

PURIFICAÇÃO DE AMPLOCOS PARA A SÍNTESE DE dsRNAs VISANDO O SILENCIAMENTO DE GENES DE *Botrytis cinerea*

SELENE HENSE LILGE¹; JUSSUANE PORTELLA DA SILVA²; MÉLANY ANDRADE THIELO³; GUSTAVO HENRIQUE CAMOZATTO⁴; PEDRO LOPES REISSER⁵; VANESSA GALLI⁶.

¹Universidade Federal de Pelotas – selenelilge04@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – jussuane.biotech@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas - melanythielo@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – gustavocamozatto@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – reisser.pedro@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – vane.galli@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

O *Botrytis cinerea* é um patógeno fúngico, conhecido como mofo cinzento, pertencente à família Sclerotiniaceae (DA SILVA et al., 2023). Esse fungo tem capacidade de infectar mais de 1000 espécies de plantas (FILLINGER; ELAD, 2016), dentre essas, muitas de importância econômica, como uvas, morangos, tomates e maçãs. O fungo representa uma ameaça tanto ao desenvolvimento das espécies quanto ao armazenamento pós-colheita (ZHAO et al., 2023), por essa razão, *Botrytis cinerea* se tornou alvo mundial de pesquisa. Além disso, vem desenvolvendo resistência a fungicidas (SPADA et al., 2023). Então, uma das alternativas emergentes para o controle de *Botrytis cinerea* é a utilização de moléculas de dsRNAs, de forma a induzir o sistema de RNA interferente (RNAi) (SPADA et al., 2023) e silenciar genes importantes para a proliferação e desenvolvimento do fungo.

Durante o desenvolvimento do *Botrytis cinerea*, ocorre a exocitose de enzimas responsáveis pela adesão celular e patogênese (READ, 2011), a mesma é mediada por um complexo proteico chamado exocisto, este é constituído por oito subunidades proteicas, Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70 e Exo84, as quais estão associadas com o deslocamento das vesículas para a membrana plasmática da célula alvo (MEI; GUO, 2018).

Dentre essas, a proteína Sec3 é uma das principais na interação com a membrana lipídica, visto que o silenciamento dessa subunidade reduziu significativamente o crescimento do fungo e prejudicou a produção de conídios e escleródios, diminuindo então, a virulência e crescimento do fungo (GUAN et al, 2020; MA et al., 2020). Desta forma, a proteína Sec3 pode ser utilizada como alvo da técnica de silenciamento gênico induzido por spray (SIGS).

Para sintetizar um dsRNA capaz de silenciar o gene Sec3 do *B. cinerea* será utilizado o MEGAscript™ T7 Transcription Kit. Para o funcionamento desse kit, a amplificação do gene deve conter a sequência promotora necessária para o ancoramento da T7 RNA polimerase, assim, essa sequência foi adicionada ao iniciador utilizado na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Esse kit exige um amplicon (produto da PCR) de purificação elevada, tendo em vista que contaminantes como dímeros de primers, dNTPs e proteínas interferem na síntese do dsRNA. Entretanto, nessa etapa pode ocorrer uma perda significativa na concentração do amplicon. Visando contornar esse problema, neste trabalho, testamos 2 kits de purificação: GFX (Cytiva) e GeneJET (Thermo Scientific), para averiguar qual remove os contaminantes sem perda da concentração dos amplicons, para utilizá-los na síntese de dsRNAs, visando o controle de *Botrytis cinerea*.

2. METODOLOGIA

Para a amplificação do gene *Sec3* no DNA do *Botrytis cinerea* foi realizada uma técnica de PCR, utilizando 28 μ L de GoTaq mastermix (Promega), 1 μ L do Primer Forward e Primer Reverse, 1,5 μ L de DNA de *Botrytis cinerea* e 18,5 μ L de H₂O, totalizando 50 μ L de reação em cada um dos 8 tubos. A desnaturação inicial foi a 95 °C por 4 minutos, seguido de 50 ciclos de 95 °C por 45 s, 58 °C por 25 s e 72 °C por 50 s, e o anelamento final a 72 °C por 7 minutos. Foi feita uma eletroforese em gel de agarose para verificar a amplificação.

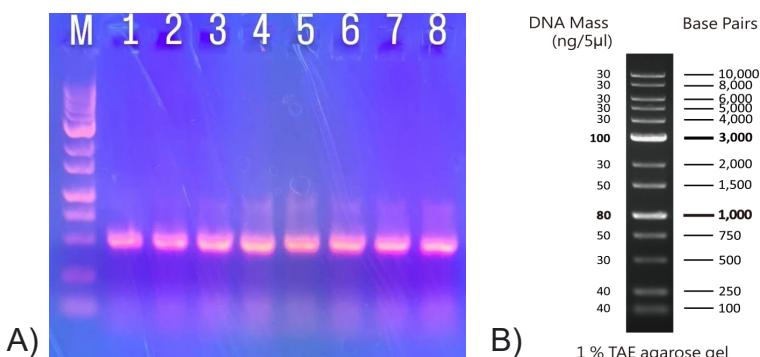
Os Kits GFX e GeneJET foram utilizados de acordo com o protocolo indicado nas instruções do fabricante e ao final do processo, os amplicons foram eluídos em 25 μ L e 50 μ L de tampão, respectivamente. Para verificar o resultado da purificação, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídeo, utilizando 2,5 μ L de tampão de amostra, 5 μ L da amostra do amplicon e 5 μ L de marcador de peso molecular, a eletroforese foi realizada em 80 V a 400 mA por 1 hora.

Posteriormente, as amostras foram quantificadas em NanoVue (GE Healthcare) nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm, utilizando o tampão de eluição respectivo de cada kit como branco.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, o objetivo foi descobrir qual kit de purificação proporciona alta concentração e pureza ao amplicon para prosseguirmos com o MEGAscript™ T7 Transcription Kit para a síntese das moléculas de dsRNAs, a fim de silenciar genes importantes para a proliferação e desenvolvimento do fungo *Botrytis cinerea*. Por tanto, inicialmente o gene *Sec3* de *Botrytis cinerea* foi amplificado por PCR. A Figura 1A representa o resultado da eletroforese em gel de agarose 0,8%, indicando que o gene *Sec3* foi amplificado com eficiência. O amplicon apresenta 500 pb e todas as amostras apresentam concentração similar de aproximadamente 200 ng/ 5 μ L, como indicado pela intensidade da banda do marcador de peso molecular, na Figura 1B.

Figura 1. **A** - Eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo. M - marcador de peso molecular; 1 a 8 - amplicons do gene *Sec3* de *Botrytis cinerea*. **B** - Marcador de peso molecular de 1kb (Kasvi).

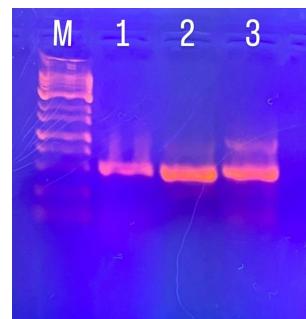


Após a amplificação do gene *Sec3*, os amplicons foram purificados com os dois kits comerciais. O Kit GFX promete remover até 99,5% dos contaminantes. Esse kit combina um tampão caotrópico com uma coluna de fibra de vidro para a purificação do DNA, tanto em solução como no gel de agarose, com tamanho de 50 pb a 10 kb. Além disso, conta com um protocolo simples e rápido, que pode

ser realizado em até 10 minutos. Enquanto, o Kit GeneJET pode ser utilizado para purificação de fragmentos de DNA de 25 pb a 20 kb, garantindo taxas de recuperação de 90-100% em uma faixa de tamanho de fragmento de DNA de 100 pb – 10 kb, neste kit cada coluna de sílica tem capacidade total de ligação de até 25 µg de DNA e todo o procedimento leva em média de 5 minutos.

Na Figura 2 é possível notar que ambos kits de purificação conseguiram concentrar as amostras, pois ao comparar com a intensidade da banda do amplicon não purificado, nota-se que as bandas do amplicon purificado são mais reluzentes, aparentando ter concentração de amplicon superior a 200 ng/5 µL. Entretanto, foram utilizados volumes diferentes de tampão de eluição, na purificação utilizando o Kit GFX foi utilizado 25 µL, enquanto na purificação utilizando o Kit GeneJET foi utilizado 50 µL do tampão de eluição. Desta forma, a amostra de amplicon purificado com o Kit GFX está mais concentrada.

Figura 2. Eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo. M - marcador de peso molecular; 1 - amplicon do gene Sec3 não purificado; 2 - amplicon do gene Sec3 purificado com o Kit comercial GFX; 3 - amplicon do gene Sec3 purificado com o Kit comercial GeneJET.



Apenas a visualização do gel de agarose é insuficiente para afirmar a concentração de amplicon, por isso foi necessário quantificar as amostras do amplicon purificado em NanoVue, para obter um indicativo de qualidade dos Kits, analisando a proporção de DNA para proteínas e contaminantes.

Tabela 1 - Quantificação em NanoVue do DNA não purificado (NP) e purificado utilizando os Kits comerciais.

DNA com o gene Sec3	Concentração (ng/µL)	Razão 260/280
NP	30,0	1,824
GFX	76,5	1,821
GeneJET	82,0	1,864

Fonte: elaborado pelo autor (2023)

Os valores da quantificação por espectrofotometria (Tabela 1) foram equivalentes à concentração indicada pelo marcador (Figura 2). Entretanto, pela semi quantificação do marcador de peso molecular, a amostra utilizando o GFX aparenta ter uma banda mais intensa pois o amplicon está menos diluído, caso tivesse sido diluído em 50 µL de tampão de eluição, provavelmente sua

concentração seria algo em torno de 38 ng/µL. Desta forma, o Kit GeneJET obteve maior concentração de amplicon ao purificar.

Ainda é possível notar a presença de uma banda inespecífica, de tamanho superior ao esperado, após a purificação do amplicon, sugerindo que os iniciadores podem estar se anelando em outros locais do genoma. Por essa razão, será necessário padronizar melhor as condições de PCR para evitar a presença de bandas inespecíficas.

Além dos kits comerciais, também é possível realizar a purificação do amplicon utilizando protocolos caseiros, com etanol, por exemplo. Entretanto, esses protocolos não são tão simples quanto os comerciais e ainda tem períodos longos de incubação, tornando a purificação mais demorada, enquanto a purificação com kits comerciais pode ser feita em menos de 10 minutos.

4. CONCLUSÕES

O Kit GeneJET é mais eficiente para a purificação de amplicon do gene *Sec3*, pois baseando-se nos resultados obtidos na quantificação por espectrofotometria, esse kit obteve maior concentração de amplicon ao purificar quando comparado ao Kit GFX. Por tanto, este será o kit que utilizaremos para purificar os amplicons que serão utilizados para a síntese de dsRNAs visando o controle de *Botrytis cinerea*. No entanto, tentaremos reduzir o volume de tampão de eluição na purificação com o Kit GeneJET para aumentar a concentração de amplicons.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DA SILVA RIPARDO-FILHO, H. et al. From Genes to Molecules, Secondary Metabolism in *Botrytis cinerea*: New Insights into Anamorphic and Teleomorphic Stages. **Plants**, v. 12, n. 3, p. 553, 2023.

FILLINGER, Sabine; ELAD, Yigal (Ed.). ***Botrytis - the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems***. Cham, Switzerland: Springer International Publishing, 2016.

GUAN, Wenqing et al. Functional analysis of the exocyst subunit BcExo70 in *Botrytis cinerea*. **Current Genetics**, v. 66, p. 85-95, 2020.

MA, Zhiwei et al. Exocyst subunit BcSec3 regulates growth, development and pathogenicity in *Botrytis cinerea*. **Journal of biosciences**, v. 45, p. 1-12, 2020.

MEI, Kunrong; GUO, Wei. The exocyst complex. **Current Biology**, v. 28, n. 17, p. R922-R925, 2018.

READ, Nick D. Exocytosis and growth do not occur only at hyphal tips. **Molecular microbiology**, v. 81, n. 1, p. 4-7, 2011.

SPADA, M. et al. Knockdown of Bmp1 and Pls1 virulence genes by exogenous application of RNAi-inducing dsRNA in *Botrytis cinerea*. **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 5, p. 4869, 2023.

ZHAO, Haipeng et al. Plant immune inducer ZNC promotes rutin accumulation and enhances resistance to *Botrytis cinerea* in tomato. **Stress Biology**, v. 3, n. 1, p. 36, 2023.