

# Simpósio de Integração Acadêmica

## “Ciências Básicas para o Desenvolvimento Sustentável”

SIA UFV 2023



### INATIVAÇÃO DO GENE *NISP*, POR CRISPR/Cas9, NA DIMINUIÇÃO DA SUSCETIBILIDADE A *BEGOMOVÍRUS* EM *ARABIDOPSIS THALIANA*

João Victor Gonçalves Maffia<sup>1</sup> - [joao.maffia@ufv.br](mailto:joao.maffia@ufv.br); Elizabeth Pacheco Batista Fontes<sup>1</sup> - [bbfontes@ufv.br](mailto:bbfontes@ufv.br); Eugênio Ribeiro de Andrade Neto<sup>1</sup> - [eugenio.neto@ufv.br](mailto:eugenio.neto@ufv.br); Marco Aurélio Ferreira<sup>1</sup> - [marco.aurelioferreira@hotmail.com](mailto:marco.aurelioferreira@hotmail.com); Fredy Davi Albuquerque Silva<sup>1</sup> - [fredydavi@gmail.com](mailto:fredydavi@gmail.com); Pedro Augusto Braga dos Reis<sup>1</sup> - [pedroreis@ufv.br](mailto:pedroreis@ufv.br)

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - Universidade Federal de Viçosa

**Palavras-Chave:** Genes de suscetibilidade; Arabidopsis; Silenciamento gênico.

#### Introdução

Atualmente, as begomoviroses causam prejuízos em lavouras de dicotiledôneas cultiváveis. Visando contornar essa situação, dois genes de suscetibilidade da planta modelo *Arabidopsis thaliana* foram previamente identificados como genes de resistência recessiva contra *begomovirus*, sendo designados *NISP* e *NIG*. Uma vez que o silenciamento de genes de suscetibilidade levam a resistência recessiva, o sistema CRISPR/Cas9 surge como uma ferramenta promissora para silenciar estes genes, de forma a neutralizar a infecção, garantindo seguridade alimentar com a diminuição do uso de defensivos agrícolas.

#### Objetivos

Silenciar o gene *NISP* em linhagens *NIG* nocaute, criando um duplo mutante *nig/nisp* com resistência recessiva e geneticamente duradoura contra um amplo espectro de begomoviroses.

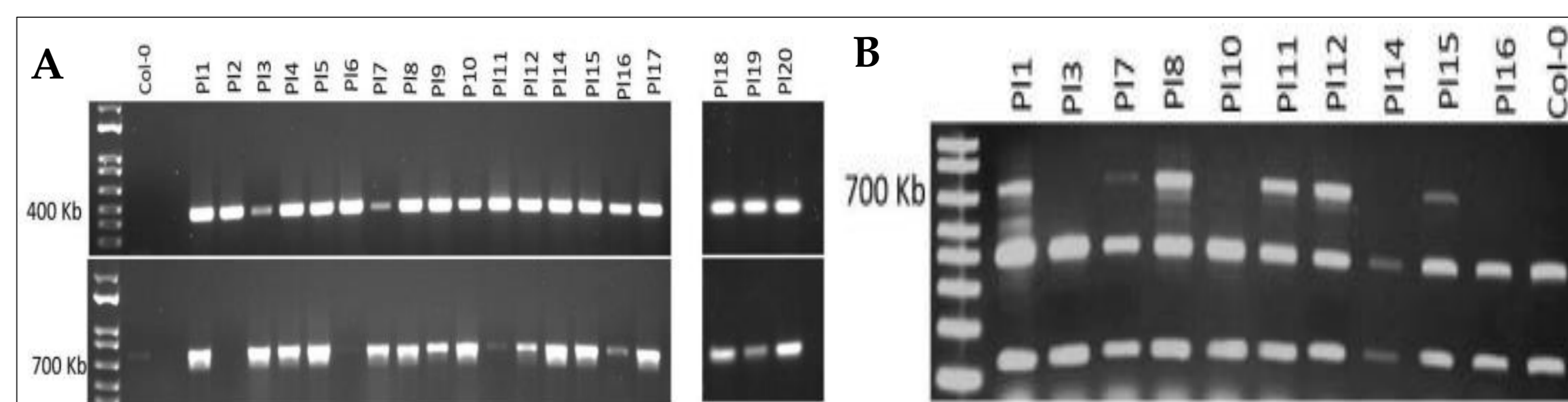
#### Material e Método

Definidas sequências do gene *NISP* foram utilizadas para a síntese de RNAs guias que foram inseridos no vetor de transformação pEE-401E. Linhagens *nig* nocaute de *Arabidopsis* foram transformadas com a referida construção de DNA por intermédio do mergulho floral utilizando agrobactéria, gerando sementes T0. Os transformantes primários foram selecionados pelo cultivo de sementes T0 em meio MS 1/2 força suplementado com higromicina 10 mg/mL, originando linhagens T1 que foram confirmadas por reações de PCR com o DNA genômico e os pares de primers U6-26p FWD + U6-29p RVS e U6-29p F+U6-26t. A confirmação da edição do gene foi realizada submetendo um fragmento amplificado do gene *NISP* contendo o sítio do RNA guia à reação de restrição com a enzima *Eco*NI. O avanço de gerações fez-se necessário na busca de um mutante transformado em homozigose, sendo o diagnóstico molecular do nocaute realizado através de reações de PCR com o par de primers AT4G30240 (1-107) FWD + AT4G30240 (105-200) RVS. As linhagens transformadas foram cultivadas com a linhagem controle Col-0 para avaliar possíveis fenótipos resultantes do nocaute do gene *NISP* no background genético *nig*.

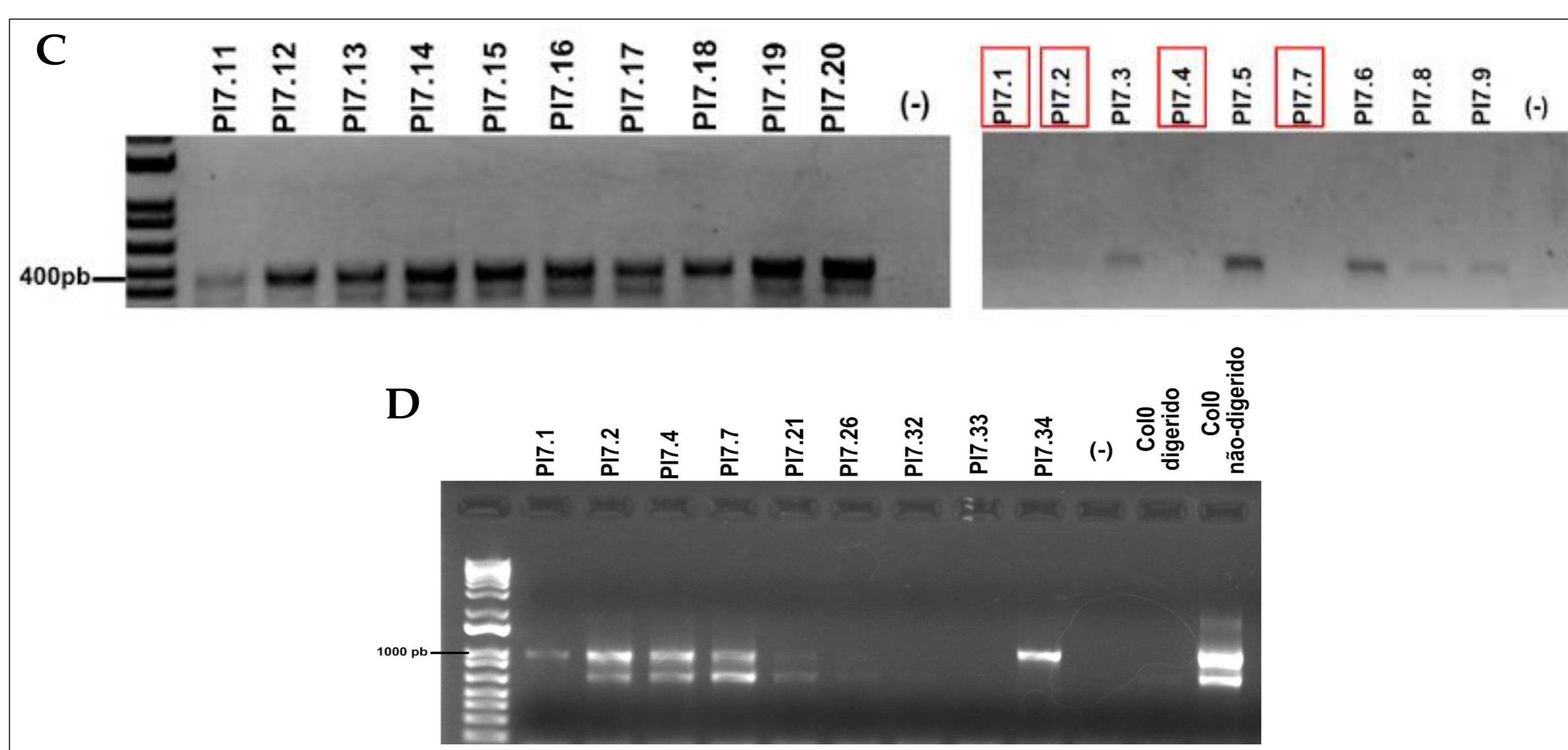
#### Apoio financeiro



#### Resultados e Discussão



**Figura 1.** Diagnóstico molecular das linhagens T1. [A] Confirmação dos transformantes com a construção *nisp-pEE401E*. [B] A reação de restrição com *Eco*NI mostrou-se parcialmente resistente em 6 organismos, caracterizando mutantes em heterozigose.



**Figura 2.** Diagnóstico molecular das linhagens T2 do organismo 7. [A] Os organismos foram selecionados sem a construção *nisp-pEE401E*, para evitar mutações inespecíficas pela Cas9 [B] O DNA genômico foi submetido à digestão e, em seguida, o produto foi substrato para uma PCR para amplificação de *NISP*. As amplificações mostram a resistência à *Eco*NI, indicando mutações no sítio de restrição de 6 organismos.

#### Conclusões

O Sistema CRISPR/*Cas9* mostrou-se promissora e eficaz no silenciamento dos genes de suscetibilidade e a metodologia não ineterferiu negativamente no desenvolvimento das linhagens. Além disso, silenciamento dos genes *NISP* e *NIG* não causaram efeitos adversos no desenvolvimento das plantas, viabilizando o silenciamento dos referidos genes de suscetibilidade.

#### Agradecimentos

