

Ferramentas computacionais na identificação de genes PDS (fitoeno desaturase) em bananeiras de forma a subsidiar estudo de caso com uso de CRISPR-cas9 para tolerância ao déficit hídrico

Samantha Costa Boaventura¹, Marcelly Santana Mascarenhas², Fernanda dos Santos Nascimento³, Carla Catharina Hora de Souza⁴, Andresa Priscila de Souza Ramos⁵ e Claudia Fortes Ferreira⁶

¹Estudante de Licenciatura em Biologia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, estagiária da Embrapa Mandioca e Fruticultura, bolsista Fapesb, Cruz das Almas, BA; ² e ³Estudante de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, BA;

⁴Estudante de Agronomia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, estagiária da Embrapa Mandioca e Fruticultura, bolsista Capes, Cruz das Almas, BA; ⁵Engenheira-agrônoma, doutora em Agronomia, analista da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA; ⁶Engenheira-agrônoma, doutora em Produção Vegetal, pesquisadora da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA.

Introdução

A seca é a principal ameaça agrícola no mundo, limitando a produção e causando impactos no crescimento, na fisiologia e reprodução das plantas. Desse modo, o uso de variedades de bananeira mais tolerantes ao déficit hídrico, é uma das maneiras eficazes de mitigar esses impactos negativos na produção da fruta. Para isso, a edição do genoma é uma ferramenta que permite a manipulação de material genético para induzir mutações em regiões pontuais de interesse ou introduzir novos genes para que o organismo apresente um fenótipo desejável. O programa de melhoramento de bananeira da Embrapa Mandioca e Fruticultura, nas últimas décadas, vem investindo em linhas de pesquisa que aportem ferramentas moleculares em suporte ao desenvolvimento de cultivares com maior tolerância ao déficit hídrico. Uma dessas ferramentas é o CRISPR-Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Region*), que já vem sendo usada em *Musa* spp. com sucesso. Esta técnica permite a edição de partes do genoma por meio de "cortes" e substituição ou adição de sequências ao DNA de um genótipo qualquer. No entanto, para início do estudo de caso do uso de CRISPR-Cas9 em bananeira, propõe-se fazer o knock-out do gene PDS (Fitoeno desaturase), que participa da rota da produção de carotenos nas plantas e cujo knock-out leva ao albinismo, fenótipo de fácil visualização. Desse modo, esse estudo inicial irá subsidiar estudo de caso com uso de CRISPR-cas9 para tolerância ao déficit hídrico.

Objetivo

Subsidiar estudo de caso com o uso da técnica de CRISPR-Cas9 para o knock-out do gene PDS em bananeira por meio do uso de ferramentas computacionais de bioinformática.

Material e Métodos

Nesse estudo, inicialmente, foi feito o resgate, alinhamento e BLAST de gene(s) PDS de bananeira (*Musa acuminata* e *Musa balbisiana*) contra as sequências dos genes PDS em milho, arroz e *Arabidopsis*, usando o banco de dados SouthGreen-Banana Genome Hub, assim como também a plataforma do Phytozome. As sequências de genes PDS em bananeira recuperadas foram usadas para projetar primers específicos para a amplificação dessa região pelo programa software Oligo Explorer 1.2. Posteriormente, as sequências do gene PDS foram alinhadas usando o programa Clustal Omega para identificar as regiões conservadas. Os primers específicos para o gene PDS de *M. acuminata* foram desenhados usando o software Oligo Explorer 1.2. Para avaliar o poder discriminatório dos primers identificados, procedeu-se então à análise de PCR (Polymerase Chain Reaction). Para o desenho dos gRNAs (guide RNAs) as sequências foram selecionadas com base no posicionamento da sequência PAM (*Protospacer Adjacent Motif*), de acordo com os critérios de CRISPR-Cas9, e a construção dos vetores levou em consideração o manual da Gibson Assembly.

Resultados

O alinhamento das sequências CDS (coding sequence) dos genes PDS para identificação dos gRNAs para o estudo de caso via CRISPR-Cas9, foi realizado. Os gRNAs foram desenhados levando em consideração as sequências PAM e os primers para validação da inserção das construções via *Agrobacterium* foram desenhados. As construções/vetores estão sendo desenhadas e em processo de testes.

Conclusão

Os softwares foram eficientes para a construção e desenhos dos primers e gRNAs para uso no estudo de caso da técnica de CRISPR-Cas9.

Significado e impacto do trabalho

A busca por ferramentas mais rápidas, baratas e mais precisas para obtenção de variedades de bananeiras mais tolerantes ao déficit hídrico é de suma importância, uma vez que a bananeira possui limitações como partenocarpia e meiose desbalanceada, tornando o melhoramento clássico demorado e custoso.