

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

Eventos Técnicos & Científicos

3

Junho, 2024

RESUMOS EXPANDIDOS

39^a Reunião de Pesquisa de Soja

**26 e 27 de junho de 2024
Londrina, PR**

*Embrapa Soja
Londrina, PR
2024*

Embrapa Soja

Rodovia Carlos João Strass, acesso Orlando Amaral, Distrito de Warta
Caixa Postal 231, CEP 86001-970, Londrina, PR
Fone: (43) 3371 6000
Fax: (43) 3371 6100
www.embrapa.br/soja
https://www.embrapa.br/fale-conosco/sac/

Comitê de Publicações da Embrapa Soja

Presidente: *Adeney de Freitas Bueno*

Secretário-executivo: *Regina Maria Villas Bôas de Campos Leite*

Membros: *Claudine Dinali Santos Seixas, Clara Beatriz Hoffmann-Campo, Fernando Augusto Henning, Ivani de Oliveira Negrão Lopes, Leandro Eugênio Cardamone Diniz, Maria Cristina Neves de Oliveira, Mônica Juliani Zavaglia Pereira e Norman Neumaier*

Edição executiva: *Vanessa Fuzinatto Dall'Agnol*

Normalização: *Valéria de Fátima Cardoso*

Diagramação: *Marisa Yuri Horikawa*

Organização da publicação: *Regina Maria Villas Bôas de Campos Leite, Claudine Dinali Santos Seixas*

1ª edição

Publicação digital: PDF

As opiniões emitidas nesta publicação são de exclusiva e de inteira responsabilidade dos autores, não exprimindo, necessariamente, o ponto de vista da Embrapa.

É de responsabilidade dos autores a declaração afirmando que seu trabalho encontra-se em conformidade com as exigências da Lei nº 13.123/2015, que trata do acesso ao Patrimônio Genético e ao Conhecimento Tradicional Associado.

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

Reunião de Pesquisa de Soja (39. : 2024 : Londrina, PR).

Resumos expandidos 39ª Reunião de Pesquisa de Soja, Londrina, PR, 26 e 27 de junho de 2024

-- Londrina : Embrapa Soja, 2024.

PDF (195 p.) -- (Eventos técnicos & científicos / Embrapa Soja, ISSN 0000-0000 ; 3).

1. Soja. 2. Pesquisa agrícola. I. Título. II. Série.

CDD (21. ed.) 633.34072

CONSTRUÇÃO DE VETOR CRISPR/Cas COM DUPLO gRNAs PARA EDIÇÃO DE DICOTILEDÔNEAS

SILVA, A. M. V.⁽¹⁾; SOUZA, E. M. G.⁽¹⁾; MARIN S. R. R.⁽²⁾; NEPOMUCENO, A. L.⁽²⁾; MERTZ-HENNING, L. M.⁽²⁾
⁽¹⁾Universidade Estadual de Londrina; ⁽²⁾Embrapa Soja, Londrina, PR.

Introdução

A soja, sendo rica em proteínas de alta qualidade e contendo aminoácidos essenciais, destaca-se como uma importante fonte alimentar. Suas sementes possuem a maior concentração de proteínas entre as leguminosas, o que faz com que a mesma seja o principal componente da alimentação animal na forma de farelo (Cabanos et al., 2021).

O sistema CRISPR/Cas é uma ferramenta utilizada na edição de genomas, que pode ser aplicada para o melhoramento genético da soja, sendo a enzima Cas9 a mais comumente empregada, derivada da *Streptococcus pyogenes* (SpCas9). Essa enzima realiza a clivagem do DNA na presença da sequência “NGG” e do RNA guia (gRNA), o qual direciona a Cas9 para o local específico do genoma o qual se deseja editar. Posteriormente, mecanismos de reparo celular são acionados, e com isso, mutações podem ser introduzidas de modo direcionado, podendo levar a deleção, substituição, ou inserção de nucleotídeos. Esse sistema de edição permite o aprimoramento de diversas características vegetais e está impulsionando o desenvolvimento de germoplasma com características superiores (Yao et al., 2023).

O uso de gRNA duplo para edição de um mesmo gene, otimiza o *screening* das plantas oriundas da cultura de tecidos, pois possibilita a deleção de grandes fragmentos do gene de interesse, facilitando o processo de caracterização molecular das plantas editadas, por meio de reação da polimerase em cadeia (PCR), seguido de eletroforese em gel de agarose (Zhao et al., 2016).

O objetivo deste estudo foi realizar a construção de vetor com duplo gRNA para edição de um único gene, utilizando o sistema de edição CRISPR/Cas9.

Material e Métodos

A sequência do gene alvo da edição, que consiste em um gene que codifica para a presença de fatores antinutricionais da soja, foi obtida a partir do banco de dados do Phytozome, utilizando a versão mais recente do genoma de soja disponível, *Glycine max* Wm82 a6.v1 (Phytozome v13).

Posteriormente, foram desenhados os gRNAs para direcionar a enzima Cas9 ao gene alvo para edição, por meio do software CCTop, que garante uma alta probabilidade de sucesso na edição e evita a presença de off-targets (modificações genéticas fora do alvo). Para síntese dos gRNAs, foram incluídos os sítios das enzimas de restrição presentes no vetor para permitir a inserção no vetor a ser utilizado na transformação.

O vetor, voltado para o silenciamento gênico via CRISPR é composto por elementos para expressar a enzima Cas9 controlada pelo promotor 35S do vírus do mosaico do couve-flor (CaMV), a sequência do gene *Bar* (marcador de seleção) que confere resistência ao herbicida glufosinato de amônio, também sob controle do promotor 35S, e os dois gRNAs do gene alvo a ser editado, sob controle do promotor U6 de *Arabidopsis thaliana*. Os gRNAs foram clonados nesse vetor binário, capaz de se replicar tanto em *Escherichia coli* quanto em *Agrobacterium tumefaciens*.

A sequência do gRNA1 foi inserida no vetor entre os sítios de restrição *BsmBI*, enquanto a sequência do promotor U6 + gRNA 2 foi inserida entre os sítios de restrição *Sall* e *KpnI*. A inserção desses gRNAs ocorreu da seguinte forma:

A sequência dos gRNAs foram fosforiladas para permitir a formação do duplex e a preparação das extremidades para ligação do gRNA ao vetor. O vetor foi linearizado usando a enzima *BsmBI*. Foi então realizada a eletroforese em gel de agarose 1% com tampão TBE1X e o fragmento referente ao vetor linearizado foi purificado usando o Kit de Purificação de gel Wizard SV Gel and PCR Clean Up System Promega, conforme o protocolo do kit. O vetor purificado foi quantificado usando espectrofotômetro NanoDrop para determinar a quantidade de vetor linear a ser usada para a ligação de cada um dos gRNAs, usando a enzima T4 ligase. O fragmento correspondente ao promotor U6+gRNA2+Track foi amplificado por PCR, em seguida foi realizada a digestão com as enzimas de restrição *Sall* e *KpnI*, tanto do *amplicon* como do vetor contendo o gRNA1. Por fim foi realizada a reação de ligação com T4 Ligase entre o vetor linear contendo o gRNA1 e o fragmento U6+gRNA2+Track. O produto final de ligação dos gRNAs ao vetor é apresentado na Figura 1.



Fonte – próprio autor

Figura 1. Cassete de expressão (Vetor) composto de: LB (borda esquerda) - promotor 35S, gene marcador Bar, terminador, promotor 35S, enzima Cas9, terminador, promotor de ubiquitina, RNA guia 1, promotor de ubiquitina RNA guia 2, RB (borda direita).

Para a clonagem do vetor, células competentes de *E. coli* e o vetor contendo os gRNAs previamente ligados foram adicionadas a um microtubo, e mantidas em repouso por 30 minutos. Posteriormente a clonagem foi realizada através de choque térmico em banho-maria a 45°C por 90 segundos, seguido por um banho de gelo por 90 segundos. Na sequência foi adicionado meio Luria Bertani (LB) aos microtubos, que foram então incubados em um agitador orbital do tipo shaker, a 180 rpm a 37°C por 1 hora, para permitir a multiplicação dos plasmídeos. Os plasmídeos foram centrifugados a 3.000 rpm por 1 minuto para concentrar as células de *E. coli*, que em seguida foram plaqueadas em meio LB contendo 50µg.mL⁻¹ de espectinomicina, para seleção das colônias recombinantes. As placas foram incubadas a 37°C durante 16 horas.

A seleção de colônias recombinantes foi realizada por PCR da região do promotor e do gRNA, seguida de visualização por eletroforese em gel de agarose a 1%. Foi selecionada uma colônia recombinante para extração do DNA plasmidial, a ser usada na transformação de *A. tumefaciens* através de choque térmico. Após confirmação de colônias recombinantes em *A. tumefaciens*, o vetor foi empregado na transformação de soja visando o silenciamento gênico.

Resultados e Discussão

No processo de transformação de plantas, a construção de um vetor otimizado que contenha todos os elementos necessários para expressão da maquinaria de edição, é essencial para obter o resultado esperado. A linearização do vetor através de digestão com enzima de restrição possibilitou gerar as extremidades coesivas necessárias para introdução do gRNA (Figura 2A).

A clonagem, com a inserção de gRNAs duplos, foi confirmada por meio de PCR de colônias e eletroforese em gel de agarose utilizando primers que se anelam na região do promotor e da enzima Cas9 e na região dos gRNAs. Conforme observado na Figura (2B) observou-se as bandas correspondendo ao tamanho do fragmento esperado de 564pb, o que demonstra que o gRNA foi clonado de forma eficiente.

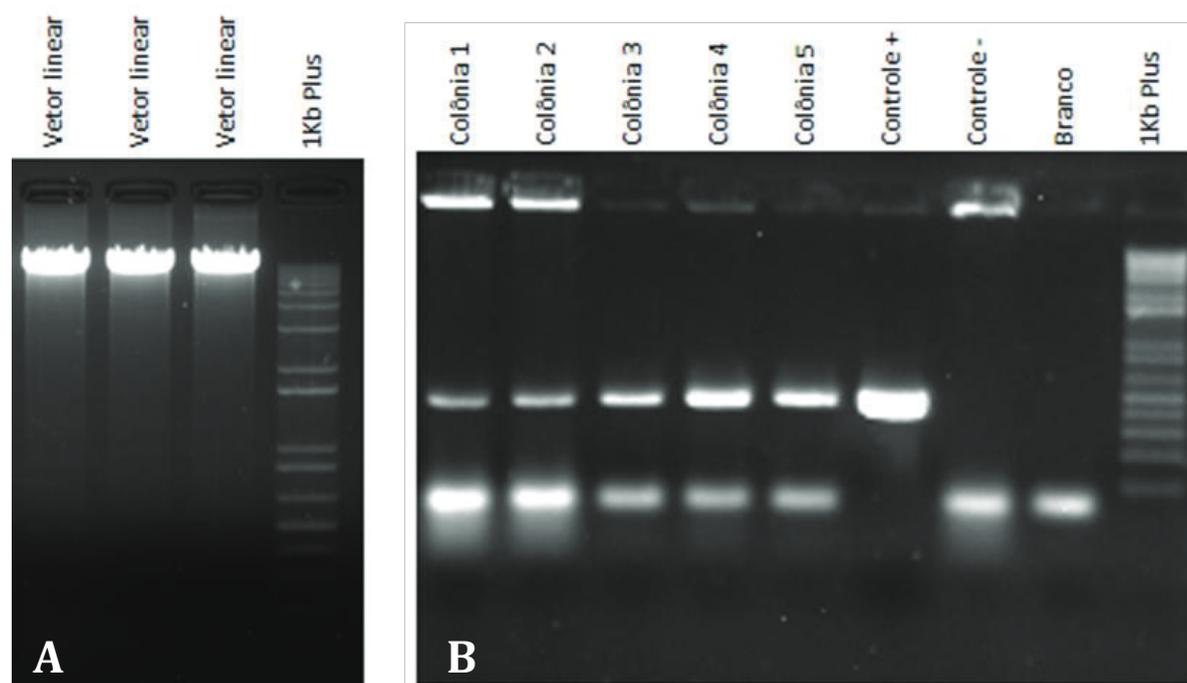


Figura 2. A) Eletroforese em gel correspondente a linearização do vetor. B) Eletroforese em gel correspondente às ligações realizadas do vetor e dos gRNAs. A reação de ligação foi utilizada como controle positivo, como controle negativo foi utilizado o vetor vazio e como branco reação sem DNA.

A possibilidade de utilizar um vetor modular que possibilita a troca do gRNA é uma estratégia eficiente e que reduz custos quando comparada à síntese química por empresas especializadas. Na literatura, essa estratégia vem sendo adotada em plantas de espécie modelo como *A. thaliana* (Stuttman et al., 2021), bem como, em culturas de importância agrícola como a soja (Mallet et al., 2019). Neste trabalho foi possível demonstrar a aplicabilidade desta estratégia em um vetor para transformação mediada por *A. tumefaciens*. O emprego de vetores com gRNA duplos fornece uma plataforma poderosa para gerar edições de grandes fragmentos, pois aumenta a probabilidade de silenciamento do gene de interesse, uma vez que quanto maior o fragmento editado, maior a chance de obter o fenótipo esperado, além de otimizar o *screening* das plantas editadas através de PCR e eletroforese selecionando apenas plantas editadas para posterior sequenciamento (Zhao et al., 2016).

Conclusão

Neste trabalho foi possível realizar com sucesso a construção de vetor com duplo gRNA para expressão do sistema CRISPR/Cas em dicotiledôneas como a soja, com potencial de otimizar o *screening* das plantas editadas.

Referências

CABANOS, C.; MATSUOKA, Y.; MARUYAMA, N. Soybean proteins/peptides: a review on their importance, biosynthesis, vacuolar sorting, and accumulation in seeds. **Peptides**, v. 143, 170598, 2021. DOI: 10.1016/j.peptides.2021.170598.

MALLET, D. R.; CHANG, M.; CHENG, X.; BEZANILLA, M. Efficient and modular CRISPR-Cas9 vector system for *Physcomitrella patens*. **Plant Direct**, v. 3, n. 9, e00168, 2019. DOI: 10.1002/pld3.168.

STUTTMANN, J.; BARTHEL, K.; MARTIN, P.; ORDON, J.; ERICKSON, J. L.; HERR, R.; FERIK, F.; KRETSCHMER, C.; BERNER, T.; KEILWAGEN, J.; MARILLONNET, S.; BONAS, U. Highly efficient multiplex editing: one-shot generation of 8x *Nicotiana benthamiana* and 12x *Arabidopsis* mutants. **Plant Journal**, v. 6, n. 1, p. 8-22, 2021. DOI: 10.1111/tpj.15197.

YAO, D.; ZHOU, J.; ZHANG, A.; WANG, J.; LIU, Y.; WANG, L.; PI, W.; LI, Z.; YUE, W.; CAI, J.; LIU, H.; HAO, W.; QU, X. Advances in CRISPR/Cas9-based research related to soybean [*Glycine max* (Linn.) Merr] molecular breeding. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, 1247707, 2023. DOI: 0.3389/fpls.2023.1247707.

ZHAO, Y.; ZHANG, C.; LIU, W.; GAO, W.; LIU, C.; SONG, G.; LI, W.; MAO, L.; CHEN, B.; XU, Y.; LI, X.; XIE, C. An alternative strategy for targeted gene replacement in plants using a dual-sgRNA/Cas9 design. **Scientific Report**, v. 6, 23890, 2016. DOI: 10.1038/srep23890.