

ENGENHARIA GENÉTICA DE PRECISÃO PARA TOLERÂNCIA A SECA EM SOJA

REIS, R.R.^{1,2}; NAKAYAMA, T. ^{1,3}; MARIN, S.R.R. ^{1,2}; MARINHO, J.P. ^{1,2}; MARCOLINO-GOMES, J.^{1,2}; MERTZ-HENNING, L. M.²; MOLINARI, H.B.C.⁴; NEPOMUCENO, A. L.²

¹Universidade Estadual de Londrina – Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Londrina-PR rafaelareis@gmail.com; ²Embrapa Soja;

³Universidade Federal de Viçosa; ⁴Embrapa Agroenergia

O Brasil é o segundo maior produtor de soja, ficando atrás apenas dos Estados Unidos. Apesar das perspectivas nacionais de liderança no mercado agrícola mundial da soja, esta cultura assim como outras, ainda é afetada por estresses bióticos e abióticos, destacando-se dentre esses a seca, que acarreta perdas no mundo todo.

Recentemente, tem-se estudado diversos genes que participam das respostas a estresses possibilitando o desenvolvimento de plantas tolerantes/resistentes a alguns destes fatores. Contudo, tratando-se da tolerância ao estresse por déficit hídrico há certa complexidade, uma vez que este está relacionado a uma característica poligênica.

O óxido nítrico (NO) atua como sinalizador de uma grande variedade de processos nas plantas, incluindo mecanismos de respostas a estresses bióticos e abióticos. Nesta linha, o gene de hemoglobina não simbiote (*nsHB*) vem demonstrando boas perspectivas como um elemento relacionado ao metabolismo ou inativação de NO, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio produzida durante condições de estresses. Este gene pode estar ligado ainda, à atividade da peroxidase, possibilitando proteger contra o dano nitrosativo na interação planta-patógeno e em interações simbióticas. Além disso, a *nsHB* atua em outras condições de estresse, tais como osmótica, nutrientes e estresse pelo frio, juntamente com NO (LESHEM et al., 1997).

Proteínas *nsHBs* da Classe 1 estão envolvidas em uma via metabólica com participação do NO. Dessa forma, a indução de alterações no gene que codifica para essa proteína, com o intuito de impedir a síntese da *nsHB*, pode resultar no desenvolvimento de plantas tolerantes a estresses, uma vez esta mutação atuaria inibindo a ação da proteína em moléculas sinalizadoras.

Hoje, com o avanço das técnicas de biologia molecular e mais recentemente a engenharia genética de precisão (EGP), é possível gerar variação genética de forma dirigida e pontual em qualquer região do genoma alvo. A tecnologia CRISPR (*Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats*)/Cas9 (FENG et al., 2013), tem sido empregada para a edição do genoma de diversas plantas. Todavia, até o presente momento, esta tecnologia não foi utilizada para validação de genes de soja e nem para a obtenção de cultivares tolerantes à seca. Dessa forma, a utilização dessa ferramenta para gerar variabilidade no gene da *nsHB* pode contribuir para o desenvolvimento de plantas tolerantes ao estresse por déficit hídrico via silenciamento gênico.

Uma vez que a estratégia for validada em espécie modelo, como *arabidopsis*, as construções contendo o gene de interesse poderão ser utilizadas no desenvolvimento de genótipos de soja tolerantes ao estresse por déficit hídrico com boas chances de se obter sucesso.

O objetivo desse trabalho foi obter plantas de *arabidopsis* transformadas com o sistema CRISPR/Cas9, tendo como elemento chave o sgRNA baseado no gene de *nsHB*. Inicialmente foi delineada a estratégia de construção utilizando o sistema CRISPR/Cas9+(gene At2G16060.1) + bar (gene de seleção), baseado no trabalho em que foi sintetizada uma construção contendo além dos elementos para seleção e transformação, um cassete de expressão 35s:Cas9 *códon* otimizado para mono e dicotiledôneas e um cassete contendo o promotor AtU6 + sequência alvo de 21 nucleotídeos + gRNA (RNA guia) (MALI et al., 2013).

Posteriormente, plantas de *Arabidopsis* em estágio de florescimento foram transformadas por *Agrobacterium tumefaciens* (estipe GV3101), contendo a construção de interesse, pelo método Floral dip (CLOUGH e BENT, 1998)

Após a primeira geração de sementes (T1), estas foram semeadas em meio de seleção contendo glufosinato de amônio com modificações (MS, Sacarose, MES, phytigel, vitamina gamborg's e glufosinato de amônio comercial-FINALE) (Figura 1).

A estratégia utilizada permitiu a obtenção e a seleção de plantas transformadas com o sistema CRISPR/Cas9. A confirmação da transformação foi através de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) utilizando *primers* (Tabela 1) que flanqueiam a região do gene de seleção *bar* presente na construção. Posteriormente o resultado da reação foi visualizado em gel de agarose 0.8% (Figura 2). Para a análise do funcionamento da mutação a ser gerada pela construção, foram desenhadas três combinações de *primers* (Tabela 1), baseados no possível local da mutação, os quais foram utilizados na reação de PCR com DNA das plantas transformadas, seguida de visualização em gel de agarose 0.8% (Figura 3 A e B).

Foi possível a confirmação de eventos de *Arabidopsis* positivos para a construção CRISPR/Cas9 utilizando o *primer* para o gene *bar* (Figura 2). Contudo, os *primers* para confirmação da mutação não foram eficientes, possivelmente devido à ocorrência da mutação em ínfimas bases do genoma que dificilmente seriam detectadas e levaria à esperada não amplificação da região alvo. Desta forma, a confirmação da mutação depende de testes mais refinados, como por exemplo, o sequenciamento da região alvo da Cas9. Se for possível confirmar a mutação, os próximos passos serão avanço de geração até alcançar homozigose e adicionalmente submeter às plantas mutantes a estresse por déficit hídrico, moderado e severo sob condições de temperatura, umidade e luz/fotoperíodo controlados. Adicionalmente desenvolver eventos de soja transgênica utilizando a mesma metodologia, contudo sendo a construção contendo o sgRNA baseado no gene *nsHB* de soja.

A EGP trás uma expectativa futura de apresentar-se como uma boa ferramenta na validação de genes de soja, podendo gerar mutações não só no gene de interesse, mas também em todos os membros de uma família gênica, contornando a possibilidade de rotas alternativas (responderem sem alterações do fenótipo e mesmo à nível de cascata gênica da planta) quando silenciados.

Referências

- CLOUGH, S. J.; BENT, A. F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. **Plant J**, v.16, p. 735-43, 1998.
- FENG, Z.; ZHANG, B.; DING, W.; LIU, X.; YANG, D.-L.; WEI, P.; CAO, F.; et al. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. **Cell research**, v.23(10), p.1229–32, 2013.
- MALI, P.; YANG, L.; ESVELT, K.M.; AACH J; GUELL. M.; DICARLO, J.E.; NORVILLE, J.E.; CHURCH, G.M. RNA-guided human genome engineering via Cas9. **Science**, v. 339, p. 823-826, 2013.
- LESHEM, Y. Y.; HARAMATY, E.; ILUZ, D.; MALIK. Z.; SOFER, Y.; ROITMAN, L.; LESHEM, Y. Effect of stress nitric oxide (NO): interaction between chlorophyll fluorescence, galactolipid fluidity and lipoxygenase activity. **Physiol Biochem Plant** v. 35 p. 573–579. 1997.

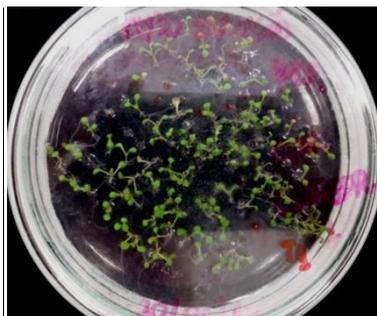


Figura 1. Seleção de plântulas de arabisopsis (Geração T1) em meio contendo glufosinato de amônio.

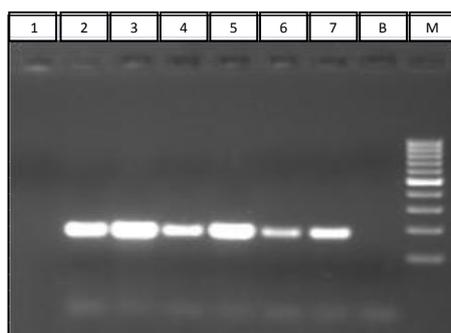


Figura 2. (1) representa uma planta de arabisopsis negativa para o sistema *CRISPR/Cas9*; (2 e 3) representam plantas de arabisopsis positivas transformadas com o sistema *CRISPR/Cas9*+(gene *A2G16060.1*)+*bar*; (4 e 5) plantas controle positivas; (6 e 7) plantas controle negativas; B o *non-template control* e (M) o marcador molecular.

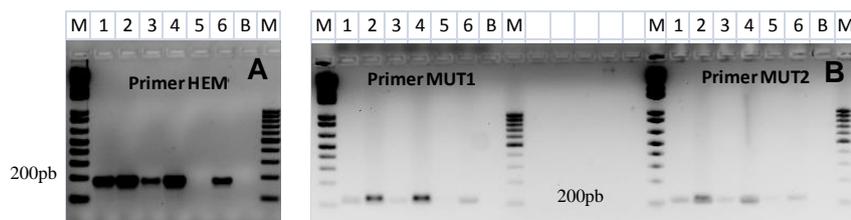


Figura 3. Gel 0.8% de agarose com produto de PCR das plantas CRISPR positivas (3, 4, 5, 6) e plantas controle negativo (1, 2): (A) *primer HEM*, demonstrando a eficiência e especificidade para o gene de interesse (200pb) ; (B) primers *MUT1* e *MUT2*, demonstrando que mesmo em plantas CRISPR positivas foram capazes de amplificar bandas de 200pb, o que confere com o tamanho do gene *nsHB* íntegro; sendo M representando o marcador molecular e B representando o *non-template control*.

Tabela 1. Sequências forward (F) e reverse (R) dos *primers* utilizados nas reações para confirmação da transformação das plantas e da geração de mutação gerada pela Cas9

Primer	Sequência 5'-3'	Objetivo do primer
Bar	F= 5´TGGCTGGAATCGCTTATGCT3´ R= 3´TGCGGTCCAATCGTAAGCAT5´	- Identificar plantas CRISPR positivas; - Identificar a qualidade do DNA,
HEM	F= 5´GGATCTTTGAGATTGCACCAAC3´ R= 3´CCAAAACCAACAATCTTTGATTC5´	amplificando uma região de 200pb que confere com o tamanho do gene <i>nsHB</i> ;
MUT1	F= 5´GCTGAGCAAAAATCCAAAGC3´ R= 3´CCAAAACCAACAATCTTTGATTC5´	- Identificar a mutação gerada pela Cas9;
MUT2	F= 5´ATGAGCAAAAATCCAAAGCTC5´ R= 3´CCAAAACCAACAATCTTTGATTC5´	- Identificar a mutação gerada pela Cas9;