

## CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDEOS CALIBRANTES PARA QUANTIFICAÇÃO DO FEIJÃO EMBRAPA 5.1 POR PCR EM TEMPO REAL

BROD, FCA. 1; DINON, AZ. 2; KOLLING, D. 3; FARIA, JC. 4; ARISI, ACM. 5.

1, 2, 3, 5 Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 4 Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás.

O feijão Embrapa 5.1 é o primeiro organismo geneticamente modificado (OGM) comercial genuinamente brasileiro. Este OGM, desenvolvido pela EMBRAPA e aprovado para comercialização pela CTNBio em 2011, é resistente ao vírus do mosaico dourado, uma das principais causas de perdas na cultura do feijão. Com a introdução deste novo OGM no mercado, métodos adequados para sua detecção e quantificação tornam-se necessários. Há uma orientação mundial quanto à quantificação de organismos geneticamente modificados (OGMs) com base na porcentagem de sequências de DNA GM alvo em relação às sequências de DNA endógeno específico. A fim de atender essa necessidade, preparações sintéticas de DNA, tais como plasmídeos, certificados com base no número de cópias de DNA, podem ser usados como calibrantes para expressar o percentual GM como uma proporção do número de cópias de moléculas GM em relação às moléculas endógenas. O objetivo deste trabalho foi a construção de um plasmídeo calibrante para quantificação do feijão Embrapa 5.1. Primeiramente foram desenhados iniciadores para amplificação por PCR de fragmentos de DNA específicos do feijão Embrapa 5.1 e do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*). Os iniciadores para este último fragmento foram desenhados contendo sítio de restrição para a enzima *NdeI*. Após amplificação estes fragmentos foram clonados, separadamente no vetor de clonagem pGEM-T easy. Após reação de ligação, os plasmídeos foram utilizados para transformação de cepas competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  e os transformantes positivos confirmados por PCR. Os transformantes positivos foram então confirmados através de sequenciamento. Os dois plasmídeos desenvolvidos, pGEM\_p35S e pGEM\_PvSR2, foram utilizados para a construção de um terceiro plasmídeo contendo ambos os fragmentos. Para tanto, ambos os plasmídeos foram incubados na presença da enzima de restrição *NdeI*. A digestão com esta enzima resultou na linearização do plasmídeo pGEM\_p35S e na clivagem de um fragmento de 495 pb do plasmídeo pGEM\_PvSR2, correspondente ao fragmento específico de *Phaseolus vulgaris*. A seguir, o fragmento de 495 pb foi ligado ao pGEM\_p35S e o plasmídeo produto desta ligação foi utilizado na transformação de cepas competentes de bactérias *E. coli* DH5 $\alpha$ . Os transformantes positivos foram confirmados por PCR e análise de restrição e aqueles apresentando o fragmento desejado foram propagados e submetidos a análise por sequenciamento, que confirmou a presença do fragmento de 495 pb. O plasmídeo calibrante desenvolvido no presente trabalho pode ser utilizado para calibração na quantificação do feijão Embrapa 5.1 por PCR em tempo real.

Palavras-chave: OGM, feijão Embrapa 5.1, plasmídeo calibrante, PCR.