

DESIGN DE PRIMERS PARA A DETECÇÃO DE CIRC RNAs COMO ESTRATÉGIA DE CONTROLE DO FUNGO *Botrytis cinerea* EM MORANGOS (*Fragaria x ananassa*)

YASMIN BRAGA FARIA¹; CHRISTIAN DOMINGUES SANCHEZ²; CLAUDIANE
DA SILVA MACHADO³; EDUARDO DOS SANTOS MACEDO COSTA⁴; PEDRO
LOPES REISSER⁵; VANESSA GALLI⁶

¹Universidade Federal de Pelotas 1 – yasminbragafar@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – christian.kun@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – claudiane.machado@ufpel.edu.br

⁴Universidade Federal de Pelotas – eduardodossantosmacedocosta@gmail.com

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

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

1. INTRODUÇÃO

O morango (*Fragaria x ananassa*) é um pseudofruto com alto valor econômico, muito apreciado por seu sabor e aroma. Por se tratar de um fruto não-climatérico possui baixa sensibilidade a ação do etileno em contraste aos clássicos climatéricos, necessitando permanecer ligado à planta para sua maturação (PERKINS-VEAZIE, 2010). Os eventos que ocorrem no amadurecimento de frutos não-climatéricos favorecem a suscetibilidade à patógenos, resultando em perdas de produtividade. Um dos principais patógenos que afetam o morango na pré e pós-colheita é o *Botrytis cinerea*, agente etiológico do mofo cinzento (PETRASCH et al., 2019).

Atualmente, o controle de fungos na agricultura é predominantemente feito com fungicidas. No entanto, esse método traz sérios impactos negativos, como a contaminação do solo e da água, a presença de resíduos químicos nos alimentos e o desenvolvimento de resistência pelos fungos, o que torna os tratamentos menos eficazes (LOPES; ALBUQUERQUE, 2018; BRENT; HOLLOMON, 2017). Diante desses desafios, há a necessidade de buscar alternativas para o controle de fungos. Logo, obter um conhecimento mais aprofundado sobre o fungo, e o seu arsenal de mecanismos de virulência contra a planta, permite identificar alvos estratégicos específicos para o desenvolvimento de agentes de controle mais precisos e de plantas mais tolerantes às infecções.

Um dos mecanismos de defesa utilizados pelo *Botrytis cinerea* é o silenciamento gênico mediado por RNAs interferentes (WEIBERG et al., 2013). O fungo é capaz de secretar pequenos RNAs (siRNAs) que suprimem a expressão de genes de defesa do morango, favorecendo a infecção. Em contrapartida, o morango também produz seus próprios siRNAs, visando silenciar genes de virulência essenciais para o fungo, em uma tentativa de conter a infecção (CHEN et al., 2020). Nesse contexto, os RNAs circulares (circRNAs) emergem como uma alternativa ao uso de fungicidas, uma vez que são capazes de capturar siRNAs por complementariedade de pares de bases. Os circRNAs são originados de um processo chamado *back-splicing* a partir de um pré-mRNA, formando estruturas covalentes fechadas, sem extremidades livres (KRISTENSEN et al., 2019). Essa

conformação confere aos circRNAs estabilidade perante exonucleases, tornandoos candidatos atraentes para estratégias de interferência por RNA.

No entanto, a detecção e validação de circRNAs representam um desafio metodológico. A baixa abundância natural e possíveis conformações secundárias, frequentemente resultam em falsos negativos. Além disso, a sua estrutura circular dificulta a amplificação a partir de PCR convencional, visto que os primers devem ser desenhados para reconhecer junções *back-splicing*, regiões essas que diferenciam os circRNAs dos transcritos lineares (HANSEN, 2018; SZABO; SALZMAN, 2016).

Assim, o presente trabalho visa projetar primers que sejam capazes de identificar as junções *back-splicing*, visando validar estratégias baseadas no silenciamento de genes de virulência fúngica utilizando circRNAs, reduzindo a dependência de agentes químicos e minimizando perdas na produção.

2. METODOLOGIA Desenho de primers para circRNAs

As sequências de circRNAs utilizadas para o desenho de primers foram previamente identificadas por GONZALEZ (2024). Sendo eles aqui chamados de CircLipid (FANhyb_rscf00006336.1:2732|2991 lipid transfer protein código XM_004299420.2) e CircVicitin-like (>FANhyb_rscf000000084.1:83736|84089 vicilin-like antimicrobial peptides 2 XM_004300566.2). Os primers foram desenhados conforme o protocolo estabelecido por Panda e Gorospe (2018). Conforme esquematizado na Figura 1, a estratégia baseia-se no desenho de primers que flanqueiem o *backsplice junction*, amplificando um amplicon formado pela junção da extremidade 3' (100 nucleotídeos - nt) com a extremidade 5' (100 nt) da sequência circular.

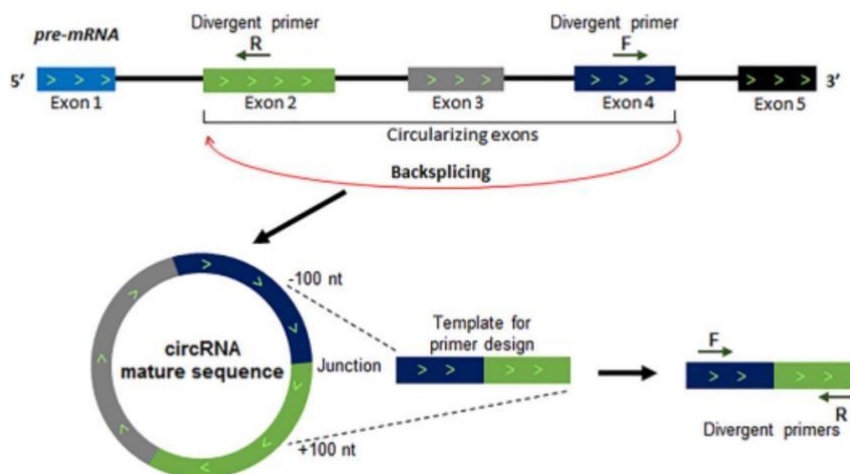


Figura 1. Esquema da biogênese de circRNAs (parte superior) e representação do desenho de primers divergentes para a amplificação por PCR da *back-splice junction* (parte inferior). Fonte: Adaptado de Panda e Gorospe (2018).

Para a confecção dos primers, utilizou-se o software Vector NTI Suite v.10 (Invitrogen), considerando os seguintes parâmetros: temperatura de *melting* (T_m), energia livre de Gibbs (ΔG), percentual de bases guanina e citosina (%GC) e formação de dímeros de primer. Adicionalmente, estabeleceu-se como meta o comprimento de 20 nucleotídeos para todos os primers. Todos os parâmetros foram ajustados para atender a um padrão de qualidade ideal, conforme especificado na Tabela 1.

Tabela 1 – Parâmetros considerados para o desenho de oligonucleotídeos primers.

Parâmetro	Valor Ideal
Comprimento do primer (forward/reverse)	18 – 22 nucleotídeos
Conteúdo de GC (%GC)	40 – 60%
Temperatura de <i>melting</i> (Tm)	54,5 – 55,3 °C
Sequências palindrômicas	0
Sequências repetida	0
Formação de dímeros de primers e <i>hairpins</i>	0
Tamanho do amplicon	180 – 250 pb

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os primers desenhados para os circRNAs CircLipid e CircVicilin-like seguiram os parâmetros estabelecidos na metodologia. Para o CircLipid, o primer *forward* convergente apresentou temperatura de *melting* (Tm) de 54,8°C e teor de G/C de 57,9%; enquanto o *forward* divergente exibiu Tm de 53,5°C e teor de G/C de 50%. Por outro lado, o primer *reverse* convergente apresentou Tm de 52,4°C e teor de G/C de 45,5%, ao passo que o *reverse* divergente registrou Tm de 55°C e teor de G/C de 57,9%. Para o CircVicilin-like, o primer *forward* convergente apresentou temperatura de *melting* (Tm) de 52,4°C e teor de G/C de 57,9%; enquanto o *forward* divergente exibiu Tm de 50,6°C e teor de G/C de 47,6%. Por outro lado, o primer *reverse* convergente demonstrou Tm de 53,3°C e teor de G/C de 45,5%, ao passo que o *reverse* divergente registrou Tm de 49,6°C e teor de G/C de 60%.

Em relação à formação de dímeros de primers, observou-se que, de modo geral, os primers não apresentaram recorrência de dímeros. Quanto à energia livre de Gibbs (ΔG), os valores obtidos foram negativos, conforme o recomendado. Adicionalmente, os primers exibiram tamanho médio de 20 pares de bases.

Dessa análise, constata-se que apenas os primer *forward* convergente e *reverse* divergente do CircLipid aproximou-se da Tm ideal; os demais ficaram abaixo do valor desejado. Entretanto, as porcentagens de guanina e citosina permaneceram dentro da faixa adequada. Cabe destacar que todos os primers projetados para os circRNAs apresentaram Tm inferiores ao recomendado, uma vez que a amplificação por PCR em tempo real emprega a enzima Taq DNA polimerase, que tem temperatura ótima de atuação próxima a 60°C.

O conteúdo de GC, que se manteve entre 45–60% para todos os primers, está de acordo com o recomendado para reações de PCR, uma vez que valores extremos podem comprometer a eficiência da amplificação (BUSTIN et al., 2009). É relevante destacar que a subestimação da Tm pelo software Vector, como observado neste estudo, é um fenômeno conhecido e justifica a validação empírica das temperaturas de anelamento (KOZERA; RAPACZ, 2013).

4. CONCLUSÕES

Através da metodologia aplicada, foi possível desenhar primers para a amplificação de RNAs circulares (circRNAs). O principal desafio reside em compreender o mecanismo de *backsplicing* e as implicações da circularização do RNA em sua tradução. Com o design concluído, as próximas etapas envolvem a síntese dos primers e a validação experimental para confirmar a eficiência do método. Entretanto, o trabalho destaca a necessidade crucial de estudos adicionais de validação biológica dos genes-alvo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRENT, K.; HOLLOMON, D. FUNGICIDE RESISTANCE IN CROP PATHOGENS: HOW CAN IT BE MANAGED? 2nd, revised edition. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.frac.info/media/xryldee4/monograph-1.pdf>>.
- BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.
- CHEN, G. et al. Inhibition of FvMYB10 transcriptional activity promotes color loss in strawberry fruit. *Plant Science*, v. 298, p. 110578, 24 jun. 2020.
- GONZALEZ, H. CARLOS BOLZON (ED.). Caracterização de RNAs circulares em morango (*Fragaria × ananassa* Duch) e desenvolvimento de uma Plataforma Bioinformática Integrada para automatização da análise de circRNAs.
- HANSEN, T. B. Improved circRNA Identification by Combining Prediction Algorithms. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 6, 5 mar. 2018.
- KRISTENSEN, L. S. et al. The biogenesis, biology and characterization of circular RNAs. *Nature Reviews Genetics*, v. 20, n. 11, p. 675–691, 8 ago. 2019.
- KOZERA, B.; RAPACZ, M. Reference genes in real-time PCR. *Journal of Applied Genetics*, v. 54, n. 4, p. 391–406, 2013.
- LOPES, C. V. A.; ALBUQUERQUE, G. S. C. DE. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. *Saúde em Debate*, v. 42, n. 117, p. 518–534, jun. 2018.
- PANDA & GOROSPE. Detection and Analysis of Circular RNAs by RT-PCR, *Bioprotocol*, v.8, n.6, p. e2775. Mar., 2018 DOI: 10.21769/BioProtoc.2775. Disponível em: <https://bio-protocol.org/pdf/bio-protocol2775.pdf>.
- PERKINS-VEAZIE, P. Growth and Ripening of Strawberry Fruit. *Horticultural Reviews*, p. 267–297, 23 jul. 2010.
- PETRASCH, S. et al. Grey mould of strawberry, a devastating disease caused by the ubiquitous necrotrophic fungal pathogen *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology*, v. 20, n. 6, p. 877–892, 4 abr. 2019.
- SZABO, L.; SALZMAN, J. Detecting circular RNAs: bioinformatic and experimental challenges. *Nature Reviews Genetics*, v. 17, n. 11, p. 679–692, 14 out. 2016.
- WEIBERG, A. et al. Fungal Small RNAs Suppress Plant Immunity by Hijacking Host RNA Interference Pathways. *Science*, v. 342, n. 6154, p. 118–123, 3 out. 2013.