



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**MIRIELSON LOURES DA SILVA**

**SILENCIAMENTO DO GENE DA  $\beta$ -1,3-GLUCANASE DE *Carica papaya* POR CRISPR-Cas9**

VITÓRIA, ES

2021

**MIRIELSON LOURES DA SILVA**

**SILENCIAMENTO DO GENE DA  $\beta$ -1,3-GLUCANASE DE *Carica papaya* POR CRISPR-Cas9**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa.Dra. Patricia Machado Bueno Fernandes

VITÓRIA, ES

2021

**(Folha de Rosto Verso)**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e Classificação da Biblioteca Central da UFES, após a conclusão das correções sugeridas pela banca examinadora**

**MIRIELSON LOURES DA SILVA**

**SILENCIAMENTO DO GENE DA  $\beta$ -1,3-GLUCANASE DE *Carica papaya* POR CRISPR-Cas9**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 18 de março de 2021.

**Profa. Dra. Patricia Machado Bueno  
Fernandes**  
**Universidade Federal do Espírito Santo**  
**Orientadora**

**Prof.Dr. José Aires Ventura**  
**Instituto Capixaba de Pesquisa,**  
**Assistência Técnica e Extensão Rural**  
**Membro Interno**

**Prof.Dr. Silas Pessini Rodrigues**  
**Universidade Federal do Rio de Janeiro**  
**Campus Duque de Caxias**  
**Membro Externo**

VITÓRIA, ES

2021

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Espírito Santo

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patricia Machado Bueno Fernandes.

Às agências de fomento, FINEP, CNPq, CAPES, e FAPES pelo apoio financeiro e bolsa de estudo que viabilizou o desenvolvimento deste trabalho.

Ao IDAF e ao Incaper pelo apoio nas coletas.

Aos profissionais que colaboraram na execução do projeto de pesquisa: Prof. Dr. Antonio Alberto Fernandes, Prof. Dr. José Aires Ventura, Prof. Dr. Alexandre Martins, Dr<sup>a</sup>. Tathiana Sá Antunes e Dr. Oeber Quadros que também se tornou um grande amigo.

Aos membros do Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio (LBAA).

Especialmente Raquel, Luiz, Raíssa, Luiza Adami, Joellington, Weverton, Isabella, Marlonni, Ana Lúcia, Walleff, Fernando, Marcos e Vitor.

À Deus.

À minha família e amigos que me apoiam incondicionalmente nessa caminhada.

*“Arte e ciência caminham de mãos dadas.”*

*Leonardo Da Vince*

## RESUMO

SILVA, M.L. **Silenciamento do gene da  $\beta$ -1,3-Glucanase de *Carica papaya* pc CRISPR-Cas9**. 2021. 80f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia. – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Brasil.

A deposição de calose nos plasmodesmos está diretamente associada ao movimento viral. A predição de micro RNAs de mamão infectados pelo complexo viral papaya meleira virus (complexo PMeV) revelaram alta presença de miRNAs reprimindo a expressão pós-transcricional de genes envolvidos na síntese de  $\beta$ -1,3-glucanases. Nesse sentido, nosso trabalho teve como objetivo avaliar o silenciamento do gene da enzima  $\beta$ -1,3-glucanase como forma de resistência ao complexo PMeV causador da meleira mamoeiro. Para tal, foi utilizada a nova tecnologia de edição gênica CRISPR/Cas9. Para atestar o funcionamento da técnica CRISPR/Cas9 em tecidos de mamão, buscamos desenvolver um marcador visual interrompendo a biossíntese de clorofila através do silenciamento do gene da fitoeno desaturase em folhas, células e protoplasto de mamoeiro. Para a transformação de tecidos de mamão por agroinfiltração, utilizou-se o vetor binário pKSE401 que possui o gene da enzima Cas9 e uma sequência customizável referente à estrutura do RNA guia. Os novos plasmídeos gerados foram inseridos por eletroporação em *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, que passou a ser denominada A $\phi$ KSPD e A $\phi$ KSBG para silenciamento da fitoeno desaturase e  $\beta$ -1,3-glucanase, respectivamente. Como resultado, todas as folhas de mamão que foram submetidas à agroinfiltração por A $\phi$ KSPD apresentaram despigmentação devido à inativação do gene da fitoeno desaturase e o mesmo foi observado em embriões regenerados a partir de células transformadas. Os tecidos agroinfiltrados expressaram o gRNA customizado junto com Cas9. O mesmo método foi utilizado para A $\phi$ KSBG. Os resultados moleculares indicam que houve a mutação do gene alvo. Além disso, foi possível observar maior deposição de calose em células transformadas com A $\phi$ KSBG. Os resultados obtidos atestam que o uso da tecnologia CRISPR/Cas9 pode ser aplicada com sucesso em *Carica papaya*. Ressaltamos que até o dado momento não existe um protocolo estabelecido para edição de *C. papaya* pela tecnologia CRISPR, deste modo, nosso trabalho é pioneiro na aplicação da técnica em mamoeiro, com destaque também para o pioneirismo no silenciamento gênico da  $\beta$ -1,3-glucanase e da fitoeno desaturase nesta cultura, sendo o segundo um promissor marcador visual de funcionamento da técnica para *C. papaya*.

Palavras-chave: Melhoramento genético. Engenharia genética. Inativação gênica. Agronegócio. Cisgenia.

## SILENCING THE *Carica papaya* $\beta$ -1,3-GLUCANASE GENE BY CRISPR-Cas9

### ABSTRACT

SILVA, M.L. Silencing of the *Carica papaya*  $\beta$ -1,3-Glucanase gene by CRISPR-Cas9. 2021. 75f. Dissertation (Master in Biotechnology) – Postgraduation Biotechnological Programme, UFES, Espírito Santo. Brazil.

Callose deposition in plasmodesma is directly associated with viral movement. The prediction of micro RNAs from papaya infected by the papaya meleira virus viral complex (PMeV complex) revealed a high presence of miRNAs repressing the post-transcriptional expression of genes involved in the synthesis of  $\beta$ -1,3-glucanases. In this sense, our study aimed to evaluate the silencing of the  $\beta$ -1,3-glucanase enzyme gene as a form of resistance to the PMeV complex that causes the papaya sticky disease. For this purpose, the new CRISPR/Cas9 gene-editing technology was used. To attest to the functioning of the CRISPR/Cas9 technique in papaya tissues, we sought to develop a visual marker interrupting chlorophyll biosynthesis by silencing the phytoene desaturase gene in papaya leaves, cells and protoplasts. For the transformation of papaya tissues by agroinfiltration, the binary vector pKSE401 was used, which contains the Cas9 enzyme gene and a customizable sequence referring to the structure of the guide RNA. The new plasmids generated were inserted by electroporation into *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, which was renamed *A*pKSPD and *A*pKSBG for silencing of phytoene desaturase and  $\beta$ -1,3-glucanase, respectively. As a result, all papaya leaves that were submitted to agroinfiltration by *A*pKSPD showed depigmentation due to the inactivation of the phytoene desaturase gene and the same was observed in embryos regenerated from transformed cells. The agroinfiltrated tissues expressed the customized gRNA together with Cas9. The same method was used for *A*pKSBG. The results obtained attest that the use of CRISPR/Cas9 technology can be successfully applied in *Carica papaya*. We emphasize that so far there is no established protocol for editing *C. papaya* by CRISPR technology, thus, our work is a pioneer in the application of the technique in papaya, also highlighting the pioneering in  $\beta$ -1,3-glucanase and phytoene desaturase gene silencing in this crop, the second being a promising visual marker of the technique's functioning for *C. papaya*.

Keywords: Genetical enhancement. Genetic engineering. Gene inactivation. Agribusiness. Cisgenic.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Sintomas da meleira do mamoeiro. A) Frutos de mamão verde apresentando látex escuro e oxidado com aspecto pegajoso (seta vermelha). B) Fruto de mamão verde apresentando látex aquoso, fluido e translúcido (seta vermelha) após corte com bisturi..... 21
- Figura 2: Desenho esquemático do processo de produção e degradação da calose e o suposto movimento do complexo P<sub>MeV</sub> via plasmodesmo. A produção de calose (2) resulta em diminuição do limite de exclusão do plasmodesmo (3). Em contrapartida, a degradação da mesma (4) resulta na abertura do plasmodesmo (1) favorecendo a translocação viral..... 26
- Figura 3: Desenho esquemático mostrando o reconhecimento e clivagem do alvo pela enzima Cas9. O sistema CRISPR consiste de duas fitas de RNAs: tracrRNA e crRNA, que guiam a enzimas Cas9 até o alvo. O reconhecimento da sequência alvo é feito pelo crRNA, que é customizado de acordo com a região do DNA que se deseja clivar. Outra particularidade é que o alvo deve estar localizado 3 nucleotídeos a montante da sequência NGG, chamada de PAM. (Adaptado de FERNANDES, 2018). ..... 29
- Figura 4: Desenho esquemático da customização do vetor de transformação pKSE401. No primeiro momento o plasmídeo é linearizado utilizando enzima de restrição específica. Os gRNAs previamente sintetizados são clonados no plasmídeo de acordo com a técnica *Golden Gate Assembly*. ..... 37
- Figura 5: Sequência do cassete de expressão de gRNA conduzido por U6-26p sem alvo. SpR, gene de resistência à espectinomicina; gRNA-Sc, gRNA scaffold. As letras ampliadas e em caixas indicam sites Bsal. .... 38
- Figura 6 Desenho esquemático dos processos de cultura de tecidos e transformação celular, onde: CIM1 é meio de indução de calo; LCIM é meio de cultura de células em suspensão; CIM2 é meio de transformação utilizado para co-cultivo, lavagem e embriogênese somática; CIM3 é meio de seleção; CIM4 é meio de maturação; MBN é meio de regeneração de brotos; e IBA+IAA é meio de enraizamento. .... 42
- Figura 7: Desenho esquemático das diferentes estratégias de transformação adotadas neste trabalho..... 47

- Figura 8: Confirmação da construção dos vetores de transformação. M) Marcador Ladder Plus 1Kb Thermo, A) plasmídeo pKSPD e B) plasmídeo pKSBG.1 e 2 são o plasmídeo original pKSE401 e o plasmídeo clonado pKSPD (A) ou pKSBG (B), respectivamente..... 57
- Figura 9: Folhas de mamoeiro agroinfiltradas com *A. tumefaciens* apresentando sinais de clorose. A) Folhas agroinfiltradas com *A. tumefaciens* apresentando clorose (despigmentação e amarelecimento foliar) (\*). B) Na esquerda, folha agroinfiltrada com *A. tumefaciens* e na direita folha agroinfiltrada com *A. tumefaciens* sem plasmídeo, sem sinais de clorose (\*\*). C) Folhas agroinfiltradas com *A. tumefaciens* (\*) e folhas agroinfiltradas com *A. tumefaciens* sem plasmídeo (\*\*). D, E e F) folhas agroinfiltradas com *A. tumefaciens* com 1, 5 e 7 dias após agroinfiltração, respectivamente (a ponta da seta vermelha indica necrose dos tecidos)..... 59
- Figura 10: Gel de agarose após eletroforese, onde, tanto em A) quanto em B): M) Ladder Plus 1Kb Thermo; 1) folhas não agroinfiltradas (controle negativo); 2) Fragmento de aproximadamente 1500 pb referente ao gene espectinomicina do vetor pKSE401 que serviu como controle positivo. Em 3 e em 4 não houve amplificação do cDNA das folhas agroinfiltradas com *A. tumefaciens* sem o vetor (controles negativos). Em A (5, 6, 7 e 8) são fragmentos de PCR que correspondem a aproximadamente 423 pb, referente a expressão da região U6-26p / gRNA / U6-26t de folhas agroinfiltradas com *A. tumefaciens*. Em B (5 e 6) são fragmentos de PCR que correspondem a aproximadamente 423 pb, referente à expressão da região U6-26p / gRNA / U6-26t de folhas agroinfiltradas com *A. tumefaciens* ..... 60
- Figura 11: Isolamento e ensaio de viabilidade de protoplastos. A) isolamento de protoplastos a partir de calos (meio CIM1). B) Na esquerda, protoplastos em luz branca, na direita fluorescência do FDA em protoplastos viáveis. Escala 50 µm. .... 61
- Figura 12: Fluorescência de GFP. Na esquerda os protoplastos na luz branca, na direita emissão de fluorescência de GFP em protoplastos transfectados com pKGQ1. Escala 50 µm. .... 62
- Figura 13: Expressão do cassete gRNA + Cas9 em protoplastos. M) Marcador Ladder Plus 1Kb Thermo. 1 e 2) Protoplastos transfectados com pKGQ1 e pKGCPM, respectivamente (controles negativos). 3) Fragmentos de PCR que corresponde a aproximadamente 423 pb, referente a expressão da região U6-26p / gRNA / U6-26t

de protoplastos transfetados com pKSPD. 4) Fragmentos de PCR que corresponde a aproximadamente 423 pb, referente a expressão da região U6-26p / gRNA / U6-26t de protoplastos transfetados com pKSBG..... 62

Figura 14: Expressão do cassete gRNA + Cas9 em células somáticas. M) *Marcador Ladder Plus 1Kb Thermo*. 1) Controle positivo do PCR (DNA de protoplasto). 2) Fragmentos de PCR que corresponde a aproximadamente 423 pb, referente a expressão da região U6-26p / gRNA / U6-26t de células transformadas com *AtpKSPD*. 3) Digestão com *BssS $\alpha$ 1* do amplicon apresentado em 2. 4) Fragmentos de PCR que corresponde a aproximadamente 423 pb, referente a expressão da região U6-26p / gRNA / U6-26t de células transformadas com *AtpKSBG*. 5) Digestão com *BspH1* do amplicon apresentado em 4. .... 63

Figura 15: Mutação em células somáticas. M) *Marcador Ladder Plus 1Kb Thermo*. 1) Fragmentos de PCR que corresponde a 941 pb do gene da  $\beta$ -1,3-glucanase de células transformadas com *AtpKBG*. 2) Digestão com *BssS $\alpha$ 1* do amplicon apresentado em 1 (seta preta indica fragmento de 941 pb não digerido com a enzima devido à mutação). 3) Fragmentos de PCR que corresponde a 680 pb do gene da fitoeno desaturase de células transformadas com *AtpKPD*. 4) Digestão com *BspH1* do amplicon apresentado em 3 (seta preta indica fragmento de 680 pb não digerido com a enzima devido à mutação)..... 64

Figura 16: Mutação em células somáticas. M) *Marcador Ladder Plus 1Kb Thermo*. 1) Fragmentos de PCR que corresponde a 941 pb do gene da  $\beta$ -1,3-glucanase de células transformadas com *AtpKBG*. 2) Digestão com *BssS $\alpha$ 1* do amplicon apresentado em 1 (seta preta indica fragmento não digerido com a enzima devido à mutação). 3) Fragmentos de PCR que corresponde a 680 pb do gene da fitoeno desaturase de células transformadas com *AtpKPD*. 4) Digestão com *BspH1* do amplicon apresentado em 3 (seta preta indica fragmento não digerido com a enzima devido à mutação). . 64

Figura 17: Confirmação da interrupção na biossíntese de clorofila utilizando citometria de fluxo. O Controle SC, são protoplastos tratados com acetona para remoção da clorofila. A) O pKGCPM são protoplastos isolados de embriões transformados com *AtpKGCPM*. B) O pKSPD são protoplastos isolados de embriões transformados com *AtpKSPD*. O deslocamento do pico verde para a direita ou esquerda significa maior ou menor autofluorescência da clorofila. .... 66

Figura 18: Ensaio com azul de anilina em células transformadas com *AtpKSBG* (A-F) e *AtpKGCPM* (G-L) para verificar a deposição de calose sob luz UV. De A-C e G-I são aglomerados celulares. De D-F e J-L são células livres. A, D, G e J fotos luz branca. Barra 50  $\mu\text{m}$ . ..... 67

Figura 19: Estágios de desenvolvimento de cultura de tecidos de mamoeiro. A) Germinação e desenvolvimento de plântulas em meio ágar-água. B) hipocótilos e folhas excisados de plântulas em meio CIM1. C) Calogênese em meio CIM1. D) Cultura de células em suspensão em meio LCIM. E) Seleção de células transformadas em meio CIM3. F) Meio de maturação CIM4. G e H) Meio de regeneração de brotos. I) Regeneração de plântula a partir de células transformadas com *AtpKSBG*  
Embriões e folhas albinas (setas vermelhas) regenerados a partir de células transformadas com *AtpKSPD*. ..... 69

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Culturas vegetais editadas por CRISPR/Cas9 entre os anos de 2012 a 2018 (JAGANATHAN et al., 2018). .....	30
Tabela 2: Espécies vegetais e seus respectivos genes editados por CRISPR/Cas9 (JAGANATHAN et al., 2018). .....	31
Tabela 3: Meios de cultura utilizados para calogênese, embriogênese somática e regeneração <i>in vitro</i> a partir de hipocótilos e <i>C. papaya</i> L.....	43
Tabela 4: Composição dos meios de cultura utilizados para calogênese, embriogênese somática e regeneração <i>in vitro</i> a partir de hipocótilos e <i>C. papaya</i> . ..	44
Tabela 5: Sequência dos iniciadores utilizados para amplificação por PCR. ....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**CRISPR/Cas9** Repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente interespaçadas associadas à proteínas Cas9 (do inglês do inglês *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)

**PMeV** papaya meleira virus

**PMeV2** papaya meleira virus 2

**dsRNA** RNA fita dupla (do inglês *Double-stranded RNA*)

**RT-PCR** Transcrição reversa-Reação em cadeia da polimerase (do inglês *Reverse transcription-polymerase chain reaction*)

**ssRNA** RNA fita simples (do inglês *Single-stranded RNA*)

**RdRp** RNA polimerase dependente de RNA (do Inglês *RNA dependente RNA polimerase*)

**PCR** Reação em cadeia da polimerase (do inglês *Polymerase chain reaction*)

**CP** Proteína capsidial (do inglês *Capsid protein*)

**FAO** Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (do inglês *Food and agriculture organization of the united nations*)

**nt** Nucleotídeo

**ORF** Fase de leitura aberta (do inglês *Open reading frame*)

**pb** Pares de base

**PpVQ** papaya virus Q

**EDTA** Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*)

**dNTP** Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

**DTT** Dithiothreitol

**M-MLV** murine leukemia virus

**RT** Transcriptase reversa (do inglês *Reverse transcriptase*)

**MS** Meio de cultura Murashige e Skoog

**2,4-D** ácido diclorofenóxiacético

**TMV** Tobacco mosaic virus

**ER** Retículo endoplasmático (do inglês *Endoplasmic reticulum*)

**CMV** Cucumber mosaic vírus

**AtpKSPD** *Agrobacterium tumefaciens* transformada com o plasmídeo pKSPD

**AtpKSBG** *Agrobacterium tumefaciens* transformada com o plasmídeo pKSBG

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	19
1.1 PRINCIPAIS DOENÇAS VIRAIS QUE OCORREM NO MAMOEIRO .....	19
1.1.1 <i>Papaya ringspot virus</i> .....	19
1.1.2 <i>Papaya mosaic virus</i> .....	20
1.1.3 <i>Complexo viral papaya meleira virus</i> .....	20
1.2 MOVIMENTO VIRAL VIA PLASMODESMOS.....	22
1.2.1 Calose.....	23
1.2.2 $\beta$ -1,3-Glucanases.....	24
1.3 SILENCIAMENTO GÊNICO POR CRISPR/Cas9.....	27
1.3.1 A Técnica CRISPR: Conceito e Princípio.....	28
1.3.2 Aplicações CRISPR/Cas9 para o Melhoramento Genético Vegetal .....	29
1.3.3 Silenciamento do Gene da Fitoeno Desaturase .....	31
1.4 CULTURA DE TECIDOS .....	31
1.5 JUSTIFICATIVA.....	33
2 OBJETIVOS.....	34
2.1 OBJETIVO GERAL .....	34
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	34
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	35
3.1 ANÁLISE DOS GENES ALVOS .....	35
3.1.1 Sequência do Gene da Fitoeno Desaturase .....	35
3.1.2 Sequência do Gene da $\beta$ -1,3-glucanase.....	35
3.2 VETORES DE TRANSFORMAÇÃO.....	36
3.2.1 pKGQ1 e pKGCPM.....	36
3.2.2 pKSE401 .....	36

3.3 CUSTOMIZAÇÃO DO VETOR DE TRANSFORMAÇÃO pKSE401 E TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA .....	39
3.3.1 Clonagem.....	39
3.3.2 Preparo de Células Bacterianas Competentes .....	39
3.3.3 Transformação Bacteriana por Eletroporação .....	40
3.4 CULTURA DE TECIDOS DE MAMOEIRO .....	42
3.4.1 Desinfestação e Germinação de Sementes e Desenvolvimento de Mudas .....	45
3.4.2 Calogênese .....	45
3.4.3 Cultura Celular em Suspensão.....	45
3.4.4 Embriogênese Somática, Organogênese e Regeneração de Plântulas .....	46
3.5 TRANSFORMAÇÃO VEGETAL .....	47
3.5.1 Transformação Transiente .....	47
3.5.2 Transformação Estável .....	48
3.6 ISOLAMENTO E TRANSFECCÃO DE PROTOPLASTOS A PARTIR DE CALO E EMBRIÕES SOMÁTICOS .....	49
3.6.1 Isolamento de protoplastos .....	49
3.6.2 Purificação de protoplastos .....	50
3.6.3 Rendimento dos Protoplastos.....	50
3.6.4 Transfecção de Protoplastos .....	50
3.6.4.1 Validação de Mutação Utilizando Citometria de Fluxo.....	51
3.7 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA .....	51
3.7.1 Viabilidade dos Protoplastos.....	51
3.7.2 Fluorescência da GFP.....	52
3.7.3 Fluorescência de Calose .....	52
3.8 ANÁLISE MOLECULAR.....	53
3.8.1 Extração de DNA Plasmidial – “MiniPrep” .....	53
3.8.2 Extração de DNA genômico.....	53

3.8.3 Extração de RNA .....	54
3.8.3.1 Tratamento com DNase .....	55
3.8.3.2 Síntese de cDNA .....	55
3.8.4 Amplificação de Fragmentos de DNA por PCR Convencional.....	55
3.8.5 Análise dos Fragmentos de PCR por Eletroforese em Gel de Agarose .....	56
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	57
4.1 CONFIRMAÇÃO DA CONSTRUÇÃO DOS VETORES pKSPD E pKSBG .....	57
4.2 MAMOEIROS AGROINFILTRADOS COM AtpKSPD .....	57
4.3 RENDIMENTO E VIABILIDADE DE PROTOPLASTOS .....	60
4.4 ANÁLISES UTILIZANDO MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA REVELAM A EXPRESSÃO DE GFP EM PROTOPLASTOS TRANSFECTADOS COM pKGQ1 ..	61
4.5 PROTOPLASTOS TRANSFECTADOS COM pKSPD E pKSBG EXPRESSAM O CASSETE gRNA E CAS9.....	62
4.6 CÉLULAS EM SUSPENSÃO TRANSFORMADAS COM AtpKSPD E AtpKSBG EXPRESSAM O CASSETE gRNA E CAS9 .....	63
4.7 ANÁLISES DE CITOMETRIA DE FLUXO INDICAM SILENCIAMENTO DO GENE PDS DE PROTOPLASTOS ISOLADOS DE CÉLULAS DESDIFERENCIADAS TRANSFORMADAS COM AtpKSPD.....	65
4.8 ANÁLISES DE MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA REVELAM AUMENTO NA DEPOSIÇÃO DE CALOSE EM CÉLULAS DIFERENCIADAS TRANSFORMADAS COM O PLASMÍDEO AtpKSBG.....	67
4.9 CULTURAS CELULARES TRANSFORMADAS POR CRISPR/Cas9 SÃO CAPAZES DE SE REGENERAR EM PLANTAS.....	68
5 CONCLUSÕES .....	73
REFERÊNCIAS.....	74

## 1 INTRODUÇÃO

O mamão destaca-se entre uma das sete principais frutas que o Brasil exporta. Somente em 2019 a produção mundial de mamão foi de aproximadamente 13.735.086 toneladas, das quais 1.161.808 toneladas foram produzidas pelo Brasil (FAOSTAT, 2021), classificado como segundo maior produtor mundial. Em território nacional, o Estado do Espírito Santo produziu 403.278 toneladas no mesmo período, sendo considerado o principal produtor e exportador nacional do fruto (IBGE, 2021).

Apesar do aparente sucesso, o cultivo de mamoeiro no Brasil enfrenta vários entraves que levam a grandes perdas na produção. Estas perdas estão relacionadas a doenças causadas por fatores bióticos, como infestação de fungos, bactérias, vírus, nematóides, insetos e ácaros e por fatores abióticos, como deficiências nutricionais, alta incidência solar e variação de temperatura, falta ou excesso de chuvas e falhas no manejo do fruto pós-colheita (MARTINS; VENTURA, 2007).

As doenças virais caracterizam-se como as principais responsáveis por perdas na produção de mamão no mundo. Aproximadamente dez diferentes espécies de vírus foram relatadas em mamoeiro, das quais três apresentam ameaça ao cultivo de mamoeiro nas Américas. São elas: *Papaya ringspot virus* (PRSV-P), *Papaya mosaic virus* (PapMV), e o complexo viral da meleira do mamoeiro, compreendendo o papaya meleira virus (PMeV) e papaya meleira virus 2 (PMeV2) (SÁ ANTUNES et al., 2020).

### 1.1 PRINCIPAIS DOENÇAS VIRAIS QUE OCORREM NO MAMOEIRO

#### 1.1.1 *Papaya ringspot virus*

*Papaya ringspot virus* (PRSV-P) da família *Potyviridae* é o causador da doença do mosaico, representando perdas de até 85% nas safras de mamão no Brasil e no México (SÁ ANTUNES et al., 2020). Os sintomas da doença incluem amarelecimento foliar com nervuras clareadas. Geralmente a folha fica com um aspecto de mosaico, apresentando porções amareladas e esverdeadas, ainda podem sofrer redução e

estreitamento dos lóbulos que em alguns casos ficam distorcidos. No pecíolo e em regiões do caule próximas a ele ocorre o surgimento de manchas alongadas de coloração verde e aspecto “oleoso” com disposição linear. No fruto, as manchas se apresentam na forma de anéis concêntricos (VENTURA; COSTA; TATAGIBA, 2016).

A transmissão viral é realizada por afídeos ou pulgões de uma planta para outra através de inoculações nas folhas. No entanto, não há relato da transmissão pelas sementes. Vale ressaltar que algumas plantas da família Cucurbitaceae (por exemplo: melão, melancia, abóbora e pepino) hospedam a virose, dessa forma, contribuem na disseminação da doença. As plantas com mosaico tendem a uma redução no crescimento e desenvolvimento, devido à queda precoce das folhas, levando a uma baixa produção e qualidade dos frutos. Não existem medidas curativas para o mosaico e nem cultivares resistentes à doença no Brasil (QUADROS et al., 2016). Atualmente, a eliminação de plantas infectadas através do *roguing* tem sido a única alternativa encontrada pelos produtores para limitar a disseminação da doença (VENTURA; MARTINS; FERREGUETTI, 2015).

### 1.1.2 ***Papaya mosaic virus***

*Papaya mosaic virus* (PapMV) é um potexvírus da família *Alphaflexiviridae*. Teve sua ocorrência registrada pela primeira vez em 1962 no Estado da Flórida, EUA, novos relatos da disseminação do PapMV foram registrados na Bolívia, Peru, Venezuela e México. Sozinho o PapMV apresenta taxa de incidência baixa a moderada em mamão. No entanto, as infecções mistas de PRSV-P e PapMV apresentam uma interação sinérgica que leva ao aumento do acúmulo de vírus e produzem múltiplos padrões de sintomas no hospedeiro. Os sintomas da doença incluem amarelecimento, descoloração das veias, mosaico e distorção da folha (VARUN et al., 2017).

### 1.1.3 ***Complexo viral papaya meleira virus***

O complexo viral da meleira do mamoeiro é o agente causador da meleira do mamoeiro. Em plantas sintomáticas, ocorre a exsudação espontânea do látex aquoso e fluido em folhas e frutos devido ao rompimento dos laticíferos. Este rompimento é causado pelo aumento da turgescência e alterações morfológicas dos laticíferos e caracteriza um sintoma clássico da doença (RODRIGUES et al., 2009). Ao entrar em

contato com o ar, o látex é oxidado e causa pequenas lesões necróticas nas pontas de folhas jovens. Causa também uma coloração escura e aspecto “melado” no fruto (Figura 1). Tais sintomas só aparecem após a floração (ABREU et al., 2015).

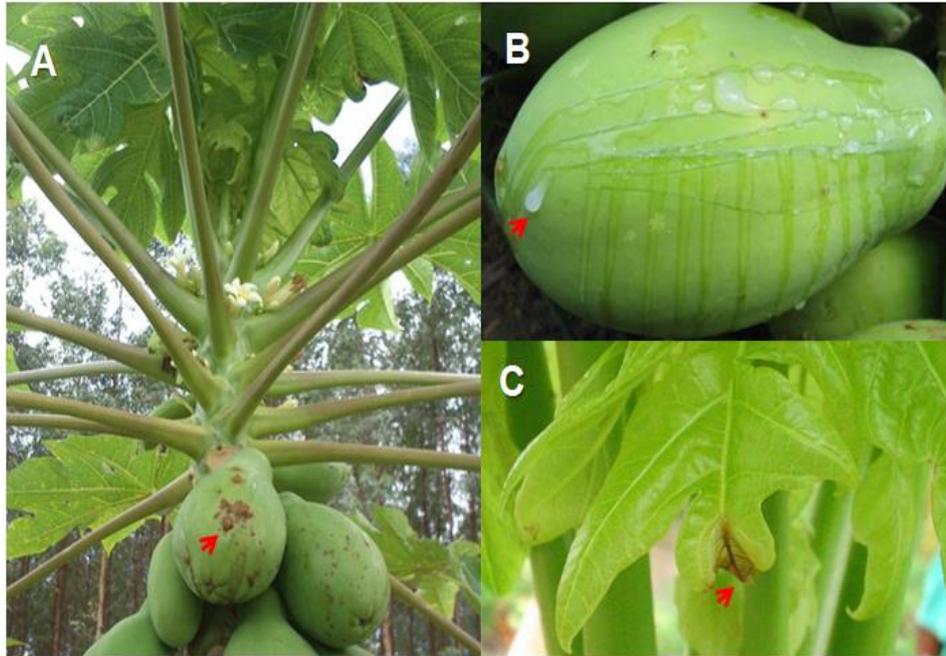


Figura 1: Sintomas da meleira do mamoeiro. A) Frutos de mamão verde apresentando látex escuro e oxidado com aspecto pegajoso (seta vermelha). B) Fruto de mamão verde apresentando látex aquoso, fluido e translúcido (seta vermelha) após corte com bisturi.

Assim como na doença do mosaico, a meleira não possui medidas curativas. Portanto, todas as plantas sintomáticas são eliminadas, a fim de evitar fontes de inóculo da doença (VENTURA et al., 2003).

A doença meleira foi relatada pela primeira vez no início da década de 80 ocorrendo na região do Nordeste do Brasil (NAKAGAWA et al., 1987). Atualmente tem ocorrência registrada nos Estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Pernambuco, Bahia e Espírito Santo. No México, Equador e Austrália também há relatos da doença, com grande similaridade entre os agentes causais da doença no Brasil, especialmente os isolados mexicanos. No Brasil essa doença está associada à interação entre o papaya mealybug virus (PMeV) e o papaya mealybug virus 2 (PMeV2) denominado de complexo PMeV (FERNANDES et al., 2018).

O PMeV possui dsRNA e é similar aos membros da família *Totiviridae*. Composto por duas possíveis fases de leitura aberta (ORFs, do inglês *open reading frame*) que codificam para uma proteína do capsídeo (CP) e uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) e formam vírions. Já o PMeV2 possui ssRNA (RNA de fita simples) e se relaciona a espécies do gênero *Umbravirus* que não codificam o gene CP, conseqüentemente, não formam partículas de vírus convencionais (ANTUNES et al., 2016).

Trabalhos de Sá Antunes e colaboradores (2016) mostram que partículas virais do complexo PMeV são formadas a partir da CP do PMeV e ssRNA do PMeV2, indicando que o PMeV é um vírus auxiliar para PMeV2. Plantas assintomáticas para a meleira foram diagnosticadas com o PMeV, sugerindo que a presença do PMeV não é responsável pelos sintomas típicos da doença. Em contrapartida, todas as plantas com sintomas de meleira foram diagnosticadas com PMeV e PMeV2, revelando a necessidade da dupla infecção para desencadear os sintomas da doença (SÁ ANTUNES, 2016).

Até o momento, não foi elucidado o mecanismo de disseminação sistêmica do complexo PMeV nos tecidos do mamoeiro. No entanto, duas possíveis hipóteses foram levantadas. A primeira é de que o PMeV se mova sistemicamente através do látex, uma vez que este tem a fluidez aumentada em plantas com meleira (KITAJIMA et al., 1993). A segunda hipótese é de que ocorra a replicação do PMeV em células do meristema, durante o processo de divisão célula, o que facilita a infecção dos tecidos vegetais pelo vírus (SÁ ANTUNES et al., 2020).

## 1.2 MOVIMENTO VIRAL VIA PLASMODESMOS

As viroses de plantas usam várias vias para se espalhar e colonizar o hospedeiro. Uma das mais comuns, que permite a disseminação local (restrito aos tecidos próximos ao ponto de penetração) e sistêmica (distribuição por toda a planta a partir do ponto de penetração, geralmente utiliza os vasos condutores – xilema e/ou floema) do vírus é o movimento de célula-célula por meio dos plasmodesmos (PD) (BENITEZ-

ALFONSO et al., 2014). Esse movimento é favorecido pelo fato de que a maioria dos vírus vegetais codificam proteínas de movimento (MP) que parecem aumentar o limite de exclusão de tamanho (SEL, do inglês *size exclusion limit*) do PD, permitindo que o material infeccioso se mova entre células adjacentes (IGLESIAS; MEINS, 2001).

Um dos fatores que regulam a permeabilidade dos PD é a deposição de calose entre a membrana plasmática e a parede celular. A calose é um polissacarídeo vegetal, que atua como uma parede celular temporária, produzida como reação de hipersensibilidade (HR) local contra infecções causadas por fungos, vírus e estresses abióticos (LEVY et al., 2007). A deposição de calose no PD está diretamente associada ao aumento ou diminuição no movimento viral (OTERO et al., 2016), atuando como uma barreira física que limita a propagação viral no hospedeiro (ALLISON; SHALLA, 1974).

A degradação da calose resulta na abertura do PD, favorecendo o movimento intercelular e o tráfego simplástico do vírus nos tecidos da planta. Tal degradação é mediada pela ação de  $\beta$ -1,3-glucanases, enzimas constitutivas que regulam o SEL do PD e que estão integradas nos mecanismos de resistência bioquímicos pré-formados (ZAVALIEV et al., 2013), atuando como indutores de HR das plantas, como mecanismos de ação opostos dependendo da classe do patógeno (BEFFA et al., 1996).

### 1.2.1 Calose

A calose é um homopolímero linear formado por resíduos de glicose ligado a  $\beta$ -1,3 com alguns ramos de  $\beta$ -1,6, biossintetizada por calose sintases a partir do substrato UDP-glicose (uridina difosfato glicose). Em *Arabidopsis thaliana* 12 genes foram propostos como codificantes para a síntese de calose denominados de GLS (*AtGLS1* a *AtGLS12*) que estão envolvidos ao desenvolvimento do pólen, fertilidade e deposição de calose parede celular. Diferente de *Arabidopsis thaliana*, o mamoeiro possui apenas 6 genes envolvidos na síntese de calose (GT2) (ZAVALIEV et al., 2011).

Diversos estudos relatam a calose enquanto componente estrutural da parede celular, depositada nas placas celulares durante a citocinese e associada aos estágios de

desenvolvimento do pólen (THIELE et al., 2009). A calose também é fundamental na regulação do movimento intercelular, controlando o SEL do PD em resposta a estresses como ferimentos, infecção por patógenos e estresses fisiológicos (ZAVALLIEV et al., 2011).

Nas plantas superiores, em geral, as células são conectadas simplásticamente via PD, esses canais sofrem modulações dinâmicas promovendo o transporte de nutrientes e moléculas sinalizadoras por meio do retículo endoplasmático (RE). O estado funcional do PD é dependente da necessidade da planta em resposta a estímulos próprios de desenvolvimento e/ou ambientais. O controle do movimento simplástico via PD requer o depósito ou degradação de calose que pode resultar num estado funcional fechado aberto ou dilatado do PD. Alguns estudos utilizando coloração da calose com azul de anilina e imunolocalização relacionaram a deposição de calose aos estados de abertura e fechamento dos PD (LEVY et al., 2007).

### 1.2.2 $\beta$ -1,3-Glucanases

Os mecanismos de defesa de uma planta podem ser estruturais e bioquímicos, ambos pré e/ou pós-formados em relação à tentativa de penetração do patógeno no hospedeiro. As  $\beta$ -1,3-glucanases estão integradas nos mecanismos de resistência bioquímicos pré-formados (passivos ou constitutivos). São consideradas pré-formadas devido à ausência de um precursor remoto (STANGARLIN et al., 2011).

Estudos mostram que as  $\beta$ -1,3-glucanases são enzimas encontradas em muitos organismos, como fungos, bactérias e nas plantas. Em plantas, as quitinases e as  $\beta$ -1,3-glucanases são pouco expressas constitutivamente, mas prontamente induzidas sob estresse biótico, como ataque fúngico, mas também por fatores abióticos, especialmente gás etileno e ácido salicílico (WU; BRADFORD, 2003). Juntas, as quitinases e as  $\beta$ -1,3-glucanases, exercem um papel sinérgico na degradação do homopolímero linear  $\beta$ -1,4-N-acetilglucosamina, componente estrutural da parede celular de muitos patógenos (EL-KATANY et al., 2001).

Em arábida, a família de genes de  $\beta$ -glucanases incluem 50 membros divididos em dois subgrupos: I) são genes regulados pelo desenvolvimento e expressos

constitutivamente. A proteína resultante, AtBG<sub>pap</sub> (denominada *A. thaliana* beta-1,3-glucanase\_proteína associada ao Pd), está envolvida no controle e transporte intercelular por meio da degradação da colose nos PDs; II) são relacionados à patogênese (PR) e inclui proteínas da família PR (BGs, AtBG<sub>2</sub> e AtBG<sub>3</sub>) reguladas por condições de estresse compondo um sistema imunológico inato induzido pela presença de patógenos. Estas proteínas estão diretamente envolvidas na regulação da calosidade no PD e no transporte viral de célula-célula, incluindo o vírus do TMV e TVCV (ZAVALLIEV et al., 2013).

O gene AtBG<sub>3</sub> (AT3G57240), identificado com PAC:19660395 na plataforma *Phytozome 13* (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>), é uma  $\beta$ -1,3-glucanase de *Arabidopsis* e possui a sequência CDS composta de 1026 nucleotídeos que codificam 342 aminoácidos. Em mamoeiro, a sequência CDS correspondente à  $\beta$ -1,3-glucanase possui o mesmo número de nucleotídeos e aminoácidos identificada no *Phytozome 13* como evm.TU.supercontig\_120.1 (PAC:16406944). O alinhamento de ambas as sequências utilizando a ferramenta BLAST® (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) revelou uma identidade de 65%.

Vale ressaltar que a calose produzida pelas plantas para regular o SEL do PD também são alvos de  $\beta$ -1,3-glucanases, por possuírem em sua constituição  $\beta$ -1,3-glucano, resultando no aumento do SEL o que favorece a translocação do patógeno. Sob condições normais, as  $\beta$ -1,3-glucanases desempenham o papel de produzir glicose a partir da degradação do substrato laminarina, um  $\beta$ -1,3-D-glucano, que é um componente da parede celular de muitos fungos, que acabam tornando-se alvo (MERCADO et al., 2015). Entretanto, a calose também se torna alvo de  $\beta$ -1,3-glucanases por possuir  $\beta$ -1,3-D-glucano em sua composição, o que resulta na diminuição de calose no PD e conseqüentemente aumento do SEL. Como problemática, uma planta que está sob infecção viral fica mais susceptível à disseminação local e/ou sistêmica do patógeno (IGLESIAS; MEINS, 2001) (Figura 2). É o que acreditamos acontecer com plantas sintomáticas para a meleira do mamoeiro.

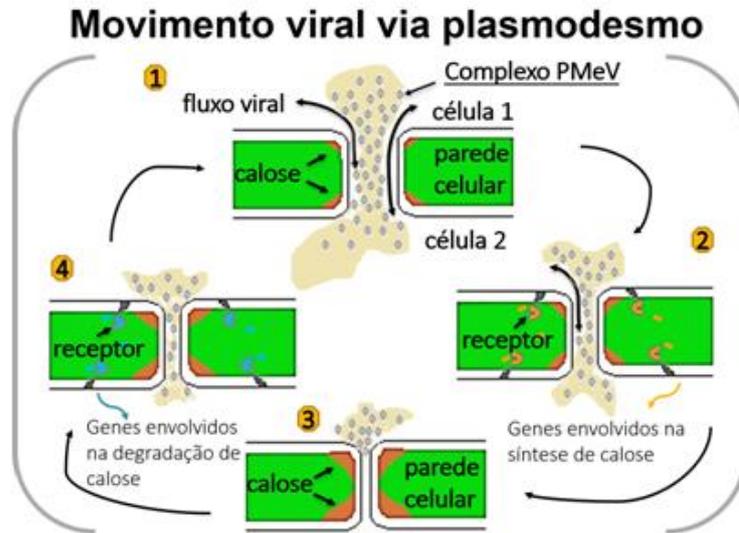


Figura 2: Desenho esquemático do processo de produção e degradação da calose e o suposto movimento do complexo PMeV via plasmodesmo. A produção de calose (2) resulta em diminuição do limite de exclusão do plasmodesmo (3). Em contrapartida, a degradação da mesma (4) resulta na abertura do plasmodesmo (1) favorecendo a translocação viral.

A análise do transcriptoma de mamoeiros infectados com o complexo PMeV mostraram sinais de tolerância induzida ao complexo PMeV, incluindo regulação positiva de genes que codificam para a síntese de calose na pré e pós-floração (MADROÑERO et al. 2018). Em contrapartida, os genes envolvidos na estruturação da parede celular como as glucanases e *GRP* (proteínas reguladas por glicose) também foram regulados positivamente na pós-floração. Paralelamente, análises de micro RNAs (miRNAs) do mamoeiro sob infecção pelo complexo PMeV revelou uma elevada presença de miRNAs que acreditamos estar relacionados à repressão pós-transcricional de genes induzidos por hipersensibilidade como resposta ao estresse abiótico, nos quais está incluído o gene que codifica para  $\beta$ -1,3-glucanases (ABREU et al., 2014). Presume-se que esta seja uma HR para silenciar a produção de  $\beta$ -1,3-glucanases, resultando em aumento na deposição de calose nos plasmodesmos, numa tentativa de a planta dificultar a translocação viral.

Em trabalhos realizados por Beffa e colaboradores (1996), mostraram que um mutante de tabaco transgênico com deficiência de *GLU I* (classe I de  $\beta$ -1,3-glucanases) resultou em redução dos sintomas de doenças causadas pelo vírus do mosaico do tabaco (TMV). Iglesias e Meins (2001) utilizaram o mesmo mutante em seus

experimentos, como resultados, ocorreu aumento na deposição de calose e redução do SEL. Foi observado também retardo no tráfego intercelular via PD para um tobamovirus (TMV), para um potexvirus (vírus da batata recombinante X expressando GFP) e para a proteína de movimento do cucumovirus (vírus do mosaico do pepino - CMV), mostrando que a deficiência de GLU I causa efeitos no movimento via PD que não se limita a um tipo específico de vírus. O mutante também mostrou aumento na deposição de calose.

Neste sentido, acreditamos que o complexo PMeV possa utilizar os canais do PD para se disseminar e invadir os tecidos da planta. Reforçando a ideia de que em trabalhos anteriores observamos uma regulação positiva de genes que codificam para a síntese de calose, bem como a presença de miRNAs que acreditamos estar relacionado à repressão pós-transcricional de genes envolvidos na síntese de  $\beta$ -1,3-glucanases.

### 1.3 SILENCIAMENTO GÊNICO POR CRISPR/Cas9

Em 1987, uma sequência repetida de DNA incomum foi descoberta no genoma da bactéria *Escherichia coli*, mais tarde, em 2002, essa sequência ficou conhecida como CRISPR. Outras bactérias e arqueias halofílicas também demonstraram sequência parecidas sugerindo que esses grupamentos sequenciais eram conservados e se relacionavam a um perfil evolutivo do sistema CRISPR (ISHINO et al., 2018).

Essas sequências espaçadoras consistem em repetições palindrômicas curtas (20 a 40 pares de base) separadas por sequências únicas intermediárias (20 a 60 pares de bases) (MORANGE, 2015). Tais sequências foram encontradas próximas a família de genes já conhecidos como sistema de reparo do DNA, hoje denominado Cas que se associa ao CRISPR (MAKAROVA et al. 2002). No entanto, a origem das sequências espaçadoras ainda era desconhecida, até que em 2005 três grupos descobriram, de forma independente, que as sequências espaçadoras tinham origem extra cromossômica e se combinavam a bacteriófagos (MOJICA et al. 2005; POURCEL et al. 2005; BOLOTIN et al. 2005).

Somente em 2006 foi sugerido por Makarova e colaboradores que o sistema CRISPR/Cas era um sistema imunológico adaptativo baseado em RNA de interferência de procariotos. Em 2007, Barrangou e colaboradores demonstraram a eficiência do sistema CRISPR/Cas na aquisição de imunidade contra bacteriófagos, na qual a infecção leva à formação de novas sequências espaçadoras e à proteção contra uma posterior infecção. Isso porque a sequência espaçadora é complementar a um fragmento do material genético do bacteriófago. Essa complementaridade permite ao sistema CRISPR/Cas9 reconhecer e clivar o material genético do bacteriófago.

Em 2012 é realizada a caracterização *in vitro* de alvos de DNA para direcionamento da Cas9, e o sistema CRISPR/Ca9 passa a ser reconhecido e utilizado como uma ferramenta de edição gênica (JINEK et al., 2012).

### 1.3.1 A Técnica CRISPR: Conceito e Princípio

A tecnologia de edição gênica por CRISPR/Cas9 tem-se destacado devido à sua versatilidade e simplicidade de manuseio em laboratório. Para o sistema CRISPR agir são necessárias duas fitas de RNAs: tracrRNA (RNA transativador) e crRNA (RNA crispr) que juntas formam o sgRNA (gRNA), funcionam como guias para a enzima Cas9 (JINEK et al., 2012).

A principal vantagem do sistema CRISPR/Cas9 é a capacidade de reconhecer a sequência alvo para clivagem. Sendo assim, o crRNA pode ser customizado de acordo com a região do DNA que se deseja clivar. Outra particularidade é que o alvo deve ser 3 nucleotídeos a montante da sequência NGG, chamada de região PAM (Figura 3). A clivagem no DNA causado pela Cas9 gera quebras de fita dupla (DSBs), que são subsequentemente reparadas por mecanismos de junção de extremidade não homóloga (NHEJ) ou de reparo direcionado por homologia (HDR). NHEJ pode introduzir *indels* (inserções e/ou deleções) que causam mutações alterando o quadro de leitura e, portanto, a interrupção das funções do gene (JINEK et al., 2012).

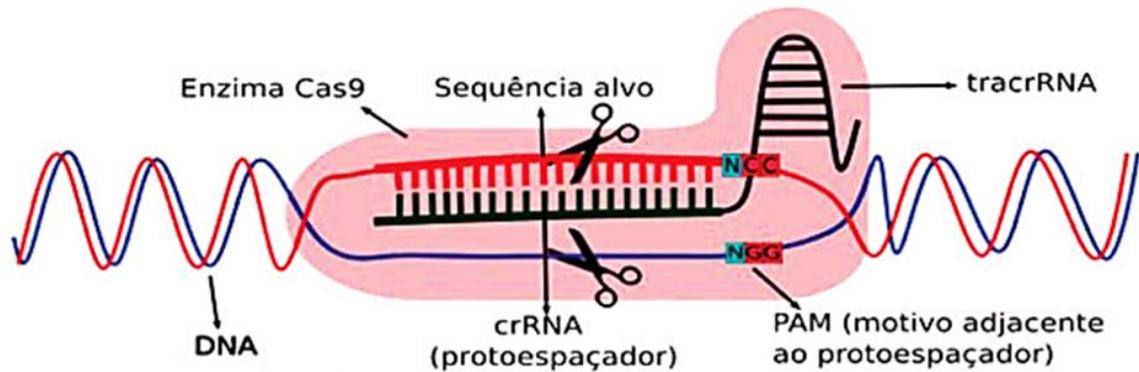


Figura 3: Desenho esquemático mostrando o reconhecimento e clivagem do alvo pela enzima Cas9. O sistema CRISPR consiste de duas fitas de RNAs: tracrRNA e crRNA, que guiam a enzimas Cas9 até o alvo. O reconhecimento da sequência alvo é feito pelo crRNA, que é customizado de acordo com a região do DNA que se deseja clivar. Outra particularidade é que o alvo deve estar localizado 3 nucleotídeos a montante da sequência NGG, chamada de PAM. (Adaptado de FERNANDES, 2018).

### 1.3.2 Aplicações CRISPR/Cas9 para o Melhoramento Genético Vegetal

A disponibilidade de sequências genômicas de várias espécies vegetais e os avanços nas abordagens de edição de genoma têm permitido a obtenção de cultivares com características desejáveis.

Nos últimos 8 anos, a tecnologia CRISPR/Cas9 tem sido utilizada para editar genomas vegetais. Mais de 20 espécies de culturas já foram editadas pela técnica objetivando aumentar a produtividade ou a resistência a estresses ambientais de origem biótica e/ou abiótica (RICROCH et al., 2017). Por enquanto, a maioria das plantas editadas são consideradas espécies modelo, como *arabidopsis*, porém existem diversas possibilidades para o melhoramento vegetal por meio da técnica CRISPR/Cas9 e suas variações.

O processo metodológico de edição e regeneração de plantas geneticamente modificadas por CRISPR/Cas9 segue o seguinte passo a passo: (I) identificação da sequência PAM no gene alvo; síntese do gRNA (sgRNA); (II) clonagem do sgRNA em um vetor binário adequado; (III) introdução do vetor em espécies hospedeiras/transformação de linhagens celulares; (IV) triagem e validação das plantas/células editadas, utilizando genes repórteres, como por exemplo a proteína verde fluorescente - GFP; (V) regeneração da planta geneticamente modificada.

Abaixo disponibilizamos uma tabela com as culturas que tiveram o genoma editado por CRISPR/Cas9 até 2018 conforme levantamento realizado por Jaganathan e colaboradores (2018), não está incluído *Arabidopsis* e tabaco.

Tabela 1: Culturas vegetais editadas por CRISPR/Cas9 entre os anos de 2012 a 2018 (JAGANATHAN et al., 2018).

<b>Ano</b>	<b>Planta</b>
2012	Arroz
2013	Arroz, Trigo, Milho
2014	Citrus, Arroz, Soja, Tomate, Milho, Trigo
2015	Algodão, Soja, Tomate, Batata, Arroz, Milho
2016	Uva, Algodão, Melancia, Soja, Trigo, Tomate, Batata, Alfafa
2017	Cevada, Trigo, Milho, Arroz, Citrus, Tomate, Algodão, Ipomoea, Uva, Batata, Legumes, Mandioca
2018	Trigo, Arroz, Banana, Uva, Soja, Cenoura, Cacau, Salvia, Alface, Alfafa

Jaganathan e colaboradores (2018), também relatam a aplicação da abordagem de edição de genoma baseada em CRISPR em plantas visando características bióticas, abióticas e nutricionais. Selecionamos as modificações visando resistência a estresses bióticos. A espécie, os genes alvos da técnica, e o tipo de estresse/característica seguem listados na tabela abaixo.

Tabela 2: Espécies vegetais e seus respectivos genes editados por CRISPR/Cas9 (JAGANATHAN et al., 2018).

<b>Espécie</b>	<b>Gene alvo</b>	<b>Estresse/Característica</b>	<b>Referência</b>
<i>A. thaliana/N. benthamiana</i>	dsDNA of virus (regiões A7, B7 e C3)	Resistência ao vírus do topo encaracolado da beterraba sacarina	Ji et al., 2015
<i>A. thaliana</i>	<i>eIF(iso)4E</i>	Resistência ao vírus do mosaico do nabo (TMV)	Pyott et al., 2016
<i>N. benthamiana</i>	BeYDV	Resistência ao vírus do feijão anão amarelo (BeYDV)	Baltes et al., 2015
<i>N. benthamiana</i>	As sequências ORFs e IR do sDNA do vírus	Vírus do enrolamento da folha amarela do tomate (TYLCV) e vírus do mosaico Merremia (MeMV)	Ali et al., 2015

### 1.3.3 Silenciamento do Gene da Fitoeno Desaturase

Diversos estudos utilizam o gene da fitoeno desaturase como alvo de mutação por CRISPR/Cas9. O silenciamento deste gene por *indels* interrompe a biossíntese de carotenoide, resultando em tecidos com fenótipos. Este recurso tem sido usado para estimar o tempo e o padrão de mutações desse gene em células com o sistema CRISPR/Cas9 albinos (WOLABU et al., 2020)..

De acordo com Yan e colaboradores (2011), a análise da expressão de genes de fitoeno desaturase e ζ-caroteno desaturase em *Carica papaya* revelou que os genes *CpPDS* e *CpZDS* possuem cópias únicas; o *CpPDS* foi mapeado para o cromossomo LG6 de mamão e o *CpZDS* foi mapeado para o cromossomo LG3.

## 1.4 CULTURA DE TECIDOS

A técnica de cultura de tecidos vegetais apresenta alto potencial de aplicação na agricultura, sendo uma excelente estratégia para a transformação vegetal, pois através dela é possível realizar melhoramento genético, resultando em plantas saudias, vigorosas e mais resistentes a doenças, como por exemplo as causadas pela ação de

vírus. O sucesso da regeneração da planta *in vitro* depende de alguns fatores, tais como o genótipo (espécie e/ou variedade utilizada), a fonte de explantes (folha, raiz, caule, meristema, etc), e a condição de cultura (recipiente, meio de cultura, temperatura e iluminação) (CALDAS et al., 1998).

Nos últimos anos, ocorreram diversos avanços na tecnologia de cultura de tecidos vegetais, especialmente em culturas de valor econômico agregado, como o milho. Ao combinar a tecnologia CRISPR/Cas com a cultura de tecidos vegetais é possível obter avanços significativos na introdução de modificações genéticas, tornando o trabalho menos laborioso e de maior qualidade se comparado aos métodos tradicionais de melhoramento (CHILCOAT et al., 2017).

## 1.5 JUSTIFICATIVA

Levando em consideração a problemática descrita, este estudo é parte integrante de uma abordagem maior que busca elucidar a relação do complexo PMeV *versus* mamoeiro e desenvolver um mamoeiro resistente à infecção viral e, conseqüentemente, à meleira. Por isso, no presente trabalho, buscamos realizar o silenciamento do gene da  $\beta$ -1,3-glucanase de *Carica papaya* por CRISPR-Cas9, avaliando a expressão transiente em folhas, e a confirmação das modificações genéticas em calos, células e protoplastos de mamoeiro. A mutação do gene  $\beta$ -1,3-glucanase é um bom candidato para conferir resistência do mamão contra a infecção causada pelo complexo PMeV, uma vez que a ação de  $\beta$ -1,3-glucanase degrada a calose depositada nos PDs em resposta à infecção, o que pode favorecer o movimento viral. De modo conjunto, buscamos desenvolver um marcador visual e funcional, silenciando o gene da fitoeno desaturase de mamoeiro (*CpPDS*) por CRISPR/Cas9 levando em consideração resultados obtidos por outros autores (BEFFA et al., 1996; IGLESIAS e MEINS, 2000; BUCHER et al., 2001; LIN et al., 2017; WOLABU et al., 2020).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Promover o silenciamento do gene da  $\beta$ -1,3-glucanase em mamoeiro utilizando a tecnologia CRISPR/Cas9.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a construção dos vetores CRISPR/Cas9 pKSBG e pKSPD para as sequências de gRNA tanto da  $\beta$ -1,3-glucanase quanto da fitoeno desaturase, respectivamente;
- Estabelecer protocolo para cultura de tecidos vegetais de mamoeiro;
- Aplicar os vetores pKSBG e pKSPD em tecido vegetal mediada por *Agrobacterium tumefaciens*;
- Isolar protoplastos a partir de calos de mamoeiro;
- Checar a viabilidade de protoplastos isolados a partir de calos de mamoeiro;
- Transfectar protoplastos de mamoeiro com os vetores pKGQ1, pKSBG e pKSPD;
- Avaliar a expressão da proteína verde fluorescente (GFP) em protoplastos transfectados com pKGQ1;
- Transformar culturas celulares de mamoeiro em suspensão com os vetores pKSBG e pKSPD;
- Confirmar a expressão do cassete CRISPR/Cas9 e gRNA em protoplastos, células e tecidos de mamoeiro;
- Confirmar mutação provocada por CRISPR/Cas9 nos sítios alvos dos genes  $\beta$ -1,3-glucanase e fitoeno desaturase.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ANÁLISE DOS GENES ALVOS

##### 3.1.1 Sequência do Gene da Fitoeno Desaturase

A sequência da região codificadora (CDS) do gene PDS de *Carica papaya* (NCBI, GenBank: DQ779922.2) possui 1751 nucleotídeos e 583 aminoácidos. Foi selecionada a sequência TGGAAGCAAGAGATGTTCT para a inativação gênica. No *downstream* da sequência existe uma região PAM composta pela sequência AGG (PAM), necessária para o reconhecimento da Cas9 e o gRNA do sistema CRISPR. Além disso, o sítio de clivagem corresponde à enzima de restrição *BssS $\alpha$ 1* (AGATGT), que funciona como um marcador de mutação no alvo, ou seja, quando houver mutação ocorrerá a perda do sítio de restrição. Um fragmento amplificado dessa região que for submetido a uma digestão enzimática pela enzima *BssS $\alpha$ 1* manterá seu tamanho original, validando que houve a mutação pela perda do sítio de ligação da enzima de restrição.

##### 3.1.2 Sequência do Gene da $\beta$ -1,3-glucanase

A sequência CDS do gene  $\beta$ -1,3-glucanase (endo-1,3-beta-glucosidase-like) de *Carica papaya* (NCBI, GenBank: gene 110809473; sequência XM\_022035326.1) possui 1026 nucleotídeos e 342 aminoácidos. Selecionamos a sequência GATGCGTTCATGACTCTG para a inativação gênica. Além disso, no *downstream* da sequência desta sequência existe uma região PAM composta pela sequência TGG, necessária para o reconhecimento da Cas9 e o gRNA do sistema CRISPR. Além disso, o sítio de clivagem corresponde à enzima de restrição *BspH1* (TCATGA), que funciona como um marcador de mutação no alvo, processo semelhante ao descrito anteriormente.

## 3.2 VETORES DE TRANSFORMAÇÃO

### 3.2.1 pKGQ1 e pKGCPM

Os vetores pKGQ1 e pKGCPM são derivados do vetor comercial pK7WGF2, no qual utilizou-se a tecnologia de clonagem *Gateway*<sup>™</sup> da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA). Este vetor contém o promotor 35S de superexpressão do gene repórter GFP com resistência a canamicina, gentamicina e rifampicina. Os vetores pKGQ1 e pKGCPM fazem parte da coleção do laboratório e foram utilizados como controles (Quadro 1). O plasmídeo pKGCPM foi inserido por eletroporação em *Agrobacterium tumefaciens* GV3101. A bactéria resultante foi chamada de *A*pKGCPM (Quadro 1).

### 3.2.2 pKSE401

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 customizada de acordo com a sequência alvo do genoma da planta que se deseja alterar (Figura 4).



O plasmídeo também possui um gene de resistência à espectinomicina (SpR) com 1219 pares de base, ambas as extremidades do gene (5' e 3') possui sítio para a enzima *Bsa*I (GAGACC e GGTCTC). Esse gene compõe a sequência do cassete de expressão de gRNA conduzido por U6-26p sem alvo. No processo de clonagem do gRNA alvo, o gene da espectinomicina é digerido pela enzima *Bsa*I e no local entra gRNA customizado (Figura 5).

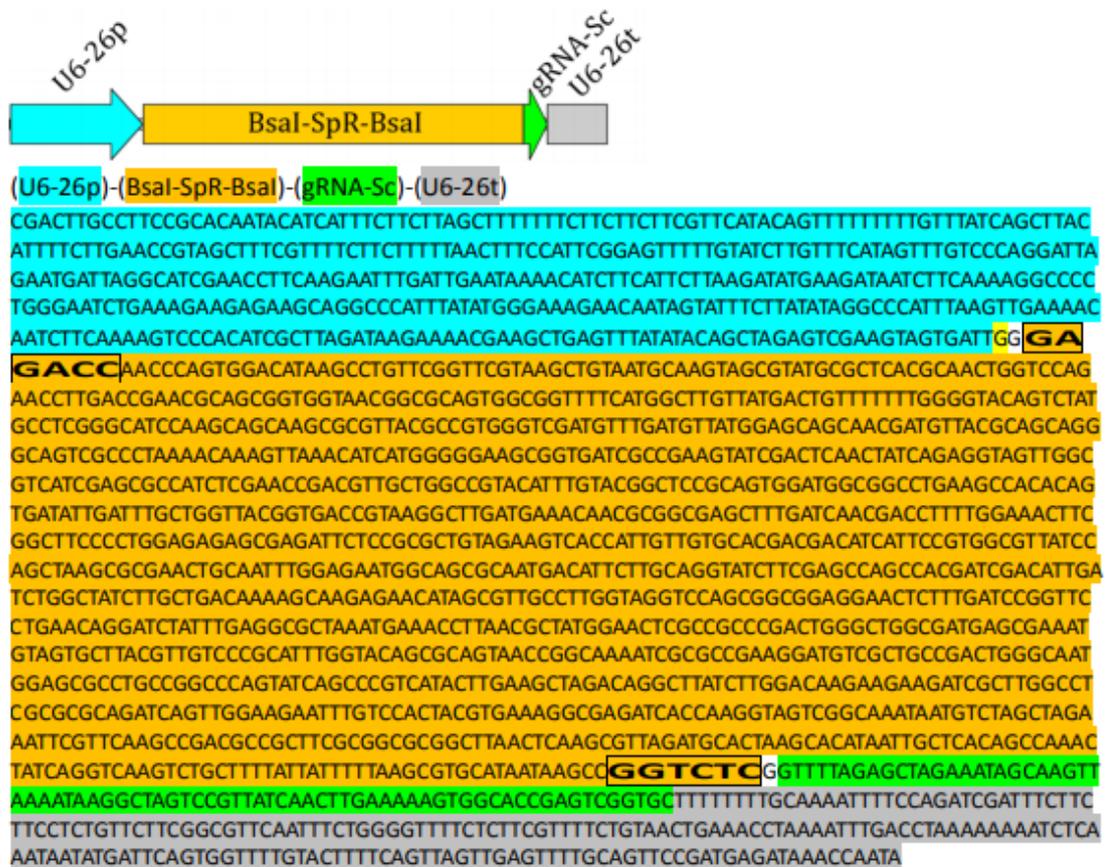


Figura 5: Sequência do cassete de expressão de gRNA conduzido por U6-26p sem alvo. SpR, gene de resistência à espectinomicina; gRNA-Sc, gRNA scaffold. As letras ampliadas e em caixas indicam sites *Bsa*I.

### 3.3 CUSTOMIZAÇÃO DO VETOR DE TRANSFORMAÇÃO pKSE401 E TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

#### 3.3.1 Clonagem

Para o processo de clonagem, quatro oligonucleotídeos foram sintetizados. Dois para o gene da  $\beta$ -1,3-glucanase e dois para o gene da fitoeno desaturase.

Oligonucleotídeos:

- Fitoeno desaturase: *forward* 5'- ATTGATCTTAACAGCTCGTGCTT -3' e *reverse* 5'- AAACAAGCACGAGCTGTTAAGAT -3', usando com referência a sequência do gene fitoeno desaturase.
- $\beta$ -1,3-glucanase: *forward* 5'-ATTGGATGCGATTCATGACTCTG-3' e *reverse* 5'-AAACCAGAGTCATGAATCGCATC-3', usando com referência a sequência CDS do gene  $\beta$ -1,3-glucanase.

A inserção dos oligonucleotídeos no vetor foi realizada pela técnica *Golden Gate Assembly*, onde numa única reação são misturados o vetor Sigma-Aldrich, os dois oligonucleotídeos e as enzimas *Bsa*I (NEB #R3733) e T4 ligase (D2886 Sigma-Aldrich). A mistura de ligação foi utilizada na eletroporação da bactéria *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . Os clones transformantes foram selecionados pela resistência ao antibiótico canamicina, na concentração de 50 $\mu$ g/ml, em meio LB líquido (1% Tripton, 1% Cloreto de Sódio, 0,5% Extrato de Levedura), cultivada a 37°C, por 24h.

Posteriormente, foram extraídos o DNA plasmidial dos clones bacterianos selecionados. Os novos plasmídeos foram chamados de pKSPD e pKSBG para a fitoeno desaturase e para a  $\beta$ -1,3-glucanase, respectivamente (Quadro 1). Também foram inseridos por eletroporação na bactéria *A. tumefaciens* GV3101. As bactérias resultantes foram denominadas de *AtpKSPD* e *AtpKSBG* (Quadro 1).

#### 3.3.2 Preparo de Células Bacterianas Competentes

Uma cultura de 5 mL de *E. coli* DH5 $\alpha$  pré-crescida foi inoculada em 500 mL de meio líquido LB e incubada (37 °C), com agitação, até ter atingido uma absorbância em torno de 0,5 (sob uma densidade ótica de 600 nm). A suspensão foi então coletada

em tubos de centrífuga de 500 mL, deixada em repouso no gelo por cerca de 30 minutos e centrifugada a 6000 g, por 15 min, à 4 °C.

O sobrenadante foi removido e o sedimento ressuspensado em 500 mL de água destilada estéril gelada. As células foram novamente centrifugadas, como no item anterior. Após a centrifugação, as células foram ressuspensas em 250 mL de água gelada destilada estéril e centrifugada novamente. As células foram ressuspensas em 50 mL de uma solução de glicerol 10%, à 4 °C, e centrifugadas pela última vez. As células foram ressuspensas em 1 mL de glicerol 10%, à 4 °C. Foram feitas alíquotas de 40 µL da suspensão de células em microtubos e armazenadas à temperatura de -80 °C.

### 3.3.3 Transformação Bacteriana por Eletroporação

As células competentes foram retiradas do freezer -80 °C e colocadas imediatamente no gelo. Foram acrescentados cerca de 1-2 µL de DNA plasmidial. O eletroporador Eppendorf Eporator foi calibrado com a voltagem 1440 V para *A. tumefaciens* GV3101 e a voltagem 1700 V para *E. coli* DH5α. A mistura célula/DNA foi transferida para a cubeta gelada. Em seguida o pulso foi aplicado. As cubetas foram imediatamente removidas da câmara de aplicação do pulso e foi adicionado 1 mL do meio SOC (2% Triptona, 0,5% Extrato de Levedura, 10 mM de Cloreto de Magnésio, 10 mM Sulfato de Magnésio, 20 mM Glicose) às células. A suspensão foi então transferida para um tubo de ensaio e incubada (37 °C, com agitação, por 1 hora). Após esse tempo de incubação a suspensão foi semeada em placa contendo meio LB sólido (1% Triptona, 1% Cloreto de Sódio, 0,5% Extrato de Levedura, 2% ágar), acrescido de antibiótico apropriado e incubada em estufa (37 °C, por 16 horas).

Quadro 1: Relação de vetores e bactérias utilizadas no experimento e as diferentes aplicações em folhas, células e protoplastos de *C. papaya* L.

PLASMÍDEOS				BACTÉRIAS			
Plasmídeo original	Vetores após clonagem	Descrição	Aplicação	Espécie e cepa original	Bactérias após transformação com os vetores pK_ _ _	Descrição	Aplicação
pK7WGF2, no qual utilizou-se a tecnologia de clonagem Gateway™ da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA).	pKGQ1	Coleção do laboratório: Contém o promotor 35S de superexpressão do gene repórter GFP. Utilizados como controle negativo para CRISPR/Cas9.	Transfecção de protoplastos	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101	AtpKGCPM	Possui o vetor pKGCPM. Utilizada como controle negativo para CRISPR/Cas9.	Agroinfiltração de folhas e células em suspensão.
	pKGCPM						
pKSE401 (Addgene #62202), no qual utilizou-se a tecnologia de clonagem Golden Gate Assembly.	pKSPD	Possui o cassete de expressão do gRNA + Cas9 para o sítio alvo do gene da fitoeno desaturase.					
	pKSBG	Possui o cassete de expressão do gRNA + Cas9 para o sítio alvo do gene da $\beta$ -1,3-glucanase.	AtpKSBG	Possui o vetor pKSBG			

### 3.4 CULTURA DE TECIDOS DE MAMOEIRO

Para a produção de tecidos vegetais e transformação dos mesmos mediado por *A. tumefaciens*, utilizamos o protocolo descrito por Carlos-Hilario e Chistopher (2015). Na figura 6 esquematizamos como foi realizado o processo. Plântulas regeneradas foram obtidas seguindo o mesmo protocolo com algumas modificações.

Na tabela 3 apresentamos os meios de cultura de tecidos vegetais utilizados e os detalhes sobre a composição dos meios estão na tabela 4.

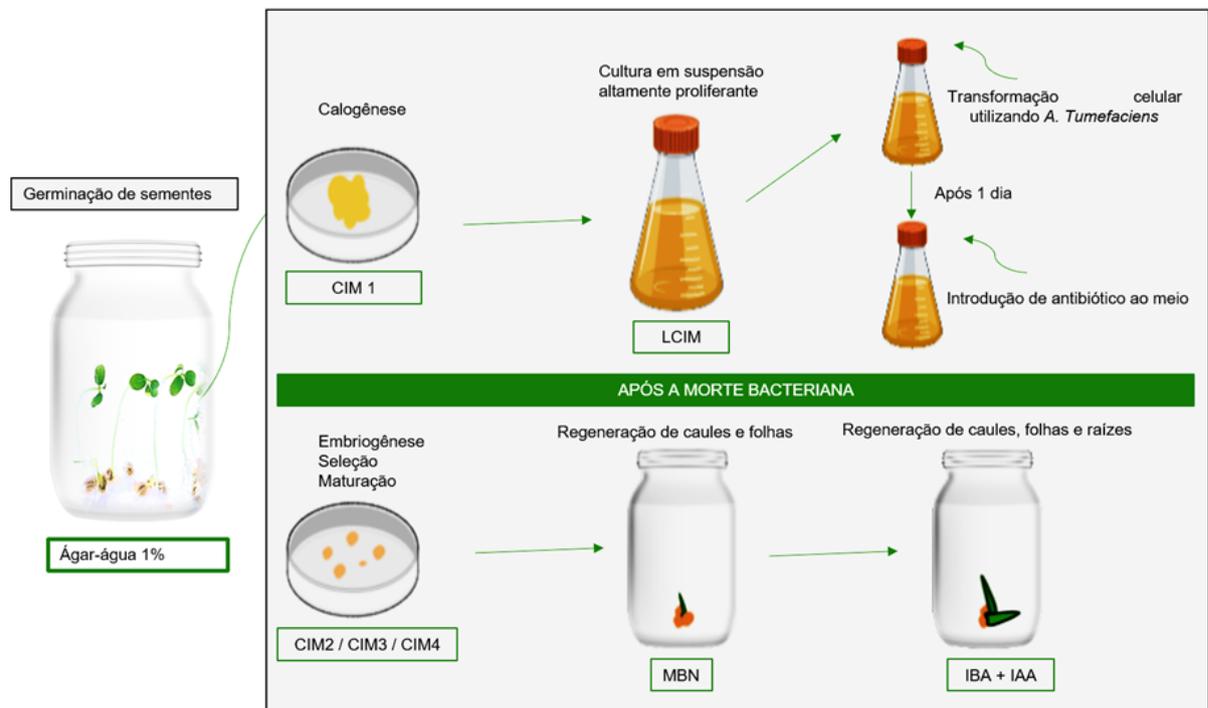


Figura 6 Desenho esquemático dos processos de cultura de tecidos e transformação celular, onde: CIM1 é meio de indução de calo; LCIM é meio de cultura de células em suspensão; CIM2 é meio de transformação utilizado para co-cultivo, lavagem e embriogênese somática; CIM3 é meio de seleção; CIM4 é meio de maturação; MBN é meio de regeneração de brotos; e IBA+IAA é meio de enraizamento.

Tabela 3: Meios de cultura utilizados para calogênese, embriogênese somática e regeneração *in vitro* a partir de hipocótilos e *C. papaya* L.

Tipo de meio		Antibiótico	Tempo	Observações	
Meio de indução de calo		CIM1	–	1 mês	Meio sólido
Meio de cultura de células em suspensão		LCIM	–	3 meses	Meio líquido - repicagem a cada 3 ou 4 semanas
Transformação	Co-cultivo		–	2 dias	Meio sólido
	Lavagem	CIM2	250 mg/L-1 cefotaxima	Momentâneo	Meio líquido
	Embriogênese somática		carbenicilina e / ou cefotaxima 250 mg.L-1	2 semanas	Meio sólido - adicionamos canamicina
Meio de seleção		CIM3	50ug/L-1 canamicina	2 meses	Meio sólido
Meio de maturação		CIM4	–	*Até regenerar	Meio sólido
Meio de regeneração de brotos		MBN	–	*Até regenerar	Meio sólido acrescido de 2mg/L-1 BAP/ANA
Meio de enraizamento		IBA/IAA	-	Até regenerar	Meio sólido acrescido de 2mg/L IBA/IAA + carvão ativado (2g/L-1)

Tabela 4: Composição dos meios de cultura utilizados para calogênese, embriogênese somática e regeneração *in vitro* a partir de hipocótilos e *C. papaya*.

Meio	Reagentes para preparo de meio de cultura					
	Sacarose	Sais MS	Glutamina	Vitamina MS	Phytigel	Hormônio
CIM 1	30g/L-1	2,165g/L-1	0,4g/L-1	1mL/L-1	3,18g/L-1	2,4-D (10 mg/L-1)
LCIM	30g/L-1	2,165g/L-1	0,4g/L-1	1mL/L-1	-	2,4-D (2 mg/L-1)
CIM2	30g/L-1	2,165g/L-1	0,4g/L-1	1mL/L-1	3,18g/L-1	2,4-D (2 mg/L-1)
CIM3	30g/L-1	2,165g/L-1	0,4g/L-1	1mL/L-1	3,18g/L-1	2,4-D (2 mg/L-1)
CIM4	30g/L-1	2,165g/L-1	0,4g/L-1	1mL/L-1	3,18g/L-1	-
MBN	30g/L-1	2,165g/L-1	0,4g/L-1	1mL/L-1	3,18g/L-1	BAP/ANA (2 mg/L-1 de cada)
IBA/IAA	30g/L-1	2,165g/L-1	0,4g/L-1	1mL/L-1	3,18g/L-1	IBA/IAA (2 mg/L-1 de cada)
Sigla/Hormônio						Concentração do estoque
2,4 -D: Ácido 2,4-diclorofenoacético BAP: Ácido Benzilaminopurina ANA: Ácido Naftalenoacético IBA: Ácido indol-3-butírico IAA: Ácido endolacético						1mg/ml

#### 3.4.1 Desinfestação e Germinação de Sementes e Desenvolvimento de Mudanças

As sementes de mamoeiro foram submersas em hipoclorito de sódio 1% acrescido de 3 gotas de tween 20. As sementes ficaram sob agitação por 15 minutos.

As sementes foram lavadas três vezes com a água destilada autoclavada. Após a terceira lavagem, as sementes foram transferidas para um erlenmeyer contendo 200ml de solução autoclavada de nitrato de sódio 1M (para auxiliar na quebra da dormência). O erlenmeyer foi colocado no *shaker* (150 rpm) por aproximadamente 24h, a 30°C.

Após o período de incubação, as sementes foram novamente lavadas três vezes com água destilada autoclavada.

Aproximadamente 15 sementes foram colocadas para germinar em frascos contendo ágar-água 1%. Os frascos foram incubados em estufa a 30°C e fotoperíodo de 16h por aproximadamente 2 semanas ou até que as sementes germinarem.

#### 3.4.2 Calogênese

Após duas semanas da germinação das sementes, as plântulas com crescimento de 10 a 12 cm tiveram os hipocótilos e as folhas seccionadas em 2 a 3 mm e inoculadas superficialmente em meio de cultura para a indução de calos CIM1. Somente as raízes foram descartadas. Após este procedimento, as placas foram vedadas com auxílio de plástico filme a fim de evitar possíveis contaminações. Os calos foram obtidos após 1 mês na placa contendo CIM1.

#### 3.4.3 Cultura Celular em Suspensão

Calos translúcidos com aproximadamente de 1 mês, pesando entre 3-5 g, foram transferidos para 50 mL de meio de cultura líquido LCIM, onde permaneceram por mais 1 mês, tempo necessário para que formassem células livres em suspensão. As células em suspensão foram utilizadas para transformação mediada por *A. tumefaciens* (*AtpKGCPM*, *AtpKSPD* e *AtpKSBG*). O processo está detalhado no subtópico 3.5.

#### 3.4.4 Embriogênese Somática, Organogênese e Regeneração de Plântulas

Após passar pelo processo de transformação, as células foram transferidas do meio LCIM para o meio CIM2 sólido, acrescido com antibiótico carbenicilina e/ou cefotaxima (250 mg/L). O procedimento segue detalhado abaixo:

Procedimentos:

Após verter o meio CIM 2 nas placas, foram preparados os seguintes materiais no fluxo: erlenmeyer com culturas em suspensão; pipetas e ponteiros de 5 ml; bécker com capacidade de 1L para descarte do meio LCIM; tubo de ensaio com álcool 70%; caneta para identificação; plástico filme; pinça autoclavada.

O erlenmeyer contendo as células em suspensão foi colocado em posição diagonal por 5 minutos, tempo suficiente para as células se sedimentarem no fundo. Com o auxílio da pipeta, retiramos o máximo possível do sobrenadante (LCIM). Este processo deve ser realizado cuidadosamente de modo que não ressuspendam as células depositadas. O meio LCIM deve ser descartado.

Após a retirada do LCIM, utilizamos a pinça para transferir as células do erlenmeyer para as placas contendo CIM2. Duas semanas após a transferência para CIM2, os calos foram repicados para o meio CIM3 sólido acrescido com canamicina (50 µg/L), para seleção dos transformantes, onde permaneceram por 2 meses. Durante esse período, os calos foram repicados para o mesmo meio após 30 dias.

Os respectivos antibióticos foram adicionados ao meio de cultura após autoclavagem do mesmo. Além disso, o processo de repicagem ocorreu dentro do fluxo laminar a fim de evitar contaminações.

Após os 2 meses, os calos foram transferidos para o meio CIM4 sólido, com ausência de hormônios e antibióticos, onde permaneceram por 1 mês. Após este período, os embriões formados foram transferidos para frascos contendo o meio MBN, para indução de caules e folhas. Após formação de folhas, os tecidos mais desenvolvidos foram repicados para novos frascos contendo o meio de enraizamento IBA/IAA, acrescido de carvão ativado. A alternância de meio MBN *versus* IBA/IAA durou de 1 a 3 meses quando a regeneração de plântulas pode ser observada.

### 3.5 TRANSFORMAÇÃO VEGETAL

Neste estudo utilizamos diferentes estratégias de transformação (Figura 7). Para a transformação de folhas, utilizamos o método de agroinfiltração a vácuo. Para células em suspensão agroinfiltramos as células em meio líquido. A transfeção de protoplastos foi realizada por PEG. Os protocolos utilizados estão detalhados nos subtópicos seguintes.

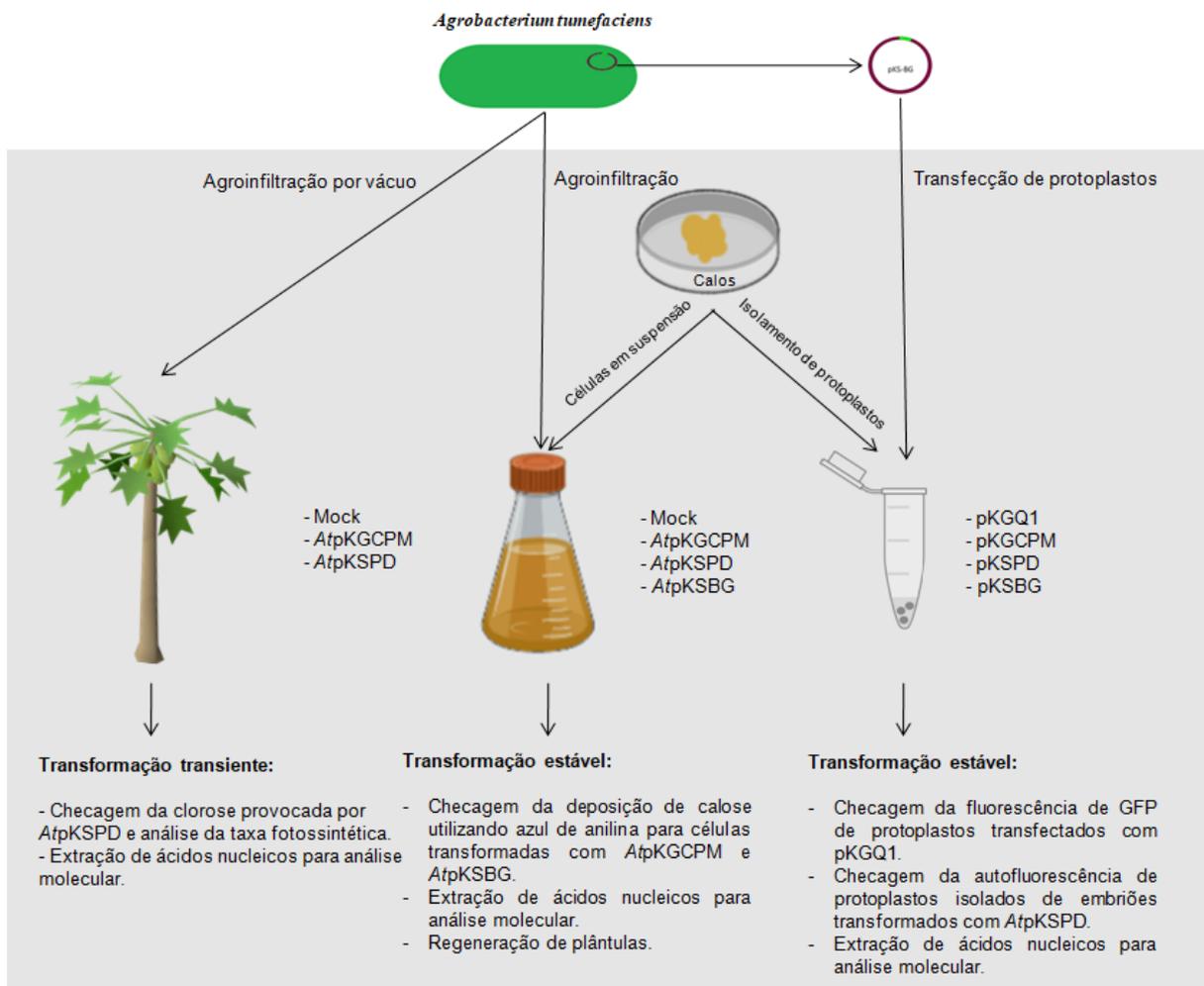


Figura 7: Desenho esquemático das diferentes estratégias de transformação adotadas neste trabalho.

#### 3.5.1 Transformação Transitente

As linhagens bacterianas *AtpKSPD* e *AtpKSBG* foram inoculadas em meio LB líquido, acrescido de canamicina (50µg/ml), e cultivadas a 28°C por 24h. Para o controle

negativo, a linhagem *A. tumefaciens* GV3101 sem plasmídeo foi cultivada da mesma forma, porém, com ausência de canamicina. Posteriormente, as culturas foram centrifugadas, lavadas com água destilada estéril e centrifugadas novamente. As massas celulares foram diluídas em ½ 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 densidade ótica (OD<sub>600</sub>) de 0,5. A virulência da *A. tumefaciens* foi induzida acrescentando acetosyringone (20µM) 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, individualmente, num dissecador e submetidos a um vácuo de 500 mmHg por 2 minutos. Ao todo, foram agroinfiltradas 8 plantas: quatro plantas foram agroinfiltradas com *A<sub>tp</sub>KSPD*; duas plantas foram agroinfiltradas com *A<sub>tp</sub>KSBG*; e duas plantas foram agroinfiltradas *A. tumefaciens* sem plasmídeo (controle negativo). 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 folhas de mamoeiro não agroinfiltrados, 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).

### 3.5.2 Transformação Estável

Células de mamoeiro em suspensão cultivadas em meio LCIM foram submetidas ao processo de transformação mediado pelas bactérias *A<sub>tp</sub>KGCPM*, *A<sub>tp</sub>KSPD* e *A<sub>tp</sub>KSBG*, separadamente.

As bactérias *A<sub>tp</sub>KSPD* e *A<sub>tp</sub>KSBG* foram inoculadas em meio LB líquido, acrescido de canamicina (50µg/ml), e cultivadas a 28°C por 24h. Para o controle negativo, a linhagem *A<sub>tp</sub>KGCPM* foi cultivada da mesma forma. Posteriormente, as culturas foram centrifugadas a 3000 g por 3 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com água destilada estéril. Em uma segunda etapa, as células foram novamente centrifugadas e o sobrenadante descartado. As massas celulares foram

diluídas em ½ MS (MS 2,165 g / L; sacarose 30 g / L; 2 mg/L de 2,4-D; pH 5,6-5,8) como tampão de transformação e ajustadas a uma densidade ótica (OD 600 nm) de 0,5. A virulência da *A. tumefaciens* foi induzida adicionando acetosyringone (20µM) ao tampão, com incubação a 28°C por 3h.

Para o processo de agroinfiltração, as culturas bacterianas foram diluídas de modo que concentrações de inóculo de *Agrobacterium* (OD 600 nm) nas culturas celulares fosse de 0,005.

### 3.6 ISOLAMENTO E TRANSFEÇÃO DE PROTOPLASTOS A PARTIR DE CALO E EMBRIÕES SOMÁTICOS

#### 3.6.1 Isolamento de protoplastos

Para o processo de isolamento de protoplastos, seguimos o protocolo descrito por Zang e colaboradores (2011). Foram isolados protoplastos a partir de dois tipos de tecidos: (I) 3 g de calos de mamoeiro gerados em meio CIM1 (não transformados); (II) 3 g de embriões somáticos gerados em meio CIM4, oriundos de células em suspensão transformadas com *A<sub>p</sub>KGCPM* e *A<sub>p</sub>KSPD*.

O isolamento ocorreu por meio da combinação da solução enzimática [1,2% p/v celulase R-10 (C1184 Sigma-Aldrich), 0,3% p/v macerozyme R-10 (P2401 Sigma-Aldrich), 0,52 M D-manitol, 20 mM KCl e 20 mM 2-(N-morfolino) etanossulfico (MES)] preparada antes da digestão dos tecidos de mamão e, em seguida, aquecido a 55 ° C por 10 min para inativar as proteases e aumentar a solubilidade das enzimas. A solução foi resfriada à temperatura ambiente antes da adição de CaCl<sub>2</sub> 10 mM e 0,5% de polivinilpirrolidona (PVP) (p/v), então a solução enzimática foi esterilizada por filtro de 0,22 µm em tubos falcons.

Com o auxílio de uma pinça estéril, os tecidos I e II foram esmigalhados diretamente no falcon contendo 10 mL da solução enzimática (um falcon para cada tipo de tecido = 20 mL de solução enzimática). Os falcons foram lacrados e incubados a 26 ° 13 h no shaker a (60 rpm) no escuro.

### 3.6.2 Purificação de protoplastos

Após a incubação, 10 ml de tampão W5 esterilizado por filtro (154 mM NaCl, 125 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM KCl, 2 mM MES e 5 mM D-glicose) foram adicionados ao tubo falcon. Os tecidos não digeridos e os protoplastos grosseiros foram separados por meio de uma peneira de náilon de 70 µm. A suspensão de protoplastos foi centrifugada a 800 rpm por 5 min em tubos de 50 ml, e os resíduos e a solução enzimática foram removidos completamente com uma pipeta de Pasteur. Os protoplastos foram lavados duas vezes com 10 ml de W5 (800 rpm por 5 min). Os protoplastos purificados foram ressuspensos em 10 ml de W5.

### 3.6.3 Rendimento dos Protoplastos

Os protoplastos suspensos (10 µl) foram colocados em uma lâmina de hemocítmetro. Após 5 min, os protoplastos foram contados no hemocítmetro sob luz branca, os resultados foram expressos como rendimento de protoplastos g<sup>-1</sup> FW e todas as avaliações de rendimento foram repetidas pelo menos 3 vezes.

### 3.6.4 Transfecção de Protoplastos

Para a transfecção de protoplasto, utilizamos o protocolo descrito por Nanjareddy e colaboradores (2016), com algumas modificações. Os protoplastos isolados de calos (I) no subtópico 3.6.1 foram utilizados para transformação mediada por PEG, no qual empregamos o protocolo com tampão de transfecção polietilenoglicol-manitol magnésio (PEG-MMG) [40% p/v polietilenoglicol 4'000 (95904 Sigma-Aldrich), 4 mM MES, 0,4 M D-manitol e 15 mM MgCl<sub>2</sub>].

Para o processo de transfecção, 10 µL de DNA plasmidial (10-20 µg) extraído das culturas bacterianas *ApKGQI*, *ApKSPD* e *ApKSBG* no subtópico 3.8.1 foram individualmente adicionados em tubos de microcentrífuga de 2 ml. Nos mesmos tubos foi adicionado 100 µL de protoplastos ( $2 \times 10^4$  protoplastos) e misturado delicadamente. Em seguida, foi adicionado 110 µL de solução de PEG-MMG e misturado completamente batendo levemente no tubo. A mistura de transfecção foi incubada em temperatura ambiente por 15 minutos.

Após a incubação, a mistura de transfecção foi diluída com 400  $\mu$ L de solução W5 em temperatura ambiente e misturada bem invertendo o tubo para interromper o processo de transfecção. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 100 g por 2 min em temperatura ambiente usando uma centrífuga de bancada. O sobrenadante foi removido, com o auxílio de uma micropipeta, e os protoplastos foram suavemente ressuspendidos com 1 ml de solução WI (4 mM MES, 0,5 M D-manitol e 20 mM KCl), pH 5,7.

#### 3.6.4.1 Validação de Mutação Utilizando Citometria de Fluxo

Os protoplastos isolados a partir de embriões somáticos no subtópico 3.6.1 (II) previamente transformados com *A<sub>tp</sub>KGCPM* e *A<sub>tp</sub>KSPD* foram analisados usando um Cit metro de Fluxo CytoFLEX V2-B2-R0 (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA) com 2 lasers ativos, violeta 405nm-80mW e azul 488nm-50mW, e com 4 canais de detec o de fluorescência. Os protoplastos foram excitados com o laser violeta e a autofluorescência da clorofila foi detectada utilizando o filtro 660/10nm. Foi adquirido um total de 20.000 eventos em um fluxo de 10 $\mu$ L/min. Uma alíquota de protoplastos foi tratado com acetona para a degrada o da clorofila para ser utilizada como controle negativo (sem fluorescência). A concentra o das amostras foi de até 10<sup>6</sup> células/mL.

### 3.7 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

#### 3.7.1 Viabilidade dos Protoplastos

Os protoplastos suspensos (500  $\mu$ l) foram misturados com 12  $\mu$ l de soluço estoque de diacetato de fluoresceína (FDA) (5 mg/ml de acetona). A viabilidade dos protoplastos foi examinada por ensaio de colora o FDA e visualizadas em microscópio invertido NIKON® Ti-Eclipse composto de um filtro de excita o (365/12 nm - bandpass) e um filtro de emissão (397 nm - bandpass) ambos já equipados no microscópio. As imagens foram fotografadas e analisadas com auxílio do software Nis-Elements AR 4.20.00. A viabilidade expressa como porcentagem   determinada como o número de protoplastos que apresentaram fluorescência verde sob luz ultravioleta em rela o ao número total de protoplastos isolados observados no mesmo campo microscópico sob luz normal.

### 3.7.2 Fluorescência da GFP

Os protoplastos transfetados com os plasmídeos extraídos da cultura bacteriana *A $\rho$ KGQI* que contém o promotor 35S de super expressão do gene repórter GFP, foram analisados em microscópio invertido NIKON® Ti-Eclipse composto de um filtro GFP de excitação (395 nm - bandpass) e um filtro de emissão (510 nm - bandpass) ambos já equipados no microscópio. As imagens foram fotografadas e analisadas com auxílio do software Nis-Elements AR 4.20.00.

### 3.7.3 Fluorescência de Calose

Uma semana após serem submetidas ao processo de transformação mediado pelas bactérias *A $\rho$ KGCPM*, *A $\rho$ KSBG* no subtópico 3.5, as células de mamoeiro em suspensão foram analisadas quanto à fluorescência da calose utilizando azul de anilina. Os ensaios com azul de anilina foram realizados conforme descrito por Herburguer e Holzinger (2016), a saber:

Preparamos 20 mL de NaOH 8N a partir de pellets de hidróxido de sódio em água bidestilada em um bécker de 25 mL.

Preparamos 50 mL de tampão de fosfato de Sørensen (0,1 M, pH = 8,0), composto de duas soluções estoque A e B (0,2 M): (A) Adicionou-se fosfato de sódio monobásico desidratado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; Merck, número de catálogo: 1063420250) a 500 mL de água miliq (B) Adicionou-se fosfato de sódio dibásico di-hidrato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; Merck, número de catálogo: 1065800500) a 1000 mL de água miliq. Ambas as soluções estoque foram armazenadas a 4 ° C. Para preparar o tampão Sørensen (0,1 M, pH = 8,0), misture 2,7 mL da solução estoque (A) com 47,3 mL da solução estoque (B) em um tubo falcon 50 mL.

Transferimos as células em suspensão para tubos Eppendorf de 2 mL e lavamos uma vez com meio de cultura LCIM. Esperamos as células decantarem, descartamos o meio de cultura e adicionamos 1,5 mL de NaOH 8N em cada tubo. Em seguida, incubamos os tubos a 60 ° C por 20 min. Passado esse tempo, centrifugamos a 1000  $\times$  g para sedimentar a biomassa. O sobrenadante (NaOH 8N) foi descartado e as células lavadas 3x com água miliq por 5 minutos.

Adicionamos azul de anilina a 1% (p / v) ao tampão de fosfato de Sørensen recém-preparado e utilizamos 1,5 mL dessa solução para corar as células. Os tubos foram incubados no shaker a temperatura ambiente por 1 h no escuro sob agitação de 60 rpm.

As células foram lavadas 3x com tampão de fosfato de Sørensen por 5 minutos e transferidas para lâminas microscópicas. A visualização da deposição de calose na parede celular foi analisada em microscópio invertido NIKON® Ti-Eclipse composto de um filtro UV de excitação (390 nm - bandpass) e um filtro de emissão (460 nm - bandpass) ambos já equipados no microscópio. As imagens foram fotografadas e analisadas com auxílio do software Nis-Elements AR 4.20.00.

### **3.8 ANÁLISE MOLECULAR**

#### **3.8.1 Extração de DNA Plasmidial – “MiniPrep”**

Os clones de bacterianos foram inoculados em 5 mL de meio LB contendo o antibiótico apropriado, na concentração apropriada. O inóculo foi incubado (37 °C) por aproximadamente 16 horas, com aeração em agitador.

Uma alíquota de 3 mL foi centrifugada, em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL, a 12000 g por 2 minutos, sendo o sobrenadante descartado. Os passos seguintes de extração do DNA plasmidial foram realizados utilizando o kit ChargeSwitch™-Pro Plasmid Miniprep Kit (CS30250 Invitrogen™).

#### **3.8.2 Extração de DNA genômico**

A extração foi realizada de calos (100 mg) e de protoplastos previamente sedimentados por decantação (30 min), o sobrenadante foi removido restando 100 µl de células no tubo. Os tecidos foram colocados em tubos de microcentrífuga de 1,5 ml. O material foi homogeneizado em 50 µL de tampão de extração de DNA (500 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 7,5 e 50 mM EDTA pH 7,5), macerados com um pistilo de plástico, por 15 ~ 20 s. Após uma homogeneização inicial, outros 150 µL de tampão de extração de DNA foram adicionados e homogeneizados com o mesmo homogeneizador por 15 ~ 20 s.

Em seguida, 20 µL de SDS a 20% foram adicionados e agitados em vórtex por 30 s. As amostras foram incubadas a 65 ° C durante 10 min para lise celular. Neste ponto, um volume igual de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25: 24: 1) foi adicionado às amostras, misturado em vórtex por 30 s e, em seguida, centrifugado a 10.000 g por 3 min a 4 ° C. O sobrenadante foi transferido para um tubo novo e adicionado mais uma vez fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25: 24: 1) e depois com clorofórmio, o conteúdo foi misturado em vórtex por 30 s e, em seguida, centrifugado a 10.000 g por 3 min a 4 ° C.

O sobrenadante foi transferido para um tubo novo, e um volume duplo de isopropanol foi adicionado a cada amostra, misturando bem, e as amostras foram incubadas a -20 ° C por 30 min. Após esse período, as amostras foram então centrifugadas a 10.000 g por 10 min a 4 ° C. O sedimento foi lavado com etanol 70%, seco e ressuspenso em água miliq estéril contendo 20 µg/ml de RNase A livre de DNase. A concentração e a pureza foram determinadas a partir da razão A260/A280 usando um NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™).

### 3.8.3 Extração de RNA

O RNA total foi extraído de amostras de utilizando o reagente Trizol (Ambion, Foster City, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Cerca de 100 mg da amostra foi colocada em tubos de eppendorf (2 mL) e pulverizadas em nitrogênio líquido. Em seguida foi adicionado 1 mL do reagente Trizol® e agitado vigorosamente no vortex durante 10 segundos e mantidas por 5 minutos a temperatura ambiente (25 °C). A seguir, foram adicionados 200 µL de clorofórmio e posteriormente homogeneizado no vortex por 1 min e incubadas em temperatura ambiente por 3 minutos. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g a 4°C por 15 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo (2 mL), e adicionou-se 423 µL de isopropanol. Os tubos foram agitados manualmente por inversão durante 2 minutos e mantidos em temperatura ambiente por 8 minutos.

Depois, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 10 minutos a 4 ° C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado obtido foi lavado com 1 mL de etanol a 75% a 4 ° C e as amostras foram centrifugadas a 7.500 rpm durante 5 min a 4°C. Retirou-se o sobrenadante e deixou-se secar o pellet na câmara de fluxo laminar. Para

sua ressuspensão, utilizaram-se 20 µL de água ultrapura. O RNA isolado foi quantificado e posteriormente estocado em ultra-freezer a -80 °C.

#### 3.8.3.1 Tratamento com DNase

No tratamento com DNase, (1 µg) de RNA extraído foi misturado com a DNase (RNase – Free DNase Promega) de acordo com a recomendação do fabricante. Foi adicionado 1 µL de tampão para DNase e 1 µL da enzima e o volume completado para 8 µL com água milliq. Em seguida a reação foi incubada por 30 minutos a 37°C e posteriormente adicionado 1 µL de EDTA 20 mM e novamente incubada por 10 minutos a 75°C.

#### 3.8.3.2 Síntese de cDNA

Ao RNA tratado com DNase, foi adicionado 0,5 µg do primer hexâmero randômico e incubados por 3 minutos a 96°C. Em seguida foi adicionado 4 µl do tampão de enzima M-MLV, e 1,25 µL de dNTP 25 mM, e 1 µl da enzima M-MLV transcriptase reversa (200 U/µl) (Promega) em um volume final de 25 µl. Posteriormente, a amostra foi incubada a 37 °C por 60 min para a síntese do cDNA e 70 °C por 10 min para a desativação da enzima.

#### 3.8.4 Amplificação de Fragmentos de DNA por PCR Convencional

Para amplificar a região genômica visada pelo sgRNA, dois pares de primers específicos para cada gene alvo foram sintetizados. A enzima de restrição e a informação da sequência do iniciador são apresentadas na tabela 5. As condições de PCR são 94 ° C por 3 min, 35 ciclos de 94 ° C por 45 s, anelamento 53° por 30 s, polimerização a 72 ° C por 30 s, seguido por 72 ° C durante 3 min. O produto de PCR foi digerido pela enzima de restrição apropriada e os produtos submetidos a eletroforese.

Tabela 5: Sequência dos iniciadores utilizados para amplificação por PCR.

Nome do iniciador	Sequência do iniciador	Objetivo	Tamanho do amplicon	Sítio de restrição
Phydes Fw	5'-ATTGATCTTAACAGCTCGTGCTT-3'	Clonagem Fitoeno desaturase	423 pb	<i>BssS<math>\alpha</math>1</i>
Phydes Rv	5'-AAACAAGCAGGAGCTGTTAAGAT-3'			
Glucan Fw	5'-GGATGCGATTTCATGACTCTG-3'	Clonagem $\beta$ -1,3-glucanase	423 pb	<i>BspH1</i>
Glucan Rv	5'-AAACCAGAGTCATGAATCGCATC-3'			
Primer 181 Fw	5'-ATGACTTTATGCGGGAGTGT-3'	Diagnóstico Fitoeno desaturase	680 pb	<i>BssS<math>\alpha</math>1</i>
Primer 500 Rv	5'-GACGTAATGATTGAGTTAGAA-3'			
Primer 941 Fw	5'-CTGCTCAGATAGGTGTTTGC-3'	Diagnóstico $\beta$ -1,3-glucanase	941 pb	<i>BspH1</i>
Primer 941 Rv	5'-TCAGTTGAAACTGACTGGAT-3'			

### 3.8.5 Análise dos Fragmentos de PCR por Eletroforese em Gel de Agarose

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,0 % (p/v), em solução tampão TAE 1X (estoque 10x: 48,4 g Trizma Base, 11,42 mL ácido acético, 3,72 g EDTA) e corado com 50  $\mu$ L de brometo de etídio a uma concentração de 1 mg/mL, durante 90 minutos em uma voltagem de 80 mV. O peso molecular foi calculado por comparação com o marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen). Foram aplicadas 10  $\mu$ L de cada amostra em cada poço e 2  $\mu$ L do tampão Blue/Orange (Promega).

As imagens dos géis foram digitalizadas e fotografadas no sistema ultravioleta digital de captura de imagens L-PIX (Loccus Biotecnologia® Molecular Imaging).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CONFIRMAÇÃO DA CONSTRUÇÃO DOS VETORES pKSPD E pKSBG

A construção dos vetores foi confirmada por meio da extração de DNA plasmidial e PCR utilizando os primers de clonagem (Figura 8).

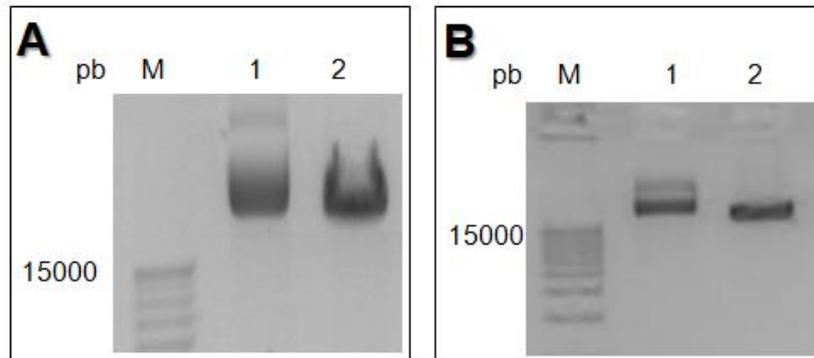


Figura 8: Confirmação da construção dos vetores de transformação. M) Marcador Ladder Plus 1Kb Thermo, A) plasmídeo pKSPD e B) plasmídeo pKSBG. 1 e 2 são o plasmídeo original pKSE401 e o plasmídeo clonado pKSPD (A) ou pKSBG (B), respectivamente.

Este resultado confirma a inserção dos respectivos gRNAs no vetor pKSE401. O DNA plasmidial (pKSPD e pKSBG) foi extraído da bactéria *E. coli* e inserido em por eletroporação em *A. tumefaciens*, as bactérias transformadas passaram a ser chamadas de *AtpKSPD* e *AtpKSBG*.

### 4.2 MAMOEIROS AGROINFILTRADOS COM *AtpKSPD*

As folhas das 4 mudas de mamoeiro que foram submetidas ao processo de agroinfiltração por *AtpKSPD* apresentaram despigmentação verde (clorose), sugerindo que o constructo foi expresso de forma transiente levando à inativação do gene PDS. Os sinais de clorose foram observados 24 h após o processo de agroinfiltração. Plantas que foram agroinfiltradas com *AtpKSBG* e com a linhagem *A.*

*tumefaciens* GV3101 sem plasmídeo, não tiveram alterações visuais em suas folhas (Figura 9).

As plantas agroinfiltradas foram acompanhadas por 7 dias. A partir do 5º dia as folhas das plantas agroinfiltradas com *AtpKSPD* começaram a apresentar sinais de necrose local. No 7º dia os pontos necrosados mais que dobrou de tamanho. Indicando danos no aparato fotossintético (Figura 9).

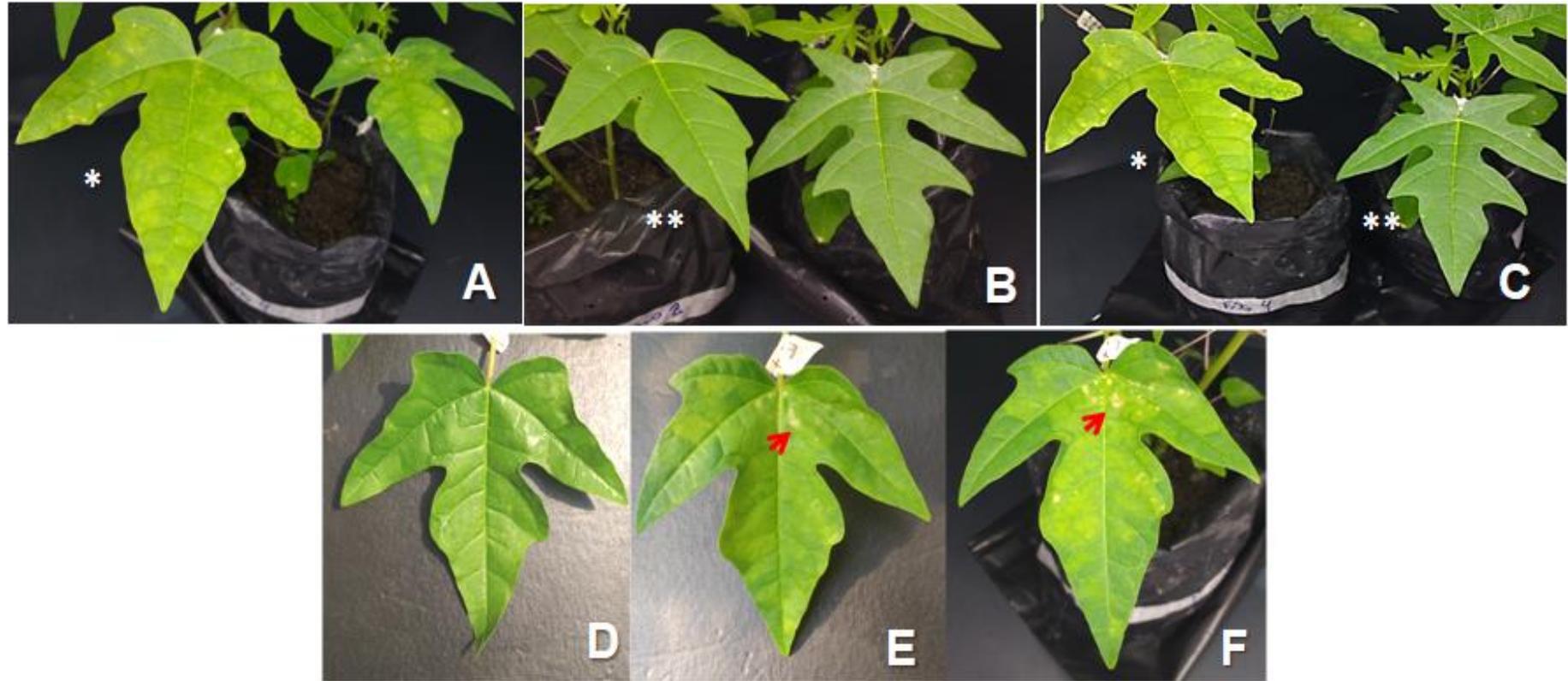


Figura 9: Folhas de mamoeiro agroinfiltradas com *AtpKSPD* apresentando sinais de clorose. A) Folhas agroinfiltradas com *AtpKSPD* apresentando clorose (despigmentação e amarelecimento foliar) (\*). B) Na esquerda, folha agroinfiltrada com *AtpKSBG* e na direita folha agroinfiltrada com *A. tumefaciens* sem plasmídeo, sem sinais de clorose (\*\*). C) Folhas agroinfiltradas com *AtpKSPD* (\*) e folhas agroinfiltradas com *A. tumefaciens* sem plasmídeo (\*\*). D, E e F) folhas agroinfiltradas com *AtpKSPD* com 1, 5 e 7 dias após agroinfiltração, respectivamente (a ponta da seta vermelha indica necrose dos tecidos).

O PCR realizado a partir do cDNA sintetizado do RNA total de folhas agroinfiltradas revelou a expressão do U626p/gRNA/U626t (423 pb) do constructo pKSPD e pKSBG. Vale ressaltar que foi utilizado como controle positivo o DNA do vetor pKSE401, onde o fragmento amplificado foi de 1500 pb, correspondente ao gene da espectinomicina. No entanto, quando é realizada a reação de clonagem *Golden Gate Assembly*, o gene da espectinomicina é substituído pelos oligonucleotídeos referentes ao gRNA customizado.

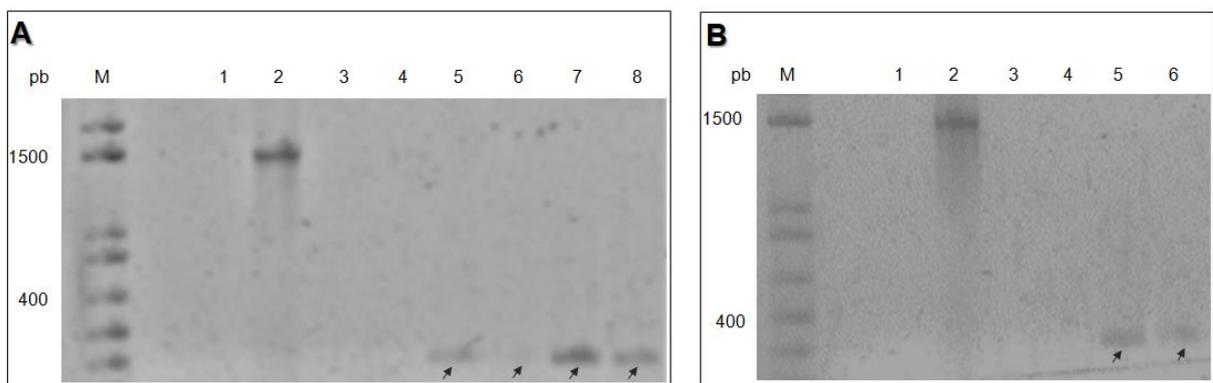


Figura 10: Gel de agarose após eletroforese, onde, tanto em A) quanto em B): M) *Ladder Plus 1Kb Thermo*; 1) folhas não agroinfiltradas (controle negativo); 2) Fragmento de aproximadamente 1500 pb referente ao gene espectinomicina do vetor pKSE401 que serviu como controle positivo. Em 3 e em 4 não houve amplificação do cDNA das folhas agroinfiltradas com *A. tumefaciens sem* o vetor (controles negativos). Em A (5, 6, 7 e 8) são fragmentos de PCR que correspondem a aproximadamente 423 pb, referente a expressão da região U6-26p / gRNA / U6-26t de folhas agroinfiltradas com *AtpKSPD*. Em B (5 e 6) são fragmentos de PCR que correspondem a aproximadamente 423 pb, referente à expressão da região U6-26p / gRNA / U6-26t de folhas agroinfiltradas com *AtpKSBG*

### 4.3 RENDIMENTO E VIABILIDADE DE PROTOPLASTOS

O rendimento de protoplastos isolados de calos foi de  $2 \times 10^6/\text{mL}$  e a viabilidade foi de 95% conforme contagem dos protoplastos que emitem fluorescência pelo FDA (Figura 11), deste modo os mesmos seguiram para o processo de transfecção (resultado apresentado nos subtópicos 4.3 e 4.4).

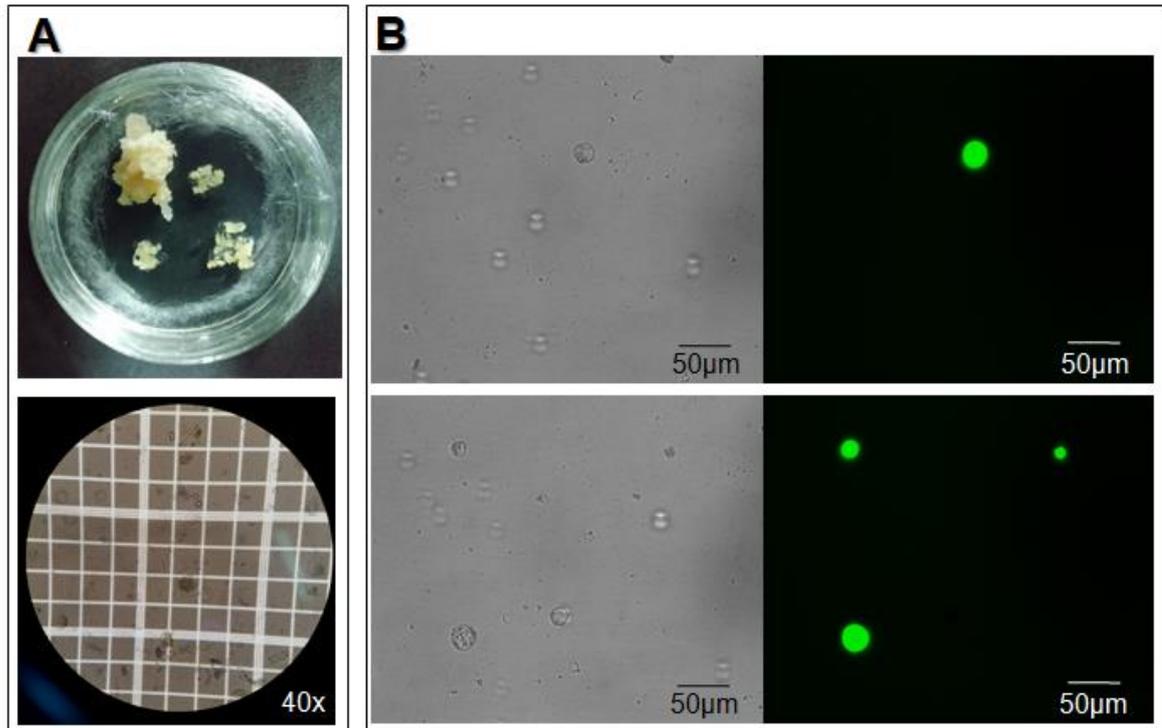


Figura 11: Isolamento e ensaio de viabilidade de protoplastos. A) isolamento de protoplastos a partir de calos (meio CIM1). B) Na esquerda, protoplastos em luz branca, na direita fluorescência do FDA em protoplastos viáveis. Escala 50 µm.

#### 4.4 ANÁLISES UTILIZANDO MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA REVELAM A EXPRESSÃO DE GFP EM PROTOPLASTOS TRANSFECTADOS COM pKGQ1

Após o processo de transfecção mediado por PEG, os protoplastos que receberam o plasmídeo pKGQ1 emitiram fluorescência verde (Figura 12).

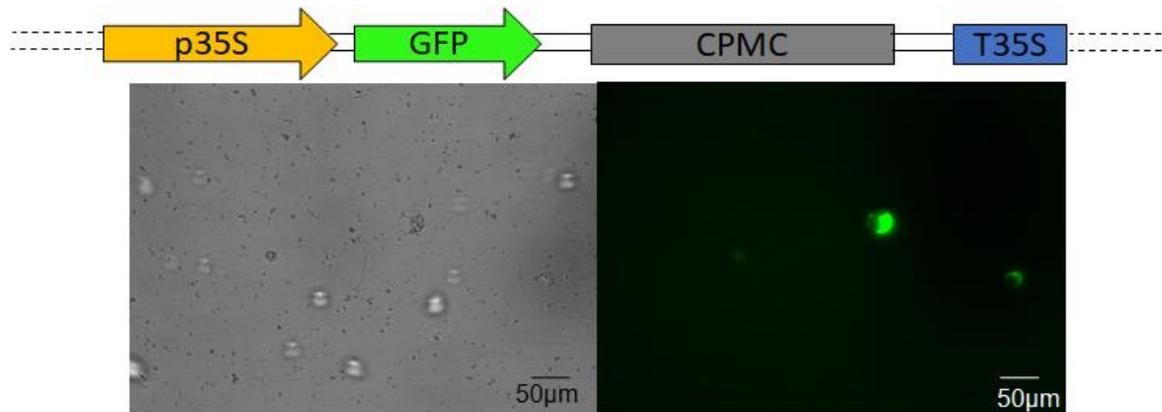


Figura 12: Fluorescência de GFP. Na esquerda os protoplastos na luz branca, na direita emissão de fluorescência de GFP em protoplastos transfetados com pKGQ1. Escala 50 µm.

#### 4.5 PROTOPLASTOS TRANSFECTADOS COM pKSPD E pKSBG EXPRESSAM O CASSETE gRNA E CAS9

A expressão de GFP em protoplastos transfetados com o plasmídeo pKGQ1 serviu como repórter de que o processo de transfecção funcionou. Desde modo, protoplasto isolados de calos também foram transfetados com os plasmídeos pKGCPM, pKSPD e pKSBG. O DNA dos protoplastos foi extraído e a região U626p/gRNA/U626t (423 pb) amplificada por PCR (Figura 13). Como esperado, a banda correspondente ao constructo apareceu somente em protoplastos transfetados com pKSPD e pKSBG.

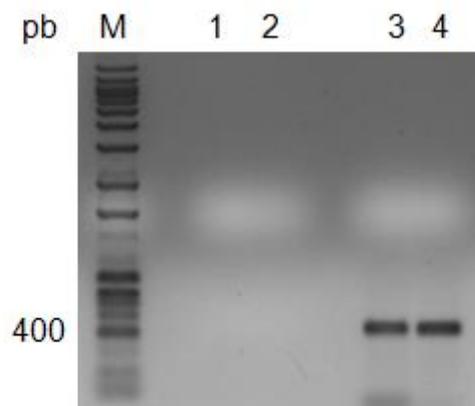


Figura 13: Expressão do cassete gRNA + Cas9 em protoplastos. M) *Marcador Ladder Plus 1Kb Thermo*. 1 e 2) Protoplastos transfetados com pKGQ1 e pKGCPM, respectivamente (controles negativos). 3) Fragmentos de PCR que corresponde a aproximadamente 423 pb, referente a expressão da região U6-26p / gRNA / U6-26t de protoplastos transfetados com pKSPD. 4) Fragmentos de PCR que corresponde a aproximadamente 423 pb, referente a expressão da região U6-26p / gRNA / U6-26t de protoplastos transfetados com pKSBG.

#### 4.6 CÉLULAS EM SUSPENSÃO TRANSFORMADAS COM *AtpKSPD* E *AtpKSBG* EXPRESSAM O CASSETE gRNA E CAS9

Após submetidas ao processo de transformação mediado por *A. tumefaciens* (*AtpKGCPM*, *AtpKSPD* e *AtpKSBG*), as células transformadas foram selecionadas por resistência ao antibiótico canamicina. O DNA das células foi extraído e a região U626p/gRNA/U626t (423 pb) amplificada por PCR. O amplicon gerado foi submetido à digestão pelas enzimas *BssS $\alpha$ 1* e *BspH1* para células transformadas com *AtpKSPD* e *AtpKSBG*, respectivamente (Figura 14).

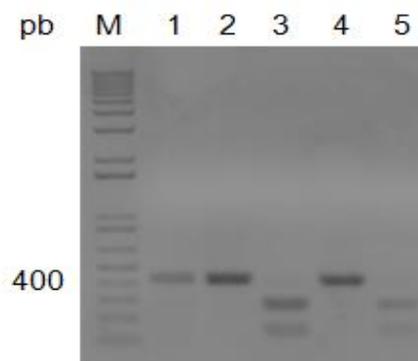


Figura 14: Expressão do cassete gRNA + Cas9 em células somáticas. M) *Marcador Ladder Plus 1Kb Thermo*. 1) Controle positivo do PCR (DNA de protoplasto). 2) Fragmentos de PCR que corresponde a aproximadamente 423 pb, referente a expressão da região U6-26p / gRNA / U6-26t de células transformadas com *AtpKSPD*. 3) Digestão com *BssS $\alpha$ 1* do amplicon apresentado em 2. 4) Fragmentos de PCR que corresponde a aproximadamente 423 pb, referente a expressão da região U6-26p / gRNA / U6-26t de células transformadas com *AtpKSBG*. 5) Digestão com *BspH1* do amplicon apresentado em 4.

A fim de analisar a mutação nos sítios alvos dos genes da fitoeno desaturase e da  $\beta$ -1,3-glucanase, foi realizado o PCR utilizando primers específicos para diagnóstico (consultar tabela 5). O fragmento gerado foi digerido com as enzimas *BssS $\alpha$ 1* e *BspH1*, respectivamente (Figura 15). Uma parte do DNA não foi digerido, esse resultado indica que ocorreu mutação no sítio alvo de ambos os genes. Vale ressaltar que no processo de transformação muitas células não foram transformadas, isso justifica a intensidade mais forte dos fragmentos digeridos (Figura 15).

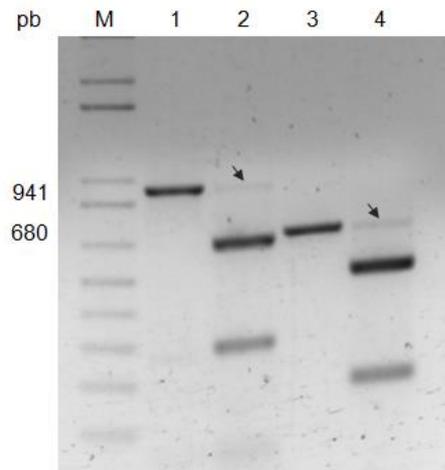


Figura 15: Mutação em células somáticas. M) Marcador Ladder Plus 1Kb Thermo. 1) Fragmentos de PCR que corresponde a 941 pb do gene da  $\beta$ -1,3-glucanase de células transformadas com *AtpKBG*. 2) Digestão com *BssS $\alpha$ 1* do amplicon apresentado em 1 (seta preta indica fragmento de 941 pb não digerido com a enzima devido à mutação). 3) Fragmentos de PCR que corresponde a 680 pb do gene da fitoeno desaturase de células transformadas com *AtpKPD*. 4) Digestão com *BspH1* do amplicon apresentado em 3 (seta preta indica fragmento de 680 pb não digerido com a enzima devido à mutação).

O fragmento não digerido foi purificado e utilizado como template para um novo PCR. O amplicon gerado foi novamente submetido ao processo de digestão enzimática. Desta vez, as bandas não digeridas apresentaram a intensidade mais forte, indicando que houve mutação gênica (Figura 16).

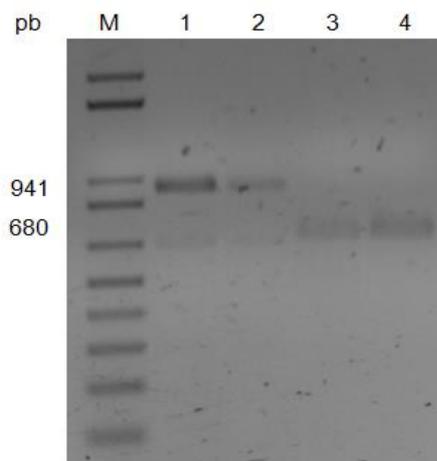


Figura 16: Mutação em células somáticas. M) Marcador *Ladder Plus 1Kb Thermo*. 1) Fragmentos de PCR que corresponde a 941 pb do gene da  $\beta$ -1,3-glucanase de células transformadas com *AtpKBG*. 2) Digestão com *BssS $\alpha$ 1* do amplicon apresentado em 1 (seta preta indica fragmento não digerido com a enzima devido à mutação). 3) Fragmentos de PCR que corresponde a 680 pb do gene da fitoeno desaturase de células transformadas com *AtpKPD*. 4) Digestão com *BspH1* do amplicon apresentado em 3 (seta preta indica fragmento não digerido com a enzima devido à mutação).

O fragmento não digerido do gene  $\beta$ -1,3-glucanas foram inseridos no plasmídeo pGEM®-T (Promega, Madison, EUA) e posteriormente transformados em *Escherichia coli Dh5 $\alpha$* . Após 24h de crescimento do inóculo os plasmídeos foram extraídos utilizando o kit PureLink™ Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen, Carlsbad, EUA) e digeridos com enzima de restrição EcoRI (Promega, Madison, EUA) conforme a bula. Os fragmentos de interesse foram separados do plasmídeo por eletroforese em gel de agarose. Em seguida as bandas foram excisadas, purificadas utilizando o kit QIAquick PCR Purification (Qiagen, Hilden, Alemanha) e armazenadas -80° C para análises posteriores (perspectivas futuras).

#### **4.7 ANÁLISES DE CITOMETRIA DE FLUXO INDICAM SILENCIAMENTO DO GENE PDS DE PROTOPLASTOS ISOLADOS DE CÉLULAS DESDIFERENCIADAS TRANSFORMADAS COM AtpKSPD**

A análise de autofluorescência da clorofila dos protoplastos isolados de embriões transformados com AtpKSPD foi inferior se comparado ao controle (Figura 17). Tais resultados sugerem que a biossíntese de carotenóides foi interrompida, a regeneração dessas culturas tende a formar embriões e plantas albinas. Resultado apresentado no Subtópico 4.8.

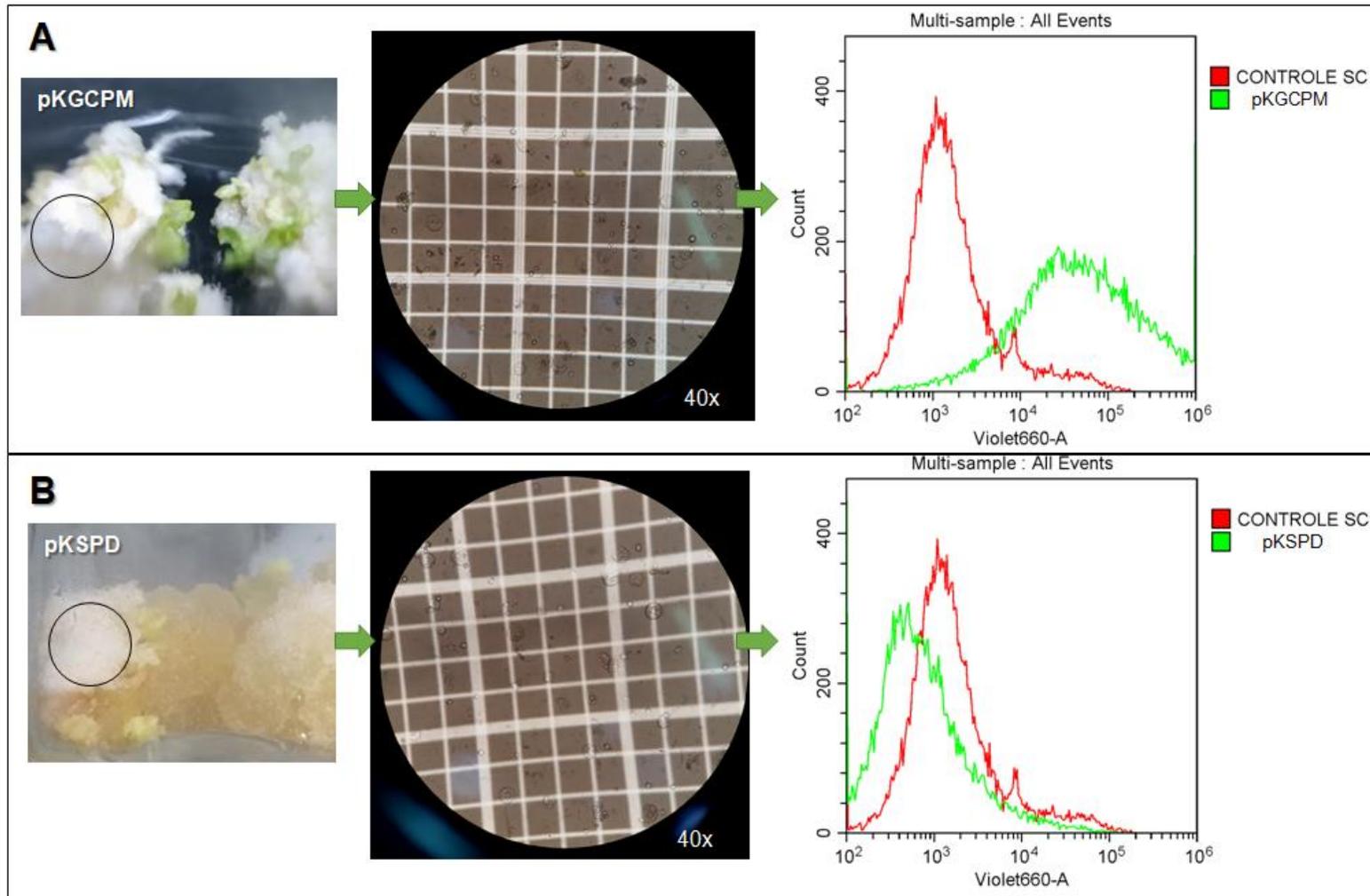


Figura 17: Confirmação da interrupção na biossíntese de clorofila utilizando citometria de fluxo. O Controle SC, são protoplastos tratados com acetona para remoção da clorofila. A) O pKGCPM são protoplastos isolados de embriões transformados com *AtpKGCPM*. B) O pKSPD são protoplastos isolados de embriões transformados com *AtpKSPD*. O deslocamento do pico verde para a direita ou esquerda significa maior ou menor autofluorescência da clorofila.

#### 4.8 ANÁLISES DE MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA REVELA AUMENTO NA DEPOSIÇÃO DE CALOSE EM CÉLULAS DIFERENCIADAS TRANSFORMADAS COM O PLASMÍDEO *AtpKSBG*.

As células transformadas com *AtpKSBG* apresentaram maior deposição de calose na parede celular se comparada ao controle *AtpKGCPM*, evidenciando uma coloração azul intensa. A deposição de calose pode ser observada de duas formas: como grânulos isolados na parede celular; ou nas extremidades da célula, principalmente quando a mesma está em processo de divisão.

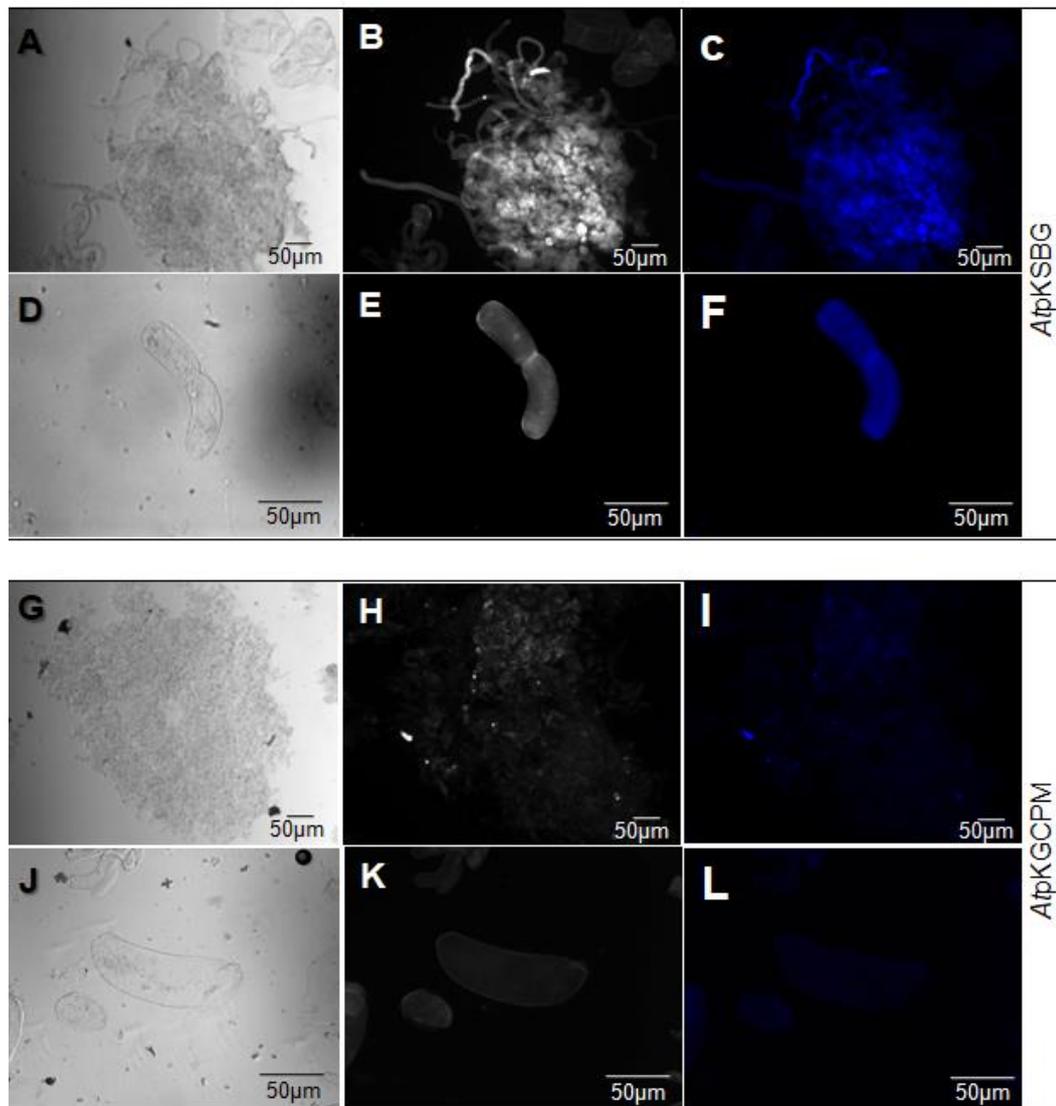


Figura 18: Ensaio com azul de anilina em células transformadas com *AtpKSBG* (A-F) e *AtpKGCPM* (G-L) para verificar a deposição de calose sob luz UV. De A-C e G-I são aglomerados celulares. De D-F e J-L são células livres. A, D, G e J fotos luz branca. Barra 50 μm.

O resultado observado indica que houve a mutação do gene da  $\beta$ -1,3-glucanase, o que ocasionou maior aumento na deposição de calose. Vale ressaltar que a produção de calose e  $\beta$ -1,3-glucanase é potencializada quando a célula está sob ataque de patógenos fúngicos, virais ou bacterianos. Isso leva a crer que a diferença significativa nos padrões de fluorescência do controle para o tratamento seja por conta também do estresse causado pela *A. tumefaciens*. Como no controle o gene continua produzindo  $\beta$ -1,3-glucanase estas acabam degradando a calose resultando numa menor intensidade de coloração azul (Figura 18).

#### **4.9 CULTURAS CELULARES TRANSFORMADAS POR CRISPR/Cas9 SÃO CAPAZES DE SE REGENERAR EM PLANTAS**

Após o processo de transformação por *A. tumefaciens* é necessário lavagens e repicagens das células com meios de cultura contendo antibióticos, este é um processo crucial e delicado na cultura de tecidos, pois as bactérias podem multiplicar demais de modo que as células vegetais não se recuperem, ou pode haver contaminação por fungos, inviabilizando a cultura. Testamos diversos protocolos, estabelecidos previamente, até conseguir um padrão de regeneração de células transformadas.

As células transformadas selecionadas por resistência ao antibiótico canamicina, foram repicadas para meios de cultura específicos, de modo que formassem embriões, caule, folhas e raízes, conforme descrito na metodologia e resultados apresentados. O processo não é linear, pois isso, os tecidos mais desenvolvidos foram repicados para novo meio. A adição de carvão ativado no final do processo de regeneração foi fundamental para a adsorção do 2,4-D, pois este induz a formação de calos, o que é desfavorável nesta etapa.

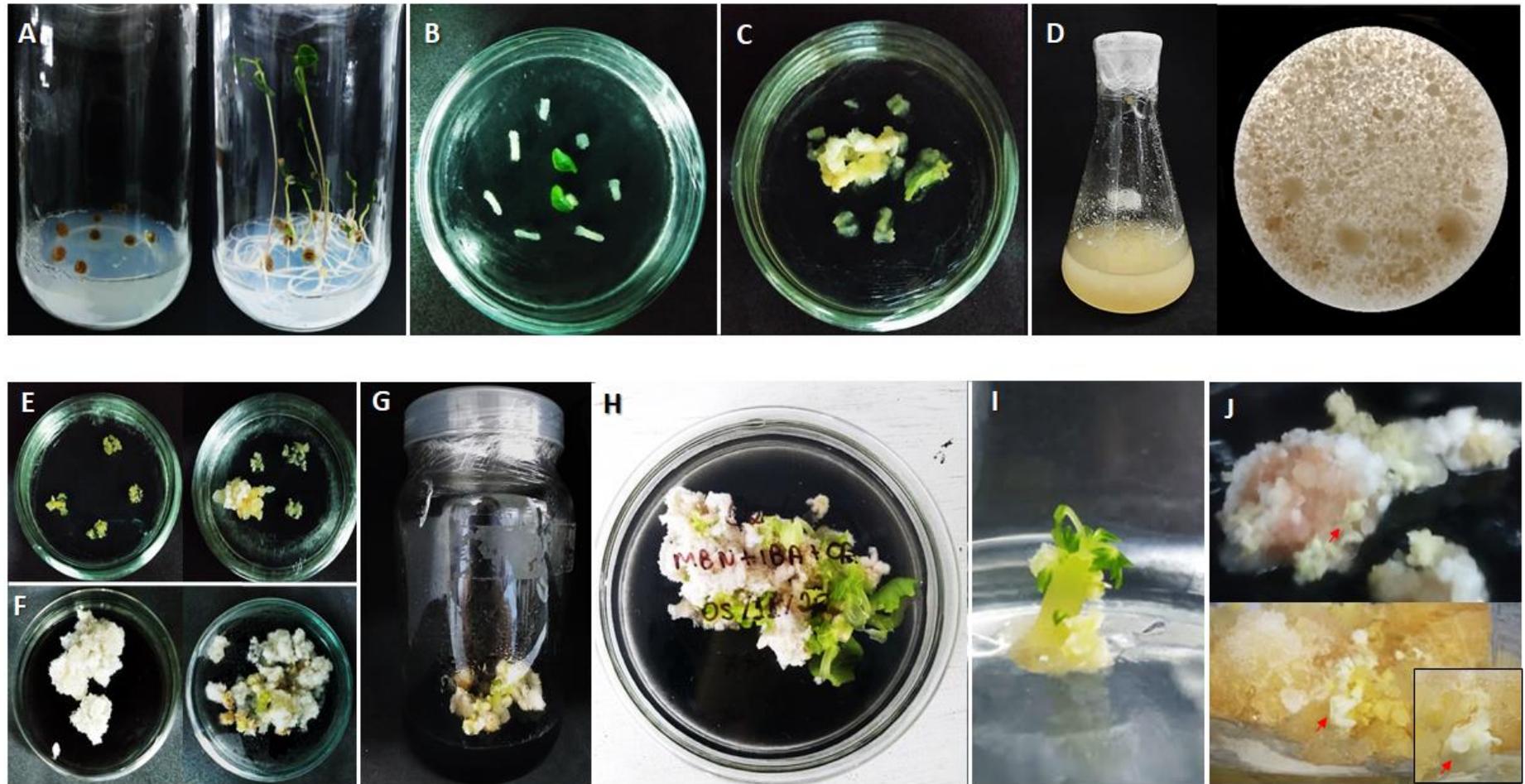


Figura 19: Estágios de desenvolvimento de cultura de tecidos de mamoeiro. A) Germinação e desenvolvimento de plântulas em meio ágar-água. B) hipocótilos e folhas excisados de plântulas em meio CIM1. C) Calogênese em meio CIM1. D) Cultura de células em suspensão em meio LCIM. E) Seleção de células transformadas em meio CIM3. F) Meio de maturação CIM4. G e H) Meio de regeneração de brotos. I) Regeneração de plântula a partir de células transformadas com *AtpKSBG*. J) Embriões e folhas albinas (setas vermelhas) regenerados a partir de células transformadas com *AtpKSPD*.

O processo de aclimação e uma possível transferência das plântulas para a casa de vegetação não foi possível por conta das dificuldades impostas em se trabalhar com cultura de tecidos de mamoeiro após transformação, principalmente com relação à geração de embriões e tecidos diferenciados. A partir do momento em que plantas transformadas com *A $\phi$ KSBG* forem inteiramente regeneradas, será possível a realização de ensaios que testem a resistência das mesmas a estresses causados por fungos, bactérias e vírus.

Os resultados apresentados validam a eficácia da edição gênica por CRISPR/Cas9 para o melhoramento vegetal. A transformação estável para avaliar as construções CRISPR/Cas9 demandam muito tempo e dinheiro. Diante disso, a transformação transiente tem se tornado a melhor estratégia para avaliar de maneira rápida a eficiência do sistema CRISPR (LIN et al., 2017).

Em nosso trabalho, após confirmar a construção do vetor CRISPR/Cas9 *pkSPD* e transformar *A. tumefaciens* (*A $\phi$ KSPD*) agroinfiltramos folhas de mamoeiro, como resultado, as folhas apresentaram despigmentação (clorose) seguida de necrose indicando o silenciamento do gene da fitoeno desaturase. A partir desse resultado, buscamos realizar a transformação estável de mamoeiro, para isso, transformamos células em suspensão com modificação de métodos anteriores (CARLOS-HILARIO; CHRISTOPHER, 2015). As células transformadas foram regeneradas em embriões albinos. Isolamos os protoplastos desses embriões e atestamos através da citometria de fluxo que a biossíntese de clorofila foi interrompida. Nossos resultados para o silenciamento da fitoeno desaturase corroboram com os de Wolabu e colaboradores (2020) que também utilizaram o sistema CRISPR/Ca9 para o silenciamento do gene PDS de *Arabidopsis* e *Medicago truncatula*. Vale ressaltar que assim como em nosso trabalho, a transformação utilizada por eles foi mediada por *A. tumefaciens*. Li e colaboradores (2018) também utilizaram o sistema CRISPR/Cas9 e obtiveram sucesso no silenciamento do gene PDS de protoplastos isolados de diversas culturas, incluindo painço (*Setaria itálica*), milho (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*), brócolis (*Brassica oleracea*), colza (*B. napus*), bambu (*Bambusa oldhamii*) e *Arabidopsis*.

Os nossos resultados de silenciamento do gene da fitoeno desaturase serviu como repórter de que o sistema CRISPR/Cas9 é aplicável e funcional em mamoeiro.

Partindo deste princípio, construímos o vetor CRISPR/Cas9 pKSBG que tem como alvo o gene da  $\beta$ -1,3-glucanase. Esse gene foi escolhido como alvo devido à ação da  $\beta$ -1,3-glucanase sobre a calose. Estudos anteriores realizados pelo nosso grupo, mostram que o mamoeiro, quando diagnosticado com o complexo PMeV na pré-floração, possui regulação positiva de genes que codificam para síntese de calose e proteínas de defesa e não apresentam sintomas visíveis da doença. No entanto, na pós-floração, quando as plantas de mamoeiro estão sintomáticas para a meleira, genes envolvidos na estruturação da parede celular como as glucanases também foram regulados positivamente (MADROÑERO et al. 2018). Em contrapartida, a análise das plantas sintomáticas revelou uma elevada presença de miRNAs que, de acordo com a literatura, estão relacionados à repressão pós-transcricional de genes que codifica para proteínas de defesa PR, nas quais incluem as  $\beta$ -1,3-glucanases (ABREU et al., 2014). Essa análise nos levou a presumir que a repressão destes transcritos é um mecanismo de defesa para reprimir a síntese de  $\beta$ -1,3-glucanases, conseqüentemente uma maior deposição de calose nos plasmodesmos, caracterizando uma tentativa da planta dificultar a translocação viral por estes canais.

Após a confirmação da construção do vetor CRISPR/Cas9 pKSBG, transfectamos protoplastos isolados de calos de mamoeiro. No grupo controle, a transfecção foi realizada com o vetor pKGQ1 que expressa a proteína GFP, usada como repórter para o processo de transfecção. Obtivemos protoplastos expressando a proteína. Este resultado nos levou a crer que os protoplastos transfectados com pKSBG também tiveram o constructo CRISPR/Cas9 pKSBG expresso. A extração de ácidos nucleicos, o resultado do PCR e digestão enzimática confirmaram nossa suposição de que o constructo é funcional. A partir de então, agroinfiltramos *A*pKSBG em células de mamoeiro em suspensão, partindo do pressuposto que as células transformadas apresentariam uma maior deposição de calose na parede. Esse resultado pôde ser observado uma semana após o processo de transformação através da coloração da calose com azul de anilina (HERBURGER; HOLZINGER, 2016). As células tratadas emitiram fluorescência superior às células controle.

As células transformadas com as bactérias *A*pKGCPM, *A*pKSPD e *A*pKSBG foram selecionadas por resistência à canamicina e seguiram para o processo de

regeneração de acordo com o protocolo Carlos-Hilario e Chistopher (2015) com algumas modificações. Vale ressaltar que células submetidas ao processo de transformação passam por vários gargalos até a regeneração. Dentre os fatores limitantes estão a própria agrobacterium que pode multiplicar demais e danificar a cultura, os antibióticos que dificultam a divisão e crescimento celular, as características das células/calos em ser responsivos ou não aos meios de cultura e os riscos de contaminação inerentes ao processo. Apesar de todos esses entraves, conseguimos regenerar tecidos foliares, caulinares e raízes de células transformadas.

Salientamos que o silenciamento de GLU I (classe I de  $\beta$ -1,3-glucanases) em mutante de tabaco transgênico gerado por transformação antisense, Havana 425, resultou em redução dos sintomas da doença causadas pelo vírus do mosaico do tabaco (TMV) (BEFFA et al., 1996). Para além disso, o mesmo mutante apresentou aumento na deposição de calose e redução do SEL de modo que o tráfego via PD fosse retardado dificultando a disseminação de outros vírus e moléculas virais, a saber; o potexvirus (vírus da batata recombinante X expressando GFP) e a proteína de movimento do cucumovirus (vírus do mosaico do pepino - CMV) (IGLESIAS; MEIS, 2001). De acordo com Bucher e colaboradores (2001), quando a GLU I é expressa localmente, as plantas de tabaco tornaram-se mais susceptíveis à infecção pelo TMV. Além disso, os autores observaram aumento dos sintomas. Segundo eles, a expressão local de GLU I favoreceu o movimento do vírus de célula para célula, levando à ocorrência de efeitos indiretos na resposta de hipersensibilidade ou por uma combinação de ambos os mecanismos.

Acreditamos que a expressão do gene da  $\beta$ -1,3-glucanases em mamoeiros esteja favorecendo o movimento viral via plasmodesmo. A elucidação do mecanismo de infecção e disseminação do complexo PMeV será crucial para traçarmos as novas estratégias de resistência à infecção, se provado que os PDs auxiliam no processo, este trabalho será de enorme relevância para novas estratégias de resistência à doença, uma vez que confirmamos que, o silenciado do gene da  $\beta$ -1,3-glucanase por CRISPR/Cas9 resultou no aumento de calose nas células em suspensão de mamoeiro. Por isso, presumimos que em plantas regeneradas a partir das células transformadas haverá diminuição do SEL e menor susceptibilidade do mamoeiro a

infecções virais, abrindo uma janela para a resistência às doenças mosaico e da meleira. Os resultados descritos neste trabalho são promissores e esperamos que possam subsidiar projetos futuros, especialmente a regeneração de plantas transformadas e a testagem das mesmas à susceptibilidade ao complexo PMeV. Propomos que novos genes alvos relacionados à estruturação da parede celular sejam testados com CRISPR/Cas9 visando o silenciamento ou superexpressão gênicas, inclusive de genes de resposta de resistência adquirida sistêmica (SAR) envolvendo moléculas de sinalização ácido jasmônico, ácido salicílico e etileno (MADROÑERO et al., 2018), além de outras endo- $\beta$ -glucanases. Salientamos que a epidemiologia do complexo PMeV em mamoeiros têm sido estudada, acreditamos que esses resultados serão fundamentais para traçar novas estratégias para desenvolvimentos de plantas cisgênicas com resistência à doença da meleira baseadas em CRISPR.

## 5 CONCLUSÕES

O uso da tecnologia CRISPR/Cas9 foi aplicada com sucesso em folhas, células e protoplastos de mamoeiro, resultado evidenciado pela expressão do constructo CRISPR/Cas9 e RNAs guia; mutação do gene da fitoeno desaturase quando utilizamos o vetor pKSPD, bem como maior deposição de calose na parede celular de células em suspensão quando utilizamos o vetor pKSBG. Os resultados apresentados com relação ao silenciamento do gene da  $\beta$ -1,3-glucanase são promissores para o melhoramento genético do mamoeiro. Faz-se necessário a regeneração de maior número de plântulas transformadas contendo raízes e brotos, aclimação e estabelecimento das mesmas no solo e às condições de casa de vegetação. Os fenótipos regenerados devem ser desafiados com o complexo do papaya meleira virus para análise do desenvolvimento dos sintomas de meleira. Ressaltamos que até o dado momento não existe um protocolo estabelecido para edição de *C. papaya* pela tecnologia CRISPR, deste modo, nosso trabalho é pioneiro na aplicação da técnica. Ressaltamos também o pioneirismo no silenciamento gênico da  $\beta$ -1,3-glucanase e da fitoeno desaturase em mamoeiro, sendo o segundo um promissor marcador visual de funcionamento da técnica para *C. papaya*.

## REFERÊNCIAS

ABREU, P. M. V.; ANTUNES, T. F. S.; MAGAÑA-ÁLVAREZ, A.; PÉREZ-BRITO, D.; TAPIA-TUSSELL, R.; VENTURA, J. A.; FERNANDES, A. A. R.; FERNANDES, P. M. B. A current overview of the Papaya meleira virus, an unusual plant virus. **Viruses**, v.7, p. 1853-1870, 2015.

ABREU, P.M.V, GASPAR, C.G, VENTURA, J. A, FERREIRA, P.C.G, et al. *Carica papaya* Micro RNAs Are Responsive to Papaya meleira virus Infection. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, 2014.

ALLISON, A. V.; SHALLA, T. A. The ultrastructure of local lesions induced by potato virus X: a sequence of cytological events in the course of infection. **Phytopath.**, v. 64, p. 784-793, 1974.

BARRANGOU, R.; FREMAUX, C.; DEVEAU, H.; RICHARDS, M.; BOYAVAL, P. et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. **Science**. v. 315, p. 1709–1712, 2007.

BEFFA, R.S.; HOFER, R. M.; THOMAS, M.; MEINS, F. JR. Decreased susceptibility to virus disease of  $\beta$ -1,3-glucanase-deficient plants generated by antisense transformation. **Plant Cell**. v. 8, p. 1001-1011, 1996.

BENITEZ-ALFONSO, Y. Symplastic intercellular transport from a developmental perspective. **Journal of Experimental Botany**. v. 65, n. 7, p. 1857-1863, 2014.

BOLOTIN, A.; QUINQUIS, B.; SOROKIN, A.; EHRLICH, S. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. **Microbiology**. v. 151, p. 2551–2561, 2005.

BUCHER, G. L.; TARINA, C.; HEINLEIN, M.; SERIO, F. D.; MEINS, F.; IGLESIAS, V. A. Local expression of enzymatically active class I  $\beta$ -1, 3-glucanase enhances symptoms of TMV infection in tobacco. **The plant journal**, v. 28:3, p. 361-369, 2001.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Culturas de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa SPI: **Embrapa CNPH**, v. 1, p. 21-43, 1998.

CARLOS-HILARIO, L. R.; CHISTOPHER, D. A. Improved Agrobacterium-mediated transformation of *Carica papaya* cultivar 'Kapoho' from embryogenic cell suspension cultures. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**. v. 51, p. 580-587, 2015.

CHILCOAT, D.; LIU, Z. B.; SANDER, J. Use of CRISPR/Cas9 for crop improvement in maize and soybean. **Prog. Mol. Biol. Transl. Sci**, v. 149, p. 27–46, 2017.

EL-KATATNY, M. H.; GUDELJ, M.; ROBRA, K. H.; ELNAGHY, M. A. GÜBITZ, G. M. Characterization of a chitinase and an endo- $\beta$ -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. **ApplMicrobiolBiotecnol**. v. 56, p.137–43, 2001.

FAOSTAT - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Crops – Area harvested, yield and production quantity of papaya in Brazil**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em: 21 set. 2020.

FERNANDES, P. M. B., FERNANDES, A. A. R., VENTURA, J. A., ANTUNES, T. F. S., QUADROS, O. F., MADROÑERO, J., CARMINATI, L. S., MAURASTONI, M. Um novo complexo viral: o caso da meleira do mamoeiro. **VII Simpósio do Papaya Brasileiro**. Produção e Sustentabilidade, Vitória, Espírito Santo, Brazil, 2018.

FERNANDES, P.M.B. Biotecnologia branca para um mundo verde. Curitiba: **Editora CRV**. p. 118, 2018.

HERBURGER, K.; HOLZINGER, A. Aniline blue and Calcofluor white staining of callose and cellulose in the streptophyte green algae *Zygnema* and *Klebsormidium*. **Bio. Protoc**. v. 6 (20), 2016.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Banco de dados agregados**. Disponível em:<<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/5457>>. Acesso em: 14 set. 2021.

IDAF - INSTITUTO DE DEFESA AGROPECUÁRIA E FLORESTAL DO ESPÍRITO SANTO. **Instrução Normativa nº 002, de 24 de abril de 2019**. Disponível em: <<https://idaf.es.gov.br/legislacao-idaf>>. Acesso em: 01 mar. 2021.

IGLESIAS, V. A.; MEINS, F. Movement of plant viruses is delayed in a  $\beta$ -1,3-glucanase-deficient mutant showing a reduced plasmodesmatal size exclusion limit and enhanced callose deposition. **Plant J.**, v. 21, n. 2, p. 157-166, 2001.

ISHINO, Y.; KRUPOVIC, M.; FORTERRE, P. History of CRISPR-Cas from Encounter with a Mysterious Repeated Sequence to Genome Editing Technology. **Journal of Bacteriology**. v. 200, 2018.

JAGANATHAN, D.; RAMASAMY, K.; JAYABALAN, S.; VENKATARAMAN, G. CRISPR for Crop Improvement: An Update Review. **Frontiers In Plant Science**. v. 9, 2018.

JINEK, M.; CHYLINSKI, K.; FONFARA, I.; HAUER, M.; DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. **Science**, v. 337, pp. 816-821, 2012.

KITAJIMA, E. W.; RODRIGUES, C.H.; SILVEIRA, J. S.; ALVES, F.J.L.; VENTURA, J.A.; ARAGÃO, F.J.L.; OLIVEIRA, C.R.B. Association of isometric virus-like particles, restricted to lacticifers, with “meleira” (sticky disease) of papaya (*Carica papaya*). **Fitopatologia Brasileira**, v. 18, p. 118-122, 1993.

LEVY, A.; ERLANGER, M.; ROSENTHAL, M.; GUENOUNE-GELBART, D.; EPEL, B. L. A plasmodesmata associated  $\beta$ -1,3-glucanase in Arabidopsis. **Plant J.**, v. 49, n. 4, p. 669-682, 2001.

LEVY, A.; GUENOUNE-GELBART, D.; EPEL, B. L.  $\beta$ -1,3-Glucanases. **Plant Signal Behav.** v. 2, n. 5, p. 404–407, 2007.

LIN C.-S., HSU C.-T., YANG L.-H., LEE L.-Y., FU J.-Y., CHENG Q.-W., et al. Application of protoplast technology to CRISPR/Cas9 mutagenesis: from single-cell mutation detection to mutant plant regeneration. **Plant Biotechnol. J.** v. 16, 2017.

MADROÑERO, J.; RODRIGUES, S. P.; ANTUNES, T. F. S.; ABREU, P. M. V.; VENTURA, J. A.; FERNANDES, A. A. R.; FERNANDES, P. M. B. Transcriptome analysis provides insights into the delayed sticky disease symptoms in *Carica papaya*. **Plant Cell Rep.** v. 37, p. 967-980, 2018.

MAKAROVA, K.; ARAVIND, L.; GRISHIN, N.; ROGOZIN, I.; KOONIN, E. A DNA repair system specific for thermophilic archaea and bacteria predicted by genomic context analysis. **Nucleic Acids Res.** v. 30, p. 482–496, 2002.

MAKAROVA, K.; GRISHIN, N. SHABALINA, S.; WOLF, Y.; KOONIN, E. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. **Biol. Direct.** v. 1, p. 7, 2006.

MARTINS, D. S.; VENTURA, J. A. Vetores de doenças do mamoeiro: monitoramento e controle. In: MARTINS, D. S.; COSTA, A. N.; COSTA, A. F. S. (Eds.). *Papaya Brasil: manejo, qualidade e mercado do mamão*. Vitória: Incaper, 2007. p. 113-128.

MERCADO, J. A.; BARCELÓ, M.; PLIEGO, C., REY, M.; CABALLERO, J. L.; MUÑOZ-BLANCO, J.; ROSA-ROSA, D.; LÉPES-HERRERA, C.; DOS SANTOS, B.; ROMERO-MUÑOZ, F.; PLIEGO-ALFARO, F. Expression Of The B-1,3-Glucanase Gene From *Trichoderma Harzianum* In Strawberry Increases Tolerance To Crown Rot Diseases But Interferes With Plant Growth. **Transgenic Research.** v. 24. p. 979-989, 2015.

MOJICA, F.; DIEZ-VILLASENOR, C.; GARCIA-MARTINEZ, J.; SORIA, E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. **J. Mol. Evol.** v. 60, p. 174–182, 2005.

MORANGE, M. What history tells us XXXVII. CRISPR-Cas: The discovery of an immune system in prokaryotes. **Journal of Biosciences.** v. 40, p. 221-223, 2015.

NAKAGAWA, J., TAKAYAMA, Y., AND SUZUKAMA, Y. **Exudação de látex pelo mamoeiro**. Estudo de ocorrência em Teixeira de Freitas, BA. Pages 555-559 in: Congresso Brasileiro de Fruticultura, 9, Campinas. Anais, Campinas, SP, Brazil, 1987.

NANJAREDDY, K.; ARTHIKALA, MK.; BLANCO, L.; ARELLANO, E. S.; LARA, M. Protoplast isolation, transient transformation of leaf mesophyll protoplasts and

improved *Agrobacterium*-mediated leaf disc infiltration of *Phaseolus vulgaris*: tools for rapid gene expression analysis. **BMC Biotechnology**. v. 16;53, 20116.

OTERO, S.; HELARIUTTA, Y.; BENITEZ-ALFONSO, Y. Symplastic communication in organ formation and tissue patterning. **Current Opinion in Plant Biology**. v. 29, p. 21-28, 2016.

POURCEL, C.; SALVIGNOL, G.; VERGNAUD, G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. **Microbiology**. v. 151, p. 653–663, 2005.

QUADROS, O.; FERREIRA, M. A. M.; VENTURA, J. A. FERNANDES, A. A. R.; FERNANDES, P. M. B. **Clonagem do gene da proteína capsidial do vírus do mosaico do mamoeiro em vetores de superexpressão e de silenciamento**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA 49, Maceió, AL. Resumo. 2016.

RICROCH, A.; CLAIRAND, P.; HARWOOD, W. Use of CRISPR systems in plant genome editing: toward new opportunities in agriculture. *Emerg. Top. Life Sci.* v. 1, p. 169–182, 2017.

RODRIGUES, S.; DA CUNHA, M.; VENTURA, J. A.; FERNANDES, P. M. B. Effects of the papaya meleira virus on papaya latex structure and composition. **Plant Cell Reports**, v. 28, p. 861-871, 2009.

SÁ ANTUNES, T. F. S.; AMARAL, R. J. V.; VENTURA, J. A.; GODINHO, M. T.; AMARAL, J. G.; SOUZA, F. O.; ZERBINI, P. A.; ZERBINI, F. M.; FERNANDE, P. M. B. The dsRNA Virus Papaya Meleira Virus and an ssRNA Virus Are Associated with Papaya Sticky Disease. **Plosone**, v. 11, p. 1-14, 2016.

SÁ ANTUNES, T. F.; MAURASTONI, M.; MADROÑERO, J.; FUENTES, G.; SANTAMARÍA, J. M.; VENTURA, J. A.; ABREU, E. F.; FERNANDES, A. R.; FERNANDES, P. M. B. Battle of Three: The Curious Case of Papaya Sticky Disease. **Plant Disease**, v. 104, n. 11, p. 2754-2763, 2020.

STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; TOLEDO, M. V.; PORTZ, R. L.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; PASCHOLATI, S. F. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**. v. 10, n. 1, 2011.

THIELE, K.; WANNER, G.; KINDZIERSKI, V.; JURGENS, G.; MAYER, U.; PACHL, F.; ASSAAD, FF. The timely deposition of callose is essential for cytokinesis in *Arabidopsis*. **Plant J**, v. 58, p. 13-26, 2009.

VARUN, P.; RANADE, S. A.; SAXENA, S. A molecular insight into papaya leaf curl—a severe viral disease. **Protoplasma**. v. 254, p. 2055-2070, 2017.

VENTURA, J. A.; COSTA, H.; TATAGIBA, J. Doenças do mamoeiro. **Revista informe agropecuário**, p. 70-81, 2016.

VENTURA, J. A.; MARTINS, D; FERREGUETTI, G. **Eficiência do roguing como estratégia de manejo da meleira e mosaico do mamoeiro**. In: SIMPÓSIO DO PAPAYA BRASILEIRO, 6, 2015, Vitória, ES. Tecnologia de produção e mercado para o mamão brasileiro: Anais. Vitória, ES: Incaper, 2015.

VENTURA, J. A.; COSTA, H.; TATAGIBA, J. ANDRADE, J. S.; MARTINS, D. S. Meleira do mamoeiro: Etiologia, sintomas e epidemiologia. In **Papaya Brasil: Qualidade do Mamão Para o Mercado Interno**; Martins, D.S., Ed.; Incaper: Vitória, Brazil,; pp. 267–276, 2003.

WOLABU, T. W.; PARK, J-J.; CHEN, M.; CONG, L.; GE, Y.; JIANG, Q.; DEBNATH, S.; LI, G.; WEN, J.; WANG, Z. Improving the genome editing efficiency of CRISPR/Cas9 in *Arabidopsis* and *Medicago truncatula*. **Planta**. v, 252:15, 2020.

WU, CT.; BRADFORD, K. J. Class I Chitinase and  $\beta$ -1,3-Glucanase Are Differentially Regulated by Wounding, Methyl Jasmonate, Ethylene, and Gibberellin in Tomato Seeds and Leaves. **Plant Physiology**. v. 133, p. 263-273, 2003.

YAN, P.; GAO, X.Z.; SHEN, W.T.; ZHOU, P. Cloning and expression analysis of phytoene desaturase and  $\zeta$ -carotene desaturase genes in *Carica papaya*. **Molecular Biology Reports**, v. 38, p. 785–791, 2011.

ZAVALIEV, R.; LEVY, A.; GERA, A.; EPEL, B. L. Subcellular Dynamics And Role Of *Arabidopsis* Beta-1,3-Glucanases In Cell-To-Cell Movement Of Tobamoviruses. **Molecular Plant-Microbe Interactions Journal**. v. 26, p. 1016-1030, 2013.

ZAVALIEV, R.; UEKI, S.; EPEL, B. L. Biology of callose ( $\beta$ -1,3-glucan) turnover at plasmodesmata. **Protoplasma**. v. 248, p. 117-130, 2011.

ZHANG, J.; SHEN, W.; YAN, P.; LI, X.; ZHOU, P. Factors that influence the yield and viability of protoplasts from *Carica papaya* L. **African Journal of Biotechnology**. v. 10, n. 26, p. 5137-5142, 2011.

ZHU, J. J.; SONG, N.; SUN, S. L.; YANG, W. L.; ZHAO, H. M.; SONG, W. B.; LAI, J. S. Efficiency and inheritance of targeted mutagenesis in maize using CRISPR-Cas9. **J. Genet. Genomics**. v. 43, p. 25 – 36, 2016.