

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA MOLECULAR
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

RAÍSSA VOLPATTO MARQUES

MÉTODO DE DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE TRANSGENES INSERIDOS EM
EUCALYPTUS GENETICAMENTE MODIFICADO

Porto Alegre

2015

RAÍSSA VOLPATTO MARQUES

MÉTODO DE DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE TRANSGENES INSERIDOS EM
EUCALYPTUS GENETICAMENTE MODIFICADO

Trabalho de conclusão de curso
submetido à Universidade
Federal do Rio Grande do Sul
como parte dos requisitos
necessários para a obtenção do
Grau de Bacharel em
Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Giancarlo Pasquali

Porto Alegre

2015

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe Irene, pelo amor, incentivo e apoio incondicionais.

Ao meu irmão Marcelo que, como químico, deu-me grande força e incentivo a seguir na área da ciência.

Ao meu orientador, Dr. Giancarlo Pasquali, por todos os ensinamentos e orientações que foram de extrema importância para o desenvolvimento deste trabalho e de minha formação acadêmica.

Agradeço à Dra. Andréia Carina Turchetto Zolet pelas orientações dadas ao longo deste trabalho.

A todos os colegas do Laboratório de Biologia Molecular Vegetal, especialmente Daniel B. Sulis, Patrícia R. D. Picolotto e Thais Lopes pela colaboração, apoio e pelos vários momentos de descontração.

Aos amigos que estiveram ao meu lado durante toda esta jornada, vocês foram essenciais na conclusão desta etapa.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul por proporcionar um ambiente acadêmico de qualidade.

Ao CNPq pelo apoio financeiro recebido.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

RESUMO

Os Organismos Geneticamente Modificados (OGMs) ou transgênicos ganharam destaque mundial em decorrência de suas várias aplicações e benefícios gerados. Plantas GM foram desenvolvidas com características como a maior resistência a doenças e pragas; a maior tolerância a estresses abióticos; o maior incremento de conteúdo nutricional; e, também, no desenvolvimento de produtos como fármacos peptídicos e metabólitos secundários. Nos últimos anos houve um aumento significativo no número de países que adotou o cultivo de plantas GM, chegando, em 2014, a 28 países produtores. As agências reguladoras de plantas transgênicas e de outros OGMs de diversos países, porém, exigem uma série de testes e análises de segurança para que estes organismos sejam liberados para o cultivo e a comercialização. Análises baseadas na detecção e na caracterização do DNA exógeno inserido no genoma das plantas, visando determinar os locais de integração e o número de cópias integradas, fazem parte das típicas exigências destas agências reguladoras. Estes testes são realizados principalmente por técnicas como a hibridização de Southern *blot* e a reação em cadeia da DNA polimerase (PCR). Estes métodos, no entanto, apresentam limitações no seu uso e na qualidade e aproveitamento dos resultados gerados, sendo necessário o desenvolvimento de novas metodologias de análise. Pelo presente trabalho, teve-se por objetivo o desenvolvimento de um novo método de detecção e caracterização de eventos de transformação de plantas GM em substituição às técnicas previamente citadas. A estratégia proposta faz uso dos marcadores moleculares denominados “Polimorfismos de Comprimento de Fragmentos Amplificados” (do inglês, *Amplified Fragment Length Polymorphism* ou AFLP). Para desenvolvimento e teste da nova metodologia, foi realizada a extração de DNA de amostras de folhas de *Eucalyptus* GM e não-GM. Testes qualitativos e quantitativos, atestando a pureza das amostras de DNA, foram realizados a fim de dar continuidade aos experimentos com AFLP. Foram realizados o planejamento e a projeção de *primers* e adaptadores específicos às sequências do DNA exógeno integrado nas plantas. Uma vez estabelecidos todos os materiais e passos necessários para iniciar a técnica de AFLP, a reação de clivagem do DNA genômico e a ligação dos adaptadores aos fragmentos gerados foi cumprida com sucesso e, assim, seguiu-se com as análises via PCR. Para a constatação da eficácia e sucesso da técnica, produtos da PCR foram analisados por eletroforese capilar em um sequenciador de DNA ABI-3500 (Applied Biosystems). Assim, foi possível avaliar o número de fragmentos gerados pelas combinações de 14 diferentes *primers* testados. A combinação do *primer* MseI-AG gerou um número maior de fragmentos e, desta forma, foi

escolhido para as análises iniciais. Pela comparação dos fragmentos obtidos de mais de uma amostra de DNA, pode-se fazer uma correlação entre a ausência e a presença dos picos gerados. Assim, os fragmentos que se mostrarem exclusivos nas amostras, isto é, presentes ou ausentes, indicarão os possíveis transgenes inseridos no genoma de *Eucalyptus*. Foi possível obter uma variedade de tamanhos de fragmentos pelo *primer* MseI-AG. Os fragmentos de 79, 100 e 378 pares de bases foram detectados em amostras únicas de *Eucalyptus*, sendo específicos para cada amostra avaliada. Por serem exclusivos de cada amostra, esses fragmentos possivelmente indicam ser originados dos transgenes inseridos no genoma de *Eucalyptus* GM. Estes estudos ainda são preliminares e devem ser realizados na presença de uma amostra controle (*Eucalyptus* não-GM), que se conheça os tamanhos de fragmentos, para a correta detecção dos fragmentos gerados por *Eucalyptus* GM. Logo, para o melhor aperfeiçoamento da nova tecnologia proposta, um maior número de amostras de plantas GM e não-GM serão analisadas.

Palavras-chave: OGMs; plantas transgênicas; detecção de transgenes; eucaliptos; AFLP; marcadores moleculares.

ABSTRACT

Genetically Modified Organisms (GMOs) or transgenics gained worldwide prominence due to their many applications and benefits. GM plants were generated in order to improve their resistance to diseases and pests; to improve their tolerance to abiotic stresses; to increase their nutritional content; and also to develop products such as peptide drugs and secondary metabolites. In the last years, a significant increase in the number of countries that adopted the cultivation of GM crops has happened, with 28 countries producing GM crops in 2014. The regulatory agencies of transgenic plants and other GMOs in many countries however require a series of tests and safety analyzes prior to planting and commercializing them. Analyses based on the detection and characterization of inserted DNA into plant genomes are among the typical results requested by those agencies in order to define the places and the number of integrated copies. These tests are mainly performed by Southern blot hybridization and polymerase chain reaction (PCR) techniques. These methods however have limitations on their use and interpretation of obtained results, requiring the development of new methods of analysis. The present work was conceived with the aim to present a new method of detection and characterization of GM plant transformation events in substitution of the previously referred techniques. The proposed strategy was carried out with the use of a molecular marker technic called "Amplified Fragment Length Polymorphism" (AFLP). In order to develop and test it, genomic DNA was extracted from leaves of GM and non-GM *Eucalyptus*. Qualitative and quantitative tests were performed to assess the purity of DNA samples to continue the experiments with AFLP. Planning and design of primers and specific adapters to transgene sequences were performed. When all materials and steps necessary to begin the AFLP technique were established, reactions of genomic DNA restriction and ligation were successfully accomplished followed by PCR analyses. For verification of the effectiveness and success of the technique, PCR products were analyzed by capillary electrophoresis in an ABI-3500 DNA sequencer (Applied Biosystems). Thus, it was possible to evaluate the number of fragments generated by the 14 different tested primer combinations. The primer combination MseI-AG generated a greater number of fragments and therefore, was chosen for initial analysis. By comparing the fragments obtained from more than one DNA sample, it is possible to make a correlation between the absence and presence of the peaks generated. The fragments show specific outcomes in each sample, i. e, present or absent, and will indicate the possible inserted transgenes into the plant genome. Therefore, it was possible to obtain a variety of fragment sizes by MseI-AG primer. The fragments of 79, 100 and 378 base pairs

were detected in unique *Eucalyptus* samples, being specific for each sample evaluated. For being unique in each sample, these fragments possibly indicate to have originated from the transgene inserted into the *Eucalyptus* genome. These studies are still preliminary, and should be performed in the presence of a control sample (non-GM *Eucalyptus*) in which the sizes of the fragments generated are known for the correct comparison of the unique fragments of *Eucalyptus* GM. A larger number of samples of GM and non-GM plants will be analyzed for the improvement of the new proposed technology.

Keywords: GMO; transgenic plants; transgene detection; eucalypts; AFLP; molecular markers

Lista de Figuras

Figura 1. Representação dos elementos fundamentais em um cassete de expressão gênica....	11
Figura 2. Transformação de plantas via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	16
Figura 3. Principais passos da técnica de AFLP.....	22
Figura 4. Representação de um típico eletroferograma obtido através da técnica de AFLP....	27
Figura 5. Imagem do gel resultante da eletroforese dos produtos da extração de DNA submetidos ao tratamento com RNase A.....	28
Figura 6. Passos da metodologia proposta de AFLP	31
Figura 7. Imagem dos géis resultantes da eletroforese dos produtos da reação de clivagem e ligação do DNA genômico de folhas de <i>Eucalyptus</i>	32
Figura 8. Padrão de tamanho molecular <i>GeneScan 500 (-250) Liz</i>	34
Figura 9. Exemplo de padrão de tamanho molecular (<i>GeneScan 500 (-250) Liz</i>) de baixa qualidade.....	35
Figura 10. Eletroferogramas obtidos através da técnica de AFLP pela combinação do <i>primer MseI-AG</i>	37
Figura 11. Exemplos de eletroferogramas obtidos através do uso da técnica de AFLP.....	41

Lista de Tabelas

Tabela 1. Parâmetros observados na quantificação das amostras de DNA extraídas.....	29
Tabela 2. Sequência do sítio de restrição da enzima MseI e dos <i>primers</i> para a formação dos adaptadores usados na análise de AFLP.....	30
Tabela 3. Sequência dos <i>primers</i> para amplificação seletiva de fragmentos de DNA genômico gerados pela enzima MseI	33
Tabela 4. Componentes da PCR para um volume total de 6 µL.....	33
Tabela 5. Programa para amplificação dos produtos da reação de restrição e ligação.....	34
Tabela 6. Número de fragmentos obtidos em cada combinação de <i>primers</i> para cada amostra de <i>Eucalyptus</i>	36
Tabela 7. Matriz de ausência ou presença dos fragmentos de AFLP gerados pelo <i>primer</i> MseI-AG	37

Lista de Abreviaturas e Siglas

AFLP	Polimorfismos de Comprimento (ou Tamanho) de Fragmentos Amplificados, do inglês, <i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
CTNBio	Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês, <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTP(s)	Desoxirribonucleosídeo(s) trifosfatado(s)
EG	Engenharia Genética
EtBr	Brometo de etídio, do inglês, <i>ethidium bromide</i>
EUA	Estados Unidos da América
h	Hora
ha	Hectare
ISAAA	<i>International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications</i>
IBÁ	Indústria Brasileira de Árvores
LB	Borda esquerda do T-DNA, do inglês, <i>T-DNA Left Border</i>
m ³	Metro cúbico
min	Minuto
nm	Nanômetro
NPTII	Neomicina fosfotransferase II, do inglês, <i>neomycin phosphotransferase II</i>
OGMs	Organismos Geneticamente Modificados
pb	Par(es) de bases
qPCR	PCR quantitativa ou em Tempo Real
PCR	Reação em cadeia da DNA polimerase, do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i>
RB	Borda direita do T-DNA, do inglês, <i>T-DNA Right Border</i>
RFU	Unidade relativa de fluorescência, do inglês, <i>Relative Fluorescent Units</i>
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês, <i>Ribonucleic Acid</i>

s	Segundo
Ti	Plasmídeo indutor de tumor, do inglês, <i>Tumor inducing plasmid</i>
T-DNA	DNA de transferência, do inglês, <i>Transfer DNA</i>
V	Volt(s)
<i>vir</i>	Genes de virulência

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 Organismos Geneticamente Modificados.....	10
1.2 Plantas Transgênicas.....	11
1.3 O Gênero <i>Eucalyptus</i>	13
1.4 Métodos de Transformação Genética de Plantas.....	14
1.4.1 Transformação Genética Mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	15
1.4.2 Biobalística	17
1.5 Métodos de Detecção e Identificação de Plantas Transgênicas	17
1.6 Técnica de AFLP	20
2 JUSTIFICATIVA	23
3 OBJETIVOS	24
3.1 Objetivo Geral	24
3.2 Objetivos Específicos	24
4 MATERIAS E MÉTODOS.....	25
4.1 Material Vegetal	25
4.2 Extração de DNA.....	25
4.3 Quantificação de DNA	25
4.4 Desenvolvimento das análises por AFLP	26
4.5 Eletroforese Capilar	26

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
5.1 Extração e Purificação de DNA.....	28
5.2 Quantificação de DNA	29
5.3 Análise por AFLP	30
5.3.1 Preparo dos adaptadores	30
5.3.2 Digestão do DNA e ligação dos adaptadores	30
5.3.4 PCR.....	32
5.4 Análises Preliminares dos dados de AFLP	34
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	42
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1 INTRODUÇÃO

1.1 Organismos Geneticamente Modificados

Os organismos geneticamente modificados (OGMs) são animais, vegetais ou microrganismos que tiveram seu material genético alterado por meio de técnicas de engenharia genética (EG). Em 1973, um grupo de cientistas liderados por Cohen e Boyer desenvolveu a tecnologia do DNA recombinante, pela qual o material genético dos organismos pode ser manipulado e transferido para diferentes espécies (COHEN *et al.*, 1973). Assim, com o surgimento e o aperfeiçoamento das técnicas de biologia molecular que fundamentam a EG, foi possível gerar organismos contendo genes exógenos (transgenes) inseridos no genoma, conferindo nova característica de interesse. Os organismos modificados por EG são conhecidos popularmente como transgênicos ou recombinantes.

A modificação por EG ocorre pela inserção de um ou mais genes no genoma de um organismo podendo ser provenientes de espécies filogeneticamente distantes ou, ainda, pela inativação de genes endógenos. O gene de interesse é inserido na presença de outros elementos gênicos gerando o que chamamos de cassete de expressão. Esta construção gênica é composta tipicamente por três elementos: o promotor, sequência importante para o início da transcrição do gene; o gene de interesse, que codifica um RNA para a característica desejável; e o terminador, responsável pelo término da transcrição. Além destes três elementos fundamentais, uma marca de seleção ou gene marcador, isto é, um gene codificador de proteína capaz de conferir a resistência a algum agente seletivo como antibióticos e herbicidas, é inserida para diferenciar e isolar os organismos transformados dos não transformados (Figura 1). Outros elementos também podem ser introduzidos a fim de se obter uma melhor regulação, estabilização e expressão do inserto gênico (DE ANDRADE, 2003; POWELL *et al.*, 2015). A metodologia de inserção do cassete de expressão em um local específico do genoma é denominada de transformação genética, transgenia, transgênese ou transgeniense, sendo que cada organismo resultante é chamado de evento de transformação.

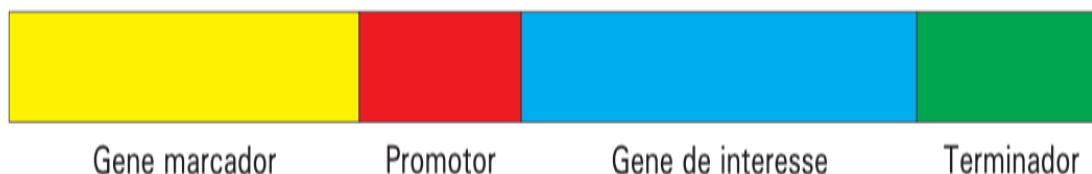


Figura 1. Representação dos elementos fundamentais em um cassete de expressão gênica. (Fonte: DE ANDRADE, 2003)

Variedades de organismos como plantas, animais e microrganismos foram modificados por EG a fim de se obter diversos produtos. Alguns exemplos são fármacos, vacinas, microrganismos fermentadores, animais e plantas mais resistentes a doenças e pragas e plantas mais tolerantes a estresses abióticos, além de incrementos das qualidades agronômica e/ou nutricional (AHMAD *et al.*, 2012; SARMIDI *et al.*, 2012).

1.2 Plantas Transgênicas

Em 1983, quatro grupos de pesquisadores desenvolveram as primeiras plantas transgênicas; três grupos foram responsáveis por inserirem genes de bactéria em plantas de tabaco e petúnia e o quarto grupo por introduzir um gene de feijão em girassol (BEVAN *et al.*, 1983; FRALEY *et al.*, 1983; HERRERA-ESTRELLA *et al.*, 1983; MURAI *et al.*, 1983). Desde então, uma série de plantas GM foi desenvolvida a fim de atender e melhorar necessidades agrícolas, ambientais, nutricionais e econômicas pelo mundo (QAIM, 2009).

Muitas plantas GM foram desenvolvidas com a inserção de genes que conferem tolerância a herbicidas, ao frio, à falta de água, à presença de metais tóxicos no solo; resistência a doenças e pragas; ou para a obtenção de um produto final de alto valor agregado como fármacos peptídicos e metabólitos secundários de interesse farmacêutico (AHMAD *et al.* 2010; BITA *et al.* 2013; GIDDINGS *et al.*, 2000; MONQUERO, 2005; SHELTON *et al.*, 2002). Plantas transgênicas foram também produzidas visando o enriquecimento nutricional, o aumento da durabilidade de frutas e de maior produtividade (BEYER, 2010; KEY *et al.*, 2008; KLEE *et al.*, 2011; QAIM 2010). Em virtude da menor complexidade de cultivo e, muitas vezes, dos menores custos de produção pela menor necessidade de defensivos agrícolas, cada vez mais agricultores adquirem sementes transgênicas (JAMES, 2014).

No início da década de 1990, a China foi o primeiro país a consumir e comercializar culturas transgênicas de tabaco e de tomate resistentes a vírus. Em seguida, os EUA liberaram a comercialização do tomate longa vida (*Flavr SavrTM*) da empresa Calgene. Com o início da liberação e da comercialização de plantas transgênicas, outros países começaram a plantar diferentes culturas como tabaco, algodão, soja, milho, canola, tomate e batata chegando, em 1996, a quase 2,8 milhões de hectares (ha) plantados (JAMES, 1997).

Desde 1996, houve um aumento de mais de 100 vezes sobre a área plantada com culturas transgênicas no mundo. Em 2014, um aumento de 1,7 milhões de ha para 181,5 milhões foi obtido, o que mostra cada vez mais a utilização de culturas transgênicas no mundo todo. Dados de 2014 revelam que 28 países plantam transgênicos, sendo os EUA o primeiro na lista, com 73,1 milhões de ha plantados com suas principais culturas de milho, soja, algodão, canola, beterraba, alfafa, mamão e abóbora. O Brasil fica em segundo lugar na lista com 42,2 milhões de ha, sendo suas principais culturas as de soja, milho e algodão (JAMES, 2014). Em 2013, cerca de 87% da área plantada no Brasil correspondia a soja, milho e algodão transgênicos de acordo com o *International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications* (ISAAA; JAMES, 2014). Além dessas culturas de grande extensão, a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), agência técnica reguladora de OGMs no Brasil e vinculada ao Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, também aprovou a liberação para plantio comercial de feijoeiro GM resistente ao vírus-do-mosaico-dourado e, em abril de 2015, do primeiro *Eucalyptus* transgênico do mundo com a característica de maior rendimento em celulose (CTNBio, 2014).

1.3 O Gênero *Eucalyptus*

As árvores do gênero *Eucalyptus* são nativas da Austrália, do Timor e da Indonésia, sendo exóticas no resto do mundo. O gênero inclui mais de 800 espécies e milhares de híbridos. No Brasil, o plantio de *Eucalyptus* começou no século XIX, quando as primeiras mudas chegaram ao Rio Grande do Sul. Atualmente, as principais espécies plantadas no Brasil são *E. grandis*, *E. camaldulensis*, *E. saligna* e *E. urophylla* e *E. dunnii*, entre outras. Além destas espécies puras, também foi realizado o cruzamento para a geração de híbridos, como é o caso do “*Eucalyptus urograndis*” (*E. urophylla* x *E. grandis*; LERAYER, 2009).

O plantio de *Eucalyptus* no Brasil e no resto do mundo é extremamente importante devido às suas inúmeras aplicações e utilizações. As toras de eucalipto tem sido empregadas principalmente na produção de celulose para a fabricação de papel, para o uso de madeira sólida na construção civil (estacaria) e postes, na indústria moveleira, na produção de madeira industrializada (MDP, MDF, HDF, OSB, compensados e aglomerados) e na obtenção de lenha e carvão vegetal para geração de energia térmica e elétrica (MORA, 2000).

De acordo com o relatório de 2015 publicado pela Indústria Brasileira de Árvores (IBÁ), o setor florestal brasileiro é líder global em produtividade. Em 2014, a produtividade média dos plantios brasileiros de *Eucalyptus* atingiu 39 m³/ha.ano e representa cerca de 71,9 % do total da área de árvores plantadas no Brasil, ocupando 5,56 milhões de ha. As plantações de *Eucalyptus* concentram-se principalmente nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Mato Grosso do Sul (IBÁ, 2015).

Devido à relevância econômica e social das árvores de *Eucalyptus*, estratégias de melhoramento genético tem sido empregadas para a geração de plantas ainda mais produtivas. No entanto, o melhoramento convencional dessas espécies apresenta algumas limitações como é o caso da incompatibilidade sexual, da redução do *pool* gênico e o ciclo de vida longo, tornando este processo de cruzamentos e seleção bastante demorado. Assim, a transformação genética mostra-se como uma grande aliada na obtenção de árvores com características gênicas de interesse. Árvores GM podem ser criadas para uma melhor qualidade da madeira, na redução de produtos químicos necessários para a extração de celulose, na geração de árvores mais resistentes e adaptadas, dentre outros. Estas características podem levar a um aumento considerável na produção e, também, na redução do impacto ambiental do processamento industrial (SARTORETTO *et al.*, 2008).

Conforme anteriormente referido, em abril de 2015 foi aprovada pela CTNBio a liberação comercial da primeira árvore de *Eucalyptus* GM. Esta árvore GM foi desenvolvida pela empresa FuturaGene, subsidiária da Suzano Papel & Celulose. As árvores GM aprovadas para plantio comercial são derivadas do evento H421 do híbrido *E. grandis* x *E. urophylla*. Estas árvores GM expressam duas proteínas recombinantes, a proteína Cell e NPTII. A proteína Cell, cujo gene codificador é proveniente de *Arabidopsis thaliana*, é uma enzima β -endoglicanase que promove o relaxamento da parede celular permitindo maior acúmulo de celulose e, por conseguinte, maior rendimento neste polímero; já a proteína NPTII ou neomicina fosfotransferase II (do inglês, *neomycin phosphotransferase II*) confere resistência a antibióticos aminoglicosilados como neomicina e derivados (canamicina, paromomicina, gentamicina), necessários para a seleção das plantas transformadas (CTNBio, 2014).

1.4 Métodos de Transformação Genética de Plantas

A introdução controlada de um ou mais transgenes no genoma de um organismo é obtida por meio de técnicas de transformação genética. Vários métodos usados para a transformação de plantas tem sido desenvolvidos e utilizados. Estes métodos dividem-se em métodos diretos e indiretos de transformação, de acordo com a forma pela qual o inserto gênico é transferido para as células do organismo. A eficiência na transferência gênica depende não apenas do método de transformação escolhido mas, também, de técnicas de cultura de tecidos para a seleção e a regeneração das plantas transformadas (SARTORETTO *et al.*, 2008).

Os métodos indiretos de transformação são aqueles que utilizam um vetor biológico para a transferência do DNA exógeno para o genoma da planta. A bactéria *Agrobacterium tumefaciens* é o vetor mais utilizado para a transformação de plantas, embora *A. rhizogenes* e alguns tipos de vírus também sejam vetores. Os métodos diretos de transformação são baseados em métodos físicos e químicos a fim de alterar a estrutura da parede e da membrana celular possibilitando a introdução do DNA exógeno nas células. Alguns dos principais métodos diretos de transformação são o bombardeamento de partículas (biolística ou biobalística) e a eletroporação (SLATER *et al.*, 2008). Destacadamente, a transformação mediada por agrobactérias é a de maior sucesso e emprego mundial, tanto na pesquisa como

na geração de plantas GM de interesse comercial. Em segundo lugar, a biobalística é o método mais empregado.

1.4.1 Transformação Genética Mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens pertencente à família Rhizobiaceae, é uma bactéria Gram-negativa encontrada no solo e é o agente etiológico da doença conhecida como galha-da-coroa ou coroa-da-galha (do inglês, *crown gall disease*). O principal sintoma desta doença é a formação de tumores na coroa (junção entre caule e raiz), afetando muitas plantas de interesse econômico e agrícola tais como videiras, nogueiras, macieiras e roseiras (NESTER, 2015). A infecção por *A. tumefaciens* tem início quando a planta sofre algum ferimento ou dano e a bactéria, então, é atraída para o local da infecção pela liberação de moléculas de açúcar e fenol pela planta (SUBRAMONI *et al.*, 2014). A bactéria tem seus genes de virulência – genes *vir* – ativados, os quais são responsáveis por codificar proteínas que transferem e integram parte do material genético bacteriano na planta. A formação dos tumores ocorre devido à presença de genes na região de transferência (região T ou T-DNA, do inglês, *T region* ou *transfer DNA*) do plasmídeo “indutor de tumor” (Ti, do inglês, *tumor inducing*) da bactéria. Assim, ocorre a transferência e a integração do T-DNA do plasmídeo Ti no genoma da planta hospedeira (Figura 2). O T-DNA é delimitado pela presença de sequências repetidas nas bordas esquerda e direita e, entre as bordas, está localizado um conjunto de oncogenes que codificam enzimas para a síntese de hormônios vegetais como auxinas e citocininas, e para a síntese de metabólitos nutritivos para as bactérias como opinas e agropinas. Os hormônios vegetais são responsáveis pela proliferação celular e a formação do tumor e os metabólitos são fontes de carbono e energia usados por *A. tumefaciens* (PERMYAKOVA *et al.*, 2009; TZFIRA *et al.*, 2006).

Em 1982, foi observado que a transferência do T-DNA para o genoma da planta hospedeira é possível devido às regiões de 25 pares de base (pb) localizadas nas extremidades esquerda (LB, do inglês, *Left Border*) e direita (RB, do inglês, *Right Border*) do T-DNA (YADAV *et al.*, 1982). Assim, os oncogenes podem ser removidos do plasmídeo Ti sem afetar o mecanismo de transferência e integração do T-DNA, transformando o plasmídeo Ti em um vetor natural para transformação (ZAMBRYSKI *et al.*, 1983). As linhagens de *A. tumefaciens* que não contêm os oncogenes são incapazes de produzir tumores e são

denominadas linhagens desarmadas de *Agrobacterium* como, por exemplo, LBA4404 (OOMS *et al.*, 1982), EHA101 (HOOD *et al.*, 1986) e EHA105 (HOOD *et al.*, 1993). A região *vir*, por ser indispensável para a transferência do T-DNA, foi mantida nas linhagens desarmadas (BRASILEIRO *et al.*, 2000). Além destas alterações no plasmídeo Ti, foi observado que a região do T-DNA e a região *vir* podem ser separadas em plasmídeos distintos sem a perda de eficiência da transferência do T-DNA. Deste modo, foi possível criar um sistema binário de transformação, o qual consiste de um plasmídeo Ti contendo a região *vir* e um segundo plasmídeo (binário), incluindo as extremidades LB e RB do T-DNA. Como consequência, é possível inserir sequências gênicas que se deseja transferir para o genoma das plantas entre as extremidades do T-DNA (BRASILEIRO *et al.*, 2000).

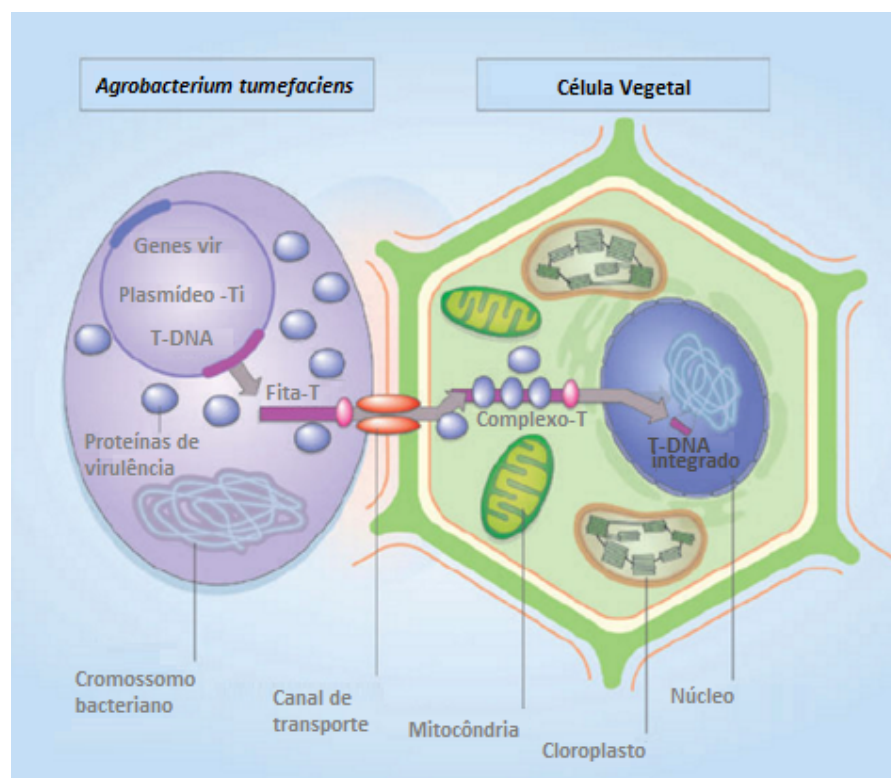


Figura 2. Transformação de plantas via *Agrobacterium tumefaciens*. O plasmídeo Ti de *A. tumefaciens* contém os genes *vir* e o T-DNA. Quando a planta sofre algum dano, são liberados compostos que induzem a expressão dos genes *vir*. As proteínas Vir codificadas atuam na transferência da região ou fita T através de um canal de transporte para a célula vegetal. Dentro da célula, as proteínas Vir interagem com o T-DNA para a sua integração no genoma da planta. [Adaptado de GELVIN (2005)]

A capacidade intrínseca de *A. tumefaciens* em transferir seu material genético para as plantas foi amplamente estudada e empregada na geração de OGMs dando origem a uma nova era na agricultura e na biologia molecular (BARTON *et al.*, 1983). Assim, o método de transformação genético via *A. tumefaciens* já possibilitou a geração de plantas (HUANG *et al.*, 2015), fungos (KELLNER *et al.*, 2005), algas (KUMAR *et al.*, 2004) e até mesmo de

células humanas modificadas geneticamente (KUNIK *et al.*, 2001). O método de transformação via *A. tumefaciens* é um dos mais utilizados para a transformação genética em plantas e tem como vantagem a baixa indução de rearranjos gênicos e baixo número de cópias dos transgenes inseridos no genoma (tipicamente uma cópia), comparado aos métodos diretos de transformação (SLATER *et al.*, 2008). O local de integração no genoma, no entanto, não é determinável ou previsível e, não raro, múltiplas cópias do T-DNA são integradas nos genomas.

1.4.2 Biobalística

Em 1987, foi demonstrado que moléculas de DNA ligadas a micropartículas de ouro ou tungstênio podiam ser diretamente entregues às células vegetais por aceleração em alta velocidade. Esta técnica ficou conhecida pelo nome de biobalística ou bombardeamento de partículas (KLEIN *et al.*, 1987). As micropartículas metálicas empregadas não devem ser tóxicas ou reativas e precisam ter diâmetros muito menores do que o da célula-alvo. O DNA é precipitado sobre as micropartículas e é liberado gradualmente na célula após o bombardeamento. O bombardeamento é realizado por um equipamento que produz uma força propulsora usando gás hélio, eletricidade, pressão d'água ou pólvora para acelerar as micropartículas. Os dois equipamentos disponíveis e mais usados atualmente são o *Accell Gene Gun* (Agracetus) e o *Helios Gene Gun* (BioRad Laboratories; MEHIER-HUMBERT *et al.*, 2005).

A principal vantagem do método de biobalística é a não dependência de um vetor biológico para a transferência do DNA exógeno, evitando problemas de não compatibilidade entre a bactéria (ou vírus) e a planta a ser transformada. Porém, como limitação do método, o DNA inserido na célula tende a resultar em rearranjos ou em sequências de DNA truncadas e, também, em um alto número de cópias integradas no genoma, podendo causar o silenciamento do gene de interesse (BARAMPURAM *et al.*, 2011; NEWELL, 2000).

1.5 Métodos de Detecção e Identificação de Plantas Transgênicas

Uma série de testes e análises, definidas por legislações nacionais e internacionais, devem ser realizadas para certificar a segurança dos OGMs ao ser humano, aos animais e ao

meio ambiente (SPARROW, 2010). Em relação às plantas transgênicas, ensaios para detectar os transgenes, caracterizar o número de cópias integradas e os locais de inserção no genoma são de extrema importância para a caracterização individual das linhagens transgênicas, isto é, dos eventos de transformação. A partir destas informações, é possível certificar se um indivíduo é ou não transgênico, estimar quantas cópias do(s) transgene(s) foram integradas no genoma e distinguir um evento recombinante de outro. Tais informações permitem também estimar ou questionar o efeito do transgene sobre outros genes próximos em virtude do local de integração no genoma.

As metodologias empregadas para a caracterização molecular de plantas transgênicas baseiam-se na detecção de DNA, RNA ou proteína. Embora sejam relevantes para acessar a funcionalidade do gene e o grau de expressão gênica, os métodos baseados na detecção da proteína ou do RNA identificam apenas os produtos gênicos, sem qualquer informação a respeito do local e do número de cópias inseridas no organismo. Assim, os métodos baseados na detecção do DNA exógeno são mais diretos e comumente usados para a caracterização de plantas GM (MIRAGLIA *et al.*, 2004). Os ensaios atualmente utilizados na detecção de transgenes são limitados a técnicas de hibridização de Southern *blot* e em PCR e suas variações que incluem a *nested-PCR*, a *multiplex PCR* e a PCR em tempo real ou quantitativa (qPCR; KOK *et al.*, 2002). Existem ainda outros métodos alternativos para a análise de OGMs como a cromatografia e a espectrometria de massas, os microarranjos de DNA, a espectrometria no infravermelho próximo, dentre outros (MICHELINI *et al.*, 2008; QUERCI *et al.*, 2010; VON *et al.*, 2010; CONCEIÇÃO *et al.*, 2006). Dentre elas, a hibridização de Southern *blot* é a “técnica-ouro” para a identificação, distinção e determinação do número de cópias do transgene integradas no genoma.

A técnica de Southern *blot* pode ser empregada na análise de plantas, animais e microrganismos GM (BROWN, 2001). O método consiste basicamente da digestão do DNA genômico por enzima de restrição; a separação dos fragmentos gerados por eletroforese em gel de agarose; a fixação das amostras de DNA isoladas em membranas de *nylon* ou nitrocelulose por Southern *blot*, propriamente dito; e posterior hibridização de uma sonda de DNA que possua homologia de sequência nucleotídica com a sequência de interesse. A visualização de bandas de hibridização é possível pelo uso de sondas radioativas, isto é, marcadas com α -³²P-dNTP ou α -³⁵S-dNTP ou de enzimas covalentemente acopladas às sondas como a fosfatase alcalina ou a peroxidase. Por meio de autorradiografias ou colorimetria, é possível visualizar as bandas geradas pela hibridização utilizando-se filme

autorradiográfico (filme de raio-X) ou ensaios enzimáticos com substratos fluorescentes ou colorimétricos gerados pelas enzimas ligadas. O número de bandas permitirá estimar o número de cópias do inserto gênico inseridos no genoma e também possibilitará diferenciar os eventos de transformação (BROWN, 2001). A técnica, apesar de efetiva e altamente sensível, apresenta algumas limitações devido a necessidade do uso de material radioativo, fluorescente ou quimioluminescente. Os radioisótopos dificilmente são disponibilizados aos laboratórios brasileiros em tempo hábil de se executar os ensaios por problemas de logística e burocracia. Tipicamente, radioisótopos são recebidos nos laboratórios com sua atividade máxima já comprometida, isto é, com tempos de meia-vida ultrapassado. Adicionalmente, as atividades de pesquisa com radioisótopos requerem treinamento e cuidados específicos legitimamente exigidos pela Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN/MCTI) por se tratarem de agentes de risco à saúde e necessitarem material apropriado de embalagem e tempo de armazenamento para decaimento radioativo. A técnica de hibridização de Southern *blot* não-radioativa, como os métodos fluorescentes e quimioluminescentes, não apresentam resultados satisfatórios tão bons quanto aqueles usando sondas radioativas. Tais métodos são 25 vezes menos sensíveis e, portanto, de baixa sensibilidade e efetividade para genomas grandes e complexos como os de vegetais (OSBORN, 2000).

A metodologia baseada em PCR consiste na amplificação de sequências específicas de DNA pelo uso de *primers* (DNA iniciadores) seletivos. Algumas variações da técnica como na *multiplex* PCR, utiliza combinações de pares de *primers* diferentes, capazes de permitir a detecção de mais de um inserto gênico no mesmo organismo (RANDHAWA *et al.*, 2010). Já na *nested* PCR, um conjunto de *primers* permite amplificar uma região conhecida do genoma de forma abrangente e o produto desta PCR é novamente amplificado por um segundo par de *primers* específico às regiões do interior do produto da primeira amplificação, aumentando a sensibilidade da técnica (BROD *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2007). No entanto, a qPCR é uma das técnicas mais eficazes na detecção e, também, na quantificação de cópias do transgene integradas no genoma (MASON *et al.*, 2002). A qPCR, no entanto, não permite diferenciar eventos de transformação obtidos com o mesmo transgene. Originalmente desenvolvida para aperfeiçoar a PCR convencional, a qPCR é monitorada enquanto a reação de amplificação está em andamento. Assim, é possível determinar a velocidade de concentração dos produtos da amplificação durante a fase exponencial da PCR, permitindo estimar a quantidade inicial do DNA amplificado (HIGUCHI *et al.*, 1993). Atualmente, o sistema qPCR é baseado no uso de sondas de hibridização específica (metodologia

*TaqMan*TM) ou fluorocromos genéricos intercalados na dupla fita de DNA (metodologia *SYBRgreen*; VALASEK *et al.*, 2005).

A PCR e suas variações são empregadas como excepcional método para a detecção de transgenes no intuito de suprir alguns fatores limitantes da técnica de Southern *blot*, caracterizando-se como rápida, eficiente, de alta sensibilidade e reprodutibilidade (INGHAM *et al.*, 2001; GACHON *et al.*, 2004; KAMLE *et al.*, 2013). Como afirmado anteriormente, embora seja possível determinar-se o número de cópias integradas nos genomas, eventos com cópias integradas em locais distintos não são distinguíveis.

Finalmente, na era do sequenciamento de última geração ou *deep-sequencing*, empregando-se tecnologia como 454, *Illumina* e *IonTorrent*, poder-se-ia sugerir o sequenciamento integral do genoma dos OGMs de interesse de forma a ter todas as respostas necessárias, isto é, (i) confirmação do estado transgênico; (ii) diferenciação de eventos de transformação; e (iii) determinação do número de cópias integradas. Adicionalmente, o sequenciamento integral dos genomas permitiria a identificação do local ou locais de integração. Nenhum outro método permite obter esta informação. Embora algumas empresas empreguem métodos de *deep sequencing* para atender a estas exigências de caracterização de OGMs, o custo ainda é muito elevado, especialmente considerando que muitos eventos de transformação são gerados a cada ensaio de transgenia e muitos indivíduos GM devem ser caracterizados ao longo de gerações.

1.6 Técnica de AFLP

A técnica de “Polimorfismos de Comprimento de Fragmentos Amplificados” ou AFLP (do inglês, *Amplified Fragment Length Polymorphism*), descrita por Vos *et al.* (1995), é muito empregada na obtenção de grande número de marcadores moleculares distribuídos em genomas de vários organismos como plantas, animais, fungos e bactérias (MEUDT *et al.*, 2007). É uma técnica altamente reprodutiva que combina a digestão do DNA genômico com a amplificação seletiva via PCR (ARIF *et al.*, 2010). A técnica tem sido empregada no estabelecimento de mapas genéticos, na caracterização de DNA por *fingerprinting* (KONOWALIK *et al.*, 2015), na determinação de parentesco entre cultivares e de inúmeros estudos de diversidade genética e filogenética (AMMAR *et al.*, 2015).

A técnica de AFLP consiste nas seguintes etapas: (1) clivagem total do DNA genômico por duas enzimas de restrição, uma de corte raro (6 a 8 pares de bases) como EcoRI, e outra de corte frequente como MseI (4 pares de bases); (2) ligação de adaptadores específicos aos fragmentos gerados pela clivagem do DNA; (3) amplificação pressetiva de uma fração dos fragmentos gerados via PCR pelo uso de *primers*, com nenhuma ou apenas uma base seletiva, projetados especificamente para reconhecer sequências nos adaptadores; (4) segunda amplificação seletiva, isto é, com *primers* marcados por radioisótopos ou fluorescência com três bases seletivas; (5) a seguir, os fragmentos amplificados são separados em gel de alta resolução ou são analisados por equipamento de eletroforese capilar como sequenciadores automáticos de DNA (Figura 3; ARIF *et al.*, 2010; VOS *et al.* 1995). O uso de sequenciadores para as análises de AFLP apresenta inúmeras vantagens comparadas à eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida. O tempo para a obtenção dos resultados é menor, além de ser uma análise mais eficiente e precisa para a separação e a identificação dos fragmentos de DNA (ABRAHÃO, 2008).

Os marcadores do tipo AFLP caracterizam-se por serem dominantes, altamente polimórficos e reprodutíveis, não sendo necessário o conhecimento prévio sobre o genoma a ser analisado (FALEIRO *et al.*, 2007; MEUDT *et al.*, 2007). Além disto, é uma técnica rápida, prática, altamente específica e de alta resolução devido à combinação da análise de PCR com a utilização de enzimas de restrição para a clivagem do DNA genômico (KUMAR *et al.*, 2013). Por apresentar estas vantagens, a técnica de AFLP pode ser empregada e direcionada para caracterização de DNA. Tipicamente, os AFLPs não são direcionados a locais específicos do genoma e, sim, aleatórios. Porém, se *primers* e adaptadores forem projetados para locais específicos do genoma, a técnica de AFLP pode ser um método inovador para a detecção e a caracterização de transgenes inseridos em plantas GM. Até o presente momento, não encontramos na bibliografia científica disponível o emprego de AFLP para identificar e caracterizar eventos GM a qualquer classe de organismo.

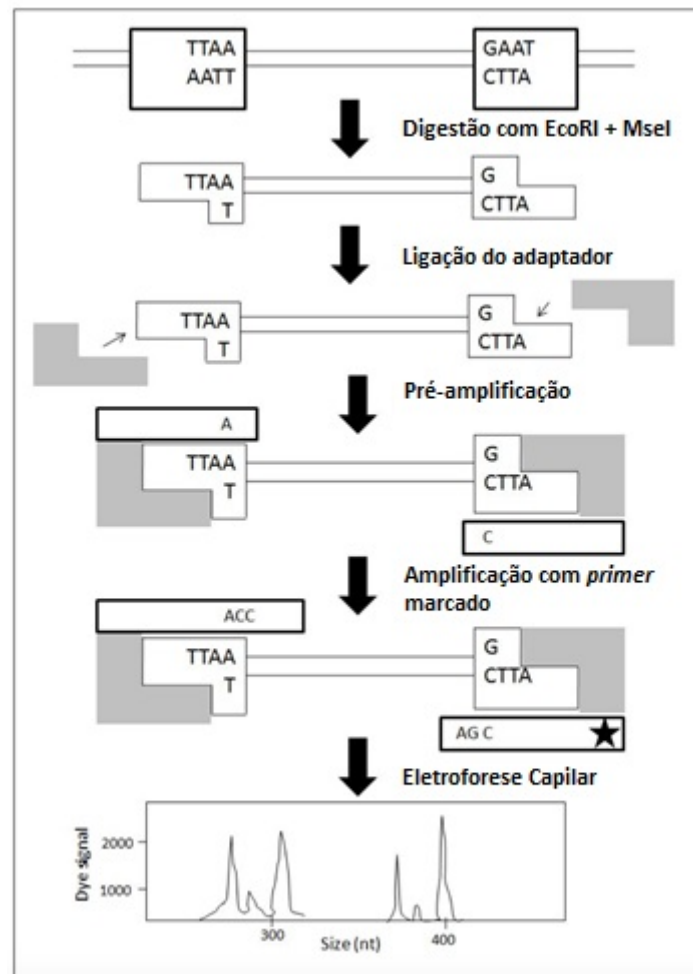


Figura 3. Principais passos da técnica de AFLP. A técnica de AFLP baseia-se na digestão de DNA e na amplificação seletiva por PCR dos fragmentos gerados. A técnica consiste em (1) extração do DNA e digestão com enzimas de restrição (geralmente EcoRI + MseI); (2) ligação dos adaptadores de DNA; (3) pré-PCR, realizando-se a amplificação dos fragmentos de restrição; amplificação preseletiva com *primer* EcoRI + A e *primer* MseI + C); (4) PCR seletiva com *primers* marcados (*primer* + 3 pb); e (5) análise dos fragmentos por eletroforese capilar. Os eletroferogramas podem ser analisados utilizando-se programas como o *GeneMapper* (*Applied Biosystems*). [Adaptado de ARIF *et al.* (2010)]

2 JUSTIFICATIVA

Conforme descrito anteriormente, as metodologias atualmente usadas para a detecção e a caracterização de OGMs apresentam limitações. A hibridização de Southern *blot*, método-ouro para este tipo de análise, exige o emprego de sondas radioativas de DNA para se obter alta sensibilidade e confiabilidade de resultados. Sondas quimioluminescentes ou fluorescentes não são suficientemente sensíveis para revelar bons resultados. A manipulação de radioisótopos, por sua vez, requer autorizações legais, treinamento e infraestrutura adequada. Mesmo atendendo a todos estes quesitos, os distribuidores de radioisótopos no país não podem garantir a entrega dos produtos no prazo de máxima atividade para a realização dos estudos. O tempo de meia-vida do ^{32}P , por exemplo, é de 15 dias. Atrasos de uma ou duas semanas na entrega comprometem criticamente a realização de ensaios de hibridização, além do alto custo deste material. Finalmente, métodos baseados unicamente em PCR como a qPCR não permitem distinguir eventos distintos de transformação, embora sejam suficientes para identificar OGMs e estimar o número de cópias integradas. Neste trabalho, temos como proposta o desenvolvimento ou adaptação de método para a detecção e a caracterização de plantas transgênicas em substituição às técnicas previamente citadas. A estratégia proposta é realizada com o uso dos marcadores moleculares do tipo AFLP. Nosso método é proposto para direcionar a geração de AFPLs às bordas conhecidas do T- DNA e, assim, detectar e caracterizar as plantas transgênicas. A detecção de bandas em géis ou picos em eletroferogramas específicos às sequências de DNA exógeno permitiriam não só a identificação de OGMs mas, também, a diferenciação de eventos e a determinação do número de cópias integradas. Aprimoramento do método com o sequenciamento direcionado à bordas do T-DNA permitiriam, ainda, a identificação dos locais do genoma onde a integração ocorreu, desde que o genoma da espécie sob análise tenha sido previamente e inteiramente sequenciado. O desenvolvimento da tecnologia proposta é uma alternativa inovadora ao uso das técnicas anteriormente citadas e, portanto, poderá abrir caminhos para novas abordagens.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo geral proposto para o desenvolvimento deste trabalho é definir uma nova metodologia de detecção e caracterização de eventos de transformação de plantas usando a técnica de AFLP.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Isolar o DNA genômico de amostras de folhas maduras de *Eucalyptus* GM e não-GM;

3.2.2 Analisar a qualidade e quantidade do DNA das amostras por análise espectrofotométrica e por eletroforese em gel de agarose;

3.2.3 Planejar e projetar oligonucleotídeos adaptadores, *primers* e demais materiais necessários e, assim, realizar a técnica de AFLP com as amostras de DNA, resolvendo os fragmentos gerados por PCR em sequenciador capilar de DNA.

3.2.4 Analisar os resultados obtidos e aperfeiçoar a metodologia, obtendo e confirmando um maior número de amostras de plantas.

4 MATERIAS E MÉTODOS

4.1 Material Vegetal

Amostras de folhas maduras derivadas de árvores híbridas GM e não-GM de *E. urophylla* x *E. grandis* foram obtidas junto à empresa Fibria S.A. para a realização deste trabalho.

As amostras de folhas foram codificadas pelo pessoal da empresa de forma que as atividades fossem conduzidas em modelo simples-cego. Somente após a obtenção dos resultados as identidades serão reveladas. Todas as amostras foram recebidas no laboratório e armazenadas em freezer a -20 °C até a extração de DNA.

4.2 Extração de DNA

A extração de DNA de um total de 12 amostras de folhas de *Eucalyptus* foi realizada utilizando-se o método modificado de Doyle & Doyle (1987), conforme detalhado em De Oliveira *et al.* (2012). A integridade das amostras de DNA foi confirmada aplicando-se as amostras de DNA extraídas em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio (EtBr) a 0,05 µg/mL. O gel foi submetido à eletroforese em cuba horizontal (Bio-Rad) com tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X a 70 V e 110 mA durante 1,5 h. A seguir, os fragmentos de DNA foram visualizados sob luz UV pelo sistema Gel-Doc (Bio-Rad).

Após confirmação da integridade do DNA, as amostras foram submetidas ao tratamento com RNase A (250 mg/mL) para a eliminação de RNA contaminante. Para verificar se o tratamento com RNase A foi satisfatório, as amostras foram checadas, novamente, por eletroforese em gel de agarose a 0,8% a 70 V e 110 mA por 1,5 h e visualizadas sob luz UV como descrito anteriormente.

4.3 Quantificação de DNA

As amostras de DNA extraídas de *Eucalyptus* foram quantificadas por espectrofotometria utilizando-se o aparelho Nanodrop 2000c (Thermo Scientific) conforme instruções do fabricante.

4.4 Desenvolvimento das análises por AFLP

As análises por AFLP foram realizadas de acordo com os procedimentos propostos originalmente por Vos *et al.* (1995), com modificações de Hayashi *et al.* (2005).

4.5 Eletroforese Capilar

As análises por eletroforese capilar foram realizadas em um sequenciador automático de DNA ABI-3500 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) armado com capilares de 50 cm e polímero POP7 (Applied Biosystems). O programa *GeneMapper* foi utilizado para as análises dos resultados de AFLP. As amostras foram preparadas pela adição de 1 µL dos produtos da PCR de cada amostra em 8,7 µL de formamida Hi-Di (Applied Biosystems) e 0,34 µL do marcador *GeneScan 500* (-250) Liz; desnaturadas a 95 °C por 3 min; resfriadas em gelo por 3 min e eletroinjetadas no sequenciador automático.

Os fragmentos marcados por fluorescência marcados com o fluoróforo 5-FAM foram detectados pela presença de picos obtidos em eletroferogramas gerados pela eletroforese capilar. De acordo com a comparação dos eletroferogramas de mais de uma amostra de DNA, é possível se fazer uma correlação entre a ausência e a presença dos picos gerados. Assim, os picos que se mostrarem exclusivos nas amostras, isto é, presentes ou ausentes, indicam os possíveis transgenes inseridos no genoma (Figura 4).

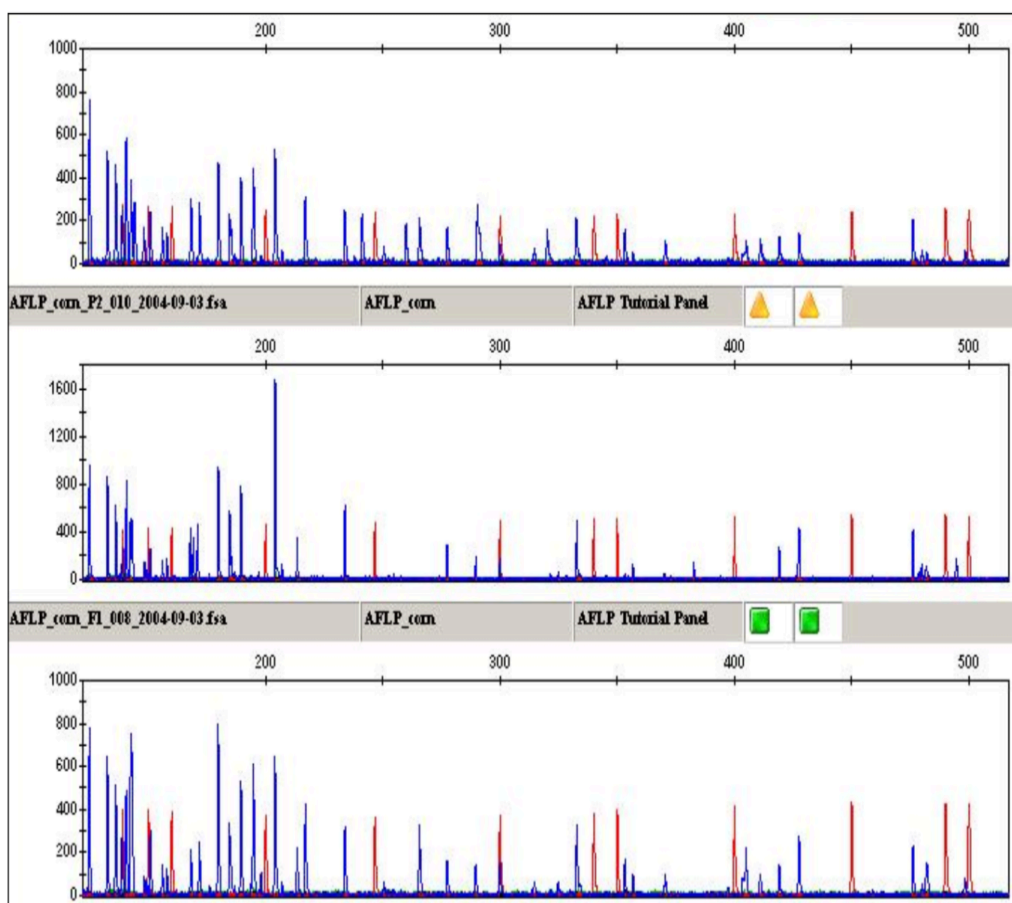


Figura 4. Representação de um típico eletroferograma obtido através da técnica de AFLP. Os picos na cor vermelha representam o padrão interno de tamanhos de fragmentos de DNA *GeneScan 500 (-250) Liz* e os picos em azul representam os fragmentos gerados pela técnica de AFLP. Cada eletroferograma é uma amostra diferente. Assim, é possível fazer-se uma correlação entre a ausência e a presença dos picos das diferentes amostras. (Applied Biosystems, 2012)

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração e Purificação de DNA

A extração de DNA foi realizada pelo método de Doyle & Doyle (1987) utilizando-se folhas maduras de *E. urophylla* x *E. grandis* GM e não-GM. Após a extração, a qualidade das amostras de DNA extraídas foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 0,8% (resultado não apresentado). As amostras extraídas continham a presença de RNA. Assim, as mesmas foram posteriormente submetidas ao tratamento com RNase A e extração com fenol e clorofórmio para se obter amostras puras de DNA. A qualidade do DNA após tratamento foi então novamente avaliada por eletroforese em gel de agarose a 0,8%, podendo-se observar DNA genômico íntegro, o que mostra a eficácia do método empregado (Figura 5), conforme resultados apresentados em Wooten *et al.* (2009). Amostras puras de DNA são extremamente importantes para as análises de AFLP. Em passos posteriores da técnica de AFLP, o DNA deve ser totalmente clivado por enzimas de restrição. Assim, é necessário a obtenção de DNA altamente puro para as reações enzimáticas ocorrerem corretamente. Contaminantes como fenóis ou polissacarídeos podem interferir diretamente nas reações de clivagem e amplificação do DNA. Deste modo, a extração de DNA deve ser realizada adequadamente para a obtenção de DNA de alta qualidade. (SAUNDERS *et al.*, 2001).

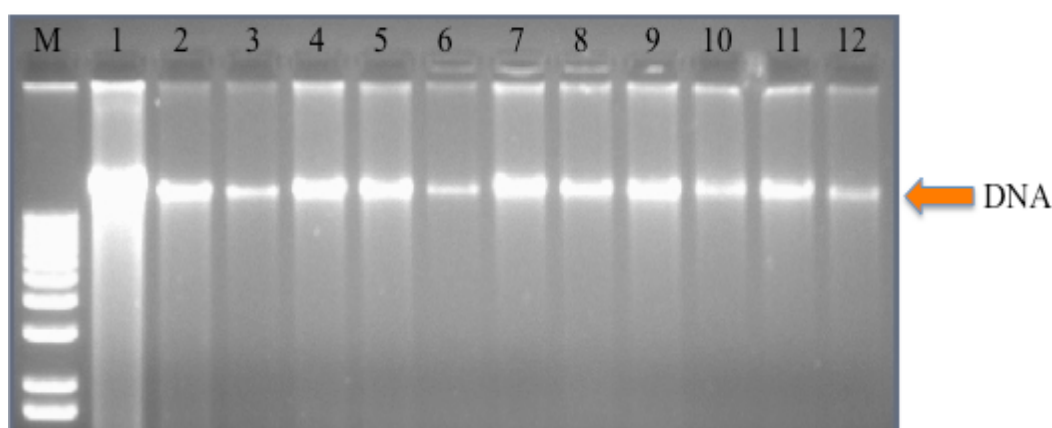


Figura 5. Imagem do gel resultante da eletroforese dos produtos da extração de DNA submetidos ao tratamento com RNase A. A presença de uma única banda mostrou que a extração de DNA e o tratamento com RNase A foram realizados com sucesso. M, marcador de tamanhos de fragmentos de DNA *1 kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen); 1-12 amostras de DNA extraídas de folhas de *E. urophylla* x *E. grandis*.

5.2 Quantificação de DNA

As amostras de DNA foram quantificadas pelo equipamento Nanodrop 2000c (Thermo Scientific) conforme apresentado na Tabela 1. A proporção das absorvâncias a 260 nm e a 280 nm é utilizada para avaliar a pureza do DNA. É considerado DNA de boa qualidade (DNA puro) quando o índice 260/280 for de aproximadamente 1,8 (MIKULÁŠKOVÁ *et al.*, 2012). Se os valores forem consideravelmente mais baixos, isso pode indicar a presença de proteínas, fenol ou outros contaminantes que absorvem fortemente ou próximo de 280 nm (NANODROP, 2007). Vários fatores afetam a reprodutibilidade da técnica de AFLP, por isso, é essencial obter DNA puro, íntegro e de alto peso molecular (HAYASHI *et al.*, 2005). Nos resultados obtidos pela quantificação, as amostras de DNA estão próximas à faixa indicando uma boa qualidade das amostras. A amostra 2 foi a única com a proporção mais baixa dentre as 12 amostras, podendo indicar que o DNA não está puro.

Tabela 1 Parâmetros observados na quantificação das amostras de DNA extraídas.

Amostra	ABS₂₆₀	ABS₂₈₀	ABS₂₆₀ ----- ABS₂₈₀	Conc. (ng/μL)	Total (μg)
1	0,328	0,187	1,75	328	12,46
2	0,218	0,149	1,46	218	8,28
3	0,142	0,077	1,84	142	5,40
4	0,197	0,121	1,62	197	7,49
5	0,145	0,082	1,77	145	5,51
6	0,068	0,036	1,87	68	2,58
7	0,151	0,083	1,83	151	5,74
8	0,148	0,087	1,69	148	5,62
9	0,209	0,129	1,62	209	7,94
10	0,115	0,066	1,73	115	4,37
11	0,123	0,071	1,72	123	4,37
12	0,142	0,072	1,96	142	5,40

5.3 Análise por AFLP

A seguir, estão descritas as etapas para o desenvolvimento da técnica de AFLP seguida das modificações necessárias para o emprego da técnica na detecção e na caracterização de transgenes em *Eucalyptus*.

5.3.1 Preparo dos adaptadores

Os adaptadores foram projetados com sequências complementares às extremidades clivadas pela enzima MseI do T-DNA do plasmídeo binário utilizado na geração das árvores GM (Tabela 2).

Tabela 2 Sequência do sítio de restrição da enzima MseI e dos *primers* para a formação dos adaptadores usados na análise de AFLP. Os asteriscos representam o local de clivagem da enzima MseI.

Sítio de Restrição de MseI	<i>Primers</i> para o Adaptador	Sequência do Adaptador
5' T*TAA 3'	5'-GACCATGAGTCCTGAG-3'	5'-GACCATGAGTCCTGAG-3'
		3'-GTACTCAGGACTCAT-5'
3' AAT*T 5'	5'-TACTCAGGACTCATG-3'	

Para o preparo dos adaptadores, uma solução contendo os dois conjuntos de *primers* a uma concentração de 100 µM foi realizada e incubada em termociclador *Genius Thermal Cycler* (Techne) nas condições de 65 °C por 10 min, 37 °C por 10 min e, finalmente, a 25 °C por 10 min. Após a incubação, as amostras foram estocadas a -20 °C.

5.3.2 Digestão do DNA e ligação dos adaptadores

Neste trabalho, a estratégia empregada foi a de clivar o DNA genômico com uma única enzima de restrição capaz de reconhecer sítios frequentes de 4 nucleotídeos como, por exemplo, MseI (NE Biolabs) e ligar, na mesma reação, os adaptadores aos fragmentos de DNA clivados pela enzima de restrição (Figura 6A). A escolha da enzima MseI foi realizada pela análise das sequências do T-DNA pelo *software SnapGene* (GSL Biotech) no qual se pode encontrar sítios de restrição à montante e à jusante da RB e da LB do T-DNA, respectivamente.

O resultado da reação de restrição e ligação foi avaliada pela aplicação de 5 μ L do produto gerado em gel de agarose a 1,2% corado com EtBr a 0,05 μ g/mL. O gel foi submetido à eletroforese conforme descrito no item 4.2 para confirmação da clivagem do DNA.

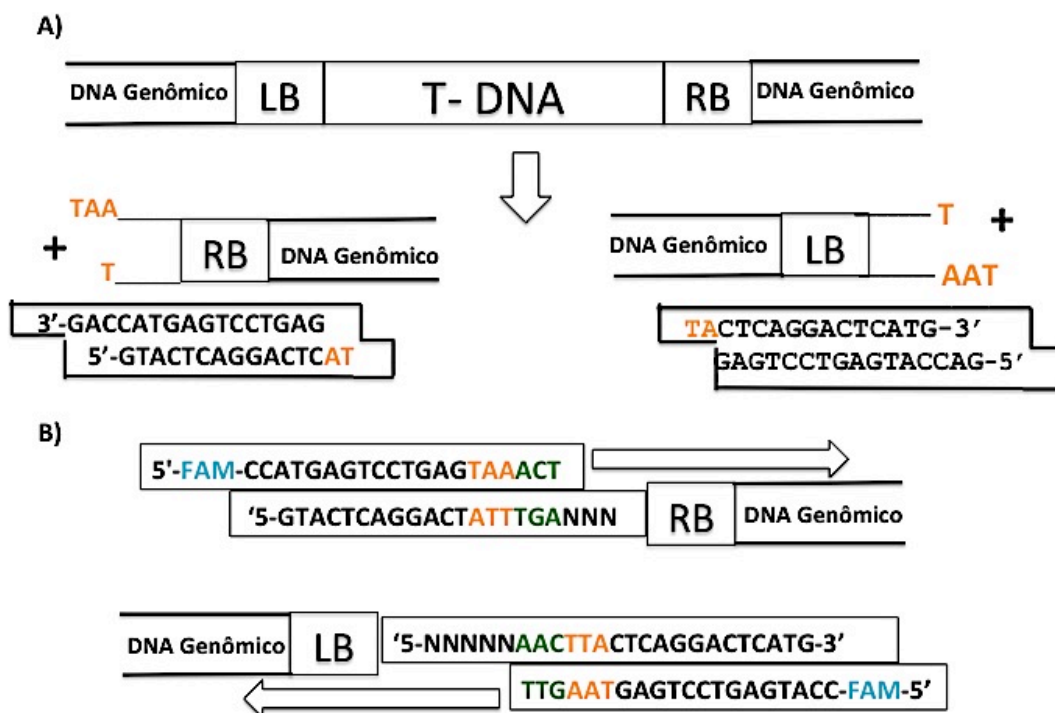


Figura 6. Passos da metodologia proposta de AFLP. (A) Na reação de digestão e ligação, o DNA é clivado pela enzima *MseI* nos sítios próximos às bordas esquerda (LB) e direita (RB) do T-DNA. Assim, os adaptadores ligar-se-ão nas sequências complementares das extremidades clivadas. (B) Na PCR, os *primers* marcados anelar-se-ão aos adaptadores e, por meio dos 3 nucleotídeos seletivos, em regiões específicas do T-DNA.

As amostras de DNA identificadas pelos números 2, 4 e 9 foram escolhidas para a reação de clivagem e ligação de acordo com os resultados qualitativos e quantitativos obtidos anteriormente (Tabela 1). Conforme descrito e apresentado nos resultados de Wooten *et al.* (2009), espera-se observar nas amostras um arraste característico de total digestão do DNA genômico pela enzima de restrição, o que foi, de fato, observado nas amostras 4 e 9 conforme ilustrado na Figura 7. Na amostra controle (DNA de *Eucalyptus grandis* sabidamente não-GM) ou C, nenhum arraste foi observado. Na amostra 2, o DNA não foi digerido eficientemente o que pode ser notado pela presença de uma banda íntegra no gel. Após essas análises iniciais, outras 4 amostras (amostras 3, 5, 7 e 8) foram escolhidas para dar continuidade às reações de clivagem e ligação. Nessas amostras, não foi possível detectar

nenhum resultado devido a baixa qualidade de captura da imagem, mesmo assim, seguiu-se com as análises de AFLP (Figura 7).

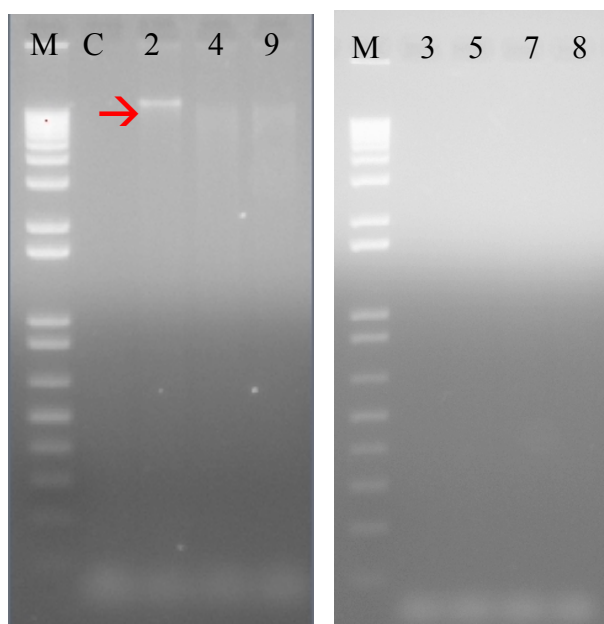


Figura 7. Imagem dos géis resultantes da eletroforese dos produtos da reação de clivagem e ligação do DNA genômico de folhas de *Eucalyptus*. Espera-se observar um arraste característico da hidrólise de DNA pela enzima *MseI*. Assim, na amostra C, não foi possível detectar qualquer fragmento e, na amostra 2, houve a presença de DNA íntegro. Já nas amostras 4 e 9, foi possível observar um arraste característico do sucesso da digestão do DNA genômico. No segundo gel, não se pode detectar corretamente nenhum arraste devido ao tempo de exposição ou contrastes não adequados para captura da imagem das amostras 3, 5, 7 e 8 de DNA de *E. urophylla x E. grandis*. M, marcador de tamanhos de fragmentos de DNA *1 kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen); C, amostra de *Eucalyptus grandis* não-GM; e 2, 3, 4, 5, 7, 8 e 9 amostras de DNA de *E. urophylla x E. grandis*.

5.3.4 PCR

Para a reação de amplificação, *primers* marcados para os adaptadores foram projetados com o fluoróforo 5-FAM com 3 nucleotídeos seletivos baseados nos sítios de *MseI* presentes nas extremidades LB e RB do T-DNA. Outros 14 possíveis *primers* não marcados também foram projetados com 2 nucleotídeos seletivos para os adaptadores de *MseI* gerados pela clivagem de regiões distintas do genoma de *Eucalyptus* (Tabela 3). Os *primers* marcados foram projetados com a finalidade de amplificar as sequências genômicas que flanqueiam o inserto de T-DNA inserido no genoma. Assim, será possível analisar os locais de inserção e discriminar os eventos de transformação, determinando-se a (in)dependência dos eventos (Figura 6B).

Tabela 3 Sequência dos *primers* para amplificação seletiva de fragmentos de DNA genômico gerados pela enzima MseI. Em verde estão marcados os nucleotídeos seletivos para as reações de amplificação.

Nomenclatura	Sequências de <i>Primers</i>
MseI-LB	5'-FAM-CCATGAGTCCTGAGTAAGTT-3'
MseI-RB	5'-FAM-CCATGAGTCCTGAGTAACT-3'
MseI-AA	5'-CATGAGTCCTGAGTAAAA-3'
MseI-AG	5'-CATGAGTCCTGAGTAAAG-3'
MseI-AT	5'-CATGAGTCCTGAGTAAAT-3'
MseI-CA	5'-CATGAGTCCTGAGTAAACA-3'
MseI-CC	5'-CATGAGTCCTGAGTAAACC-3'
MseI-CG	5'-CATGAGTCCTGAGTAAACG-3'
MseI-CT	5'-CATGAGTCCTGAGTAAACT-3'
MseI-GA	5'-CATGAGTCCTGAGTAAAGA-3'
MseI-GC	5'-CATGAGTCCTGAGTAAAGC-3'
MseI-GG	5'-CATGAGTCCTGAGTAAAGG-3'
MseI-TA	5'-CATGAGTCCTGAGTAAATA-3'
MseI-TC	5'-CATGAGTCCTGAGTAAATC-3'
MseI-TG	5'-CATGAGTCCTGAGTAAATG-3'
MseI-TT	5'-CATGAGTCCTGAGTAAATT-3'

Para análises preliminares, as PCRs foram realizadas com as amostras 3, 4, 5 e 9 com as combinações do *primer* marcado (MseI-LB ou MseI-RB) e um dos 14 possíveis *primers* não marcados conforme componentes e programa indicados nas Tabelas 4 e 5 no termociclador LGC XP *Cycler*.

Tabela 4 Componentes da PCR para um volume total de 6 μ L. Após a mistura dos componentes da reação, adicionou-se os *primers* e o produto da reação de restrição e ligação.

Reagentes	Volume (μ L) utilizado por reação
Água ultrapura	4,0
5X Tampão padrão <i>One-Taq</i> (NE Biolabs)	1,6
dNTPs	0,4
<i>One Taq</i> DNA Polimerase (NE Biolabs)	0,04

Tabela 5 Programa para amplificação dos produtos da reação de restrição e ligação.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
1	94	2 min	1
2	94	20 s	10
	50 (reduzir 1 °C/ciclo)	30 s	
	72	2 min	
3	94	30 s	25
	40	30 s	
	72	3 min	
4	40	30 min	1

5.4 Análises Preliminares dos dados de AFLP

Os resultados obtidos pelo sequenciador ABI-3500 (Applied Biosystems) foram analisados pelo programa *GeneMapper* versão 5.0 (Applied Biosystems) tendo como padrão de tamanho molecular o *GeneScan 500* (-250) Liz. Na figura 8, pode-se observar que o padrão de tamanho molecular gerado nas amostras está de acordo com o esperado, isso é, com boa separação e resolução dos picos gerados.

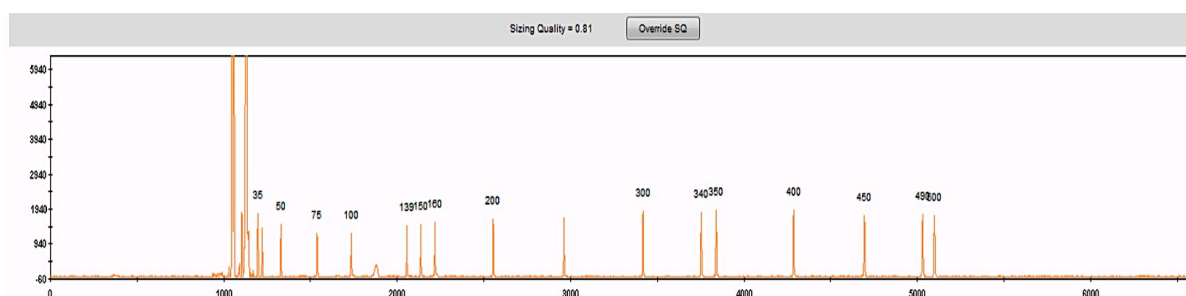


Figura 8. Padrão de tamanho molecular *GeneScan 500* (-250) Liz. Padrão de picos nos tamanhos de 35, 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 245, 300, 340, 350, 400, 450, 490 e 500 pares de bases.

No entanto, em 7 diferentes amostras de um total de 112, os padrões gerados não puderam ser utilizados para as análises. Como exemplo de baixa qualidade, pode-se observar na figura 9 que a grande maioria dos fragmentos do padrão não foram reproduzidos adequadamente. Assim, o padrão e as amostras devem apresentar valores na faixa de 0.75 a 1.0 para serem considerados de boa qualidade e, assim, adequados para as análises de AFLP. (Applied Biosystems).

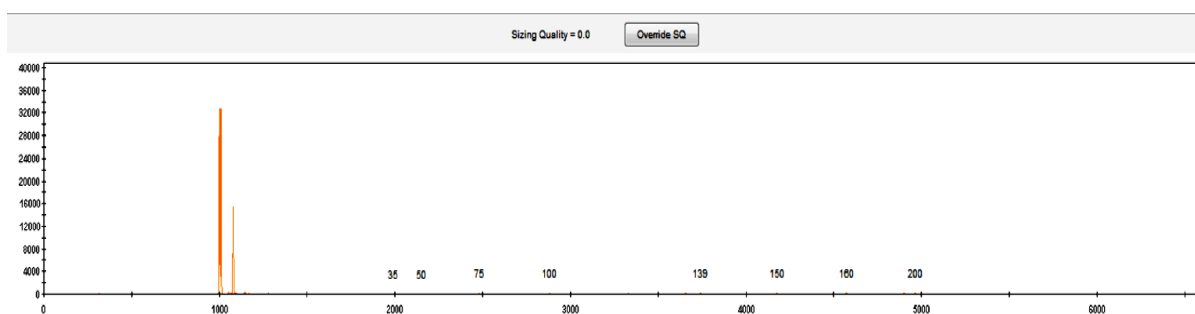


Figura 9. Exemplo de padrão de tamanho molecular *GeneScan 500 (-250) Liz* de baixa qualidade.

Após as análises de qualidade das amostras, foram selecionados os fragmentos de AFLP de tamanho entre 50 a 500 pares de bases e com intensidade de sinal (altura) maior que 1000 unidades relativas de fluorescência (RFU). Valores que não se encontrem nesses limiares são classificados como *backgrounds* e não foram considerados para as análises de AFLP (SAUNDERS *et al.*, 2001). A análise da eficiência dos *primers*, isso é, da capacidade discriminatória de um número maior de fragmentos, é muito importante para as análises dos resultados obtidos de AFLPs. (FERRÃO *et al.*, 2008). Assim, determinou-se o número de fragmentos obtidos em cada uma das 14 combinações de *primers* que condizem com os valores de tamanho e intensidade estabelecidos anteriormente. Na tabela 6, está representado cada uma das combinações de *primers* com suas respectivas amostras. As amostras de baixa qualidade não foram utilizadas para as análises de AFLP e estão demonstradas com a letra **E**. Algumas combinações de *primers* não geraram nenhum fragmento e estão enumerados com o valor zero. Desse modo, dentre todas as 14 combinações, o *primer* denominado MseI-AG foi o que mais gerou fragmentos, sendo 32 ao todo (Tabela 6).

Tabela 6 Número de fragmentos obtidos em cada combinação de *primers* para cada amostra de *Eucalyptus*. Os fragmentos de AFLP com intensidade >1000 RFU, detectados dentro da faixa do padrão de tamanho molecular de 50 a 500 pares de bases, foram analisados em cada amostra. Na tabela, está demonstrada as combinações dos *primers* seletivos (14) com os *primers* marcados MseI -LB e MseI-RB das amostras de *Eucalyptus* : 03-LB e 03-RB; 04-LB e 04-RB; 05-LB e 05-RB; 09-LB e 09-RB. As amostras marcadas com **E** são de baixa qualidade e não foram consideradas para as análises dos fragmentos. Assim, os fragmentos dentro da faixa de 50 a 500 pares de bases e com intensidade >1000 RFU são apresentados na tabela.

COMBINAÇÕES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	AA	AT	AG	TA	TT	TC	TG	GA	GC	GG	CA	CC	CG	CT
03-LB	5	3	6	4	4	6	3	5	2	4	4	2	5	0
03-RB	2	4	3	5	3	5	5	5	4	5	4	4	2	4
04-LB	4	5	6	3	5	4	4	3	3	4	4	5	4	5
04-RB	2	4	4	3	2	3	2	3	E	E	2	E	3	E
05-LB	5	1	5	3	1	1	1	1	3	5	2	6	6	E
05-RB	1	2	3	1	2	2	3	3	4	4	4	4	5	E
09-LB	1	1	3	2	1	1	1	2	1	0	3	5	0	0
09-RB	1	2	2	2	1	1	3	E	2	3	1	1	0	0
Número Total de Fragmentos	21	22	32	23	19	24	22	22	18	25	24	27	25	9

A discriminação dos fragmentos de AFLP de origem do genoma de *Eucalyptus* GM ou não-GM devem ser analisados baseados na ausência ou presença dos fragmentos obtidos pela técnica de AFLP. Para as análises iniciais, utilizou-se os fragmentos de AFLP gerados pelas combinações das amostras com o *primer* MseI-AG, por apresentarem um maior número de fragmentos. De acordo com as análises realizadas no trabalho de Saunders *et al.* (2001), atribuiu-se escores, como uma característica binária, por presença (1) ou ausência (0) dos fragmentos de AFLP que foram detectados em cada uma das amostras. Para isso, é importante que se delimite os valores de tamanho e de intensidade dos picos gerados para a construção da matriz binária (MEUDT *et al.*, 2007). Com essas análises, foi possível observar um padrão de picos de tamanhos iguais nas amostras, sugerindo que esses fragmentos sejam originários do genoma de *Eucalyptus*, sendo transgênico ou não. Ou seja, o fragmento que for de tamanho diferente e exclusivo entre as 14 combinações de *primers* possivelmente será originado dos

transgenes inseridos no genoma de *Eucalyptus*. Se a amostra apresentar mais de um fragmento de tamanho diferente e único, isso poderá indicar o número de cópias do transgene na amostra. Os diferentes tamanhos de fragmentos indicarão os locais distintos de integração do transgene no genoma da planta, possibilitando a caracterização dos eventos independentes de transformação entre as amostras de *Eucalyptus* GM.

Nos resultados obtidos pela combinação com o *primer* MseI-AG, o fragmento de 97 pb é presente em todas as amostras (Tabela 7). Ao contrário, os fragmentos de 79 pb, 100 pb e 378 pb são detectados em amostras distintas. Em 04-LB e 04-RB foi detectado o pico de 79 pb; em 04-RB o pico de 100 pb e em 05-LB o pico de 378 pb. Esses três fragmentos mostram-se específicos e exclusivos de cada amostra e, assim, possivelmente originados de transgenes inseridos no genoma de *Eucalyptus* GM (Tabela 7 e Figura 10). Além disso, na amostra 04-LB e 04-RB dois fragmentos são observados, podendo indicar que essa amostra de *Eucalyptus* contém mais de uma cópia do transgene inserido no genoma.

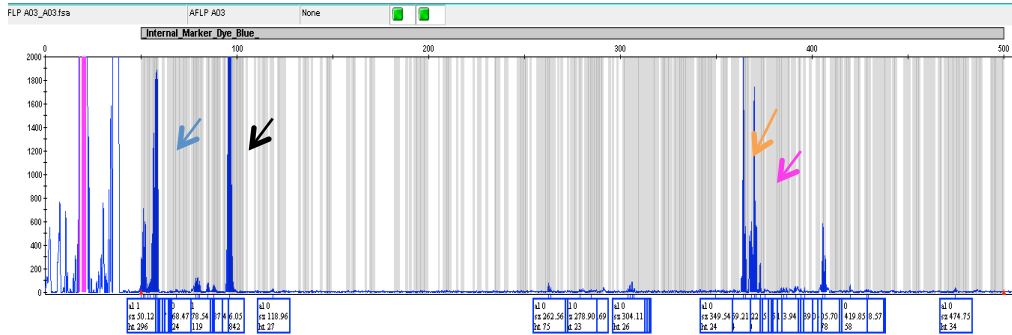
Desse modo, essas são análises preliminares e não conclusivas. Para a real verificação do método, é necessário realizar as análises dos fragmentos de todas as 14 combinações de *primers*. Além disso, comparar os fragmentos gerados pelas amostras com fragmentos de uma planta não-transgênica de *Eucalyptus* (controle). Assim, poderá ser feita a correta correlação entre os fragmentos de AFLP originados do genoma de *Eucalyptus* transgênico e não-transgênico.

Tabela 7 Matriz de ausência ou presença dos fragmentos de AFLP gerados pelo *primer* MseI-AG. A combinação com o *primer* MseI-AG gerou um número maior de fragmentos de AFLP dentre todas as combinações de *primers*. Esses fragmentos podem ser analisados pela sua ausência (0) ou presença (1) nas amostras. Está indicado na matriz as amostras de *Eucalyptus* e os tamanhos em pares de bases dos fragmentos detectados pelas combinações com o *primer* MseI-AG.

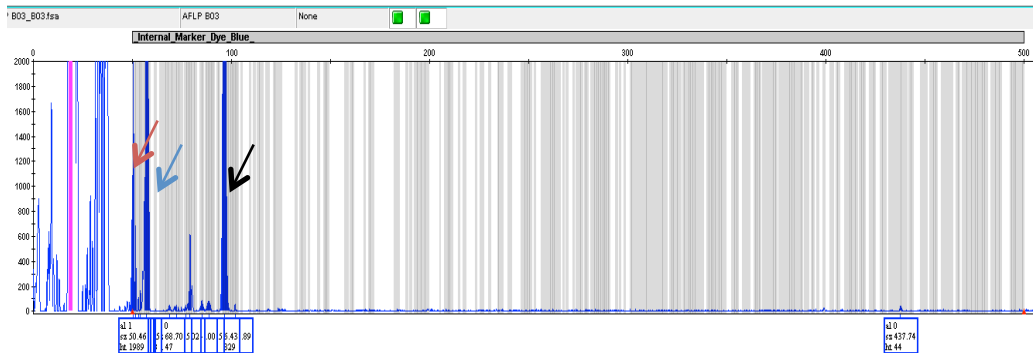
Fragmentos de MseI-AG (pb)									
Amostra	Primer Marcado	51	57	79	97	100	364	370	378
03	LB	0	1	0	1	0	1	1	0
	RB	1	1	0	1	0	0	0	0
04	LB	1	1	1	1	0	0	0	0
	RB	0	1	1	1	1	0	0	0
05	LB	0	0	0	1	0	0	1	1
	RB	1	1	0	1	0	0	0	0
09	LB	0	1	0	1	0	1	1	0
	RB	0	1	0	1	0	0	0	0

Eletroferogramas obtidos pela técnica de AFLP

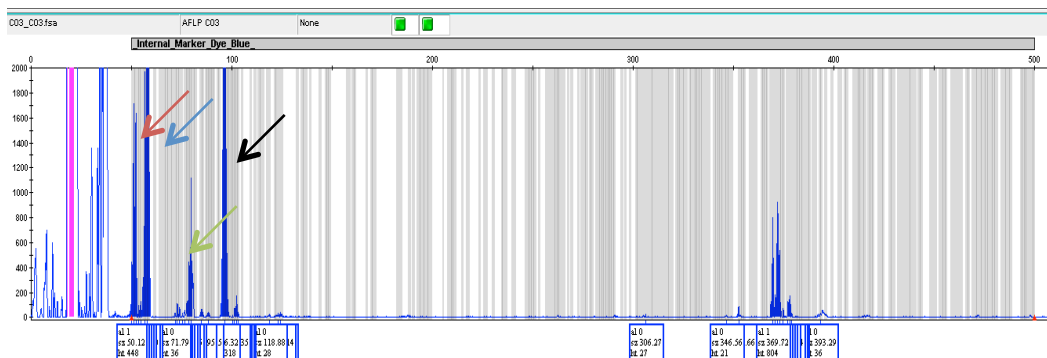
A. Eletroferograma da amostra 03-LB



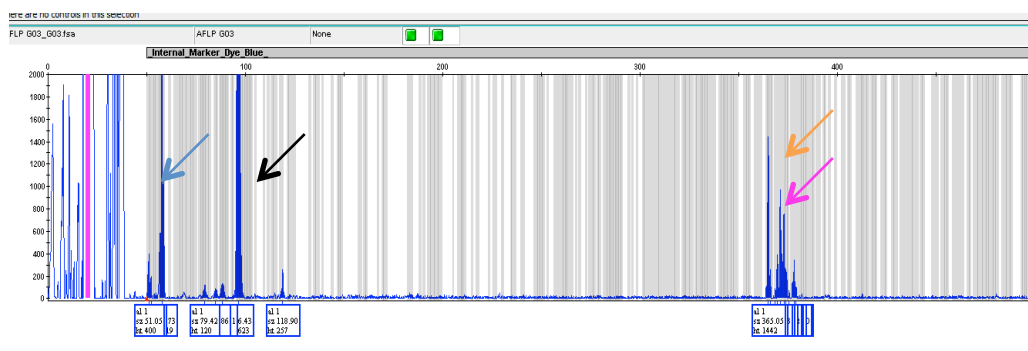
B. Eletroferograma da amostra 03-RB



C. Eletroferograma da amostra 04-LB



G. Eletroferograma da amostra 09-LB



H. Eletroferograma amostra 09-LB

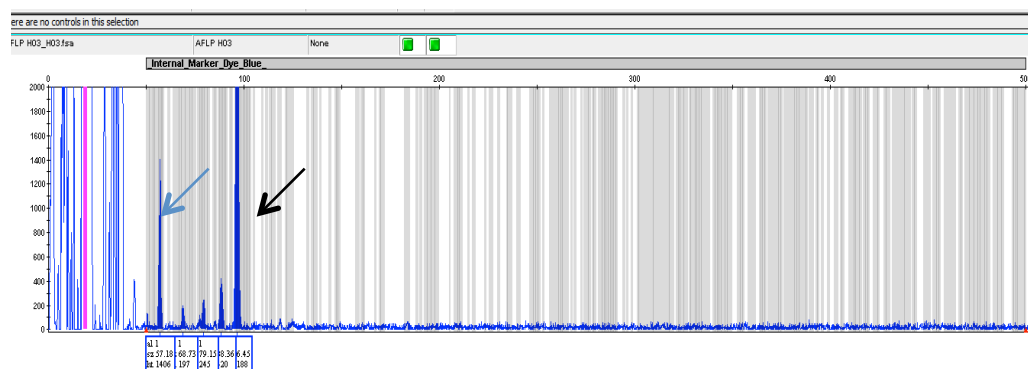


Figura 10. Eletroferogramas obtidos através da técnica de AFLP pela combinação do *primer* MseI-AG. Os picos de tamanhos diferentes (fragmentos de AFLP) estão identificados por diferentes cores de setas. Assim, cada cor representa um tamanho de fragmento: 51 pb (vermelho); 57 pb (azul); 79 pb (verde); 97 pb (preto); 100 pb (lilás); 364 pb (laranja); 370 pb (rosa) e 378 pb (amarelo). As amostras estão representadas de A até H.

Além disso, pode-se observar que o número de fragmentos de AFLP gerado pelas combinações dos *primers* neste trabalho são consideravelmente menores àqueles obtidos pelo uso da técnica de AFLP em estudos de diversidade genética, caracterização de DNA por *fingerprinting*, dentre outros. Na figura 11, adaptado de Hayashi *et al.* (2005), o número de fragmentos apresentados é consideravelmente alto, o que o autor considera como essencial para as análises de AFLP. Neste trabalho, os fragmentos foram gerados em menor número, conforme o propósito do método em direcionar a geração de AFPLs às bordas conhecidas do T- DNA e, assim, detectar e caracterizar as plantas transgênicas.

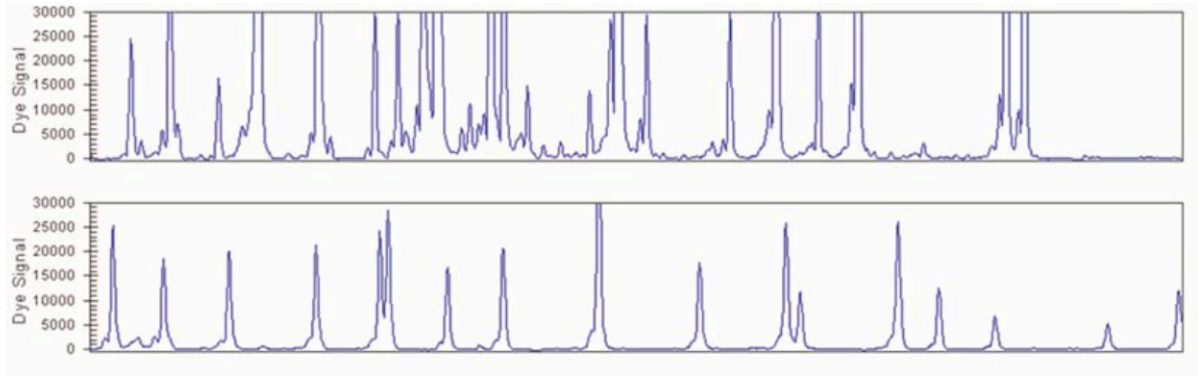


Figura 11. Exemplos de eletroferogramas obtidos através do uso da técnica de AFLP. [Adaptado de HAYASHI *et al.*, (2005)]

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O crescente avanço na geração de plantas transgênicas necessita de testes eficientes e capazes de identificar e caracterizar eventos independentes de transformação. Porém, os métodos rotineiramente estabelecidos para tais análises apresentam limitações de uso e de análise dos transgenes. Por isso, é importante o desenvolvimento de novas metodologias a fim de se substituir e melhorar as análises já empregadas de detecção e caracterização de plantas GM (ŽEL *et al.*, 2012). Portanto, o presente trabalho foi e está sendo desenvolvido com o objetivo de apresentar uma nova metodologia de caracterização e de análise de plantas transgênicas, o que justifica a continuação deste trabalho diante dos fatores limitantes apresentados pelos métodos tradicionais como hibridização de Southern *blot* e PCR.

No presente trabalho, as amostras de DNA extraídas de folhas de *Eucalyptus* e as reações de clivagem do DNA foram satisfatórias. Duas amostras testadas não apresentaram clivagem de seu DNA, sugerindo que a extração de DNA destas amostras não foi realizada adequadamente. De um modo geral, tivemos sucesso nos passos iniciais de AFLP e nas análises preliminares dos fragmentos de AFLP gerados para a detecção e caracterização de transgenes. Nessas análises iniciais, observou-se que o *primer* MseI-AG gerou um número maior de fragmentos dentre as 14 diferentes combinações de *primers*. Assim, os fragmentos obtidos pelo *primer* MseI-AG foram escolhidos para as análises iniciais do método proposto. Os fragmentos de 79 pb, 100 pb e 378 pb foram detectados em amostras únicas de *Eucalyptus*, o que sugere que esses fragmentos sejam originários de *Eucalyptus* GM. Esses resultados não são conclusivos e devem ser comparados aos fragmentos de AFLP gerados a partir de plantas de *Eucalyptus* não-GM para a real verificação da eficácia do método proposto. Desse modo, pretende-se cumprir os objetivos propostos e os que não foram atingidos até o presente momento, conforme indicados no item 3.2, ou seja:

- Resolver os fragmentos gerados por PCR em sequenciador capilar de DNA de amostras de plantas de *Eucalyptus* transgênicas e não-transgênicas.
- Testar diferentes protocolos já estabelecidos para AFLP. Isso é, comparar os resultados obtidos com métodos diferentes de geração de AFLP.
- Analisar os resultados obtidos e aperfeiçoar a metodologia, obtendo e confirmando um maior número de amostras de plantas.
- Validar os resultados obtidos pela técnica-ouro de hibridização de Southern *blot*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHÃO, O. S. **Rastreabilidade de soja Roundup Ready em produtos agrícolas e derivados: produção de materiais de referência e uso de marcadores AFLP**. 2008. Tese (Doutorado em Biologia na Agricultura e no Ambiente) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

AHMAD, A.; DIWAN, H.; ABROL, Y. P. Global climate change, stress and plant productivity. In: **Abiotic Stress Adaptation in Plants**. Springer Netherlands, p. 503-521, 2010.

AMMAR, M. H.; ALGHAMDI, S. S.; MIGDADI, H. M.; KHAN, M. A.; EL-HARTY, E. H.; AL-FAIFI, S. A. Assessment of genetic diversity among faba bean genotypes using agromorphological and molecular markers. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 22, p. 340-350, 2015.

APPLIED BIOSYSTEMS, **DNA Fragment Analysis by Capillary Electrophoresis**, p. 1-217, 2012.

ARIF, I. A.; BAKIR, M. A.; KHAN, H. A.; AL FARHAN, A. H.; AL HOMAIDAN, A. A.; BAHKALI, A. H.; AL SADOON, M.; SHOBRAK, M. A brief review of molecular techniques to assess plant diversity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, p. 2079-2096, 2010.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Short Protocols in Molecular Biology**, 5th Ed., John Wiley & Sons, p. 1512, 2002.

BARAMPURAM, S.; ZHANG, Z. J. Recent advances in plant transformation. In: **Plant Chromosome Engineering methods and protocols, methods in molecular biology**, Humana Press, v. 701, p. 1-35, 2011.

BARTON, K. A.; BINNS, A. N.; MATZKE, A. J.; CHILTON, M. D. Regeneration of intact tobacco plants containing full length copies of genetically engineered T-DNA, and transmission of T-DNA to R1 progeny. **Cell**, v. 32, p. 1033-1043, 1983.

BEVAN, M. W.; FLAVELL, R. B.; CHILTON, M. D. A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. **Nature**, v. 304, p. 184-187, 1983.

BEYER, P. Golden Rice and 'Golden' crops for human nutrition. **New Biotechnology**, v. 27, p. 478-481, 2010.

BITA, C. E.; GERATS, T. Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 1-18, 2013.

BRASILEIRO, A. C. M.; LACORTE, C. *Agrobacterium*: Um sistema natural de transferência de genes para plantas. **Biociência, Ciência & Desenvolvimento**, v. 15, p. 12-15, 2000.

BROD, F. C. A.; DOS SANTOS FERRARI, C.; VALENTE, L. L.; ARISI, A. C. M. Nested PCR detection of genetically modified soybean in soybean flour, infant formula and soymilk. **LWT-Food Science & Technology**, v. 40, p. 748-751, 2007.

BROWN, T. A. Southern Blotting and Related DNA Detection Techniques. **Encyclopedia of Life Sciences**, University of Manchester Institute of Science and Technology, Manchester, UK, p. 1-6, 2001.

COHEN, S. N.; CHANG, A. C.; BOYER, H. W.; HELLING, R. B. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 70, p. 3240-3244, 1973.

CONCEIÇÃO, F. R.; MOREIRA, A. N.; BINSFELD, P. C. Detecção e quantificação de organismos geneticamente modificados em alimentos e ingredientes alimentares. **Ciência Rural**, v. 36, p. 315-324, 2006.

CTNBio - Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. Disponível em: www.ctnbio.gov.br. Acesso em: Outubro de 2015.

DE ANDRADE, S. R. M. **Transformação de Plantas**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 1ª edição, p. 28, 2003.

DE OLIVEIRA, L. A.; BRETON, M. C.; BASTOLLA, F. M.; CAMARGO, S. D. S.; MARGIS R.; FRAZZON, J.; PASQUALI, G. Reference genes for the normalization of gene expression in *Eucalyptus* species. **Plant & Cell Physiology**, v.53, p. 405-422, 2012.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v.19, p. 11-15, 1987.

FALEIRO, F.G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Embrapa, Brasília, DF, 2007.

FERRÃO, L. F. V. **Marcadores microssatélites em estudos de diversidade, mapeamento genético e análises de QTLs em *Coffea canephora***. 2013. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

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**, v. 80, p. 4803-4807, 1983.

GACHON, C.; MINGAM, A.; CHARRIER, B. Real-time PCR: what relevance to plant studies?. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 1445-1454, 2004.

GELVIN, S. B. Agricultural biotechnology: gene exchange by design. **Nature**, v. 433, p. 583-584, 2005.

GIDDINGS, G.; ALLISON, G.; BROOKS, D.; CARTER, A. Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 1151-1155, 2000.

HAYASHI, E.; CHI, H-C.; BOYER, S.K.; STILL, D.W. Amplified fragment length polymorphism protocol for plant science on CEQ™ series genetic analysis system. **Beckman Coulter**, Fullerton, California, p. 1-11, 2005.

HERRERA-ESTRELLA, L.; DEPICKER, A.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J. Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. **Nature**, v. 303, p. 209-213, 1983.

HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G.; WATSON, R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology**, v. 11, p. 1026-1030, 1993.

HOOD, E. E.; GELVIN, S. B.; MELCHERS, L. S.; HOEKEMA, A. New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. **Transgenic Research**, v. 2, p. 208-218, 1993.

HOOD, E. E.; HELMER, G. L.; FRALEY, R. T.; CHILTON, M. D. The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. **Journal of Bacteriology**, v. 168, p. 1291-1301, 1986.

HUANG, Z.; Lin, J.; CHENG, Z.; XU, M.; HUANG, X.; YANG, Z.; ZHENG, J. Production of dammarane-type sapogenins in rice by expressing the dammarenediol-II synthase gene from *Panax ginseng* CA Mey. **Plant Science**, v. 239, p. 106-114, 2015.

IBÁ - Indústria Brasileira de Árvores. Disponível em: www.iba.org/pt/. Acesso em: Outubro de 2015.

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, p. 132-141, 2001.

JAMES, C. **Global status of transgenic crops in 1997**. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA) Ithaca, NY, USA, 1997.

JAMES, C. **Global status of commercialized biotech/GM crops: 2014**. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA) Ithaca, NY, USA, 2014.

KAMLE, S.; ALI, S. Genetically modified crops: Detection strategies and biosafety issues. **Gene**, v. 522, p. 123-132, 2013.

KELLNER, E. M.; ORSBORN, K. I.; SIEGEL, E. M.; MANDEL, M. A.; ORBACH, M. J.; GALGANI, J. N. *Coccidioides posadasii* contains a single 1, 3- β -glucan synthase gene that appears to be essential for growth. **Eukaryotic Cell**, v. 4, p. 111-120, 2005.

KEY, S.; MA, J. K. C; DRAKE, P. M. W. Genetically modified plants and human health. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 101, p. 290-298, 2008.

KLEE, H. J.; GIOVANNONI, J. J. Genetics and control of tomato fruit ripening and quality attributes. **Annual Review of Genetics**, v. 45, p. 41-59, 2011.

KLEIN, T. M.; WOLF, E. D.; WU, R.; SANFORD, J. C. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. **Nature**, v. 327, p. 70-73, 1987.

KOK, E. J.; AARTS, H. J.; HOEF, A. M.; KUIPER, H. A. DNA methods: critical review of innovative approaches. **Journal of AOAC International**, v. 85, p. 797- 800, 2002.

KONOWALIK, K.; WAGNER, F.; TOMASELLO, S.; VOGT, R.; OBERPRIELER, C. Detecting reticulate relationships among diploid *Leucanthemum* Mill. (Compositae, Anthemideae) taxa using multilocus species tree reconstruction methods and AFLP fingerprinting. **Molecular Phylogenetics & Evolution**, v. 92, p. 308-328, 2015.

KUMAR, A.; MISRA, P.; DUBE, A. Amplified fragment length polymorphism: an adept technique for genome mapping, genetic differentiation, and intraspecific variation in protozoan parasites. **Parasitology Research**, v. 112, p. 457-466, 2013.

KUMAR, S. V.; MISQUITTA, R. W.; REDDY, V. S.; RAO, B. J.; RAJAM, M. V. Genetic transformation of the green alga—*Chlamydomonas reinhardtii* by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Science**, v. 166, p. 731-738, 2004.

KUNIK, T.; TZFIRA, T.; KAPULNIK, Y.; GAFNI, Y.; DINGWALL, C.; CITOVSKY, V. Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, p. 1871-1876, 2001.

LERAYER, A. **Guia do eucalipto 2009**. Disponível em: www.cib.org.br. Acesso em: outubro de 2010.

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**, v. 2, p. 1-10, 2002.

MEHIER-HUMBERT, S.; GUY, R. H. Physical methods for gene transfer: improving the kinetics of gene delivery into cells. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 733-753, 2005.

MEUDT, H. M.; CLARKE, A. C. Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances. **Trends in Plant Science**, v. 12, p. 106-117, 2007.

MICHELINI, E.; SIMONI, P.; CEVENINI, L.; MEZZANOTTE, L.; RODA, A. New trends in bioanalytical tools for the detection of genetically modified organisms: an update. **Analytical & Bioanalytical Chemistry**, v. 392, p. 355-367, 2008.

MIKULÁŠKOVÁ, E.; FÉR, T.; KUČABOVÁ, V. The effect of different DNA isolation protocols and AFLP fingerprinting optimizations on error rate estimates in the bryophyte *Campylopus introflexus*. **Lindbergia: Journal of Bryology**, v. 35, p. 7-17, 2012.

MIRAGLIA, M.; BERDAL, K. G.; BRERA, C.; CORBISIER, P.; HOLST-JENSEN, A.; Kok, E. J.; MARVIN, H.J.P.; SCHIMMEL, H.; RENTSCH, J.; VAN RIE, J.P.P.F.; ZAGON, J. Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. **Food & Chemical Toxicology**, v. 42, p. 1157-1180, 2004.

MONQUERO, P. A. Plantas transgênicas resistentes aos herbicidas: situação e perspectivas. **Bragantia**, Campinas v. 64, p. 517-531, 2005.

MORA, A. L.; GARCIA, C. H. **A cultura do eucalipto no Brasil**. Sociedade Brasileira de Silvicultura, São Paulo, SP. 2000.

MURAI, N.; KEMP, J. D.; SUTTON, D. W.; MURRAY, M. G.; SLIGHTOM, J. L.; MERLO, D. J.; REICHERT, N.A.; SENGUPTA-GOPALAN, C.; STOCK, C. A.; BARKER, R.F.; HALL, T. C. Phaseolin gene from bean is expressed after transfer to sunflower via tumor-inducing plasmid vectors. **Science**, v. 222, p. 476-482, 1983.

NANODROP TECHNOLOGIES, INC. **ND-1000 Spectrophotometer V3.5 User's Manual**. Wilmington, USA, p. 61, 2007.

NESTER, E. W. *Agrobacterium*: nature's genetic engineer. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 1-16, 2015.

NEWELL, C. A. Plant transformation technology. **Molecular Biotechnology**, v. 16, p. 53-65, 2000.

OLIVEIRA, M. C. D. S.; REGITANO, L. C. D. A.; ROESE, A. D.; ANTHONISEN, D. G.; PATROCINIO, E. D.; PARMA, M. M.; SCAGLIUSI, S. M. M.; TIMÓTEO, W. H. B.; JARDIM, S. N. **Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia de polimerase [recurso eletrônico]**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007.

OOMS, G.; HOOYKAAS, P. J.; VAN VEEN, R. J.; VAN BEELEN, P.; REGENSBURG-TUÏNK, T. J.; SCHILPEROORT, R. A. Octopine Ti-plasmid deletion mutants of *Agrobacterium tumefaciens* with emphasis on the right side of the T-region. **Plasmid**, v. 7, p. 15-29, 1982.

OSBORN, J. A review of radioactive and non-radioactive-based techniques used in life science applications—Part I: Blotting techniques. **Life Science News (Amersham Pharmacia Biotech)**, v. 6, p. 1-4, 2000.

PERMYAKOVA, N. V.; SHUMNYI, V. K.; DEINEKO, E. V. *Agrobacterium*-mediated transformation of plants: Transfer of vector DNA fragments in the plant genome. **Russian Journal of Genetics**, v. 45, p. 266-275, 2009.

POWELL, S. K.; RIVERA-SOTO, R.; GRAY, S. J. Viral Expression Cassette Elements to Enhance Transgene Target Specificity and Expression in Gene Therapy. **Discovery Medicine**, v. 19, p. 49-57, 2015.

QAIM, M. The economics of genetically modified crops. **Annual Review of Resource Economics**, v. 1, p. 665-694, 2009.

QAIM, M. Benefits of genetically modified crops for the poor: household income, nutrition, and health. **New Biotechnology**, v. 27, p. 552-557, 2010.

QUERCI, M.; VAN DEN BULCKE, M.; ŽEL, J.; VAN DEN EEDE, G.; BROLL, H. New approaches in GMO detection. **Analytical & Bioanalytical Chemistry**, v. 396, p. 1991-2002, 2010.

RANDHAWA, G. J.; CHHABRA, R.; SINGH, M. Decaplex and real-time PCR based detection of MON531 and MON15985 Bt cotton events. **Journal of Agricultural & Food Chemistry**, v. 58, p. 9875-9881, 2010.

SARMIDI, M. R.; EL ENSHASY, H. A. Biotechnology for wellness industry: concepts and biofactories. **International Journal of Biotechnology for Wellness Industries**, v. 1, p. 3-30, 2012.

SARTORETTO, L. M.; SALDANHA, C. W.; CORDER, M. P. M. Transformação genética: estratégias e aplicações para o melhoramento genético de espécies florestais. **Ciência Rural**, v. 38, p. 861-871, 2008.

SAUNDERS, J. A.; MISCHKEL, S.; HEMEIDA, A. A. The use of AFLP techniques for DNA fingerprinting in plants. CEQ 2000XL application information. **Beckman Coulter**, Inc., Fullerton, California, p. 1-9, 2001.

SHELTON, A. M.; ZHAO, J. Z.; ROUSH, R. T. Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. **Annual Review of Entomology**, v. 47, p. 845-881, 2002.

SLATER, A.; SCOTT, N. W.; FOWLER, M. R. **Plant biotechnology, The genetic manipulation of plants**. Oxford, England: Oxford University Press, 2th Ed., p. 400, 2008.

SPARROW, P. A. C. GM risk assessment. **Molecular Biotechnology**, v. 44, p. 267-275, 2010.

SUBRAMONI, S.; NATHOO, N.; KLIMOV, E.; YUAN, Z. C. *Agrobacterium tumefaciens* responses to plant-derived signaling molecules. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 1-12, 2014.

TZFIRA, T.; CITOVSKEY, V. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 17, p. 147-154, 2006.

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

VON GÖTZ, F. See what you eat—broad GMO screening with microarrays. **Analytical & Bioanalytical Chemistry**, v. 396, p. 1961-1967, 2010.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRITERS, A.; POT, J.; Paleman, J.; KUIPER, M.; Zabeau, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, p. 4407-4414, 1995.

WOOTEN, J. A.; TOLLEY-JORDAN, L. R. Validation of phylogenetic signals in amplified fragment length data: testing the utility and reliability in closely related taxa. **BMC Research Notes**, v. 2, p. 1-26, 2009.

YADAV, N. S.; VANDERLEYDEN, J.; BENNETT, D. R.; BARNES, W. M.; CHILTON, M. D. Short direct repeats flank the T-DNA on a nopaline Ti plasmid. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 79, p. 6322-6326, 1982.

ZAMBRYSKI, P.; JOOS, H.; GENETELLO, C.; LEEMANS, J.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J. Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. **The EMBO Journal**, v. 2, p. 2143, 1983.

ŽEL, J.; MILAVEC, M.; MORISSET, D.; PLAN, D.; VAN DEN EEDE, G.; GRUDEN, K. How to reliably test for GMOs, **Springer US**, p. 1-95, 2012.