

## AMPLIFICAÇÃO DE GENES *FaCYP707A* POR PCR (REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE) E PROPAGAÇÃO DE VETORES VIRAIS PARA CLONAGEM

HUGO CARLOS BOLZON GONZALEZ<sup>1</sup>; VITÓRIA HIRDES GLENZEL<sup>2</sup>;  
VANESSA GALLI<sup>3</sup>; CESAR VALMOR ROMBALDI<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – hugocarlos.bg@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – vitoriaglenzel@gmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – vane.galli@yahoo.com.br

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – cesarvrf@ufpel.edu.br

### 1. INTRODUÇÃO

O morango (*Fragaria*  $\times$  *ananassa* Duch.) é um pseudofruto, doravante denominado fruto, de grande valia econômica, apresentando ainda importância nutricional, tendo em vista suas características organolépticas. O fruto é rico em compostos bioativos como compostos fenólicos e antocianinas. Este potencial fitoquímico fornece propriedades benéficas à saúde, desempenhando ações neuroprotetoras, antimicrobianas, antioxidantes, sendo assim reconhecido como um alimento funcional. (GIAMPIERI et al., 2012).

Os aspectos sensoriais e biofuncionais dos frutos são amplamente influenciados pelo processo de maturação. No caso do morango, tal processo se dá pela via não climatérica, onde não há aumento da taxa respiratória, nem resposta ao etileno, ao contrário dos frutos climatéricos. Os estudos evidenciam que fitormônio ácido abscísico (ABA) apresenta importante papel na regulação do amadurecimento e da aquisição de compostos bioativos de interesse, tanto em frutos climatéricos quanto não climatéricos. (JIA et al., 2011).

O metabolismo do ABA se caracteriza por um processo de síntese *de novo* promovida pelas enzimas NCED (9-cisepoxycarotenoid dioxigenase), uma inativação reversível por glicosilação promovidas pelas enzimas BGs/GTs ( $\beta$ -glucosidases / UDP-glucosiltransferases) e uma rota de inativação irreversível promovida pelas enzimas CYP707A (Ácido Abscísico 8' – Hidroxilase 4), que é a menos elucidada das três (JIANG AND HARTUNG, 2007).

Estudos prévios do grupo identificaram por bioinformática 4 prováveis sequências *CYP707A* em transcriptoma de morango (GONZALEZ, 2018). As sequências *CYP707A* foram descritas e identificadas como *CYP707A1* (CL15525), *CYP707A2* (CL17770), *CYP707A3* (CL18454), *CYP707A4* (CL24483), as quais, a exceção da primeira descrita na literatura por JI et al. (2012), carecem de validação *in vivo*, podendo ter suas funcionalidades verificadas através do silenciamento gênico, prospectando-as como possíveis genes-alvo para ações biotecnológicas.

Neste estudo demonstra-se o uso da bioinformática no desenho de *primers* e montagem do vetor de clonagem a ser posteriormente utilizado no silenciamento gênico por VIGS - Silenciamento Gênico Induzido por Vírus - das sequências *CYP707A* em morango, bem como a obtenção *in vivo* dos fragmentos correspondentes a cada gene de interesse. Ainda é apresentando o cultivo e extração do vetor viral pTRV2 em *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  para futura clonagem e transformação

## 2. METODOLOGIA

Os *primers* para extração dos insertos a serem utilizados no silenciamento gênico foram desenhados através do programa Vector NTI Advance 11 - Invitrogen® de modo que os *amplicons* tivessem entre 250 e 400 pares de base, tendo em vista que resultados satisfatórios em silenciamento gênico por VIGS são obtidos com fragmentos amplificados com entorno de 300, 350 pares de base. A temperatura de melting ( $T_m$ ) foi mantida entre 55-62°C e o conteúdo de GC de 45-55%. Ao início de cada *primer* foram desenhadas as sequências correspondentes às enzimas de restrição a serem utilizadas na digestão e montagem do vetor TRV2 de modo a permitir a clonagem. As sequências foram amplificadas via PCR a partir de cDNA (2 µL) com auxílio da enzima *Taq DNA Polymerase*, em volume final de reação de 50 µL, com 1 µL de cada *primer* e temperatura de anelamento de 55°C e estão apresentadas na Tabela 1. O produto de PCR foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1%.

**Tabela 1.** *Amplicon* contendo sítio de restrição para os respectivos genes de interesse.

Nome	Sense	Enzima de Restrição	Sequência	Genes	<i>Amplicon</i>
CYP707A1	F	<i>Xba</i> I	GC TCTAGA GC GGCTTTGTTGGCGAGGG	CL15525	395pb**
	R	<i>Kpn</i> I	GG GGTACC C CAGTCTCAAACCTCTCCAACACAAC*		
CYP707A2	F	<i>Xba</i> I	GC TCTAGA GC GAAGGCGAGGGAGAGGC	CL17770	389pb**
	R	<i>Kpn</i> I	GG GGTACC C CAGTCTCAAACCTCTCCAACACAAC*		
CYP707A3	F	<i>Xba</i> I	GC TCTAGA G CAAAATGAAAAGGGGCAAAAC	CL18454	299pb**
	R	<i>Kpn</i> I	GGTACC GCGAAAGATATGATGCTGGC		
CYP707A4	F	<i>Kpn</i> I	GG GGTACC C CATCGTACTACCCCCAGCAA	CL24483	334pb**
	R	<i>Sac</i> I	C GAGCTC GCACCAAAGCCAAATACATTT		

\*mesmo *primer reverse* utilizado para as sequências CYP707A1 e CYP707A2 dada a similaridade das sequências.

\*\*pb = pares de base.

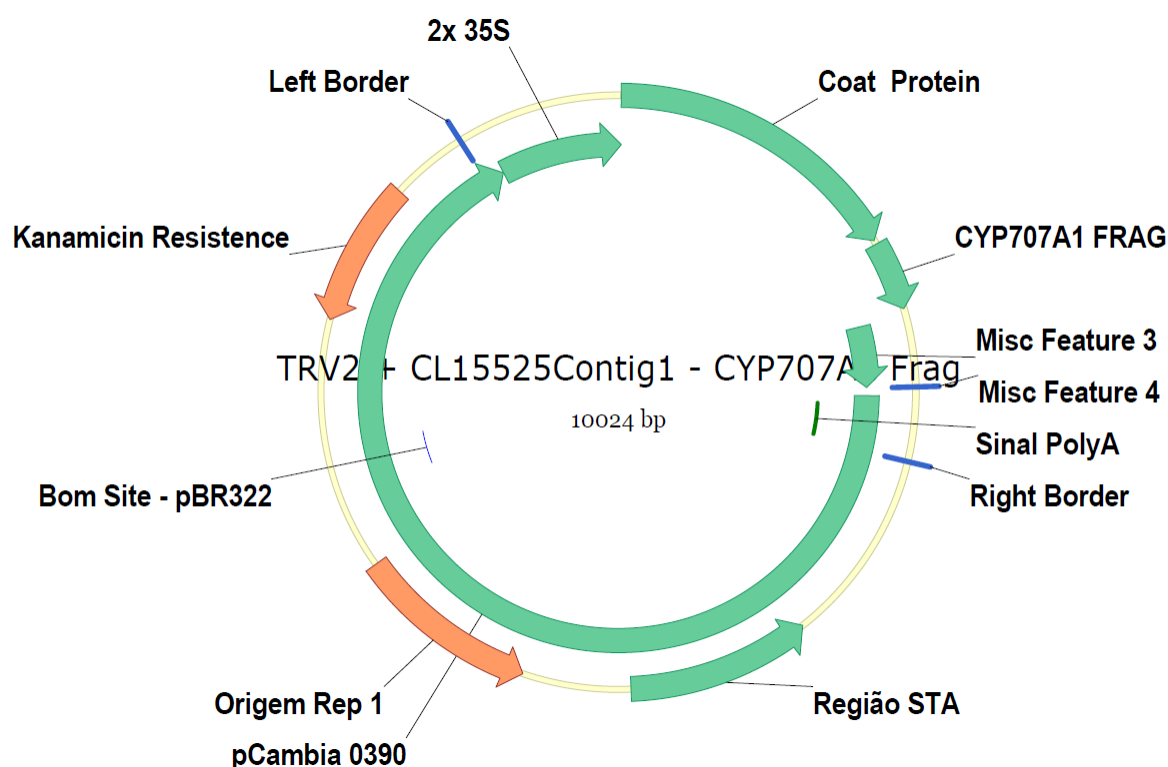
Para confirmar a compatibilidade dos insertos com o vetor de clonagem, realizou-se a digestão enzimática e montagem do vetor TRV2 com os respectivos insertos correspondentes às 4 sequências CYP707A estudadas, através do programa Vector NTI Advance 11 - Invitrogen®.

A bactéria *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  já transformada com o vetor TRV2 foi cultivada em caldo *Luria-Bertani* (LB, Difco) suplementado com 50  $\mu$ g/ml de kanamicina, seguido de uma extração de DNA plasmidial realizada através da técnica MicroPREP (LI et al., 1995).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Utilizando dos *primers* descritos acima, foi possível simular *in silico* a extração dos insertos de interesse (PCR), a digestão enzimática e a montagem do vetor TRV2 clonado, através do programa Vector NTI Advance 11 - Invitrogen®, comprovando a correta construção dos *primers* com as respectivas enzimas de restrição, compatíveis com o vetor de destino, resultando em uma clonagem bem-sucedida. O vetor clonado está representado na Figura 1.

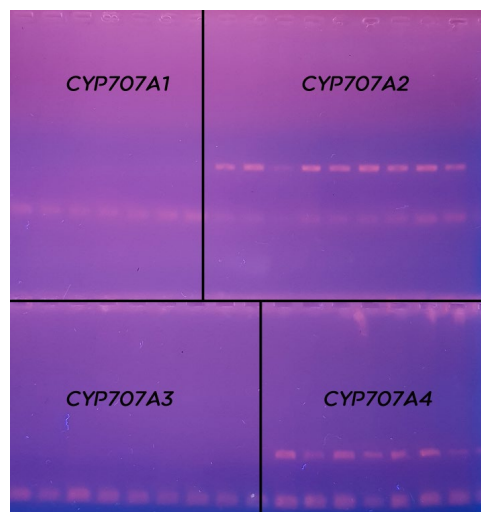
**Figura 1.** Ilustração representando o vetor TRV2 clonado com o inserto correspondente ao gene *CYP707A1*



Os insertos correspondentes a cada gene aplicados ao gel de agarose possibilitaram observar o resultado da reação. Os genes *CYP707A2* e *CYP707A4* resultaram em amplificações bem-sucedidas enquanto *CYP707A1* e *CYP707A3* não resultaram em amplificação, sugerindo que possa haver *splicing* alternativo nas sequências, um erro de sequenciamento das contigs guias, ou ainda problemas no processo de síntese dos *primers*. O gel de agarose correspondente aos fragmentos está demonstrado na Figura 2.

O processo de extração do vetor TRV2 apresentou baixo rendimento, com concentrações máximas de 26  $\mu$ g/ml, e baixa capacidade de purificação das amostras, sugerindo a necessidade da adoção de nova técnica para extração, como exemplo a MaxiPrep.

**Figura 2.** Fotografia do gel de agarose demonstrando a amplificação dos insertos correspondentes às *CYP707A2* e *CYP707A4*, além da não amplificação das sequências *CYP707A1* e *CYP707A3*.



#### 4. CONCLUSÕES

O presente estudo permitiu realizar a obtenção *in vivo* de sequências *CYP707As* em morango, ao mesmo tempo que levanta questionamentos sobre as amplificações malsucedidas. Ainda é necessário a continuação do estudo, culminando na montagem dos vetores de clonagem *in vivo*, e na transformação das plantas de modo a permitir observar as mudanças causadas pelo silenciamento dos genes na espécie. Para as sequências malsucedidas, o estudo sugere a necessidade de resíntese dos *primers*, além da possível necessidade de desenhar novas sequências para obtenção dos fragmentos correspondentes.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GIAMPIERI, F. et al. The strawberry: Composition, nutritional quality, and impact on human health. **Nutrition**, v. 28, n. 1, p. 9–19, 2012.

GONZALEZ, Hugo Carlos Bolzon **Genes *CYP707A* em *Fragaria x ananassa* Duch: identificação e caracterização funcional sob condições de estresse salino e aplicação de ácido abscísico**. 2018. 47f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) – Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

JIA, H.F.; CHAI, Y.M.; LI, C.L.; LU, D.; LUO, J.J.; QIN, L.; SHEN, Y.Y. Absciscic acid plays an important role in the regulation of strawberry fruit ripening. **Plant Physiology**, v.157, p.188–199, 2011.

JIANG, Fan; HARTUNG, Wolfram. Long-distance signalling of abscisic acid (ABA): the factors regulating the intensity of the ABA signal. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 1, p. 37-43, 2007.

LI, Xiu-Qing; STAHL, Richard; BROWN, Gregory G. Rapid micropreps and minipreps of Ti plasmids and binary vectors from *Agrobacterium tumefaciens*. **Transgenic research**, v. 4, n. 5, p. 349-351, 1995.