

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

VALIDAÇÃO DE PRIMERS PARA CLONAGEM DE *PHANTASTICA* E SILENCIAMENTO GÊNICO EM *Nicotiana benthamiana*

Rafael Lara Rezende Cabral¹, Marcella Augusta Falci Demarque¹, Vinícius Sartori Fioresi¹, Fernanda Prieto Bruckner², Fernanda Pereira da Silva¹, André da Silva Xavier¹.

¹Universidade Federal do Espírito Santo/Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. Alto Universitário, S/N, Guararema, 29500-000 - Alegre – ES, Brasil, rafaelaraaaa@gmail.com, marcela.falcci@gmail.com, vinicius.fioresi@hotmail.com, fernanda.bio2010@hotmail.com.

²Universidade do Estado de Minas Gerais/Unidade Ibirité/Departamento de Ciências Biológicas, Av. São Paulo, 3996, Vila Rosário - 32415-250, Ibirité, MG, Brasil. fernanda.bruckner@uemg.br.

Resumo

Recentes descobertas de ferramentas têm viabilizado uma investigação mais profunda dos fundamentos genéticos, moleculares e bioquímicos das plantas em resposta a estresses bióticos e abióticos. Este trabalho teve como objetivo desenvolver e validar oligonucleotídeos para o gene *phantastica* em *Nicotiana benthamiana*, visando a aplicação do método de silenciamento pós-transcricional induzido por vírus (VISG) por meio de vetores TRV (*Tobacco rattle virus*). Em seguida, a eficiência dos primers foram testadas em plantas de tabaco. No avanço dessa pesquisa, realizou-se a busca em bancos de sequências genéticas, análise *in silico*, testes de bancada como PCR, eletroforese, clonagem, clivagem, agroinfiltração e sequenciamento. Os resultados para o silenciamento do gene-alvo se demonstraram positivos e corroboram com outros autores. Conclui-se que o par de oligonucleotídeos desenvolvido para *phantastica* e sua aplicação no método de VIGS em plantas de *N. benthamiana* foi eficiente *in vitro*, sendo assim, sugerido para estudos experimentais de genômica funcional e engenharia genética.

Palavras-chave: PCR. *phantastica*. Oligonucleotídeos. VIGS. Tabaco.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas: Genética.

Introdução

Em função dos últimos avanços na biologia molecular, novas ferramentas têm sido descobertas possibilitando novos estudos em plantas. Liu et al. (2002) desenvolveram um sistema de silenciamento pós transcricional induzido por vírus (VIGS) baseado na incorporação estável de DNA plasmidial de bactérias *Agrobacterium tumefaciens* e no vírus de genoma bipartido *Tobacco rattle virus* (TRV), dividido em RNA 1, responsáveis por codificar proteínas replicase, proteínas de movimento, RNAs subgenômicos e RNA 2, codificantes de proteínas de revestimento e proteínas não estruturais. Esse sistema é valioso nas áreas da engenharia genética e genômica funcional, pois permite o silenciamento específico de genes-alvo seguido da análise de suas funções em um curto período de tempo.

Waites e Hudson (1995) identificaram pela primeira vez a função de *phantastica* em *Antirrhinum majus* (Plantaginaceae), relatando que plantas mutantes (silenciadas) possuíam fenótipo de má-formação dorso-ventral em folhas e flores. *Phantastica* é essencial para a formação da simetria adaxial-abaxial, regulando a expressão de outros genes envolvidos no amadurecimento desses órgãos (BUSTAMANTE et al., 2016). Huang et al. (2013) identificaram um novo órtologo de *phantastica* em plantas de *Nicotiana benthamiana* aplicando o método de VIGS.

O gene *NbPHAN* e seus homólogos estão presente em mais de 50 espécies e 22 famílias de plantas diferentes, incluindo solanáceas (KAZEMIAN et al., 2020). Localizado no núcleo celular, este gene de éxon único pertence à família de fatores de transcrição de domínio MYB altamente conservados com duas repetições, classificados como MYB tipo R2R3 (DUBOS et al., 2010). Essa subfamília MYB (R2R3) participa do metabolismo primário e secundário, crescimento e da resposta aos estresses bióticos e abióticos em plantas (STRACKE et al. 2001; MATUS et al., 2008).

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Experimentos utilizando VIGS em plantas-modelo de *Nicotiana benthamiana* se destacam por sua efetividade e fácil manejo. Embora *N. benthamiana* não seja uma planta cultivada de interesse comercial, diversos estudos usufruem do seu acesso na aplicação desse método, contribuindo na obtenção de informações cruciais para o desenvolvimento de culturas resistentes e tolerantes (VENTIMILLA et al., 2021; HELDERMAN et al., 2022).

Diante do exposto, objetivou-se com esse estudo elaborar e validar um par de *primers* específico e eficiente para clonar um fragmento do gene *phantastica* de *N. Benthamiana* no vetor *Tobacco rattle virus* (TRV) (LIU et al., 2002) para o silenciamento específico do gene pelo método de VIGS.

Metodologia

A sequência gênica de *PHAN* (Código no GenBank FR878011) de *N. benthamiana* foi obtida com auxílio da ferramenta BLASTn (NCBI) e a localização de regiões candidatas com 400 pares de bases consideradas ideais para o silenciamento por VIGS foi realizada com o programa SGN VIGS Tool (FERNANDES-POZO et al., 2015), que prediz o nível de especificidade do silenciamento, eliminando regiões com potencial de silenciamento de genes não-alvo. Os *primers* foram desenhados no software *Primer's Tools* da plataforma online NCBI e *OligoAnalyzer Tool – Integrated DNA Technologies* (IDT) de acordo com os parâmetros descritos por Huang et al. (2013). Para etapa de clonagem, introduzimos nos *primers* os sítios das enzimas de restrição *BamHI* e *XhoI* selecionados por meio da ferramenta online WebCutter 2.0, acrescentando nucleotídeos (nt) âncora de 3nt e 4nt, respectivamente.

Para obtenção do cDNA, foram coletadas amostras de tecido vegetal de folhas de *Nicotiana benthamiana*. O RNA total foi extraído com o kit SV Total RNA Isolation System e obteve-se o cDNA com uso do kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription, de acordo com as respectivas recomendações dos fabricantes (Promega® e Invitrogen®). Em reações de PCR para amplificação do gene-alvo, utilizou-se o kit HOT FIREPol Master Mix, de acordo com as recomendações do fabricante (Solis Biodyne®). Os oligonucleotídeos desenvolvidos foram validados quanto a amplificação aplicando gradiente de temperatura de anelamento (Ta) igual a 50–60 °C ± 2 °C. Os parâmetros da reação adaptados foram: desnaturação a 95 °C por 15 minutos; ciclo: desnaturação de 95 °C por 30 segundos, seguido de anelamento de 58 °C por 30 segundos e extensão 72 °C por 30 segundos, no total de 35 ciclos; extensão final 72 °C por dez minutos e 4°C, em termociclador TC-9639 (Loccus®).

Em seguida, o fragmento do gene *NbPHAN* foi clonado no vetor pGEM-Teasy com uso do kit pGEM-Teasy Easy Vectors Systems, seguindo as recomendações do fabricante (Promega®). Após a ligação, células competentes de *Escherichia coli* linhagem DH5α obtidas de acordo com Sambrook & Russell (2001) foram transformadas por choque térmico (CALVETE, et al. 2015), plaqueadas em meio de cultura Luria Bertani (LB) com antibiótico ampicilina [100 ug/mL] e solução seletora (X-GAL [5,33 mg/mL] + IPTG [0,66 mM] – espalhado por cima) e incubadas a 37 °C por 24 horas.

As colônias transformadas de *E. coli* com a cor branca foram selecionadas e repicadas em meio LB líquido com antibiótico ampicilina [100 ug/mL] e incubadas em agitador (180 rpm) durante a noite. Em seguida, efetuou-se a extração da construção pGEM-NbPHAN utilizando Mini kit de purificação de plasmídeo, de acordo com as recomendações do fabricante (Ludwig®).

Para inserção do fragmento de *NbPHAN* no vetor pTRV2, o fragmento de 367 pb foi recuperado do vetor pGEM-Teasy usando as enzimas de restrição *BamHI* e *XhoI* (clivagem dupla) de acordo com as recomendações do fabricante (Promega®). A ligação no vetor pTRV2 foi realizada com uso do kit Anza™ T4 DNA Ligase Master Mix (Invitrogen®), incubado a temperatura ambiente por 16 horas.

A construção pTRV2-NbPHAN foi então transformada em células competentes de *Agrobacterium tumefaciens*, estirpe C58C1, por choque térmico (SAMBROOK; RUSSEL, 2001), seguido do plaqueamento em meio de cultura YEP (Extrato de Levedura + Peptona) acrescido dos antibióticos canamicina [50 µg/mL] e rifampicina [25 µg/mL] e incubadas a 30°C em estufas por 48 horas. Após o crescimento, colônias transformadas foram repicadas em meio YEP líquido e incubadas em agitador a 180 rpm por 48 horas. A presença das construções nas bactérias transformadas também foi confirmada por PCR, clivagem com enzimas de restrição e sequenciamento.

O silenciamento gênico de *NbPHAN* por VIGS em plantas de tabaco com 5 semanas de idade foi realizado a partir da agroinfiltração de uma suspensão bacteriana de *A. tumefaciens* (C58C1) transformadas com o RNA1 (vetor pTRV1) e com o RNA 2 (vetor pTRV2-NbPHAN) do TRV, ressuspendidos em solução de infiltração (10 mM de MgCl₂, 100 mM de MES e 200 µM de

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

acetosiringona, pH 5,5), misturados na proporção de 1:1 (da mesma forma o controle fenotípico do gene de fotobranqueamento *PDS* – pTRV2-*PDS* e controle negativo com gene exógeno *GFP* – pTRV2-*GFP*) por infiltração foliar usando seringa sem agulha. O protocolo de inoculação foi realizado de acordo com Li (2011) e adaptado por Yu & Macho (2021). As plantas foram mantidas em temperatura de 22–24°C, 16h claro / 8h escuro e 65–70% de umidade relativa para crescimento e disseminação viral.

Após 7 semanas, a análise da expressão foi conduzida por qRT-PCR, em reações de 10 µL totais (2 µL – cDNA, 5 µL PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix – Applied Biosystems™ e 3 µL de *primer* [400 nM] iniciador 5'-CAGATCACCATCTCCATCTGTG-3' e reverso 5'-TTCAGGTCCTCTATCTGTCTGT-3' específico para o gene *NbPHAN*, utilizando o equipamento LightCycler® 96 (Roche). Para tanto, os parâmetros reação foram: incubação a 50°C por 2 minutos, 95°C por 2 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos seguidos de 60°C por 1 minuto. Ao final, foi realizado Melt-curve com 50–95°C incrementando 0,5°C for 10 segundos. Utilizou-se o gene *GAPDH* como referência (HUANG et al., 2013) e as análises de expressão diferencial foram realizadas de acordo com o cálculo do $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (PFAFFL, 2001).

Resultados

Neste trabalho foram utilizados dois pares de oligonucleotídeos para amplificação do gene *NbPHAN*, sub clonagem no vetor pGEM-Teasy e clonagem no vetor pTRV2. O primeiro par desenvolvido para *NbPHAN* para o método de VIGS (*NbPHANS*) foi desenvolvido por Hung et al. (2013) e o segundo par denominado *NbPHAN-VIGS* pelos autores. As regiões sublinhadas representam sítios de enzimas de restrição para posterior clonagem e os nucleotídeos âncora destacados em negrito. Os *primers* estão descritos de acordo com a tabela 1.

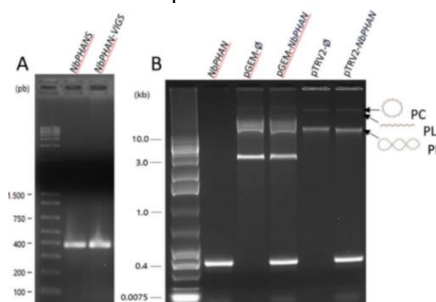
Tabela 1 – Descrição dos oligonucleotídeos para amplificação da região parcial do gene *phantastica* em plantas-modelo *N. benthamiana*.

Primers	Sequência	Região codificante		Tamanho (pb)	Amplicon (pb)	Tm (°C)
		Início	Fim			
NbPHANS	F: <u>TCTAGAACTACCTCAAACCAGGGAT</u>	152	171	19	345	56
	R: <u>GGATCCAGGAAGAAGAGTTTGTGG</u>	479	497	18	345	60
NbPHAN-VIGS	F: G TAGGATCCTGGCGATCTGAAGAGGATGC	19	39	20	367	65
	R: GTCGCTCGAGTGTGGTCGTATTTCCCTCGT	365	386	21	367	66

Fonte: Os autores.

As amplificações foram observadas para ambos os oligonucleotídeos (Figura 1 – A), entretanto, o amplicon *NbPHAN-VIGS* foi utilizado na subclonagem em pGEM-Teasy seguido de transformação em bactérias *E. coli* DH5α. A clonagem foi confirmada por PCR das construções de DNA plasmidial extraídas (Figura 1 – B).

Figura 1 – (A) Resultado da PCR com uso dos *primers* em gel de agarose 1,5% e (B) resultado da PCR usando como DNA molde os vetores extraídos de colônias de *E. coli* DH5α transformadas para construção pGEM-NbPHAN e pTRV2-NbPHAN. Plasmídeo circular (PC), Plasmídeo linear (PL) e Plasmídeo enovelado (PE) são representados

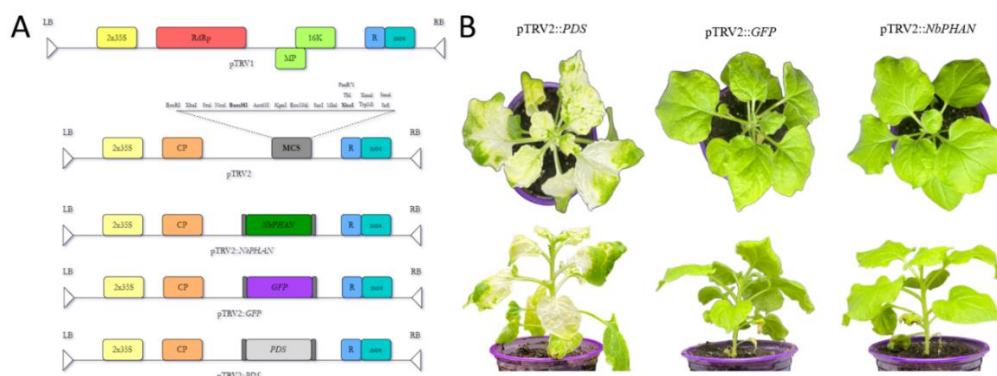


Fonte: Os autores.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Após a co-agroinfiltração de suspensões bacterianas de C58Cl contendo pTRV1 e os cassetes de silenciamento pTRV2 (Fig. 2 – A), as plantas foram avaliadas todos os dias a partir de uma semana pós-agroinfiltração. O mosaico da coloração de folhas causada pelo início do silenciamento do controle fenotípico *PDS* foi observado. A indução do silenciamento do gene *PDS* foi constatado duas semanas pós-agroinfiltração para todas as plantas silenciadas, e com isso, assumiu-se que todas as plantas também estavam efetivamente silenciadas para o gene *NbPHAN* (Fig. 2 – B).

Figura 2 – (A) Mapa das construções utilizadas e (B) representação da estabilidade fenotípica duas semanas pós agroinfiltração.

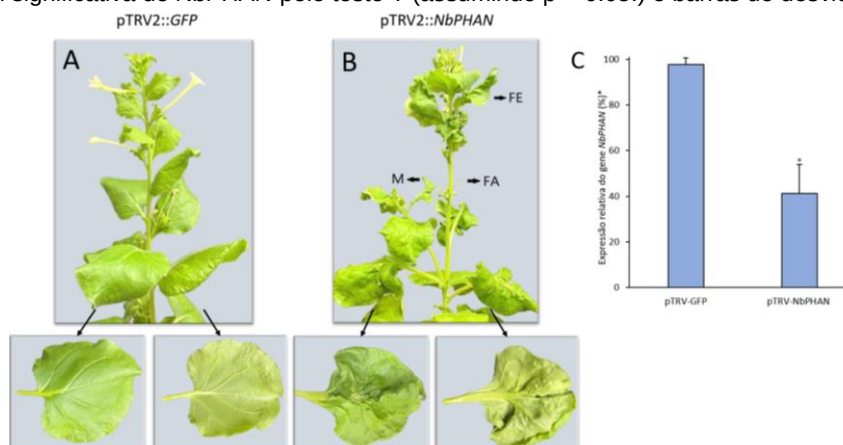


Fonte: Os autores.

Plantas com 7 semanas de idade começaram a expressar o fenótipo de silenciamento gênico para *NbPHAN* quando comparado a plantas controle *GFP*, ao detectar folhas exibindo má formação foliar e floral (Fig. 3) e consequentemente menor taxa de crescimento e desenvolvimento. A análise de RT-qPCR confirmou o silenciamento gênico de aproximadamente 60% do gene *phantastica* em *N. benthamiana*.

Esse nível de silenciamento é justificado pela idade das plantas no momento da coleta, visto que o método de VIGS é caracterizado por ser transiente, ou seja, aos poucos a planta recupera sua taxa normal de transcritos e o gene volta a ser expresso em níveis naturais. Entretanto, foi possível observar uma diferença significativa na expressão gênica entre plantas controle e plantas tratamento.

Figura 3 – (A) Fenótipo normalizado de plantas controle para o silenciamento gênico, (B) fenótipo com má-formação foliar causado pela dorsoventralidade (FE – folhas estreitas, FA – folhas agulha e FM – folhas mosaicos) evidenciando a estrutura adaxial e abaxial das folhas respectivas e (C) gráfico de barras da expressão diferencial significativa de *NbPHAN* pelo teste T (assumindo $p < 0.05$) e barras de desvio padrão.



Fonte: Os autores.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Discussão

Até o momento, genes que codificam proteínas TF's de domínio MYB como *phantastica* tem sido extensivamente estudado devido a sua atuação na regulação da expressão gênica de vários genes responsivos aos estresses bióticos e abióticos em plantas, sendo excelentes candidatos para o melhoramento de culturas de interesse (NURUZZAM et al., 2013; BAILLO et al., 2019). Embora um sistema VIGS tenha sido estabelecido para *NbPHAN* em tabaco (HUANG et al., 2013), buscamos complementar a robustez desses ensaios desenvolvendo novas ferramentas moleculares de silenciamento gênico, que contempla predominantemente regiões do domínio MYB, já que são bem conservados em muitas espécies de plantas com regiões hipervariáveis, caracterizando-as como ideias para uso no sistema de VIGS.

O par de *primers* para região parcial do gene *NbPHAN* propostos neste trabalho demonstrou eficiência na amplificação do gene-alvo e é possível inferir que esses oligonucleotídeos são indicados para uso no método de VIGS de maneira confiável.

A disponibilidade de novos oligonucleotídeos para estudos de silenciamento gênico em plantas otimiza o processo e aumenta a possibilidade de gerar respostas mais robustas. O silenciamento gênico é uma alternativa empregada extensamente na comunidade científica e contribui na compreensão das funções de determinado gene (ou genes) na planta, de acordo com a condição que a mesma é submetida.

Os nossos resultados corroboram com outros trabalhos relacionando o silenciamento do gene-alvo com o fenótipo de dorsoventralidade na formação dos órgãos, como em *Medicago truncatula* (GE; CHEN, 2014), *Nicotiana tabacum* e *Solanum lycopersicum* (ZOULIAS et al., 2012). Ainda, os resultados obtidos nas análises de sequenciamento certificaram a amplificação, conferindo credibilidade ao conjunto de iniciadores, visto que o segmento dos oligonucleotídeos correspondem ao mesmo identificado nos sequenciamentos dos fragmentos amplificados.

Conclusão

O par de oligonucleotídeos desenvolvido para *phantastica* e sua aplicação no método de VIGS em plantas de *N. benthamiana* foi eficiente *in vitro*, sendo assim, sugerido para estudos experimentais de genômica funcional e engenharia genética.

Referências

- BAILLO, E. H. et al. Transcription Factors Associated with Abiotic and Biotic Stress Tolerance and Their Potential for Crops Improvement. **Genes** 2019 , 10 , 771.
- BUSTAMANTE, M.; MATUS, J.; RIECHMANN, J. L. Genome-wide analyses for dissecting gene regulatory networks in the shoot apical meristem. **Journal of Experimental Botany** 67 (6): 1639-1648. 2016. doi: 10.1093/jxb/erw058
- CALVETE, C. L.; CASEIRO, M. M.; SOUZA, C. B. Biotecnologia: transformação bacteriana por método de choque térmico. **Revista UNILUS Ensino e Pesquisa**. v. 12, n. 26, jan./mar. 2015. ISSN 2318 – 2083.
- DUBOS, C. et al. MYB transcription factors in Arabidopsis. **Trends in Plant Science**, v. 15, Issue 10, 2010, P. 573-581, ISSN 1360-1385, <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.06.005>.
- FERNANDES-POZO, N. et al. The Sol Genomics Network (SGN) - do genótipo ao fenótipo ao melhoramento. **Nucleic Acids Res.** Volume 43, D1036-41. 2015.
- GE, L.; CHEN, R. *PHANTASTICA* regulates leaf polarity and petiole identity in *Medicago truncatula*. **Plant Signaling & Behavior**, 9:3, 2014. Cold Spring Harbor, NY, 2001.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

HELDERMAN, T. A. et al. Members of the ribosomal protein S6 (RPS6) family act as pro-viral factor for tomato spotted wilt orthotospovirus infectivity in *Nicotiana benthamiana*. **Molecular Plant Pathology**, 23, 431–446, 2022.

HUANG, C. et al. NbPHAN, a MYB transcriptional factor, regulates leaf development and affects drought tolerance in *Nicotiana benthamiana*. **Physiol Plantarum**, 149: 297-309. 2013.

KAZEMIAN, M. et al. Identification and in silico analysis of *PHANTASTICA* gene in *Saintpaulia ionantha* H. Wendl (Gesneriaceae). **Turkish Journal of Botany**: Vol. 44: No. 4, Article 4. 2020.

LI, X. Infiltration of *Nicotiana benthamiana* Protocol for Transient Expression via *Agrobacterium*. **Bio-101**: e95. 2011.

LIU, Y. et al. Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. **Plant J.** 2002 May;30(4):415-29.

MATUS, J. T.; AQUEA, F.; ARCE-JOHNSON, P. Analysis of the grape MYB R2R3 subfamily reveals expanded wine quality-related clades and conserved gene structure organization across *Vitis* and *Arabidopsis* genomes. **BMC Plant Biol.** 2008, 8: 83.

NURUZZAMAN M.; SHARONI, A. M.; KIKUCHI, S. Roles of NAC transcription factors in the regulation of biotic and abiotic stress responses in plants. **Frontiers in Microbiology**, Vol.4, 2013.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res.** 2001 May 1;29(9):e45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45. PMID: 11328886; PMCID: PMC55695.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. The Hanahan Method for Preparation and Transformation of Competent Competent *E. coli*: High-Efficiency Transformation. **Molecular cloning**. p. 9.16-9.17. Cold Spring

STRACKE R.; WERBER, M.; WEISSHAAR, B. The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. **Curr Opin Plant Biol.** 2001, 4: 447–456.

VENTIMILLA, D. et al. IDA (INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION)-like peptides and HAE (HAESA)-like receptors regulate corolla abscission in *Nicotiana benthamiana* flowers. **BMC Plant Biol** 21, 226 (2021).

WAITES, R.; HUDSON, A. *phantastica*: a gene required for dorsoventrality of leaves in *Antirrhinum majus*. **Development**. 1 July 1995; 121 (7): 2143–2154. doi: <https://doi.org/10.1242/dev.121.7.2143>

YU, W.; MACHO, A.P. A Fast and Easy Method to Study *Ralstonia solanacearum* Virulence upon Transient Gene Expression or Gene Silencing in *Nicotiana benthamiana* Leaves. **Bio Protoc.** 2021 Aug 5;11(15):e4116. doi: 10.21769/BioProtoc.4116. PMID: 34458410; PMCID: PMC8376586.

ZOULIAS, N. et al. A role for *PHANTASTICA* in medio-lateral regulation of adaxial domain development in tomato and tobacco leaves. **Annals of Botany**, Volume 109, Issue 2, February 2012, Pages 407–418, <https://doi.org/10.1093/aob/mcr295>

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pelo apoio financeiro e bolsa do pesquisador Rafael Lara Rezende Cabral e à Fundação de Amparo à Pesquisa de Inovação do Espírito Santo (FAPES) pelo financiamento da pesquisa.