

Transformação de tomate Micro-Tom
com um gene tipo-*PR* de cupuaçuzeiro
(*Theobroma grandiflorum*) visando ao
estudo de função da proteína



***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da agricultura, Pecuária e Abastecimento***

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
343**

**Transformação de tomate Micro-Tom
com um gene tipo-PR de cupuaçuzeiro
(*Theobroma grandiflorum*) visando ao
estudo de função da proteína**

*Joseilde Oliveira Silva-Werneck
Leila Maria Gomes Barros
Michelly da Silva Neves
Loeni Lüdke Falcão
Lucilia Helena Marcellino*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Parque Estação Biológica
PqEB, Av. W5 Norte (final)
70970-717, Brasília, DF
Fone: +55 (61) 3448-4700
Fax: +55 (61) 3340-3624
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Unidade Responsável

Presidente
Marília Lobo Burle

Secretária-Executiva
Ana Flávia do N. Dias Côrtes

Membros
Antonieta Nassif Salomão; Diva Maria Alencar Dusi; Francisco Guilherme V. Schmidt; João Batista Teixeira; João Batista Tavares da Silva; Maria Cléria Valadares Inglis; Rosameres Rocha Galvão; Tânia da Silveira Agostini Costa

Supervisão editorial
Ana Flávia do N. Dias Côrtes

Revisão de texto
João Batista Teixeira

Normalização bibliográfica
Ana Flávia do N. Dias Côrtes

Tratamento das ilustrações
Adilson Werneck

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Adilson Werneck

Foto da capa
Joseilde O. Silva-Werneck e acervo Embrapa

1ª edição

1ª impressão (ano): tiragem

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Transformação de tomate Micro-Tom com um gene tipo-*PR* de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) visando ao estudo de função da proteína / Joseilde Oliveira Silva-Werneck... [et al.]. – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2018.

16 p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 343).

ISSN: 0102-0110
Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader
Modo de Acesso: World Wide Web

1. Transgênico. 2. Tomateiro. 3. Cupuaçu. I. Silva-Werneck, Joseilde Oliveira. II. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. III. Série

Ana Flávia do N. Dias Côrtes (CRB-1999)

631.52 – CDD 21

© Embrapa, 2018

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
Introdução.....	7
Material e Métodos	9
Resultados e Discussão	12
Conclusão.....	16
Agradecimentos.....	16
Referências	17

Transformação de tomate Micro-Tom com um gene tipo-PR de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) visando ao estudo de função da proteína

Joseilde Oliveira Silva-Werneck¹

Leila Maria Gomes Barros²

Michelly da Silva Neves³

Loeni Lüdke Falcão⁴

Lucilia Helena Marcellino⁵

Resumo – O cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) é uma espécie frutífera amazônica, cuja produção é altamente afetada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*, causador da doença vassoura-de-bruxa (VB). Diversos genes potencialmente envolvidos com a resposta ao patógeno foram identificados em cupuaçuzeiro, entre eles, alguns que codificam para proteínas do tipo PR (pathogenesis related). Neste trabalho, o gene *TgPRA* foi selecionado para estudos funcionais por expressão heteróloga em tomate Micro-Tom-*Rg1* (MT-*Rg1*). Esta planta possui interação compatível com *M. perniciosa* (biótipo-S), sendo um bom modelo para estudos sobre VB. O gene *TgPRA* foi clonado no vetor pBI121, sob o controle do promotor de *ACT2* de *Arabidopsis*. O vetor resultante, pBI121-TgPRA, contendo também o gene repórter *gus* e o de seleção *nptII*, foi inserido em *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, a qual foi usada na transformação de MT-*Rg1*. Foram obtidas plantas T0 resistentes à canamicina e que também expressaram o gene *gus*, potencialmente transformadas com o gene de interesse, o que será confirmado por análises de PCR e *Southern blot*. As plantas estão sendo cultivadas para obtenção de MT-*Rg1* em homozigose para *TgPRA*. Estas plantas serão, futuramente, submetidas a bioensaios com *M. perniciosa* e outros fungos fitopatogênicos, visando avaliar a função de *TgPRA* no desenvolvimento de VB, assim como de outras doenças, incluindo algumas de interesse para a tomaticultura.

¹ Agrônoma, Ph.D., pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

² Bióloga, Ph.D., pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

³ Graduanda em Biologia, estagiária da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁴ Agrônoma, M.Sc., analista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁵ Bióloga, Ph.D., pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Termos para indexação: tomate Micro-Tom, *Theobroma grandiflorum*, *Moniliophthora perniciosa*, *Agrobacterium tumefaciens*, transformação, gene *PR*

Transformation of tomato Micro-Tom with a cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) *PR*-like gene aiming the protein functional study

Abstract – The cupuassu tree (*Theobroma grandiflorum*) is an Amazonian fruit species, whose production is highly affected by the fungus *Moniliophthora perniciosa*, which causes the witches' broom (WB) disease. Several genes potentially involved in the response to the pathogen have been identified in cupuassu, including some that code for PR (pathogenesis related)-like proteins. In this work, the gene *TgPRa* was selected for functional studies by heterologous expression in tomato Micro-Tom-*Rg1* (MT-*Rg1*). This plant presents compatible interaction with *M. perniciosa* (biotype S), being a good model for WB studies. The *TgPRa* gene was cloned into pBI121, under the control of the Arabidopsis *ACT2* promoter. The resulting vector, pBI121-TgPRa, also containing the *gus* reporter gene and the *nptII* selection gene, was inserted into *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, which was used in the MT-*Rg1* transformation. Kanamycin resistant and GUS-positive T0 plants, potentially transformed with the gene of interest, were obtained, what will be confirmed by PCR and *Southern blot* analysis. Plants are being grown to obtain MT-*Rg1* homozygous for *TgPRa*. These plants will, in near future, be submitted to bioassays with *M. perniciosa* and other phytopathogenic fungi, aiming to evaluate the role of *TgPRa* in the development of WB, as well as other diseases, including some of interest to tomato cultivation.

Index terms: tomate Micro-Tom, *Theobroma grandiflorum*, *Moniliophthora perniciosa*, *Agrobacterium tumefaciens*, transformation, *PR* gene

Introdução

O cupuaçuzeiro, *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schumm., é uma fruteira nativa da Amazônia com enorme potencial econômico devido às múltiplas utilidades de sua polpa e amêndoas (sementes). Vários produtos são obtidos a partir do cupuaçu, como sucos, sorvetes, licores, compotas, geleias, doces, cosméticos e cupulate, produto similar ao chocolate (Calzavara et al., 1984; Nazaré et al., 1990; Alves et al., 2014). Além disso, o cupuaçuzeiro apresenta a vantagem de poder ser cultivado em sistema agroflorestal, tornando-se uma forma de cultivo sustentável e assumindo grande importância socioeconômica e ambiental para a região (Alves et al., 2014). A cultura do cupuaçu, assim como a do cacau, é afetada pela doença vassoura-de-bruxa (VB), causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*, responsável por grande redução na produção de frutos.

Para dar suporte ao programa de melhoramento desta cultura, iniciou-se a caracterização dos genes expressos em cupuaçuzeiro por RNAseq. Recentemente, foi relatada por nosso grupo, a obtenção de cerca de 8.330 ESTs (*expressed sequence tags*) de polpa e semente de cupuaçuzeiro, a partir das quais foi possível identificar diversos EST-SSRs (*EST-simple sequence repeats*) (Santos et al., 2016), assim como diversos genes com potencial envolvimento na resposta a patógenos. Dentre estes genes, foram identificados alguns codificadores de proteínas relacionadas à patogênese, proteínas PR. Estas proteínas se expressam nas plantas em resposta ao ataque de um patógeno (Van Loon, 1997), e formam um grupo diverso de proteínas que são atualmente classificadas em 17 famílias (Tabela 1), com base na sequência de aminoácidos, função biológica e reação sorológica (Van Loon; Van Strien, 1999; Van Loon et al., 2006; Gorjanović, 2009; Cao et al., 2016).

Tabela 1. Famílias de proteínas de plantas relacionadas à patogênese (PR).

Família	Propriedades	Família	Propriedades
PR-1	Desconhecida	PR-10	Similar a ribonuclease
PR-2	β -1,3-glucanase	PR-11	Quitinase tipo I
PR-3	Quitinase tipo I, II, IV, V, VI, VII	PR-12	Defensina
PR-4	Quitinase tipo I, II	PR-13	Tionina
PR-5	Similar a Taumatina	PR-14	Proteína transportadora de lipídeos
PR-6	Inibidor de proteinase	PR-15	Oxalato oxidase
PR-7	Endoproteinase	PR-16	Proteína similar à oxalato oxidase
PR-8	Quitinase tipo III	PR-17	Desconhecida
PR-9	Peroxidase		

Fonte: Van Loon et al, 2006.

Além da resposta ao patógeno, as PRs podem ser sintetizadas em situações de estresses abióticos, ferimentos e moléculas sinalizadoras como ácido salicílico (AS), etileno e jasmonato (Van Loon et al., 2006; Anil Kumar et al., 2015).

Em nossas análises do transcriptoma de cupuaçuzeiros desafiados por *M. pernicioso*, foram identificados alguns genes tipo-PR, cuja expressão foi alterada na presença do patógeno (Silva, 2015). Para um estudo mais detalhado, selecionamos um dos genes, aqui denominado *TgPRA*, para análise funcional por expressão heteróloga em tomate (*Solanum lycopersicum*) variedade Micro-Tom-*Rg1* (MT-*Rg1*). A escolha desta planta se deve ao fato de MT apresentar interação compatível com *M. pernicioso* (biótipo-S) e desenvolver sintomas similares aos da VB em cacau (Marelli et al., 2009). Além disso, por ter um ciclo de vida curto e ser de relativa facilidade de transformação, MT se torna um bom modelo de estudo de genes envolvidos na resposta a *M. pernicioso*. Recentemente, este sistema foi utilizado para a avaliação de gene *tcBax1* de cacau, codificadora de uma proteína atenuadora de morte celular programada, tendo sido demonstrada a diminuição de sintomas de VB em tomate transgênico (Scotton et al., 2016). Aqui, reportamos a obtenção de tomate MT-*Rg1* transformado com *TgPRA* para futuros estudos funcionais desta proteína *in planta*.

Material e Métodos

Material vegetal

Sementes de tomate MT-Rg1 (Pino et al., 2010) foram gentilmente cedidas pelo Dr. Lázaro E. P. Peres, provenientes da coleção de mutantes de tomateiro Micro-Tom do Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento, da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ - USP (São Paulo, Brasil). Para multiplicação das sementes, as mesmas foram plantadas em vasos, contendo mistura de latossolo vermelho, areia lavada, adubo orgânico de gado, na proporção de 3:1:1, complementado com calcário e adubo químico NPK (3-17-0). As plantas foram cultivadas em casa de vegetação, na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, até a produção dos frutos. As sementes foram extraídas de tomates maduros, secadas no laboratório sobre papel pardo e armazenadas na geladeira (4°C).

Construção do vetor pBI121-TgPRa

O vetor binário pBI121-TgPRa foi construído utilizando como base o vetor pBI121 (Chen et al., 2003). Inicialmente, foi sintetizado o cassete de expressão do gene *TgPRa*, consistindo de promotor de *ACT2* (promotor de *actina* de *Arabidopsis thaliana*), região codificante do gene *TgPRa* e o terminador *nos* (nopalina sintase). Este cassete, de 2,3 kb, foi então clonado no sítio de restrição de HindIII de pBI121, resultando no vetor pBI121-TgPRa, contendo também o gene repórter *gus* (β -glucoronidase) e o gene *nptII* (neomicina fosfotransferase) para seleção de plantas transformadas. Além destes, o plasmídeo contém o gene *kanR* para a seleção de clones de *A. tumefaciens* transformados. O vetor foi construído por Epoch Life Science Inc (Texas, USA).

Transformação de *Agrobacterium tumefaciens* com pBI121-TgPRa

O plasmídeo pBI121-TgPRa foi introduzido em *A. tumefaciens* GV3101 via eletroporação, conforme Lacorte e Romano (Lacorte; Romano, 2015). Foram utilizados 10 ng do vetor, 50 μ L de células competentes e ele-

troporação a 2,2 kV, 200 Ω , 25 μ F, em eletroporador Micropulse (BioRad). Em seguida, as células foram cultivadas em meio LB (triptona 10 g.L⁻¹, NaCl 10 g.L⁻¹, extrato de levedura 5 g.L⁻¹, pH 7,0) por 2 h, a 28°C, 180 rpm. A seleção das bactérias transformadas foi realizada em LB-ágar contendo canamicina (100 mg.L⁻¹), rifampicina (50 mg.L⁻¹) e gentamicina (50 mg.L⁻¹) e incubação a 28°C, por 48-72 h.

PCR para detecção do gene *gus* em *A. tumefaciens*

Transferiu-se uma colônia isolada de *A. tumefaciens* transformada com pBI121-TgPRa para um tubo de PCR contendo 25 μ L de água MilliQ. As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 50 μ L nas seguintes condições: tampão de PCR 1 X (Ludwig Biotec), MgCl₂ 2,0 mM (Ludwig Biotec), dNTP mix 0,2 mM (Invitrogen), primer gusF1 (5'-CTATCAGCTCTTTAATCGCCTGTAAG-3') 0,4 μ M, primer gusR1 (5'-GTGAAGGTTATCTCTATGAACTGTGC-3') 0,4 μ M e Taq DNA Polimerase (Ludwig Biotec) 2,5 U. Como controles negativos, utilizou-se água MilliQ e uma colônia de *A. tumefaciens* GV3101 não transformada. Como controles positivos, utilizou-se DNA purificado do vetor pBI121 (10 ng) e uma colônia do clone de pBI121. As reações foram realizadas em termociclador (BioRad MJ Mini), utilizando-se o seguinte programa: 94°C/4 min, 30 ciclos a 94°C/40 seg, 52°C/40 seg, 72°C/40 seg, e extensão final a 72°C/5 min. Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose 1%, em tampão TBE 0,5X (Trizma-base 45 mM, Ácido bórico 45 mM, EDTA 1,0 mM) corado com brometo de etídio (0,5 mg.L⁻¹).

Transformação e regeneração de tomate MT-*Rg1*

A metodologia de transformação de MT-*Rg1* foi adaptada de diversos trabalhos (Dan et al., 2006; Sun et al., 2006; Abu-el-Heba; Hussein, 2008; Pino et al., 2010).

Cerca de 150 sementes de tomate MT-*Rg1* foram hidratadas por 1 h em água destilada, à temperatura ambiente (TA). Em seguida, foram descontaminadas substituindo-se a água por etanol 70% e incubação por 5 min à TA. Retirou-se o etanol, adicionou-se hipoclorito de sódio à concentração de 2,0%-2,5% de cloro ativo, contendo Tween-20 a 0,05% e o material foi incu-

bado à TA por 40 min, agitando-se frequentemente. Em capela de fluxo laminar, o hipoclorito foi retirado e as sementes lavadas 4 vezes com água MilliQ estéril. Após a última lavagem, as sementes foram vertidas sobre papel-filtro estéril e transferidas para placas de Petri (30 sementes por placa) contendo meio de germinação, composto por 0,5 x sais de MS, 0,5 x vitaminas B5, sacarose 15 g.L⁻¹, ágar 7 g.L⁻¹, pH 5,6 (Murashige; Skoog, 1962; Gamborg et al., 1968). Incubou-se em sala de cultivo in vitro, a 26°C, por 6 dias no escuro, seguido por dois dias com fotoperíodo de 16 h. As demais incubações foram realizadas nas seguintes condições: temperatura de 26°C ± 2, fotoperíodo de 16 h (lâmpadas frias, brancas e fluorescentes) e luminosidade de aproximadamente 5.500 lx. Dois dias antes da transformação, o clone de *A. tumefaciens* transformado com o vetor pBI121-TgPRa foi inoculado em 2 mL de meio LB contendo rifampicina 50 mg.L⁻¹, gentamicina 50 mg.L⁻¹ e canamicina 100 mg.L⁻¹, e incubado a 28°C, 180 rpm, por 24 h. Em seguida, foram espalhados 150 µL da cultura sobre LB-ágar, contendo os mesmos antibióticos seletivos, e incubou-se a 28°C, por 24 h. Ressuspendeu-se a agrobactéria em meio de cocultura líquido (sais de MS, vitaminas B5, sacarose 30 g.L⁻¹, pH 5,6, acetoseringona 40 mg.L⁻¹), ajustou-se a OD (A600) para aproximadamente 0,4 e distribuiu-se a suspensão em placas de Petri. Segmentos de cotilédones (explantos) de plântulas com 8 dias de idade foram incubados na suspensão de *A. tumefaciens* transformada, ou em meio de cocultura (controle), por aproximadamente 20 minutos. Em seguida, os explantes foram secos em papel-filtro estéril e transferidos para meio de cocultura sólido (sais de MS, vitaminas B5, sacarose 30 g.L⁻¹, ágar 7,0 g.L⁻¹, pH 5,6, acetoseringona 40 mg.L⁻¹, zeatina 1,0 mg.L⁻¹, BAP 1,0 mg.L⁻¹), em placas de Petri, com o lado abaxial para baixo. Os explantes foram incubados em sala de cultivo in vitro, no escuro, por dois dias. Após este período, os explantes foram transferidos para placas de Petri contendo meio de regeneração (sais de MS, vitaminas B5, sacarose 30 g.L⁻¹, ágar 7,0 g.L⁻¹, pH 5,6, zeatina 1,0 mg.L⁻¹, BAP 1,0 mg.L⁻¹), contendo carbenicilina 500 mg.L⁻¹, timentin 300 mg.L⁻¹ e canamicina 50 mg.L⁻¹. Para os explantes controles, não foi adicionada canamicina ao meio. Os explantes foram cultivados em sala de cultivo in vitro, por aproximadamente 3 semanas, com uma transferência para o mesmo meio depois de aproximadamente 15 dias. Após a regeneração, os brotos foram transferidos para meio de alongamento (sais de MS, vitaminas B5, sacarose 30 g.L⁻¹, ágar 7,0 g.L⁻¹, pH 5,6, zeatina 0,5 mg.L⁻¹), contendo carbenicilina 500 mg.L⁻¹,

timentin 300 mg.L⁻¹ e canamicina 50 mg.L⁻¹, em placas de Petri, e cultivados em sala de cultivo in vitro, por aproximadamente 3 semanas. Os brotos regenerados foram transferidos para frascos de vidro contendo meio de enraizamento (sais de MS, vitaminas B5, sacarose 30 g.L⁻¹, ágar 7 g.L⁻¹, pH 5,6, AIB 1,0 mg.L⁻¹), adicionado de carbenicilina 500 mg.L⁻¹, timentin 300 mg.L⁻¹ e canamicina 50 mg.L⁻¹, e mantidos em sala de cultivo in vitro até enraizamento suficiente para aclimação em solo.

Ensaio histoquímico de GUS para detecção de plantas positivas

O teste histoquímico de GUS (β -glucuronidase) foi realizado de acordo com Lacorte e Barros (Lacorte; Barros, 2015). Fragmentos de folhas ou raízes foram incubados em microtubos de 1,5 mL contendo tampão de reação [tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,0, ferricianeto de potássio 2,0 mM, Na₂EDTA.2H₂O 10 mM, Triton X-100 0,1%, X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucoronídeo) 1,0 mM], em volume suficiente para cobrir a amostra, no escuro, a 37°C, por 16 a 18 h. Em seguida, retirou-se o tampão de reação e adicionou-se etanol 70%. Após 24 a 48 horas, fazendo algumas trocas do etanol, as amostras foram observadas a olho nu ou sob lupa.

Resultados e Discussão

Um gene tipo-*PR* identificado no transcriptoma do cupuaçuzeiro, denominado *TgPRA*, foi selecionado para avaliação funcional em tomate MT-*Rg1*. Inicialmente, este gene foi clonado no vetor pBI121 (14.758 pb), sob o controle do promotor de *ACT2* e terminador *nos*. O plasmídeo resultante, pBI121-TgPRA, está representado na figura 1.

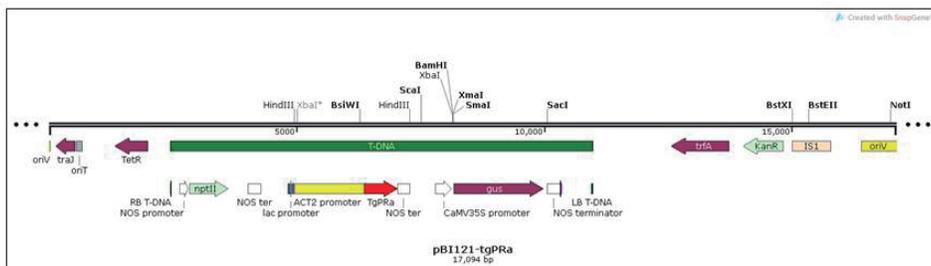


Figura 1. Representação esquemática linear do plasmídeo pBI121-TgPRA. O T-DNA possui 8,5 Kb e compreende o segmento entre a borda direita (RB) e a borda esquerda (LB), contendo o gene de interesse *TgPRA* sob o controle do promotor de *ACT2*, o gene repórter *gus* e o gene *nptII* que confere resistência à canamicina.

Nesta construção, o gene *TgPRA* está sob o controle do promotor do gene *actina 2* (*ACT2*) de *Arabidopsis*, que regula a expressão constitutiva em tecidos vegetativos. Em estudos de atividade regulatória, usando o sistema do gene repórter *gus*, o promotor de *ACT2* mostrou-se mais forte que o promotor CaMV35S em plantas de *Arabidopsis* (An et al., 1996; An; Meagher, 2010). Assim, é provável que a planta transformada com este vetor expresse a proteína TgPRA constitutivamente e em níveis significativos.

Para transformação de tomate MT-*Rg1*, inicialmente foi realizada a inserção do vetor pBI121-TgPRA em *A. tumefaciens* GV3101. Clones resistentes à canamicina foram selecionados e analisados quanto à presença do vetor por PCR, utilizando primers para o gene *gus*. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose. A figura 2 mostra a presença do amplicon de 450 pb (seta) do clone PRA-2, correspondente à amplificação de um fragmento do gene *gus*, confirmando a transformação da agrobactéria.

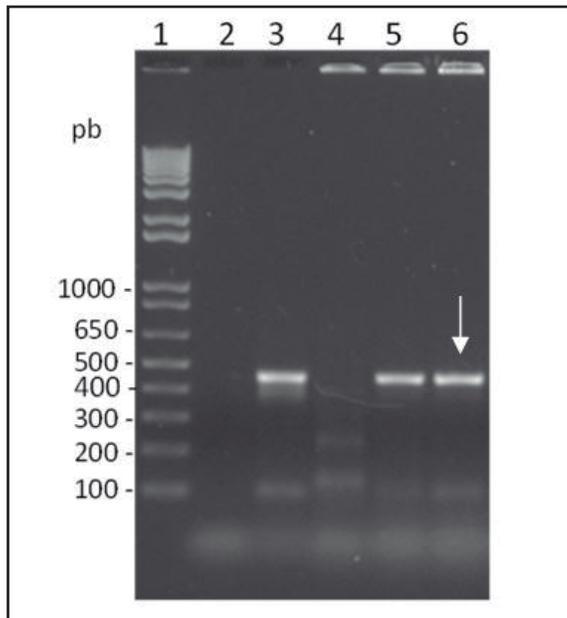


Figura 2. Análise por PCR de *Agrobacterium tumefaciens* transformada com pBI121-TgPRA. Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR. 1 – 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen); controles negativos: 2 – água; 4 – *A. tumefaciens* GV3101 não transformada; controles positivos: 3 – vetor pBI121; 5 – *A. tumefaciens* GV3101 transformada com pBI121; 6 – clone PRA-2.

Para a transformação de tomateiro MT-Rg1, tecido cotiledonar foi cocultivado com *A. tumefaciens* carregando o vetor pBI121-TgPRA. O cultivo subsequente do tecido vegetal em meio de regeneração, acrescido de canamicina, permitiu obter diversos brotos resistentes ao antibiótico e, portanto, potencialmente transgênicos. Para confirmação da inserção do T-DNA, procedeu-se ao teste histoquímico de GUS. Foram testados fragmentos foliares dos brotos de MT-Rg1 no momento da transferência para meio de enraizamento, assim como fragmentos foliares e de raízes no momento da aclimação das plantas em casa de vegetação. Inicialmente, seis brotos foram testados e todos apresentaram reação positiva, evidenciada pela coloração azul (Figura 3).

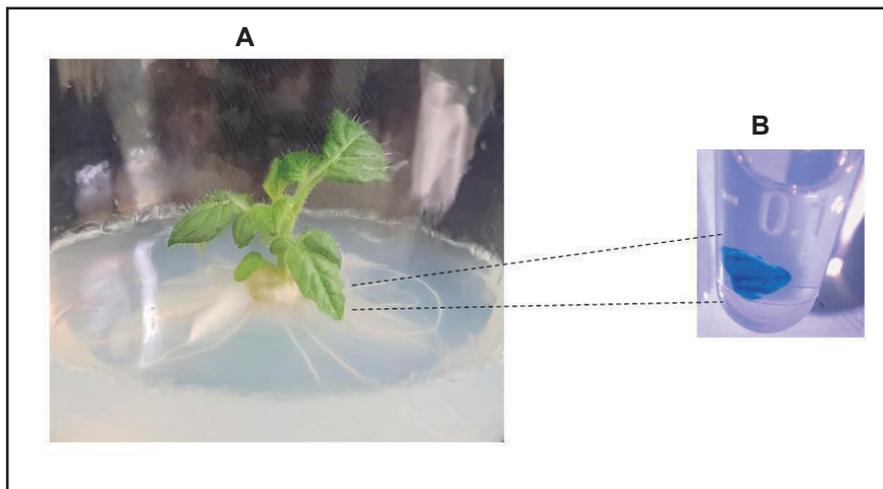


Figura 3. Transformação genética de tomateiro *Micro-Tom-Rg1*. A) Tomateiro *MT-Rg1* transformado com *pBI121-TgPRa* cultivado em meio de enraizamento contendo canamicina. B) Fragmento foliar apresentando coloração azul após ensaio histoquímico de GUS.

Este resultado indica a presença do gene repórter *gus* e, provavelmente, do gene de interesse *TgPRa*, já que ambos se encontram no T-DNA. Estas plantas T0 estão sendo cultivadas em casa de vegetação para análises moleculares por PCR e *Southern blot*, a fim de determinar a presença e o número de cópias do transgene, e para obtenção de plantas em homozigose para *TgPRa*. Estas plantas serão, futuramente, testadas por meio de bioensaios com *M. perniciosa* e outros fungos fitopatogênicos, visando avaliar a função da proteína TgPRa no desenvolvimento de VB e de outras doenças, incluindo algumas de interesse para a tomaticultura.

A expressão heteróloga de proteínas PR em plantas é uma ferramenta que tem sido usada para estudos de função, assim como para obtenção de plantas com características desejáveis. Por exemplo, foi verificado que a superexpressão de uma PR-1 de pimenteira em fumo aumenta a resistência a estresses bióticos (fungos e bactérias) e tolerância parcial a metais pesados (cádmio e mercúrio) (Sarowar et al., 2005). As osmotinas e proteínas tipo-osmotina (Osmotin-like proteins - OLPs), membros da família PR-5, têm sido expressas em diversas espécies de plantas, como batata, fumo, tomate, soja,

Arabidopsis, etc, sendo observados efeitos como aumento de resistência ou tolerância a fungos, a estresses osmóticos, a frio e a seca (Anil Kumar et al., 2015). Mais recentemente, foi relatada que a expressão heteróloga de uma PR-4 em videira aumenta a resistência a oídio (Ali et al., 2018). Desta forma, a obtenção de tomate transformado com *TgPRa* é uma etapa importante para o estudo de função desta proteína de cupuaçu.

Conclusões

Plantas de tomateiro MT-*Rg1* geneticamente modificadas, contendo o gene *TgPRa*, foram obtidas. A disponibilidade destas plantas permitirá uma avaliação do papel da proteína TgPRa no desenvolvimento da doença vassoura-de-bruxa. Adicionalmente, será possível o estudo da ação desta proteína contra outros fitopatógenos de interesse, não só para a cultura de cupuaçu, mas também para a tomaticultura.

Agradecimentos

À Embrapa, CAPES e Fundação Agropolis (França), pelo cofinanciamento do projeto “Interação entre *Theobroma grandiflorum* e *Moniliophthora perniciosa*: Estudos de Associação e Genômica Funcional” (Embrapa nº 02.14.02.002.00.00). À Dra. Glaucia Barbosa Cabral, pelas discussões sobre protocolos de regeneração de plantas de tomate.

Referências

- ABU-EL-HEBA, G. A.; HUSSEIN, G. M.; ABDALLA, N. A. A rapid and efficient tomato regeneration and transformation system. **Agriculture and Forestry Research**, v. 1, n. 2, p. 103–110, 2008.
- ALI, S.; GANAI, B. A.; KAMILI, A. N.; BHAT, A. A.; MIR, Z. A.; BHAT, J. A.; TYAGI, A.; ISLAM, S. T.; MUSHTAQ, M.; YADAV, P.; RAWAT, S.; GROVER, A. Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. **Microbiological Research**, v. 212–213, p. 29–37, 2018.
- ALVES, R. M.; FILGUEIRAS, G. C.; HOMMA, A. K. O. Aspectos sócio-econômicos do cupuaçuzeiro na amazônia: do extrativismo a domesticação. In: SANTANA, A. C. DE (Ed.). **Mercado, cadeia produtiva e desenvolvimento rural na Amazônia**. 1. ed. Belém, PA: UFRA, 2014. p. 197–223.
- AN, Y.-Q.; MCDOWELL, J. M.; HUANG, S.; MCKINNEY, E. C.; CHAMBLISS, S.; MEAGHER, R. B. Strong, constitutive expression of the Arabidopsis ACT2/ACT8 actin subclass in vegetative tissues. **Plant Journal**, v. 10, p. 107–121, 1996.
- AN, Y. Q. C.; MEAGHER, R. B. Strong Expression and Conserved Regulation of ACT2 in *Arabidopsis thaliana* and *Physcomitrella patens*. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 28, n. 3, p. 481–490, 2010.
- ANIL KUMAR, S.; HIMAKUMARI, P.; SHRAVAN KUMAR, G.; MOHANALATHA, C.; KAVI KISHOR, P. B. Osmotin: a plant sentinel and a possible agonist of mammalian adiponectin. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. March, p. 1–16, 2015.
- CALZAVARA, B. B. G.; MÜLLER, C. H.; KAHWAGE, O. de N. da C. Fruticultura tropical: o cupuaçuzeiro: cultivo, beneficiamento e utilização do fruto. Belém, PA: EMBRAPA-CPATU, 1984. 101 p. il (EMBRAPA-CPATU. Documentos, 32).
- CAO, J.; LV, Y.; HOU, Z.; LI, X.; DING, L. Expansion and evolution of thaumatin-like protein (TLP) gene family in six plants. **Plant Growth Regulation**, v. 79, n. 3, p. 299–307, 9 jul. 2016.
- CHEN, P.; WANG, C.; SOONG, S.; TO, K. Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants. **Molecular Breeding**, v. 11, n. 4, p. 287–293, 2003.
- DAN, Y.; YAN, H.; MUNYIKWA, T.; DONG, J.; ZHANG, Y.; ARMSTRONG, C. L. MicroTom—a high-throughput model transformation system for functional genomics. **Plant Cell Reports**, v. 25, n. 5, p. 432–441, 2006.

GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A. ; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v. 50, p. 151-158, 1968.

GORJANOVIĆ, S. A review: biological and technological functions of barley seed pathogenesis - related proteins (PRS). **Journal of the Institute of Brewing**, v. 115, n. 4, p. 334–360, 2009.

LACORTE, C.; BARROS, L. M. G. Genes repórteres *gus* (β -glucuronidase) e *gfp* (proteína verde-fluorescente). In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. 2.ed. Brasília: Embrapa, 2015. p. 147–164.

LACORTE, C.; ROMANO, E. Transferência de vetores para *Agrobacterium* spp. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. 2. ed. Brasília: Embrapa, 2015. p. 55–71.

MARELLI, J. P.; MAXIMOVA, S. N.; GRAMACHO, K. P.; KANG, S.; GUILTINAN, M. J. Infection biology of *Moniliophthora perniciosa* on *Theobroma cacao* and alternate solanaceous hosts. **Tropical Plant Biology**, v. 2, n. 3, p. 149–160, 2009.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473–497, 1 jul. 1962.

NAZARÉ, R. F. R. de; BARBOSA, W. C.; VIEGAS, R. M. F. **Processamento das sementes de cupuaçu para a obtenção de cupulate**. Belém, PA: Embrapa-CPATU, 1990. 37 p. il. (Embrapa-CPATU. Boletim de pesquisa, 108).

PINO, L. E.; LOMBARDI-CRESTANA, S.; AZEVEDO, M. S.; SCOTTON, D. C.; BORGIO, L.; QUECINI, V.; FIGUEIRA, A.; PERES, L. E. The *Rg1* allele as a valuable tool for genetic transformation of the tomato “Micro-Tom” model system. **Plant methods**, v. 6, p. 23, 2010.

SANTOS, L. F.; FREGAPANI, R. M.; FALCÃO, L. L.; TOGAWA, R. C.; COSTA, M. M. do C.; LOPES, U. V.; GRAMACHO, K. P.; ALVES, R. M.; MICHELI, F.; MARCELLINO, L. H. First microsatellite markers developed from cupuassu ESTs: application in diversity analysis and cross-species transferability to cacao. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, p. 1–19, 2016.

SAROWAR, S.; YOUNG, J. K.; EUI, N. K.; KI, D. K.; BYUNG, K. H.; ISLAM, R.; JEONG, S. S. Overexpression of a pepper basic pathogenesis-related protein 1 gene in tobacco plants enhances resistance to heavy metal and pathogen stresses. **Plant Cell Reports**, v. 24, n. 4, p. 216–224, 2005.

SCOTTON, D. C.; AZEVEDO, M. D. S.; SESTARI, I.; DA SILVA, J. S.; SOUZA, L. A.; PERES, L. E. P.; LEAL, G. A.; FIGUEIRA, A. Expression of the *Theobroma cacao* Bax-inhibitor-1 gene in tomato reduces infection by the hemibiotrophic pathogen *Monilophthora perniciosa*. **Molecular Plant Pathology**, p. 1–12, 2016.

SILVA, R. J. S. **Caracterização in silico e análise de expressão de genes do tipo PR de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*)**. 2015. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular.

SUN, H. J.; UCHII, S.; WATANABE, S.; EZURA, H. A highly efficient transformation protocol for Micro-Tom, a model cultivar for tomato functional genomics. **Plant and Cell Physiology**, v. 47, n. 3, p. 426–431, 2006.

VAN LOON, L. C. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. **European Journal of Plant Pathology**, v. 103, p. 753–765, 1997.

VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, n. 1, p. 135–162, 2006.

VAN LOON, L. C.; VAN STRIEN, E. A. The Families of Pathogenesis-Related Proteins, Their Activities, and Comparative Analysis of PR-1 Type Proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 55, n. 2, p. 85–97, 1999.



*Recursos Genéticos e
Biotecnologia*

CGPE: 14947

MINISTÉRIO DA
**AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO**

