

DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE INSERÇÕES DE TRANSGENE EM PLANTAS TRANSGÊNICAS DE TABACO POR REAÇÃO DA CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL

Jéssica Fabiane da Veiga Costa¹

Simara da Silva Lopes²

Beatriz de Almeida Barros³

Andrea Almeida Carneiro⁴

Sylvia Morais de Sousa Tinoco⁵

¹Graduanda em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário de Sete Lagoas. E-mail: jessica_fabianeveiga@hotmail.com

²Doutoranda em Bioengenharia pela Universidade Federal de São João de Rei. E-mail: simarabrazil@yahoo.com.br

³Bióloga, DSc., Analista em Biologia Molecular da Embrapa Milho e Sorgo. E-mail: beatriz.barros@embrapa.br

⁴Bióloga, DSc., Pesquisadora em Cultura de Tecidos da Embrapa Milho e Sorgo E-mail: Andrea.carneiro@embrapa.br

⁵Bióloga, DSc., Pesquisadora em Biologia Molecular da Embrapa Milho e Sorgo, Professora do Mestrado Profissional em Biotecnologia e Gestão da Inovação do Centro Universitário de Sete Lagoas e da pós-graduação em Bioengenharia da Universidade Federal de São João del-Rei, Sete Lagoas, MG. E-mail: sylvia.sousa@embrapa.br

RESUMO

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 com PCR em tempo real (qPCR) para determinar o número de cópias em plantas transgênicas de tabaco, utilizando o gene *Axi1*

como controle endógeno. Plantas de tabaco (*Petit havana*) foram transformadas via *Agrobacterium tumefaciens* e regeneradas com vetor vazio (pMCG1005), com o gene de arroz *Phosphorus Starvation Tolerance 1* (*OsPstol1*) e seus 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 e utilizado na confecção de uma curva padrão. O número de cópias do gene foi obtido plotando-se valores de Ct 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 $2^{-\Delta Ct}$ 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 $2^{-\Delta Ct}$ e utilizada como referência de cópia única usando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. 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 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ em tabaco transgênico.

Palavras-chave: Transgênico; *Nicotiana tabacum*; *Axi1*; fósforo.

1 INTRODUÇÃO

Plantas transgênicas contêm um ou mais genes introduzidos por meio da técnica de transformação genética. Por meio 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 (LEITE, 1998). 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, onde a agrobactéria transfere parte do DNA do seu plasmídeo Ti (*Tumor Inducing*) para células de plantas (HOEKEMA et al., 1983; ROGERS et al., 1986). 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.

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 *Ax1l* como controle endógeno (SUBR et al., 2006). O gene *Ax1l* (*Auxin independent1*) tem papel na ação da auxina, sendo que em plantas selvagens ele é expresso principalmente nas raízes. WALDEN e colaboradores (1994) utilizaram o gene *Ax1l* como gene de referência para a quantificação relativa baseada no método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e posteriormente a eficiência de reação foi testada e o número de cópias por PCR em tempo real foi confirmado por

teste de segregação por SUBR et al. (2006), porém não foi confirmado se o *Ax1l* 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) a cerca de 200.000 anos atrás (LEITCH et al., 2008).

Eventos de plantas transgênicas de tabaco expressando os genes *Phosphorus-Starvation Tolerance 1* (*OsPstol1*) de arroz, responsável por aumentar a área de superfície radicular, a aquisição de P e a produção de grãos

(GAMUYAO et al., 2012), 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) devido a necessidade de validação funcional dos genes *Pstol1* de sorgo e milho. 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 *Ax1l* como controle endógeno.

2 METODOLOGIA

2.1 Clonagem do gene *Ax1l*

Foram desenhados oligonucleotídeos para a clonagem do fragmento do gene *Ax1l* (GenBank: X80301) com 727 pb (*Ax1l*CloneF: 5'-AGATGCAGTTGTTGCAGCTC-3' e *Ax1l*CloneR: 5'-TCAGATGCAAGGCAACAAAG-3'). A reação de PCR foi composta por DNA genômico de tabaco (40 ng), 0,5 mM de MgCl₂, 0,5 μM de primer, 1x GoTaq® Colorless Master Mix (Promega) em um volume final de 20 μL de reação. As reações foram submetidas à 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. A banda referente ao fragmento de interesse foi isolada e clonada no pGEM®-T Easy Vector

Systems (Promega), seguindo as orientações do fabricante.

2.2 Confirmação do número de cópias do gene *AxiI* no genoma de tabaco

A quantificação do número de cópias do gene *AxiI* 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 *AxiI*. O número de cópias do plasmídeo (quantidade inicial) foi calculado utilizando a fórmula abaixo:

$$N \text{ de cópias}/\mu\text{L} = \frac{\text{massa molecular} \times 6,022 \times 10^{23}}{\text{massa (g)}}$$

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 *AxiI* 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 $2^{Ct_{\text{referência}} - Ct_{\text{transgene}}}$ (ZHANG et al., 2015) para determinar uma amostra calibradora com uma

cópia única do transgene e posteriormente foi utilizada a fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (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 μ M de cada primer (*AxiI*/Forward: 5'-GCCGTCCTTG TAGTTCCAAA -3' e *AxiI*/Reverse: 5'-TTTGGA ACTACAAGGACGGCC -3') (SUBR et al., 2006) em volume final de 10 μ L. 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.

2.3 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 $2^{C_{t_refer\acute{e}ncia}-C_{t_transgene}}$, na qual não é necessária que tenha 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 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (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 μ M dos oligonucleotídeos *AxiI*Forward e *AxiI*Reverse (SUBR et al., 2006) ou 0,8 μ M dos oligonucleotídeos *Bar* (BarF:5'-ACAGCGACCACGCTCTTGA-3' e BarR:5'-GCTCTACACCCACCTGCTGA-3') em volume final de 10 μ L. 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.

2.4 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 μ M de cada primer (BarF1: 5'-AGAAACCCACGTCATGC-3' e BarR1: 5'-GTGGTTGACGATGGTGCA-3'), tampão de reação 1X, 0,6 μ M de cada dNTP, 1U Taq DNA Polimerase Platinum (Invitrogen), DMSO 5% em volume final de 20 μ L. 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).

3 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 *Ax1l*, como gene endógeno cópia única e o gene *Bar* como gene alvo. Foi necessária a determinação do número de cópias do *Ax1l*, uma vez que não foi encontrada descrição definitiva na literatura. O fragmento clonado (727 bp) do gene *Ax1l* foi utilizado para testar a especificidade dos oligonucleotídeos, através da curva de dissociação (*melting*), que evidenciou a amplificação de um único produto (Figura 1A), 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 dos oligonucleotídeos é a medida que equivale à taxa de amplificação da PCR, possibilitando assim determinar o sucesso destes utilizados nessa técnica. A utilização do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 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 *Axil* 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 a 12.650 cópias, interpolando no ponto de 10.000 cópias na curva padrão. O resultado indica que o

gene *Axil* é encontrado em cópia única no genoma (Figura 1B) e que foi herdado de apenas uma das espécies que originaram a espécie *Nicotiana tabacum*.

Figuras 1 A e 1 B – Curvas de dissociação e padrão

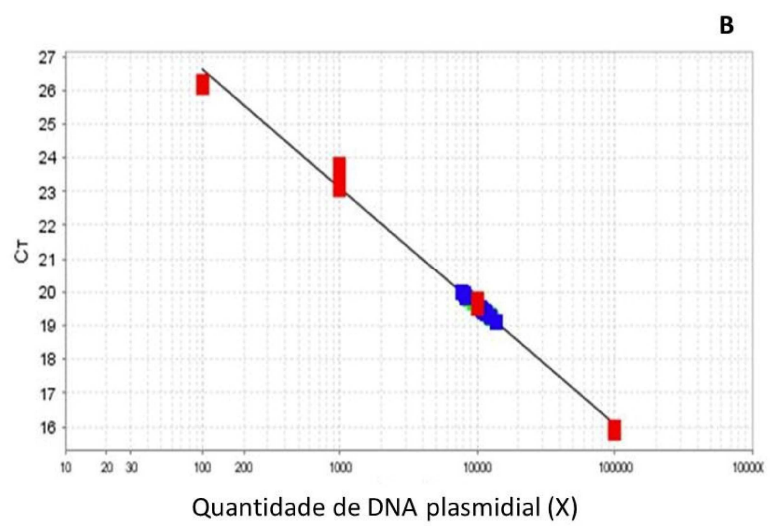
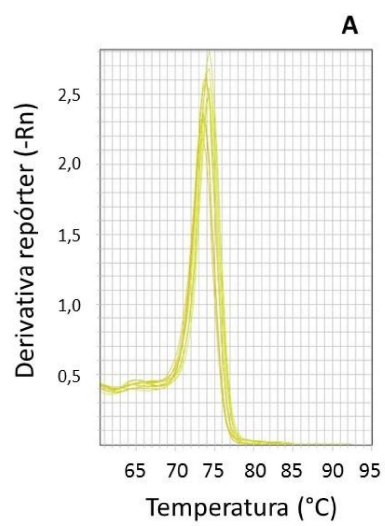


Figura 1. Curva de dissociação com os oligonucleotídeos para o gene *Ax1l* de tabaco (A) e Curva padrão gene *Ax1l* utilizando as diluições de 100.000, 10.000, 1.000 e 100 cópias do fragmento contendo plasmídeo do gene *Ax1l* (B) R^2 : 0,992 e Eficiência (%): 93,055. Em

vermelho, pontos da curva padrão e em azul, o gene *Ax1l* no genoma do tabaco.

Inicialmente, foi utilizado o método $2^{-\Delta Ct}$ usando o gene *Ax1l* 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 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ foi

ZmPst08.02 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 a 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* (*Arabidopsisthaliana* ATP binding cassette (ABC) transporter) (YUAN et al., 2007) e em noventa e duas linhagens T0 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 e colaboradores (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, onde ocorre a degradação de

mRNAs homólogos no citoplasma e do silenciamento transcricional, que está relacionado com o bloqueio da transcrição por um RNA antisense 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 T₀ 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	ZmPstol8.02 Ev.2	0,24
pMCG1005 Ev. 4	0,98	ZmPstol8.02 Ev.3	0,84
pMCG1005 Ev. 5	2,7	ZmPstol8.02 Ev. 5	0,39
pMCG1005 Ev. 6	0,5	ZmPstol8.02 Ev. 6	1
pMCG1005 Ev. 7	1,12	ZmPstol8.02 Ev.7	1,54
pMCG1005 Ev. 9	0,39	ZmPstol8.02 Ev.9	1,37
pMCG1005 Ev. 10	0,45	ZmPstol8.02 Ev.10	0,7
OsPstol1 Ev. 5	0,79	Sb07g002840 Ev.11	4,78
OsPstol1 Ev. 6	1,17	Sb03g031690 Ev.1	0,52
OsPstol1 Ev. 11	1,72	Sb03g031690 Ev.2	0,37
OsPstol1 Ev. 21	0,8	Sb03g031690 Ev.3	0,58
OsPstol1 Ev. 22	0,8	Sb03g031690 Ev.5	0,41
ZmPstol8.05_1 Ev.4	0,44	Sb03g031690 Ev.6	0,4
ZmPstol8.05_1 Ev.8	0,62	Sb03g031690 Ev.7	0,83
ZmPstol8.05_1 Ev.10	0,39	Sb03g031690 Ev.8	0,32
ZmPstol8.05_1 Ev.11	0,32	Sb03g031690 Ev.10	0,42
ZmPstol8.05_1 Ev.13	0,57	Sb03g006765 Ev.5	0,72
ZmPstol8.05_1 Ev.14	0,39	Sb03g006765 Ev.6	0,74
ZmPstol8.05_1 Ev.15	0,39	Sb03g006765 Ev.7	0,96
ZmPstol8.05_1 Ev.16	0,34	Sb03g006765 Ev.12	1
ZmPstol3.06 Ev.1	1,33	Sb03g006765 Ev.13	0,59
ZmPstol3.06 Ev.3	0,4	Sb03g006765 Ev.19	0,69
ZmPstol3.06 Ev.5	1,35	Sb03g006765 Ev.20	0,83
ZmPstol3.06 Ev.6	0,71	Sb03g006765 Ev.21	0,94
ZmPstol3.06 Ev.7	0,55	Sb03g006765 Ev.29	0,8
ZmPstol3.06 Ev.8	0,7	Sb03g006765 Ev.30	0,66

Fonte: dados da pesquisa

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, onde 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

Fonte: dados da pesquisa

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 T₁ de tabaco transgênico para o gene *NptII* mostraram segregação Mendeliana 3:1 em evento com cópia única do transgene, assim como para linhagens T₂ e T₃ desse evento (TIZAOU; 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 T₅ (YONG et al., 2006). A estabilidade, como mostrada nesse estudo, em conjunto com dados de expressão gênica são importantes para evitar o silenciamento gênico e consequentemente a instabilidade da expressão e fenótipo do transgene.

4 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, foi confirmado que o gene *Ax1l* 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 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ em tabaco transgênico.

REFERÊNCIAS

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**, v. 86, n. 19, p. 7500-7504, 1989.

FAGARD, M.; VAUCHERET, H. (Trans) genes silencing in plants: How many mechanisms? **Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.**, v.51, n.1, p. 67-194, 2000.

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**, v. 488, n. 7412, p. 535, 2012.

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**, v. 303, n. 5913, p. 179, 1983.

KOORNNEEF, M.; MEINKE, K. The development of *Arabidopsis* as a model plant. **The Plant Journal**, 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**, v. 101, n. 6, p. 805-814, 2008.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis de relative gene expression data using realtime 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. 58p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São João del-Rei, Sete Lagoas.

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, 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**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NOVÁKOVÁ, S.; MAZÚROVÁ, E.; ČEŘOVSKÁ, N.; ŠUBR, Z. W. Transgenic tobacco plants carrying the non-structural P3 gene of potato virus A. **Biologia plantarum**, 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 **Rapid Cycle Real-time PCR**. Springer, Berlin , Heidelberg, p. 21–34, 2001.

ROGERS, S.G.; HORSCH, R.B.; FRALEY, R. T. Gene transfer in plants: production of transformed plants using Ti plasmid vectors. **Methods Enzymol.** Academic Press, 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**, 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**, 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**, 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**, v. 35, n. 3, p. 640-649, 2012.

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

VENDRUSCOLO, E. C. G. Silenciamento gênico e transgênicos. **Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, 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**, v. 13, n. 20, p. 4729-4736, 1994.

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 Cry1Ie gene with SYBR® Green qRT-PCR. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 51, n. 2, p. 125-134, 2015.