

EDIÇÃO DOS GENES *ZmBahd01* E *ZmBahd05* EM MILHO VIA CRISPR/Cas9^(*)

Kamila Ellen Souza de Oliveira⁽¹⁾, Matheus Carlos Valinhas⁽²⁾, Rayanne Pereira de Oliveira⁽³⁾, Sylvia Moraes de Sousa⁽⁴⁾, Andrea Almeida Carneiro⁽⁵⁾ e Newton Portilho Carneiro⁽⁶⁾

Palavras-chave: *Zea mays*, nocauteamento gênico, transformação genética, mutação.

O sistema CRISPR/Cas9 é formado pela associação da enzima Cas9 e um RNA de guia única (gRNA), capaz de direcionar a nuclease para uma região específica de DNA-alvo no genoma, onde uma clivagem promovida por essa enzima gera quebras de fita dupla no DNA (DSB). Estas DSB desencadeiam mecanismos de reparo celular que resultam em mutações nas proximidades ou nos locais clivados. Quando a DSB é reparada, os *indels* formados modificam a sequência do DNA original, o que pode levar a inativação de genes. Na prática, esse sistema é usado para obtenção de plantas melhoradas geneticamente. O objetivo deste trabalho é caracterizar funcionalmente os genes *ZmBahd01* e *ZmBahd05* e obter plantas de milho silenciadas para estes genes, além de estabelecer a tecnologia de edição via CRISPR na Embrapa Milho e Sorgo. A caracterização funcional dos genes *ZmBahd1* e *ZmBahd5* via CRISPR/Cas9 foi feita com base no silenciamento desses genes em milho, via transformação genética de embriões imaturos mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Para o gene *ZmBahd01*, duas estratégias foram adotadas: o desenho de gRNAs únicos, clonados no vetor p7ioR, e gRNAs múltiplos clonados no mesmo vetor de expressão, em uma estratégia denominada “engenharia de genoma multiplex”. Para *ZmBahd05*, os gRNAs únicos desenhados também serão clonados no mesmo vetor p7ioR. Para cada um dos genes/estratégias foram desenhados 4 gRNAs, que tiveram sua eficiência avaliada via transformação transiente de embriões. Os embriões utilizados para transformação foram obtidos da linhagem de milho tropical L3 crescida em casa de vegetação, aproximadamente 11 dias após a polinização. O milho foi transformado via *A. tumefaciens* EHA101. As mutações nos genes *ZmBahd01* e *ZmBahd05* foram identificadas nas plantas transformadas via amplificação do DNA genômico, utilizando oligonucleotídeos flanqueando a região mutada, seguido do sequenciamento de alguns eventos, utilizando NGS (*Next generation sequencing*) para avaliação da sequência-alvo mutada. A análise das regiões mutadas foi feita na ferramenta on-line ICE Synthego, através da análise da qualidade das sequências e da porcentagem de *indels* gerados. Os resultados revelaram eventos mutados, na primeira geração, com todos os gRNAs testados, para ambos os genes, sendo que a porcentagem de *indels* variou de 0 a 76%. Os eventos *Bahd1* que apresentaram maiores *indels* (76%) foram transformados com dois gRNAs ao mesmo tempo, via engenharia multiplex. Já os eventos *Bahd5* com as maiores taxas de mutação (60%), foram transformados com o guia 4. Assim como já observado em trabalhos anteriores, o CRISPR traz novas oportunidades para a manipulação genética de genes de interesse agrônomico, inclusive no milho. O silenciamento dos genes *Bahd01* e *Bahd05* em milho torna-se uma alternativa promissora para o melhoramento dessa cultura, assim como os avanços na caracterização desses genes.

^{*} Fonte financiadora: Embrapa e Fundação de Amparo à Pesquisa e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).



⁽¹⁾ Engenheira agrônoma, Doutoranda em Bioengenharia, Universidade Federal de São José Del Rei (UFSJ), Sete Lagoas – MG. E-mail: kamila.ellen.s@gmail.com

⁽²⁾ Biólogo, Bolsista Iniciação Científica, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG

⁽³⁾ Bióloga, Bolsista DTI, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas – MG.

⁽⁴⁾ Bióloga, Pesquisadora, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas – MG.

⁽⁵⁾ Bióloga, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas – MG.

⁽⁶⁾ Biólogo, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo. E-mail: newton.carneiro@embrapa.br