

## Caracterização de mutações sítio-dirigidas mediadas por CRISPR/CAS9 em genes associados à dormência em macieira

Rodrigo Mateus Jeske<sup>(1)</sup>, Dalton Ferreira Matos<sup>(2)</sup>, Fernando Rafael Alves Ferreira<sup>(3)</sup>, Guilherme Leitão Duarte<sup>(3)</sup>, Cibele Tesser da Costa<sup>(3)</sup>, Felipe dos Santos Maraschin<sup>(4)</sup>, Gabriel Chenet Frandoloso<sup>(1)</sup>, Luis Fernando Revers<sup>(5)</sup> e Mickael Arnaud Malnoy<sup>(6)</sup>

<sup>(1)</sup> Estagiários, Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS. <sup>(2)</sup> Estudante de doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. <sup>(3)</sup> Estudantes de pós-doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. <sup>(4)</sup> Professor, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. <sup>(5)</sup> Pesquisador, Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS. <sup>(6)</sup> Pesquisador, Fundação Edmund Mach, San Michele all'Adige, TN, Itália.

**Resumo** – Em macieira, o acúmulo insuficiente de horas de frio em climas subtropicais, como no sul do Brasil, limita a superação da dormência, resultando na redução da produtividade. Para superar essa restrição, utiliza-se a cianamida hidrogenada, um agente químico tóxico que promove a brotação e floração uniformes em pomares comerciais. Nesse contexto, as mudanças climáticas são uma ameaça à produção de maçã ao exacerbar deficiências de exposição ao frio. Para avançar na compreensão dos mecanismos reguladores da dormência e gerar tecnologias para reduzir a dependência do uso de cianamida hidrogenada, o objetivo deste trabalho foi gerar mutações sítio-dirigidas em *loci* de genes dos fatores de transcrição MADS-box associados ao controle da dormência (*Dormancy-Associated MADS-box* — DAM), utilizando CRISPR/Cas9. Oito RNAs guias únicos (sgRNAs) foram projetados para criar quatro deleções combinatórias (MdDAM1-2-4-b, MdDAM1-4, MdDAM1-b e MdDAM2-b). Quatro mil explantes foram transformados, resultando em 92 brotações resistentes à canamicina, com eficiências de transformação variando de 2,14 a 2,50%. A edição do genoma foi validada por sequenciamento de nova geração (Illumina) de *amplicons* locus-específicos. Os conjuntos de sequências resultantes foram analisados com os softwares CRISPResso2 e Cas-Analyzer, identificando deleções, inserções e substituições indicativas de perda de função, tanto em estados homocigotos quanto bi-alélicos. A eficiência de edição variou de 0,69 a 1,18%. A análise fenotípica e a avaliação da supressão da dormência serão realizadas posteriormente sob condições controladas em plantas micro-enxertadas *ex vitro*.

Termos para indexação: *Malus x domestica*, dormência, estresses ambientais, fruticultura, edição gênica.