



EXPRESSÃO TRANSIENTE DE CRISPR/Cas9 EM FOLHAS DE MAMOEIRO VISANDO A INATIVAÇÃO DO β -1,3-GLUCANO-HIDROLASES/PR2

Mirielson Loures da Silva¹, Oeber de Freitas Quadros¹, Caroline Gonçalves da Silva¹, José Aires Ventura^{1,2}, Antonio Alberto Ribeiro Fernandes¹, Patricia Machado Bueno Fernandes¹

¹Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio da Universidade Federal do Espírito Santo - UFES - LBAA/UFES, Vitória, ES, CEP 29040-090; ²Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural – Incaper, CEP 28052-010, Vitória, ES; E-mail: mirielsonlouress@gmail.com, oeberquadros@gmail.com, caroline_gs.rob@hotmail.com, ventura@incaper.es.gov.br, alberto.fernandes@ufes.br, patricia.fernandes@ufes.br

INTRODUÇÃO

As viroses de plantas usam várias vias para se espalhar e colonizar o hospedeiro, uma das mais comuns que permite a disseminação local e sistêmica do vírus é o movimento de célula-célula por meio dos plasmodesmos (BENITEZ-ALFONSO et al., 2014).

Um dos fatores que regulam a permeabilidade dos plasmodesmos é a deposição de calose, um polissacarídeo na forma de β -1,3-glucano com alguns ramos de β -1,6. Essa calose é resultado da atividade de β -1,3 glucano sintase. A deposição de calose nos plasmodesmos está diretamente associada ao aumento ou diminuição no movimento viral (OTERO et al., 2016).

A degradação da calose resulta na abertura dos plasmodesmos, favorecendo o movimento intercelular e o tráfego simplástico do vírus nos tecidos da planta. Tal degradação é mediada pela ação de β -1,3-glucanases (endonucleases), enzimas constitutivas que estão integradas nos mecanismos de resistência bioquímicos pré-formados (ZAVALIEV et al., 2013).

Sob condições normais, as β -1,3-glucanases desempenham o papel de produzir glicose a partir da degradação do substrato laminarina (um β -1,3 glucano) que é um componente da parede celular de muitos fungos (MERCADO et al., 2015). Entretanto, a calose também se torna alvo de β -1,3-glucanases por possuir β -1,3-glucano em sua composição.

Análises de micro RNAs (miRNAs) do mamoeiro sob infecção pelo complexo viral *Papaya meleira virus* (PMeV e PMeV2) revelou a elevada presença de miRNAs reprimindo a expressão pós-transcricional de genes envolvidos na síntese de β -1,3-glucanases. Desta forma, com a produção de β -1,3-glucanases reprimida, poderia ocorrer um aumento de calose nos plasmodesmos, numa tentativa da planta dificultar a translocação viral.

Neste sentido, nosso trabalho objetivou avaliar a expressão transiente de CRISPR/Cas9 (Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas associadas à proteína Cas9), em folhas de mamoeiro visando o silenciamento do gene β -1,3-glucano-hidrolases/PR2, que codifica a enzima β -1,3-glucanase.

MATERIAL E MÉTODOS

Materiais vegetais e condições de crescimento - As sementes de mamoeiro do cultivar Golden, fornecidas pelo INCAPER foram cultivadas na casa de vegetação do Núcleo de Biotecnologia/UFES, sob condições favoráveis à germinação e crescimento.

Análise bioinformática - A sequência CDS do gene β -1,3-glucan hydrolases/PR2 possui 1026 nucleotídeos e 342 aminoácidos. Foi selecionado a sequência GATGCGTTCATGACTCTG para a inativação gênica. Além disso, no *downstream* da sequência desta sequência existe uma região PAM composta pela sequência TGG, necessária para o reconhecimento da Cas9 e o gRNA do sistema CRISPR.

Customização do vetor de transformação - O vetor binário pKSE401 (Addgene #62202), foi desenvolvido com propósito de edição do genoma vegetal por CRISPR/Cas9 (XING, et. al., 2014). Este vetor possui o gene da enzima Cas9 e uma sequência referente a estrutura do gRNA, onde 19 nucleotídeos desta sequência é customizada de acordo com a sequência alvo do genoma da planta que se deseja alterar. Para tanto, dois oligonucleotídeos foram sintetizados: *forward* 5'-ATTGGATGCGATTCATGACTCTG-3' e *reverse* 5'-AAACCAGAGTCATGAATCGCATC-3', usando com referência a sequência CDS do gene β -1,3-glucano-hidrolase/PR2. A inserção dos oligonucleotídeos no vetor foi realizada pela técnica *Golden Gate Assembly*, onde numa única reação são misturados o vetor pKSE401, os dois oligonucleotídeos e as enzimas *Bsa*I e T4 Ligase. A mistura de ligação foi utilizada na eletroporação da bactéria *Escherichia coli* DH5 α . Os clones transformantes foram selecionados pela resistência ao antibiótico Canamicina, na concentração de 50 μ g/ml, em meio LB líquido, cultivada a 37 °C, por 24h. Posteriormente, foram extraídos o DNA plasmidial dos clones bacterianos selecionados. O novo plasmídeo, chamado de pKS-BG, também foi inserido por eletroporação na bactéria *Agrobacterium tumefaciens* GV3101.

Transformação vegetal - A bactéria *A. tumefaciens*/pKS-BG foi inoculada em meio LB líquido, acrescido de Canamicina 50 μ g/mL, e cultivada a 28°C, por 24h. Para o controle negativo, a linhagem *A. tumefaciens* sem plasmídeo também foi cultivada da mesma forma, exceto pela ausência de Canamicina. Posteriormente, as culturas foram centrifugadas, lavadas com água destilada estéril e centrifugadas novamente. As massas celulares foram diluídas em 1/2 MS (MS sais 2,16 g / L; sacarose 30 g / L; 2 mg/L de 2,4-D; pH 5,6-5,8) como tampão de transformação e ajustadas numa a densidade ótica (OD600) de 0,5. A virulência da *A. tumefaciens* foi induzida, acrescentando acetosiringone 20 μ M ao tampão, com incubação a 28 °C, por 3h. Para o processo de agroinfiltração, as folhas das plantas foram mergulhadas no tampão de transformação contendo as respectivas bactérias. Estes conjuntos foram alocados num dessecador, e submetidos a um vácuo de 500 mmHg por 2 minutos. Ao todo foram quatro plantas agroinfiltradas com *A. tumefaciens*/pKS-BG e as outras duas

mudas com *A. tumefaciens* sem plasmídeo. As plantas agroinfiltradas foram mantidas em casa de vegetação em temperatura e fotoperíodo ambiente, por uma semana.

Confirmação da expressão transiente – As folhas foram coletadas 48 horas após a agroinfiltração. Também foi coletada folha de mamoeiro não agroinfiltrado, como segundo controle negativo. De cada folha foi retirada uma amostra de 100mg, da qual foi realizada a extração do RNA total por TRIzol® (Thermo). O RNA extraído foi tratado com “DNase I RNase-free” (New England BioLabs) e em sequência foi feita a reação de transcrição reversa com a enzima “M-MLV Reverse Transcriptase” (Thermo). O cDNA obtido foi utilizado como molde reação de PCR onde foram empregados os oligonucleotídeos U6-26p-F 5’-TGTTCCAGGATTAGAATGATTAGGC-3’ e U6-26t-R 5’-CCCCAGAAATTGAACGCCGAAGAAC-3’ (Figura 1). Os fragmentos de PCR obtidos foram analisados em gel de agarose após eletroforese.

(U6-26p)-(Target-1)-(gRNA-Sc)-(U6-26t)

```

CGACTTGCCTCCGCACAATACATCATTTCTTCTTAGCTTTTTTCTTCTTCTCGTTCATACAGTTTTTTTTGT
TTATCAGCTTACATTTCTTGAACCGTAGCTTTCGTTTTCTTCTTTTAACTTCCATTCGGAGTTTTGTATCTT
GTTTCATAGTTTGTCCAGGATTAGAATGATTAGGCATCGAACCTTCAAGAATTTGATTGAATAAAACATCTT
CATTCTTAAGATATGAAGATAATCTTCAAAGGCCCTGGGAATCTGAAAGAAGAGAAGCAGGCCCATTTATA
TGGGAAAGAACAATAGTATTTCTTATATAGGCCCATTTAAGTTGAAAACAATCTTCAAAGTCCCACATCGCTT
AGATAAGAAAACGAAGCTGAGTTTATATACAGCTAGAGTCGAAGTAGTGATTGNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNGTTTTAGAGCTAGAAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGA
GTCGGTGCTTTTTTTTGCAAAATTTCCAGATCGATTTCTTCTTCTCTCTTCTTCGGCGTTCAATTTCTGGGG
TTTTCTTCTCGTTTTCTGTAACTGAAACCTAAAATTTGACCTAAAAAAAATCTCAAATAAATATGATTCAGTGGT
TTGTACTTTTCAGTTAGTTGAGTTTTGCAGTTCCGATGAGATAAACCAATA
  
```

Figura 1. Representação de parte da sequência do vetor pKS401. Em vermelho estão destacados os locais de alinhamento dos oligonucleotídeos U6-26p-F e U6-29t-R. Em amarelo, encontra-se a região referente ao gRNA que foi customizada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A construção do plasmídeo pKS-BG, foi confirmada por extração do DNA plasmidial (Figura 2).

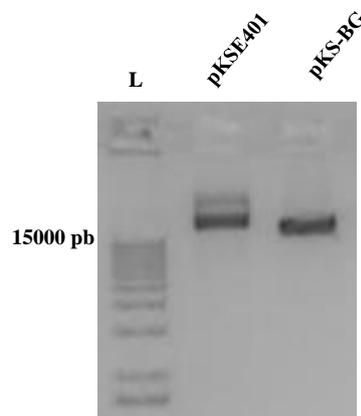


Figura 2. Confirmação da construção do plasmídeo pKS-BG. Gel de agarose após eletroforese, onde L: Ladder Plus 1Kb Thermo.

As plantas agroinfiltradas por vácuo (Figura 3) foram mantidas em casa de vegetação, com temperatura e fotoperíodo ambiente, por uma semana.

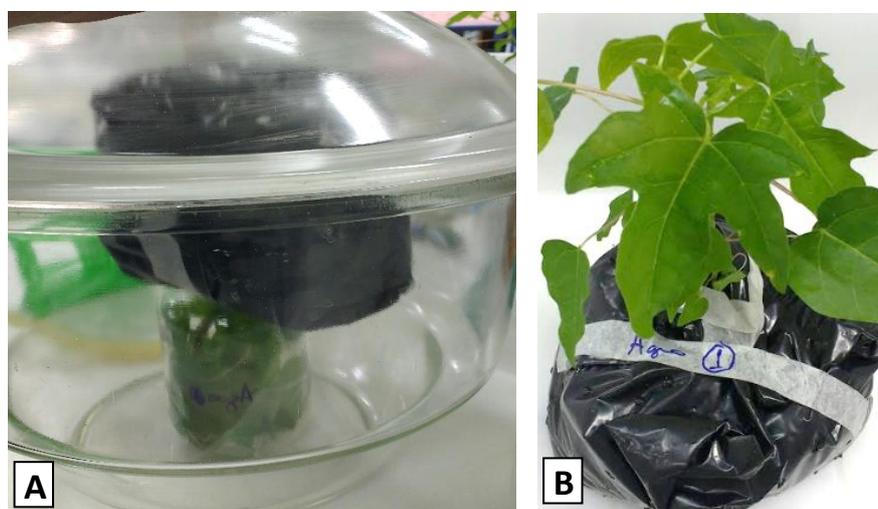


Figura 3. A) Representação da agroinfiltração por vácuo, em dessecador, onde as folhas de mamoeiro foram mergulhadas em tampão de transformação contendo *A. tumefaciens*/pKS-BG ou *A. tumefaciens* sem plasmídeo. B) Aparência das mudas de mamoeiro logo após a agroinfiltração.

Após a construção de pKS-BG, a expressão transiente do gRNA nas folhas agroinfiltradas, foram verificadas após a extração do RNA total, da transcrição em cDNA e do PCR (Figura 4)

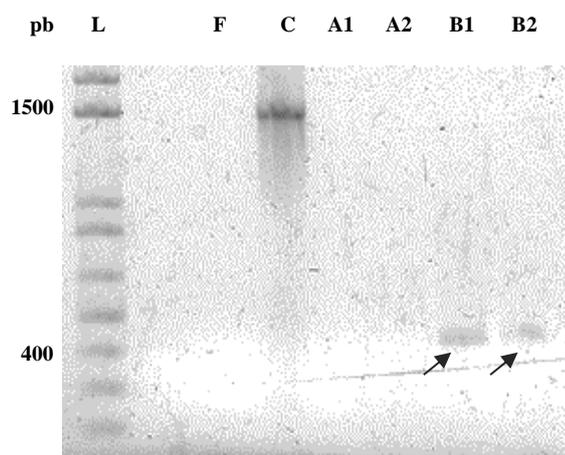


Figura 4. Gel de agarose após eletroforese, onde: L) Ladder Plus 1Kb Thermo; F) folhas não agroinfiltradas (controle negativo); C) Fragmento de aproximadamente 1500 pb referente ao gene Espectinomicina do vetor pKSE401 que serviu como controle positivo; A1 e A2) Não houve amplificação do cDNA das folhas agroinfiltradas com *A. tumefaciens* sem o vetor (controles negativos); B1 e B2) correspondem aos fragmentos de PCR de aproximadamente 400 pb, referente a expressão da região U6-26p / gRNA / U6-26t. Os resultados corroboram para o sucesso da construção de pKS-GB.

Os resultados apresentados no gel de agarose evidenciam que a amplificação dos fragmentos de aproximadamente 400 pb ocorreram apenas nas plantas que receberam o plasmídeo pKS-BG. Este fragmento corresponde a expressão da região U6-26p / gRNA customizado / U6-26t. Vale ressaltar que foi utilizado como controle positivo o DNA do vetor pKSE401, onde o fragmento amplificado foi de 1500 pb, correspondente ao gene da Espectinomicina. No entanto, quando é realizada a reação de clonagem *Golden Gate Assembly*, o gene da Espectinomicina é substituído pelos oligonucleotídeos referentes ao gRNA customizado.

CONCLUSÕES

Estes resultados sugerem que as folhas de mamoeiro que receberam o plasmídeo pKS-BG expressaram de forma transiente do gRNA customizado e junto com a Cas9, que provavelmente também foi expressa. Uma vez que a maquinaria CRISPR/Cas9 está funcional nestas folhas, é esperado que o gene β -1,3-glucanohidrolases/PR2 deva ter sido editado e inativado. Em trabalhos futuros, o plasmídeo pKS-BG será usado na transformação de cultura de tecidos de mamoeiro.

REFERÊNCIAS

- BENITEZ-ALFONSO, Y. Symplastic intercellular transport from a developmental perspective. **Journal of Experimental Botany**. 2014, 65:1857-1863.
- MERCADO, J. A.; BARCELÓ, M.; PLIEGO, C., et al. Expression of the β -1,3-glucanase gene from *Trichoderma harzianum* in strawberry increases tolerance to crown rot diseases but interferes with plant growth. **Transgenic Research**. 2015, 24:979-989.
- OTERO, S.; HELARIUTTA, Y.; BENITEZ-ALFONSO, Y. Symplastic communication in organ formation and tissue patterning. **Current Opinion in Plant Biology**. 2016, 29: 21-28.
- XING H. L; DONG, L.; CHEN, Q. J. et al. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. **BMC Plant Biology**. 2014 Nov 29; 14(1):327.
- ZAVALIEV, R.; LEVY, A.; GERA, A.; EPEL, B. L. Subcellular dynamics and role of Arabidopsis beta-1,3-glucanases in cell-to-cell movement of tobamoviruses. **Molecular Plant-Microbe Interactions Journal**. 2013, 26:1016-1030.