias do transgene em amostras GM, geração T₁ e T₂, via qPCR por quantificação relativa pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, utilizando a amostra BR16 como calibradora.

Amostra	Média ΔCt	SD ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Número de cópias
P 59 B-12A T1	-3,29	0,07	-3,39	18,24	18
45 A- 48 A	2,25	0,12	2,15	0,82	0
345 A- 61 A T1	2,30	0,33	2,20	0,80	0
382 B -97 B T1	-3,02	0,05	-3,12	15,66	15-16
1333 A- vaso 30 T2	-1,19	0,04	-1,29	5,63	5-6
1333 A - vaso 37 T2	-9,37	12,94	-9,47	548,07	-
1333 - vaso 25 T2	-1,23	0,03	-1,33	5,74	5-6
P 58 - vaso 46 T2	-1,05	0,03	-1,15	5,20	5
P 58 - vaso 41 T2	-1,04	0,04	-1,14	5,17	5
P 58 - vaso 51 T2	-0,98	0,04	-1,08	4,99	5
BR 16	1,90	0,10	1,80	1,00	

* Média dos resultados de Ct, analisadas em triplicata em uma corrida.

Tabela 4 – Análise do número de cópias do cassete transgene em amostras GM, geração T₂ e T₅, analisadas em três corridas independentes via qPCR por quantificação relativa, pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, utilizando a amostra BR16 como calibradora.

Amostras	$2^{-\Delta\Delta Ct}$			Número de cópia	SD	%CV
	Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3			
P58 T ₅	1,32	1,10	0,99	1,14	0,17	14,78
3075 T ₂	2,45	2,00	2,03	2,16	0,25	11,65
P58 T ₂ 12(6)	2,74	2,10	2,12	2,32	0,36	15,68
P58 T ₂ 32(1)	2,83	2,13	2,18	2,38	0,39	16,41
P58 T ₂ 32(2)	2,83	2,21	2,11	2,38	0,39	16,37
3069 T ₂	4,52	3,89	3,69	4,03	0,43	10,74
3069 T ₂ (4) B1	5,08	4,03	4,11	4,41	0,58	13,26
3058 T ₂ (6) A1	1,09	0,80	0,82	0,90	0,16	17,93
BR16	-0,76	-1,15	-1,15	-1,02	-1,02	-1,02

Além da amostra BR16, o próprio gene lectina, utilizado como referência endógena e que apresenta apenas uma cópia por genoma haplóide da soja, foi testado como calibrador. A única alteração no método foi a exclusão do cálculo do $\Delta\Delta Ct$, seguido da divisão do resultado final por 2, uma vez que o resultado final encontra-se duplicado. Tal duplicação no resultado final da quantificação das amostras ocorre uma vez que a soja apresenta genoma diplóide ($2n=4x=40$), logo a cada genoma existe 2 cópias do gene lectina, uma em cada cromossomo.

Utilizando o gene lectina como calibrador internos foi possível observar que as amostras em geração T₂, 3075 apresentou 2 cópias, 3069 e 3069

(4) apresentaram 3 a 4 cópias e a amostra 3058 T₂ apresentou aproximadamente 1 cópia. Os eventos em geração T₅ P58 variaram de 1 a 2 cópias (tabela 5).

Tabela 5 – Determinação do número de cópias do cassete transgene em amostra GM, geração T₂ e T₅, analisadas em três corridas independentes, via qPCR por quantificação relativa, pela fórmula $2^{-\Delta Ct}/2$, utilizando o gene lectina como calibrador.

Amostras	Calibrador referência endógena			Média ΔCt	$2^{-\Delta Ct}/2$	Número de cópias	SD	% CV
	Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3					
P58 T ₅	2,18	2,32	2,11	2,20	1,10	1	0,11	4,85
3075 T ₂	4,04	4,24	4,31	4,20	2,10	2	0,14	3,34
P58 T ₅ 12(6)	4,51	4,45	4,50	4,49	2,24	2	0,03	0,72
P58 T ₅ 32(1)	4,17	4,39	4,62	4,39	2,20	2	0,23	5,12
P58 T ₅ 32(2)	4,65	4,68	4,47	4,60	2,30	2	0,11	2,47
3069 T ₂	7,44	8,24	7,82	7,83	3,92	3-4	0,40	5,11
3069 T ₂ (4) B1	8,35	8,54	8,71	8,53	4,27	4	0,18	2,11
3058 T ₂ (6) A1	1,79	1,69	1,74	1,74	0,87	1	0,05	2,87
BR16	-0,76	-1,15	-1,15	-1,02	-0,51	0	-1,02	-1,02

Tabela 6 – Quantificação dos eventos quanto ao número de cópias. Metodologias quantificadas por PCR em tempo real comparadas à técnica de Southern blot.

Eventos	Geração	Amostras	Número de cópias		
			$2^{-\Delta \Delta Ct}$	$2^{-\Delta Ct}/2$	<i>Southern Blot</i>
P59 B	T ₁	P 59 B-12A	18	-	18-20
345 A	T ₁	345 A- 61 A	0	-	0
382 B	T ₁	382 B -97 B	15-16	-	18-20
45 A	T ₁	45 A- 48 A	0	-	0
1333	T ₂	1333 A- v. 37	0	-	0
		1333 A- v. 30	5-6	-	5-6
		1333 - v. 25	5-6	-	5-6
3075	T ₂	3075	2	2	2-3
3069	T ₂	3069	4	3-4	2-4
		3069 (4) B1	4	4	2-5
3058	T ₂	3058 (6) A1	1	1	1-2
P58	T ₂	P 58 - v. 46	5	-	6-8
		P 58 - v. 41	5	-	6-8
		P 58 - v. 51	5	-	6-8
	T ₅	P58 (1)	2	1	2-3
		P58 12 (2)	2	2	2-3
		P58 32 (1)	2	2	2-3
		P58 32 (2)	2	2	2-3

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 6, pode-se observar que a quantificação por qPCR corroborou a estimativa do número de

cópias apresentada na técnica de *Southern blot*. Pode-se observar que alguns eventos tiveram número superior de cópias na técnica de *Southern blot* quando comparado com os resultados obtidos no qPCR. Isso devido aos tamanhos das sondas utilizadas nas análises. A sonda utilizada no *Southern blot* foi de 1,92kb enquanto a do qPCR foi de 65pb, podendo ocorrer hibridizações inespecíficas no *Southern blot* que não foram eliminadas no processo de lavagem das membranas.

Das 18 amostras analisadas, distribuídas em 9 eventos, em diferentes gerações, 15 amostras, cerca de 83% dos resultados coincidiram quanto ao número de cópias entre as metodologias.

Determinação do número de cópias por quantificação relativa pelo método da curva padrão

Quantificação relativa pelo método da curva padrão baseada em DNA plasmidial (pDNA)

As amostras em geração T₂, 3075, 3069, 3069 (4), 3058 T₂ e geração T₅ P58, P5812(2), P58 32(1) e P58 32(2) foram também quantificadas quanto ao número de cópias por quantificação relativa através do método curva padrão.

Para a quantificação relativa pelo método da curva padrão por pDNA, as curvas foram construídas baseadas em dois tipos de misturas: plasmídeo Dreb (pDreb) com plasmídeo Lectina (pLec) e outra mistura composta do plasmídeo pDreb diluído em DNA genômico de uma amostra BR 16 não transgênica, em proporções iguais, a fim de se obter os padrões de 1000, 500, 100, 50, 25, 10, 5, e 1 cópia do transgene.

A eficiência ($E=10^{-1/\text{slope}}-1$) de amplificação do sistema utilizando amostras de DNA plasmidial foi de 1,228 para pDreb e 1,55 para pLec, enquanto o pDreb 1,34 e BR 16 1,66, onde os valores do alvo e referência endógena devem estar próximos.

Foram construídas curvas independentes para o gene alvo e referência endógena, através de ensaio *multiplex*, em cada uma das três corridas, utilizadas para quantificação das amostras GM positivas. Em cada corrida, os valores médios de Ct para cada um dos padrões foi plotado em função do logaritmo

do número de cópias do plasmídeo ou do genoma da soja. Os valores médios de Ct para cada um dos padrões nas três corridas independentes, bem como os valores de SD e CV (%) correspondentes, podem ser observados na Tabela 7 e 8.

A comparação entre os valores médios de Ct obtidos em cada padrão demonstrou estabilidade, o que resultou na elaboração de curvas com alta reprodutibilidade para ambos os alvos. Os valores médios de Ct mínimo e máximo refletem a quantidade de DNA alvo presente nos pontos extremos da curva. Os padrões pDreb apresentaram Ct mínimo de 32,01 e máximo de 36,27, enquanto para as de pLec foram de 31,52 e 34,36, respectivamente. Os valores de Ct próximos significam que houve problemas na amplificação ou nas diluições. Os valores médios de Ct para pDreb 27,24 a 35,17 e 29,63 a 33,99 para lectina.

Entre os parâmetros que indicam a qualidade das curvas de calibração destacam-se os valores de R^2 . Este coeficiente indica o nível de correlação entre o número de cópias presente em cada padrão e os valores de Ct obtidos. Nas curvas geradas para o alvo pDreb apresentou R^2 em 96% e a curva gerada para o pLec o R^2 em 89%, e nas curvas pDreb e gDNA BR16, de 90 % e 97% respectivamente, sendo o ideal acima de 98%.

Para o cálculo do número de cópias foi utilizada a equação da regressão linear gerada por cada curva padrão. Os valores médios do número de cópias obtidos para de cada amostra foram similares nas diferentes repetições, conforme demonstrado pelos valores de SD, que não ultrapassaram 0,50, que podem se observados nas Tabelas 9 e 10.

Tabela 7 – Repetibilidade das curvas de calibração baseadas em pDreb e pLec. Os valores médios de Ct, que representa triplicada de pontos (Ct) obtidos em cada corrida, desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV(%)) para cada um dos padrões baseados em pDNA.

Numero de Cópias	Valores de Ct			Média	SD	CV (%)
	Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3			
pDreb 1000	32,01	32,42	-	32,22	0,29	0,90
pDreb 500	30,52	32,08	32,30	31,63	0,97	3,07
pDreb 100	32,16	35,00	33,80	33,65	1,43	4,24
pDreb 50	33,89	36,87	-	35,38	2,11	5,96
pDreb 25	33,74	39,07	34,28	35,70	2,94	8,22
pDreb 10	34,18	36,50	34,95	35,21	1,18	3,36
pDreb 5	34,06	37,35	34,71	35,37	1,75	4,93
pDreb 1	34,59	37,95	-	36,27	2,37	6,54
Coefficiente de correlação (R^2)	0,964	0,984	0,923	0,96		
pLec 1000	31,93	32,49	-	32,21	0,40	1,23
pLec 500	30,95	32,10	32,30	31,52	0,73	2,31
pLec 100	31,06	35,03	33,73	33,04	2,03	6,13
pLec 50	32,39	34,81	-	33,60	1,71	5,09
pLec 25	32,65	36,08	34,51	34,36	1,72	5,00
pLec 10	32,80	35,11	35,52	33,95	1,47	4,33
pLec 5	32,62	35,59	34,85	34,10	1,54	4,53
pLec 1	32,80	35,10	-	33,95	1,63	4,79
Coefficiente de correlação (R^2)	0,889	0,941	0,852	0,89		

Tabela 8 – Repetibilidade das curvas de calibração baseadas em pDreb diluídos em gDNA da amostra BR 16. Os valores médios de Ct que representa triplicada de cada corrida, desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV(%)) para cada uma das diluições do pDNA em gDNA.

Numero de Cópias	Valores de Ct			Média	SD	CV (%)
	Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3			
pDreb 1000	27,10	27,38	27,57	27,24	0,24	0,87
pDreb 500	28,07	28,34	-	28,20	0,19	0,69
pDreb 100	32,31	32,26	32,16	32,24	0,07	0,23
pDreb 50	31,29	31,52	-	31,40	0,16	0,51
pDreb 25	32,24	33,07	33,04	32,78	0,47	1,44
pDreb 10	35,19	35,08	34,04	34,77	0,64	1,83
pDreb 5	34,41	33,80	34,16	34,12	0,31	0,90
pDreb 1	35,16	35,19	-	35,17	0,02	0,06
Coefficiente de correlação (R^2)	0,90	0,88	0,93	0,90		
pLec 1000	29,59	29,68	-	29,63	0,07	0,23
pLec 500	30,38	30,58	32,30	30,48	1,05	3,45
pLec 100	31,80	31,42	33,73	31,61	1,24	3,92
pLec 50	33,08	32,66	-	32,87	0,29	0,89
pLec 25	33,32	33,33	34,51	33,32	0,68	2,05
pLec 10	34,29	33,34	35,52	33,81	1,10	3,24
pLec 5	34,43	33,56	34,85	33,99	0,66	1,94
pLec 1	33,76	33,90	-	33,83	0,10	0,29
Coefficiente de correlação (R^2)	0,99	0,95	0,98	0,97		

Tabela 9 – Quantificação do número de cópias dos eventos GM em T₂ e T₅ pelo método curva padrão baseadas em pDreb e pLec. Os valores do número de cópias, desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV(%)) para cada um dos eventos quantificados.

Eventos	Cópias Dreb/Genoma Soja			Média	SD	CV (%)
	Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3			
P58 T5	0,00	0,02	0,17	0,06	0,09	68,16
3075 T2	0,00	0,04	0,37	0,14	0,20	67,30
P58 T5 12 (2)	0,00	0,04	0,46	0,17	0,25	65,41
P58 T5 32 (1)	0,00	0,05	0,48	0,18	0,26	66,95
P58 T5 32 (2)	0,00	0,05	0,40	0,15	0,22	68,82
3069 T2	0,00	0,15	0,93	0,36	0,50	72,10
3069 T2 (4) B1	0,00	0,01	0,22	0,08	0,12	63,32
3058 T2 (6) A1	0,00	0,02	0,01	0,01	0,01	100,00

Tabela 10 – Quantificação do número de cópias dos eventos GM em T₂ e T₅ pelo método curva padrão baseadas em pDreb diluídas em DNA genômico. Os valores do número de cópias, desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV(%)) para cada um dos eventos quantificados.

Eventos	Cópias Dreb/Genoma Soja			Média	SD	CV (%)
	Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3			
P58 T5	0,00	0,00	75,76	25,25	43,74	57,74
3075 T2	0,00	0,00	282,40	94,14	163,04	57,74
P58 T5 12 (2)	0,00	0,00	321,88	107,29	185,84	57,74
P58 T5 32 (1)	0,01	0,00	443,27	147,76	255,92	57,74
P58 T5 32 (2)	0,00	0,00	512,12	170,71	295,67	57,74
3069 T2	0,04	0,01	1115,41	371,82	643,97	57,74
3069 T2 (4) B1	0,04	0,01	1328,31	442,79	766,89	57,74
3058 T2 (6) A1	0,00	0,00	16,97	5,66	9,80	57,76

As duas estratégias apresentadas nas Tabelas 9 e 10, método curva padrão pDreb com pLec e pDreb com um DNA genômico de uma BR 16, não foram possíveis de serem quantificadas, quanto ao número de cópias. O fato de ter misturado duas amostras com quantidades iguais na construção dos padrões absolutos, erros de pipetagem podem ter contribuído para variação de amplificação. Pode-se observar que as triplicatas das corridas demonstraram similaridade entre as repetições, exceto na terceira corrida pDreb com BR16 que houve discrepância das outras repetições. Isso demonstra que as quantificações das amostras utilizadas

com padrões absolutos podem apresentar problemas no preparo contribuindo para ampliações inespecíficas.

A quantificação não foi possível de ser realizada devido a pequenos erros de pipetagem que implicam elevada variação na qualidade de cópias do alvo nos padrões, ocasionando diferenças nas ampliações.

Construção das curvas de calibração baseada em gDNA

Além dos plasmídeos, as curvas também foram feitas utilizando DNA genômico da amostra GM P58 T₅, positiva, contendo uma cópia do evento transgene, determinado por *Southern blot* e DNA genômico de uma BR16 não transgênica, em proporções iguais, a fim de obter padrões 1000, 500, 100, 50, 25, 10, 5, e 1 cópia.

A eficiência de amplificação ($E=10^{-1/\text{slope}}-1$) ficou em torno de 2,38 para gDNA Dreb e 2,25 para gDNA lectina. Os valores médios de Ct de cada padrão, obtidos nas três diferentes corridas, bem como os valores de SD e CV (%) correspondentes, podem ser visualizados na Tabela 11.

A comparação entre os valores médios de Ct obtidos em cada padrão demonstrou instabilidade, pois os valores de Ct bem próximos um do outro cerca de 29,89 a 34,12 para gDNA Dreb e 30,48 a 34,58 para o gDNA lectina. Os Cts próximos podem indicar problema no preparo das diluições. Os parâmetros que indicam a qualidade das curvas de calibração destacam-se os valores de R² onde as médias das triplicatas ficaram entre 85% para o gDNA Dreb e 69% para gDNA lectina, sendo o ideal valores acima de 98%.

Para o cálculo do número de cópias das amostras quantificadas foi utilizada a equação da regressão linear gerada por cada curva padrão. Os valores de SD não ultrapassam 0,56 presentes na Tabela 12.

Tabela 11 – Repetibilidade das curvas de calibração baseadas em gDNA Dreb e gDNA lectina. Os valores médios de Ct que representa triplicada de cada corrida, desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV(%)) para cada uma das diluições.

Número de Cópias	Valores de Ct			Média	SD	CV (%)
	Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3			
gDNA Dreb 1000	30,02	29,80	29,84	29,89	0,16	0,52
gDNA Dreb 500	30,57	30,80	30,92	30,76	0,18	0,58
gDNA Dreb 100	32,65	32,62	32,64	32,63	0,02	0,05
gDNA Dreb 50	33,41	33,20	-	33,30	0,15	0,46
gDNA Dreb 25	32,97	33,55	-	33,26	0,41	1,23
gDNA Dreb 10	33,10	34,44	33,74	33,76	0,67	1,99
gDNA Dreb 5	34,34	34,31	33,70	34,12	0,36	1,05
gDNA Dreb 1	34,62	33,35	34,04	34,00	0,90	2,64
Coeficiente de correlação (R²)	0,94	0,93	0,67	0,85		
gDNA Lec 1000	30,49	30,46	30,58	30,48	0,02	0,07
gDNA Lec 500	31,17	31,34	31,58	31,26	0,20	0,65
gDNA Lec 100	32,15	32,56	33,37	32,36	0,62	1,91
gDNA Lec 50	32,83	33,13	-	32,98	0,22	0,65
gDNA Lec 25	32,80	33,08	-	32,94	0,20	0,61
gDNA Lec 10	33,25	33,25	33,88	33,25	0,36	1,09
gDNA Lec 5	33,45	33,71	33,90	33,58	0,23	0,67
gDNA Lec 1	33,25	35,80	34,40	34,53	1,80	5,22
Coeficiente de correlação (R²)	0,82	0,71	0,53	0,69		

Tabela 12 – Quantificação das amostras utilizando as curvas baseadas em gDNA. Os valores de número de cópias, desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV(%)) para cada um dos eventos.

Eventos	Cópias Dreb/Genoma Soja			Média	SD	CV (%)
	Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3			
P58 T5	0,070	0,170	0,100	0,11	0,05	45,28
3075 T2	0,140	0,330	0,400	0,29	0,13	46,39
P58 T5 12 (2)	0,130	0,340	0,380	0,28	0,13	47,40
P58 T5 32 (1)	0,180	0,420	0,910	0,50	0,37	73,92
P58 T5 32 (2)	0,140	0,330	0,640	0,37	0,25	68,21
3069 T2	0,550	1,110	0,000	0,55	0,56	100,30
3069 T2(4)B1	0,540	1,110	0,910	0,85	0,29	33,89
3058 T2(6)A1	0,080	0,170	0,100	0,12	0,05	40,51

A inclinação da reta em cada curva de calibração obtida permite estimar os valores de eficiência de amplificação de cada alvo amplificado por PCR. Uma inclinação de $-3,32$ indica uma eficiência de amplificação teórica de 100%

(GINZINGER, 2002). Nas curvas pDNA obtidas pelo método da curva padrão, os plasmídeos contendo o alvo pDreb apresentaram uma baixa eficiência de amplificação em média de 95%, enquanto os contendo o alvo lectina a eficiência foi ainda inferior, com 89,1%.

Deste modo, o declínio na eficiência não pode ser atribuído à competição entre a amplificação entre os alvos, mas sim com o *background* das diluições, também conhecido como efeito de matriz (KURNET *et al.*, 2006). No caso das curvas baseadas em gDNA a menor eficiência pode ser atribuída a menor qualidade do DNA amplificado quando comparado com DNA plasmidial.

DISCUSSÃO

De acordo com os resultados, cinco eventos tiveram o número de cópias do transgene determinados por PCR quantitativo e confirmados por *Southern blot*, entre eles as amostras 1333 A- v.30 T₂, P58 – v. 46 T₂, P58 – v. 41 T₂ e P58 – v. 51 T₂, 3058 T₂, 3069 T₂ (4) e 3069 T₂, 3075 T₂, P58 T₅, P58 T₅ 12(2), P58 T₅ 32(1), P58 T₅ 32(2). Dois eventos que apresentaram elevado número de cópias, P59 B-12A T₁ e 382 B -97 B T₁, não puderam ser quantificados com precisão via *Southern blot*, no entanto, foram quantificados por PCR quantitativo. Este fato pode ser explicado principalmente devido à ocorrência de múltiplas inserções do cassete dentro do genoma, o que após as digestões com as enzimas de restrição resulta no gel em múltiplas bandas de diferentes intensidades, fato que dificulta a quantificação precisa. Além disso, uma questão muito relatada em artigos científicos trata das limitações da técnica de *Southern blot*, uma vez que digestões parciais, transferências incompletas e revelações com baixa resolução geram artefatos que impedem a identificação precisa de bandas. Cabe ressaltar ainda, que esta identificação é subjetiva, razão pela qual a técnica de qPCR vem sendo escolhida para realizar tais análises (WENG *et al.*, 2004; LI, *et al.*, 2004)

Entre os eventos estudados, as amostras P58 – v. 46 T₂, P58 – v. 41 T₂ e P58 – v. 51 T₂, foram analisados na geração T₂, e apresentaram em ambas as metodologias utilizadas 5 cópias do transgene *DREB1A*. Posteriormente, as mesmas amostras foram analisadas em novas corridas de qPCR, utilizando a mesma metodologia empregada em T₂, para confirmar a presença do número de cópias do transgene na geração T₅. Foi possível verificar que no avanço das

gerações ocorreu uma diminuição do número de cópias detectadas para 1 e 2 cópias do gene, confirmadas também por *Southern blot*, quando comparadas com a análise em T₂.

A redução do número de cópias do transgene entre as gerações pode ser explicada pela segregação dos insertos não ligados.

WENG em 2004, ao quantificar número de cópias em canola, fez um *screening* inicial em 10 plantas transgênicas em T₀ pela técnica de PCR em tempo real utilizando cálculos baseados na eficiência de amplificação do alvo (proteína HMG) através do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ sendo os resultados confirmados pela técnica de *Southern blot*. Baseada comparação de ambas as técnicas, cerca de 70% das plantas foram confirmados quanto ao número de cópias. Foram utilizadas duas sondas de diferentes tamanhos no *Southern blot*, sendo uma estratégia excelente para confirmar os resultados e também verificar quebras nos cassetes inseridos.

Alguns trabalhos científicos têm relatado a quantificação do número de cópias transgenes utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. LI et al. (2004), com o objetivo de estimar número de cópias em PGM de trigo, compararam qPCR com *Southern blot*. A concordância dos resultados obtidos por qPCR e *Southern blot* foi de aproximadamente 90%, o que aponta o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ eficiente para a quantificação do número de cópias. Para tal quantificação foi realizado um *screening* em um evento de trigo com dez plantas, sendo utilizado como normalizador o gene da *puroindolina-b*, controle interno trigo, e como calibrador uma amostra não transgênica. No presente trabalho, em um total de 18 amostras analisadas, distribuídas em 9 eventos, em diferentes gerações, 15 amostras tiveram os resultados coincidentes entre as técnicas de qPCR e *Southern blot*, cerca de 83%.

INGHAM et al., (2001) mostraram que o ensaio *multiplex* em PCR quantitativo através do método da fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para determinar o número de cópias do gene de seleção (*pmi* -**phosphomannose isomerase**) **em milho**. Encontrou-se uma correlação rigorosa entre os seus resultados do *Southern blot*, exceto para duas linhagens (de um total de 37). Utilizam como normalizador, o gene *adn* (álcool desidrogenase) como controle endógeno.

Em trabalho realizado por MASON e colaboradores (2002), propõe-se o desenvolvimento de um método rápido e confiável para estimar o número de cópias em tomate. Ao contrário de outros procedimentos semelhantes, este método desconsidera a eficiência de amplificação do alvo e do controle endógeno, uma

etapa essencial para otimização do sistema. De acordo com essa proposta não são necessárias informações preliminares sobre o calibrador, pois utilizam um “calibrador virtual”, onde a amplificação desse calibrador é estimada entre 38 a 40 ciclos, assumindo o calibrador com 1 cópia. Em contrapartida, este fato nem sempre é possível uma vez que amplificações inespecíficas podem ocorrer mesmo se sabendo o número de cópias do calibrador. Por isso, faz-se importante o uso de referência endógena com o menor número de cópias determinado nas reações para que os dados apresentados sejam mais confiáveis.

Outra análise apresentada para a quantificação número de cópias é utilizar a própria referência endógena lectina como calibrador através da fórmula $2^{-\Delta C_t}/2$, sendo um mais método rápido, prático e eficiente para se determinar o número de cópias e selecionar precocemente eventos com poucas ou uma cópias simples do transgene.

A quantificação baseada na construção de curvas de calibração trata-se um procedimento extremamente minucioso, que necessita de cuidados na preparação dos padrões, quantificação e precisão nas diluições, caso contrário os desvios e baixa correlação entre os valores de Ct e a diluição podem ocorrer, e a quantificação de todas as amostras pode ser comprometida. No presente trabalho foram utilizados padrões baseados tanto em DNA plasmidial quanto DNA genômico para a construção de curvas de calibração para quantificação do número de cópias pelo método da curva padrão. Uma das vantagens de se utilizar DNA plasmidial na construção das curvas de calibração é a obtenção de DNA de melhor qualidade quando comparado às amostras extraídas de material vegetal, apresentando menor contaminação com compostos fenólicos e polissacarídeos (BRASILEIRO & CARNEIRO, 1998).

Baseados nos resultados obtidos, ambas as curvas construídas com pDreb e pLec, uma vez que padrões lineares tendem a demonstrar pouca variação entre os Ct, que poderia ser explicado pela forma de preparo dos padrões. A mistura dos plasmídeos, embora tenha sido feita a quantificação em espectrofotômetro Nano drop, e além do cuidado no preparo dos mesmos e suas amplificações *multiplex*, o *background* parece ter influenciado na eficiência e, conseqüentemente, na quantificação dos padrões. Essa interferência na sensibilidade do qPCR, e, conseqüentemente, variações nos resultados de quantificação, devido ao efeito de matriz ou do *background* das diluições de padrões baseados em pDNA e gDNA

(KUNERT *et al.*, 2006). A construção dos padrões para o número de cópias é a etapa mais crítica da quantificação, pois qualquer erro na diluição altera os dados de quantificação das amostras a terem um DNA alvo específico previamente determinado. Constituiu um processo de minucioso, onde erros de pipetagem comprometem todas as análises futuras.

A partir dos resultados apresentados, pode-se observar que entre as metodologias de qPCR testadas, a que apresentou os resultados mais precisos quando comparados com a técnica pioneira para quantificação de número de cópias, *Southern blot*, foi a quantificação relativa pela fórmula $2^{-\Delta Ct}/2$ quando o próprio gene utilizado como referência endógena foi utilizado como calibrador.

Estes dados demonstram o potencial da PCR em tempo real como ser um método que possui alta eficiência, sensibilidade e rapidez para o *screening* inicial de plantas GM para seleção de eventos com baixo número de cópias, e, conseqüentemente, a aceleração do desenvolvimento de eventos GM elites.

REFERÊNCIAS

AGBIOS – Disponível em <www.agbios.com>. Acesso em out. 2008.

ALWINE, J.C.; KEMP, D.J.; STARK, G.R. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Califórnia, v.96, p. 6745-6750, December 1977.

AMBION – Disponível em <www.ambion.com>. Acesso em outubro, 2008.

ALTPETER, F. e JAMES, V. A. Genetic transformation of turf-type bahiagrass (*Paspalum notatum* Flugge) by biolistic gene transfer. **International Turfgrass Society**, Wales, v. 10, p. 485-489, July 2005

APPLIED BIOSYSTEMS. Creating standards curves with genomic DNA or plasmids DNA templates for use in quantitative PCR. **Tutorial Review**, p.9, 2004.

ARAGÃO, F. J. L.; RIBEIRO, S. G. Detecção de proteínas pela técnica ELISA. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. **Manual de transformação genética de plantas**, Brasília, 1998.

ARAGÃO, F. J. L.; SAROKIN, L.; VIANNA, G.R.; RECH, E.L. Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in recovery of fertile transgenic soybean *Glycine max* (L.) Merrill plants at a high frequency. **Theoretical and Applied Genetics**, Brasília, v.101, p.1-6, 2000.

ARAGÃO, F. J. L. Development of transformation methods toward producing transgenic plants with abiotic stress tolerance. **Jircas Working Report**, Brasília, v. 65, p. 42, 2002.

BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília, p. 309, 1998.

BENEVENTI, M.A. **Transformação genética em soja pela inserção da construção gênica contendo a região promotora do gene rd29A e a região codante do gene DREB1A de *Arabidopsis thaliana*, visando tolerância à seca**. 126 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

BOYER, J. S. Plant productivity and environment. **Science**, Washington, v. 218, p. 443-448, 1982.

BROWN, T.A. **Clonagem gênica e análise de DNA: Uma introdução**. 4ª Ed. Porto Alegre, 2003.

BRAY, E. A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Response to abiotic stress. In: Biochemistry and molecular biology of plants. **American Society of Plant Physiologists**, Rockville, v. 35, p. 1158-1249, 2000.

CHIANG, P. W.; SONG, W.J.; WU, K.Y.; FOGEL, E.J.; VAN KEUREN, M. L.; KURNIT, D. M. Use of fluorescent-PCR reaction to detect genomic sequence copy

number and transcriptional abundance. **Genome Research**, Califórnia, p.1013-1026, 1996.

Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em 15 out. 2008.

CROSSWAY, A.; OAKES, J.V.; IRVINE, J.M.; WARD, B.; KNAUF, V.; SHEWMAKER, C.K. Integration of foreign DNA following microinjection of tobacco mesophyll protoplasts. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 202, p. 179-185, 1986

Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBIO. Disponível em <<http://www.ctnbio.gov.br/>>. Acesso em 18 jan. 2009.

DANG, W.; Wei, ZHI-MING. An optimized *Agrobacterium*-mediated transformation for soybean for expression of binary insect resistance genes. **Plant Science**, Shanghai, v.173, p. 381-389, 2007.

DEBLOCK, M.; DEBROUWER, D. Two T-DNAs cotransformed into *Brassica napus* by a double *Agrobacterium tumefaciens* infection are mainly integrated at the same locus. **Theoretical and Applied Genetics**, Lincoln, v.82, p.257–263,1991.

DESTRO, D.; MONTALVÁN, R. **Melhoramento genético de plantas**. Londrina: Ed. UEL, p. 820, 1999.

EISEN, M.B.; BROWN, P.O. DNA arrays for analysis of gene expression. **Methods in Enzymology**, Stanford, v. 303, p. 174-205, 1999.

ENGVALL, E.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**, v. 8, p. 871-874, 1971.

FARIA, C. R. S. M. A polêmica dos transgênicos- aspectos técnicos, legais e econômicos (2005). Disponível em <http://www.senado.gov.br/web/conleg/artigos_sociais.htm>. Acesso em jan. 2009.

FARIAS, J. R. B.; NEPOMUCENO, A. L.; NEURMAIER, N. Rendimento de genótipos semiprecoces de soja submetidos ou não a irrigação. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, São Carlos, v.5, p.57, junho 1993.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. 1998. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**, 3 ed. Brasília, Embrapa Cernagen.

FREEMAN, W.M.; ROBERTSON, D.J.; VRANA, K.E. Fundamentals of DNA hybridization arrays for gene expression analysis. **Biotechniques**, v. 29, p. 1042-1055, 2000.

GINZINGER, D. G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology it's the mainstream. **Experimental Hematology**, v. 30, p. 503-512, 2002.

GIULIETTI, A; OVERBERGH, L; VALCKX, D; DECALLONNE, B; BOUILLON, R.; MATHIEU, C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. **Methods**, v. 25, p. 386-394, 2001.

HUFFMAN, W. E. Production, identity preservation, and labeling in a marketplace with genetically modified and non-genetically modified foods. **Plant Physiology**, v.134, p. 3–10, 2004.

HADI, M. Z.; MCMULLEN, M. D.; FINER, J. J. Transformation of 12 different plasmids into soybean via particle bombardment. **Plant Cell Report**, v.15, p.500–505, 1996.

INGHAM, D. J.; BEER, S.; MONEY, S.; HANSEN, G. Quantitative real time PCR assays for determining transgene copy number in transformed plants. **Biotechniques**, v. 31, p.132-142, July 2001.

JAMES, C. Global Status of Commercialized Transgenic Crops:. **ISAAA Briefs** N° 30, 2003.

JAMES, C. Global Status of Commercialized Transgenic crops: **ISAAA Briefs** N° 34, 2008.

LEUTENEGGER, C.M.; MISLIN, C. N.; SIGRIST, B.; EHRENGRUBER, M. U.; HOFMANN-LEHMANN, R.; LU, H. Quantitative real-time PCR for the measurement of feline cytokine mRNA. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.71, p. 291-305, 1999.

LI, Z.; HANSEN, J. L.; LIU, Y.; ZEMETRA, R.; BERGER, P.H. Using real time PCR to determine transgene copy number in wheat. **Plant Molecular Biology Reporter**, Manhattan, v.22, p.179-188, June 2004.

KIM, V.N. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, Seoul, v. 6, p. 376-385, April 2005.

KOHLI, A.; GRIFFITHS, S.; PALACIOS, N.; TWYMAN, R.M.; VAIN, P.; LAURIE D.A.; CHRISTOU, P. Molecular characterization of transforming plasmid rearrangements in transgenic rice reveals a recombination hotspot in the CaMV 35S promoter and confirms the predominance of microhomology-mediated recombination. **Plant Journal**, v. 17, p. 591-601, 1999b.

KRAMER M. G.; REDENBAUGH, K. Commercialization of a tomato with an antisense polygalacturonase gene: The FLAVR SAVR tomato story. **Euphytica**, v.79, p. 293-297, 1994.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J. M; BENGTSSON, M. A.; FOROOTAN, A.; JONA´K, J.; LIND, K.; SINDELKA, R.; SJÖBACK, R.; SJÖGREEN, B.; STRÖMBOM, L.; SHLBERG, A.; ZORIC, N. The real time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 95-125, 2006.

LACORTE, C.; ROMANO, E. Transferência de vetores para *Agrobacterium*. In: BRASILEIRO, A.C.; CARNEIRO, V.T.C. **Manual de Transformação Genética de Plantas**, Brasília, Embrapa Cernagen, p. 93-107, 1998.

- LEITE, M. Os gene da discórdia – Alimentos transgênicos no Brasil. **Política Externa**, v. 8, p. 2, 1999.
- LIVAK, K. J. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.
- LUBECK, P. S.; COOK, N.; WAGNER, M.; FACH, P.; HOORFAR, J. Toward an international standard for PCR-based detection of food-borne thermotolerant campylobacters: validation in a multicenter collaborative trial. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 5670-5672, 2002.
- MAKAREVITCH I.; SVITASHEV S. K.; SOMERS D. A. Complete sequence analysis of transgene loci from plants transformed via microprojectile bombardment. **Plant Molecular Biology**, v. 2, p. 421–432, 2003.
- MARCELINO, F. C. GUIMARÃES, M. F. M.; PIMENTA, M. A. S.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Detecção de resíduos de transgênicos em grãos e produtos derivados: a experiência da Universidade Federal de Viçosa. **Revista Brasileira de Ciências e Biotecnologia**, v. 31, p. 15 – 22, 2003.
- MARCELINO, F. C. **Avaliação de resíduos transgênicos em alimentos no Brasil e desenvolvimento de metodologias de análise**. 132p. Tese (Universidade Federal de Viçosa/MG), p.132, 2006.
- MARIN, V. A. Avaliação de risco dos organismos geneticamente modificados. **Revista Ciências & Saúde**, FIOCRUZ, 2007.
- MASON, G.; PROVERO, P.; VAIRA, A. M.; ACCOTTO, G. P. Estimating the number of integrations in transformed plants by quantitative real-time PCR. **BMC Biotechnology**, Alessandria, p.1-10, October 2002.
- MATZ, M.V.; LUKYANOV, S.A. Referent strategies of differential display: a pratic of application. **Nucleic Acids Research**, Moscow, v. 26, p. 5538-5543, August 1998.
- NEGRUTIU, I.; SHILLITO, R.; POTRYKUS, I.; BIASINI, G.; SALA, F. Hybrid genes in the analysis of transformation conditions. **Plant Molecular Biology**, v. 8. p. 363-373, 1987.
- NIESTER, H. Quantitation of viral load using real-time amplification techniques. **Methods**, Rotterdam, v.25, p. 419-429, December 2001.
- NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v.33, p. 10-13, Dezembro 2004.
- REED, K.C.; MANN, D.A. Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes. *Nucleic Acids Research*, v.25, p. 7207–7221, Oct 1985.
- ROMANO, E. Análise da integração do DNA pela técnica de Southern Blot. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília, Embrapa, p. 205-222, 1998.

SANFORD, J. C.; KLEIN, T. M.; WOLF, E. D.; ALLEN, N. Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. **Journal of Particulate Science and Technology**, v.5, p. 27-30, 197.

SAWASAKI, T.; TAKAHASHI, M.; GOSHIMA, N.; MORIKAWA, H. Structures of transgene loci in transgenic *Arabidopsis* plants obtained by particle bombardment: junction regions can bind to nuclear matrices. **Gene**, Japan, v. 218, p. 27–35, July 1998.

SCHUSTER, I; VIEIRA E. S. N.; SANTANA, H.; SINHORATI, D.; SILVA, R.B.; OLIVEIRA, M. A. R. Fluxo gênico em soja na Região Oeste do Paraná. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.42, p.515-520, Abril 2007.

SINGER, T. e BURKE, E. High-Throughput TAIL-PCR as a tool to identify DNA flanking insertions. **Methods in Molecular Biology**, Totowa, v.236, Feb. 2003.

SHILLITO, R. D., SAUL, M.W.; PASZKOWSKI, J.; MULLER M.; POTRYKUS I. High efficiency direct gene transfer to plants. **Nature Biotechnology**, Basel, v. 3, p. 1099–1103, 1985.

SVITASHEV, S.K.; PAWLOWSKI, W.P.; MAKAREVITCH, I.; PLANK, D.W.; SOMERS, D.A. Complex transgene locus structures implicate multiple mechanisms for plant transgene rearrangement. **The Plant Journal**, v. 32, p. 433–445, 2002.

VALASEK, M.; REPA, J. The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education*, Dallas, v. 29, p. 151-159, April 2005.

VAUCHERET, H.; BÉCLIN, C.; ELMAYAN, T.; FEUERBACH, F.; GODON, C.; MOREL, J. B.; MOURRAIN, P.; PALAUQUI, J.C.; VERNHETTES, S.; Transgene-induced gene silencing in plants. **The Plant Journal**, v.16, p. 51–659, 1998.

WENG, H.; PAN, A.; ZHANG, C.; LIU, Z.; ZANG, D. Estimating Number of transgene copies in transgenic rapeseed by real-time PCR assay with *HMG I/Y* as an endogenous reference gene. **Plant Molecular Biology Report**, v. 22, p. 289–300, 2004.

WINDELS, P.; TAVERNIERS, I.; DEPICKER, A.; BOCKSTAELE, E. V., LOOSE, M.D. Characterization of the *Roundup Ready* soybean insert. **European Food Research Technology**, v.213, p. 107-112, 2001.

TANAKA N.; KIMURA, H.; IIDA, K.; SAITO Y.; TSUGE, I.; YOSHIMI, A. MATSUYAMA, T. MORISHIMA, T.. Quantitative analysis of cytomegalovirus load using a real-time PCR assay. *Journal of Medical Virology*, v. 60, p.455-462, 2000.

THOMPSON, A. J.;DRAYTON, D. R.;FRAME, B. R.;WANG, K.; DUNWELL, J. M. Maize transformation utilizing silicon carbide Whiskers: a review. **Euphytica**, v.85, p. 75-80, 1995.

ANEXOS

ANEXO A – Protocolos

1 CÉLULAS ELETROCOMPETENTES DE *ESCHERICHIA COLI*

- Obter colônias isoladas à partir do estoque em glicerol, crescer uma colônia overnight em 10mL de meio LB a 37°C, a 200 rpm (pré-inóculo).
- Inocular 5mL do pré-inóculo em 500mL de meio LB e crescer a 37°C com agitação 300 rpm, até atingir OD600 0,5 a 0,7.
- Manter as células no gelo por aproximadamente 20 min. Asepticamente, transferir as células para tubos de centrifuga, pré-resfriados em gelo.
- Centrifugar a 7.500 rpm por 15 min a 4°C.
- Descartar o sobrenadante e ressuspender o pellet com 500mL de glicerol 10% gelado. Centrifugar a 7.500 rpm por 15 min a 4°C.
- Descartar o sobrenadante e ressuspender o pellet com 250mL de glicerol 10% gelado. Centrifugar a 7.500 rpm por 15 min a 4°C.
- Descartar o sobrenadante e ressuspender o pellet com 20mL de glicerol 10% gelado.
- Transferir para tubos de 30mL estéril e centrifugar a 7.200 rpm por 15 min a 4°C.
- Descartar o sobrenadante e ressuspender o pellet em 1 a 2mL de glicerol 10% gelado.
- Alicotar em eppendorf e armazenar a - 80°C por até 6 meses.

2 TRANSFORMAÇÃO VIA ELETROPORAÇÃO

- No processo de transformação por eletroporação foi seguido o protocolo de Miller & Nickoloff (1995). O aparelho utilizado para a transformação foi um eletroporador Micro pulser, Bio-Rad.
- Preparar o eletroporador para 2.5 kV, 25mF, preparar o controlador de pulso para 200 ou 400 ohms. O controlador de pulso é necessário

quando altas voltagens são aplicadas sobre curtas distâncias entre eletrodos em amostras com alta resistência.

- Misturar 40mL de células eletrocompetentes em eppendorf 1,5mL com 2mL de DNA (5pg a 0.5mg de DNA plasmidial). Misturar a solução no tubo gentilmente e incubar no gelo por 1 min.
- Transferir o DNA e as células para a cubeta pré-resfriada em gelo, agitar levemente para acomodar as células no fundo da cubeta, secar o gelo e a água da cubeta.
- Colocar a cubeta na câmara do eletroporador. Aplicar o pulso.
- Remover a cubeta e imediatamente adicionar 1mL de meio SOC. Transferir a suspensão de células para tubo Falcon de 15mL estéril e incubar a 37°C por 1 h com agitação de 225 rpm.
- Espalhar com alça 60mL de IPTG/X-Gal (50ml de IPTG 0,1M e 10mL de X-Gal 50mg/mL) em placas com LB/antibiótico (100mg/placa), deixar secar por 30 min

3 EXTRAÇÃO DE DNA EM LARGA ESCALA- SOUTHERN BLOT

- Macerar 3 trifólios de folhas em nitrogênio líquido ou pelo menos 1g de folha.
- Para transferir a amostra do cadinho para o tubo Falcon, adicionar mais nitrogênio na amostra já macerada e transferir para o tubo Falcon de 50 mL.
- Aquecer o tampão de extração a 65°C e adicionar β -mercaptoetanol no momento do uso (200 μ L para cada 100 mL).
- O procedimento de adição do tampão de extração as amostras deve ser realizado na capela devido à presença β -mercaptoetanol.
- Antes de adicionar o tampão, coloque o tubo Falcon em uma raque, abra um pouco a tampa e espere secar o nitrogênio. Assim que estiver seco, retorne a amostra ao nitrogênio para mantê-la bem resfriada.

- Utilizando um tubo Falcon medir 20 mL de tampão de extração e adicionar em cada amostra. Agite bem até que esteja homogeneizado (pode ser utilizado o vortex).
- Colocar no banho a 65°C por 30 minutos (deixar no máximo 60 minutos). Homogeneizar de tempo em tempo para manter o extrato ressuspendido.
- Após o banho adicionar 1 volume (20 mL) de clorofórmio (na capela). Vedar o tubo com parafilme e agitar ~ 10 minutos.
- Centrifugar a 7500 rpm por 20 minutos para separar a fase orgânica.
- Transferir o sobrenadante (verde claro) para um tubo falcon novo (+- 17mL).
- Adicionar 0,6 volumes de isopropanol gelado, e agitar gentilmente várias vezes.
- Deixar os tubos na geladeira por 2 horas ou 30 minutos no freezer (-20°C).
- **Obs:** A quantidade de isopropanol depende da quantidade do sobrenadante que foi possível resgatar. Normalmente esse volume é de 15 a 20 mL. Em nossas amostras padronizamos para 17 mL e adicionamos 10, 2 mL de isopropanol gelado em cada amostra.
- Centrifugar as amostras por 20 minutos, 7500g a 4°C.
- Descartar o sobrenadante.
- Deixar o pellet secando na bancada ou utilizar uma ponteira adaptada ao sistema à vácuo.
- O pellet tem que secar até ficar transparente, se não ficar transparente pode estar contaminado com proteínas e será necessária uma nova lavagem.
- Ressuspender o DNA em TE (200 µL) por amostra. Adicionar no fundo do tubo sobre a amostra que estará transparente. Chacoalhar o tubo levemente para produzir um efeito de onda, dessa forma o TE passará levemente sobre a amostra.
- Com o auxílio de uma ponteira (p1000) com a ponta cortada lavar as paredes do tubo. A solução deve ser jogada na região da parede onde está o DNA até que ele se solte.

- **Importante:** O DNA quando seco se torna transparente, mas no momento em que ele hidrata fica como uma geléia transparente.
- **Obs:** Uma alternativa é adicionar o TE e deixar o tubo na horizontal de forma que a solução fique sobre o DNA e mantido *overnight* na geladeira. Entretanto esse procedimento só pode ser feito se o DNA foi ressuspendido em TE. Certifique-se de que todas as amostras foram ressuspendidas.
- Transfira as amostras para microtubos e armazene em freezer -20°C.

Tampão de extração segundo Doyle e Doyle:

→ O tampão pode ser dissolvido usando aquecimento até 65°C, preferencialmente, autoclave antes do uso.

Reagentes	[final]	Preparo de 500 mL
CTAB	2%	10g
PVPP	2%	10g
Tris-HCl 1M pH 8,0	100 Mm	50 mL
EDTA 0,5M pH 8,0	25 Mm	25 mL
NaCl	2 M	200 mL
Água Destilada	-	Suficiente para 500mL

Obs: adicionar β -mercaptoetanol no momento do uso (200 μ L para cada 100 mL).

4 EXTRAÇÃO DE DNA DE PLANTAS EM PEQUENA ESCALA – PCR EM TEMPO REAL

- Triturar cerca de 1g de folha em presença de N₂ líquido em almofariz e transferir para tubos de microcentrifuga e adicionar tampão de extração na proporção de 4 vezes o volume da amostra.
- Incubar a 65°C por 60 minutos, agitando de vez em quando (cada 15min)
- Resfriar e centrifugar a 6000 rpm por 10 minutos. Transferir a fase aquosa (superior) para outro tubo.

- Adicionar igual volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e agitar por suaves inversões por cerca de 5 minutos
- Centrifugar a 6000 rpm por 15 minutos e transferir a fase superior para outro tubo.
- Repetir os passos dois passos anteriores
- Precipitar os ácidos nucleicos pela adição de isopropanol gelado (2/3 do volume). Misturar por inversões até os ácidos nucleicos tornarem-se visíveis e deixar *over night* a 4°C ou 2 horas a -20°C
- Centrifugar a velocidade máxima por 10 minutos. Descartar o sobrenadante e adicionar 500ul de etanol 70%. Centrifugar novamente por 5 min., descartar o sobrenadante e secar o pellet (O pellet pode ser sêco a vácuo ou deixar o tubo invertido sobre a bancada por cerca de 2 horas)
- Ressuspender o pellet em 400ul de TE pH 8,0. Se necessário, pode-se aquecer a 65°C por 5 minutos para ajudar a ressuspensão.
- Adicionar RNase A, na concentração final de 40ug/ml e incubar a 37°C por pelo menos 30 minutos.
- Re-precipitar o DNA pela adição de 1/10 do volume de NaCl 5M e 2 vol. de etanol 95% gelado. Deixar *over night* a 4°C ou a -20 C por 2 horas
- Repetir os dois passos anteriores a adição de RNase A . Quantificar o DNA em espectrofotômetro ou gel de agarose 0,8%.

- **Tampão de Extração**

Componentes	Conc. final	Vol. Final (10ml)
CTAB 5%	1%	2,0 ml
NaCl 5M	1,4 M	2,8 ml
Tris-HCl 1M pH 8,0	100 mM	1,0 ml
EDTA 0,5M	20 mM	0,4 ml
Mercaptoetanol	0,1%	0,01 ml
Água		3,7 ml

Obs.: O mercaptoetanol deve ser adicionado somente no momento do uso do tampão

5 EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL (KIT WIZARD PLUS MAXIPREPS DNA PURIFICATION SYSTEM – PROMEGA – CAT A7421)

- **Antes de iniciar o uso do Kit**
- Diluir a solução **Column Wash** adicionando 170 mL de etanol 95% para um volume final de 295 mL;
- Inocular uma colônia única em 2-5 mL de meio LB contendo o antibiótico apropriado e, incubar a 37° C por aproximadamente 8 horas com agitação (300 rpm) (pré-inóculo);
- Transferir 1 mL do pré-inóculo para erlenmeyer contendo 500 mL de meio LB/antibiótico e incubar a 37° C por 12 a 20 horas com agitação (~300 rpm);
- Coletar as células por centrifugação a 5000 x g por 10 minutos a temperatura ambiente;
- Descartar o sobrenadante e ressuspender completamente o pellet em 15 mL de **Cell Ressuspension Solution**;
- Adicionar 15 mL de **Cell Lysis Solution**, e misturar por inversão, incubar por aproximadamente 20 minutos a temperatura ambiente;
- ** Não utilizar agitador vortex. O lisado apresenta aparência viscosa;
- Adicionar 15 mL de **Neutralization Solution** e misturar por inversão;
- Após a adição de Neutralization Solution há formação de um floco branco e o lisado fica menos viscoso;
- O material precipitado contém DNA genômico, proteínas, debris celulares e SDS.
- Centrifugar a 14000 x g por 15 minutos a temperatura ambiente;
- Filtrar o sobrenadante em uma proveta utilizando papel de filtro Whatman 1, medir o volume e transferir para tubo de centrifuga;
- Adicionar 0,5 volume de **isopropanol** a temperatura ambiente, misturar por inversão;
- Centrifugar a 14000 x g por 15 minutos a temperatura ambiente;
- Descartar o sobrenadante e ressuspender o pellet em 2 mL de tampão **TE**;

- Adicionar 10 mL de **Wizard Maxipreps DNA Purification Resin** ao DNA;
- Acoplar a **Maxicolumn** ao sistema de vácuo;
- Transferir a mistura de resina+DNA à **Maxicolumn**. Aplicar o vácuo;
- Adicionar 25 mL de **Column Wash Solution** a **Maxicolumn** e aplicar o vácuo;
- Adicionar 5 mL de etanol 80% a **Maxicolumn**, aplicar o vácuo, manter o vácuo por mais 1 minuto;
- Transferir a **Maxicolumn** para tubo falcon de 50 mL e centrifugar a 1300 x g por 5 minutos;
- Retornar a **Maxicolumn** para o sistema de vácuo e aplicar o vácuo por 5 minutos para secar a resina;
- Transferir a **Maxicolumn** para o tubo que acompanha o kit e adicionar 1,5 mL de água pré-aquecida a 65-70° C à **Maxicolumn**. Aguardar 1 minuto;
- Centrifugar a 1300 x g por 5 minutos a temperatura ambiente para eluir o DNA;
- Para remover qualquer resíduo de resina , acoplar a seringa ao filtro 0,22 um e transferir o DNA para a seringa;
- Acoplar o filtro a um tubo de 1,5 mL e filtrar o DNA eluído;
- Centrifugar a 14000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente;
- Transferir o sobrenadante para novo tubo e armazenar a -20° C.

1 MEIO SOC

Extrato de levedura 0,5% 0,5g

Triptona 2% 2,0g

NaCl 10mM 1,0mL

KCl 2,5mM 250mL

MgCl₂ 10mM 1,0mL

MgSO₄ 10mM 1,0mL

Glicose 20mM 0,3604g

Água destilada 96mL

Autoclavar.

2 MEIO LB (*LENNOX L BROTH BASE*) LÍQUIDO

Meio LB (triptona, extrato de levedura e NaOH) -20g para cada 1L de água destilada.

Autoclavar.

3 MEIO LB (*LENNOX L BROTH BASE*) SÓLIDO

Meio LB (triptona, extrato de levedura e NaOH) -20g para cada 1L de água destilada.

Adicionar 12g para ágar bacteriológico para cada 1L de meio.

Autoclavar.

4 SOLUÇÕES DE TRANSFERÊNCIA *SOUTHERN BLOT*:

→ Solução de Depurinação: (Nesta etapa, o DNA é parcialmente hidrolizado, o que facilita a transferência, principalmente de DNA de alto peso molecular).

- 20,8 ml de HCl concentrado (12M) + 980 ml de água destilada (autoclavada). Essa solução não necessita ser autoclavada antes do uso.

→ Solução de Desnaturação: (Nesta etapa, o pH alto faz com que as pontes de hidrogênio se quebrem, deixando o DNA fita simples).

- 20 g NaOH
- 87,68 g NaCl
- Completar para 1 litro
- Autoclavar ou utilizar água milliQ autoclavada.

→ Solução de Neutralização: (Nesta etapa, ocorre o restabelecimento do pH para próximo da neutralidade, mantendo as fitas desnaturadas):

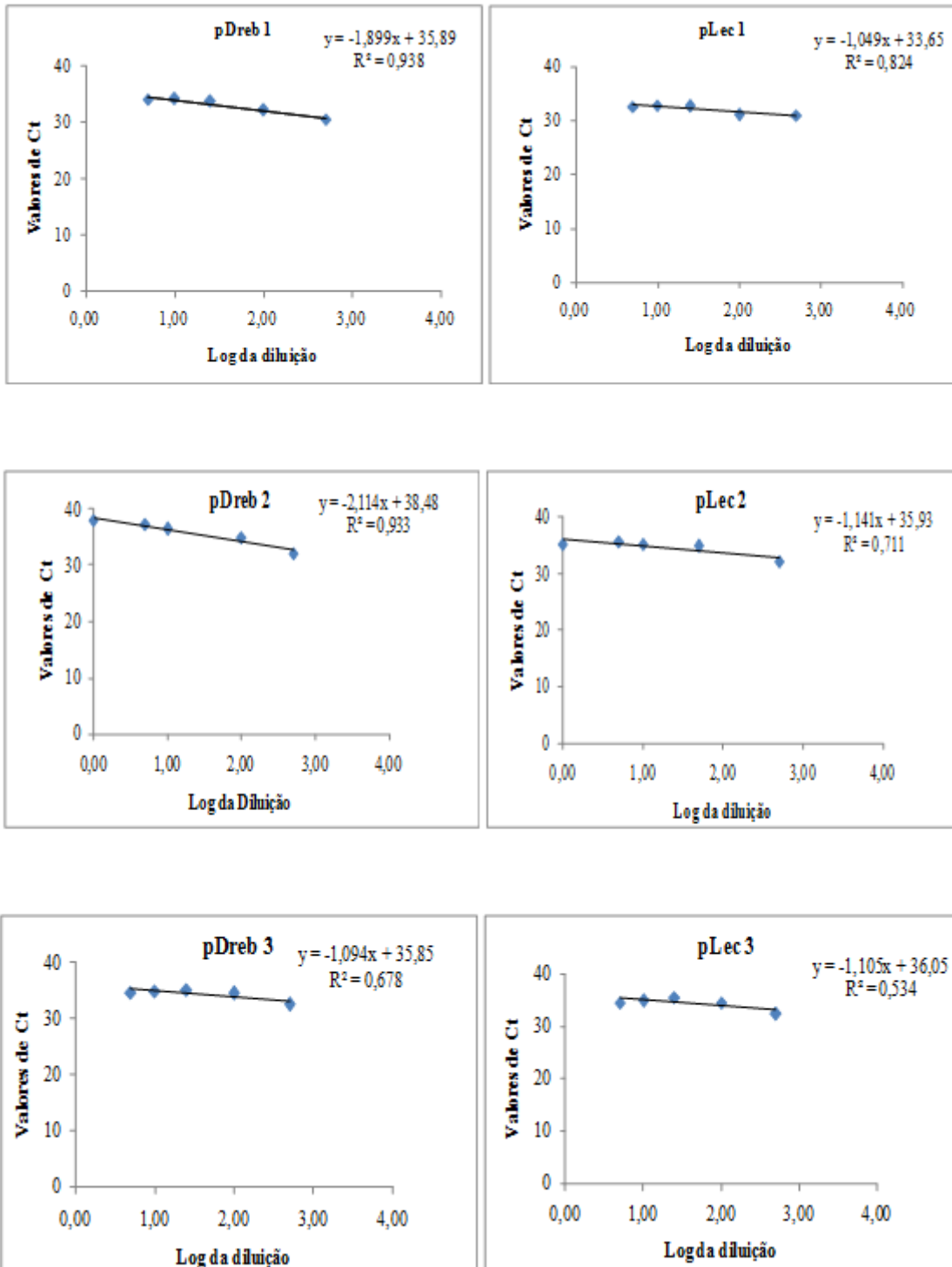
- 60,57 g Tris (pH~10)
- 175,32 g NaCl
- Corrigir o pH para 7,0 com HCl concentrado e completar para 1 litro. (Utiliza-se mais ou menos 40 mL para aferir o pH).
- Autoclavar ou utilizar água milliQ autoclavada.

→ Solução 20 X SSC: (Tampão de transferência para sistema por capilaridade):

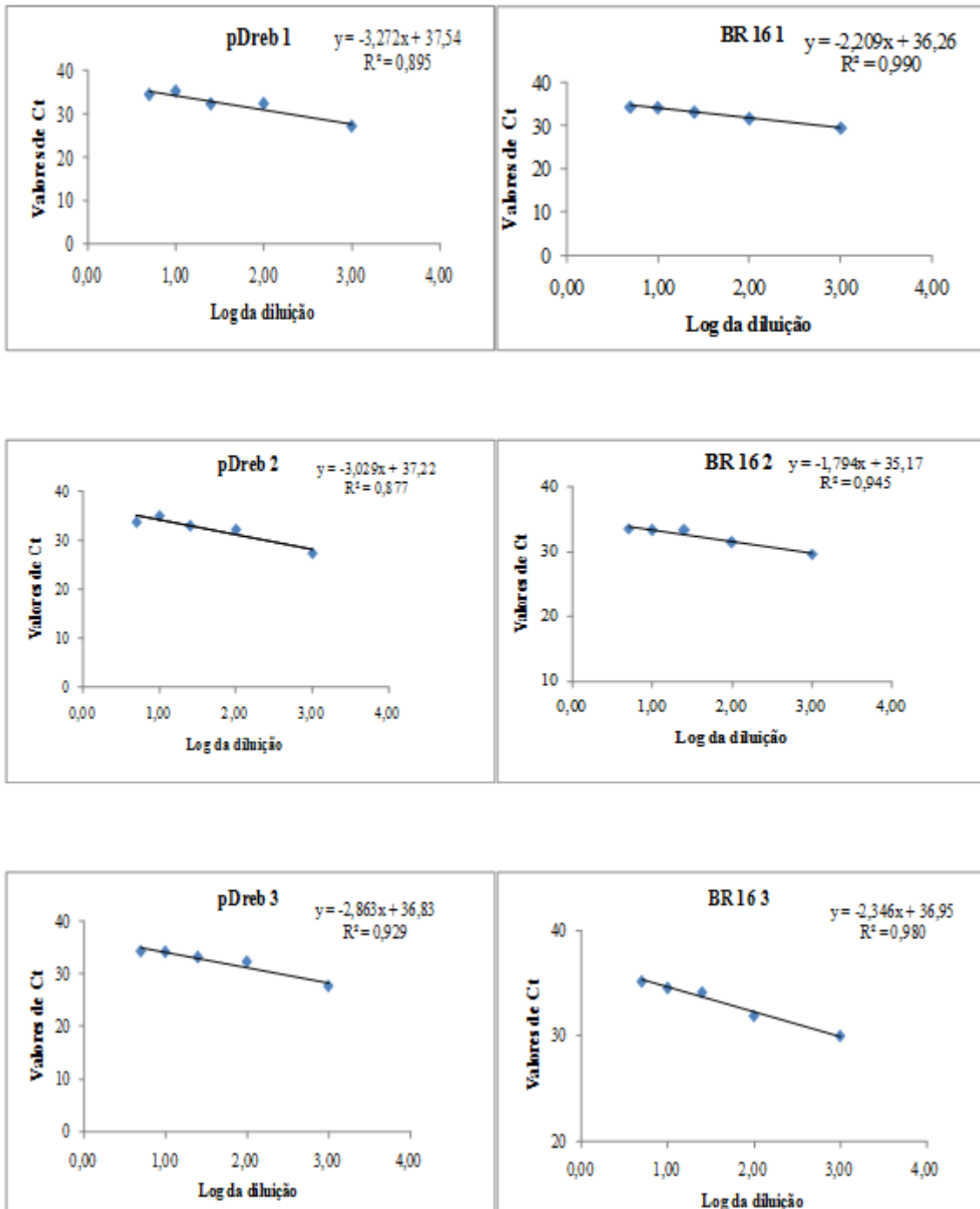
- 175,3 g NaCl
- 88,2 g Citrato de Sódio ou ácido cítrico → PM: 294,1 ($C_6H_5Na_3O_7H_2O$)
- Corrigir o pH para 7,0 e completar para 1 litro. (Pouco HCl - μ L).
- Autoclavar ou utilizar água milliQ autoclavada.

ANEXO B – PCR quantitativo

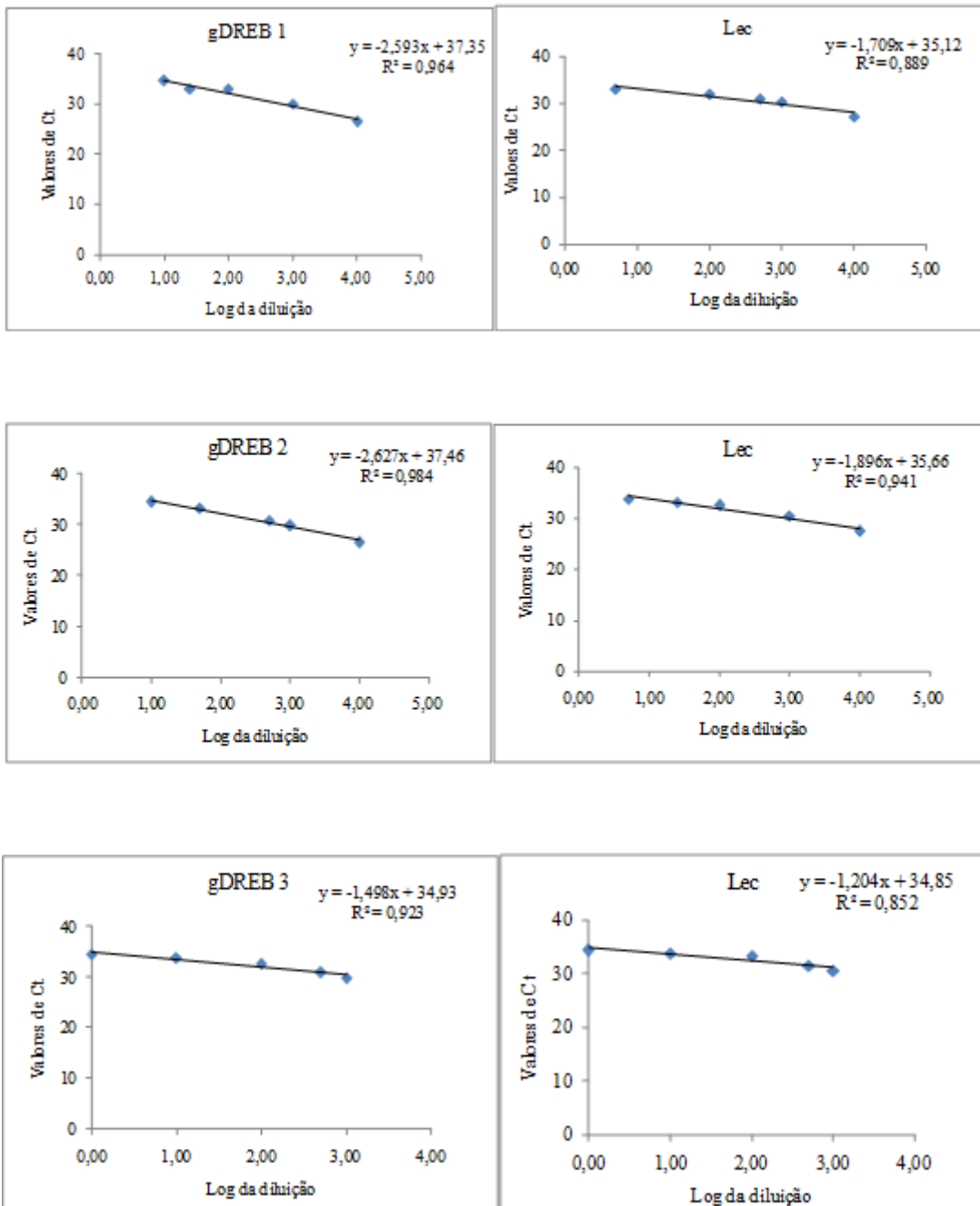
Curva de calibração quantificação relativa método curva padrão. As curvas foram obtidas pela interpolação do logaritmo da diluição dos plasmídeos Dreb e Lectina em função dos valores de Ct, em três corridas independentes.



Curva de calibração quantificação relativa método curva padrão. As curvas foram obtidas pela interpolação do logaritmo da diluição do plasmídeo pDreb e BR 16 em função dos valores de Ct, em três corridas independentes.



Curva de calibração quantificação relativa método curva padrão. As curvas foram obtidas pela interpolação do logaritmo da diluição gDNA da amostra P58 T5 em função dos valores de Ct, em três corridas independentes.



Planilha de diluição DNA plasmidial DREB1A, para construção dos padrões.

Material:	DNA plasmidial pDREB	
Concentração:	100	ng/uL
Tamanho da plasmídeo + inserto	4838pb	
Massa de 1 C:	$5,30 \times 10^{-18}$	g
	$5,30 \times 10^{-9}$	ng
Vol. Final Reação:	2,5	uL
Vol. Final diluição:	30	uL

Quantidade de DNA (ng)	Cópias do Genoma	Diluição	Exp	Conc. das diluições ng/uL	Vol de DNA	Vol H ₂ O
53,00	10.000.000.000	10^{-10}	10^{10}	21,2	6,36	23,64
5,3	1.000.000.000	10^{-9}	10^9	2,12	Diluição: 3 uL de DNA + 27 H ₂ O	
0,53	100.000.000	10^{-8}	10^8	0,212	Diluição: 3 uL de DNA + 27 H ₂ O	
0,053	10.000.000	10^{-7}	10^7	0,0212	Diluição: 3 uL de DNA + 27 H ₂ O	
0,0053	1.000.000	10^{-6}	10^6	0,00212	Diluição: 3 uL de DNA + 27 H ₂ O	
0,00053	100.000	10^{-5}	10^5	0,000212	Diluição: 3 uL de DNA + 27 H ₂ O	
0,000053	10.000	10^{-4}	10^4	0,0000212	Diluição: 3 uL de DNA + 27 H ₂ O	
0,0000053	1.000	10^{-3}	10^3	0,00000212	Diluição: 10 uL de DNA + 90 H ₂ O	
0,00000053	100	10^{-2}	10^2	0,000000212	Diluição: 10 uL de DNA + 90 H ₂ O	
0,000000053	10	10^{-1}	10^1	2,12E-08	Diluição: 10 uL de DNA + 90 H ₂ O	
5,3E-09	1	10^0	10^0	2,12E-09	Diluição: 10 uL de DNA + 90 H ₂ O	

Fórmula para determinação da massa de 1 cópia

$$m = *n \quad x \quad \frac{[1 \text{ mole }]}{6,023 \times 10^{23} \text{ moléc.}} \quad x \quad \frac{(660 \text{ g })}{\text{mole}}$$

$$m = *n \quad x \quad [1,096 \times 10^{-21}]$$

$$m = 4838 \times 1,096 \times 10^{-21}$$

$$m = 5302,448 \times 10^{-21} \text{ g}$$

$$m = 5,302 \times 10^{-18} \text{ ng}$$

*n = tamanho do plasmídeo + inserto

Planilha de diluição DNA plasmidial lectina de soja para a construção dos padrões.

Material:	DNA plasmidial pLec	
Concetração:	60	ng/uL
Tamanho da plasmideo + inserto	3079pb	
Massa de 1 C:	$3,374 \times 10^{18}$	g
	$3,374 \times 10^{-9}$	ng
Vol. Final Reação:	2,5	uL
Vol. Final diluição:	30	uL

Quantidade de DNA (ng)	Cópias do Genoma	Diluição	Exp	Conc. das diluições ng/uL	Vol de DNA	Vol. H ₂ O
33,74	10.000.000.000	10^{-10}	10^{10}	13.496	6,75	23,25
3,374	1.000.000.000	10^{-9}	10^9	1,3496	Diluição: 3 uL de DNA + 27 H ₂ O	
0,3374	100.000.000	10^{-8}	10^8	0,13496	Diluição: 3 uL de DNA + 27 H ₂ O	
0,03374	10.000.000	10^{-7}	10^7	0,013496	Diluição: 3 uL de DNA + 27 H ₂ O	
0,003374	1.000.000	10^{-6}	10^6	0,0013496	Diluição: 3 uL de DNA + 27 H ₂ O	
0,0003374	100.000	10^{-5}	10^5	0,00013496	Diluição: 3 uL de DNA + 27 H ₂ O	
0,00003374	10.000	10^{-4}	10^4	0,000013496	Diluição: 3 uL de DNA + 27 H ₂ O	
0,000003374	1.000	10^{-3}	10^3	1,3496E-06	Diluição: 10 uL de DNA + 90 H ₂ O	
3,374E-07	100	10^{-2}	10^2	1,3496E-07	Diluição: 10 uL de DNA + 90 H ₂ O	
3,374E-08	10	10^{-1}	10^1	1,3496E-08	Diluição: 10 uL de DNA + 90 H ₂ O	
3,374E-09	1	10^0	10^0	1,3496E-09	Diluição: 10 uL de DNA + 90 H ₂ O	

Fórmula para determinação da massa de 1 cópia

$$m = *n \quad x \quad \frac{[\text{1 mole}]}{6,023 \times 10^{23} \text{ moléc.}} \quad x \quad \frac{(660 \text{ g})}{\text{mole}}$$

$$m = *n \quad x \quad [1,096 \times 10^{-21}]$$

$$m = 3079 \times 1,096 \times 10^{-21}$$

$$m = 3374,584 \times 10^{-21} \text{ g}$$

$$m = 3,374 \times 10^{-18} \text{ ng}$$

*n = tamanho do plasmideo + inserto

Planilha de diluição DNA genômico, evento P58 T₅ contendo 1 cópia

Material:	DNA genômico soja	
Concentração:	100	ng/uL
Tamanho do genoma soja	1,115Mb	
Massa de 1 C:	1,22 x 10 ⁻¹²	g
	0,000122000	ng
Vol. Final Reação:	2,5	uL
Vol. Final diluição:	30	uL

Quantidade de DNA (ng)	Cópias do Genoma	Diluição	Exp	Conc. das diluições ng/uL	Vol de DNA	Vol H ₂ O
122,204	100.000	10 ⁻⁵	10 ⁵	48,8816	14,66	15,34
12,2204	10.000	10 ⁻⁴	10 ⁴	4,88816	Diluição: 10 uL de DNA + 90 H ₂ O	
1,22204	1.000	10 ⁻³	10 ³	0,488816	Diluição: 10 uL de DNA + 90 H ₂ O	
0,122204	100	10 ⁻²	10 ²	0,0488816	Diluição: 10 uL de DNA + 90 H ₂ O	
0,0122204	10	10 ⁻¹	10 ¹	0,00488816	Diluição: 10 uL de DNA + 90 H ₂ O	
0,00122204	1	10 ⁰	10 ⁰	0,000488816	Diluição: 10 uL de DNA + 90 H ₂ O	

Fórmula para determinação da massa de 1 cópia

$$m = *n \quad x \quad \frac{[1 \text{ mole }]}{6,023 \times 10^{23} \text{ moléc.}} \quad x \quad \left(\frac{660 \text{ g}}{\text{mole}} \right)$$

$$m = *n \quad x \quad [1,096 \times 10^{-21}]$$

$$m = 1,115 \times 10^9 \times 1,096 \times 10^{-21} \text{ g}$$

$$m = 0,000122 \text{ ng}$$

*n = tamanho do genoma da soja