

CONSTRUÇÃO DOS VETORES PGWGFP-BAR E PGWGFP-CBXR PARA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA EM FUNGOS MEDIADA POR *Agrobacterium tumefaciens*

Igor Kelyvn Cavalcante LOBO¹; Rogério Eiji HANADA²; Nelcimar Reis SOUSA³; Gilvan Ferreira da SILVA³

¹Bolsista PAIC/FAPEAM/INPA; ²Orientador CPPF/INPA; ³Co-orientador Embrapa-CPPA

1. Introdução

Os dados genômicos têm criado uma demanda crescente por ferramentas e metodologias para o estudo da função dos genes (Jeon *et al.*, 2008). A transformação via *Agrobacterium tumefaciens* tem sido utilizada como uma eficiente ferramenta para análise funcional de genes, bem como para mutagênese insercional, transferência de genes e *knockout* (Rho *et al.*, 2001; Okamoto *et al.*, 2010; Mullins *et al.*, 2000; Paz *et al.*, 2011). O entendimento do funcionamento do gene, com base em seu perfil de expressão, contextualiza o gene *gfp* (*Green Fluorescent Protein*) fusionado a promotores como sendo utilizado para monitoramento dos padrões de expressão, além de ser de extrema importância para a detecção de fungos no hospedeiro e em substratos (Saitoh *et al.*, 2008; Banno *et al.*, 2003; Du *et al.*, 1999). A construção de plasmídeos contendo o gene *gfp* e as marcas de seleção *bar* e *cbxr* é uma forma de obter em uma única construção vantagens que vão desde a detecção dos fungos *in vivo* no hospedeiro à redução dos custos da transformação, fazendo uso de agentes seletivos menos dispendiosos em opção ao uso de higromicina. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi construir os vetores binários **PGWGFP-BAR** e **PGWGFP-CBXR** carregando gene repórter *gfp* e as marcas de seleção que conferem resistência a bialafos e carboxina.

2. Material e Métodos

Para a construção dos vetores binários, o produto de PCR contendo o cassete com gene que codifica a proteína GFP (*green fluorescent protein*) e com os promotores *PtoxA* e *PtrpC* foi clonado no vetor **pDONR P1-P5r** (Invitrogen) para formar o vetor de entrada **pENTRGFP**. Os fragmentos contendo os genes *bar* e *cbxr* foram clonados em vetores doadores **pDONR P5-P2** (Invitrogen), dando origem aos *entry* clones **pENTRBAR** e **pENTRCBXR**. As reações de clonagens foram mediadas pela enzima BP Clonase II (Invitrogen), conforme recomendações do fabricante. Para a construção de **PGWGFP-BAR** e **PGWGFP-CBXR**, foram usados os vetores "destino" **pPGW** (Ugent-Belgium) e de "entrada" **pENTRGFP**, **pENTRBAR** e **pENTRCBXR** e a clonagem foi realizada com a enzima LR Clonase II (Invitrogen), conforme recomendações do fabricante. Para selecionar os fungos usando resistência a bialafos e carboxina, foram realizados testes de concentração letal com glifosato a partir da suplementação do meio BDA com diversas concentrações do herbicida Roundup. Os testes para fragmentos de hifas de *Mycosphaerella fijiensis* ocorreram no intervalo de 100 µg mL⁻¹ a 3 mg mL⁻¹, enquanto os testes com os conídios de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* foram feitos nas concentrações de 100-500 µg mL⁻¹, numa razão de 100 µg mL⁻¹. Posteriormente, aumentaram-se as concentrações para o intervalo de 20-80 mg mL⁻¹, a uma razão de 10 mg mL⁻¹, sendo 100 mg mL⁻¹ a última concentração testada.

3. Resultados e Discussão

Para realizar as transformações mediadas por *A. tumefaciens* foi usado como "destino" o vetor binário **pPGW**, resultando na construção dos plasmídeos **PGWGFP-BAR** e **PGWGFP-CBXR**, contendo, respectivamente, os genes *bar* e *cbxr* e ambos contendo o gene repórter *gfp*. A montagem dos cassetes compostos pelos genes *gfp-bar* e *gfp-cbxr* é mostrada nas Figuras 1 e 2, onde o gene *gfp* é controlado pelo promotor *PtoxA* e as marcas de seleção, *bar* e *cbxr*, que conferem resistência a bialafos (DeBlock *et al.*, 1987) e carboxina (Honda *et al.*, 2000), respectivamente, estão sob controle do promotor *PtrpC*, de *Aspergillus nidulans* (Hamer e Timberlake, 1987). A construção foi realizada de modo que a transcrição ocorresse em orientação oposta entre os dois genes.

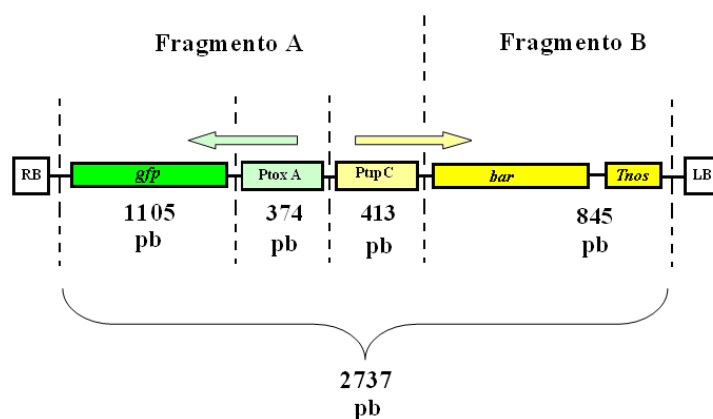


Figura 1 - Esquema representando a construção do vetor binário **pGWGFP-BAR**. As bordas direita e esquerda estão indicadas como RB e LB, respectivamente. O cassete foi montado por meio da clonagem dos fragmentos A e B, usando o sistema Gateway. A cor verde em tom escuro representa o gene *gfp* (*Green fluorescent protein*) e em tom claro, o promotor *Ptox A*, que controla a transcrição do *gfp*. A cor amarelo em tom escuro representa o gene *bar* e o terminador *Tnos* e em tom claro, o promotor *Ptrp C*, que controla a transcrição do gene *bar*.

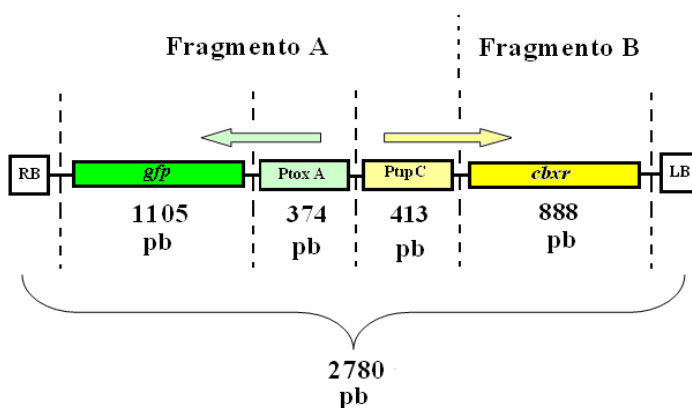


Figura 2 - Esquema representando a construção do vetor binário **pGWGFP-CBXR**. As bordas direita e esquerda estão indicadas como RB e LB, respectivamente. O cassete foi montado por meio da clonagem dos fragmentos A e B, usando o sistema gateway. A cor verde em tom escuro representa o gene *gfp* (*Green fluorescent protein*) e em tom claro, o promotor *Ptox A*, que controla a transcrição do *gfp*. A cor amarelo em tom escuro representa o gene *cbxr* e em tom claro, o promotor *Ptrp C*, que controla a transcrição do gene *cbxr*.

A concentração letal mínima de glifosato para *M. fijiensis* foi obtida com 2 mg mL^{-1} (Figura 3). Enquanto que nenhuma diferença foi detectada entre os controles e os isolados de *F. oxysporum* f. sp. *cube* submetidos ao glifosato nos intervalos de concentração testados. Realizou-se, então, novo experimento com um aumento nas concentrações (20 a 100 mg mL^{-1}), no qual permaneceu pouca redução do crescimento em relação ao controle nas doses de 20 a 80 mg mL^{-1} , havendo maior inibição de crescimento apenas em 100 mg mL^{-1} , não sendo registrada a letalidade necessária (Figura 4). A alta concentração determinada para *M. fijiensis*, além das respostas insatisfatórias com *F. oxysporum* f. sp. *cube*, levaram a realizar novos testes com glufosinato de amônio. Além disso, no estudo futuro, será determinada a dose letal de carboxina para ambos os fungos visando a seleção de transformantes resistentes a este agente seletivo. Após a determinação das doses letais será realizada a validação dos vetores (**pGWGFP-BAR** e **pGWGFP-CBXR**) os quais serão utilizados para transformação dos fitopatógenos *M. fijiensis* e *F. oxysporum* f. sp. *cube*.

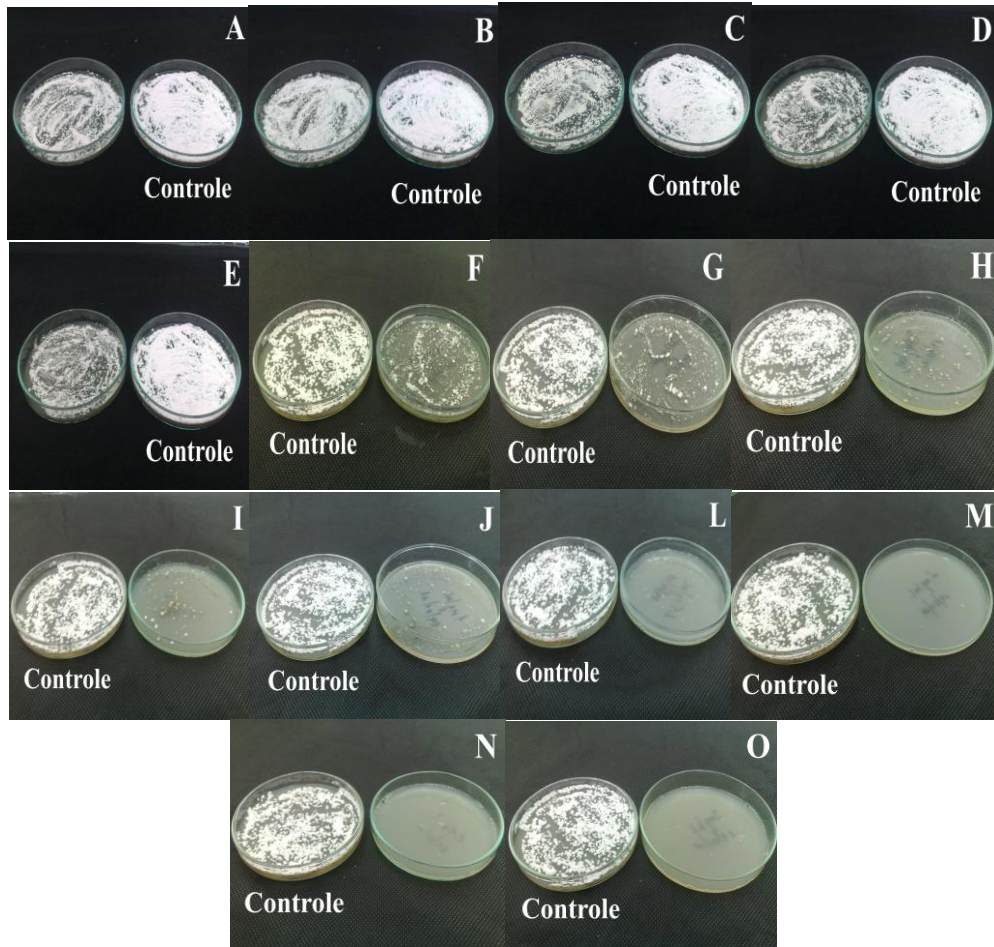


Figura 3 - Sensibilidade do isolado 18 de *Mycosphaerella fijiensis* em variadas concentrações de Roundup (Monsanto) após 15 dias do plaqueamento dos fragmentos de hifas. **A** (Controle e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$), **B** (Controle e $200 \mu\text{g mL}^{-1}$), **C** (Controle e $300 \mu\text{g mL}^{-1}$), **D** (Controle e $400 \mu\text{g mL}^{-1}$), **E** (Controle e $500 \mu\text{g mL}^{-1}$), **F** (Controle e $600 \mu\text{g mL}^{-1}$), **G** (Controle e $700 \mu\text{g mL}^{-1}$), **H** (Controle e $800 \mu\text{g mL}^{-1}$), **I** (Controle e $900 \mu\text{g mL}^{-1}$), **J** (Controle e 1 mg mL^{-1}), **L** (Controle e $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$), **M** (Controle e 2 mg mL^{-1}), **N** (Controle e $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$) e **O** (Controle e 3 mg mL^{-1}).

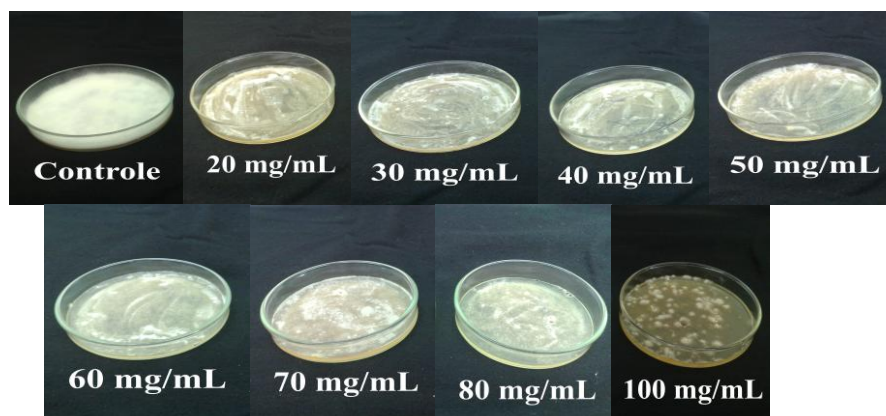


Figura 4 - Sensibilidade dos conídios de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* após 10 dias de plaqueamento em doses até 100 mg mL^{-1} de Roundup (Monsanto).

4. Conclusão

Foram construídos dois vetores binários, **pGWGFP-BAR** e **pGWGFP-CBXR**, carregando simultaneamente o gene repórter *gfp* e, respectivamente, os genes *bar* e *cbxr*. Os vetores serão validados na transformação de isolados de *M.fijiensis* e *F. oxysporum* f. sp. *ubense*, para a obtenção de transformantes resistentes a bialafos e a carboxina. Tais vetores permitirão a localização celular durante o processo de interação planta-patógeno e os cassetes (*gfp-bar* ou *gfp-cbxr*) poderão ser usados também para silenciamento (*knockout*), o que auxiliará na detecção histológica do patógeno e ao mesmo tempo no estudo da função do gene silenciado.

5. Referências

- 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.
- DeBlock, M.; Botterman, J.; Vandewiele, M.; Dockx, J.; Thoen, C.; Gossele, V.; Rao Mowa, N.; Thompson, C.; Van Montagu, M.; Leemans, J. 1987. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *EMBO J.*, 6: 2513-2518.
- 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.
- Hamer, J.E.; Timberlake, W.E. 1987. Functional Organization of the *Aspergillus nidulans* trpC Promoter. *Molecular and Cellular Biology*, 7(7): 2352-2359.
- Honda, Y.; Matsuyama, T.; Irie, T.; Watanabe, T.; Kuwahara, M. 2000. Carboxin resistance transformation of the homobasidiomycete fungus *Pleurotus ostreatus*. *Curr. Genet.*, 37: 209-212.
- 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.
- Mullins, E.D.; Chen, X.; Romaine, P.; Raina, R.; Geiser, D.M.; Kang, S. 2000. *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 PlantPathogenic 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.