



INATIVAÇÃO DO GENE DA FITOENO DESATURASE DO MAMOEIRO POR CRISPR/Cas9

Caroline Gonçalves da Silva¹, Oeber de Freitas Quadros¹, Mirielson Loures 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: caroline_gs.rob@hotmail.com, oeberquadros@gmail.com, mirielsonlouress@gmail.com, ventura@incaper.es.gov.br, alberto.fernandes@ufes.br, patricia.fernandes@ufes.br

INTRODUÇÃO

O gene da fitoeno desaturase (*PDS3*) é um precursor de grande relevância na biossíntese de carotenóides e está associada com outras vias importantes como a produção da clorofila, fitormônio, pigmentos acessórios da fotossíntese e vitaminas. Este gene é responsável pela proteção da clorofila contra o foto-branqueamento da planta (HIRSCHBERG, 2001).

O silenciamento de genes tornou-se um instrumento facilitador na investigação de diversos acontecimentos da biologia vegetal, podendo ser manipulada para obtenção de características desejáveis ou deleção das características indesejáveis. Ferramentas de edição genética como nucleases de dedo de zinco (ZFNs), nucleases efetoras semelhantes a ativadores de transcrição (TALENs) e repetições palindrômicas curtas com intervalos regulares (CRISPR) são utilizadas no silenciamento de genes promovendo quebras de dupla fita em DNA (SUN; ZHAO, 2013).

Em plantas modelo como *Arabidopsis thaliana* a ferramenta CRISPR/Cas9 foi utilizada para silenciar o gene da fitoeno desaturase, resultando em um cultivar albino e anão, pois as vias reguladas pela luz foram cessadas, acarretando em uma perda na realização da fotossíntese, assim a biossíntese de clorofilas se torna disfuncional, afetando na produção de giberelina, o que causa diminuição do crescimento do cultivar. Com isso As características visuais geradas a partir da inativação deste gene são uma planta com sintomas de “albinismo” ou despigmentação (QIN et al., 2007).

Assim, o objetivo deste trabalho foi utilizar o sistema CRISPR/Cas9 no silenciamento do gene fitoeno desaturase (*PDS3*) em mamoeiro, como um marcador visual e funcional da edição gênica.

MATERIAL E MÉTODOS

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.

A sequência do gene fitoeno desaturase *-PDS3* (NCBI, código- DQ779922. 2) possui 1752 nucleotídeos e 584 aminoácidos. Foi selecionado a sequência TGGAAGCAAGAGATGTTCT para a inativação gênica. Além disso, no *downstream* da sequência desta sequência existe uma região PAM composta pela sequência AGG, necessária para o reconhecimento da Cas9 e o gRNA do sistema CRISPR.

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 customizado de acordo com a sequência alvo do genoma da planta que se deseja alterar. Para tanto, dois oligonucleotídeos foram sintetizados: *forward* 5'- ATTGATCTTAACAGCTCGTGCTT -3' e *reverse* 5'- AAACAAGCACGAGCTGTTAAGAT -3', usando com referência a sequência do gene fitoeno desaturase *-PDS3*. 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 *BsaI* e T4 Ligase. Nesta reação o gene da Espectinomicina do vetor pKSE401 é substituído pelos oligonucleotídeos referentes ao gRNA customizado. 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-PD, também foi inserido por eletroporação na bactéria *Agrobacterium tumefaciens* GV3101.

A bactéria *A. tumefaciens*/pKS-PD 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-PD 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.

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’-TGTC CAGGATTAGAATGATTAGGC-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)

```

CGACTTGCCTTCCGCACAATACATCATTCTTCTTAGCTTTTTTCTTCTTCGTTTCATACAGTTTTTTTTGT
TTATCAGCTTACATTTCTTGAACCGTAGCTTTCGTTTTCTTCTTTTAACTTTCATTCCGAGTTTTGTATCTT
GTTTCATAGTTTGTCCAGGATTAGAATGATTAGGCATCGAACCTTCAAGAATTTGATTGAATAAAACATCTT
CATTCTTAAGATATGAAGATAATCTTCAAAGGCCCTGGGAATCTGAAAGAAGAGAAGCAGGCCCATTTATA
TGGGAAAGAACAATAGTATTCTTATATAGGCCATTAAAGTTGAAAACAATCTTCAAAAAGTCCACATCGCTT
AGATAAGAAAACGAAGCTGAGTTTATATACAGCTAGAGTCGAAGTAGTGATTGNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAGTGGCACCGA
GTCGGTGC TTTTTTTTGCAAATTTCCAGATCGATTCTTCTTCTCTTTCTTCGCGGTTCAATTTCTGGGG
TTTTCTTTCGTTTTCTGTAACCTAAAATTTGACCTAAAAAAAATCTCAAATAATATGATTCAGTGGTT
TTGTACTTTTCAGTTAGTTGAGTTTTGCAGTCCGATGAGATAAACCAATA
  
```

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-PD, foi confirmada por extração do DNA plasmidial (Figura 2).

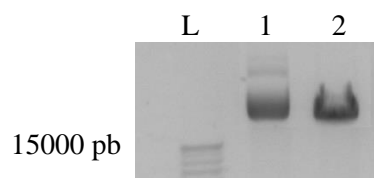


Figura 2. Gel de agarose após eletroforese, onde: L) Ladder Plus 1Kb Thermo; 1) vetor pKSE401; 2) novo plasmídeo pKS-PD.

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

As folhas das 4 mudas de mamoeiro que foram submetidas a agroinfiltração por *A. tumefaciens*/pKS-PD apresentaram uma despigmentação, evidenciando a expressão transiente do sistema CRISPR/Cas9, levando a inativação do gene fitoeno desaturase. Plantas que foram agroinfiltradas, mas não receberam o plasmídeo não tiveram alterações visuais em suas folhas (controle negativo).

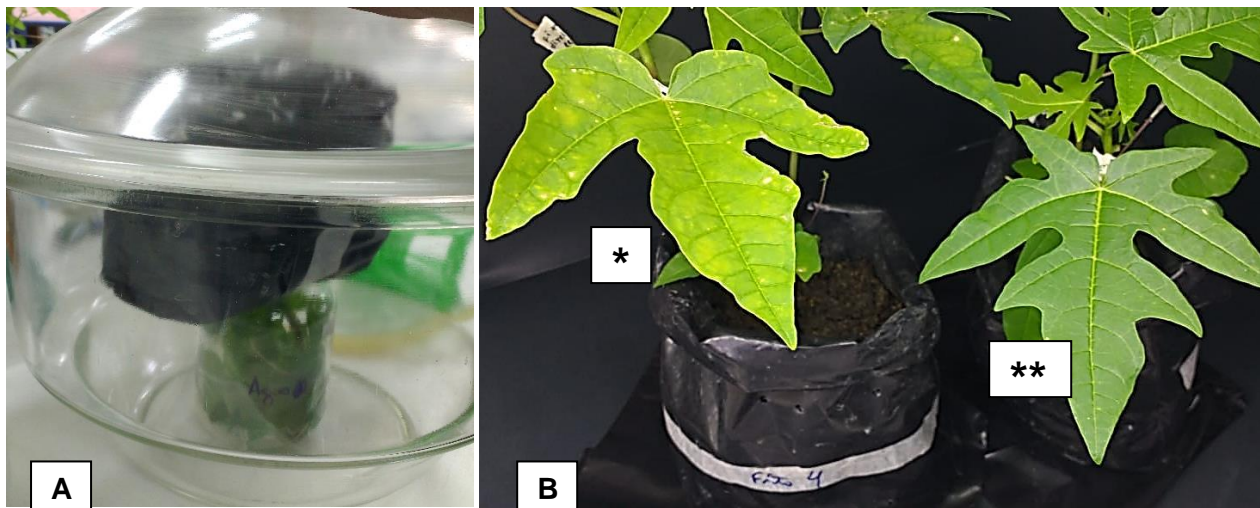


Figura 3. A) Representação da agroinfiltração por vácuo, em dessecador. Após uma semana da agroinfiltração, nota-se que as folhas de mamoeiro que foram mergulhadas em tampão de transformação contendo *A. tumefaciens*/pKS-PD apresentaram uma despigmentação (*) e as mudas controle não (**).

Em outro experimento, para se avaliar a expressão transiente do gRNA nas folhas agroinfiltradas, foram feitos PCR (Figura 4) do cDNA, a partir da extração do RNA total.

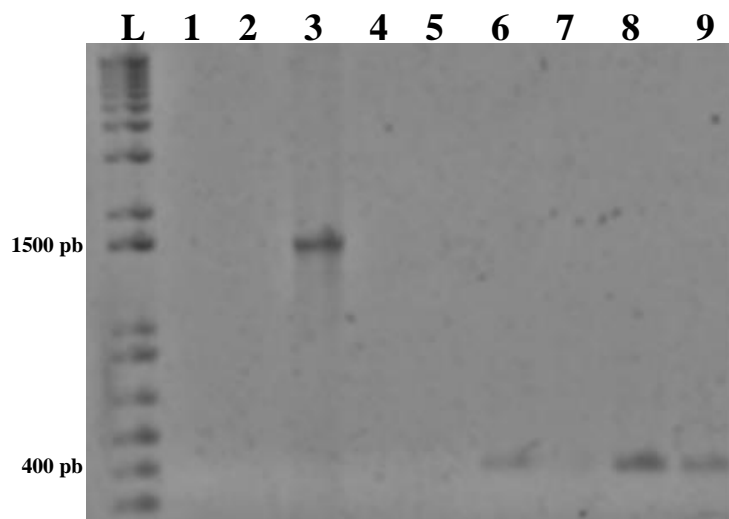


Figura 4. Gel de agarose após eletroforese, onde: L) Ladder Plus 1Kb Thermo; 1 e 2) folhas não agroinfiltradas (controles negativos); 3) Fragmento de aproximadamente 1500 pb referente ao gene Espectinomicina do vetor pKSE401 que serviu como controle positivo; 4 e 5) Não houve amplificação do cDNA das folhas agroinfiltradas com *A. tumefaciens* sem o vetor (controles negativos); 6 a 8) 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-PD.

De acordo com Matzke (2009), as ferramentas de silenciamento gênico têm sido amplamente utilizadas em plantas devido a sua agilidade, supressão transiente da expressão gênica e clonagem de fragmentos pequenos de genes de interesse. Em mamoeiro este foi o primeiro trabalho de inativação do gene fitoeno desaturase. Os resultados aqui apresentados servirão como modelo visual do efeito da edição gênica, em trabalhos futuros, o plasmídeo pKS-PD será usado na transformação de cultura de tecidos de mamoeiro.

CONCLUSÃO

As plantas que foram agroinfiltradas por pKS-PD obtiveram uma despigmentação das folhas, quando comparadas às plantas do controle negativo. Os resultados obtidos através da extração de RNA e amplificação por PCR evidenciam a funcionalidade do sistema CRISPR/Cas9 na inativação do gene fitoeno desaturase.

REFERÊNCIAS

HIRSCHBERG, J. Carotenoid biosynthesis in flowering plants. **Current Opinion in Plant Biology** 2001; 4:210–218.

SUN, N.; ZHAO, H. Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALENs): a highly efficient and versatile tool for genome editing. **Biotechnology and Bioengineering**. 2013. v. 110, n. 7, p. 1811-1821.

MATZKE, M.; KANNO, T.; DAXINGER, L.; HUETTEL, B.; MATZKE, A. J. RNA-mediated chromatinbased silencing in plants. **Current Opinion in Cell Biology**. 2009 Jun; 21(3): 367-76.

QIN G., GU H., M. L., PENG Y., DENG XW, CHEN Z., et al. Disruption of phytoene desaturase gene results in albino and dwarf phenotypes in Arabidopsis by impairing chlorophyll, carotenoid, and gibberellin biosynthesis. **Cell Research**. 2007. 17 471-482. 10.1038 / cr. 40.

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.