

CONSTRUÇÃO DO VETOR *PGWGFP-GENET* PARA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA EM FUNGOS MEDIADA POR *Agrobacterium tumefaciens*

Igor Kelvyn Cavalcante LOBO¹; Rogério Eiji HANADA²; Nelcimar Reis SOUSA³; Gilvan Ferreira da SILVA⁴
¹Bolsista PIBIC/CNPq-INPA; ²Orientador INPA-CPAA; ³Colaboradora – Embrapa Amazônia Ocidental;
⁴Co-orientador – Embrapa Amazônia Ocidental

1. Introdução

A sofisticação e maior eficiência das técnicas de sequenciamento concederam maior praticidade para se obter sequências de genes, aumentando a quantidade de dados disponibilizados. Diante disso, o grande gargalo, atualmente, torna-se não mais conhecer a sequência e seus pares de bases, mas elucidar uma possível função biológica de dada sequência (Jeon *et al.*, 2008). O método mediado por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT), uma das mais eficientes formas de transformação genética, se sobressai, quando comparado com métodos convencionais, como, por exemplo, através de protoplastos. ATMT também é utilizada em trabalhos com silenciamento de gene, tanto por meio de deleção (*knockout*) e RNA de interferência (*knockdown*), quanto por mutagênese insercional (Mullins *et al.* 2001; Rho *et al.* 2001; Okamoto *et al.* 2010; Paz *et al.* 2011). Outra ferramenta importante consiste no gene repórter *gfp* (*Green Fluorescent Protein*), utilizado para monitoramento dos padrões de expressão e detecção de fungos no hospedeiro e em substratos (Du *et al.* 1999; Banno *et al.* 2003; Saitoh *et al.* 2008).

Fungos do gênero *Fusarium* são mais amplamente transformados com plasmídeos que portam o gene de resistência ao antibiótico higromicina (gene *hph*) (Visser *et al.* 2004; Xiao *et al.* 2013). A construção do plasmídeo *pGWGFP-GENET*, portando em uma única construção o gene *gfp* e a marca de seleção que confere resistência à geneticina (gene *nptII*), traz como vantagens além da detecção de fungos *in vivo* no hospedeiro, a possibilidade de se utilizar o plasmídeo em combinação com o plasmídeo *pFANTai*, próprio para o silenciamento em estudos de função de genes, que contém o gene *hph* como marca de seleção. Deste modo, os objetivos deste trabalho foram construir o plasmídeo *pGWGFP-GENET*, portando o gene *gfp* e a marca de seleção que confere resistência ao antibiótico geneticina, e validá-lo em *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC), agente causal do Mal-do-Panamá em bananeiras, uma das principais doenças para a cultura de bananas no mundo.

2. Material e Métodos

2.1 Construção do vetor binário *pGWGFP-GENET*

O fragmento de aproximadamente 3,5 kb, contendo o terminador *NcTerm*, o gene *nptII*, os promotores *Pgap3d* e *PtoxA*, o gene *gfp* e o terminador *Tnos*, foi amplificado a partir do vetor *pGenGFP* e, posteriormente, clonado no vetor *pPGW* (Ugent), dando origem ao vetor binário *pGWGFP-GENET*. A montagem do vetor binário foi mediada pela enzima *LR Clonase II* (*Invitrogen*), segundo recomendações do fabricante. Os *primers* utilizados na reação de PCR para amplificação do fragmento de interesse (AttB1T3: 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT AATTAACCCTCACTAAAGGG-3' e AttB2T5: 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT TAATACGACTCACTATAGGG-3') tiveram as regiões de recombinação desenhadas segundo o Manual do Usuário (*Invitrogen*).

2.2 Testes de concentração letal

Os testes de dose letal para os isolados da raça 2 de FOC foram realizados com os esporos coletados após dois dias de crescimento em meio BD ¼ (0,5 g L⁻¹ de peptona, 2,5 g L⁻¹ de dextrose, 0,375 g L⁻¹ de caseína, 0,5 g L⁻¹ de extrato de levedura e 62,5 g L⁻¹ de batata) a 25 °C. Os esporos foram filtrados em gaze, contados em câmara de *Neubauer* e diluídos para 10⁷ esporos. Foram, então, avaliadas concentrações de 50 a 350 µg mL⁻¹ de geneticina, suplementando o meio de cultura BDA (2 g L⁻¹ de peptona, 10 g L⁻¹ de dextrose, 16 g L⁻¹ de ágar, 1,5 g L⁻¹ de caseína, 2 g L⁻¹ de extrato de levedura e 250 g L⁻¹ de batata).

2.3 Transformação de FOC

A transformação de FOC foi realizada utilizando a linhagem AGL-1 de *Agrobacterium tumefaciens*, portando o plasmídeo *pGWGFP-GENET*. Os esporos foram obtidos conforme já descrito. O co-cultivo foi preparado com 10⁷ esporos, na proporção volumétrica de 1:1 (esporos:bactérias), sendo incubado a 22 °C, por 48 horas. Após 48 horas, a mistura foi centrifugada e diluída em meio BD (BDA sem ágar). Três alíquotas de 300 µL cada foram plaqueadas em meio de cultura BDA, suplementado com 350 µg mL⁻¹ de geneticina e 400 µg mL⁻¹ de cefotaxima. As placas foram, então, incubadas a 25 °C. A cultura em meio líquido foi mantida em agitação de 150 rpm, a 25 °C.

3. Resultados e Discussão

Foi construído o vetor binário *pGWGFP-GENET*, portando a marca de seleção que confere resistência ao antibiótico geneticina (gene *nptII*) e o gene *gfp*. O gene *gfp* é controlado pelo promotor *PtoxA*, de *Pyrenophora tritici-repentis*, seguido do terminador *Tnos*. O gene *nptII* está sob o controle do promotor

Pgap3, de *Cochliobolus heterostrophus*, seguido do terminador *NcTerm*. A construção foi realizada de modo que a transcrição dos genes ocorra em sentidos contrários (Figura 1):

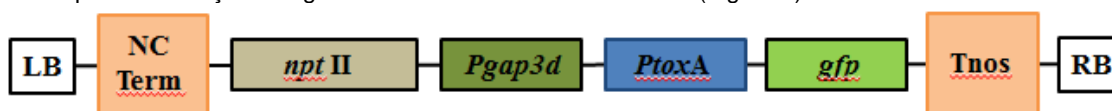


Figura 1. Cassete de 3,5 kb em forma linear. As bordas direita e esquerda estão indicadas como *RB* (*Right Border*) e *LB* (*Left Border*), respectivamente. As setas indicam o sentido da transcrição de cada gene.

Transformações *ATMT* são vantajosas, quando comparadas a métodos convencionais de transformação. *ATMT* não requer o uso de protoplastos, podendo ser utilizados, conídios, micélios, simplificando mais ainda o processo de mutagênese, visto que a obtenção de protoplastos consiste em um processo laborioso. Além disso, há uma maior taxa de transformantes com únicas inserções do fragmento de interesse no genoma, facilitando o posterior isolamento do gene de interesse (Michielse e Hooykaas, 2005).

A concentração de $350 \mu\text{g mL}^{-1}$ do antibiótico geneticina mostrou-se letal aos esporos de FOC e a transformação resultou em 4 transformantes putativos, resistentes ao antibiótico (Figura 2).

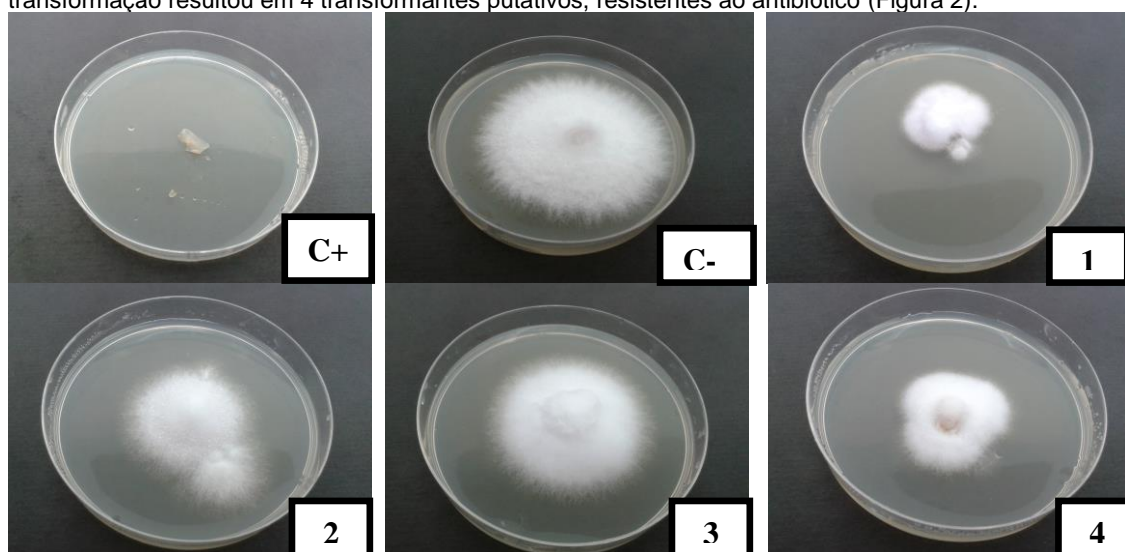


Figura 2. Transformantes putativos. **C-**: Controle sem antibiótico no meio de cultura; **C+**: Controle com $350 \mu\text{g mL}^{-1}$ de geneticina suplementando o meio de cultura; **1, 2, 3 e 4**: transformantes putativos com $350 \mu\text{g mL}^{-1}$ de geneticina suplementando o meio de cultura BDA.

Os transformantes putativos 1, 2, 3 e 4 mostram-se resistentes à dose letal de $350 \mu\text{g mL}^{-1}$ de geneticina, o que indica que o inserto pode estar sendo expresso no genoma do fungo. Porém, necessitando de mais análises, como PCR para confirmação da presença do fragmento no genoma, bem como a microscopia de fluorescência, para avaliação da expressão do gene *gfp*. No presente momento, estas análises ainda estão em andamento.

4. Conclusão

Foi encontrada como dose letal $350 \mu\text{g mL}^{-1}$ de geneticina para os esporos de FOC e o vetor binário *pGWGFP-GENET* foi construído e seu processo de validação está em andamento, sendo que até o presente momento, foram obtidos 4 transformantes putativos resistentes ao antibiótico geneticina.

5. Referências Bibliográficas

- Banno, S.; Kimura, M.; Tokai, T.; Kasahara, S.; Higa-Nishiyama, A.; Takahashi-Ando, N.; Hamamoto, H.; Fujimura, M.; Staskawicz, B.J.; Yamaguchi, I. 2003. Cloning and characterization of genes specifically expressed during infection stages in the rice blast fungus. *FEMS Microbiology Letters*, 222: 221-227.
- Du, W.; Huang, Z.; Flaherty, J.E.; Wells, K.; Payne, G.A. 1999. Green Fluorescent Protein as a Reporter To Monitor Gene Expression and Food Colonization by *Aspergillus flavus*. *Applied and environmental microbiology*, 65(2): 834-836.
- Jeon, J.; Choi, J.; Park, J.; Lee, Y. 2008. Functional genomics in the rice blast fungus to unravel the fungal pathogenicity. *Journal of Zhejiang University Science B*, 9 (10): 747-752.
- Michielse, C.B.; Hooykaas, P.J.J. 2005. Agrobacterium-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Curr Genet*, 48: 1-17.
- Mullins, E.D.; Chen, X.; Romaine, P.; Raina, R.; Geiser, D.M.; Kang, S. 2001. *Agrobacterium*-Mediated Transformation of *Fusarium oxysporum*: An Efficient Tool for Insertional Mutagenesis and Gene Transfer. *The American Phytopathological Society*, 91(2): 173-180.
- Okamoto, T.; Yamada, M.; Sekiya, S.; Okuhara, T.; Taguchi, G.; Inatomi, S.; Shimosaka, M. 2010. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the vegetative dikaryotic mycelium of the cultivated mushroom *Flammulina velutipes*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 74(11): 2327-2329.
- Paz, Z.; García-Pedrajas, M.D.; Andrews, D.L.; Klosterman, S.J.; Baeza-Montañez, L.; Gold, S.E. 2011. One Step Construction of *Agrobacterium*-Recombination-ready-plasmids (OSCAR), an efficient and robust tool for ATMT based gene deletion construction in fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 48: 677-684.
- Rho, H.; Kang, S.; Lee, Y. 2001. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated Transformation of the Plant Pathogenic Fungus, *Magnaporthe grisea*. *Molecules and Cells*, 12(3): 407-411.
- Saitoh, K.; Nishimura, M.; Kubo, Y.; Hayashi, N.; Minami, E.; Nishizawa, Y. 2008. Construction of a Binary Vector for Knockout and Expression Analysis of Rice Blast Fungus Genes. *Bioscience, biotechnology and biochemistry*, 72(5): 1380-1383.
- Visser, M.; Gordon, T. R.; Wingfield, B. D.; Wingfield, M.J.; Viljoen, A. 2004. Transformation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*, causal agent of Fusarium wilt of banana, with the green fluorescent protein (GFP) gene. *Australasian Plant Pathology*, 33: 69-75.
- Xiao, R. F.; Zhu, Y. J.; Li, Y. D.; Liu, B. 2013. Studies on vascular infection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* Race 4 in banana by field survey and green fluorescent protein reporter. *ESci J. Plant Pathol.*, 2(1): 44-51.