



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS**

**OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS PARA EDIÇÃO DE GENOMA VIA
CRISPR/CAS9 EM CITROS**

AMANDA DE CARVALHO BERNARDI

Araras

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

OTIMIZAÇÃO DE PARAMETROS PARA EDIÇÃO DE GENOMA VIA
CRISPR/CAS9 EM CITROS

AMANDA DE CARVALHO BERNARDI

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCO AURÉLIO TAKITA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados como requisito parcial à obtenção do título de MESTRE EM PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

Araras
2017

AGRADECIMENTOS

Á Deus e a Divina Providência por traçarem e conduzirem meu caminho, e por permitirem que ele se cruzasse com o de todos a seguir:

Á minha família, em especial meus pais Eliane e Marcos e ao meu irmão León por se manterem incondicionalmente ao meu lado durante toda minha caminhada;

Ao Paulo, por me ajudar a levantar a cada tropeço;

Ao meu orientador Dr. Marco Aurélio Takita por me indicar a direção e sempre as melhores rotas a seguir;

Ao Dr. Marcos Antônio Machado, ao Centro de Citricultura Sylvio Moreira (CCSM) a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) e a Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados (PVBA) do Centro de Ciências Agrárias da UFSCAR (CCA) por pavimentar minha trilha, tornando essa jornada possível;

E aos meus amigos e colegas do CCSM por iluminarem meu trajeto, fazendo dessa estrada uma das mais especiais que já percorri.

Bernardi, Amanda

Otimização de Parâmetros para Edição de Genoma via CRISPR/CAS9 em Citros / Amanda Bernardi. -- 2017.

78 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, campus Araras, Araras

Orientador: Dr. Marco Aurélio Takita

Banca examinadora: Dra. Raquel Boscariol, Dr. Ricardo Harakava

Bibliografia

1. Edição de Genomas. 2. Clonagem. 3. Expressão Transiente. I. Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Agrárias
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Amanda de Carvalho Bernardi, realizada em 31/08/2017:

Prof. Dr. Marco Aurelio Takita
IAC

Profa. Dra. Raquel Luciana Boscardi Camargo
IAC

Prof. Dr. Ricardo Harakava
IBC-SP

SUMÁRIO

Página

ÍNDICE DE TABELAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
INTRODUÇÃO	6
OBJETIVOS.....	9
1. OBJETIVO GERAL.....	9
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
REVISÃO DA LITERATURA	10
1. CITRICULTURA.....	10
1.1. Aspectos gerais da cultura.....	10
1.2. Genoma de Citros.....	12
2. EDIÇÃO DE GENOMAS	13
2.1. CRISPR em Plantas.....	16
2.2. Transformação Transiente para Avaliação da Frequência de Mutação	17
LITERATURA CITADA.....	19
CAPÍTULO 1. Construção de vetores CRISPR com alvo em genes relacionados a doenças dos Citros	27
1. Resumo.....	27
2. Introdução	28
3. Materiais e Métodos.....	30
3.1. Linhagens Bacterianas, Vetores E Primers Utilizados	30
3.2. Meio de cultura bacteriana.....	30
3.3. Transformação de <i>E. coli</i>	30
3.4. Minipreparação de Plasmídeos.....	31
3.5. Clonagem de sgRNAs.....	31
3.6. Transformação Genética.....	32
4. Resultados e Discussão.....	32
4.1. Seleção de genes de interesse e sequências-guia.....	32
4.2. Customização do sgRNA	34
4.3. Clonagem no vetor binário (pCAS9-TPC).....	35
4.4. Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	39
5. Conclusões	40
6. Literatura citada	40
CAPÍTULO 2. Transformação Transiente de folhas aderidas e destacadas de laranja doce.	43

1.	Resumo.....	43
2.	Introdução	44
3.	Materiais e Métodos.....	45
3.1.	Material Vegetal, Estirpe de <i>Agrobacterium</i> e vetor binário utilizado	45
3.2.	Otimização de Transformação Transiente em plantas.....	46
3.3.	Expressão transiente em folhas destacadas.....	47
3.4.	Análise histoquímica de expressão GUS	47
4.	Resultados e Discussão.....	48
4.1.	Análise da concentração ideal de crescimento de <i>Agrobacterium</i> (ODi) ..	48
4.2.	Análise da densidade celular ótima de <i>Agrobacterium</i> para infiltração (ODf).....	51
4.3.	Experimentos de folhas aderidas x Folhas destacadas	52
6.	Literatura citada	54
CAPÍTULO 3. Construção de novo vetor otimizado para edição de genomas de plantas.....		57
1.	Resumo.....	57
2.	Introdução	58
3.	Materiais e Métodos.....	59
3.1.	Linhagens bacterianas, plasmídeos e primers utilizados	60
3.2.	Meio de cultura bacteriana.....	60
3.3.	Transformação de <i>E. coli</i>	60
3.4.	Kits e Enzimas utilizadas	61
4.	Resultados e Discussão.....	61
4.1.	Clonagem do sgRNA e promotor U6-26 no vetor pGreen 0029.....	61
4.2.	Clonagem da CAS9.....	63
4.3.	Clonagem do promotor pUbi 4-2.....	64
CONSIDERAÇÕES FINAIS		70

ÍNDICE DE TABELAS

Página

Capítulo 1

Tabela 1. Primers utilizados neste trabalho.	30
Tabela 2. Sequências-guia para sgRNA de possíveis genes codificadores de terpeno sintase e resistência a CTV.....	33

Capítulo 2

Tabela 1. Média das porcentagens de discos foliares Gus positivos em tratamentos com ODi de 0,5 e ODi de 0,8..	50
---	-----------

Capítulo 3

Tabela 1. Primers utilizados neste trabalho	60
---	-----------

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Capítulo 1

Figura 1. Clonagem do sgRNA através da enzima <i>Bpi</i> l.	35
Figura 2. Exemplo de gel de agarose 0.7% mostrando o produto do PCR para confirmar a clonagem das sequências Cs3g04190A, Cs3g04260A, Cs304340A, Cs3g04340B, Cs3g04360A no vetor pChimera.....	35
Figura 3. Digestões dos plasmídeos com <i>AvrII</i> l.	36
Figura 4: Exemplo de gel de agarose 0.7% resultado do PCR das ligações 1, 5, 10,13 e 27..	37
Figura 5. Teste de PCR para avaliação de construção	38
Figura 6. Teste de digestão para confirmação de construção.....	39
Figura 7. Confirmação da transformação de <i>A. tumefaciens</i>	40

Capítulo 2

Figura 1. Mapa do vetor pCambia 3301.	46
Figura 2. Análise histoquímica de discos foliares de experimentos em folhas destacadas.	49
Figura 3. Análise histoquímica de discos foliares de experimentos em folhas aderidas.....	50
Figura 4. Porcentagem de discos foliares GUS positivos em folhas destacadas e anexas.....	52
Figura 5. Porcentagem de discos foliares GUS positivos em folhas destacadas e folhas aderidas.	53

Capítulo 3

Figura 1. Esquema representando a construção do vetor pTAK-GE0001.	62
Figura 2. Gel de Agarose 1% com o resultado da digestão dos vetores pGreen 0029 e pChimera com as enzimas <i>SacI</i> e <i>XbaI</i>	63
Figura 3. Gel de Agarose 1% com o resultado do ensaio de restrição dos clones de pGreen+sgRNAØ com as enzimas <i>SacI</i> e <i>XbaI</i>	63
Figura 4. Gel de Agarose 1% mostrando a linearização do vetor pGreen_sgRNAØ com as enzimas <i>EcoRI</i> e <i>XbaI</i>	64

Figura 5. Gel de Agarose 1% mostrando a digestão do vetor pCAS9-TPC para liberação da enzima CAS9.	64
Figura 6. Gel de agarose 1% mostrando o ensaio de Restrição das colônias obtidas da ligação pGreen_sgRNAØ + CAS9, digeridas com <i>EcoRI</i> somente e <i>EcoRI</i> e <i>XbaI</i> simultaneamente.	64
Figura 7. Gel de agarose 1% mostrando a digestão do vetor pGreen_sgRNAØ_CAS9 com a enzima <i>EcoRI</i>	65
Figura 8. Gel de agarose 1% mostrando o PCR de colônia com os primers M13(-20) e pUbi4-2_RV dos transformantes da ligação pGreen_sgRNAØ_CAS9 + pUbi..	65
Figura 9. Esquema ilustrando a diferença na posição do sítio de <i>NheI</i> no caso de cada uma das orientações da clonagem de PcUbi(P).	66
Figura 10. Gel de agarose 1% mostrando o resultado obtido no ensaio de restrição com as enzimas <i>HindIII</i> e <i>NheI</i>	66

OTIMIZAÇÃO DE PARAMETROS PARA EDIÇÃO DE GENOMA VIA CRISPR/CAS9 EM CITROS

Autor: AMANDA DE CARVALHO BERNARDI

Orientador: Prof. Dr. MARCO AURÉLIO TAKITA

RESUMO

O gênero *Citrus* abrange uma grande diversidade de espécies produtoras de frutas como laranjas, limões, limas e tangerinas que são altamente populares no mundo. O Brasil é um dos principais produtores de citros, liderando a produção mundial de laranjas. A citricultura brasileira é de extrema importância pois é uma grande atividade geradora de emprego, contribuindo assim para o desenvolvimento socioeconômico do país. Entretanto, a base genética utilizada na citricultura brasileira é ainda muito estreita, com poucas variedades sendo cultivadas comercialmente. Isto é reflexo de ainda existir uma grande dificuldade na obtenção de indivíduos superiores através do melhoramento tradicional, pelas limitações apresentadas pela cultura dos citros. Isto faz com que seja necessário o desenvolvimento de novas tecnologias, principalmente aquelas que exploram os genomas já sequenciados. Uma destas tecnologias é a edição de genomas, onde se realiza disruptions em pontos específicos do genoma de um determinado organismo, levando a mutações ou substituições de fragmentos de DNA. Dentre as várias técnicas utilizadas para edição de genomas, CRISPR/CAS9 é a que tem se mostrado a mais promissora, pela facilidade de utilização. Com início de aplicação em 2013, há um número crescente de trabalhos mostrando edição de genoma mediada por CRISPR/CAS9 em diferentes organismos, incluindo plantas. Até o presente momento, para citros existem trabalhos de dois grupos nos quais esta tecnologia foi utilizada para gerar plantas mutantes. Portanto, a aplicação desta tecnologia poderia ser melhor explorada para levar estudos de citros no Brasil a um outro patamar, com perspectivas de geração de novas variedades. Assim, este projeto teve como objetivo central otimizar sistemas para geração de mutantes via CRISPR/CAS9 em citros. Afim de explorar as metodologias existentes para edição de genoma em plantas, foram feitas construções de vetores com alvos em genes de interesse para o estudo de resistência de doenças utilizando-se vetores disponíveis na literatura. A partir deste trabalho inicial, foi possível propor duas melhorias para otimização do processo: o uso de transformação transiente para identificação de mutações e consequente eficiência do vetor CRISPR, e a construção de um novo vetor para edição de genomas de plantas. Fomos capazes de avaliar alguns parâmetros e otimizar a metodologia de transformação transiente em laranja doce, resultando em uma média de até 93% de discos foliares transformados. Também foi possível finalizar a construção de um novo vetor para edição de genomas de plantas que possui as vantagens de ter tamanho reduzido, fácil customização no próprio vetor e resistência a canamicina em plantas e bactérias. Os avanços obtidos nesse trabalho poderão ser aplicados em estudos de diversas áreas não só de citros, mas também de outras culturas.

OPTIMIZATION OF PARAMETERS FOR CRISPR/CAS9 GENOME EDITING IN CITRUS

Author: AMANDA DE CARVALHO BERNARDI

Adviser: Prof. Dr. MARCO AURÉLIO TAKITA

ABSTRACT

The genus *Citrus* contains a wide variety of fruit-producing species such as oranges, lemons, limes and mandarins that are highly popular in the world. Brazil is one of the main citrus producers, currently leading the world production of oranges. The Brazilian citrus industry is extremely important because of its great activity that generates jobs, thus contributing to the socioeconomic development of the country. However, the genetic background used in the Brazilian citriculture is still very narrow, with few varieties being cultivated commercially. This is a reflection of the fact that there is still a great difficulty in obtaining superior individuals through traditional breeding due to the limitations presented by the citrus crop. This makes it necessary to develop new technologies, especially those that exploit the already sequenced genomes. One of these technologies is the genome editing, where it is possible to make disruptions in specific points in the genome of a given organism, leading to mutations or substitutions of DNA fragments. Among the various techniques used for genome editing, CRISPR / CAS9 is the most promising because of its ease of use. With its first studies in 2013, there is an increasing number of papers showing CRISPR / CAS9 mediated genome editing in different organisms, including plants. At the present time, for citrus there are works of two groups in which this technology was used to generate mutant plants. Therefore, the application of this technology could be better exploited to take citrus studies in Brazil to another level, with prospects of generation of new varieties. Thus, this project had a central objective to optimize systems for generation of mutants via CRISPR / CAS9 in citrus. In order to explore the existing methodologies for genome editing in plants, constructs of vectors with targets in genes of interest for the study of disease resistance were made using vectors available in the literature. From this initial work, it was possible to propose two improvements for optimization of the process: the use of transient transformation to identify mutations and consequent efficiency of the CRISPR vector and the construction of a new vector for plant genome editing. We were able to evaluate some parameters and to optimize the methodology of transient transformation in sweet orange, resulting in an average of up to 93% of transformed leaf discs. It was also possible to conclude the construction of a new vector for plant genome editing that has the advantages of having reduced size, easy customization in the vector itself and resistance to kanamycin in plants and bacteria. The advances obtained in this work can be applied in studies of several areas not only of citrus, but also of other cultures.

INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos líderes mundiais na produção de citros, com destaque para laranja doce que alcançou uma produção anual de quase 50 milhões de toneladas no ano safra 2016-2017 somente com as frutas destinadas a consumo *in natura* (USDA, 2017). A alta movimentação financeira gerada pela citricultura brasileira, expõe esse setor como de extrema importância para o desenvolvimento socioeconômico do país, sendo uma atividade geradora de milhares de empregos diretos e indiretos (LOPES et al., 2011; NEVES et al., 2010).

O melhoramento de citros tem sido feito há muito tempo, desde o final do século XIX (COOPER et al., 1962). No Brasil, cruzamentos controlados visando melhoramento genético de citros são realizados desde 1989 no Instituto Agrônomo (BORDIGNON et al., 1990). Todavia, esta cultura possui dificuldades inerentes à sua fisiologia para a obtenção e identificação de plantas resistentes e/ou com genótipos superiores. Isso acontece porque o melhoramento tradicional de citros apresenta algumas limitações biológicas associadas a esterilidade e incompatibilidade sexual, longa juvenilidade, grande porte das plantas, além de sua baixíssima diversidade genética, tornando-se importante o desenvolvimento de novas tecnologias como as que exploram os genomas sequenciados destas espécies. Tais dificuldades fazem com que os citros se tornem bastante vulneráveis a pragas e doenças que afetam a cultura, fazendo com que a citricultura enfrente graves problemas de ordem fitossanitária, gerando grande prejuízo aos citricultores. Por essa razão, há uma

grande necessidade de desenvolvimento de novas tecnologias que permitam a exploração do potencial genético dessa cultura, afim de possibilitar a geração de novas variedades resistentes a essas doenças.

Dentre as novas tecnologias desenvolvidas para estudos genômicos, encontra-se o CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), que foi descoberto como parte de um mecanismo de defesa de algumas bactérias contra ácidos nucleicos invasores (HORVATH; BARRANGOU, 2010) e passou a ser utilizado em edição de genomas em 2013 (CONG et al., 2013; JINEK et al., 2012; MALI et al., 2013), tornando-se uma das ferramentas mais promissoras da atualidade. A técnica permite direcionar uma endonuclease, chamada CAS9, através de um RNA guia, para a clivagem de um alvo específico no DNA, e a edição de genomas especificamente se dá através da participação do sistema natural de reparo na célula, o qual utiliza primordialmente dois mecanismos, a ligação de extremidade não homóloga (NHEJ) e a recombinação homóloga (HR) (CHAPMAN et al., 2012; LIU et al., 2014). Atualmente essa técnica tem sido amplamente utilizada por se tratar de uma poderosa ferramenta de biologia molecular, uma vez que pode ser facilmente customizada para gerar mutações em um sítio específico de qualquer genoma, além de substituição gênica, entre outras aplicações. Em plantas, a tecnologia vem sendo usada desde 2013 (FENG et al., 2013; JIANG et al., 2013; LI et al., 2013; NEKRASOV et al., 2013), e já foi utilizada em abordagens de transformação transiente e estável de diversas culturas como *Arabidopsis thaliana* (HAHN et al., 2017), tabaco (MERCX et al., 2016), arroz (NIEVES-CORDONES et al., 2017), trigo (LIANG et al., 2017), milho (CHAR et al., 2017), entre outras.

Para citros, também existem trabalhos de dois grupos no qual esta tecnologia foi usada para gerar plantas mutantes (JIA et al., 2016, 2017; JIA; WANG, 2014a; PENG et al., 2017), sendo que o trabalho principal de ambos os grupos focou no silenciamento de regiões promotoras e codificadoras do gene de susceptibilidade ao cancro cítrico *CsLOB1*. Entretanto, ainda é possível afirmar que a aplicação desta tecnologia pode ser melhor explorada para levar estudos dessa cultura a um novo patamar, abrindo perspectivas para geração de novas variedades.

Diante deste quadro, a proposta inicial do trabalho foi desenvolver a metodologia de edição de genomas de plantas com uso do sistema CRISPR/CAS9, através da construção de vetores com alvos em genes relacionados a resistência a Cancro Cítrico e *CTV* a partir de metodologias pré-existentes (Capítulo 1). A partir do

desenvolvimento destas construções, foi possível compreender melhor as metodologias existentes, e assim propor melhorias no processo, como a otimização do protocolo de transformação transiente, uma vez que essa ainda é a principal estratégia para provas de conceito e avaliação da eficiência de mutação de vetores CRISPR/CAS9 em muitas plantas que possuem recalcitrância a transformação genética estável / regeneração *in vitro* (Capítulo 2). Além disso, identificou-se a necessidade da construção de um novo vetor para edição de genomas de plantas otimizado para facilitar a customização para qualquer alvo desejado não só em citros, mas também em outras plantas (Capítulo 3).

OBJETIVOS

1. OBJETIVO GERAL

O objetivo central deste trabalho é otimizar sistemas para geração de mutantes via CRISPR/CAS9 em citros.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construção e validação de vetores para edição de genomas em citros, com alvo em genes relacionados a resistência a *CTV* e ao Cancro Cítrico;
- Estabelecer protocolo de expressão transiente para utilização em Edição de Genomas;
- Construção de novo vetor otimizado para edição de genomas de plantas.

REVISÃO DA LITERATURA

1. CITRICULTURA

1.1. Aspectos gerais da cultura

A citricultura conta com um histórico muito antigo, com relatos de cultivo de mais de 4.000 anos, tendo suas primeiras referências na literatura a partir de 800 D.C. em livros chineses, o que fortalece a hipótese de que seu centro de origem seja no sudeste da Ásia (SCORA, 1975; WEBBER et al., 1967) Existe uma grande controvérsia com relação à origem genética e classificação taxonômica de suas espécies, principalmente devido à compatibilidade sexual entre gêneros, à grande frequência de mutações espontâneas e ao longo histórico de cultivo associado à sua grande expansão pelo mundo (LI et al., 2010).

Um dos sistemas de classificação mais aceitos atualmente, considera como frutas cítricas, espécies de três gêneros da família *Rutaceae*: *Citrus*, *Fortunella* e *Poncirus* (SWINGLE, W.T, REECE, 1976). O gênero *Poncirus* é monoespecífico (*P. trifoliata*) e desempenha um papel central na criação de porta-enxertos, uma vez que possui tolerância a muitos fatores bióticos, enquanto o gênero *Fortunella* inclui algumas poucas cultivares conhecidas (Kunquats) (TADEO et al., 2008). O gênero *Citrus* apresenta maior importância econômica por conter a maioria das espécies consumidas no mundo, como laranjas doces (*C. sinensis*), tangerina comum (*C. reticulata*), limões (*C. limon*), etc, além de híbridos naturais (LIU et al., 2012).

As frutas cítricas juntas possuem uma das maiores expressões econômicas mundiais, por se tratarem das mais consumidas na dieta humana, alcançando uma produção anual estimada em 93 milhões de toneladas no ano safra 2016/2017 (FUNDECITRUS, 2017). Dentre essas frutas, a laranja doce possui a maior popularidade, com produção anual destinadas a consumo *in natura* de quase 50 milhões de toneladas no mesmo ano safra, seguida por tangerinas e mandarins que tiveram uma produção anual recorde de 29 milhões de toneladas no (USDA, 2017). China, Brasil e Estados Unidos, nesta ordem, lideram o ranking de produtores de frutas cítricas, sendo responsáveis por quase 48% da produção mundial desta cultura (FAO, 2015).

O Brasil detém a liderança na produção de laranja, porém historicamente seu consumo como fruta de mesa não é o preponderante, uma vez que desde os anos 60 o uso de laranjas para produção de suco vem sendo fortemente explorado, passando a responder por 55% da produção brasileira. O suco de laranja brasileiro corresponde a mais de 50% da produção mundial e chega a impressionantes 85% de participação de mercado (NEVES et al., 2010). Isso se deve a diversos fatores, dentre eles o preço do produto brasileiro, que chega a apenas 28% do europeu.

O PIB de US\$ 6,5 bilhões em 2009 ilustra a importância da citricultura brasileira no desenvolvimento socioeconômico do país, sendo responsável pela geração direta e indireta de cerca de 230 mil empregos na área rural, o que corresponde a uma massa salarial de R\$ 676 milhões (LOPES et al., 2011; NEVES et al., 2010). Além disso, o faturamento total dos elos da cadeia produtiva chegou a US\$ 14,6 bilhões em 2009, arrecadando US\$ 189 milhões em impostos para o Estado brasileiro.

A citricultura brasileira, no entanto, concentra-se na região sudeste do país, contendo 4 dos principais estados produtores: Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo, sendo esse último responsável por 62% de toda área de produção de laranjas do país (IBGE, 2017). Segundo boletim da Conab, em 2014 no estado de São Paulo a receita bruta anual da laranja chegou a R\$ 2.697.231,78, sendo a maior entre as frutas e a segunda maior entre todos os produtos agrícolas, perdendo apenas para a cana-de-açúcar (CONAB, 2016). Esses números expressivos com relação ao estado se devem principalmente a fatores históricos relacionados à introdução da cultura no país e também a condições ecológicas favoráveis para produções satisfatórias (EMBRAPA, 2008).

1.2. Genoma de Citros

O melhoramento genético de citros apresenta limitações biológicas associadas à esterilidade e incompatibilidade sexual, longa juvenilidade, grande porte das plantas e consequente custos para manutenção das progênes até a maturidade, o que leva a uma baixa probabilidade de obtenção e identificação de indivíduos superiores. Somado a isto, a baixíssima variabilidade genética existente entre os diferentes representantes do grupo de citros (laranjas doce e azeda, limas ácida e doce, limões e tangerinas, entre outros), determinado pela estreita origem genética destas espécies, dificulta imensamente o avanço genético através de técnicas clássicas (MACHADO et al., 2005; PASQUAL et al., 2015).

Esses fatores fizeram com que, historicamente, a seleção de mutantes naturais associada a práticas e características que favorecem o acúmulo e conservação de mutações na cultura (estaquia, enxertia e embrionia nucelar) agisse predominantemente como método de melhoramento genético de citros, sendo responsável pela geração da maioria das cultivares existentes atualmente (SOOST; ROOSE, 1996). O primeiro programa formal de melhoramento genético de citros se deu na Flórida, em 1893 pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), e desde então houve muitos avanços no uso da hibridação sexual controlada, sendo alguns programas atuais em destaque o americano da Universidade da Califórnia e o francês da Unité Expérimentale C. (OLIVEIRA et al., 2014). No Brasil, destacam-se os programas da Embrapa Mandioca e Fruticultura e do Centro de Citricultura Sylvio Moreira vinculado ao Instituto Agrônomo de Campinas.

Um dos grandes avanços no conhecimento científico foi determinado pelo sequenciamento de genomas. Para plantas, desde a publicação do genoma de *Arabidopsis thaliana* em 2000 (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000), tem-se observado um grande aumento no número de genomas sendo sequenciados, trabalho também facilitado pelo desenvolvimento de novas tecnologias (revisado por HUQ et al., 2016; TÜRKTAS et al., 2015). Em abril de 2003, foi criado o “Consórcio Internacional do Genoma de Citros” que, a partir a elaboração de um documento chamado Declaração de Valência (INTERNATIONAL CITRUS GENOME, 2003) estabeleceu uma série de iniciativas para que fosse realizado um trabalho conjunto mundial visando o sequenciamento do genoma de citros, usando como justificativa

várias características da cultura além das crescentes necessidades de se incorporar novas tecnologias ao estudo do genoma da cultura.

Desta iniciativa resultaram o sequenciamento dos genomas de laranja doce (*C. sinensis*) e clementina (*C. clementina*) (WU et al., 2014). Paralelamente, na China foi realizado um outro trabalho de sequenciamento do genoma de laranja doce, formando assim uma base de informações genômicas muito rica para trabalho com citros. Apesar das limitações e do panorama da baixa diversidade genética de citros se manterem os mesmos, uma vez que são totalmente inerentes ao grupo, estes genomas possibilitam trabalhos muito mais refinados em mapeamento, por exemplo, com marcadores DArT-seq, que não existiam quando o Consócio foi formado. O custo mais baixo para sequenciamento de nova geração permite sequenciar novos genomas e compará-los com os genomas existentes, buscando-se variações e facilitando a construção de mapas genéticos muito mais saturados e confiáveis. Com um maior número de marcadores é possível realizar associações mais precisas com fenótipos, especialmente em espécies com baixa diversidade, como citros.

Além disso, com os avanços da Biotecnologia, novas ferramentas foram incorporadas as pesquisas em citros e a transformação genética passou a ser uma importante alternativa na geração de novas variedades por possibilitar a introdução de genes de interesse agrônômico, de forma controlada, sem a transferência de características deletérias (VARDI et al., 1990). A obtenção de plantas transgênicas na cultura tem sido eficientemente realizada via transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, utilizando diversos tecidos, como segmentos de epicótilos (JIA et al., 2016; SENDÍN et al., 2017) e cotilédones (DE OLIVEIRA et al., 2015) ou também via eletroporação de protoplastos (OMAR et al., 2007). Atualmente novas ferramentas de biologia molecular vêm sendo incorporadas a estudos com citros, visando o controle de doenças e pragas e o melhoramento dessa cultura.

2. EDIÇÃO DE GENOMAS

Apesar da importância da geração de mutantes como ferramenta no melhoramento genético de citros, a forma de se obtê-los foi, por muito tempo, restrita à utilização de agentes mutagênicos químicos ou físicos (GOLDENBERG et al., 2014; JAIN, 2010; LIN et al., 1999; SUTARTO et al., 2009). Atualmente, novas tecnologias estão disponíveis e suas utilizações permitem um grande avanço tanto em pesquisas quanto em desenvolvimento de tecnologia. O sequenciamento do

genoma permite o que é conhecido como “edição de genomas”. Esta tecnologia começou a ser utilizada em 1979, com “gene replacement” em levedura (SCHERER; DAVIS, 1979) e posteriormente, começaram a aparecer os primeiros estudos mostrando edição de genoma também em células humanas (MANSOUR et al., 1988; SMITHIES et al., 1985; THOMAS et al., 1986).

Estudos de proteínas Zinc-finger levaram ao desenvolvimento de novas moléculas capazes de editar genomas, as nucleases Zinc-finger ou, do inglês, ZFNs (BIBIKOVA et al., 2002, 2003; KIM et al., 1996). Posteriormente, uma nova tecnologia para edição de genomas foi desenvolvida através de estudos com TALE (“transcription activator-like effector”) (MOSCOU; BOGDANOVE, 2009), que ocorrem naturalmente em bactérias que infectam plantas e reconhecem DNA de forma programável. Estes estudos levaram ao desenvolvimento das TALENS (“TALE nucleases”) que são TALEs acoplados à nuclease *FokI* possibilitando clivagem de DNA direcionada por TALE (CHRISTIAN et al., 2010). Apesar de similares, TALENS seriam mais facilmente manipuláveis para aplicações práticas do que as ZFNs.

A última tecnologia desenvolvida para edição de genomas começou a ser desenhada a partir de estudos básicos que acabaram descrevendo CRISPR (“clustered regularly interspaced short palindromic repeat”) a partir de sequenciamento do gene *iap* de *Escherichia coli* (ISHINO et al., 1987). Como o próprio nome já diz, CRISPRs são aglomerados de sequências palindrômicas repetitivas intercaladas por espaçadores, e já despertavam a atenção de pesquisadores há muitos anos por sua peculiar estrutura. Entretanto, sua função biológica permaneceu desconhecida por muito tempo, até que em 2005, grupos de pesquisa distintos concluíram que os espaçadores pertencentes a estas sequências possuíam origem exógena, derivadas de plasmídeos ou vírus, o que sugeriu que esse sistema funcionasse como um sistema imune adaptativo de bactérias e archaea (BOLOTIN et al., 2005; POURCEL et al., 2005), hipótese que foi confirmada posteriormente (MOJICA et al., 2005).

Esse mecanismo de defesa funciona de maneira que, quando há uma primeira invasão, parte do DNA invasor é incorporado no *locus* CRISPR do hospedeiro na forma de espaçador a partir da clivagem de seu ácido nucleico em pequenos pedaços pelas proteínas Cas1 e Cas2. Uma vez incorporados ao genoma da bactéria, esses espaçadores passam a ser transcritos, inseridos ao *locus* CRISPR, ocorrendo posteriormente um processamento em vários RNAs menores cada qual

com um espaçador, chamado de crRNA (CRISPR-derived RNA). Esses crRNAs formam um complexo com a proteína CAS9, que é capaz de reconhecer e destruir a sequência exógena, no caso de uma segunda invasão (MAKAROVA et al., 2011), processo que se assemelha em alguns aspectos ao mecanismo de interferência por RNA (RNAi).

A compreensão do funcionamento desse mecanismo de defesa e seus estudos decorrentes, levou os pesquisadores a enxergar nesse sistema um grande potencial científico e tecnológico decorrente da possibilidade de direcionar uma endonuclease, através de seu RNA guia, para a clivagem de um alvo específico no DNA (JINEK et al., 2012). Isso fez com que, a partir de 2013, esse processo biológico fosse desenvolvido em uma técnica, que se tornou uma das ferramentas de biologia molecular mais promissoras da atualidade (CONG et al., 2013; MALI et al., 2013). O sistema usado baseia-se no tipo II, no qual um RNA pequeno transcrito (tracrRNA) participa do processamento do CRISPR RNA (crRNA) por uma única proteína (Cas9), com a formação de um duplex com a sequência repetida do CRISPR e clivagem com RNase III. A tecnologia CRISPR atualmente utiliza uma fusão crRNA-tracrRNA, chamada de RNA guia único (sgRNA) para direcionar a clivagem de sequências de interesse por Cas9 (JINEK et al., 2012).

Uma vez que todos estes sistemas (ZFN, TALEN e CRISPR) produzem quebra da dupla fita de DNA, a edição do genoma se dá através da participação do sistema natural de reparo na célula, o qual utiliza primordialmente dois mecanismos, a ligação de extremidade não homóloga (NHEJ) e a recombinação homóloga (HR) (CHAPMAN et al., 2012; LIU et al., 2014). Na primeira, as extremidades do DNA são unidas sem um molde, tornando o sistema passível de erro, porém caracteriza-se por ser mais imediato. Já a HR ocorre na presença de um molde, gerando uma cópia perfeita deste. Em termos práticos, a tecnologia utiliza-se de vetores (plasmídeos ou vírus) para expressão *in vivo* dos componentes ou do sistema montado *in vitro* (HSU et al., 2014) e pode-se ainda utilizar Cas9 intacta ou mutada em uma das atividades (nickase), o que aumenta a especificidade de reconhecimento de sequências no genoma (RAN et al., 2013).

Nos últimos anos a utilização de CRISPR vem encantando a comunidade científica, fazendo com que muitos pesquisadores se envolvam com o uso dessa técnica, o que tem como consequência um número muito alto de artigos publicado sobre o tema atualmente no mundo todo. Estudos revelam que apenas nos dois

primeiros anos desde sua primeira publicação como técnica (2013 e 2014) o número de artigos chegou a 477 e que em 2016 esse número se aproximou de 4.300 publicações (PEREIRA, 2016).

2.1. CRISPR em Plantas

No que diz respeito a edição de genomas de plantas, os trabalhos envolvendo o uso do sistema CRISPR/CAS9, começaram logo em 2013 (JIANG et al., 2013; LI et al., 2013; NEKRASOV et al., 2013), e estima-se que hoje já existem mais de 60 artigos publicados com o uso dessa técnica em diversas plantas (LIU et al., 2017) como *Arabidopsis thaliana* (HAHN et al., 2017), tabaco (MERCX et al., 2016), arroz (NIEVES-CORDONES et al., 2017), trigo (LIANG et al., 2017) milho (CHAR et al., 2017), entre outras.

Em alguns desses estudos já é possível verificar a utilização da enzima CAS9 otimizada para plantas (LOWDER et al., 2015) ou para culturas específicas como soja (LI et al., 2015; MICHNO et al., 2015), milho (ZHU et al., 2016) e arroz (ENDO et al., 2016; SHAN et al., 2014), porém as CAS9 otimizadas para humanos também são amplamente utilizadas (FENG et al., 2016; YAN et al., 2015). A grande maioria desses trabalhos utilizam como estratégia para edição de genomas o uso de NHEJ, porém também existem poucos trabalhos com HR (LI et al., 2013, 2015; REN et al., 2016). As frequências de mutações variam entre 1% (NEKRASOV et al., 2013) e 100% (ZHOU et al., 2014).

As aplicações desses estudos incluem desde provas de conceito, utilizando como alvo genes como GFP (JACOBS et al., 2015), GUS (MICHNO et al., 2015) e DsRed (JIANG et al., 2013) até o silenciamento de genes de interesse como de susceptibilidade a doenças (PENG et al., 2017). Para estudos visando provas de conceito e/ou comprovar a eficiência de vetores CRISPR, comumente é adotada a estratégia do uso de transformação transiente (BORTESI; FISCHER, 2015) devido à versatilidade e facilidade da técnica quando comparada a transformação estável.

Para citros, existem trabalhos de edição de genoma de apenas dois grupos de pesquisa usando o sistema CRISPR (JIA et al., 2016, 2017; JIA; WANG, 2014a; PENG et al., 2017). Em um destes trabalhos, foi utilizada a estratégia de transformação transiente em folhas de laranja doce utilizando-se como alvo o gene *CsPDS*, onde foi possível observar uma taxa de mutação de 3,2 a 3,9%, sem mutação “off-target” (JIA; WANG, 2014a). Com relação à estratégia de

transformação estável, os trabalhos focaram na edição de gene *CsLOB1* relacionado a susceptibilidade ao cancro cítrico, onde foi possível encontrar frequências de mutações próximas a 90% sempre mediadas por NHEJ (JIA et al., 2016, 2017; PENG et al., 2017).

A grande variabilidade e aplicabilidade desses trabalhos demonstram o imenso potencial que essa técnica tem de revolucionar o setor agrícola, o que se deve principalmente às mudanças burocráticas e regulatórias que o uso desse sistema pode implicar. Conforme aconteceu com a introdução dos primeiros organismos transgênicos, a chegada da edição de genomas também representa uma situação sem precedentes e demanda atenção especiais dos órgãos regulatórios para a aceitação dos novos organismos gerados (ARAKI; ISHII, 2015). A principal controvérsia inerente a esse novo sistema é que, dependendo da forma como é utilizado, pode gerar mutações extremamente similares ou idênticas às induzidas ou espontâneas encontradas em organismos existentes na natureza, tornando-se quase impossível a distinção entre as mesmas (ARAKI et al., 2014).

No cenário mundial, a Argentina foi pioneira em regulamentar os produtos obtidos pelo uso de CRISPR baseando-se na divisão dos produtos gerados por essa técnica em 3 categorias: NSD1 - Pequenos *indels* resultando em mutações randômicas sítio específicas sem recombinação homóloga; NSD2- Substituições específicas de um ou poucos nucleotídeos, com recombinação homóloga; NSD3 – Inserções sítio-direcionadas de transgenes (PEREIRA, 2016). Nessa categorização são levados em consideração apenas casos onde o complexo CRISPR/CAS9 é totalmente removido do sistema e apenas os produtos da categoria NSD1 ficam livres de regulamentação enquanto NSD3 é mantido e NSD2 será analisado caso a caso. Outros países como Austrália e Nova Zelândia posteriormente seguiram o mesmo conceito enquanto países como Canadá e EUA optaram pela regulamentação de todos os materiais (PEREIRA, 2016). No Brasil, a Comissão Técnica de Biossegurança (CTNBio) é quem vai determinar como esse tipo de produto será tratado, mas a grande tendência é que sigam o modelo de categorização.

2.2. Transformação Transiente para Avaliação da Frequência de Mutação

A expressão transiente consiste na expressão de um DNA não integrado por um curto período de tempo, e tem sido amplamente utilizada desde o final dos anos 80

devido à sua facilidade e versatilidade (JONES et al., 2009) para avaliação de construções vetoriais, expressão gênica, atividade de promotores, localização de proteínas, compreensão de funções celulares, etc. (NANJAREDDY et al., 2016). Em casos em que a abordagem estável é ineficiente, bem como quando há necessidade de uma avaliação fácil e rápida da informação genética, a transformação transiente tornou-se uma estratégia importante na pesquisa de genômica funcional e tem sido utilizada para várias espécies e aplicações (ZHONG et al., 2016). No entanto, a eficiência de transformação transiente também varia entre diferentes espécies e tecidos em plantas (KRENEK et al., 2015). Alguns protocolos foram publicados para expressão transiente em citros, utilizando protoplastos (VARDI et al., 1990), frutas (AHMAD; MIRZA, 2005) e epicótilos (BESPALHOK FILHO et al., 2003), mas as folhas ainda são atualmente o tecido mais utilizado. O método foi descrito em folhas em plantas de pomelo usando GFP para elucidar a função do gene *AvrGf1* (FIGUEIREDO et al., 2011) e, mais tarde, Jia e Wang (2014b) propuseram a adição de um pré-tratamento com *Xanthomonas citri* subsp. *citri* para aumentar a expressão de β -glucuronidase (GUS) em cinco variedades de citros. Mais recentemente, um novo estudo investigou os fatores que afetam a expressão transiente, como a composição do tampão de infiltração, a densidade celular de *Agrobacterium*, o estágio de desenvolvimento da folha, a temperatura de incubação e o genótipo da planta (FANG et al., 2016). Este trabalho indicou vários parâmetros ótimos para a transformação transiente e observa que a laranja doce é uma das variedades de citros menos eficientes para a expressão transiente.

LITERATURA CITADA

AHMAD, M.; MIRZA, B. An Efficient Protocol for Transient Transformation of Intact Fruit and Transgene Expression in Citrus. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 23, n. December, p. 419a–419k, 2005.

ARAKI, M.; ISHII, T. Towards social acceptance of plant breeding by genome editing. **Trends in Plant Science**, v. 20, n. 3, p. 145–149, 2015.

ARAKI, M.; NOJIMA, K.; ISHII, T. Caution required for handling genome editing technology. **Trends in Biotechnology**, v. 32, n. 5, p. 234–237, 2014.

BESPALHOK FILHO, J. C.; KOBAYASHI, A. K.; PEREIRA, L. F. P.; GALVÃO, R. M.; VIEIRA, L. G. E. Transient gene expression of beta-glucuronidase in citrus thin epicotyl transversal sections using particle bombardment. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, n. 1, p. 1–6, 2003.

BIBIKOVA, M.; GOLIC, M.; GOLIC, K. G.; CARROL, D. Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. **Genetics**, v. 161, n. 3, p. 1169–1175, 2002.

BIBIKOVA, M. BEUMER, K.; TRAUTMAN, J. K.; CARROLL, D. Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. **Science** v. 300, n. 5620, p. 764, 2003.

BOLOTIN, A.; QUINQUIS, B.; SOROKIN, A.; EHRLICH, S. D. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. **Microbiology**, v. 151, n. 8, p. 2551–2561, 2005.

BORDIGNON, R.; MEDINA FILHO, H. P.; BALLVÉ, R. M. Melhoramento genético de citros no Instituto Agronômico. **Laranja**, v. 11, p. 167–176, 1990.

BORTESI, L.; FISCHER, R. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 1, p. 41–52, 2015.

CHAPMAN, J. R.; TAYLOR, M. R. G.; BOULTON, S. J. Playing the End Game: DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice. **Molecular Cell**, v. 47, n. 4, p. 497–510, 2012.

CHAR, S. N.; NEELAKANDAN, A. K.; NAHAMPUN, H.; FRAME, B.; MAIN, M.; SPALDING, M. H.; BECRAFT, P.W.; MEYERS, B.C.; WALBOT, V.; WANG, K.; YANG, B. An Agrobacterium-delivered CRISPR/Cas9 system for high-frequency targeted mutagenesis in maize. **Plant Biotechnology Journal**, v. 15, n. 2, p. 257–268, 2017.

CHRISTIAN, M.; CHRISTIAN, M.; CERMAK, T.; DOYLE, E. L.; SCHMIDT, C.; ZHANG, F.; HUMMEL, A.; BOGDANOVA, A. J.; VOYTAS, D. F. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. **Genetics**, v. 186, n. 2, p. 756–761, 2010.

CONAB. **Receita bruta dos produtores rurais brasileiros**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_03_28_11_07_21_receita_bruta_volume_7.pdf>.

CONG, L.; RAN, F. A.; COX, D.; LIN, S.; BARRETTO, R.; HSU, P. D.; WU, X.; JIANG, W.; MARRAFFINI, L. A. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. **Science**, v. 339, n. 6121, p. 819–823, 2013.

COOPER, W. C.; REECE, P. C.; FURR, J. R. Citrus breeding in Florida - Past, present and future. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, v. 75, p. 5–13, 1962.

DE OLIVEIRA, M. L. P.; MOORE, G.; THOMSON, J. G.; STOVER, E. Agrobacterium-Mediated Transformation of Mexican Lime (*Citrus aurantifolia* Swingle) Using Optimized Systems for Epicotyls and Cotyledons. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 6, n. November, p. 657–668, 2015.

EMBRAPA. **Sistema de Produção de Citros para o Nordeste**. 2008.

ENDO, M.; MIKAMI, M.; TOKI, S. Allelic Gene Targeting in Rice. **Plant physiology**, v. 170, n. 2, p. 667–77, 2016.

FANG, L.; SU MING, D.; ZI NIU, D.; DA ZHI, L.; NA, L.; YI, L.; GENTILE, A. Evaluation of parameters affecting Agrobacterium-mediated transient expression in citrus. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 16, n. 3, p. 572–579, 2016.

FAO. Citrus Fruit Statistics 2015. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, p. 53, 2015.

FENG, C.; YUAN, J.; WANG, R.; LIU, Y.; BIRCHLER, J. A.; HAN, F. Efficient Targeted Genome Modification in Maize Using CRISPR/Cas9 System. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 43, n. 1, p. 37–43, 2016.

FENG, Z.; ZHANG, B.; DING, W.; LIU, X.; YANG, D-L.; WEI, P.; CAO, F.; ZHU, S.; ZHANG, F.; MAO, Y.; ZHU, J-K. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. **Cell Research**, v. 23, n. 10, p. 1229–1232, 2013.

FIGUEIREDO, J. F. L. RÖMER, P.; LAHAYE, T.; GRAHAM, J. H.; WHITE, F. F.; JONES, J. B. Agrobacterium-mediated transient expression in citrus leaves: A rapid tool for gene expression and functional gene assay. **Plant Cell Reports**, v. 30, n. 7, p. 1339–1345, 2011.

FUNDECITRUS. Tree inventory and orange production forecast for the 2017-2018 season of the são paulo and west-southwest of minas gerais citrus belt. Disponível em: http://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes_relatorios/2017_12_05_Tree_Inventory_and_Orange_Production_Forecast_2017-20181.pdf. 2017

GOLDENBERG, L.; YANIV, Y.; PORAT, R.; CARMI, N. Effects of gamma-irradiation mutagenesis for induction of seedlessness, on the quality of mandarin fruit. **Food and Nutrition Sciences**, v. 5, p. 943–952, 2014.

HAHN, F.; MANTEGAZZA, O.; GREINER, A.; HEGEMANN, P.; EISENHUT, M.; WEBER, A. P. M. An Efficient Visual Screen for CRISPR/Cas9 Activity in Arabidopsis thaliana. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. January, p. 39, 2017.

HORVATH, P.; BARRANGOU, R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. **Science**, v. 327, p. 167–70, 2010.

HUQ, M. A.; AKTER, S.; JUNG, Y. J.; NOU, S.; CHO, Y. G.; KANG, K. K. Genome Sequencing, a Milestone for Genomic Research and Plant Breeding. **Plant Breeding**, v. 4, n. 1, p. 29–39, 2016.

IBGE. Indicadores IBGE - Estatística da Produção Agrícola. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2017.

INTERNATIONAL CITRUS GENOME, C. **INTERNATIONAL CITRUS GENOME CONSORTIUM**.

ISHINO, Y.; SHINAGAWA, H.; MAKINO, K.; AMEMURA, M.; NAKATA, A. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product. **Journal of bacteriology**, v. 169, n. 12, p. 5429–33, 1987.

JACOBS, T. B.; LAFAYETTE, P. R.; SCHMITZ, R. J.; PARROTT, W. A. Targeted genome modifications in soybean with CRISPR/Cas9. **BMC Biotechnology**, v. 15, p. 16, 2015.

JAIN, S. M. Mutagenesis in crop improvement under the climate change. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 15, n. 2, p. 88–106, 2010.

JIA, H.; ORBOVIC, V.; JONES, J. B.; WANG, N. Modification of the PthA4 effector binding elements in Type I CsLOB1 promoter using Cas9/sgRNA to produce transgenic Duncan grapefruit alleviating XccΔpthA4: DCsLOB1.3 infection. **Plant Biotechnology Journal**, v. 14, n. 5, p. 1291–1301, 2016.

JIA, H.; ZHANG, Y.; ORBOVIĆ, V.; XU, J.; WHITE, F.F.; JONES, J. B.; WANG, N. Genome editing of the disease susceptibility gene CsLOB1 in citrus confers resistance to citrus canker. **Plant Biotechnology Journal**, v. 15, n. 7, p. 817–823, 2017.

JIA, H.; WANG, N. Targeted genome editing of sweet orange using Cas9/sgRNA. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014a.

JIA, H.; WANG, N. Xcc-facilitated agroinfiltration of citrus leaves: a tool for rapid

functional analysis of transgenes in citrus leaves. **Plant Cell Reports**, v. 33, n. 12, p. 1993–2001, 2014b.

JIANG, W.; ZHOU, H.; BI, H.; FROMM, M.; YANG, B.; WEEKS, D. P. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 20, p. 1–12, 2013.

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, n. August, p. 816–822, 2012.

JONES, H. D.; DOHERTY, A.; SPARKS, C. A. Transient Transformation of Plants. In: **Methods in Molecular Biology, Plant Genomics**. [s.l: s.n.]. v. 513p. 131–152.

KIM, Y. G.; CHA, J.; CHANDRASEGARAN, S. Srinivasan Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 3, p. 1156–1160, 1996.

KRENEK, P.; SAMAJOVA, O.; LUPTOVCIK, I.; DOSKOCILOVA, A.; KOMIS, G.; SAMAJ, J. Transient plant transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: Principles, methods and applications. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 1024–1042, 2015.

LI, J.-F.; LI, NORVILLE, J.E.; AACH, J.; MCCORMACK, M.; ZHANG, D.; BUSH, J.; CHURCH, G. M.; SHEEN, J. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in Arabidopsis and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 8, p. 688–691, 2013.

LI, X.; XIE, R.; LU, Z.; ZHOU, Z. The Origin of Cultivated Citrus as Inferred from Internal Transcribed Spacer and Chloroplast DNA Sequence and Amplified Fragment Length Polymorphism Fingerprints. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 135, n. 4, p. 341–350, 2010.

LI, Z.; LIU, Z.-B.; XING, A.; MOON, B. P.; KOELLHOFFER, J. P.; HUANG, L.; WARD, R. T.; CLIFTON, E.; FALCO, S. C.; CIGAN, M. Cas9-guide RNA Directed Genome Editing in Soybean. **Plant Physiology**, v. 169, n. October, p. pp.00783.2015, 2015.

LIANG, Z.; CHEN, K.; LI, T.; ZHANG, Y.; WANG, Y.; ZHAO, Q.; LIU, J.; ZHANG, H.; LIU, C.; RAN, Y.; GAO, C. Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. **Nature Communications**, v. 8, n. January, p. 1–5, 2017.

LIN, D.-B.; YAN, Q.-S.; SHEN, D.-X. Selection of cold tolerant somaclonal variant from *Citrus sinensis* cv. Jincheng and genetic stability evaluation of its cold tolerance. **Acta Botanica Sinica**, v. 41, n. 2, p. 136–141, 1999.

LIU, C.; SRIHARI, S.; CAO, K. A. L.; CHENEVIX-TRENCH, G.; SIMPSON, P. T.; RAGAN, M. A.; KHANNA, K. K. A fine-scale dissection of the DNA double-strand break repair machinery and its implications for breast cancer therapy. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 10, p. 6106–6127, 2014.

LIU, X.; WU, S.; XU, J.; SUI, C.; WEI, J. Application of CRISPR/Cas9 in plant biology. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 7, n. 3, p. 292–302, 2017.

LIU, Y.; HEYING, E.; TANUMIHARDJO, S. A. History, Global Distribution, and Nutritional Importance of Citrus Fruits. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, n. 6, p. 530–545, 2012.

LOPES, J. M. S.; DÉO, T. F.G.; ANDRADE, B.J.M.; GIROTO, M.; FELIPE, A.L.S.; JUNIOR, C.E.I.; BUENO, C.E.M.S.; SILVA, T.F; LIMA, F.C.C. Importância Econômica Do Citros No Brasil. **Revista Científica Eletrônica De Agronomia**, p. 0–2, 2011.

LOWDER, L. G.; ZHANG, D.; BALTES, N. J.; PAUL, J. W.; TANG, X.; ZHENG, X.; VOYTAS, D. F.; HSIEH, T-F.; ZHANG, Y.; QI, Y. A CRISPR/Cas9 Toolbox for Multiplexed Plant Genome Editing and Transcriptional Regulation. **Plant physiology**, v. 169, n. 2, p. 971–85, 2015.

MACHADO, M. A; CRISTOFANI, M.; AMARAL, A.M.; OLIVEIRA, A.C.Genética, melhoramento e biotecnologia de citros. In: MATTOS JR. D.; NEGRI, J.D; PIO, R. M. P. J. J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico: Fundag, 2005. p. 243–246.

MAKAROVA, K. S.; HAFT, D. H.; BARRANGOU, R.; BROUNS, S. J.; CHARPENTIER, E.; HORVATH, P.; MOINEAU, S.; MOJICA, F. J.; WOLF, Y. I.; YAKUNIN, A. F.; VAN DER OOST, J.; KOONIN, E V. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 6, p. 467–477, 2011.

MALI, P.; ESVELT, K. M.; CHURCH, G. M. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. **Nature Methods**, v. 10, n. 10, p. 957–963, 2013.

MANSOUR, S. L., THOMAS, K. R., CAPECCHI, M. R. Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: A general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. **Nature**, v. 336, p. 348–352, 1988.

MERCX, S.; TOLLET, J.; MAGY, B.; NAVARRE, C.; BOUTRY, M. Gene Inactivation by CRISPR-Cas9 in *Nicotiana tabacum* BY-2 Suspension Cells. **Frontiers in plant science**, v. 7, n. e188, p. 41, 2016.

MICHNO, J.-M.; WANG, X.; LIU, J.; CURTIN, S. J.; KONO, T. J. Y.; STUPAR, R. M. CRISPR/Cas mutagenesis of soybean and *Medicago truncatula* using a new web-tool and a modified Cas9 enzyme. **GM Crops & Food**, v. 5698, n. November, 2015.

MOJICA, F. J. M.; DÍEZ-VILLASEÑOR, C.; GARCÍA-MARTÍNEZ, J.; SORIA, E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. **Journal of Molecular Evolution**, v. 60, n. 2, p. 174–182, 2005.

MOSCOU, M. J.; BOGDANOVE, A. J. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. **Science**, v. 326, n. 5959, p. 1501, 2009.

NANJAREDDY, K.; ARTHIKALA, M-K.; 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, n. 1, p. 53, 2016.

NEKRASOV, V.; STASKAWICZ, B.; WEIGEL, D.; JONES, J. D. G.; KAMOUN, S. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 8, p. 691–693, 2013.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. **O retrato da citricultura brasileira**. p. 138, 2010.

NIEVES-CORDONES, M.; MOHAMEDA, S.; TANOIC, K.; KOBAYASHIC, N. I.; TAKAGIC, K.; VERNET, A.; GUIDERDONIB, E.; PÉRINB, C.; SENTENACA, H.; VÉRYA, A-A. Production of low-Cs⁺ rice plants by inactivation of the K⁺ transporter OsHAK1 with the CRISPR-Cas system. **The Plant Journal**, 2017.

OLIVEIRA, R. P. DE; MACHADO, M. A.; FERREIRA, E. A. Melhoramento genético de plantas cítricas. **Informe Agropecuário**, v. V.35, p. 1–9, 2014.

OMAR, A. A.; SONG, W.-Y.; GROSSER, J. W. Introduction of *Xa21*, a *Xanthomonas*-resistance gene from rice, into “Hamlin” sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] using protoplast-GFP co-transformation or single plasmid transformation. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 82, n. 6, p. 914–923, 7 jan. 2007.

PASQUAL, M.; ALVES, G. P.; DUTRA, L. F.; FINOTTI, D. R.; CHAGAS, E. A. Concentrações Do Meio Ms E Da Sacarose/In Vitro Culture Of Poncã Mandarin Immature Embryos: Ms Medium And Sucrose Concentrations. **Ceres**, v. 49, n. 282, 2015.

PENG, A.; CHEN, S.; LEI, T.; XU, L.; HE, Y.; WU, L.; YAO, L.; ZOU, X. Engineering canker-resistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the susceptibility gene CsLOB1 promoter in citrus. **Plant Biotechnology Journal**, p. 1–11, 2017.

PEREIRA, T. C. **Introdução á técnica de CRISPR**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 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, n. 3, p. 653–663, 2005.

RAN, F. A.; HSU, P. D.; LIN, C. Y.; GOOTENBERG, J. S.; KONERMANN, S.; TREVINO, A. E.; SCOTT, D. A.; INOUE, A.; MATOBA, S.; ZHANG, Y.; ZHANG, F. Double nicking by RNA-guided CRISPR cas9 for enhanced genome editing specificity. **Cell**, v. 154, n. 6, p. 1380–1389, 2013.

REN, C.; LIU, X.; ZHANG, Z.; WANG, Y.; DUAN, W.; LI, S.; LIANG, Z. CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis in Chardonnay (*Vitis vinifera* L.). **Scientific Reports**, v. 6, p. 32289, 2016.

SCHERER, S.; DAVIS, R. W. Replacement of chromosome segments with altered DNA sequences constructed in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, p. 4951–4955, 1979.

SCORA, R. W. On the history and origin of Citrus. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, v. 102, p. 369–375, 1975.

SENDÍN, L. N.; ORCE, I. G.; GÓMEZ, R. L.; ENRIQUE, R.; GRELLET BOURNONVILLE, C. F.; NOGUERA, A. S.; VOJNOV, A. A.; MARANO, M. R.; CASTAGNARO, A. P.; FILIPPONE, M. P. Inducible expression of Bs2 R gene from *Capsicum chacoense* in sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) confers enhanced resistance to citrus canker disease. **Plant Molecular Biology**, v. 93, n. 6, p. 607–621, 2017.

SHAN, Q.; WANG, Y.; LI, J.; GAO, C. Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system. **Nature protocols**, v. 9, n. 10, p. 2395–410, 2014.

SMITHIES, O.; GREGG, R. G.; BOGGS, S. S.; KORALEWSKI, M. A.; KUCHERLAPATI, R. S. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. **Nature**, v. 317, p. 230–234, 1985.

SOOST, R.K.; ROOSE, M. L. Citrus. In: JANICK, J.; MOORE, J. N. (Ed.). . **Fruit breeding: tree and tropical fruits**. New York: J. Wiley, 1996. p. 257–323.

SUTARTO, I.; AGISIMANTO, D.; SUPRIYANTO, A. Q. Y. Development of Promising Seedless Citrus Mutants through Gamma Irradiation. In: **Induced Plant Mutations in the Genomics Era**. SUTARTO, I.p. 306–308.

SWINGLE, W.T, REECE, P. C. The botany of citrus and its wild relatives. In: **A numerical study of affinity relationships in cultivated Citrus and its close relatives**. p. 105–136.

TADEO, F. R.; CERCÓS, M.; COLMENERO-FLORES, J. M.; IGLESIAS, D. J.; NARANJO, M. A.; RÍOS, G. Molecular Physiology of Development and Quality of Citrus. **Advances in Botanical Research**, v. 47, n. 8, p. 147–223, 2008.

THOMAS, K. R.; FOLGER, K. R.; CAPECCHI, M. R. High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. **Cell**, v. 44, p. 419–428, 1986.

TÜRKTAŞ, M.; KURTOĞLU, K. Y.; DORADO, G.; ZHANG, B.; HERNANDEZ, P.; ÜNVER, T. L. Sequencing of plant genomes - A review. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 39, n. 3, p. 361–376, 2015.

USDA. **Citrus: World Markets and Trade**. p. 12, 2017.

VARDI, A.; BLEICHMAN, S.; AVIV, D. Genetic transformation of citrus protoplasts and regeneration of transgenic plants. **Plant Science**, v. 69, n. 2, p. 199–206, 1990.

WEBBER, H. J.; REUTHER, W.; LAWTON, H. W. History and development of the citrus industry. In: REUTHER, W.; WEBBER, H. J.; BATCHELOR, L. D. (Eds.). . **The citrus industry**. 1. ed. Berkeley: [s.n.]. p. 1–39.

WU, G. A. et al. Sequencing of diverse mandarin, pummelo and orange genomes reveals complex history of admixture during citrus domestication. **Nature biotechnology**, v. 32, n. 7, p. 656–662, 2014.

YAN, L.; WEI, S.; WU, Y.; HU, R.; LI, H.; YANG, W.; XIE, Q. High-Efficiency Genome Editing in Arabidopsis Using YAO Promoter-Driven CRISPR/Cas9 System. **Molecular Plant**, v. 8, n. 12, p. 1820–1823, 2015.

ZHONG, L.; ZHANG, Y.; LIU, H.; SUN, G.; CHEN, R.; SONG, S. Agrobacterium-mediated transient expression via root absorption in flowering Chinese cabbage. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, p. 1825, 2016.

ZHOU, H.; LIU, B.; WEEKS, D. P.; SPALDING, M. H.; YANG, B. Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 17, p. 10903–10914, 2014.

ZHU, J.; SONG, N.; SUN, S.; YANG, W.; ZHAO, H.; SONG, W.; LAI, J. Efficiency and Inheritance of Targeted Mutagenesis in Maize Using CRISPR-Cas9. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 43, n. 1, p. 25–36, 2016.

CAPÍTULO 1. Construção de vetores CRISPR com alvo em genes relacionados a doenças dos Citros

1. Resumo

A citricultura é de extrema importância pois é uma grande atividade geradora de emprego, contribuindo assim para o desenvolvimento socioeconômico do país. Entretanto, um dos fatores que atualmente ainda gera grandes prejuízos aos citricultores, são os graves problemas de ordem fitossanitária enfrentados por essa cultura, decorrentes de sua vulnerabilidade a pragas e doenças. Dentre as principais doenças destaca-se historicamente a Tristeza do Citros (CTV) responsável pela dizimação de cerca de 10 milhões de árvores no início do século XX e pela substituição do principal porta-enxerto da época, a laranja azeda, por outras opções, como limão cravo. Outra doença importante é o Cancro Cítrico, que vem afetando os pomares citrícolas desde meados dos anos 70, afetando todas as espécies e variedades de citros de importância comercial, causando desfolha de plantas, lesões em frutos, queda prematura de frutos e restrição da produção para áreas livres da doença. Uma das tecnologias promissoras para a geração de indivíduos tolerantes a essas doenças é a edição de genomas, na qual a utilização de CRISPR/CAS9 tem sido reportada desde 2013, inclusive de plantas, possibilitando a criação de mutantes para genes específicos ou substituição de fragmentos genômicos. Até o presente momento, existem trabalhos de dois grupos no qual esta tecnologia foi usada para gerar plantas mutantes de citros. Entretanto, a aplicação desta

tecnologia poderia ser melhor explorada para levar estudos de citros no Brasil a um outro patamar, com possibilidade de gerar novas variedades. Assim, este projeto tem como objetivo o estabelecimento desta tecnologia para estudos funcionais de citros, através da obtenção de vetores para edição de genomas focados em genes relacionados a resistência ao Cancro Cítrico *CTV*, para estudo genotípico e fenotípico desses mutantes.

2. Introdução

A citricultura é um setor de grande importância para a economia do Brasil, sendo significativa fonte geradora de empregos diretos e indiretos, além de responsável por uma alta movimentação financeira todos os anos (LOPES et al., 2011; NEVES et al., 2010). Dentre as frutas cítricas, destaca-se a laranja, na qual o Brasil é o maior produtor mundial, com uma produção anual de quase 50 milhões de toneladas no ano safra 2016-2017 (FUNDECITRUS, 2017).

Apesar disso, a obtenção de indivíduos superiores para essa cultura ainda é bastante limitada, devido principalmente as dificuldades inerentes à sua biologia associadas a esterilidade e incompatibilidade sexual, longa juvenilidade, grande porte das plantas, além de sua baixíssima diversidade genética. Tais dificuldades fazem com que os citros se tornem bastante vulneráveis a pragas e doenças que afetam a cultura, fazendo com que a citricultura enfrente graves problemas de ordem fitossanitária, gerando grande prejuízos aos citricultores.

Dentre essas doenças, uma das mais importantes historicamente é a Tristeza do Citros, causada por um vírus pertencente ao gênero *Closterovirus*, conhecido como *CTV* ("Citrus Tristeza Virus"), que é transmitido por material propagativo infectado e por afídeos. Essa doença afetou de forma significativa a citricultura no início do século XX, dizimando cerca de 10 milhões de árvores (FIGUEIREDO, 2008) e obrigando os produtores a trocarem o principal porta-enxerto da época, a laranja azeda, por outras opções, como limão cravo (CARLOS et al., 1997), que não apresentam características agrônomicas e produtividade igual ao do anterior. Outra espécie que apresenta resistência natural ao *CTV* é *Poncirus trifoliata*, que foi usado para estudos em que mapearam uma região genômica responsável por esta resistência (DENG et al., 2001; FANG et al., 1998). O sequenciamento desta região mostrou a existência de vários genes de resistência (YANG et al., 2003), dentre os quais quatro determinam maior tolerância ao *CTV*, quando super-expressos em

citrus (RAI, 2006). Experimentos de super-expressão dão um indicativo da função de determinado gene mas para que se tenha pleno conhecimento da biologia, é importante complementar-se os estudos com experimentos de perda de função, o que pode ser feito através de edição de genomas.

Outra doença que ameaça significativamente a citricultura mundial é o Cancro Cítrico, causada prioritariamente pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, e que afeta todas as espécies e variedades de citros de importância comercial, causando desfolha de plantas, lesões em frutos, queda prematura de frutos e restrição da produção para áreas livres da doença (FUNDECITRUS, 2016). Em meados dos anos 70, comprometeu de forma preocupante os pomares citrícolas paulistas, o que fez com que o governo federal interviesse criando a Campanha Nacional de Erradicação do Cancro Cítrico, que incluía diversas medidas de controle e prevenção da doença (BARBOSA; GITAHY, 2016). Atualmente, o cancro cítrico é tratado até como uma epidemia (EXAME, 2015) devido a um aumento crescente da incidência da doença no Estado de São Paulo, que faz com que os custos de manejo projetados para 20 anos variassem de 500 milhões a 3,5 bilhões de reais, dependendo dos níveis de erradicação utilizados (SANCHES et al., 2014).

Na busca pela resistência a essas e outras doenças dos citros, há uma necessidade eminente no desenvolvimento de novas tecnologias que permitam a exploração do potencial genético dessa cultura. Dentre essas tecnologias, a transgenia tem se mostrado uma importante estratégia, uma vez que o avanço genético se dá de maneira muito mais precisa que o melhoramento convencional (MACHADO et al., 2005; PASQUAL et al., 2015), porém a estratégia mais atual que ganhou muito espaço nos últimos anos é a edição de genomas via CRISPR/CAS9 que se baseia em um sistema de defesa de algumas bactérias e pode ser utilizado facilmente para gerar mutações em uma região específica do genoma, e consequentemente possível silenciamento gênico (JINEK et al., 2012).

Diante deste quadro, a proposta deste trabalho foi desenvolver vetores CRISPR/CAS9 com alvos em genes relacionados ao cancro cítrico e *CTV*, afim de possibilitar estudos que determinem o papel funcional desses genes e compreendam os mecanismos de resistência, além de facilitar uma futura obtenção de fenótipos mutantes de interesse. Para isso, um dos alvos utilizados foram genes de terpeno sintase, que segundo estudos anteriores, uma vez suprimidos, poderiam levar a um redirecionamento das vias metabólicas com consequente favorecimento

da produção de terpeno álcoois, que por sua vez são tóxicos a microrganismos como a *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (RODRIGUEZ et al., 2011; SHIMADA et al., 2017). Por outro lado, genes de uma região previamente identificada como QTL ligada a resistência ao CTV em *Poncirus trifoliata* (DENG et al., 2001; FANG; FEDERICI; ROOSE, 1998; YANG et al., 2003), também foram utilizados como alvo para elucidação da contribuição individual de cada um deles na resistência a essa doença.

3. Materiais e Métodos

3.1. Linhagens Bacterianas, Vetores E Primers Utilizados

Neste trabalho foi utilizada a linhagem DH5 α [Δ lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rK-mK+) supE44 thi-1 gyrA96 relA1] de *E. coli* e a linhagem AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens*.

Os vetores para transformação de plantas foram gentilmente cedidos pelo Dr. Puchta (Karlsruher Institut für Technologie) sendo estes pCAS9-TPC e pChimera (FAUSER et al., 2014; SCHIML et al., 2014).

Os primers utilizados nesse capítulo encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1: Primers utilizados neste trabalho.

Nome do Primer	Sequências 5'-3'	Orientação
SS129	CACAGGAAACAGCTATGAC	Rv
SS42	TCCCAGGATTAGAATGATTAGG	Fw
SS43	CGACTAAGGGTTTCTTATATGC	Rv
SgRNA+NheSite_FW	CCAGAGCTCGCTAGCCTTTTTTTC	Fw
SgRNA+NheSite_RV	CTCCAGGTACCGCTAGCTAATGCC	Rv

3.2. Meio de cultura bacteriana

Neste trabalho foi usado meio de cultura LB (1% triptona, 0,5% extrato de levedura, e 1% NaCl) para *E. coli* e para *A. tumefaciens* (suplementado com rifampicina 30 ug/mL para seleção). Para meio sólido, foram adicionados 2% ágar.

3.3. Transformação de *E. coli*

Células competentes de *E. coli* DH5 α foram preparadas através de seguidas lavagens das mesmas com glicerol 1% a 4°C. Cinco microlitros das ligações foram usados para transformação misturando-se a 100 μ L de suspensão de células da linhagem bacteriana em uma cuveta própria para eletroporação (BioRad). A cuveta foi inserida no eletroporador (MicroPulser - BioRad) e submetida a uma voltagem de 3.0 kV sendo logo em seguida adicionado 1 mL de meio LB pré-aquecido. Os tubos foram incubados a 37°C por 1 hora com agitação (250 rpm) e 300 μ L de células foram plaqueados em 3 placas com meio LB (1% NaCl, 1% triptona, 0,5% extrato de levedura, pH 7,0, 2% ágar) contendo 100 μ g/mL do antibiótico de seleção (ampicilina para seleção do pChimera e espectinomicina para seleção do pCAS9-TPC). As placas foram incubadas durante a noite em estufa a 37°C.

3.4. Minipreparação de Plasmídeos

O kit de purificação Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) foi utilizado segundo protocolo do fabricante.

3.5. Clonagem de sgRNAs

Oligonucleotídeos para os sgRNAs de genes codificando proteínas com similaridade a limoneno sintase foram sintetizados de acordo com as sequências encontradas utilizando-se o programa CRISPR-P (<http://cbi.hzau.edu.cn/crispr/>). Foram selecionadas duas sequências para cada gene e a estas foram adicionadas as seguintes sequências: 5'-ATTG no primer sense e 5'-AAAC no primer antisense.

Para cada sequência-guia, foram sintetizados um par de oligonucleotídeos (Sigma). A adição dos 4 nucleotídeos nas extremidades de cada oligo, se faz necessária para gerar extremidades protuberantes complementares às geradas na digestão do vetor pChimera com a enzima *Bp*I (Thermo Scientific).

O par de oligos foi hibridizado misturando-se 0,1 nmol de cada oligo em um volume final de 50 μ L seguido por incubação por 5 min a 95°C e resfriado a temperatura ambiente, gerando dupla fitas de DNA com a sequência desejada. As 42 sequências selecionadas neste trabalho foram hibridizadas, quantificadas em Nanodrop (Thermo Scientific) e guardadas a -20°C para posterior clonagem no vetor pChimera.

O vetor pChimera foi linearizado com a enzima *Bp*I para posterior clonagem das sequências previamente selecionadas utilizando-se a enzima T4 DNA ligase (New

England Biolabs). Os transformantes foram avaliados por PCR de colônia com o GoTaq® Green Master Mix (Promega), conforme instruções do fabricante. Os sgRNAs foram isolados do vetor através de uma reação de PCR com primers flanqueadores SgRNA+NheSite_FW e SgRNA+NheSite_RV (Tabela 1) e posteriormente digeridos com a enzima *NheI* para serem subclonados em pCAS9-TPC, previamente linearizado com *XbaI*. A reação de ligação foi incubada por pelo menos 16 horas a 16°C. As ligações foram testadas antes de serem usadas para transformação de *E. coli* através de PCR utilizando-se os primers SS42 e SS43 (Tabela 1). Após a transformação, as colônias obtidas foram testadas em PCR de colônia, como anteriormente e através de digestão das minipreparações de plasmídeo com *EcoRV*.

3.6. Transformação Genética

Os vetores plasmidiais contendo as construções de interesse foram transformados em células competentes da estirpe AGL1 de *A. tumefaciens* via choque térmico, seguindo protocolo previamente estabelecido (LACORTE; ROMANO, 1998) utilizando-se 1 µg do vetor.

Após a transformação, a suspensão de *A. tumefaciens* foi plaqueada em meio de cultura LB sólido, suplementado com espectinomicina (100 mg/L) e rifampicina (30 mg/L), e cultivada a 27°C, por 72 h. A presença dos transgenes foi confirmada por PCR utilizando-se dos primers SS42 e SS43. Os clones confirmados foram guardados em forma de cultura permanente para posterior utilização para transformação de plantas.

4. Resultados e Discussão

4.1. Seleção de genes de interesse e sequências-guia

Os possíveis genes codificantes de terpeno sintases em *C. sinensis*, foram selecionados a partir de uma busca no genoma da espécie, disponível em <http://citrus.hzau.edu.cn/orange/index.php>, utilizando-se como a palavra-chave “limonene”. De todos os 62 genes únicos identificados, 17 foram selecionados como possíveis alvos, por já estarem disponíveis no banco de clones do Centro de Citricultura Sylvio Moreira. Através do programa CRISPR-P foram usados como “template” para a busca por sequências guia associadas a regiões PAM. Foram

selecionadas duas sequências guia para cada gene, totalizando 34 alvos CRISPR para possíveis genes de terpeno sintase (Tabela 2).

O programa possui um banco de dados com genomas de algumas espécies de plantas para permitir a análise dos possíveis alvos “off-target”, porém uma vez que algumas sequências são similares a outras presentes no genoma, as edições guiadas por essas sequências poderão levar a um processamento múltiplo, ou seja, com alterações em uma ou mais sequências além do gene de interesse. As sequências que possuíam similaridade com as demais regiões do genoma estão marcadas na Tabela 2.

Os possíveis genes de resistência ao CTV em *P. trifoliata*, foram selecionados a partir de uma região identificada e estudada em trabalhos anteriores de mapeamento genético (DENG et al., 2001; FANG et al., 1998; YANG et al., 2003, 2001) e super-expressão em outras cultivares (RAI, 2006). As correspondentes sequências guia para os genes identificados por Rai, 2006 foram obtidas da mesma maneira que para os genes de terpeno sintases, totalizando 8 sequências alvos CRISPR para possíveis genes de resistência a CTV em *P. trifoliata* (Tabela 2).

Tabela 2: Sequências-guia para sgRNA de possíveis genes codificadores de terpeno sintase e resistência a CTV.

Gene	Sequências guia (A/B)
Terpeno Sintase (<i>Citrus sinensis</i>)	
Cs2g03570	GGTTCACGTCTGGCCCTCTT / GGTTCACGTCTGGCCCTCTT
Cs2g07230	GCCTTCACTACTTGTTTAAA / GCTCTATTTGTGGAAAGTAG
Cs3g04170	GAAGGTGAATGCATACACAG ¹ / GTTTCGGTGTGTACTTGCTA ¹
Cs3g04190	GAGATGCTGTGAAAGCCATG / GCTTTGCAGCATCCTTCTTA
Cs3g04260	GCTATTGATACCAGTCCAAA / GGTTTTGTTACATTTCTTT
Cs3g04340	GTACGGAGCATGGGGAGCAT ² / GCTCCCATGCTCCGTACGA ²
Cs3g04360	GAAGGTGAATGCATACACAG ³ / GTTTCGGTGTGTACTTGCTA ³
Cs3g04390	GAGCATGGGGATAGGGTCTG / GCCGCTGTTGAGATGTTTGT
Cs3g04410	GCCAACGCACATACCTTTCT / GCGTTGGCGTGTACTCACCA
Cs5g22980	GAGCTTTGCCAGGAGCAGAT / GGAAGTTACCAATCTGCTCC
Cs5g22990	GAGTGTGACCAATAAGCCTC / GAGGCTCAAACGCAATCCCC
orange1.1t03904	GTACGGCCAAGGCGTGTA ⁴ / GTAACCGAGCCTGGATCAGT ⁴
orange1.1t04363	GATAGGATCTGAGCCTCGAT ⁷ / GTGTCCCCCTTTTCTCCAGG ⁷

orange1.1t04366	GATGTTTATGGAACCTTTGGA / GTATCAATAGGAGGCCCTAT ^{4,7}
orange1.1t04775	GAATAGCAAGTATACGGTAT / GTACGGAGCATGGGGAGCAT ⁵
orange1.1t05179	GGTTTAAAAGACGGCCAGGG ^{2,6} / GTTTTCAATGGTTTAAAAGA ^{2,6}
orange1.1t05236	GATAGGATCTGAGCATGCTT / GAGCTCTGCGAGGAACTGGT

Resistência a CTV (*Poncirus trifoliata*)

R-1 (g1)	GGTAGTTTAAGAAAATTGGC / GGAGCTCGTATTACAGATTC
R-2 (g7)	GGCTGAACAAAGTTCAAGGC / GGCCGAAGGAGTCTTTGAAG
R-3 (g8)	GGCTGAACGAAGTGCAATTG / GGCCGAAGGATCCTTTGCAG
R-4 (g15)	GGGAAAATAATCGACGCAA / GGCTGAACAAAGTTCAAGGC

1- Iguais a Cs3g04360; 2- Iguais a orange1.1t04775; 3- Iguais a Cs3g04170; 4- Iguais a Cs3g04190; 5- Iguais a Cs3g04340; 6- Iguais a orange1.1t04366; 7- Iguais a região intergênica

4.2. Customização do sgRNA

O vetor pChimera contém o promotor AtU6-26 seguido pela sequência que codifica o RNA quimérico ou sgRNA, além de dois sítios de restrição de *Bpi*I. Essa enzima reconhece o sítio de restrição “GAAGAC”, clivando após 2 nucleotídeos na sense e 6 nucleotídeos na fita antisense, fazendo com que as pontas protuberantes advindas de sua clivagem variem de acordo com a sequência adjacente ao sítio de restrição. No vetor pChimera o sítio de customização do sgRNA encontra-se no meio de 2 sítios *Bpi*I, fazendo com que ao ser digerido por essa enzima, ele libere um fragmento de aproximadamente 18 pb e fique com suas extremidades complementares a sequência sintética previamente sintetizada (Figura 1).

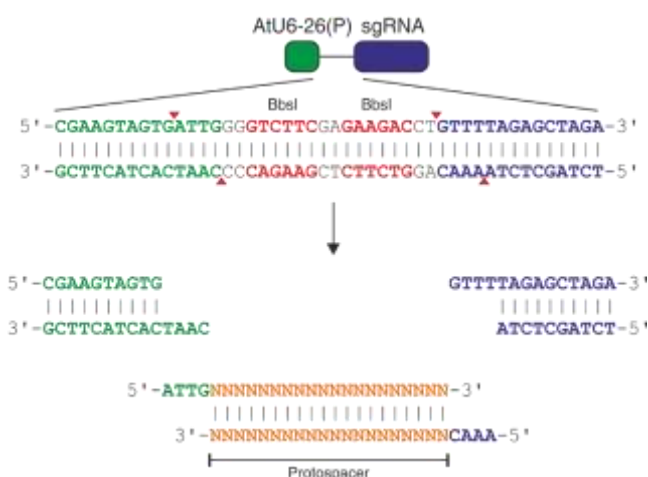


Figura 1: Clonagem do sgRNA através da enzima *Bpi*I (FAUSER et al., 2014).

Desta forma, para a customização dos sgRNAs, foi feita a digestão do vetor pChimera com a enzima *Bpi*I, seguida por sua purificação e ligação da sequência sintética desejada. As ligações foram usadas para transformação de *E. coli* DH5 α via eletroporação e as colônias transformadas foram selecionadas por cultivo em meio sólido (LB) contendo o antibiótico de seleção ampicilina a uma concentração final de 100 μ g/mL. Foi feita a confirmação das colônias transformadas através de uma reação de PCR utilizando como primers o oligo forward de cada sequência e o primer SS129 (que anela em uma região do sgRNA). O amplicon foi visualizado em gel de agarose, quando observou-se uma banda de aproximadamente 300 pb quando as transformações eram positivas (Figura 2).

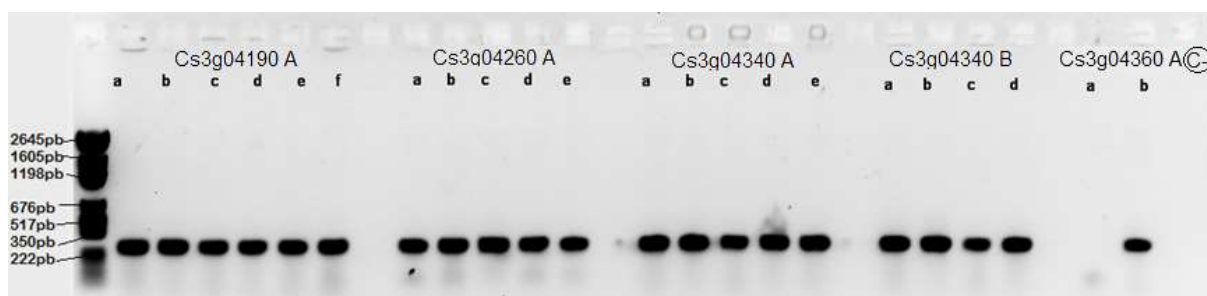


Figura 2: Exemplo de gel de agarose 0.7% mostrando o produto do PCR para confirmar a clonagem das sequências Cs3g04190A, Cs3g04260A, Cs3g04340A, Cs3g04340B, Cs3g04360A no vetor pChimera. As letras representam as colônias testadas e como controle negativo foi utilizado o vetor sem estar customizado.

Ao todo, neste trabalho, foram clonadas as 42 sequências propostas ao vetor pChimera, sendo 34 delas correspondentes a alvos de terpenos sintase e 8 correspondentes a genes de resistência a *CTV*.

4.3. Clonagem no vetor binário (pCAS9-TPC)

O vetor pCAS9-TPC contém a sequência codificante da proteína CAS9 de *Streptococcus pyogenes* sob controle do promotor *PcUBI4-2* e o terminador *Pea3A*. O protocolo de Schiml et al., (2016), sugere a clonagem do sgRNA customizado através da digestão de ambos os vetores com a enzima *Avr*II. Esta enzima lineariza o vetor pCAS9-TPC pela presença de um sítio de restrição à jusante do terminador da CAS9. Já em pChimera, há dois sítios adjacentes ao sgRNA, liberando o mesmo do backbone conforme pode ser observado na figura 3.

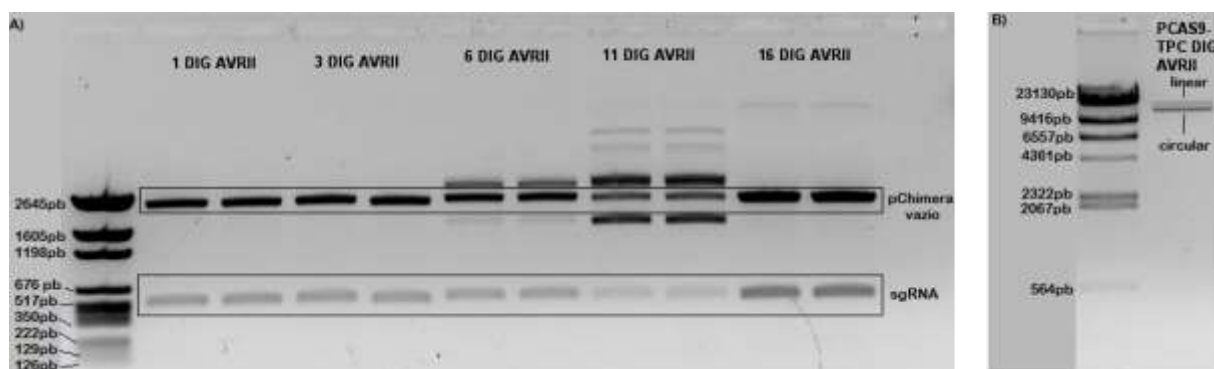


Figura 3: Digestões dos plasmídeos com *AvrII*. **A)** Exemplo de gel de agarose 0.7% resultado da digestão de vetor pChimera customizado para os genes Cs2g03570, Cs2g07230, Cs3g04170, Cs3g04340 e Cs3g04390 (sequências alvo 1, 3, 6, 11 e 16). A digestão resulta uma banda de aproximadamente 2,5Kb correspondente ao backbone do vetor e uma banda de aproximadamente 500pb correspondentes ao sgRNA customizado. O gel também mostra exemplos de digestões incompletas (Digestões 6 e 11). **B)** Exemplo de gel da digestão do vetor pCAS9-TPC. Neste exemplo também ocorreu digestão parcial do vetor.

Após a digestão do vetor pChimera com esta enzima, a banda correspondente ao sgRNA foi purificada com kit de purificação de DNA em gel (PROMEGA), porém sempre resultando em uma quantidade de DNA muito baixa (~5-15 ng/μL), dificultando sua clonagem. Várias tentativas de aumentar a quantidade de sgRNA obtida na digestão foram feitas, porém a eficiência dessa etapa se manteve muito baixa. Como agravante, a enzima *AvrII* apresentou comportamento inconsistente, gerando digestões parciais em grande parte das vezes que foi utilizada, como pode ser observado na Figura 3, o que nos levou a traçar novas estratégias para o isolamento do sgRNA.

Para aumentar a eficiência de obtenção do sgRNA customizado, primers contendo em sua extremidade um sítio de restrição de *NheI* foram desenhados flanqueando o fragmento (Tabela 1). Apesar de reconhecer um sítio diferente de *AvrII*, as extremidades protuberantes geradas na digestão por *NheI* são iguais. Alternativamente ao uso de *AvrII* para a digestão do vetor passou também a ser usada a enzima *XbaI*, que o lineariza a poucos nucleotídeos do sítio de *NheI* e também gera extremidades protuberantes complementares às de *NheI*.

Assim, foi feita uma PCR para cada sgRNA, utilizando como molde o vetor pChimera customizado desejado, e os primers sgRNA+NhesiteFw e sgRNA+NhesiteFw (Tabela 1). Foi retirada uma alíquota (~5 μL) do produto de cada reação para confirmar a amplificação do fragmento desejado através de eletroforese

em gel de agarose (Figura 4). Após a confirmação da amplificação, o restante da reação foi purificado com o kit de purificação de DNA (Promega) e, em seguida, digerido com 1 μ L da enzima *Nhe*I e 2 μ L do seu tampão correspondente por aproximadamente 2 horas a 37°C. Após a digestão, a reação foi novamente purificada para permitir a atividade da enzima T4 ligase, que é adicionada juntamente com o vetor digerido com *Xba*I. Para as ligações, foi utilizado 1 μ L (15 ng) do vetor digerido, 1 μ L (60 ng) do amplicon digerido, 5 U de T4 ligase, 2 μ L de seu tampão e 15 μ L de água milliQ autoclavada, e a reação foi incubada a 16°C por pelo menos 16 horas e posteriormente utilizadas para transformação de *E. coli* DH5 α .

Por se tratar de um vetor muito grande, a eficiência de transformação da ligação pCas9-TPC+sgRNA possui rendimento muito baixo, o que nos levou a acionar uma etapa de confirmação via PCR no processo para garantir que a ligação se deu de maneira correta. Para isso foi feita uma reação de PCR utilizando-se como molde as próprias ligações e os primers SS42 e SS43, que se ligam ao sgRNA e ao vetor pCAS9-TPC respectivamente. Um exemplo de resultado em gel de agarose desta reação pode ser observado na Figura 4, onde apenas as ligações que apresentavam a amplificação de uma banda de aproximadamente 1Kb foram usadas para transformação.

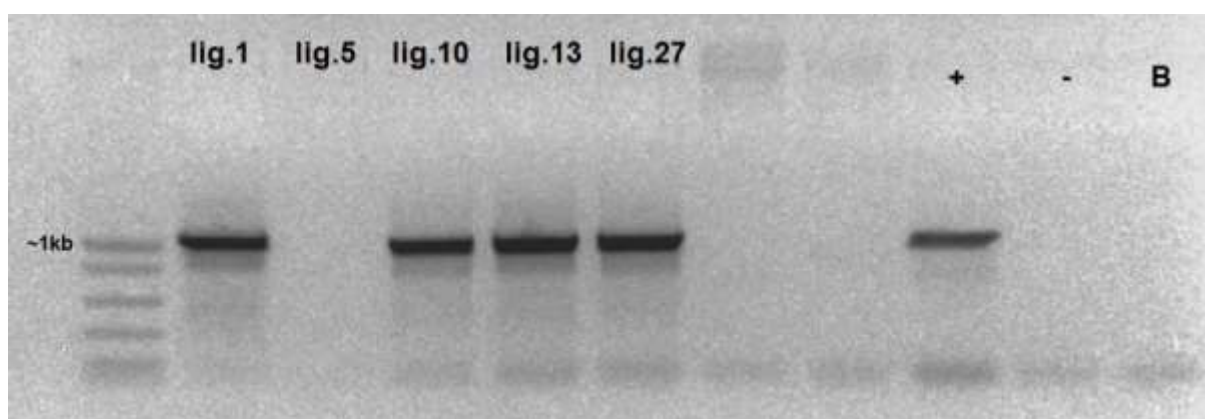


Figura 4: Exemplo de gel de agarose 0.7% resultado do PCR das ligações 1, 5, 10,13 e 27. Foi utilizado com controle positivo uma ligação previamente confirmada, como controle negativo o vetor pCAS9-TPC vazio e como branco apenas H₂O como template. No exemplo acima, apenas a ligação 5 não resultou em amplificação.

Foi possível obter duas construções de pCAS9-TPC + sgRNA, uma customizada para o gene “Cs3g04170” de limoneno sintase e uma para o gene “R-1 (g1)” de

resistência a CTV. As construções foram duplamente confirmadas, via PCR utilizando como primers SS42 e SS43 e via ensaio de restrição com a enzima *EcoRV*. Os resultados da PCR e do ensaio de restrição para os dois genes podem ser observados nas figuras 5 e 6.

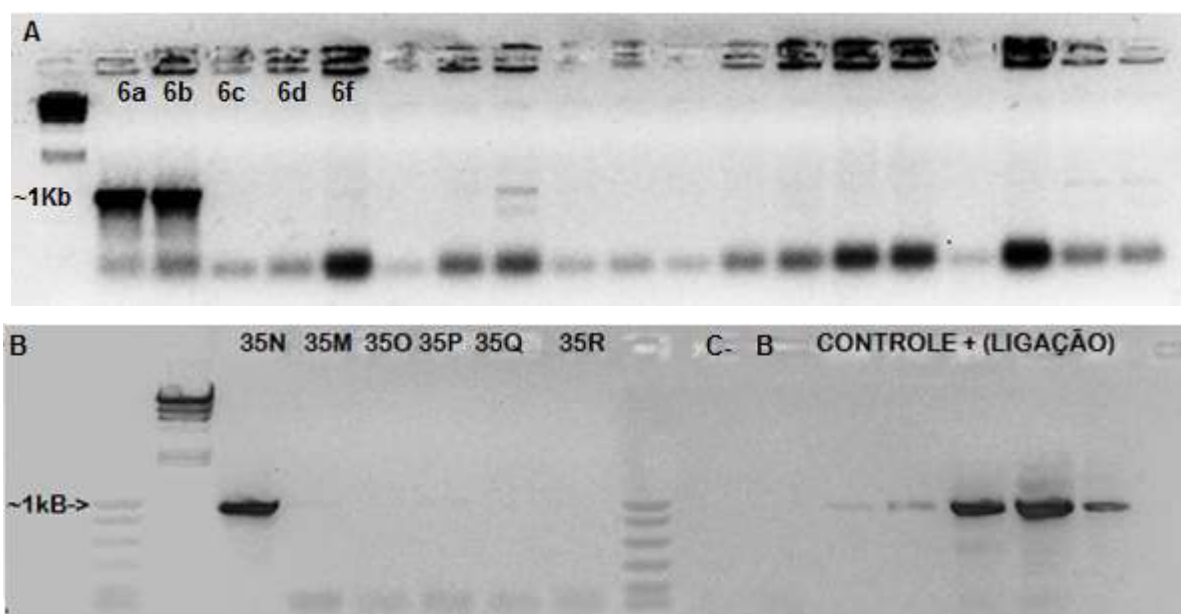
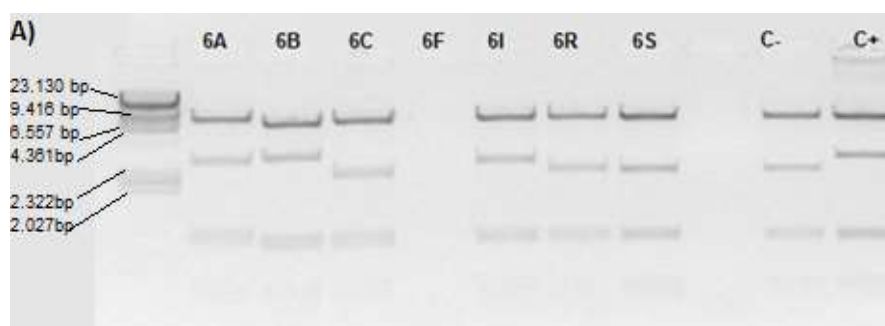


Figura 5: Teste de PCR para avaliação de construção. **A)** Gel de agarose mostrando o resultado do PCR para confirmação da clonagem do sgRNA Cs3g04170B (seq 6) no vetor pCAS9-TPC. **B)** Gel de agarose mostrando o resultado do PCR para confirmação da clonagem do sgRNA R-1 (g1)A (seq 35).



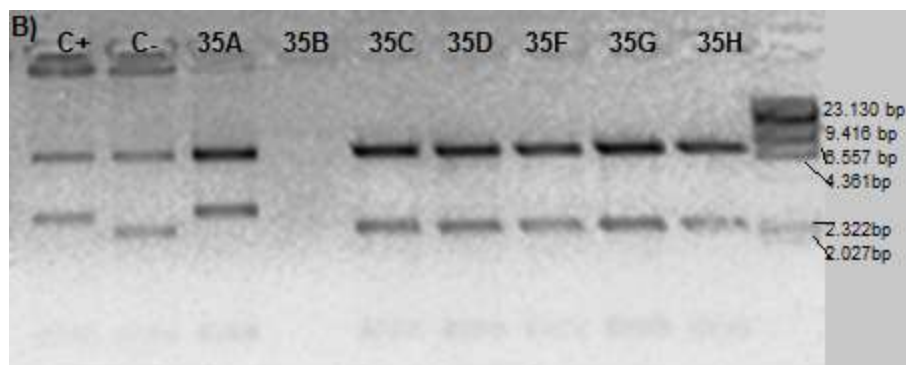


Figura 6: Teste de digestão para confirmação de construção. **A)** Gel de agarose mostrando o resultado do ensaio de restrição com a enzima *EcoRV* para confirmação da clonagem do sgRNA Cs3g04170B (seq 6) no vetor pCAS9-TPC. Nota-se que as clonagens 6A, 6B e 6I apresentam a banda menor mais alta que o controle negativo (pCas9-TPC vazio), confirmando assim a inserção do fragmento correspondente ao sgRNA. **B)** Gel de agarose mostrando o resultado do ensaio de restrição com a enzima *EcoRV* para confirmação da clonagem do R-1 (g1)A (seq 35) no vetor pCAS9-TPC. Neste gel apenas a clonagem 35 A apresenta a segunda banda mais alta que o controle negativo (pCas9-TPC vazio), confirmando assim a inserção do fragmento correspondente ao sgRNA.

4.4. Transformação de *Agrobacterium tumefaciens*

Uma vez confirmadas as construções, foram feitas culturas permanentes e miniprep de todas elas. Para transformação de *A. tumefaciens* foram utilizados 100 μ L de uma suspensão de células da estirpe AGL1 competente, onde foi acrescentado aproximadamente 1 ng da miniprep da construção desejada. A transformação se deu por choque térmico conforme descrito na metodologia, e a seleção foi feita em meio de cultura sólido LB contendo rifampicina a 30 μ g/mL e espectinomicina a 100 μ g/mL. A *A. tumefaciens* possui resistência genômica a rifampicina, o que possibilita o seu uso para evitar o crescimento de outros microrganismos, já a resistência a espectinomicina é dada pelo vetor, sendo utilizada para seleção das colônias transformadas.

Para confirmar a transformação, as colônias foram selecionadas e foi feita uma PCR com elas, utilizando os mesmos primers SS42 e SS43. Os resultados dos géis comprovando a presença dos genes “Cs3g04170” de terpeno sintase e “R-1 (g1)” de resistência a CTV pode ser observado na figura 7.

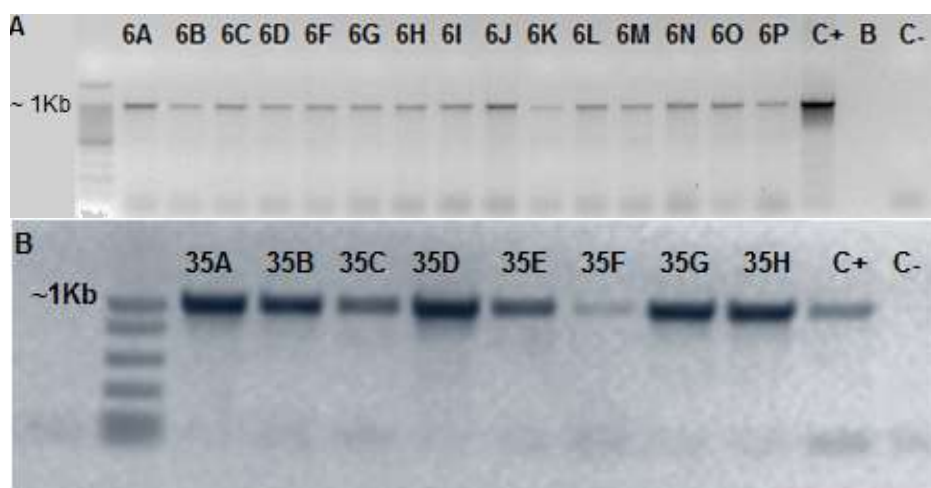


Figura 7: Confirmação da transformação de *A. tumefaciens*. **A)** Gel de agarose mostrando o resultado da PCR para confirmação da transformação de *A. tumefaciens* com a construção pCAS9-TPC + sgRNA Cs3g04170B (6A-6P) **B)** Confirmação da transformação de *A. tumefaciens* com a construção pCAS9-TPC + sgRNA R-1 (g1)A (35A-35H).

5. Conclusões

O presente trabalho resultou na seleção de 34 sequências alvos para CRISPR em 17 possíveis genes de terpeno sintases no genoma de *C. sinensis* e na seleção de 8 sequências alvos para CRISPR em 4 possíveis genes de resistência a CTV no genoma de *P. trifoliata*. Foram obtidas 24 construções, sendo 20 vetores com sgRNAs customizados para genes alvos de terpeno sintases e 4 customizados para genes de resistência a CTV.

Dos 24 sgRNAs customizados, 2 deles foram subclonados com sucesso para o vetor pCAS9-TPC, sendo eles para os genes alvos ‘Cs3g04170” de terpeno sintase em e para o gene “R-1 (g1)” de resistência a CTV. Ambas as construções foram transferidas com sucesso para *A. tumefaciens* para serem usadas em transformação de plantas. Os vetores obtidos nesse trabalho serão futuramente utilizados para outros experimentos de transformação transiente e estável afim de estudar mutantes destes genes na resistência ao cancro cítrico e Tristeza dos Citros.

6. Literatura citada

BARBOSA, G. DA R.; GITAHY, L. Pragas e Doenças: Controvérsias na Constituição Da Cadeia Produtiva da Laranja no Estado de São Paulo dos Anos 1930 Aos 2000. **Desafio Online**, v. 4, n. 2, p. 41–62, 2016.

CARLOS, E. F.; STUCHI, E. S.; DONADIO, L. C. Porta-Enxertos Para a Citricultura Paulista. **Boletim Citrícola**, n. 1, p. 47, 1997.

DENG, Z.; HUANG, S.; LING, P.; YU, C.; TAO, Q.; CHEN, C.; WENDELL, M.; ZHANG, H. B.; GMITTER, F. Fine genetic mapping and BAC contig development for the citrus tristeza virus resistance gene locus in *Poncirus trifoliata* (Raf.). **Molecular Genetics and Genomics**, v. 265, n. 4, p. 739–747, 2001.

EXAME. Cancro cítrico em plantações vira epidemia em SP. 2015.

FANG, D. Q.; FEDERICI, C. T.; ROOSE, M. L. A high-resolution linkage map of the citrus tristeza virus resistance gene region in *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. **Genetics**, v. 150, n. 2, p. 883–890, 1998.

FAUSER, F.; SCHIML, S.; PUCHTA, H. Both CRISPR/Cas-based nucleases and nickases can be used efficiently for genome engineering in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, v. 79, n. 2, p. 348–359, 2014.

FIGUEIREDO, M. G. DE. **Retorno econômico dos investimentos em pesquisa e desenvolvimento (P&D) na citricultura paulista**. 158 p. 2008.

FUNDECITRUS. **Cancro Cítrico**. Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro/7>. 2016.

FUNDECITRUS. Tree inventory and orange production forecast for the 2017-2018 season of the são paulo and west-southwest of minas gerais citrus belt. Disponível em: http://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes_relatorios/2017_12_05_Tree_Inventory_and_Orange_Production_Forecast_2017-20181.pdf. 2017.

JIA, H.; ORBOVIC, V.; JONES, J. B.; WANG, N. Modification of the PthA4 effector binding elements in Type I CsLOB1 promoter using Cas9/sgRNA to produce transgenic Duncan grapefruit alleviating Xcc Δ pthA4: DCsLOB1.3 infection. **Plant Biotechnology Journal**, v. 14, n. 5, p. 1291–1301, 2016.

JIA, H.; ZHANG, Y.; ORBOVIĆ, V.; XU, J.; WHITE, F.F.; JONES, J. B.; WANG, N. Genome editing of the disease susceptibility gene CsLOB1 in citrus confers resistance to citrus canker. **Plant Biotechnology Journal**, v. 15, n. 7, p. 817–823, 2017.

JIA, H.; WANG, N. Targeted genome editing of sweet orange using Cas9/sgRNA. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014.

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, n. August, p. 816–822, 2012.

LACORTE, C.; ROMANO, E. Transferência de vetores para *Agrobacterium*. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. (Eds.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: [s.n.], p. 93–109.

SANCHES, A. L. R.; MIRANDA, S. H. G.; BELASQUE JUNIOR, J.; BASSANEZI, R. B. Análise Econômica da Prevenção e Controle do Cancro Cítrico no Estado de São

Paulo. **Resr**, v. 52, n. 3, p. 549–566, 2014.

MACHADO, M. A.; CRISTOFANI, M.; AMARAL, A.M.; OLIVEIRA, A.C. Genética, melhoramento e biotecnologia de citros. In: MATTOS JR. D.; NEGRI, J.D; PIO, R. M. P. J. J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico: Fundag, 2005. p. 243–246.

PASQUAL, M.; ALVES, G. P.; DUTRA, L. F.; FINOTTI, D. R.; CHAGAS, E. A. Concentrações Do Meio Ms E Da Sacarose/In Vitro Culture Of Poncã Mandarin Immature Embryos: Ms Medium And Sucrose Concentrations. **Ceres**, v. 49, n. 282, 2015.

PENG, A.; CHEN, S.; LEI, T.; XU, L.; HE, Y.; WU, L.; YAO, L.; ZOU, X. Engineering canker-resistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the susceptibility gene CsLOB1 promoter in citrus. **Plant Biotechnology Journal**, p. 1–11, 2017.

RAI, M. Refinement of the Citrus tristeza virus resistance gene (Ctv) positional map in *Poncirus trifoliata* and generation of transgenic grapefruit (*Citrus paradisi*) plant lines with candidate resistance genes in this region. **Plant Molecular Biology**, v. 61, n. 3, p. 399–414, 2006.

RODRIGUEZ, A.; SAN ANDRÉS, V.; CERVERA, M.; REDONDO, A.; ALQUÉZAR, B.; SHIMADA, T.; GADEA, J.; RODRIGO, M J.; ZACARÍAS, L.; PALOU, L.; LÓPEZ, M M.; CASTAÑERA, P.; PEÑA, L. Terpene down-regulation in orange reveals the role of fruit aromas in mediating interactions with insect herbivores and pathogens. **Plant Physiology**, v. 156, n. 2, p. 793–802, 2011.

SCHIML, S.; FAUSER, F.; PUCHTA, H. The CRISPR/Cas system can be used as nuclease for in planta gene targeting and as paired nickases for directed mutagenesis in Arabidopsis resulting in heritable progeny. **Plant Journal**, v. 80, n. 6, p. 1139–1150, 2014.

SHIMADA, T.; ENDO, T.; RODRÍGUEZ, A.; FUJII, H.; GOTO, S.; MATSUURA, T.; HOJO, Y.; IKEDA, Y.; MORI, I. C.; FUJIKAWA, T.; PEÑA, L.; OMURA, M. Ectopic accumulation of linalool confers resistance to *Xanthomonas citri* subsp. *citri* in transgenic sweet orange plants. **Tree Physiology**, v. 37, n. 5, p. 654–664, 2017.

YANG, Z.; YE, X-R.; MOLINA, J.; ROOSE, M. L.; MIRKOV, T. E. Sequence analysis of a 282-kilobase region surrounding the citrus Tristeza virus resistance gene (Ctv) locus in *Poncirus trifoliata* L. Raf. **Plant physiology**, v. 131, n. 2, p. 482–92, 2003.

YANG, Z. N.; YE, X. R.; CHOI, S.; MOLINA, J.; MOONAN, F.; WING, R.; ROOSE, M. L.; MIRKOV, T. E. Construction of a 1.2-Mb contig including the citrus tristeza virus resistance gene locus using a bacterial artificial chromosome library of *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. **Genome-National Research Council Canada**, v. 44, n. 3, p. 382–393, 2001.

CAPÍTULO 2. Transformação Transiente de folhas aderidas e destacadas de laranja doce.

1. Resumo

A transformação genética de citros é de grande importância pois é uma aliada do melhoramento tradicional, que possui muitas limitações biológicas para esta cultura. Além disso, permite estudos funcionais que são importantes para entender a biologia das espécies. No entanto, ainda existem alguns fatores limitantes, como a alta recalcitrância de algumas variedades para transformação genética e regeneração *in vitro*, tornando-se necessário o desenvolvimento de metodologias alternativas para análises genéticas rápidas e simplificadas. A expressão transiente é definida como a expressão de um DNA não integrado por um curto período de tempo e tem se mostrado uma técnica muito eficiente para avaliar construções vetoriais, expressão gênica, atividade de promotores, localização de proteínas, compreensão de funções celulares, etc. Para citros, já existem alguns protocolos de transformação transiente estabelecidos, porém todos evidenciam dificuldades na obtenção de expressão transiente em variedades de laranja doce. O objetivo deste trabalho foi adaptar e otimizar os protocolos de transformação transiente para laranja doce em folhas aderidas e destacadas. Foram testados diferentes estádios de crescimento de *Agrobacterium tumefaciens* (ODi) e densidade celular (ODf) e foi proposto um novo protocolo usando folhas destacadas para simplificar e ampliar a aplicabilidade do método. Os resultados obtidos neste trabalho indicam uma possível alteração na

fase de crescimento de agrobacteria (ODi), permitindo uma execução mais rápida do protocolo, além de atingir médias de mais de 90% de discos foliares com coloração de GUS em experimentos de folhas aderidas e quase 60% para folhas destacadas.

2. Introdução

As frutas cítricas estão entre as frutas mais importantes do mundo, não só porque são amplamente consumidas na dieta humana, mas também pelos aspectos econômicos inerentes ao alto número de empregos diretos e indiretos gerados em todo o mundo (LOPES et al., 2011; NEVES et al., 2010). No entanto, a citricultura ainda se baseia em um número limitado de cultivares, principalmente porque a obtenção de indivíduos superiores através do melhoramento tradicional é trabalhosa e demorada devido às limitações relacionadas à fisiologia desta cultura, como a esterilidade do pólen e óvulos, a incompatibilidade sexual, alta heterozigosidade, longo período juvenil e poliploidia (GROSSER; GMITTER JR, 1990). Por esta razão, a engenharia genética surge como uma alternativa importante, pois permite a introdução de genes específicos sem alterar as características das cultivares. A transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* é amplamente utilizada para citros em diferentes tecidos, tais como epicótilos (JIA et al., 2016; SENDÍN et al., 2017), cotilédones (DE OLIVEIRA et al., 2015) e protoplastos (OMAR et al., 2007), enquanto a regeneração pode ser feita por organogênese e embriogênese somática. Entretanto, a eficiência de transformação varia entre variedades cítricas que, em alguns casos, permanecem muito recalcitrantes para a transformação e regeneração *in vitro* (DOMÍNGUEZ et al., 2004)

A expressão transiente consiste na expressão de um DNA não integrado por um curto período de tempo e tem sido amplamente utilizada desde o final da década de 1980 devido à sua facilidade e versatilidade (JONES et al., 2009) para avaliação de construções vetoriais, expressão gênica, atividade de promotores, localização de proteínas, compreensão de recursos celulares, entre outros (NANJAREDDY et al., 2016). Nos casos em que a abordagem estável é ineficiente, bem como quando há necessidade de uma avaliação fácil e rápida da informação genética, a transformação transiente tornou-se uma estratégia importante para as pesquisas de genômica funcional e tem sido utilizada para várias espécies e aplicações (ZHONG et al., 2016). No entanto, a eficiência de transformação transiente também varia entre diferentes espécies e tecidos de plantas (KRENEK et al., 2015). Alguns

protocolos foram publicados descrevendo expressão transiente em citros, utilizando protoplastos (VARDI et al., 1990), frutas (AHMAD; MIRZA, 2005) e epicótilos (BESPALHOK FILHO et al., 2003), mas as folhas são atualmente o tecido mais utilizado.

O método foi primeiramente descrito para folhas em plantas de pomelo usando GFP para elucidar o mecanismo da função do gene *AvrGf1* (FIGUEIREDO et al., 2011), e mais tarde (Jiae Wang, 2014a) propuseram um pré-tratamento com *Xanthomonas citri* subsp. *citri* para aumentar a expressão de β -glucuronidase (GUS) em cinco variedades de citros. Mais recentemente, um novo estudo investigou os fatores que afetam a expressão transiente, como a composição do tampão de infiltração, a densidade celular de *Agrobacterium*, o estágio de desenvolvimento da folha, a temperatura de incubação e o genótipo vegetal (FANG et al., 2016). Este trabalho estabeleceu vários parâmetros ótimos para a transformação transiente e mostrou que a laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) é uma das variedades de citros menos eficientes para a expressão transiente.

Devido à necessidade de estudos com laranja doce, este trabalho focou na otimização do protocolo para uma transformação transiente rápida e eficiente dessa espécie. Os parâmetros avaliados neste estudo foram a fase de crescimento de *Agrobacterium tumefaciens* utilizada para infiltração (ODi) e a densidade celular (ODf). Também estávamos interessados em desenvolver um protocolo para a transformação de folhas destacadas que possa ser usado em casos específicos quando não é possível infiltrar a própria planta e quando não há necessidade de avaliar uma resposta dependente de toda a fisiologia da planta. A expressão transiente de folhas destacadas pode ser usada em várias aplicações, como na verificação genética de mutações CRISPR/CAS9, experimentos de avaliação da expressão de novas construções, avaliação de proteínas transgênicas em dietas de insetos, etc.

3. Materiais e Métodos

3.1. Material Vegetal, Estirpe de *Agrobacterium* e vetor binário utilizado

As plantas de laranja doce usadas neste trabalho foram Hamlin de aproximadamente um ano e meio, enxertadas em limão-cravo, e cultivadas em estufa no Centro de Citricultura Sylvio Moreira em Cordeirópolis, SP, Brasil e levadas a uma sala a 22°C para o experimento. A estirpe de *Agrobacterium tumefaciens*

utilizada foi a AGL-1. Para transformação, utilizamos o vetor binário pCambia 3301 (BACON et al., 2006) que codifica o gene da β -glucuronidase, conforme ilustrado na Figura 1.

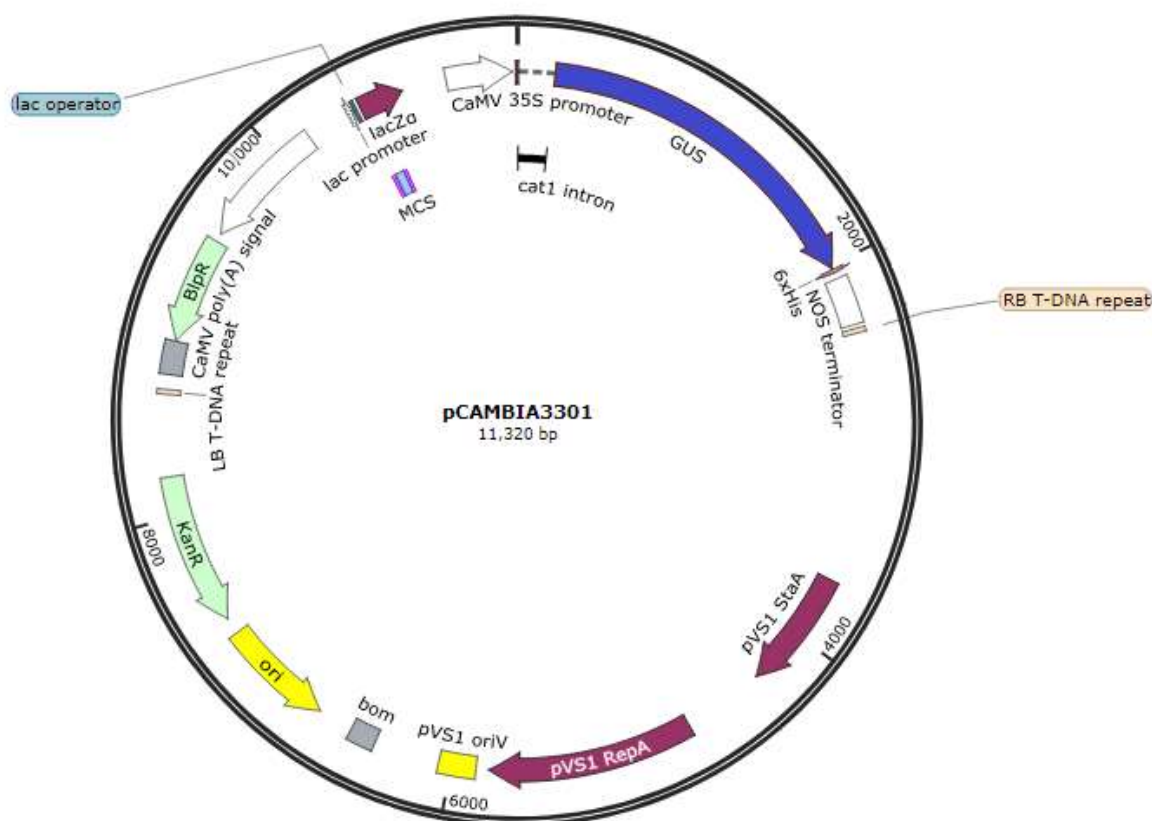


Figura 1: Mapa do vetor pCambia 3301. Seta em azul indica o gene da beta-glucuronidase (GUS) sob o promotor CaMV e o terminador NOS, contendo um intron. Setas verdes representam os genes de resistência a Fosfotricina (Glufosinato de Amônia) e a canamicina em plantas e bactérias respectivamente.

3.2. Otimização de Transformação Transiente em plantas

Para experimentos de transformação transiente em plantas, *A. tumefaciens* foi transformado com o vetor pCambia 3301 e uma única colônia foi selecionada a partir de uma placa e inoculada em 10 mL de LB suplementado com 100 μ g/mL de canamicina para seleção de plasmídeos e 30 μ g/mL de rifampicina para seleção de agrobactéria e incubadas a 28°C. Na manhã seguinte, as bactérias foram re-inoculadas a uma Densidade Ótica de 600 nm (OD₆₀₀) de 0,1 em 50 mL de meio YEP (10 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de cloreto de sódio e 10 g/L de peptona),

suplementado com canamicina 100 µg/mL, rifampicina 30 µg/mL, acetosiringona (3', 5'-Dimetoxi-4'-hidroxiacetofenona) 2 µM e MES (ácido 2-morfolino etanosulfônico) 10 mM. O inóculo foi mantido a 28°C até a OD desejada (0,5 ou 0,8). As bactérias foram então centrifugadas a 3.400xg durante 10 minutos e uma quantidade específica de meio de infiltração de MMA [1 L H₂O, 2% de sacarose, 0,5% de sal de MS, 0,195% de MES, 2 mL de NaOH (1 M) e 200 µM de acetossiringona] foi adicionado de acordo com o OD₆₀₀ final desejada (0,6, 0,8 ou 1,0). Após três horas de incubação à temperatura ambiente no escuro, a suspensão bacteriana foi infiltrada com a ajuda de uma seringa de 1 mL em folhas jovens de plantas de laranja doce. Para a infiltração, foram feitos furos na folha com a própria agulha que então foi descartada, e o conteúdo da seringa foi dispensado através da pressão contra a folha apoiada em um dedo. Posteriormente essas folhas foram mantidas a 22°C por 3 dias até a análise histoquímica. O volume total infiltrado foi de aproximadamente 300 µL por ponto de infiltração.

3.3. Expressão transiente em folhas destacadas

Experimentos de expressão transiente em folhas destacadas foram realizados como descrito para folhas aderidas até a incubação da bactéria em MMA. Folhas jovens de laranja doce foram coletadas no máximo 1 hora antes da infiltração, lavadas e mantidas em água de torneira até serem usadas. Para a esterilização, as folhas foram imersas em solução de hipoclorito de sódio a 10% durante 1 minuto dentro de um fluxo laminar e lavadas em água de torneira autoclavada durante 5 minutos. As bactérias foram infiltradas em folhas destacadas usando uma seringa de 1 mL, conforme descrito anteriormente. As folhas infiltradas foram colocadas em tubos Falcon estéreis de 50 mL com os pecíolos imersos em 5 mL de água autoclavada e mantidos a 22°C por 3 dias até a análise histoquímica.

3.4. Análise histoquímica de expressão GUS

Após três dias de incubação, os discos foliares foram coletados exatamente no local de infiltração de folhas destacadas e aderidas e foram imersos no tampão de reação (x-glucuronido 1 mM, NaH₂PO₄.H₂O 100 mM, K₄Fe(CN)₆.H₂O 0,5 mM, Na₂EDTA.2H₂O 10 mM, Triton X-100 a 0,1%), que contém o substrato para a atividade de GUS e aplicou-se vácuo durante 15 minutos. Após 16 horas de incubação a 37°C no escuro, a reação foi substituída por uma solução de ácido

acético:etanol 1:3, incubando-se até os discos foliares serem completamente clareados. A análise da expressão de GUS foi feita através da contagem de discos foliares com coloração azul.

3.5 Análise Estatística

Para as análises estatística dos experimentos de expressão transiente foi utilizado como apoio o software SASM-Agri. O experimento foi conduzido em um delineamento de blocos casualizados e posteriormente analisado de duas formas: considerando-se todos os dados e definindo como “blocos” cada um dos protocolos (folhas destacadas x folhas aderidas) e analisando os dados dentro de cada protocolo e definindo como “blocos” as OD iniciais (0,5 e 0,8), afim de verificar o efeito individual de cada uma dessas variáveis. Para todos os casos foram feitas análises de variância (ANOVA) e Teste de separação de médias baseado no teste Tukey a 5% de significância.

4. Resultados e Discussão

4.1. Análise da concentração ideal de crescimento de *Agrobacterium* (ODi)

Na maioria dos protocolos de transformação transiente de citros, *A. tumefaciens* é cultivada até uma ODi₆₀₀ de 0,8 antes do uso, o que determina não apenas a quantidade a ser utilizada, mas também a fase de crescimento bacteriano. *A. tumefaciens* tem um crescimento mais lento em comparação com outras bactérias, como *Escherichia coli*, com um tempo de duplicação que pode variar de 2,5 a 4 horas, dependendo do meio, o que pode resultar em várias horas para alcançar uma ODi tão alta, contribuindo assim para um longo tempo de execução do protocolo. Além disso, a uma ODi₆₀₀ 0,8, esta bactéria se aproxima da fase lag de crescimento (MORTON; FUQUA, 2013), o que poderia ser um fator negativo para a transformação genética. Para verificar a influência de um menor crescimento bacteriano na eficiência de transformação, testamos o ODi₆₀₀ 0,5 em comparação a ODi₆₀₀ 0,8 descrita anteriormente em folhas destacadas (Figura 2).

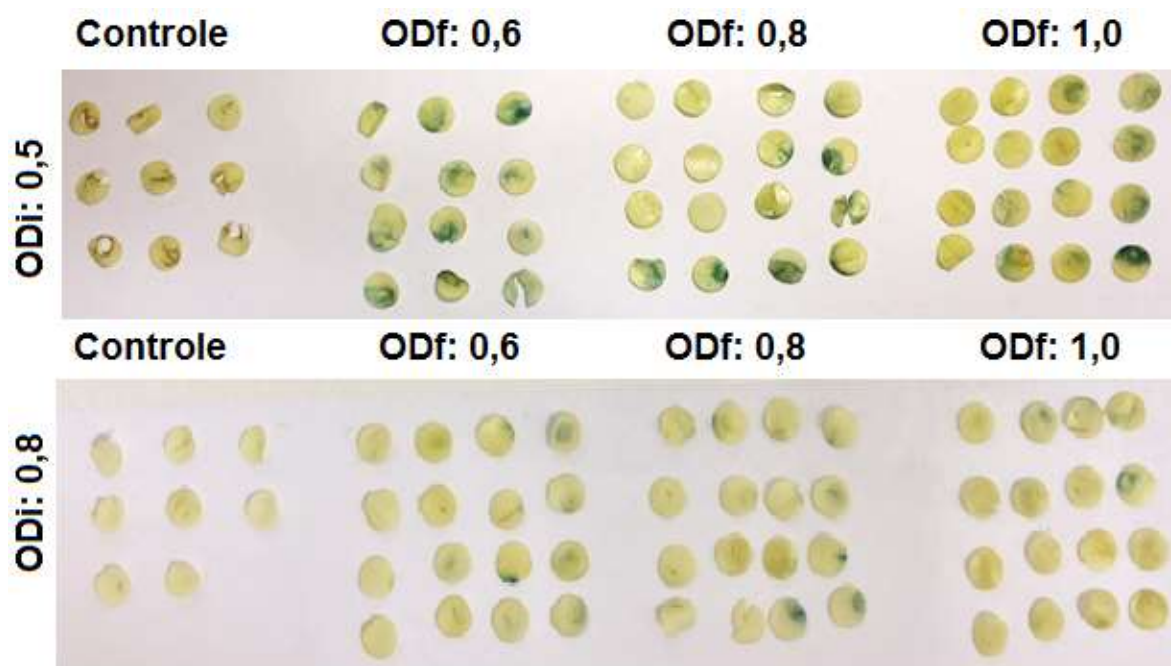


Figura 2: Análise histoquímica de discos foliares de experimentos em folhas destacadas. A imagem superior mostra a coloração de discos de folhas obtidos em experiências usando ODi de 0,5, enquanto a imagem inferior mostra resultados usando ODi de 0,8. Os discos foliares controle foram obtidos a partir de uma folha infiltrada com *A. tumefaciens* AGL-1 sem o vetor pCambia 3301. As três ODi diferentes também foram usados para cada condição (0,6, 0,8 e 1,0).

Os discos foliares de folhas destacadas infiltradas com ODi de 0,5 mostraram uma coloração GUS mais intensa, fator que não foi levado em consideração uma vez que a eficácia foi medida qualitativamente (número de discos de folhas com manchas de GUS) e não quantitativamente. O mesmo experimento foi feito com as folhas nas planta (Figura 3). E, curiosamente, não observamos coloração mais forte em ODi 0,5 em comparação com ODi 0,8.

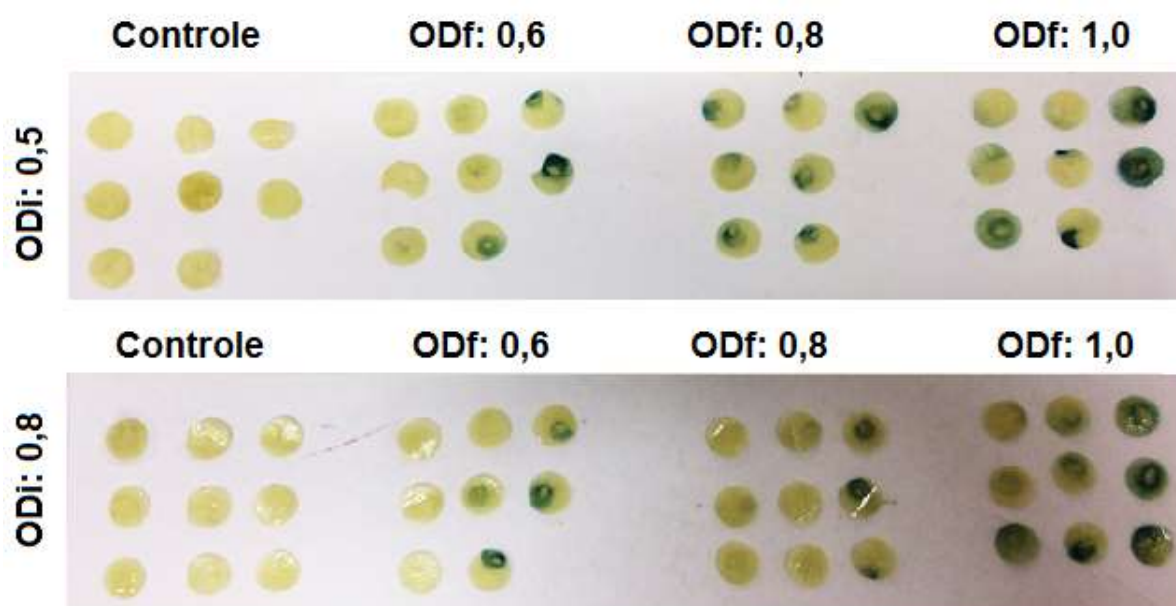


Figura 3: Análise histoquímica de discos foliares de experimentos em folhas aderidas. A imagem superior mostra a coloração de discos de folhas obtidos em experiências usando ODi de 0,5, enquanto a imagem inferior mostra resultados usando ODi de 0,8. Os discos foliares controle foram obtidos a partir de uma folha infiltrada com *A. tumefaciens* AGL-1 sem o vetor pCambia 3301. As três ODF diferentes também foram usados para cada condição (0,6, 0,8 e 1,0).

A avaliação dos discos foliares com coloração de GUS revelou que a eficiência de transformação para ODi₆₀₀ 0,5 foi em média 10% maior do que ODi₆₀₀ 0,8. Além disso, para as folhas nas plantas, o aumento de eficiência foi em média de 8% para ODi₆₀₀ 0,5 (Tabela 1).

Tabela 1: Média das porcentagens de discos foliares GUS positivos em tratamentos com ODi de 0,5 e ODi de 0,8. As letras minúsculas mostram que não houve diferença estatística entre os tratamentos ODi.

ODi	Folhas Destacadas	Folhas aderidas
0,5	52% a	88% a
0,8	42% a	80% a

Embora esses resultados não sejam estatisticamente significativos no teste Tukey a 5% de significância, eles são consistentes e, mais que isto, representam um ganho de tempo em comparação com os protocolos atuais. Além disso, a fisiologia da

planta parece afetar positivamente a transformação, levando à diferença em sua eficiência, observada entre as ODis em folhas destacadas e aderidas.

4.2. Análise da densidade celular ótima de *Agrobacterium* para infiltração (ODf).

A densidade celular de *A. tumefaciens* determina a quantidade de células utilizadas para a infiltração e pode ser ajustada através da ressuspensão do pellet celular em quantidade suficiente de meio MMA. O protocolo convencional para a transformação estável de citros usa uma alta densidade celular (ODf₆₀₀ 1,0) para transformação. Para testar a densidade ótima de *A. tumefaciens* para uma transformação transiente mais eficiente de laranja doce, ajustamos e testamos ODf₆₀₀ para 0,6, 0,8 e 1,0 (Figura 4). Para os experimentos com folhas aderidas, não houve diferença estatisticamente significativa entre as ODfs testadas, embora uma quantidade ligeiramente maior de discos foliares apresentando coloração de GUS tenha sido observada no ODf mais alta (1,0), onde foi possível observar uma média de 93% de discos foliares com coloração positiva entre as três repetições (Figura 4b). No entanto, nos experimentos usando folhas destacadas, observou-se o resultado oposto, com maior eficiência de transformação alcançada com a menor ODf₆₀₀ ajustado (0,6) e, neste caso, houve diferença estatística entre as amostras (Figura 4a). Uma possível explicação para isso é que, ao trabalhar com folhas destacadas, a defesa da folha está comprometida, impedindo que ela consiga responder de maneira adequada a infecção e, por isso, uma infecção controlada apresentaria melhores resultados. No entanto, em plantas, uma vez que os sistemas de defesa estão funcionando corretamente e não há necessidade de usar uma menor quantidade de bactérias.

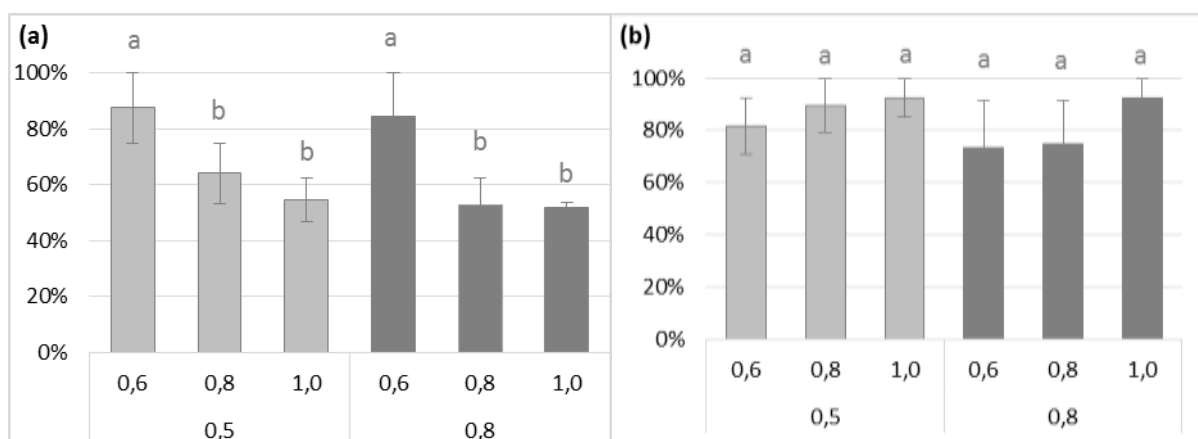


Figura 4: Porcentagem de discos foliares GUS positivos em folhas destacadas (a) e folhas aderidas (b). O lado esquerdo dos gráficos mostra os resultados obtidos com diferentes ODfs₆₀₀ para ODi₆₀₀ 0,5 e o lado direito do gráfico mostra os mesmos resultados para o ODi₆₀₀ 0,8. Diferentes letras minúsculas representam diferença estatística entre os ODfs analisados em uma análise de Tukey com significância de 5%.

4.3. Experimentos de folhas aderidas x folhas destacadas

Ao comparar os dois protocolos de transformação transiente, podemos observar uma ligeira vantagem em termos de eficiência ao usar folhas aderidas, uma vez que com esse protocolo foi possível obter até 93% de discos de folhas transformadas, enquanto que para folhas destacadas atingimos 88% (Figura 4, Figura 5). Esses resultados são consistentes e mostram que a fisiologia da planta afeta a transformação transiente de citros, aumentando positivamente a eficiência de transformação das folhas aderidas em comparação com as folhas destacadas. Sabe-se que a transformação mediada por *A. tumefaciens* depende de alguns fatores da planta (revisada em PITZSCHKE, 2013) e, portanto, não seria inesperado a diminuição da eficiência no protocolo de folhas destacadas, uma vez que essas folhas não estão no mesmo estado fisiológico que as folhas na planta. No entanto, ao comparar os protocolos dentro de cada condição (ODi x ODf), podemos observar uma diferença estatisticamente significativa somente quando se usa ODf de 1,0 (Figura 5). Assim, através desses resultados, é possível afirmar que este ainda é um protocolo alternativo eficaz, devido à sua versatilidade, que pode ser um ótimo aliado em situações específicas quando não é possível usar a planta inteira para experimentos transiente. Além disso, esse protocolo ainda demonstra uma alta eficiência para transformação transiente de laranja doce quando comparado com os relatados anteriormente (FANG et al., 2016; JIA; WANG, 2014b). Nestes protocolos, a transformação transiente de laranja doce mostrou uma fraca eficácia quando comparada com outras espécies, como o kumquat (*Fortunella obovate*) e *Poncirus trifoliata*, para o qual foi obtido cerca de 250% mais fluorescência de YFP em plantas agroinfiltradas (FANG et al., 2016). Quando comparado com pomelo, que é uma das variedades mais utilizadas para a transformação transiente, a diferença é menor, mas essa variedade ainda é 60% mais eficiente em termos de fluorescência de YFP (FANG et al., 2016).

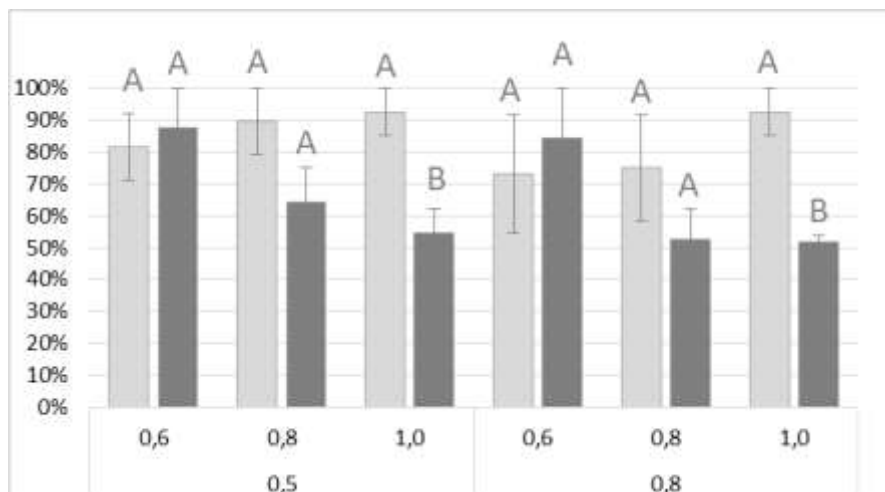


Figura 5: Porcentagem de discos foliares GUS positivos em folhas destacadas (barras claras) e folhas aderidas (barras escuras). O lado esquerdo dos gráficos mostra os resultados obtidos com diferentes ODf₆₀₀ para ODi₆₀₀ 0,5 e o lado direito do gráfico mostra os mesmos resultados para o ODi₆₀₀ 0,8. Letras maiúsculas diferentes representam diferença estatística entre os protocolos nas mesmas condições (ODi e ODF) em uma análise de Tukey com significância de 5%.

5. Conclusões

Neste trabalho, estabelecemos parâmetros significativos para dois protocolos de transformação transiente em laranja doce. A principal contribuição deste estudo para o protocolo de transformação transiente atual é a redução da ODi de 0,8 para 0,5 com conseqüente redução de tempo na execução do protocolo sem perda significativa na eficiência de transformação. Este estudo também apresentou uma alta eficiência de transformação em laranja doce, o que é muito importante, uma vez que os protocolos já desenvolvidos nunca alcançaram níveis de transformação observados nesse trabalho. Isto se torna ainda mais significativo, levando-se em conta que a laranja doce é a espécie de citros mais importante cultivada no mundo. Uma possível explicação para os altos níveis obtidos é a estirpe de *A. tumefaciens* AGL-1, que foi utilizada pela primeira vez para transformação transiente em citros neste trabalho. Sabe-se que a eficiência da transformação da planta varia significativamente entre as estirpes de *A. tumefaciens* usadas (CHETTY et al., 2013; GHEDIRA et al., 2013; ZHI et al., 2015). Além disso, o novo protocolo alternativo para a transformação transiente em citros usando folhas destacadas também é um achado importante porque, se usado nas condições adequadas, pode ser tão eficiente quanto o protocolo atual e tem muitas vantagens logísticas. Esta estratégia pode valer a pena em casos específicos, como quando não é possível infiltrar toda a

planta ou incubar a planta a 22°C, conforme descrito anteriormente como a temperatura ideal por Fang et al., 2016. Além disso, esse novo protocolo pode ser facilmente implementado, uma vez que demanda um espaço pequeno e recursos limitados, já que é necessário apenas algumas folhas, que podem ser armazenadas em tubos Falcon. Também é importante enfatizar que a estratégia de folhas destacadas só é possível de ser usada em casos onde a informação a ser acessada não depende de uma resposta da planta (por exemplo, identificação de mutações). Por último, os resultados obtidos neste estudo mostraram que na agroinfiltração das folhas aderidas não há diferença entre a densidade celular ajustada (OD_{f600}), diferentemente do que foi anteriormente relatado por Fang et al., 2016, que mostraram o OD_f de 0,8 como com a melhor eficácia. Em outros estudos, como Jia e Wang, 2014, a OD_f de 1,0 é usada. A diferença na OD_f foi apenas significativa ao usar o protocolo de folhas destacadas, onde o OD_{f600} de 0,6 mostrou maior eficiência entre as OD_fs testadas.

Pode-se concluir, então, que as melhores condições para execução do protocolo de folhas destacadas são utilizando-se uma OD_i de 0,5 e uma OD_f de 0,6. Já as melhores condições para execução do protocolo de folhas aderidas são utilizando-se uma OD_i de 0,5 e qualquer OD_f desejada.

6. Literatura citada

AHMAD, M.; MIRZA, B. An Efficient Protocol for Transient Transformation of Intact Fruit and Transgene Expression in Citrus. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 23, n. December, p. 419a–419k, 2005.

BACON, N.; ASHTON, D.; JEFFERSON, R.A.; CONNETT, M.B. **CAMBIA Patent Lens OS4 Initiative**, 2006.

BESPALHOK FILHO, J. C.; KOBAYASHI, A. K.; PEREIRA, L. F. P.; GALVÃO, R. M.; VIEIRA, L.G. E Transient gene expression of beta-glucuronidase in citrus thin epicotyl transversal sections using particle bombardment. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, n. 1, p. 1–6, 2003.

CHETTY, V. J.; CEBALLOS, N.; GARCIA, D.; NARVÁEZ-VÁSQUEZ, J.; LOPEZ, W.; OROZCO-CÁRDENAS, M. L. Evaluation of four *Agrobacterium tumefaciens* strains for the genetic transformation of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivar Micro-Tom. **Plant Cell Reports**, v. 32, n. 2, p. 239–247, 2013.

DE OLIVEIRA, M. L. P.; MOORE, G.; THOMSON, J. G.; STOVER, E. *Agrobacterium*-Mediated Transformation of Mexican Lime (*Citrus aurantifolia* Swingle) Using Optimized Systems for Epicotyls and Cotyledons. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 6, n. November, p. 657–668, 2015.

DOMÍNGUEZ, A.; CERVERA, M.; PÉREZ, R. M.; ROMERO, J.; FAGOAGA, C.; CUBERO, J.; LÓPEZ, M. M.; JUÁREZ, J. A.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. Characterisation of regenerants obtained under selective conditions after *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus explants reveals production of silenced and chimeric plants at unexpected high frequencies. **Molecular Breeding**, v. 14, n. 2, p. 171–183, 2004.

FANG, L.; SU MING, D.; ZI NIU, D.; DA ZHI, L.; NA, L.; YI, L.; GENTILE, A. Evaluation of parameters affecting *Agrobacterium*-mediated transient expression in citrus. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 16, n. 3, p. 572–579, 2016.

FIGUEIREDO, J. F. L. RÖMER, P.; LAHAYE, T.; GRAHAM, J. H.; WHITE, F. F.; JONES, J. B. *Agrobacterium*-mediated transient expression in citrus leaves: A rapid tool for gene expression and functional gene assay. **Plant Cell Reports**, v. 30, n. 7, p. 1339–1345, 2011.

GHEDIRA, R.; DE BUCK, S.; NOLF, J.; DEPICKER, A. The Efficiency of *Arabidopsis thaliana* Floral Dip Transformation Is Determined Not Only by the *Agrobacterium* Strain Used but Also by the Physiology and the Ecotype of the Dipped Plant. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 26, n. 7, p. 823–832, jul. 2013.

GROSSER, J.; GMITTER JR, F. Protoplast fusion and citrus improvement. In: **Plant Breeding Reviews**. 8. ed. Portland: Timber Press Inc, 1990. p. 339–374.

JIA, H. et al. Modification of the PthA4 effector binding elements in Type I CsLOB1 promoter using Cas9/sgRNA to produce transgenic Duncan grapefruit alleviating Xcc Δ pthA4: DCsLOB1.3 infection. **Plant Biotechnology Journal**, v. 14, n. 5, p. 1291–1301, 2016.

JIA, H.; WANG, N. Targeted genome editing of sweet orange using Cas9/sgRNA. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014a.

JIA, H.; WANG, N. Xcc-facilitated agroinfiltration of citrus leaves: a tool for rapid functional analysis of transgenes in citrus leaves. **Plant Cell Reports**, v. 33, n. 12, p. 1993–2001, 2014b.

JONES, H. D.; DOHERTY, A.; SPARKS, C. A. Transient Transformation of Plants Huw. In: **Methods in Molecular Biology, Plant Genomics**. v. 513p. 131–152.

KRENEK, P.; SAMAJOVA, O.; LUPTOVCIK, I.; DOSKOCILOVA, A.; KOMIS, G.; SAMAJ, J. Transient plant transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: Principles, methods and applications. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 1024–1042, 2015.

LOPES, J. M. S.; DÉO, T. F.G.; ANDRADE, B.J.M.; GIROTO, M.; FELIPE, A.L.S.; JUNIOR, C.E.I.; BUENO, C.E.M.S.; SILVA, T.F.; LIMA, F.C.C. Importância Econômica Do Citros No Brasil. **Revista Científica Eletrônica De Agronomia**, p. 0–2, 2011.

MORTON, E. R.; FUQUA, C. Laboratory Maintenance of *Agrobacterium*. In: **Currently Protocols in Microbiology**. p. 1–8.

NANJAREDDY, K.; ARTHIKALA, M-K.; 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, n. 1, p. 53, 2016.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. **O retrato da citricultura brasileira**. p. 138, 2010.

OMAR, A. A.; SONG, W.-Y.; GROSSER, J. W. Introduction of *Xa21*, a *Xanthomonas*-resistance gene from rice, into “Hamlin” sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] using protoplast-GFP co-transformation or single plasmid transformation. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 82, n. 6, p. 914–923, 7 jan. 2007.

PITZSCHKE, A. Agrobacterium infection and plant defense-transformation success hangs by a thread. **Frontiers in plant science**, v. 4, n. December, p. 519, 2013.

SENDÍN, L. N.; ORCE, I. G.; GÓMEZ, R. L.; ENRIQUE, R.; GRELLET BOURNONVILLE, C. F.; NOGUERA, A. S.; VOJNOV, A. A.; MARANO, M. R.; CASTAGNARO, A. P.; FILIPPONE, M. P. Inducible expression of Bs2 R gene from *Capsicum chacoense* in sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) confers enhanced resistance to citrus canker disease. **Plant Molecular Biology**, v. 93, n. 6, p. 607–621, 2017.

VARDI, A.; BLEICHMAN, S.; AVIV, D. Genetic transformation of citrus protoplasts and regeneration of transgenic plants. **Plant Science**, v. 69, n. 2, p. 199–206, 1990.

ZHI, L.; TERONDE, S.; MEYER, S.; ARLING, M. L.; REGISTER III, J. C.; ZHAO, Z-Y.; JONES, T. J.; ANAND, A. Effect of Agrobacterium strain and plasmid copy number on transformation frequency, event quality and usable event quality in an elite maize cultivar. **Plant Cell Reports**, v. 34, n. 5, p. 745–754, 6 maio 2015.

ZHONG, L.; ZHANG, Y.; LIU, H.; SUN, G.; CHEN, R.; SONG, S. Agrobacterium-mediated transient expression via root absorption in flowering Chinese cabbage. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, p. 1825, 2016.

CAPÍTULO 3. Construção de novo vetor otimizado para edição de genomas de plantas

1. Resumo

CRISPR (Clustered Regularmente Interspaced Palindromic Repeats) foram descobertos como parte de um sistema imune de algumas bactérias, mas recentemente estão sendo utilizados como uma poderosa ferramenta de biologia molecular, uma vez que pode ser facilmente customizado para gerar mutações pontuais em um sítio específico do genoma. Em plantas, a técnica já vem sendo utilizada desde 2013 e hoje já está presente em mais de 60 trabalhos ao redor do mundo. Os primeiros trabalhos com plantas se basearam na utilização de vetores CRISPR otimizados para humanos apesar da baixa eficiência, porém rapidamente novos vetores otimizados para plantas foram surgindo. Um dos principais grupos de pesquisa com CRISPR em plantas propôs a utilização de sistemas para edição de genoma em plantas (FAUSER et al., 2014; SCHIML et al., 2014) que apesar de se mostrarem bastantes eficientes para essa aplicação, apresentaram certos desafios relacionados a sua clonagem e manipulação. Tendo isso em vista, esse trabalho propôs utilizar os componentes CRISPR (CAS9 e sgRNA) desse sistema para a construção de um novo vetor, que possibilitará a redução do tamanho do vetor binário e a inserção do espaçador diretamente em seu esqueleto, além de uma seleção tanto em plantas quanto bacteriana utilizando canamicina. Para essa

construção foram realizadas clonagens consecutivas utilizando como base os vetores pGreen 0029, pChimera e pCAS9-TPC.

2. Introdução

CRISPR (“clustered regularly interspaced short palindromic repeat”), como o próprio nome já diz, é um aglomerado de pequenas repetições palindrômicas regularmente espaçadas. Estas estruturas foram primeiramente observadas a partir de sequenciamento do gene *iap* de *Escherichia coli* (ISHINO et al., 1987), porém sua função biológica permaneceu desconhecida por muito tempo, até que em 2005, grupos de pesquisa distintos propuseram que esse sistema funcionasse como um sistema imune adaptativo de bactérias e archaea (BOLOTIN et al., 2005; POURCEL et al., 2005) hipótese que foi confirmada em seguida (MOJICA et al., 2005).

Em 2013 a partir da compreensão do funcionamento desse mecanismo de defesa, pesquisadores desenvolveram uma metodologia para edição de genomas que se tornou uma das ferramentas de biologia molecular mais promissoras da atualidade (CONG et al., 2013; JINEK et al., 2012; MALI et al., 2013). Essa ferramenta utiliza-se da capacidade de direcionar uma endonuclease, através de seu RNA guia, para a clivagem de um alvo específico no DNA, e baseia-se no tipo II do sistema, no qual um RNA pequeno transcrito (tracrRNA) participa do processamento do CRISPR RNA (crRNA) por uma única proteína (Cas9), com a formação de um duplex com a sequência repetida do CRISPR e clivagem com RNase III. A tecnologia CRISPR atualmente utiliza uma fusão crRNA-tracrRNA, chamada de RNA guia único (sgRNA) para direcionar a clivagem de sequências de interesse por Cas9 (JINEK et al., 2012).

Nos últimos anos a utilização de CRISPR vem encantando a comunidade científica, fazendo com que muitos pesquisadores se envolvam com o uso dessa técnica, o que tem como consequência um número muito alto de artigos publicado sobre o tema atualmente no mundo todo. Em plantas, a tecnologia também vem sendo usada desde 2013 (FENG et al., 2013; JIANG et al., 2013; LI et al., 2013; NEKRASOV et al., 2013), e já foi utilizada em abordagens de transformação transiente e estável de diversas culturas como *Arabidopsis thaliana* (HAHN et al., 2017), tabaco (MERCX et al., 2016), arroz (NIEVES-CORDONES et al., 2017), trigo (LIANG et al., 2017), milho (CHAR et al., 2017), citros (JIA et al., 2016, 2017; JIA; WANG, 2014a; PENG et al., 2017).

Inicialmente os sistemas utilizados para edição genomas em plantas via CRISPR/CAS9 baseavam-se em vetores desenvolvidos para edição de genomas de humanos (códon otimizados), que apesar de sua baixa eficiência foram testados com sucesso em algumas espécies (LI et al., 2013; NEKRASOV et al., 2013; SHAN et al., 2013). Rapidamente novos vetores foram surgindo e apresentando uma eficiência maior devido a otimização de códon para plantas, tais como para arroz (HYUN et al., 2014; MA et al., 2015; ZHOU et al., 2014), tabaco (GAO et al., 2015), milho (SVITASHEV et al., 2015; XING et al., 2014), soja (LI et al., 2015) e *Arabidopsis thaliana* (FAUSER; SCHIML; PUCHTA, 2014; WANG et al., 2015), o que permitiu um grande avanço nas pesquisas e ampliou as aplicações da edição de genomas em plantas, que atualmente incluem o “knockout” de genes, deleções genômicas, supressão de infecção viral, etc (MA et al., 2015).

Um dos principais grupos de pesquisa com CRISPR em plantas propôs a utilização de sistemas para edição de genoma em plantas que incluem o uso de dois vetores, pChimera e pCAS9-TPC (FAUSER et al., 2014; SCHIML et al., 2014), onde no primeiro faz-se a clonagem do espaçador de 20 pares de base, proveniente da hibridação de dois oligonucleotídeos e, no segundo, clona-se o sgRNA sob controle do promotor U6-26. Resultados preliminares do nosso grupo demonstram que a estratégia funciona, tendo-se já obtido construções para transformação de plantas (Capítulo 1). Entretanto, a experiência de trabalhar-se com o vetor pCAS9-TPC mostrou que todo o processo poderia ser muito facilitado se a clonagem do espaçador fosse realizada no próprio vetor de transformação de planta, uma vez que a clonagem do espaçador seria mais eficiente do que a do sgRNA com promotor.

Todavia, esta construção não poderia ser realizada no próprio pCAS9-TPC pois só no gene de seleção em plantas, *ppt* (resistência à fosfotricina) existem 3 sítios da enzima utilizada para a customização (*BbsI*), além de um outro no esqueleto do vetor. Sendo assim, esse trabalho propôs a construção de um novo vetor, baseado no pGreen 0029, que possibilitará a inserção do espaçador diretamente em seu esqueleto, sem a necessidade de passos intermediários, determinando ganho de tempo no processo total de obtenção de construções para edição de genomas de plantas. Este vetor será disponibilizado para todos os grupos que se interessarem por fazer edição de genomas em plantas.

3. Materiais e Métodos

3.1. Linhagens bacterianas, plasmídeos e primers utilizados

Nesse trabalho foi utilizada a estirpe DH5 α [Δ lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rK-mK+) supE44 thi-1 gyrA96 relA1] de *E. coli*. O plasmídeo utilizado como esqueleto para a nova construção foi o pGreen 0029 (HELLENS, et al., 2000), o sgRNA com o sítio de customização foi retirado do vetor pChimera e a CAS9 com seu promotor foram retirados do vetor pCAS9-TPC.

Os primers utilizados nesse trabalho encontram-se na tabela 1.

Tabela 1: Primers utilizados neste trabalho

Nome do Primer	Sequências 5'-3'	Orientação
SgRNA+NheSite_FW	CCAGAGCTCGCTAGCCTTTTTTTC	Fw
SgRNA+NheSite_RV	CTCCAGGTACCGCTAGCTAATGCC	Rv
pUbi4-2_FW	GTGGAATTGTGAGCGGATAAC	Fw
pUbi4-2_RV	GAGTACTTCTTATCCATGGCGC	Rv
SS129	CACAGGAAACAGCTATGAC	Rv
M13 (-20)	GTAAAACGACGGCCAGT	Rv

3.2. Meio de cultura bacteriana

Foi usado meio de cultura LB (1% triptona, 0,5% extrato de levedura, e 1% NaCl), sendo que para meio sólido, foi adicionado 2% ágar.

3.3. Transformação de *E. coli*

Células competentes de *E. coli* DH5 α foram preparadas (INOUE et al., 1990). Entre cinco e dez microlitros das ligações foram usados para transformação, misturando-se a 100 μ L de suspensão de células da linhagem bacteriana em um tubo eppendorf de 1,5 mL. A mistura célula/ligação foi mantida no gelo por 30 minutos, e posteriormente transferida para um banho seco a 42°C. Após um minuto o tubo foi transferido para o gelo novamente onde permaneceu por mais 2 minutos e então 800 μ L de meio LB pré-aquecido a 37°C foi adicionado. Os tubos foram incubados a 37°C por 1 hora com agitação (250 rpm) e 100 μ L de células foram plaqueados em 1 placa com meio LB (1% NaCl, 1% triptona, 0,5% extrato de levedura, pH 7,0, 2% ágar) contendo 100 μ g/mL de canamicina. As placas foram

incubadas durante a noite em estufa a 37°C e no dia seguinte as clonagens foram confirmadas por PCR de colônia ou análise por restrição.

3.4. Kits e Enzimas utilizadas

Para minipreparação de plasmídeos, o kit de purificação Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) foi utilizado segundo protocolo do fabricante. Já para purificação de PCR ou DNA foi utilizado o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System também da Promega.

Para as clonagens, as enzimas de restrição *SacI*, *XbaI* e *EcoRI* (Fermentas) foram utilizadas para as digestões, enquanto a T4 Ligase (Promega) foi utilizada para as ligações.

4. Resultados

Para a construção do vetor proposto, foram necessários 3 passos, sendo 1) Clonagem do sgRNA com o promotor U6-26, retirado de pChimera, 2) Clonagem da CAS9 a partir do vetor pCAS9-TPC e 3) Clonagem do pUbi também a partir de pCAS9-TPC (Figura 1). As clonagens foram executadas obrigatoriamente nessa ordem para permitir o uso correto dos sítios de restrição.

4.1. Clonagem do sgRNA e promotor U6-26 no vetor pGreen 0029

Para clonagem do sgRNA contendo o sítio de customização vazio, foi feita a digestão do vetor pGreen 0029 com as enzimas *XbaI* e *SacI* afim de linearizar o vetor, e também do vetor pChimera afim de liberar o sgRNA (Figura 2). A retirada do sgRNA juntamente com o promotor U6-26 do vetor pChimera foi feita através de um PCR utilizando-se os primers SgRNA+NheSite_FW e SgRNA+NheSite_RV (Tabela 1) que flanqueiam a região. O amplicon gerado foi digerido com as enzimas *XbaI* e *SacI* e posteriormente foi ligado ao vetor pGreen previamente digerido e purificado numa proporção de 1:5. A ligação foi incubada a 22°C durante a noite e então usadas na transformação de *E. coli*, conforme protocolo previamente descrito. As colônias obtidas na transformação foram confirmadas através de ensaio de restrição utilizando as próprias enzimas *SacI* e *XbaI* que, na construção correta, libera um fragmento de aproximadamente 500 pb correspondente ao sgRNA e um fragmento de aproximadamente 4 kb correspondentes ao vetor linearizado (Figura 3). Após a

confirmação da clonagem, foram feitas culturas permanente e minipreps do plasmídeo então nomeado de pGreen_sgRNAØ.

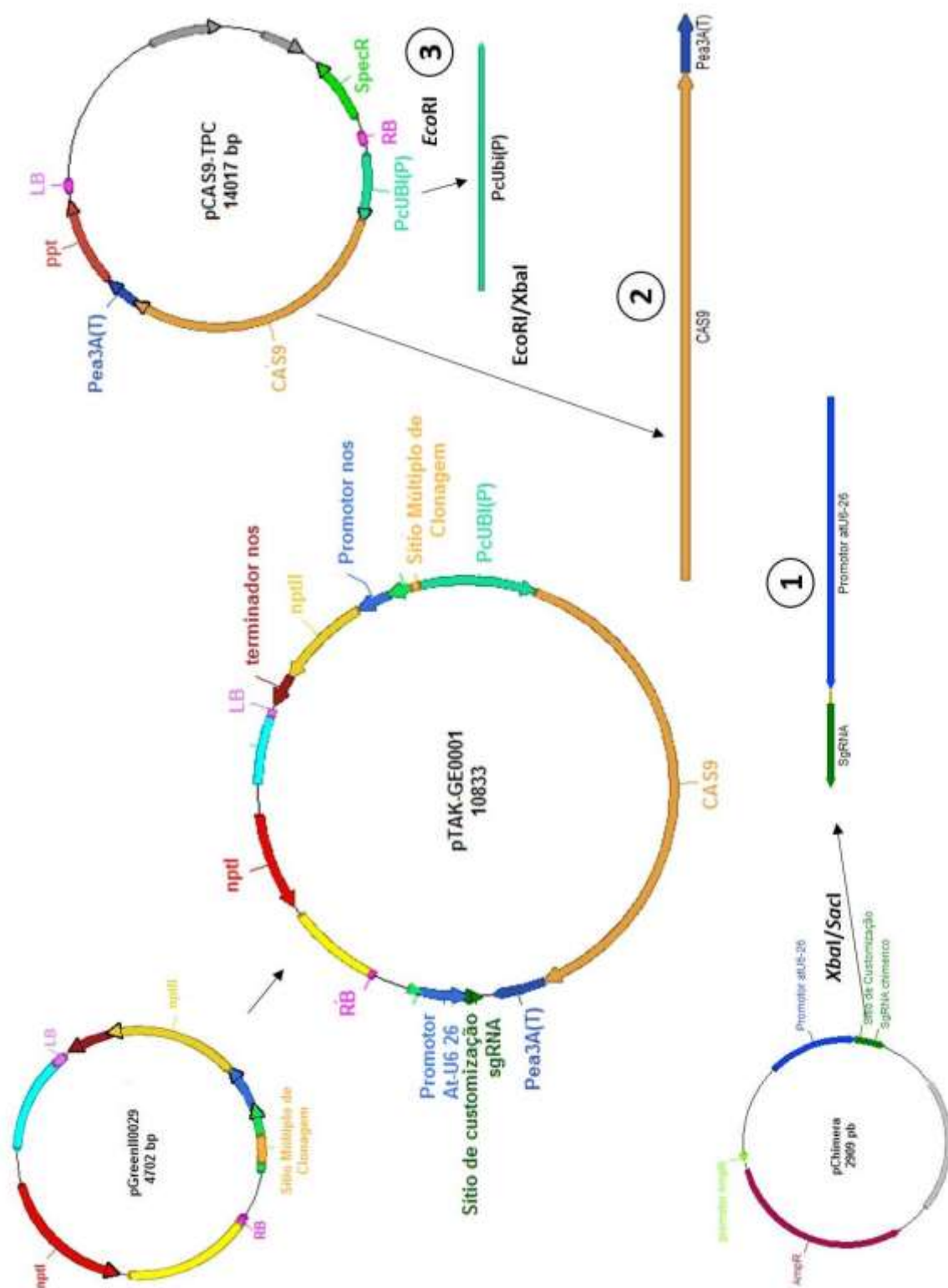


Figura 1: Esquema representando a construção do vetor pTAK-GE0001. As setas representam cada uma das três clonagens com as respectivas enzimas de restrição.

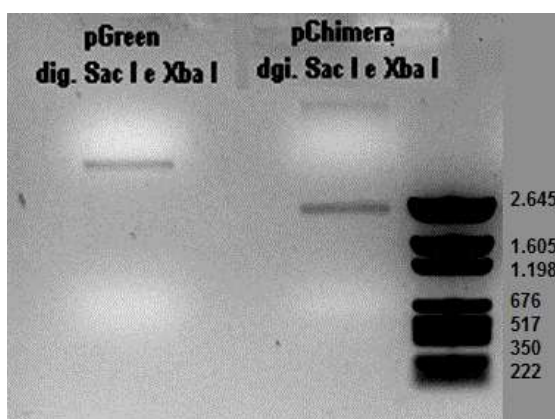


Figura 2: Gel de Agarose 1% com o resultado da digestão dos vetores pGreen 0029 e pChimera com as enzimas *SacI* e *XbaI*.

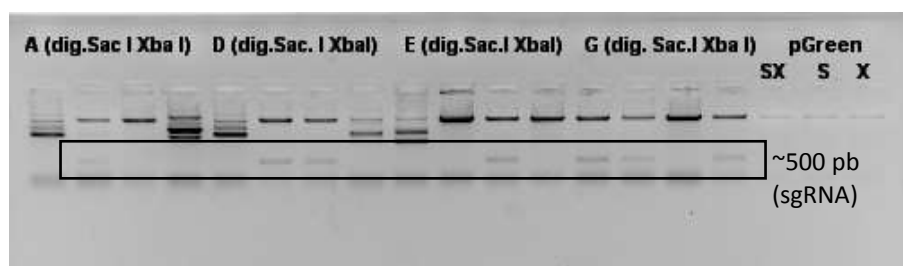


Figura 3: Gel de Agarose 1% com o resultado do ensaio de restrição dos clones de pGreen+sgRNAØ com as enzimas *SacI* e *XbaI*.

4.2. Clonagem da CAS9

Após a confirmação da clonagem, o vetor pGreen-sgRNAØ foi digerido com as enzimas *EcoRI* e *XbaI* (Figura 4) assim como o vetor pCAS9-TPC, afim de liberar a CAS9 (Figura 5). Foi feita uma ligação na proporção 1:5 como descrita anteriormente e as colônias obtidas foram selecionadas para extração de plasmídeos e posteriormente confirmadas através de ensaio de restrição utilizando a enzima *EcoRI* e as enzimas *EcoRI* e *XbaI* simultaneamente. A digestão com apenas a enzima *EcoRI* no vetor corretamente clonado libera um fragmento de 4Kb correspondente tanto o esqueleto do vetor pGreen_sgRNAØ, quanto a CAS 9 sozinha, que se sobrepõem, portanto há a necessidade de uma digestão dupla para diferenciar o vetor com a CAS9 clonado do vetor vazio (Figura 6). Após a confirmação da clonagem, foram feitas culturas permanente e minipreps do plasmídeo então nomeado de pGreen_sgRNAØ_CAS9.

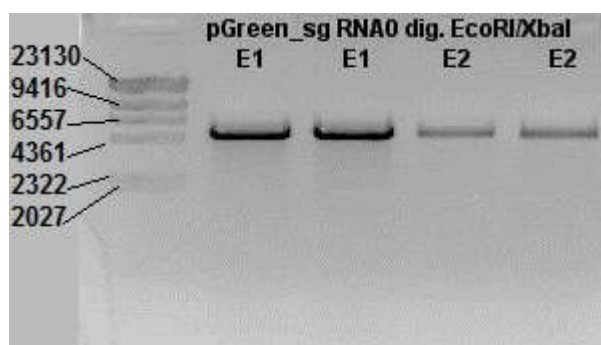


Figura 4: Gel de Agarose 1% mostrando a linearização do vetor pGreen_sgRNAØ com as enzimas *EcoRI* e *XbaI*.

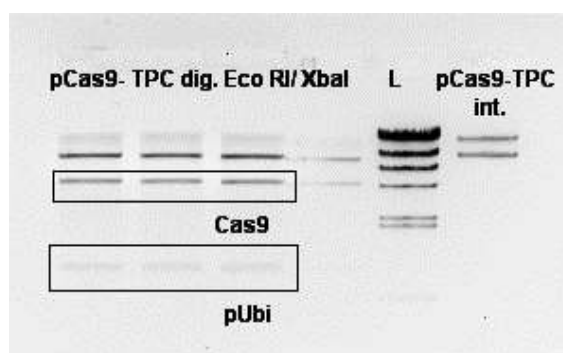


Figura 5: Gel de Agarose 1% mostrando a digestão do vetor pCAS9-TPC para liberação da enzima CAS9.



Figura 6: Gel de agarose 1% mostrando o ensaio de Restrição das colônias obtidas da ligação pGreen_sgRNAØ + CAS9, digeridas com *EcoRI* somente e *EcoRI* e *XbaI* simultaneamente.

4.3. Clonagem do promotor pUbi 4-2

A última etapa da construção consistiu na clonagem do promotor Ubi4-2 no vetor pGreen_sgRNAØ_CAS9. Esse promotor foi retirado do vetor pCAS9-TPC que possui um tamanho extremamente elevado quando comparado ao do fragmento que se desejava liberar, e por isso fazia com que a digestão se tornasse extremamente ineficiente. Afim de contornar esse problema, foram sintetizados um par de primers (pUbi4-2_FW e pUbi4-2_RV) flanqueando o promotor, que foram utilizados para amplificação da região via PCR. O amplicon obtido foi digerido com a enzima *EcoRI*

assim como o vetor pGreen_sgRNAØ_CAS9 (Figura 7). Foi feita uma ligação durante a noite, conforme descrito previamente. Para confirmação da inserção do promotor foi feito um PCR de colônia utilizando os primers M13(-20) e pUbi4-2_RV (Figura 8), porém nesse caso também foi necessária a confirmação da orientação da clonagem uma vez que a mesma se deu utilizando-se de apenas uma enzima. Para isso, as colônias que apresentaram clonagem positivas foram selecionadas e foi feita uma extração de plasmídeos das mesmas, seguido por um ensaio de restrição com a enzima *NheI*, que resultou em um fragmento de 1.500 pares de base no caso de orientação invertida, e em um fragmento de 500 pares de base no caso de orientação correta (Figura 9). Também foi feita uma digestão com a enzima *HindIII* para fins de linearização do vetor. Conforme os resultados observados na figura 10, foi possível selecionar um vetor clonado na orientação correta a partir da colônia, que foi nomeado de pTAK-GE0001.



Figura 7: Gel de agarose 1% mostrando a digestão do vetor pGreen_sgRNAØ_CAS9 com a enzima *EcoRI*.

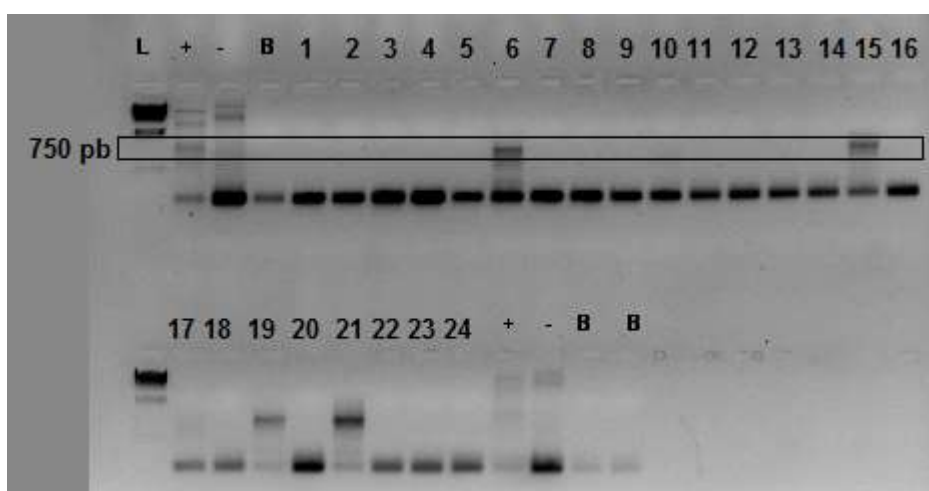


Figura 8: Gel de agarose 1% mostrando o PCR de colônia com os primers M13(-20) e pUbi4-2_RV dos transformantes da ligação pGreen_sgRNAØ_CAS9 + pUbi. As colônias 6, 15, 19 e 21 indicaram que houve a clonagem do promotor pUbi.

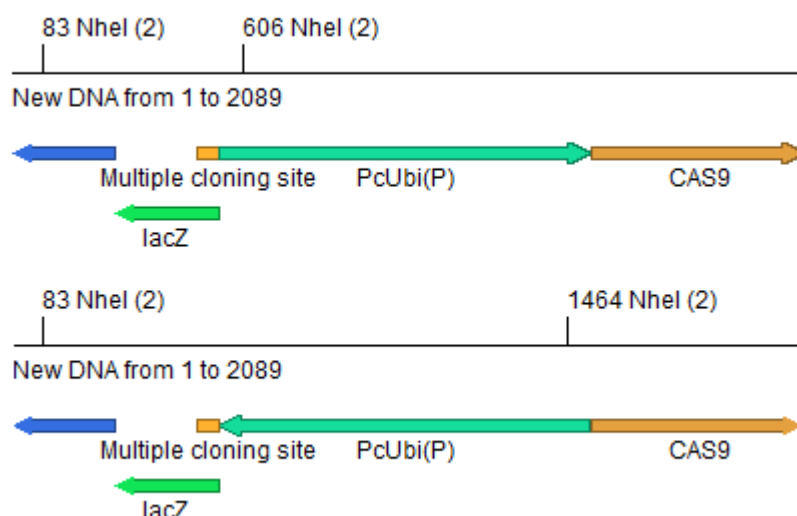


Figura 9: Esquema ilustrando a diferença na posição do sítio de *NheI* no caso de cada uma das orientações da clonagem de PcUbi(P).

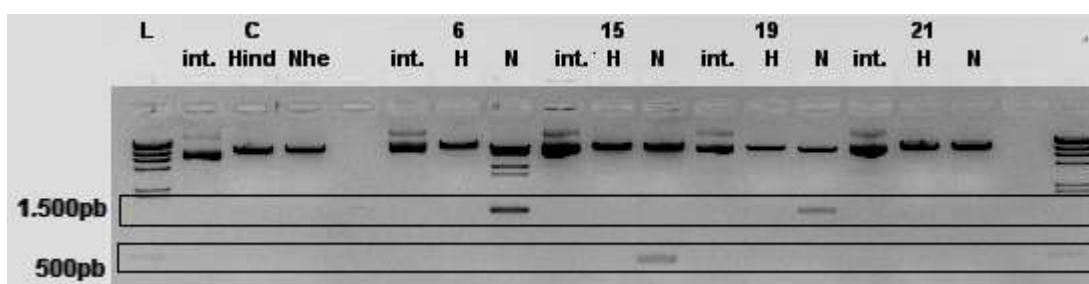


Figura 10: Gel de agarose 1% mostrando o resultado obtido no ensaio de restrição com as enzimas *HindIII* e *NheI*. A colônia 15 foi a única com o promotor clonado na orientação correta.

5. Conclusões

Nesse trabalho foi possível obter com sucesso um novo vetor para edição de genomas de plantas conforme proposto e através de clonagens sequenciais.

6. Literatura citada

BOLOTIN, A.; QUINQUIS, B.; SOROKIN, A.; EHRLICH, S. D. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. **Microbiology**, v. 151, n. 8, p. 2551–2561, 2005.

CHAR, S. N.; NEELAKANDAN, A. K.; NAHAMPUN, H.; FRAME, B.; MAIN, M.; SPALDING, M. H.; BECRAFT, P.W.; MEYERS, B.C.; WALBOT, V.; WANG, K.; YANG, B. An *Agrobacterium*-delivered CRISPR/Cas9 system for high-frequency targeted mutagenesis in maize. **Plant Biotechnology Journal**, v. 15, n. 2, p. 257–

268, 2017.

CONG, L.; RAN, F. A.; COX, D.; LIN, S.; BARRETTO, R.; HSU, P. D.; WU, X.; JIANG, W.; MARRAFFINI, L. A. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. **Science**, v. 339, n. 6121, p. 819–823, 2013.

FAUSER, F.; SCHIML, S.; PUCHTA, H. Both CRISPR/Cas-based nucleases and nickases can be used efficiently for genome engineering in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, v. 79, n. 2, p. 348–359, 2014.

FENG, Z.; ZHANG, B.; DING, W.; LIU, X.; YANG, D-L.; WEI, P.; CAO, F.; ZHU, S.; ZHANG, F.; MAO, Y.; ZHU, J-K. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. **Cell Research**, v. 23, n. 10, p. 1229–1232, 2013.

GAO, J.; WANG, G.; MA, S.; XIE, X.; WU, X.; ZHANG, X.; WU, Y.; ZHAO, P.; XIA, Q. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Nicotiana tabacum*. **Plant Molecular Biology**, v. 87, n. 1–2, p. 99–110, 2015.

HAHN, F.; MANTEGAZZA, O.; GREINER, A.; HEGEMANN, P.; EISENHUT, M.; WEBER, A. P. M. An Efficient Visual Screen for CRISPR/Cas9 Activity in *Arabidopsis thaliana*. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. January, p. 39, 2017.

HYUN, Y.; KIM, J.; CHO, S. W.; CHOI, Y.; KIM, J. S.; COUPLAND, G. Site-directed mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* using dividing tissue-targeted RGEN of the CRISPR/Cas system to generate heritable null alleles. **Planta**, v. 241, n. 1, p. 271–284, 2014.

INOUE, H.; NOJIMA, H.; OKAYAMA, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Gene**, v. 96, n. 1, p. 23–28, 1990.

ISHINO, Y.; SHINAGAWA, H.; MAKINO, K.; AMEMURA, M.; NAKATA, A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. **Journal of bacteriology**, v. 169, n. 12, p. 5429–33, 1987.

JIA, H.; ORBOVIC, V.; JONES, J. B.; WANG, N. Modification of the PthA4 effector binding elements in Type I CsLOB1 promoter using Cas9/sgRNA to produce transgenic Duncan grapefruit alleviating Xcc Δ pthA4: DCsLOB1.3 infection. **Plant Biotechnology Journal**, v. 14, n. 5, p. 1291–1301, 2016.

JIA, H.; ZHANG, Y.; ORBOVIĆ, V.; XU, J.; WHITE, F.F.; JONES, J. B.; WANG, N. Genome editing of the disease susceptibility gene CsLOB1 in citrus confers resistance to citrus canker. **Plant Biotechnology Journal**, v. 15, n. 7, p. 817–823, 2017.

JIA, H.; WANG, N. Targeted genome editing of sweet orange using Cas9/sgRNA. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014.

JIANG, W.; ZHOU, H.; BI, H.; FROMM, M.; YANG, B.; WEEKS, D. P. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 20, p. 1–12, 2013.

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, n. August, p. 816–822, 2012.

LI, J.-F.; LI, NORVILLE, J.E.; AACH, J.; MCCORMACK, M.; ZHANG, D.; BUSH, J.; CHURCH, G. M.; SHEEN, J. Multiplex and homologous recombination–mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 8, p. 688–691, 2013.

LI, Z.; LIU, Z.-B.; XING, A.; MOON, B. P.; KOELLHOFFER, J. P.; HUANG, L.; WARD, R. T.; CLIFTON, E.; FALCO, S. C.; CIGAN, M. Cas9-guide RNA Directed Genome Editing in Soybean. **Plant Physiology**, v. 169, n. October, p. pp.00783.2015, 2015.

LIANG, Z.; CHEN, K.; LI, T.; ZHANG, Y.; WANG, Y.; ZHAO, Q.; LIU, J.; ZHANG, H.; LIU, C.; RAN, Y.; GAO, C. Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. **Nature Communications**, v. 8, n. January, p. 1–5, 2017.

MA, X.; ZHANG, Q.; ZHU, Q.; LIU, W.; CHEN, Y.; QIU, R. A Robust CRISPR / Cas9 System for Convenient , High-Efficiency Multiplex Genome Editing in Monocot and Dicot Plants. **Molecular Plant**, n. 8, p. 1274–1284, 2015.

MA, X.; Zhu, Q.; Chen, Y.; Liu, Y.-G.; RISPR/Cas9 platforms for genome editing in plants: developments and applications. **Molecular Plant**, v. 9, n. 7, p. 961–974, 2016.

MALI, P.; ESVELT, K. M.; CHURCH, G. M. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. **Nature Methods**, v. 10, n. 10, p. 957–963, 2013.

MERCX, S.; TOLLET, J.; MAGY, B.; NAVARRE, C.; BOUTRY, M. Gene Inactivation by CRISPR-Cas9 in *Nicotiana tabacum* BY-2 Suspension Cells. **Frontiers in plant science**, v. 7, n. e188, p. 41, 2016.

MOJICA, F. J. M.; DÍEZ-VILLASEÑOR, C.; GARCÍA-MARTÍNEZ, J.; SORIA, E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. **Journal of Molecular Evolution**, v. 60, n. 2, p. 174–182, 2005.

NEKRASOV, V.; STASKAWICZ, B.; WEIGEL, D.; JONES, J. D. G.; KAMOUN, S. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 8, p. 691–693, 2013.

NIEVES-CORDONES, M.; MOHAMEDA, S.; TANOIC, K.; KOBAYASHIC, N. I.; TAKAGIC, K.; VERNET, A.; GUIDERDONIB, E.; PÉRINB, C.; SENTENACA, H.; VÉRYA, A.-A. Production of low-Cs⁺ rice plants by inactivation of the K⁺ transporter OsHAK1 with the CRISPR-Cas system. **The Plant Journal**, 2017.

PENG, A.; CHEN, S.; LEI, T.; XU, L.; HE, Y.; WU, L.; YAO, L.; ZOU, X. Engineering canker-resistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the susceptibility gene CsLOB1 promoter in citrus. **Plant Biotechnology Journal**, p. 1–11, 2017.

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, n. 3, p. 653–663, 2005.

RAN, F. A.; HSU, P. D.; LIN, C. Y.; GOOTENBERG, J. S.; KONERMANN, S.; TREVINO, A. E.; SCOTT, D. A.; INOUE, A.; MATOBA, S.; ZHANG, Y.; ZHANG, F. Double nicking by RNA-guided CRISPR cas9 for enhanced genome editing specificity. **Cell**, v. 154, n. 6, p. 1380–1389, 2013.

SCHIML, S.; FAUSER, F.; PUCHTA, H. The CRISPR/Cas system can be used as nuclease for in planta gene targeting and as paired nickases for directed mutagenesis in Arabidopsis resulting in heritable progeny. **Plant Journal**, v. 80, n. 6, p. 1139–1150, 2014.

SHAN, Q.; WANG, Y.; LI, J.; ZHANG, Y.; CHEN, K.; LIANG, Z.; ZHANG, K.; LIU, J.; XI, J. J.; QIU, J.-L.; GAO, C. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 8, p. 684–686, 2013.

SVITASHEV, S.; YOUNG, J. K.; SCHWARTZ, C.; GAO, H.; FALCO, S. C.; CIGAN, A. M. Targeted Mutagenesis, Precise Gene Editing, and Site-Specific Gene Insertion in Maize Using Cas9 and Guide RNA. **Plant Physiology**, v. 169, n. 2, p. 931–45, 2015.

WANG, Z.-P.; XING, H.-L.; DONG, L.; ZHANG, H.-Y.; HAN, C.-Y.; WANG, X.-C.; CHEN, Q.-J. Egg cell-specific promoter-controlled CRISPR/Cas9 efficiently generates homozygous mutants for multiple target genes in Arabidopsis in a single generation. **Genome biology**, v. 16, n. 1, p. 144, 2015.

XING, H.-L.; DONG, L.; WANG, Z.-P.; ZHANG, H.-Y.; HAN, C.-Y.; LIU, B.; WANG, X.-C.; CHEN, Q.-J. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. **BMC Plant Biology**, v. 14, n. 1, p. 327, 2014.

ZHOU, H.; LIU, B.; WEEKS, D. P.; SPALDING, M. H.; YANG, B. Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice.

Nucleic Acids Research, v. 42, n. 17, p. 10903–10914, 2014.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse trabalho foi possível fazer a seleção e clonagem de 42 sequências alvo potenciais para estudos de doenças de citros, sendo 34 correspondentes a possíveis genes de terpeno sintase e 8 correspondentes a genes previamente relatados como de resistência a *CTV*. Os vetores obtidos foram utilizados para posterior subclonagem no vetor binário pCAS9-TPC, porém devido a dificuldades relatadas no processo, apenas foi possível concluir a inserção de 2 sgRNAs, sendo cada um deles customizado para um tipo de gene alvo estudado. Os vetores binários obtidos serão futuramente validados via ensaio enzimático de clivagem de bases não pareadas e serão utilizados para edição de genomas por nosso grupo de pesquisa.

No decorrer do processo de clonagem desses vetores, foi possível identificar algumas limitações do sistema, que comprometeram a obtenção de construções adicionais. Entretanto, essa experiência estimulou o desenvolvimento de um novo sistema de clonagem que supre tais limitações e que poderia facilitar o procedimento de edição de genomas via CRISPR/CAS 9, tornando-o algo mais simples e fácil de ser executado não só para citros, mas também para outras culturas. Para isso foi proposto e concluída a construção de um novo vetor, aqui chamado de pTAK-GE0001, para uso desse sistema em plantas adaptado às necessidades de nosso grupo, que possui tamanho reduzido uma vez que conta com a co-transformação com o vetor auxiliar pSoup. Além disso, o novo vetor obtido permite a customização do sgRNA no próprio vetor binário, reduzindo assim uma etapa de subclonagem no

processo. Por fim, o vetor pTAK-GE0001 substitui os agentes de seleção para bactéria e planta, respectivamente espectinomicina e finale, por canamicina para ambas as seleções, por ser um antibiótico amplamente utilizado para esse contexto.

O novo vetor pTAK-GE0001 já foi customizado com pelo menos 5 sequências-alvo, dentre as quais se encontram algumas selecionadas no Capítulo 1, relacionadas a tolerância a CTV e cancro cítrico. O vetor também foi customizado com sequências alvo para o gene Cs6g08720.1, relacionado a síntese de fotossíntese. A Clonagem dessas sequências-alvo foi realizada de maneira simples e sem maiores complicações, o que confirma uma vantagem desse vetor sob o sistema original quanto a rapidez e facilidade na execução da etapa de clonagem. Esses ganhos representam um avanço no que diz respeito ao protocolo de edição de genomas em plantas. O Vetor pTAK-GE0001 aguarda sequenciamento e validação.

Adicionalmente ao novo vetor obtido, foi possível estabelecer nesse trabalho, parâmetros para duas metodologias de transformação transiente, o que representa um grande avanço para os estudos genéticos em citros. Os novos protocolos obtidos nesse trabalho poderão ser utilizados para testes de eficiência de vetores CRISPR, uma vez que possibilitam o acesso rápido as informações genéticas como mutações, facilitando ainda mais a expansão do uso dessa técnica nessa cultura. Adicionalmente, esses novos protocolos também contribuirão para avanços em outras pesquisas com diversas aplicações, uma vez que muitas delas dependiam do estabelecimento dessa metodologia.