

## TRANSFORMAÇÃO TRANSIENTE DE EMBRIÕES IMATUROS DE MILHO L3 COMO MÉTODO DE SELEÇÃO DE RNA-GUIAS PARA A TÉCNICA DE CRISPR/Cas9<sup>(\*)</sup>

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

Palavras-chave: edição genética, gRNAs, silenciamento gênico, transformação genética, *Zea mays*.

A tecnologia CRISPR/Cas9 é uma ferramenta poderosa capaz de editar genomas de forma precisa em inúmeros organismos eucariotos. Isso é possível em função da nuclease (Cas9) ser direcionada por RNAs guias (gRNAs), complementares à região-alvo do genoma. Para o desenho dos gRNAs são utilizados softwares baseados em parâmetros que levam em consideração vários aspectos para aumentar a eficiência dos guias e minimizar regiões não alvo. Em geral, esses programas retornam com uma média de três a cinco guias como melhores opções. Com objetivo de diminuir o número de gRNA(s) a serem utilizados na transformação genética, foi testada a viabilidade da utilização da transformação genética transiente a de embriões imaturos de milho para identificar os gRNA capazes de gerar mutação. O parâmetro avaliado foi o cálculo da porcentagem de *indels* gerados a partir de sequenciamento de fragmentos de PCR nas regiões mutadas. Alelos da linhagem L3 representando o primeiro exon do gene *Bahd5* foram sequenciados e quatro gRNAs foram clonados em vetor binário sob controle do promotor U6. Para a seleção dos gRNAs foi utilizado a ferramenta on-line CHOP-CHOP (<https://chopchop.cbu.uib.no/>) e a seleção no conteúdo de GC, na especificidade, na eficiência e no número de *mismatches*. A busca por *mismatches* foi feita no software on-line Cas-OFFinder (<http://www.rgenome.net/cas-offinder/>), segundo as recomendações padrão do programa. As construções gênicas contendo cada um dos gRNAs foram transformadas independentemente via *Agrobacterium tumefaciens* em embriões imaturos de milho (1,5 mm a 2 mm de comprimento). Estes foram mantidos em meio de cocultivo (N6 Sais e Vitaminas; 10 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D; 2,9 g.L<sup>-1</sup> de prolina; 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose; 1.000 µL de acetoseringona; 3 mg.mL<sup>-1</sup> de cisteína; 3 g.L<sup>-1</sup> de phytigel; pH 5,8), a 20 °C; após cinco dias, o DNA foi extraído dos embriões. Em seguida, o gene *ZmBahd5* foi amplificado via PCR utilizando primers flanqueando a localização provável de mutação. As amostras foram sequenciadas utilizando-se a plataforma ABI 3500/Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, e os resultados foram analisados no software on-line ICE Synthego. Os gRNAs 1 a 4 geraram 3%, 5%, 6% e 7% de *indels*, respectivamente, nas amostras de DNA analisadas. Esses resultados indicam que o uso de um teste transiente em embriões pode auxiliar na escolha de gRNAs mais eficientes para a transformação definitiva em milho resultando em menor custo, trabalho e tempo para obtenção de resultados reais.

<sup>\*</sup> Fonte financiadora: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), CNPq, Embrapa Milho e Sorgo / Projetos SEG



- <sup>(1)</sup> Biólogo, Bolsista Iniciação Científica, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG. E-mail: matheusvarlos@gmail.com
- <sup>(2)</sup> Engenheira agrônoma, Doutoranda em Bioengenharia, Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ), Sete Lagoas-MG
- <sup>(3)</sup> Bióloga, Bolsista DTI, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas-MG
- <sup>(4)</sup> Bióloga, Pesquisadora, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas-MG
- <sup>(5)</sup> Bióloga, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas-MG
- <sup>(6)</sup> Biólogo, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo. E-mail: newton.carneiro@embrapa.br