

CONSTRUÇÃO DE MOLÉCULAS DE siRNA PARA SILENCIAMENTO DO RNA MENSAGEIRO DA CHALCONA SINTASE EM MORANGOS (*Fragaria x ananassa*)

YASMIN BRAGA FARIA¹; GUSTAVO HENRIQUE CAMOZATTO²; PEDRO LOPES REISSER³; RAFFAELA DE HOLLEBEN CAMOZZATO BENETTI⁴; CLAUDIANE DA SILVA MACHADO⁵, VANESSA GALLI⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – yasminbragafar@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – gustavocamozatto@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – reisser.pedro@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – raffaela.cbenetti@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – Claudiane.machado@ufpel.edu.br

⁶Universidade Federal de Pelotas – vanessa.galli@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

O morango (*Fragaria x ananassa*) é um fruto amplamente apreciado, além de ser um modelo para pesquisas com frutas não climatéricas, devido à facilidade de manipulação genética e rápida maturação dos frutos (HOLLENDER, 2012; FOLTA et al., 2007). O processo de amadurecimento das frutas não climatéricas se diferencia do clássico controle por etileno das climatéricas, o que torna essa categoria de fruta escassa de tecnologias para controle de maturação e armazenamento (GIOVANNINONI, 2004). Devido à necessidade de colher esses frutos em estádio final de maturação, quando apresenta alta porcentagem de água e açúcares, além de parede celular frágil, é comum o ataque de patógenos, o que estimula o uso de agroquímicos para controle. Uma vez que o uso de agroquímicos enfrenta uma crescente rejeição por parte dos consumidores, novas alternativas de controle se tornam importantes.

Uma das tecnologias alternativas que vem sendo estudadas é o silenciamento gênico induzido por spray (SIGS). A técnica de SIGS consiste na aplicação via spray de RNAs pequenos interferentes (siRNAs), moléculas de RNA entre 21-22 pares de base, que se ligam a RNAs mensageiros (mRNAs) alvos promovendo sua degradação. Esta degradação é temporária e culmina na redução da síntese proteica. (VETUKURI et al., 2021). Assim, para ação como agroquímico, as moléculas de siRNAs são projetadas para degradar mRNAs do patógeno que se deseja controlar. Alternativamente, é possível projetar siRNAs para silenciar genes do fruto visando aumentar a tolerância à infecção pelo patógeno.

No entanto, um dos limitantes para que essa técnica não tenha se difundido é a falta de controles positivos para esta metodologia, que sejam espécie-específicos, permitindo confirmar a eficácia da metodologia adotada. Um controle ideal para experimentos que envolvem silenciamento gênico deve apresentar reproduzibilidade (KATHY BARKER, 2002), e no caso de SIGS, que seja visual. Um gene possível para adquirir o controle desejado em frutos de morango seria a *chalcona sintase* (CHS), uma vez que em experimentos de silenciamento desse gene pode-se notar um fenótipo esbranquiçado no fruto, devido à baixa ou ausência da síntese de antocianinas (XING et al., 2018).

Assim, o presente trabalho visa construir siRNAs para o gene da *Chalcona sintase* de morango (*FaCHS*), com o objetivo de silenciar o mRNA que codifica para

esta enzima. O design desses siRNAs tem como intuito obter um controle positivo adequado para confirmar a eficácia da metodologia adotada para SIGS, visando o silenciamento de genes de morango e de genes de patógenos que infectam o fruto.

2. METODOLOGIA

A sequência codificadora do mRNA (CDS) da enzima *Chalcona Sintase* (*FaCHS*) foi obtida por buscas no banco de dados de nucleotídeos NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>). Para tanto, esta sequência foi adicionada no programa pssRNAit (<https://www.zhaolab.org/pssRNAit/>), no formato FASTA, utilizando as configurações padrões (*default*) e o organismo de referência utilizado foi a *Fragaria x vesca*, que se refere ao morango selvagem, visto que o programa não permite a seleção da espécie cultivada. Para escolha dos siRNAs foi utilizado como critérios: a pontuação de *antisense* e *sense* de ligação ao complexo RISC, off-targets, acessibilidade do alvo, e eficiência do siRNA.

Posteriormente, utilizou-se o programa RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>), onde se adicionou a sequência CDS para gerar o gráfico MFE, usando a configuração *color by base-pairing probability*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em metodologias de silenciamento gênico, o uso de controles positivos é essencial, para garantir que os efeitos fenotípicos, bioquímicos ou fisiológicos observados são de fato oriundos do silenciamento específico do gene alvo. Para a obtenção de um controle positivo para uso de SIGS em frutos de morango, foram projetados siRNAs visando o silenciamento de mRNAs de *FaCHS*, utilizando ferramentas de bioinformática.

Este estudo resultou em 65 possíveis candidatos de siRNAs para o mRNA da *FaCHS*, dos quais selecionamos quatro (Tabela 1). Esses siRNAs foram selecionados e filtrados com base em 5 critérios, sendo estes: Pontuação *Antisense* e *Sense* para ligação do siRNA no complexo RISC (PRisc), eficiência das moléculas em ocasionar silenciamento, minimização dos efeitos *off-target* e acessibilidade ao alvo. O complexo RISC no *antisense* é importante pois ele rege uma maior possibilidade no silenciamento do gene CHS, logo a sua pontuação tende a ser positiva, o contrário dos resultados para a fita *sense* que tende a ser negativo pois a molécula se torna mais eficaz sem a interferência da fita *sense* no complexo RISC (AHMED *et al*, 2020), além disso, deve-se evitar siRNAs que apresentem efeitos *off-target*, garantindo que não ocorra o silenciamento de outros genes que não seja o alvo original, ocasionando em uma especificidade do experimento.

Tabela 1 – Informações sobre as moléculas de siRNAs selecionadas. Off-targets corresponde a alvos não atingidos

Nome	Eficiência	Pontuação Antisense de Ligação RISC	Pontuação Sense de Ligação RISC	Acessibilidade Alvo	Off-Targets
siRNA ¹³³	8,91	2,56	-2,45	8,068	9
siRNA ⁴⁷⁵	7,96	1,24	-1,19	18,962	7
siRNA ⁴⁷⁷	7,65	1,18	-2,48	18,947	15
siRNA ⁴⁷⁸	8,57	1,17	-1,53	18,951	15

Um dos critérios utilizado pelo pssRNAit é a acessibilidade do alvo, que se refere à possibilidade de o siRNA se ligar a regiões do mRNA alvo que não apresentem estruturas secundárias que impeçam sua ligação. Uma vez que não há informações suficientes na literatura para definir os valores adequados para este critério, utilizou-se o programa RNAfold para obter um dado com maior confiabilidade. Este programa tem como intuito prever o dobramento secundário presente no mRNA e calcular a sua energia livre mínima (MFE - *Minimal Free Energy*), que indica a estabilidade termodinâmica das estruturas formadas. Desta forma, como mostra a Figura 1 e 2, é possível correlacionar com o local onde os siRNAs escolhidos apresentam complementariedade de pares de bases e visualizar de forma clara estas estruturas e as regiões de menor MFE. Foi levado em consideração os locais onde havia uma menor concentração de energia, pois se trata de uma área com menor dobramento da molécula, sendo assim, um local que possa ter uma facilidade do siRNA se conectar e fazer o silenciamento do mRNA.

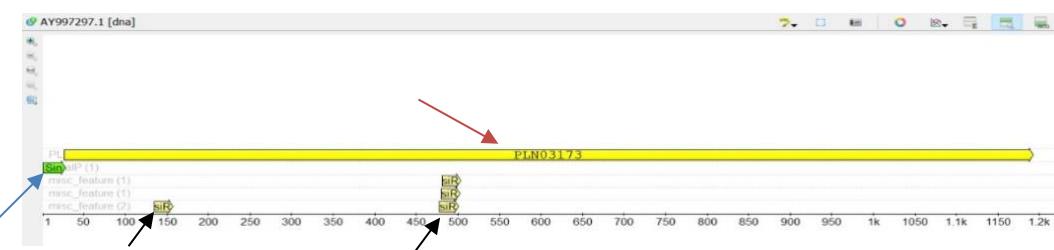


Figura 1. Na ilustração conta o domínio do mRNA FaCHS (seta vermelha), e a localização dos siRNAs ao longo da molécula (setas pretas), além do Sinal P, que é uma sequência curta de aminoácidos recém sintetizada.

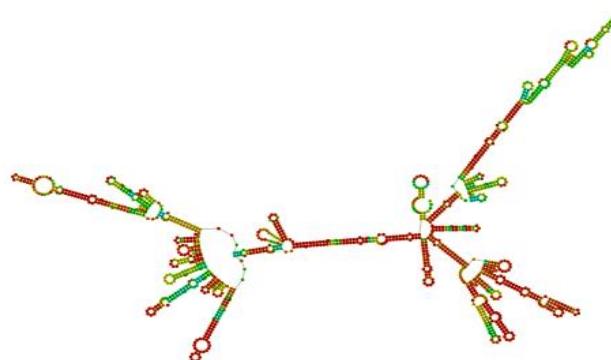


Figura 2. Gráfico da estrutura secundária MFE, onde é possível visualizar as áreas com menor energia, indicando que há menores dobramentos da sequência do mRNA que codifica para FaCHS. Fonte: GRUBER et al. (2008).

Na presente pesquisa não foi possível identificar artigos que utilizem de siRNAs para silenciamento do mRNA da CHS. Todavia, há estudos que usam de outros métodos para o silenciamento do gene CHS, como por exemplo, o estudo dirigido por HÄRTL et al (2016) que utilizaram sequências de grampo de cabelo de ítron autocomplementares (ihp) dando origem a dsRNAs a partir de moléculas de RNA endógenas para enzima CHS em morangos. Outro exemplo é a transformação de planta mediada por *Agrobacterium* para introduzir um RNAi negativo de Chs1 em tomates, feito por SCHIJLEN et al. (2007).

4. CONCLUSÕES

Com base nos critérios adotados, foram selecionadas quatro sequências de siRNAs para o silenciamento de mRNAs que codificam para *FaCHS*. Estes siRNAs serão enviados para uma empresa para que sejam sintetizados quimicamente e então serão aplicados via spray em frutos de morango visando determinar a sequência que apresenta maior eficácia no silenciamento, para ser utilizado como controle positivo em ensaios de SIGS.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, F. et al. *pssRNAit*: A Web Server for Designing Effective and Specific Plant siRNAs with Genome-Wide Off-Target Assessment. **Plant Physiology**, v. 184, n. 1, p. 65–81, 10 jul. 2020.
- BARKER, Kathy. Na Bancada: Manual de iniciação científica em pesquisas biomédicas São Paulo: Editora Artmed, 2002.
- CARBONE, F. et al. Developmental, genetic and environmental factors affect the expression of flavonoid genes, enzymes and metabolites in strawberry fruits. **Plant, Cell & Environment**, v. 32, n. 8, p. 1117–1131, ago. 2009.
- DAO, T. T. H.; LINTHORST, H. J. M.; VERPOORTE, R. Chalcone synthase and its functions in plant resistance. **Phytochemistry Reviews**, v. 10, n. 3, p. 397–412, 3 maio 2011.
- FOLTA, K. M.; DAVIS, T. M. Strawberry Genes and Genomics. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 25, n. 5, p. 399–415, out. 2006.
- GIOVANNONI, J. J. Genetic Regulation of Fruit Development and Ripening. **THE PLANT CELL ONLINE**, v. 16, n. suppl_1, p. S170–S180, 12 mar. 2004.
- GRUBER, A. R. et al. The Vienna RNA Websuite. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. Web Server, p. W70–W74, 19 maio 2008.
- HOLLENDER, C. A. et al. Flower and early fruit development in a diploid strawberry, *Fragaria vesca*. **Planta**, v. 235, n. 6, p. 1123–1139, 24 dez. 2011.
- KATJA HÄRTL et al. RNAi-mediated endogene silencing in strawberry fruit: detection of primary and secondary siRNAs by deep sequencing. **Plant Biotechnology Journal**, v. 15, n. 5, p. 658–668, 18 nov. 2016.
- SCHIJLEN, E. G. W. M. et al. RNA Interference Silencing of Chalcone Synthase, the First Step in the Flavonoid Biosynthesis Pathway, Leads to Parthenocarpic Tomato Fruits. **Plant Physiology**, v. 144, n. 3, p. 1520–1530, 3 maio 2007.
- VETUKURI, R. R. et al.. Spray-induced gene silencing: an innovative strategy for plant trait improvement and disease control. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 21, n. spe, p. e387921S11, 2021.
- XING, S. et al. CRISPR/Cas9-introduced single and multiple mutagenesis in strawberry. **Journal of genetics and genomics/Journal of Genetics and Genomics**, v. 45, n. 12, p. 685–687, 18 ago. 2018.