

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Soja
Ministério da Agricultura e Pecuária**

DOCUMENTOS 453

18^a Jornada Acadêmica da Embrapa Soja Resumos expandidos

*Regina Maria Villas Bôas de Campos Leite
Larissa Alexandra Cardoso Moraes
Kelly Catharin*
Editoras Técnicas

Embrapa Soja
Londrina, PR
2023

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Soja
Rod. Carlos João Strass, s/n
Acesso Orlando Amaral, Distrito da Warta
CEP 86065-981
Caixa Postal 4006
Londrina, PR
Fone: (43) 3371 6000
www.embrapa.br/soja
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

**Comitê Local de Publicações
da Embrapa Soja**

Presidente
Adeney de Freitas Bueno

Secretária-Executiva
Regina Maria Villas Bôas de Campos Leite

Membros
*Claudine Dinali Santos Seixas, Edson Hirose,
Ivani de Oliveira Negrão Lopes, José de Barros
França Neto, Leandro Eugênio Cardamone
Diniz, Marco Antonio Nogueira, Mônica Juliani
Zavaglia Pereira e Norman Neumaier*

Supervisão editorial
Vanessa Fuzinatto Dall’Agnol

Bibliotecária
Valéria de Fátima Cardoso

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica e capa
Marisa Yuri Horikawa

1ª edição
PDF digitalizado (2023).

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Soja

Jornada Acadêmica da Embrapa Soja (18. : 2023: Londrina, PR).
Resumos expandidos [da] XVIII Jornada Acadêmica da Embrapa Soja / Regina
Maria Villas Bôas de Campos Leite... [et al.] editoras técnicas – Londrina:
Embrapa Soja, 2023.
161 p. (Documentos / Embrapa Soja, ISSN 2176-2937 ; n. 453).

1. Soja. 2. Pesquisa agrícola. I. Leite, Regina Maria Villas Bôas de Campos. II.
Moraes, Larissa Alexandra Cardoso. III. Catharin, Kelly. IV. Série.

CDD: 630.2515 (21. ed.)

Expressão transiente em embriões de soja para validação *in vivo* de gRNAs visando a edição genica via CRISPR/Cas

POLIZELI, S. R. A.¹; FIGLIANO, G. C.¹; HOSHINO, R. T.²; MARIN, S. R. R.³; NEPOMUCENO, A. L.⁴; MERTZ-HENNING, L. M.⁴

¹ UEL - Universidade Estadual de Londrina, Bolsista PIBIC/CNPq, Londrina, PR; ² Bolsista Funarbe/Embrapa Soja; ³ Analista, Embrapa Soja; ⁴ Pesquisador (a), Embrapa Soja.

Introdução

O sistema CRISPR/Cas é um mecanismo no qual uma molécula de RNA guia (gRNA) direciona nucleases Cas para quebrar um sítio de DNA alvo (Doudna; Charpentier, 2014). Após a quebra na dupla fita de DNA, o sistema de reparo inato da célula corrige o DNA danificado (Ran et al., 2013; Doudna; Charpentier, 2014), podendo gerar novas mutações. O gRNA é componente chave do sistema CRISPR/Cas e várias ferramentas *in silico* foram desenvolvidas para ajudar a orientar o design do gRNA (Stemmer et al., 2015; Doench et al., 2016; Haeussler et al., 2016; Chari et al., 2017; Liu et al., 2017). No entanto, essas ferramentas apenas preveem o desempenho do gRNA como um guia, exigindo ensaios *in vivo* para validar sua real funcionalidade ou eficiência. Além disso, a validação de sistemas CRISPR/Cas com um ensaio *in vivo* é fortemente recomendada quando a espécie-alvo é difícil de transformar, como é o caso da maioria das culturas, a fim de otimizar as etapas subsequentes no *pipeline* de pesquisa (Shan et al., 2020).

A geração de plantas de soja editadas tem sido considerada complexa, demorada e trabalhosa, uma vez que a eficiência de transformação estável geralmente permanece abaixo de 10% (Do et al., 2019). Isso mostra a importância de validar o sistema CRISPR/Cas aplicando ensaios transientes para verificar se o gRNA tem acesso ao DNA alvo e direciona as nucleases para a sequência desejada (Shan et al., 2020). Na soja, algumas das abordagens utilizadas incluem agroinfiltração de células foliares, transfecção de protoplastos (Kim; Choi, 2021) e transformação de raízes usando *Agrobacterium rhizogenes* (Do et al., 2019). No entanto, esses métodos às vezes são trabalhosos e demorados e/ou ainda apresentam uma eficiência de transformação relativamente baixa, confirmando que a validação do gRNA continua a ser

um gargalo no pipeline de edição gênica de soja. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um ensaio *in vivo* por meio de expressão transiente para validação de gRNAs em soja, visando a edição de genes associados a tolerância à seca.

Material e Métodos

Identificação dos genes alvos, desenho dos RNAs guias (gRNAs) e clonagem

As sequências dos genes alvos associadas a característica de tolerância à seca foram obtidas a partir do banco de dados do Phytozome e comparadas nas duas versões do genoma de soja disponíveis *Glycine max* a2.v1 e *Glycine max* a4.v1 (Phytozome v13). Posteriormente essas sequências foram alinhadas com o genoma da cultivar de soja BRS 537 (cultivar utilizada no processo de edição), apresentando 100% de similaridade. Realizou-se o desenho dos gRNAs para os genes de interesse por meio do software CRISPRDirect (Naito et al., 2015). Foram selecionados os guias mais promissores e altamente específicos, com ausência de *off-targets* na região do guia + PAM. Em seguida esses gRNAs foram clonados em um vetor binário capaz de se multiplicar tanto em *Escherichia coli* quanto em *Agrobacterium tumefaciens*. O vetor contém os seguintes elementos: sequência para expressar a enzima Cas9 sob controle do promotor 35S do *Cauliflower mosaic virus* (CaMV), sequência do gene *Bar* (marcador de seleção) que confere resistência à herbicida glufosinato de amônio também sob controle do promotor 35S, além dos gRNAs do gene alvo na soja sob controle do promotor U6 de *Arabidopsis thaliana*.

Validação dos gRNAs *in vivo* por meio de expressão transiente

A transformação de embriões de soja da cultivar convencional BRS 537 foi realizada de acordo com o protocolo estabelecido por Kanamori et al. (2011) com uma modificação; a injúria foi realizada não somente na região apical, mas em todo embrião para aumentar a probabilidade de obtenção de células transformadas. Após o processo de injúria, os embriões foram mantidos por 5 dias em meio sólido (composto por Gamborg B5 Basal Medium 1/10X;

Vitamina B5 1/10X; sacarose 30g/L; MES 4,62 g/L; phytaagar 4 g/L, suplementado BAP 1,67mg/L; GA3 0,25mg/L; AS 1 M, STS (Tiosulfato de sódio, 1M, 1% de DTT 1M e CYS 400 mg/L, pH 5,4). A seguir, os embriões foram coletados em 3 *bulks* composto por 15 embriões cada. O DNA foi extraído de acordo com o protocolo de Doyle e Doyle (1990) e a integridade do DNA foi visualizada em gel de agarose 1% (v/v). Para identificar a presença de células transformadas foi realizado uma PCR convencional, conforme as condições de ciclagem, desnaturação a 95°C por 1 min, seguido por 35 ciclos de 96°C por 15 s, anelamento a 50°C por 15 s, extensão a 60°C por 4 min, utilizando os *primers* que confirmam a presença da maquinaria da Cas9, presente no vetor de transformação.

Confirmação da edição por sequenciamento

Foram utilizados *primers* específicos flanqueando as regiões dos gRNAs onde deve ocorrer a edição dos genes de cada construção utilizada na transformação. As condições de ciclagem utilizadas foram: desnaturação a 95°C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 95°C por 30 s, anelamento a 55°C por 30 s, extensão a 72°C por 45 s, seguido por 72°C por 7 min. Para a realização do sequenciamento, o produto desta PCR foi purificado com o kit *Wizard SV Gel e PCR Clean-Up System* (EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. O sequenciamento foi realizado em sequenciador ABI 3530 DNA Analyzer Applied Biosystems utilizando o kit de sequenciamento *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Invitrogen, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. O sequenciamento direto de produtos de PCR contendo tais mutações resultou em cromatogramas de sequenciamento sobrepostos, que foram analisados pelo software TIDE¹.

Resultados e Discussão

Foram validados sete gRNAs (gRNA2; gRNA3; gRNA4; gRNA5; gRNA6; gRNA2/2.1 e gRNA4/2.1) que apresentaram resultado positivo na amplificação por PCR convencional para genes associados a maquinaria do vetor. Desses, seis gRNAs foram funcionais e adequados para serem utilizados na transformação transiente de soja de acordo com a análise dos *bulks* (sequenciados) no software TIDE, que comprovaram a ocorrência de edição em

¹ <https://tide.nki.nl/>

ambas as repetições biológicas (Figura 1). O software TIDE estima a frequência de pequenas alterações de nucleotídeos direcionadas introduzidas pelo CRISPR e relata a identidade das inserções ou deleções detectadas e suas frequências (Brinkman et al., 2018). No caso deste ensaio a eficiência de edição foi variável, o que é esperado tendo em vista que se trata de um ensaio transitente, e que desta forma, nem todas as células são transformadas e editadas.

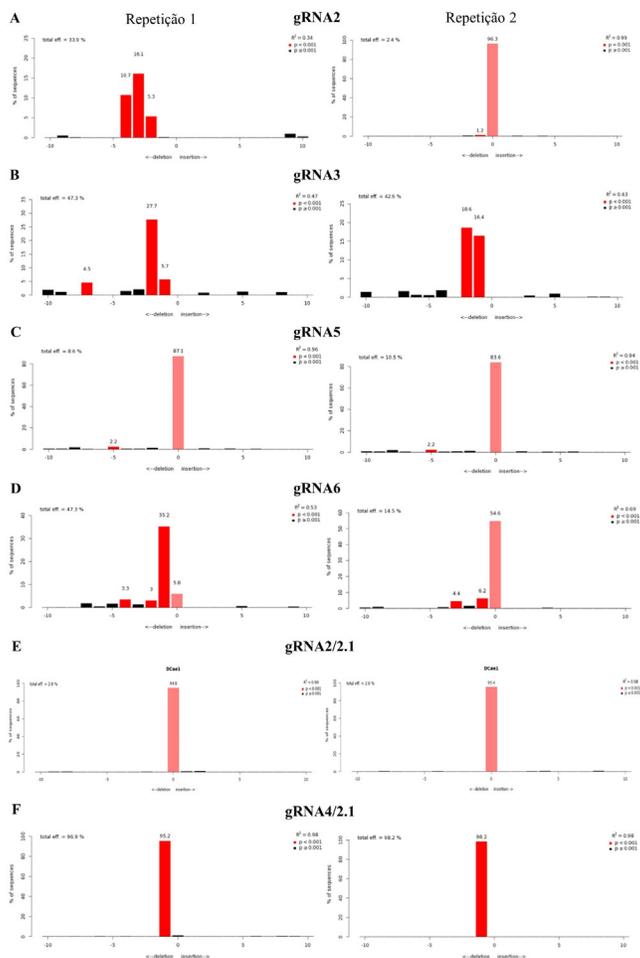


Figura 1. Análise dos RNAs guias (gRNA) por meio de expressão transitente em embriões de soja. As análises de sequenciamento Sanger foram realizadas em duplicata biológica da cultivar BRS 537 pelo software TIDE que estima a frequência de pequenas alterações de nucleotídeos via CRISPR bem como, a identidade das inserções e deleções detectadas e suas frequências (Brinkman et al., 2018).

Embora ferramentas *in silico* e *in vitro* sejam usadas para verificar a qualidade do gRNA, elas nem sempre representam a realidade *in vivo*. Naim et al. (2020), por exemplo, encontrou um baixo consenso para uniformidade preditiva e desempenho entre oito diferentes ferramentas *on-line* de gRNA-site e nenhuma correlação significativa com sua eficácia *in vivo* em *Nicotiana benthamiana*. Portanto, há variações na eficiência real das mutações derivadas de CRISPR induzidas por gRNAs selecionados *in silico*, o que significa que métodos confiáveis para a validação de gRNAs são críticos para melhorar o sistema.

Em espécies como a soja, as etapas de cultura de tecidos *in vitro* demandam mão de obra e tempo para a transformação da planta. Embora diferentes métodos tenham sido propostos e aprimorados para a espécie, eles ainda são trabalhosos, demorados e apresentam baixa eficiência, continuando a ser um gargalo para a manipulação genética (Kereszt et al., 2007; Chen et al., 2018; Xu et al., 2022). Portanto, qualquer etapa otimizada é vantajosa a fim de garantir que o sistema CRISPR/Cas esteja funcionando antes de iniciar a transformação genética para obtenção de plantas editadas, devido aos altos investimentos envolvidos na transformação estável da soja, incluindo reagentes e pessoal altamente qualificado.

Conclusão

Os ensaios *in vivo* descritos neste trabalho demonstraram ser uma alternativa rápida e de baixo custo para verificação da expressão transiente de genes associados a tolerância à seca em soja. O método foi eficiente para validação de sete gRNAs, permitindo a observação de genes editados.

Referências

BRINKMAN, E. K.; KOUSHOLT, A. N.; HARMSSEN, T.; LEEMANS, C.; CHEN, T.; JONKERS, J.; STEENSEL, B. V. Easy quantification of template-directed CRISPR/Cas9 editing. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. 10, e58, 2018.

CHARI, R.; YEO, N. C.; CHAVEZ, A.; CHURCH, G. M. sgRNA Scorer 2.0: a species-independent model to predict CRISPR/Cas9 activity. **ACS Synthetic Biology**, v. 6, p. 902-904, 2017. DOI: 10.1021/acssynbio.6b00343.

CHEN, L.; CAI, Y.; LIU, X.; YAO, W.; GUO, C.; SUN, S.; WU, C.; JIANG, B.; HAN, T.; HOU, W. Improvement of soybean *Agrobacterium*-mediated transformation efficiency by adding glutamine

and asparagine into the culture media. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, art. 3039, 2018. DOI: 10.3390/ijms19103039.

DO, P. T.; NGUYEN, C. X.; BUI, H. T.; TRAN, L. T. N.; STACEY, G.; GILLMAN, J. D.; ZHANG, Z. J.; STACEY, M. G. Demonstration of highly efficient dual gRNA CRISPR/Cas9 editing of the homeologous GmFAD2-1A and GmFAD2-1B genes to yield a high oleic, low linoleic and α -linolenic acid phenotype in soybean. **BMC Plant Biology**, v. 19, art. 311, 2019. DOI: 10.1186/s12870-019-1906-8.

DOENCH, J. G.; FUSI, N.; SULLENDER, M.; HEGDE, M.; VAIMBERG, E. W.; DONOVAN, K. F.; SMITH, I.; TOTHOVA, Z.; WILEN, C.; ORCHARD, R.; VIRGIN, H. W.; LISTGARTEN, J.; ROOT, D. E. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off- target effects of CRISPR-Cas9. **Nature Biotechnology**, v. 34, p. 184-191, 2016. DOI: 10.1038/nbt.3437.

DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science**, v. 346, 1258096, 2014. DOI: 10.1126/science.1258096.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.

HAEUSSLER, M.; SCHÖNIG, K.; ECKERT, H.; ESCHSTRUTH, A.; MIANNÉ, J.; RENAUD, J.-B.; SCHNEIDER-MAUNOURY, S.; SHKUMATAVA, A.; TEBOUL, L.; KENT, J.; JOLY, J.-S.; CONCORDET, J.-P. Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR. **Genome Biology**, v. 17, art. 148, 2016. DOI: 10.1186/s13059-016-1012-2.

KANAMORI, N.; GIROTTO, L.; NEPOMUCENO, A. L. *Agrobacterium* mediated transformation of Brazilian soybean variety, BR 16. **JIRCAS Work Report**, v. 71, p. 75-79, 2011.

KERESZT, A.; LI, D.; INDRASUMUNAR, A.; NGUYEN, C. D. T.; NONTACHAIYAPOOM, S.; KINKEMA, M.; GRESSHOFF, P.M. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of soybean to study root biology. **Nature Protocols**, v. 2, p. 948-952, 2007. DOI: 10.1038/nprot.2007.141.

KIM, H.; CHOI, J. A robust and practical CRISPR/crRNA screening system for soybean cultivar editing using LbCpf1 ribonucleoproteins. **Plant Cell Reports**, v. 40, p. 1059-1070, 2021. DOI: 10.1007/s00299-020-02597-x.

LIU, H.; DING, Y.; ZHOU, Y.; JIN, W.; XIE, K.; CHEN, L. L. CRISPR-P 2.0: an improved CRISPR-Cas9 tool for genome editing in plants. **Molecular Plant**, v. 10, p. 530-532, 2017. DOI: 10.1016/j.molp.2017.01.003.

NAIM, F.; SHAND, K.; HAYASHI, S.; O'BRIEN, M.; MCGREE, J.; JOHNSON, A. A. T.; DUGDALE, B.; WATERHOUSE, P. M. Are the current gRNA ranking prediction algorithms useful for genome editing in plants? **PLoS ONE**, v. 15, e0227994, 2020. DOI: 10.1371/journal.pone.0227994.

NAITO, Y.; HINO, K.; BONO, H.; UI-TEI, K. CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites. **Bioinformatics**, v. 31, p. 1120-1123, 2015. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu743.

RAN, F. A.; HSU, P. D.; WRIGHT, J.; AGARWALA, V.; SCOTT, D. A.; ZHANG, F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. **Nature Protocols**, v. 8, p. 2281-2308, 2013. DOI: 10.1038/nprot.2013.143.

SHAN, S.; SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E.; YANG, B. Considerations in adapting CRISPR/Cas9 in nongenetic model plant systems. **Applications in Plant Sciences**, v. 8, e11314, 2020. DOI: 10.1002/aps3.11314.

STEMMER, M.; THUMBERGER, T.; KEYER, M. del S.; WITTBRODT, J.; MATEO, J. L. CCTop: an intuitive, flexible and reliable CRISPR/Cas9 target prediction tool. **PLoS ONE**, v. 10, e0124633, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0124633.

XU, H.; GUO, Y.; QIU, L.; RAN, Y. Progress in soybean genetic transformation over the last decade. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, art. 900318, 2022. DOI: 10.3389/fpls.2022.900318.