

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Tetrademus obliquus* (TURPIN)  
M.J.WYNNE ISOLADO DO PARANÁ**

CAMPANÁRIO, Marco Antonio Sampaio<sup>1</sup>; PASSOS, Matheus Felipe<sup>2</sup>; VARGAS, José Viriato Coelho<sup>3</sup>; DE MEDEIROS, Lia Carolina Almeida Soares<sup>4</sup>, KAVA, Vanessa Merlo<sup>5</sup>

**RESUMO**

**Introdução:** Microrganismos fotossintetizantes produzem vários compostos de interesse econômico, de óleos a pigmentos, utilizados para diferentes propósitos, como nutrição humana e até produção de biocombustível. Entre as técnicas moleculares para melhoramento genético de microalgas, a transformação genética tem sido usada em diversas clorófitas (*Chlorophyceae*, *Chlorophyta*). Entretanto, poucos trabalhos de transformação genética foram publicados com *Tetrademus obliquus* (Turpin) M.J.Wynne (*Sphaeropleales*, *Chlorophyta*), uma microalga eucariótica oleaginosa, cosmopolita e com alto potencial biotecnológico. **Objetivo:** Neste trabalho, o objetivo foi aprimorar um sistema de transformação genética por eletroporação para *T. obliquus* LGMM01, linhagem isolada em Curitiba, Paraná. **Material e métodos:** Para a transformação, foi usado o vetor pCAMBIA1303 armazenado em *Escherichia coli* TOP10/pCAMBIA1303. Ele contém o promotor CamV35S, marcadores de seleção para procariotos (*aphA-3*; resistência à canamicina) e para eucariotos (*hph*; resistência à higromicina) e o gene repórter *gusA* ( $\beta$ -glucuronidase). Depois de traçar a curva de crescimento para *T. obliquus* LGMM01 em meios CHU (autotrófico) e TAP (mixotrófico), células da fase de crescimento exponencial desta microalga foram tornadas competentes e eletroporadas sob 10 condições diferentes, considerando conformação do vetor (linear ou circular), tipo de choque (tempo constante ou decaimento exponencial), parâmetros de choque (voltagem, capacitância, resistência e tempo) e número de choques consecutivos (1 ou 2). **Resultados:** Dos 10 tratamentos, 7 geraram unidades formadoras de colônia resistentes à higromicina (UFC-Hg+), e o ensaio GUS preliminar revelou atividade de  $\beta$ -glucuronidase nas células. Os transformantes cresceram apenas em meio TAP. A média de eficiência de transformação foi de  $8,09 \pm 0,65$  UFC-Hg+ por  $10^6$  células, e a condição mais eficiente apresentou 30 UFC-Hg+ por  $10^6$  células. O fenótipo de resistência se mostrou estável durante 3 meses de repiques quinzenais. **Conclusão:** Esse estudo apontou novas condições de choque para eletroporação de *T. obliquus* e corroborou com trabalhos prévios mostrando eficiência dos choques de tempo constante de 3 ms e 2 kV de voltagem. Além disso, nas condições ensaiadas houve a necessidade de cultivo mixotrófico para a transformação com pCAMBIA1303. Também foi possível confirmar o uso de *gusA* como gene repórter em *T. obliquus*, pois foi observado o fenótipo azulado em transformantes na presença de X-gluc.

**Palavras-chave:**  $\beta$ -glucuronidase; clorófitas; eletroporação; expressão heteróloga; marcador de seleção.

<sup>1</sup> Universidade Federal do Paraná, Curitiba. macscampanario@gmail.com.

<sup>2</sup> Universidade Federal do Paraná, Curitiba. matheus.pbio@gmail.com

<sup>3</sup> Universidade Federal do Paraná, Curitiba. jvargas@demec.ufpr.br

<sup>4</sup> Instituto Carlos Chagas – Fundação Oswaldo Cruz, Curitiba. lia.medeiros@fiocruz.br

<sup>5</sup> Universidade Federal do Paraná, Curitiba. vanessagenetica@gmail.com