

## TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Agrobacterium tumefaciens* PELA UTILIZAÇÃO DE VETOR VIRAL TRANSFORMADO COM O GENE *FaCPDK4*

ANTÔNIO DUARTE PAGANO<sup>1</sup>; ROSANE LOPES CRIZEL<sup>2</sup>  
; VANESSA GALLI<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas – DCTA (FAEM- UFPeI) –  
antonioduarte pagano@gmail.com

<sup>2</sup>Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas – DCTA (FAEM- UFPeI) –  
rosanecrizel1@hotmail.com

<sup>3</sup>Laboratório de Biotecnologia Vegetal – CDTec – UFPeI – vane.galli@yahoo.com.br

### 1. INTRODUÇÃO

O morango (*Fragaria x ananassa*) é a espécie de maior expressão em área cultivada e em valor econômico na cadeia produtiva de pequenas frutas. É um pseudofruto amplamente consumido em função das características sensoriais, principalmente, da coloração, sabor e aroma (SCHAART et al., 2013). Além disso, é rico em compostos bioativos, com destaque para o ácido ascórbico e compostos fenólicos, dentre esses os ácidos fenólicos e as antocianinas (GIAMPIERI et al., 2012). As características sensoriais e funcionais dos frutos de morango são influenciadas pelo processo de amadurecimento. Há evidências que esse processo é dependente do ácido abscísico (ABA) e que envolve uma cascata de sinalização mediada pelo íon cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (AYUB et al., 2016). Para conferir especificidade para o estímulo de sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$ , existem proteínas específicas que atuam como sensores, dentre elas as proteínas quinases dependentes de cálcio (CDPKs). As CDPKs vem sendo relatadas como fatores essenciais na tolerância a estresses bióticos e abióticos e no processo de maturação de alguns frutos, além de, em morangos, contribuírem a concentração de fenilpropanoides.

Uma das estratégias utilizadas para levar ao acúmulo destes compostos benéficos à saúde humana e a resistência da planta as intempéries é a biofortificação. Esta é usada para aumentar o conteúdo nutricional em porções comestíveis das plantas utilizadas como alimentos. Para isso, é necessário saber a função da porção genômica a ser modificada, sendo uma das técnicas empregadas para elucidar a função de genes em plantas o silenciamento gênico induzidos por vírus (VIGS), que envolve a inserção de um fragmento do gene de interesse em um vetor viral, seja por substituição de genes que são dispensáveis para a replicação e movimento do vírus ou pela duplicação da região promotora

necessária para a expressão do gene do vírus (JIA; SHEN, 2013; TIAN et al., 2015). Baseado nisto, o seguinte trabalho objetivou clonar o gene que codifica par *FaCDPK4* em vetor viral TRV, afim de transformar a *Agrobacterium tumefaciens* para posterior agroinfiltração em frutos de morango.

## 2. METODOLOGIA

As mudas de morango foram transplantadas e cultivadas (*Fragaria x Ananassa*) em vasos de 9L, em casa de vegetação. Concomitantemente a isto, primers específicos a *FaCPDK4* foram desenhados com auxílio do software Vector NTI10. O RNA total dos morangos foi isolado utilizando protocolo de CTAB (brometo de hexadeciltrimetilamônio) (MESSIAS et al., 2014). Após isso, realizou-se a síntese de cDNA. Com isto, realizou-se PCR para verificar a especificidade dos primers desenhados, e a posterior purificação do produto da PCR, feita com o *Illustra GFX PCR DNA and Gel Purification*

*n Kit*.

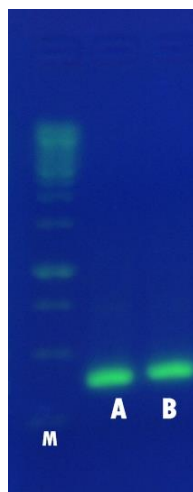
O fragmentos gerados na PCR foi submetido à clonagem em vetores plasmidiais (TRV2), utilizando as enzimas de restrição XbaI e KpnI e a enzima DNA ligase. O produto da ligação foi inserido nas bactérias *E. coli* por choque térmico. Junto a isto, pré-inóculos de *E. coli* foram preparados em meio LB líquido, onde as bactérias foram passadas para placas de meio LB sólido, suplementado com o antibiótico kanamicina (50ug/mL). Um *screening* das colônias recombinantes foi realizado através da comparação com vetor circular. Posteriormente, o DNA da colônia recombinante foi extraído e amplificado por PCR.

Posteriormente, os plasmídeos recombinantes foram inseridos por choque térmico nas cepas de *Agrobacterium*. Por fim, a cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 contendo os vetores virais pTRV2 recombinantes + pTRV1 foi cultivada a 28°C em meio LB. Ao atingir densidade óptica (DO<sub>600</sub>) de aproximadamente 0,8, as células de *Agrobacterium* foram centrifugadas e ressuspendidas em meio Murashige and Skoog.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O produto da PCR utilizando cDNA e DNA foi avaliado por gel de agarose 0,8% (Figura 1), demonstrando que a extração do material genético foi eficaz, assim como o desenho dos primers que apresentaram alta especificidade ao

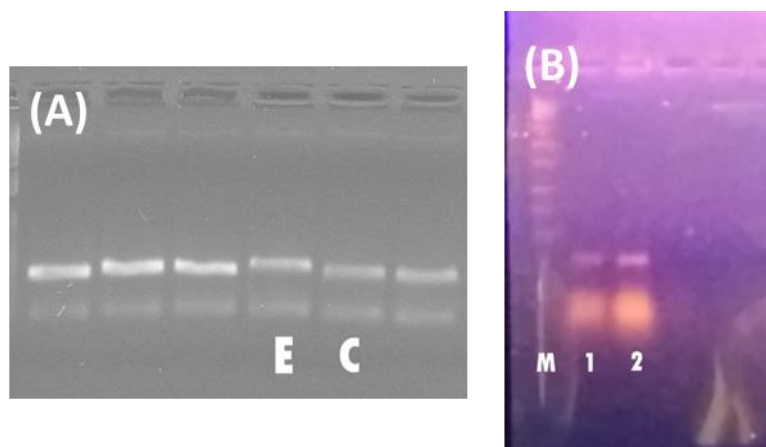
fragmento de interesse e sem indícios de degradação, formando bandas sólidas no gel.



**Figura 1.** Produto da PCR disposto em gel de agarose 0,8%

M – marcador molecular 1000pb; A – amostra de PCR com cDNA e B – amostra de PCR com DNA.

Isto possibilitou o início dos processos de clonagem, como extração e digestão do vetor pTRV. Após a transformação correta do vetor viral, a transformação e crescimento adequado das cepas de *E. coli* com o plasmídeo de interesse (contendo o gene CDPK4) foi eficaz, conforme exposto no *screening* (Figura 2A) e no produto da PCR (Figura 2B).



**Figura 2.** (A) - *Screening* do pTRV transformados com o gene CDPK4. E – colônia de bactérias *E. coli* transformada; C – vetor circular. (B) Confirmação da colônia recombinante por PCR. M – marcador padrão; 1- Colônia recombinante (CPDK4); 2- amostra de DNA (CPDK4)

Em comparação ao vetor circular (que serve como amostra controle, sendo um vetro vazio) a colônia E (*Escherichia coli* TOP10) aparentemente foi transformada com o fragmento de interesse que possui. Para confirmação, o DNA

dessa colônia foi extraído e amplificado utilizando primers de *FaCDPK4*, confirmando que esta colônia realmente está transformada. A partir disto, usou-se esta colônia para a transformação das cepas de *Agrobacterium tumefaciens*.

A futura perspectiva de agroinocular os frutos de morangos promoveria, possivelmente, o silenciamento do gene *FaCDPK4*, visando assim confirmar a função que este gene exerce. Com o acúmulo desses compostos sendo inibido, a hipótese que estas proteínas desempenham um importante papel na biossíntese de fenilpropanoides seria confirmada. Além disso, as CPDKs podem estar diretamente ligadas a fosforilação de uma importante enzima envolvida no metabolismo de compostos fenilpropanoides: a enzima FAL (fenilamônio liase).

#### 4. CONCLUSÕES

A clonagem e transformação de *FaCDPK4* foi efetuado com sucesso. Dado o exposto, estratégias direcionadas à biofortificação da cultura do morango pelo maior acúmulo de compostos fitoquímicos podem ser exploradas. Como perspectivas futuras, a agroinoculação possibilitará a prospecção de estratégias direcionadas à biofortificação de culturas de morango.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOUIS, H. E.; SALTZMAN, A. Improving nutrition through biofortification: A review of evidence from HarvestPlus, 2003 through 2016. **Global Food Security**, v. 12, n. January, p. 49–58, 2017.

MESSIAS, R. S., et al. Isolation of high quality rna from grains of diferente maize varieties. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, 45, 140108064118000, 2014.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

CHENG, S.; WILLMANN, M. R.; CHEN, H.; SHEEN, J. Update on Calcium Signaling through Protein Kinases. The Arabidopsis Calcium-Dependent Protein Kinase Gene Family 1. **Plant Physiology**, v. 129, n. June, p. 469–485, 2002.

GIAMPIERI, F.; TULIPANI, S.; ALVAREZ-SUAREZ, J. M.; QUILES, J.; MEZZETTI, B.; BATTINO, M. The strawberry: Composition, nutritional quality, and impact on human health. **Nutrition**, v. 28, n. 1, p. 9–19, 2012.