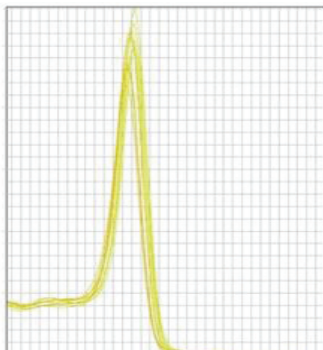


Determinação do Número de Cópias de Transgenes em Eventos de Tabaco por PCR em Tempo Real



***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento***

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
168**

**Determinação do Número de Cópias
de Transgenes em Eventos de
Tabaco por PCR em Tempo Real**

Jéssica Fabiane da Veiga Costa
Simara da Silva Lopes
Beatriz de Almeida Barros
Andrea Almeida Carneiro
Sylvia Moraes de Sousa

*Embrapa Milho e Sorgo
Sete Lagoas, MG
2018*

Esta publicação está disponível no endereço:

<https://www.embrapa.br/milho-e-sorgo/publicacoes>

Embrapa Milho e Sorgo

Rod. MG 424 Km 45
Caixa Postal 151
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
Fone: (31) 3027-1100
Fax: (31) 3027-1188
www.embrapa.br/fale-conosco/sa

Comitê Local de Publicações
da Unidade Responsável

Presidente

Sidney Netto Parentoni

Secretário-Executivo

Elena Charlotte Landau

Membros

*Antonio Claudio da Silva Barros, Cynthia
Maria Borges Damasceno, Maria Lúcia
Ferreira Simeone, Roberto dos Santos
Trindade e Rosângela Lacerda de Castro*

Revisão de texto

Antonio Claudio da Silva Barros

Normalização bibliográfica

Rosângela Lacerda de Castro (CRB 6/2749)

Tratamento das ilustrações

Tânia Mara Assunção Barbosa

Projeto gráfico da coleção

Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica

Tânia Mara Assunção Barbosa

Fotos da capa

*Jéssica Fabiane da Veiga Costa
Simara da Silva Lopes*

1ª edição

Formato digital (2018)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Nome da unidade catalogadora

Determinação do número de cópias de transgenes em eventos de tabaco por
PCR em tempo real / Jéssica Fabiane da Veiga Costa ... [et al.]. -- Sete Lago-
as : Embrapa Milho e Sorgo, 2018.
23 p. : il. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo,
ISSN 1679-0154; 168).

1. Planta transgênica. 2. Transgênico. 3. Engenharia genética. I. Costa, Jéssica
Fabiane da Veiga. II. Lopes, Simara da Silva. III. Barros, Beatriz de Almeida. IV.
Carneiro, Andrea Almeida. V. Sousa, Sylvia Moraes de. VI. Série.

CDD 631.523 (21. ed.)

Rosângela Lacerda de Castro (CRB 6/2749)

© Embrapa, 2018

Sumário

Resumo4

Abstract6

Introdução.....7

Material e Métodos10

Resultados e Discussão13

Conclusões.....18

Agradecimentos.....18

Referências18

Determinação do Número de Cópias de Transgenes em Eventos de Tabaco por PCR em Tempo Real

Jéssica Fabiane da Veiga Costa¹

Simara da Silva Lopes²

Beatriz de Almeida Barros³

Andrea Almeida Carneiro⁴

Sylvia Moraes de Sousa^{*5}

Resumo – Por causa da facilidade de regeneração *in vitro* e de transformação via agrobactéria, o tabaco tem sido considerado um sistema modelo ideal para a transferência de genes e estudos genético-moleculares. Métodos eficientes para caracterizar plantas transgênicas são importantes para entender o estado fisiológico do transformante. A técnica de PCR em tempo real pode ser usada para determinar a zigosidade em plantas transgênicas e o número de cópias do transgene. Em plantas transgênicas, o número de cópias do transgene pode influenciar o nível de expressão e a estabilidade genética do gene alvo, o que torna a estimativa do número de cópias do transgene extremamente importante na pesquisa com culturas geneticamente modificadas. O gene *Axi1*, envolvido na ação das auxinas, já foi utilizado anteriormente como controle endógeno na determinação de número de inserções de transgenes de tabaco, no entanto, não foi confirmado se esse gene é cópia única. Portanto, o objetivo desse trabalho foi estabelecer uma metodologia para determinar o número de cópias em plantas transgênicas de tabaco, utilizando PCR em tempo real (qPCR). Plantas de tabaco (*Petit havana*) foram transformadas via *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 e regeneradas de calos selecionados em meio de brotamento e enraizamento com vetor vazio (pMCG1005), com o gene de arroz *Phosphorus Starvation Tolerance 1* (*OsPstol1*) e seus

¹ Graduanda em Ciências Biológicas, Centro Universitário de Sete Lagoas – UNIFEMM, Sete Lagoas, MG.

² Doutoranda em Bioengenharia, Universidade Federal de São João de Rei, UFSJ, São João del-Rei, MG.

³ Bióloga, Dsc., Analista da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG.

⁴ Bióloga, Ph.D., Pesquisadora em Biologia Celular da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG.

⁵ Bióloga, Dsc., Pesquisadora em Biologia Molecular da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. *Autora correspondente

homólogos em milho (*ZmPstol3.06*, *ZmPstol8.02* e *ZmPstol8.05_1*) e sorgo (*Sb07g002840*, *Sb03g031690* e *Sb03g006765*) sob o promotor da ubiquitina e com o gene de seleção *Bar*. Para confirmar o número de cópias do gene *Axi1*, um fragmento desse gene de tabaco foi clonado no vetor pGEM-T Easy e utilizado na confecção de uma curva padrão. O número de cópias do gene foi obtido plotando-se valores de C_t obtidos de amostras de DNA genômico de tabaco de concentração conhecida nessa curva. Essa abordagem demonstrou que o gene *Axi1* encontra-se em cópia única no genoma do tabaco. Assim, onze eventos de tabaco transgênico T0 foram avaliados com o método $2^{-\Delta C_t}$ para determinar o número relativo de cópias do gene *Bar* no genoma, utilizando *Axi1* como gene de referência. Uma amostra com uma cópia (*ZmPstol8.02 Ev.6*) foi estabelecida pelo método $2^{-\Delta C_t}$ e utilizada como referência de cópia única usando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Os resultados da determinação do número de cópias foram concordantes com as taxas de segregação em plantas T1 com o genótipo *Bar* de cada evento. Todos os três eventos cópia únicas tiveram segregação Mendeliana de 3:1 e esses resultados confirmam que *Axi1* é um gene cópia única e pode ser usado como um controle endógeno para avaliar o número de cópias com o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ em tabaco transgênico.

Termos para indexação: Transgênico; *Nicotiana tabacum*; *Axi1*; fósforo.

Transgene Copy Number Determination in Tobacco Events by Real-Time PCR

Abstract – Tobacco can be easily regenerated in vitro and genetically transformed by *Agrobacterium*, which makes it ideal model for gene transfer and genetic-molecular studies. Efficient methods to characterize transgenic plants are important to understand the state of the transformant. Real-time PCR technique can be used to determine zygosity and copy number in transgenes. In transgenic plants, transgene copy number can greatly influence the expression level and genetic stability of the target gene, making transgene copy number estimative extremely important for genetically modified crop research. *Axi1* gene, involved in auxin metabolism, was previously used as an endogenous control in the determination of transgene insertion in tobacco, however it was not confirmed if this gene has only one copy. Thus, this work aimed to establish a methodology to estimate transgene copy number in transgenic tobacco, using real time PCR (qPCR). Tobacco *Petit havana* plants were transformed via *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 strain and regenerated from selected callus in shooting and rooting medium with an empty vector (pMCG1005), rice *Phosphorus Starvation Tolerance 1* gene (*OsPstol1*), its maize (*ZmPstol3.06*, *ZmPstol8.02* and *ZmPstol8.05_1*) and sorghum (*Sb07g002840*, *Sb03g031690* and *Sb03g006765*) homologs under ubiquitin promoter and with *Bar* as selective gene. In order to confirm the *Axi1* copy number, one fragment of tobacco *Axi1* gene was cloned into the pGEM-T Easy vector and used to make a standard curve. The gene copy number was obtained by plotting Ct values obtained from tobacco genomic DNA samples of known concentration in the curve. This approach demonstrated that the *Axi1* is a single copy gene in the tobacco genome. Thus, qPCR with the $2^{-\Delta Ct}$ method was used to determine the relative number of copies of the *Bar* gene in the genome, using *Axi1* as endogenous control, in the T0 generation of eleven transgenic tobacco events. One copy sample (*ZmPstol8.02 Ev.6*) was established by the $2^{-\Delta Ct}$ method and was used as one copy reference with the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. These copy number results corroborated with segregation

ratios of *Bar* gene in T1 plants. All three single copy events presented 3:1 Mendelian segregation ratio, confirming that *Axi1* is a single copy gene that can be used as an endogenous control to evaluate copy number with $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method in transgenic tobacco.

Index terms: Transgenic; *Nicotiana tabacum*; *Axi1*; phosphorus.

Introdução

Plantas transgênicas contêm um ou mais genes introduzidos por meio da técnica de transformação genética. Através desta técnica, uma nova característica de outra espécie, que não acontece espontaneamente, pode ser inserida na planta (Rani; Usha, 2013) e transmitida para seus descendentes (Barros, 2004).

Em 1983, surgiram as primeiras plantas transgênicas de tabaco contendo um gene codificante para a resistência contra o antibiótico canamicina (Fraley et al., 1983). Desde então, diversas proteínas foram expressas em plantas de tabaco, milho e batata, dentre outras (Austin et al., 1994). O tabaco (*Nicotiana tabacum*) é uma das plantas mais transformadas e considerada como modelo, uma vez que possui métodos de transformação bem estabelecidos, possui fácil propagação, além de ter o genoma sequenciado (Koornneef; Meinke, 2010).

A transformação via *Agrobacterium* é um dos métodos mais utilizados, em que a agrobactéria transfere parte do DNA do seu plasmídeo Ti (*Tumor Inducing*) para células de plantas (Hoekema et al., 1983; Rogers et al., 1986). A agrobactéria pode ser encontrada no solo e tem a capacidade de provocar naturalmente tumores nos vegetais (Gelvin, 2003). O fragmento de DNA transferido contém genes responsáveis pela síntese de hormônios e metabólitos, delimitados por sequências conservadas. A expressão destes genes promove o crescimento desorganizado das células e a produção de metabólitos utilizados apenas pelas bactérias. É possível fazer a modificação do T-DNA da *Agrobacterium* nativa para desarmá-la, através da retirada de genes relacionados à síntese de fito-hormônios. Além disso, a construção de vetores de transformação via *Agrobacterium* necessita que as bordas esquerda e direita sejam conservadas e que os genes que fazem as sínteses de fito-hormônios sejam removidos do T-DNA. Por isso, independente da

sequência de DNA inserida entre as bordas do T-DNA ela pode ser transferida e integrada ao genoma vegetal, sem que haja interferência na regeneração de plantas (Brasileiro, 1995). Os plasmídeos Ti modificados são utilizados por técnicas de engenharia genética como vetores de transformação de plantas (Almeida; Borém, 2015).

Estudos moleculares, como a determinação do número de inserções, são necessários após a transformação genética, já que o número de cópias e o local de inserção podem influenciar a estabilidade dos genes e seu nível de expressão (Gadaleta et al., 2011). A técnica de PCR em tempo real tem se apresentado como uma alternativa rápida, sensível e acurada para este tipo de análise. Essa estimativa é essencial para a fixação do transgene, ou seja, obtenção de progênies homozigóticas, dado que múltiplas cópias podem causar efeitos negativos na expressão de um gene. No entanto, para a utilização dessa metodologia é essencial que se conheça um gene de referência de cópia única no genoma da planta avaliada, com pouca variação na expressão por influência de estímulos externos ou mudanças no metabolismo celular. Dessa forma, as possíveis variações de pipetagem e consequentemente a concentração final dos reagentes, da amostra ou variações nas condições das reações da PCR em tempo real, seriam corrigidas pela expressão do gene constitutivo. Como exemplo de referência de gene em cópia única, existe o gene que codifica a enzima *Alcool desidrogenase 1* (*Adh1*) no milho (Ingham et al., 2001) e o gene que codifica a proteína I/Y de um elemento móvel (HMG L/Y) em *Brassica napus* (Weng et al., 2005; Masek et al., 2000).

Em tabaco (*Nicotiana tabacum*), o número de cópias em plantas transgênicas transformadas com o gene P3 (*PotatoVirus A - PVA*) (Nováková et al., 2005) foi estimado utilizando o gene *Axi1* como controle endógeno (Subr et al., 2006). O gene *Axi1* (*Auxin independent1*) tem papel na ação da auxina, sendo que em plantas selvagens ele é expresso principalmente nas raízes. Quando tem sua expressão interrompida, o gene *Axi1* confere aos protoplastos a capacidade de crescer em cultura não somente sob ausência de auxina, mas também sob altas concentrações desse fito-hormônio, onde a máxima frequência de divisão celular não é observada nos protoplastos selvagens (Walden et al., 1994). Neste trabalho, o gene *Axi1* foi utilizado como gene de referência para a quantificação relativa baseada no método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak; Schmittgen, 2001) e a eficiência de reação também foi testada. Além

disso, o resultado do número de cópias por PCR em tempo real foi confirmado por teste de segregação (Subr et al., 2006), porém não foi confirmado se o *Axi1* era realmente cópia única, uma vez que o tabaco é alotetraploide. O tabaco tem um genoma complexo e grande (4,5 Gb) com uma significativa proporção de repetições (>70%). A espécie *N. tabacum* (2n=4x=48) evoluiu da hibridização interespecífica dos ancestrais *Nicotiana sylvestris* (2n=24, doador materno) e *Nicotiana tomentosiformis* (2n=24, doador paterno) há cerca de 200.000 anos (Leitch et al., 2008).

Eventos de plantas transgênicas de tabaco expressando os genes *Phosphorus-Starvation Tolerance 1* (*OsPstol1*) de arroz e seus homólogos de milho (*ZmPstol1_3.06*, *ZmPstol1_8.02* e *ZmPstol1_8.05_1*) e de sorgo (*Sb07g002840*, *Sb03g031690* e *Sb03g006765*) foram gerados (Lopes, 2016) por causa da necessidade de validação funcional dos genes *Pstol1* de sorgo e de milho quanto ao aumento da superfície radicular, aumento de aquisição de fósforo (P) e produtividade. Em arroz, foi encontrado na variedade *Kasalath* um loco denominado *Phosphorus Uptake1* (*Pup1*), que foi caracterizado por estar relacionado ao aumento da aquisição de P em baixas condições desse nutriente (Wissuwa et al., 2002) e ao aumento radicular (Ni et al., 1998; Wissuwa et al., 1998; Wissuwa; Ae, 2001). O *Pstol1* é o gene responsável por esse QTL (*Quantitative Trait Locus*), que codifica uma proteína quinase responsável pelo aumento na área de superfície radicular, na aquisição de P e na produção de grãos (Gamuyao et al., 2012).

Os homólogos do *OsPstol1* de arroz em milho e sorgo foram identificados por meio de estudos de genômica comparativa. Três proteínas preditas de sorgo com identidade superior a 55% com o *Pstol1* de arroz (BAK26566) foram identificadas por Hufnagel et al. (2014), pelo mapeamento associativo dois painéis de sorgo fenotipados para absorção de P, morfologia e arquitetura do sistema radicular em hidroponia e produtividade de grãos e acúmulo de biomassa em condições de baixo P. Esses dados foram validados por mapeamento de QTL utilizando população biparental, mostrando um papel geral dos homólogos de sorgo na morfologia e arquitetura do sistema radicular em sorgo. Azevedo et al. (2015) identificaram três genes preditos de milho com identidade superior a 55% com o *OsPstol1* colocalizados com QTLs para morfologia radicular, acúmulo de biomassa e teor de P em uma população de RILs (*Recombinant inbred lines*) em solução nutritiva, que foram mais expressos na raiz em relação à parte aérea. Dentro desse contexto, o

presente trabalho teve como objetivo estabelecer uma metodologia para a determinação, por PCR em tempo real, do número de cópias de inserções de transgenes em plantas de tabaco expressando os genes *Pstol1*, usando o gene *Axi1* como controle endógeno.

Material e Métodos

Clonagem do gene *Axi1*

Foram desenhados oligonucleotídeos para a clonagem do fragmento do gene *Axi1* (GenBank: X80301) com 727 pb (*Ax1CloneF*: 5'-AGATGCAGTTGTTGCAGCTC-3' e *Axi1CloneR*: 5'-TCAGATGCAAGGCAACAAAG-3'). A reação de PCR foi composta por DNA genômico de tabaco (40 ng), 0,5 mM de MgCl₂, 0,5 mM de primer, 1x GoTaq® Colorless Master Mix (Promega) em um volume final de 20 µL de reação. As reações foram submetidas a 94 °C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos de 94 °C por 20 segundos, e 61 °C por 20 segundos e 72 °C por 1 minutos, finalizando com 72 °C por 5 minutos. O produto da PCR foi aplicado em gel de agarose a 1% e visualizado com GelRed (Biotium®). A banda referente ao fragmento de interesse foi isolada do gel e purificada com o Kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) e, em seguida clonada no pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega). Células de *E. coli* DH5a foram transformadas por choque térmico e o DNA plasmidial dos clones recombinantes foi extraído com o auxílio do kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). A quantificação do DNA plasmidial foi realizada por espectrofotometria em Nanodrop1000 (ThermoFisher Scientific). Todos os procedimentos realizados com kits foram feitos seguindo as recomendações do fabricante.

Confirmação do número de cópias do gene *Axi1* no genoma de tabaco

A quantificação do número de cópias do gene *Axi1* no genoma do tabaco foi feita utilizando-se uma curva padrão de quatro pontos obtidos a partir de uma diluição seriada com fator de 1:10 do DNA plasmidial contendo 100.000,

10.000, 1.000 e 100 cópias do gene *Axi1*. O número de cópias do plasmídeo (quantidade inicial) foi calculado utilizando a fórmula abaixo:

$$\text{Nº de cópias}/\mu\text{L} = \frac{\text{massa molecular}}{\text{massa (g)}} \times 6,022 \times 10^{23}$$

Os valores de CT foram plotados contra o logaritmo dos números de cópias e a curva padrão foi gerada a partir do ajuste de uma regressão linear dos pontos plotados. A eficiência de amplificação por PCR (E) foi calculada a partir do coeficiente de inclinação da reta ajustada e de acordo com a equação (Rasmussen, 2001): $E = 10^{-1/\text{slope}} - 1$. Para a determinação do número de cópias do gene *Axi1* no genoma de tabaco, 87 ng (10000 cópias do genoma – conteúdo 2C = 8,7 pg) de quatro amostras independentes de DNA genômico foram amplificadas nas mesmas condições e interpoladas na curva padrão.

A princípio foi utilizada a fórmula $2^{\text{Ct}_{\text{referência}} - \text{Ct}_{\text{transgene}}}$ (Zhang et al., 2015) para determinar uma amostra calibradora com uma cópia única do transgene e posteriormente foi utilizada a fórmula $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (Livak; Schmittgen, 2001).

A reação de PCR foi composta por DNA plasmidial nas diluições descritas acima e 90 ng DNA genômico, Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems da Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA) 1X, 1 mM de cada primer (*Axi1*Forward: 5'-GCCGTCCTTGTTAGTTCCAAA-3' e *Axi1*Reverse: 5'-AGCGGTGCGACATCAAAAATC-3') (Subr et al., 2006) (Figura 1) em volume final de 10 mL. As condições de amplificação foram: 95 °C por 20 segundos uma vez, seguida por 40 ciclos de 95 °C por 3 segundos e 60 °C por 30 segundos, no equipamento 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems da Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA), seguindo as recomendações do fabricante.

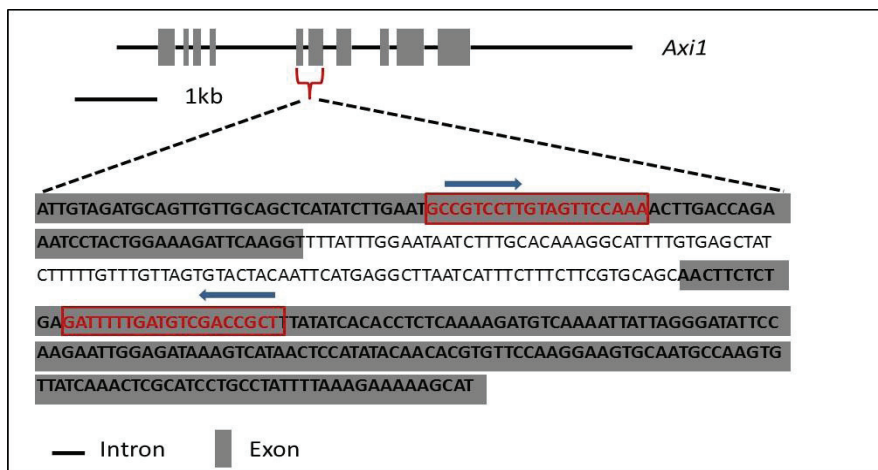


Figura 1. Representação esquemática do gene *Axi1* (6650 bp). Os primers do gene *Axi1* usados para PCR em tempo real estão localizados no exon cinco (Direto) e exon seis (Reverso) e marcados em vermelho.

Estimativa do número de cópias dos eventos transgênicos de tabaco

A estimativa do número de cópias do transgene inicialmente foi calculada para onze eventos T0 das construções gênicas pMCG1005 Ev. 5 (vetor vazio), *OsPstol1* Ev. 11, *ZmPstol3.06* Ev. 6, *ZmPstol8.02* Ev. 6, *ZmPstol8.05_1* Ev. 13, *Sb07g002840* Evs. 4 e 5, *Sb03g031690* Evs. 3 e 7, *Sb03g006765* Evs. 12 e 21 utilizando a fórmula $2^{Ct_{\text{referência}} - Ct_{\text{transgene}}}$, na qual não é necessário um evento e/ou linhagem de referência com cópia única (Zhang et al., 2015). A partir dessa análise, uma amostra com cópia única do transgene foi selecionada como referência para calcular com a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak; Schmittgen, 2001), para quantificar níveis de expressão relativa.

A reação foi composta por 50 ng de DNA genômico, Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) 1X, 0,6 mM dos oligonucleotídeos *Axi1*Forward e *Axi1*Reverse (Subr et al., 2006) ou 0,8 mM dos oligonucleotídeos *Bar* (BarF: 5'-ACAGCGACCACGCTCTTGA-3e BarR: 5'-GCTCTACACCCACCTGCTGA-3') em volume final de 10 mL. As condições de amplificação foram: 95 °C por 20 segundos uma vez, seguida por 40 ciclos de 95 °C por 3 segundos e 60 °C por 30 segundos no equipamento 7500 Fast

Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA), seguindo as recomendações do fabricante.

Teste de segregação nas plantas transgênicas de tabaco

Sementes de três eventos transgênicos de tabaco na progênie T1 (pMCG1005 Ev.7, *OsPstol1* Ev.6, *ZmPSTOL8.02* Ev. 6) foram germinadas em meio MS (Murashige; Skoog, 1962) sem agente de seleção. Plântulas com 20 a 35 dias após a germinação foram usadas para extração de DNA genômico pelo método de Saghai-Marooof et al. (1984).

A inserção dos cassetes de expressão nas plantas transgênicas de tabaco foram confirmadas por PCR utilizando 30 ng de DNA genômico, 0,5 mM de cada primer (BarF1: 5'- AGAAACCCACGTCATGC-3' e BarR1: 5'- GTGGTTGACGATGGTGCA-3'), tampão de reação 1X, 0,6 mM de cada dNTP, 1U Taq DNA Polimerase Platinum (Invitrogen), DMSO 5% em volume final de 20 mL. As condições de ciclagem foram: 94 °C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos de: 94 °C por 20 segundos, 62 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos, terminando com 72 °C por 5 minutos.

O teste de χ^2 foi feito para comparar as proporções esperadas para a integração de uma cópia do transgene (Tizaoui; Kchouk, 2012).

Resultados e Discussão

Neste trabalho foi usada a técnica de PCR em tempo real para estimar o número de cópias do transgene em plantas de tabaco transgênicas, utilizando o gene *Axi1*, como gene endógeno cópia única e o gene *Bar* como gene alvo. Foi necessária a determinação do número de cópias do *Axi1*, uma vez que não foi encontrada descrição definitiva na literatura. O fragmento clonado (727 bp) do gene *Axi1* foi utilizado para testar a especificidade dos oligonucleotídeos, através da curva de dissociação (*melting*), que evidenciou a amplificação de um único produto (Figura 2A), indicando a inexistência de produtos inespecíficos. Além disso, os experimentos mostraram que a eficiência dos oligonucleotídeos foi 93%, e, portanto apropriados para serem utilizados para o estabelecimento da curva padrão. A eficiência é a proporção que equivale à taxa de amplificação da PCR, possibilitando assim determinar o sucesso

dos oligonucleotídeos. A utilização do método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ requer uma eficiência dos oligonucleotídeos de 90 a 100% e com uma eficiência equivalente entre os oligonucleotídeos do gene alvo e do gene endógeno.

A curva padrão foi estabelecida utilizando DNA plasmidial com o fragmento do gene *Axi1* clonado em concentrações crescentes representando de 100 a 100.000 cópias com DNA genômico de tabaco. As amostras de DNA genômico de tabaco quantificaram entre 7.000 e 12.650 cópias, interpolando no ponto de 10.000 cópias na curva padrão. O resultado indica que o gene *Axi1* é encontrado em cópia única no genoma (Figura 2B) e que foi herdado de apenas uma das espécies que originaram a espécie *Nicotiana tabacum*.

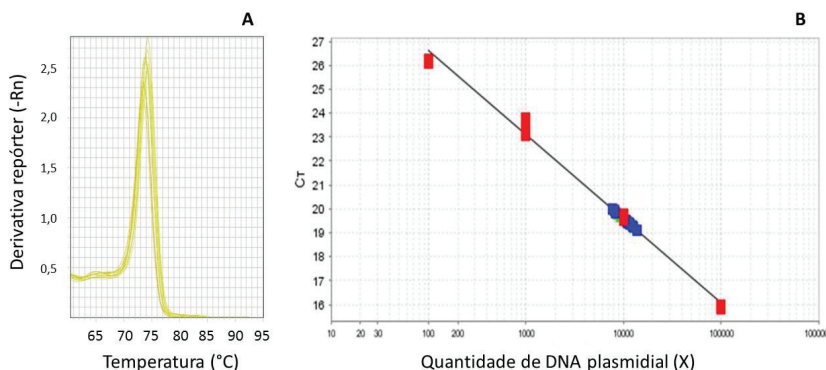


Figura 2. Curva de dissociação com os oligonucleotídeos para o gene *Axi1* de tabaco (A) e Curva padrão gene *Axi1* utilizando as diluições de 100.000, 10.000, 1.000 e 100 cópias do fragmento contendo plasmídeo do gene *Axi1* (B) R^2 : 0,992 e Eficiência (%): 93,055. Em vermelho, pontos da curva padrão e em azul, o gene *Axi1* no genoma do tabaco.

Inicialmente, foi utilizado o método $2^{-\Delta C_t}$ usando o gene *Axi1* como gene endógeno e o gene alvo, o gene de seleção *Bar* na geração T0 de oito construções gênicas dos transgênicos de tabaco para identificar uma amostra cópia única. A amostra cópia única selecionada para ser utilizada como referência pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ foi *ZmPstol8.02* Ev.6. A amostra referência cópia única foi utilizada como referência para o cálculo do número de cópias de 52 eventos, sendo que 48 eventos foram considerados cópia única e os demais variaram entre duas e cinco cópias (Tabela 1). Como esperado, o tabaco não transformado não apresentou amplificação para o gene *Bar* (Tabela 1). Resultados semelhantes com transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* foram encontrados em duas linhagens transgênicas de *Nicotiana*

tabacum cv. Xanthi, com inserção de uma cópia do transgene *AtWBC* (*Arabidopsis thaliana* ATP binding cassette (ABC) transporter) (Yuan et al., 2007) e em noventa e duas linhagens T_0 de algodão com inserção de uma a quatro cópias do gene *nptII* (*neomycin phosphotransferase tip II*) (Yang et al., 2013). Os resultados obtidos corroboraram os de Subr et al. (2006), que usaram o gene *Axi1* (*Auxin independent1*) como controle endógeno para determinar o número de cópias de transgênicos de tabaco com o gene *Potato virus A* (PVA) P3.

Em comparação com a transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, na transformação por biobalística ocorre integração de um grande número de cópias do transgene no genoma vegetal, o que pode levar ao silenciamento do transgene (Vyacheslavova et al., 2012). O processo de silenciamento gênico envolve a interação de sequências homólogas de DNA ou RNA, no qual o RNA participa do silenciamento pós-transcricional, em que ocorre a degradação de mRNAs homólogos no citoplasma e do silenciamento transcricional, que está relacionado com o bloqueio da transcrição por um RNA antissenso proveniente do próprio DNA, causando metilação da região promotora no núcleo (Fagard; Vaucheret, 2000; Vaucheret et al., 2001; Vendruscolo, 2003).

Tabela 1. Estimativas do número de cópias do transgene *Bar* em linhagens T_0 de tabaco por qPCR calculado pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, utilizando o gene *Axi1* como controle endógeno.

Amostras	Nº de cópias ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	Amostras	Nº de cópias ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
Tabaco não transgênico	0	Tabaco não transgênico	0
pMCG1005 Ev. 3	0,52	<i>ZmPstol8.02</i> Ev.2	0,24
pMCG1005 Ev. 4	0,98	<i>ZmPstol8.02</i> Ev.3	0,84
pMCG1005 Ev. 5	2,7	<i>ZmPstol8.02</i> Ev. 5	0,39
pMCG1005 Ev. 6	0,5	<i>ZmPstol8.02</i> Ev. 6	1
pMCG1005 Ev. 7	1,12	<i>ZmPstol8.02</i> Ev.7	1,54
pMCG1005 Ev. 9	0,39	<i>ZmPstol8.02</i> Ev.9	1,37

Tabela 1 cont. Estimativas do número de cópias do transgene *Bar* em linhagens T_0 de tabaco por qPCR calculado pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, utilizando o gene *Axi1* como controle endógeno.

Amostras	Nº de cópias ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	Amostras	Nº de cópias ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
pMCG1005 Ev. 10	0,45	<i>ZmPstol8.02</i> Ev.10	0,7
<i>OsPstol1</i> Ev. 5	0,79	<i>Sb07g002840</i> Ev.11	4,78
<i>OsPstol1</i> Ev. 6	1,17	<i>Sb03g031690</i> Ev.1	0,52
<i>OsPstol1</i> Ev. 11	1,72	<i>Sb03g031690</i> Ev.2	0,37
<i>OsPstol1</i> Ev. 21	0,8	<i>Sb03g031690</i> Ev.3	0,58
<i>OsPstol1</i> Ev. 22	0,8	<i>Sb03g031690</i> Ev.5	0,41
<i>ZmPstol8.05_1</i> Ev.4	0,44	<i>Sb03g031690</i> Ev.6	0,4
<i>ZmPstol8.05_1</i> Ev.8	0,62	<i>Sb03g031690</i> Ev.7	0,83
<i>ZmPstol8.05_1</i> Ev.10	0,39	<i>Sb03g031690</i> Ev.8	0,32
<i>ZmPstol8.05_1</i> Ev.11	0,32	<i>Sb03g031690</i> Ev.10	0,42
<i>ZmPstol8.05_1</i> Ev.13	0,57	<i>Sb03g006765</i> Ev.5	0,72
<i>ZmPstol8.05_1</i> Ev.14	0,39	<i>Sb03g006765</i> Ev.6	0,74
<i>ZmPstol8.05_1</i> Ev.15	0,39	<i>Sb03g006765</i> Ev.7	0,96
<i>ZmPstol8.05_1</i> Ev.16	0,34	<i>Sb03g006765</i> Ev.12	1
<i>ZmPstol3.06</i> Ev.1	1,33	<i>Sb03g006765</i> Ev.13	0,59
<i>ZmPstol3.06</i> Ev.3	0,4	<i>Sb03g006765</i> Ev.19	0,69
<i>ZmPstol3.06</i> Ev.5	1,35	<i>Sb03g006765</i> Ev.20	0,83
<i>ZmPstol3.06</i> Ev.6	0,71	<i>Sb03g006765</i> Ev.21	0,94
<i>ZmPstol3.06</i> Ev.7	0,55	<i>Sb03g006765</i> Ev.29	0,8
<i>ZmPstol3.06</i> Ev.8	0,7	<i>Sb03g006765</i> Ev.30	0,66

Para validar os dados obtidos do número de cópias por PCR em tempo real, foi feito um teste de segregação com os eventos pMCG1005 Ev. 7, *OsPSTOL1* Ev. 6 e *ZmPSTOL8.02* Ev. 6. Para o evento pMCG1005 Ev. 7, do total de dezesseis plântulas quatorze foram positivas para *Bar* e duas negativas, no evento *OsPSTOL1* Ev. 6 de dezenove plântulas dezesseis foram positivas e três negativas para *Bar*, e evento *ZmPSTOL8.02* Ev. 6 de dezenove plântulas quatorze foram positivas e cinco negativas para *Bar*. Sendo, portanto, o padrão de segregação esperado para características monogênicas (3:1) confirmado por meio de teste de χ^2 com $p < 0,05$ (Tabela 2). A segregação nesses eventos segue padrões de segregação Mendelianos 3:1, visto que os transgenes são herdados como um alelo dominante (Christou et al., 1989; Misra, 1989; Pawlowski; Somers, 1996; Theuns et al., 2002), no qual cada planta (2n) possui um par de genes, em que cada alelo doado de um dos pais é transmitido de geração a geração, sendo passados individualmente por meio dos gametas (n). A segregação Mendeliana 3:1 indica que há a presença de um único loco transgênico que pode ser funcional (Parrott, 2010).

Tabela 2. Segregação mendeliana e valores χ^2 para eventos transgênicos de tabaco T1 obtendo valores menores que o tabelado (3,481) ($p < 0,05$)

Amostras	Nº de cópias ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	Segregação	Valor χ^2
pMCG1005 Ev. 7	1,12	3:1	1,33
<i>OsPstol1</i> Ev. 6	1,17	3:1	0,85
<i>ZmPstol8.02</i> Ev. 6	1	3:1	0,01

Os transgenes são herdados sexualmente como uma característica dominante, com herança na proporção Mendeliana de 3:1 quando presentes em cópia única no genoma hospedeiro (Christou et al., 1989). Estudos de segregação em progênies T_1 de tabaco transgênico para o gene *NptII* mostraram segregação Mendeliana 3:1 em evento com cópia única do transgene, assim como para linhagens T_2 e T_3 desse evento (Tizaoui; Kchouk, 2012). Em três linhagens de soja transgênica com inserção de cópia única do transgene houve herança Mendeliana para os genes *Gus* e *Bar* até a

geração T_5 (Yong et al., 2006). A estabilidade, como mostrada nesse estudo, em conjunto com dados de expressão gênica é importante para evitar o silenciamento gênico e consequentemente a instabilidade da expressão e fenótipo do transgene.

Conclusões

Com base nos resultados obtidos, foi confirmado que o gene *Axi1* possui apenas uma cópia no genoma do tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), sendo possível utilizá-lo como gene de referência para estimar o número de cópias por meio de PCR em tempo real por meio do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ em tabaco transgênico.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Embrapa e à Fapemig pelo apoio financeiro.

Referências

- ALMEIDA, G. D.; BORÉM, A. Engenharia genética introduz novas características para melhorar plantas. **Visão Agrícola**, Piracicaba, n. 13, p. 16-19, jul./dez. 2015.
- AUSTIN, S.; BINGHAM, E. T.; KOEGELF, R. G.; MATHEW, D. E.; SHAHAN, M. N.; STRAUBF, R. J.; BURGESS, R. R. An overview of a feasibility study for the production of industrial enzymes in transgenic alfalfa. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 721, n. 1, p. 234-244, 1994.
- AZEVEDO, G. C. **Identificação de genes associados com a eficiência na aquisição de fósforo em milho com foco nos genes PSTOL1, STR1 e STR2**. 2015. 128 f. Tese - (Doutorado em Genética) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.
- BARROS, W. P. **Estudos tópicos sobre os organismos geneticamente modificados**. Porto Alegre: Tribunal de Justiça do Estado do Rio Grande do Sul, 2004.

BRASILEIRO, A. C. M. Transformação mediada por *Agrobacterium* sp. In: MÉTODOS de transferência e análise da expressão de genes em plantas. Brasília, DF: Embrapa-Cenargen, 1995. p. 7 - 22.

CHRISTOU, P.; SWAIN, F. W.; YANG, N. S.; McCABE, D. E. Inheritance and expression of foreign genes in transgenic soybean plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 86, n. 19, p. 7500-7504, 1989.

FAGARD, M.; VAUCHERET, H. (Trans) genes silencing in plants: how many mechanisms? **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 51, n. 1, p. 67-194, 2000.

FRALEY, R. T.; ROGERS, S. G.; HORSCH, R. B.; SANDERS, P. R.; FLICK, J. S.; ADAMS, S. P.; BITTNER, M. L.; BRAND, L. A.; FINK, C. L.; FRY, J. S.; GALLUPPI, G. R.; GOLDBERG, S. B.; HOFFMANN, N. L.; WOO, S. C. Expression of bacterial genes in plant cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 80, n. 15, p. 4803-4807, 1983.

GADALETA, A.; GIANCASPRO, A.; CARDONE, M. F.; BLANCO, A. Real-time PCR for detection of precise transgene copy number in durum wheat. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 16, n. 4, p. 652, 2011.

GAMUYAO, R.; CHIN, J. H.; TANAKA, J. P.; PESARESI, P.; CATAUSAN, S.; DALID, C.; LOEDIN, I. S.; MENDOZA, E. M. T.; WISSUWA, M.; HEUER, S. The protein kinase *PSTOL1* from traditional rice confers tolerance of phosphorus deficiency. **Nature**, London, v. 488, n. 7412, p. 535, 2012.

GELVIN, S. B. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 67, n. 1, p. 16-37, 2003.

HOEKEMA, A.; HIRSCH, P. R.; HOOYKAAS, P. J.; SCHILPEROORT, R. A. A binary plant vector strategy based on separation of vir-and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. **Nature**, London, v. 303, n. 5913, p. 179, 1983.

HUFNAGEL, B.; SOUSA, S. M. de; ASSIS, L.; GUIMARÃES, C. T.; LEISER, W.; AZEVEDO, G. C.; NEGRI, B.; LARSON, B. G.; SHAFF, J. E.; PASTINA, M. M.; BARROS, B. A.; WELTZIEN, E.; RATTUNDE, H. F. W.; VIANA, J. H.;

CLARK, R. T.; FALCÃO, A.; GAZAFFI, R.; GARCIA, A. A. F.; SCHAFFERT, R. E.; KOCHIAN, L. V.; MAGALHÃES, J. V. Duplicate and conquer: multiple homologs of PHOSPHORUS-STARVATION TOLERANCE 1 enhance phosphorus acquisition and sorghum performance on low phosphorus soils. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 166, n. 2, p. 659-677, 2014.

INGHAM, D. J.; BEER, S.; MONEY, S.; HANSEN, G. Quantitative real-time PCR assay for determining transgene copy number in transformed plants. **Biotechniques**, v. 31, n. 1, p. 132-141, 2001.

KOORNNEEF, M.; MEINKE, K. The development of Arabidopsis as a model plant. **The Plant Journal**, The Hague, v. 61, n. 6, p. 909-921, 2010.

LEITCH, I. J.; HANSON, L.; LIM, K. Y.; KOVARIK, A.; CHASE, M. W.; CLARKSON, J. J.; LEITCH, A. R. *The ups and downs of genome size evolution in polyploid species of Nicotiana (Solanaceae)*. **Annals of Botany**, London, v. 101, n. 6, p. 805-814, 2008.

LI, Y.; GU, M.; ZHANG, X.; ZHANG, J.; FAN, H.; LI, P.; LI, Z.; XU, G. Engineering a sensitive visual-tracking reporter system for real-time monitoring phosphorus deficiency in tobacco. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 12, n. 6, p. 674-684, 2014.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis de relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Method**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LOPES, S. S. **Análise funcional do gene PSTOL1 de arroz e de seus homólogos em milho e sorgo em plantas transgênicas de tabaco**. 2016. 58 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São João del-Rei, Sete Lagoas, 2016.

LYNCH, J. P. Roots of the second green revolution. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 55, p. 493-512, 2007.

MASEK, T.; SMYKAL, P.; JANOTOVA, I. I.; HONYS, D.; CAPKOVA, V. V.; PECHAN, P. M. Isolation of a *Brassica napus* L. cDNA encoding a putative high-mobility-group HMG I/Y protein. **Plant Science**, Limerick, v. 159, n. 2, p. 197-204, 2000.

MISRA, S. Transformation of *Brassica napus* L. with a disarmed-octopine plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*: molecular analysis and inheritance of

the transformed phenotype. **Journal of experimental Botany**, Oxford, v. 41, n. 3, p. 269-275, 1990.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NI, J. J.; WU, P.; SENADHIRA, D.; HUANG, N. Mapping QTLs for phosphorus deficiency tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 97, n. 8, p. 1361-1369, 1998.

NOVÁKOVÁ, S.; MAZÚROVÁ, L.; ČEŘOVSKÁ, N.; ŠUBR, Z. W. Transgenic tobacco plants carrying the non-structural P3 gene of potato virus A. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 49, n. 4, p. 593-598, 2005.

PARROTT, W. Genetically modified myths and realities. **New Biotechnology**, v. 27, n. 5, p. 545-551, 2010.

PAWLOWSKI, W. P.; SOMERS, D. A. Transgene inheritance in plants genetically engineered by microprojectile bombardment. **Molecular Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 17-30, 1996.

RANI, S. J.; USHA, R. Transgenic plants: types, benefits, public concerns and future. **Journal of Pharmacy Research**, v. 6, n. 8, p. 879-883, 2013.

RASMUSSEN, R. Quantification on the LightCycler. In: DIETMAIER, W.; WITTEW, C.; SIVASUBRAMANIAN, N. (Ed.). **Rapid cycle real-time PCR: methods and applications**. Berlin: Springer, 2001. p. 21-34.

ROGERS, S. G.; HORSCH, R. B.; FRALEY, R. T. Gene transfer in plants: production of transformed plants using Ti plasmid vectors. **Methods in Enzymology**, New York, v. 118, p. 627-640, 1986.

SAGHAI-MAROOF, M. A.; SOLIMAN, K. A.; JORGENSEN, R. A.; ALLARD, R. W. Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 81, n. 24, p. 8014-8018, 1984.

SUBR, Z.; NOVÁKOVÁ, S.; DRAHOVSKÁ, H. Detection of transgene copy number by analysis of the T1 generation of tobacco plants with introduced P3 gene of potato virus A. **Acta Virologica**, Bratislava, v. 50, p. 135-138, 2006.

THEUNS, I.; WINDELS, P.; DEBUCK, S.; DEPICKER, A.; VAN BOCKSTAL, E.; DELOOSE, M. Identification and characterization of T-DNA inserts by T-DNA finger printing. **Euphytica**, Wageningen, v. 123, n. 1, p. 75-84, 2002.

TIZAOUI, K.; KCHOUK, M. E. Genetic approaches for studying transgene inheritance and genetic recombination in three successive generations of transformed tobacco. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 35, n. 3, p. 640-649, 2012.

VAUCHERET, H.; BÉCLIN, C.; FAGARD, M. Post-transcriptional gene silencing in plants. **Journal of Cell Science**, London, v. 114, n. 17, p. 3083-3091, 2001.

VENDRUSCOLO, E. C. G. Silenciamento gênico e transgênicos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, DF, v. 31, p. 8, 2003.

VYACHESLAVOVA, A. O.; BERDICHEVETS, I. N.; TYURIN, A. A.; SHIMSHILASHVILI, K. R.; MUSTAFAEV, O. N.; GOLDENKOVA-PAVLOVA, I. V. Expression of heterologous genes in plant systems: new possibilities. **Russian Journal of Genetics**, v. 48, n. 11, p. 1067-1079, 2012.

WALDEN, R.; HAYASHI, H.; LUBENOW, H.; CZAJA, I.; SCHELL, J. Auxin inducibility and developmental expression of axi 1: a gene directing auxin independent growth in tobacco protoplasts. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 13, n. 20, p. 4729-4736, 1994.

WENG, H.; YANG, L.; LIU, Z.; DING, J.; PAN, A.; ZHANG, D. A novel reference gene, high-mobility-group protein I/Y, can be used in qualitative and real-time quantitative PCR detection of transgenic rapeseed cultivars. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 88, n. 2, p. 577-584, 2005.

WISSUWA, M.; AE, N. Further characterization of two QTLs that increase phosphorus uptake of rice (*Oryza sativa* L.) under phosphorus deficiency. **Plant and Soil**, The Hague, v. 237, n. 2, p. 275-286, 2001.

WISSUWA, M.; WEGNER, J.; AE, N.; YANO, M. Substitution mapping of Pup1: a major QTL increasing phosphorus uptake of rice from a phosphorus deficient soil. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 105, n. 6/7, p. 890-897, 2002.

WISSUWA, M.; YANO, M.; AE, N. Mapping of QTLs for phosphorus-deficiency tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 97, n. 5/6, p. 777-783, 1998.

YANG, X.; LI, F.; ZHANG, X.; LIU, K.; WANG, Q.; ZHANG, J.; LIU, C.; ZHU, Z.; SHAN, G.; CHIN, C. K.; FANG, W. Integration and characterization of T-DNA insertion in upland cotton. **Czech Journal of Genetics and Plant Breeding**, v. 49, n. 2, p. 51-57, 2013.

YONG, Z.; BAO-YU, Y.; SHI-YUN, C. Inheritance analysis of herbicide-resistant transgenic soybean lines. **Acta Genetica Sinica**, v. 33, n. 12, p. 1105-1111, 2006.

YUAN, J. S.; BURRIS, J.; STEWART, N. R.; MENTEWAB, A.; STEWART JR., C. N. Statistical tools for transgene copy number estimation based on real-time PCR. **BMC Bioinformatics**, v. 8, n. 7, p. S6, 2007.

ZHANG, Y.; LIU, Y.; ZHANG, J.; WANG, G.; WANG, J.; LIU, Y. Assessment of transgene copy number and zygosity of transgenic maize overexpressing Cry1le gene with SYBR® Green qRT-PCR. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 51, n. 2, p. 125-134, 2015.



Milho e Sorgo

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

Governo
Federal