



Simpósio de Integração Acadêmica

"Ciências Básicas para o Desenvolvimento Sustentável"

SIA UFV 2023



CLONAGEM DE *Escherichia coli* HT115 PARA A PRODUÇÃO DE dsRNA EM LARGA ESCALA

Isabella Araújo Sousa Neves, Luciano Gomes Fietto, Isabel Samila Lima Castro, Bruna Pires Silva, Tiago Antônio de Oliveira Mendes, Eveline Teixeira Caixeta

Palavras-chave: RNAi; Café; *Hemileia vastatrix*

(Pesquisa – Ciências Biológicas e da Saúde - Bioquímica)

Introdução

O Brasil é o maior produtor e exportador de café do mundo. A ferrugem do cafeeiro, causada pelo fungo *Hemileia vastatrix*, é a principal doença que acomete a cultura. Cultivares com resistência durável a ferrugem tem sido um constante desafio, pois ao longo do tempo novas raças do patógeno surgem com a capacidade de suplantação da resistência. Dessa forma, o desenvolvimento de novas metodologias, com maior especificidade, menor potencial de indução de resistência e sustentáveis, são necessárias para o controle da doença. Assim, abordagens baseadas em RNA de interferência (RNAi) tem ganhado destaque nos últimos anos.

Objetivos

O objetivo deste estudo foi a transformação, seleção e validação da expressão de dsRNA em bactéria *Escherichia coli* HT115 com complementaridade a um gene alvo essencial para *H. vastatrix*.

Material e Método

O gene alvo escolhido, uma Helicase (*HEL3*), foi selecionado por meio de genômica comparativa e os primers foram sintetizados por uma empresa especializada. A especificidade do alvo foi testada por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR). A sequência foi recombinada em vetor de clonagem plasmidial pGEM®-T Easy e transformada por meio de choque térmico em bactérias *E. coli* DH5α. A extração do DNA plasmidial das colônias de bactérias transformadas foi realizada pelo método de lise alcalina. A transformação em *E. coli* HT115, utilizando os plasmídios extraídos da bactéria DH5α, também foi realizada por meio da metodologia de choque térmico. Um resumo das metodologias utilizadas está esquematizado na Figura 1.

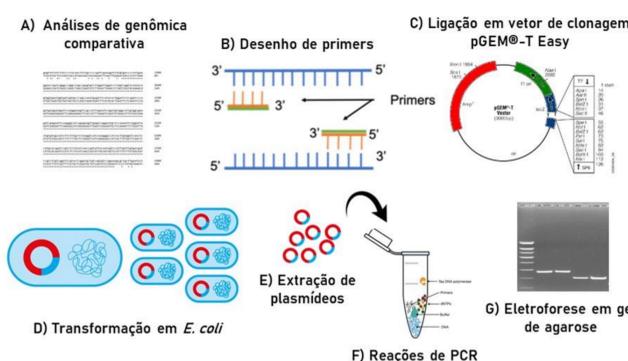


Figura 1: A) Seleção do alvo por meio de genômica comparativa. B) Desenhos de primers específicos para o gene alvo *HEL3*. C) Ligação no vetor de clonagem pGEM T easy. D) Transformação de *E. coli*. E) Extração plasmidial. F) e G) Confirmação da transformação por meio de PCR e eletroforese em gel de agarose.

Apoio financeiro



Resultados e Discussão

O gene alvo *HEL3* se mostrou específico para o patógeno e ausente na planta hospedeira. Foi utilizada a estratégia de transformação primeiro em *E. coli* DH5α (Figura 2) e depois em *E. coli* HT115, pois foi observada uma maior eficiência de transformação do que na transformação direta. A HT115 é bem adaptada a cultivo em fermentadores industriais. Esta bactéria é deficiente de genes de RNase III, responsável pela degradação de dsRNA, resultando em significativos rendimentos de produção desta molécula. A PCR, utilizando o plasmídeo e o primer específico para o alvo, confirmou a transformação (Figura 3).

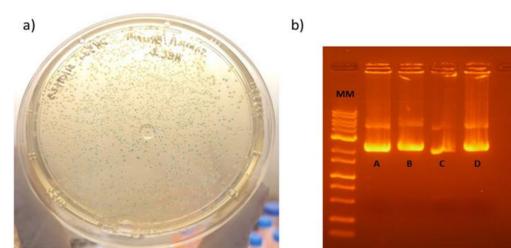


Figura 2: a) Placa de bactérias DH5α após protocolo de transformação. Colônias azuis são bactérias não transformadas e colônias brancas são as bactérias transformadas. b) Gel de agarose 1% da miniprep realizada após a multiplicação de quatro colônias brancas (A, B, C e D) teoricamente transformadas.

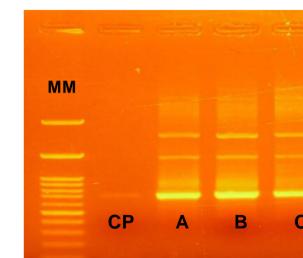


Figura 3: Gel de agarose 1% do resultado da PCR utilizando os plasmídeos e o primer específico do alvo *HEL3*. Todas as colônias selecionadas (A, B e C) foram transformadas com eficiência. MM: marcador de peso molecular de 100 pares de base. CP: Controles positivo (cDNA de *H. vastatrix*).

Conclusões

Dessa forma, foram obtidas colônias de *E. coli* HT115 transformadas com o gene alvo *HEL3* que poderão ser utilizadas para a produção de dsRNA em larga escala para o uso em metodologias de RNAi, que visam o silenciamento de genes essenciais do patógeno. Ainda, as moléculas de dsRNA possuem o potencial para serem utilizadas em formulações de defensivos agrícolas para o controle de *H. vastatrix* no campo.

Bibliografia

- Zambolim L (2016) Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. Tropical Plant Pathology, 41:1-8.
- Talhinhas P, Batista D, Diniz I, et al (2017). The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics. Molecular Plant Pathology, 18:1039-1051.

Agradecimentos

