Editing of genes coding protein involved in maize gamete membrane interaction and fusion

Moiseeva Ye.M., Gusev Yu.S., Volokhina I.V., Fadeev V.V., Mazilov S.I., Chumakov M.I.

Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia

E-mail: em-moiseeva@mail.ru

Key message. An agrobacterial transformation of maize was performed using a CRISPR/Cas9 vector for knockout the *Zm_gex2* and *Zm_gsc1* genes.

Keywords: CRISPR/Cas9, *Zea mays*, gamete interaction, membrane fusion

In the case of gynogenesis (parthenogenesis) one of the sperm does not fuse with the egg and only the egg nucleus is involved in the subsequent embryo development, forming a matrocline haploid. However, the molecular genetic mechanism of gynogenesis is unknown. In 2017 for the first time we discovered and described the maize *Zm_gex2* and *Zm_gsc1* genes that presumably control the gamete interaction and membranes fusion (Volokhina et al., Russ. J. Development. 2017.2:134-139).

The aim of the work is to obtain maize plants with mutations in the gamete membranes interaction and fusion genes.

We used CRISPR/Cas9 technology for editing the *Zm_gex2* and *Zm_gsc1* genes. 1645 immature maize embryos were isolated from ovaries at 10-15-days after pollination and were subjected for agrobacterial transformation. 65 maize plants were transformed by the *in planta* method.

We prepare CRISPR/Cas9 constructs containing gRNA to the target *Zm_gsc1* and *Zm_gex2* genes. The specific gRNA to several sites of *Zm_gsc1* and *Zm_gex2* genes were synthesized and cloned to the CRISPR/Cas9 vector pKir1.1 expressing non-coding RNA (gRNA) and Cas9 nuclease. The CRISPR/Cas9-constructs were introduced into the genetically labeled KM maize line genome using agrobacterial transformation by the *in planta* and *in vitro* methods. In 2019 we obtained 2094 and 5191 maize grains after agrobacterial transformation in *in planta* method using CRISPR/Cas9 constructs with gRNA for the *Zm_gsc1* and *Zm_gex2* genes, respectively. T-DNA insertion by PCR method was performed.

This work was carried out in a part by the program of Fundamental scientific research of the state academies of sciences for 2020 (№ AAAA-A17-117102740101-5) and Russian Foundation for Basic Research (№20-016-00020 A) (*Zm_gex2*) and - no.20-316-80020 mol-ev-a (*Zm_gsc1*).

Редактирование генов, кодирующих белки взаимодействия и слияния мембран гамет кукурузы

Моисеева Е.М., Гусев Ю.С., Волохина И.В., Фадеев В.В., Мазиллов В.И., Чумаков М.И.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, Саратов, Россия

Аннотация. Проведена агробактериальная трансформация кукурузы с использованием CRISPR/Cas9-вектора с целью нокаутирования генов *Zm_gex2* и *Zm_gsc1*, кодирующих белки взаимодействия и слияния мембран.

Ключевые слова: CRISPR/Cas9, кукуруза, слияние мембран гамет

При нарушении двойного оплодотворения у кукурузы, в случае гиогенеза (партеогенеза) один из спермиев не сливается с яйцеклеткой, и в последующем развитии зародыша участвует только ядро яйцеклетки, образуя матроклинный гаплоид. Однако молекулярно-генетический механизм возникновения гиогенеза у кукурузы неизвестен. В 2017 г. мы впервые обнаружили и описали в геноме кукурузы гены *Zm_gex2* и *Zm_gsc1* предположительно контролирующее взаимодействие и слияние мембран гамет кукурузы (Волохина с соавт., Онтогенез. 2017. 2:134–139).

Целью работы является получение растений кукурузы с мутациями у генов взаимодействия и слияния мембран гамет. Использовали CRISPR/Cas9 технологию, позволяющую нокаутировать определенные гены кукурузы. Агробактериальной трансформации подвергали 1645 незрелых зародышей кукурузы, выделенных из завязей через 10-15 суток после опыления методом *in vivo*. Трансформации методом *in planta* было подвергнуто 65 растений кукурузы.

В ходе работы мы получили CRISPR/Cas9-конструкции, содержащие гид-ПНК, опознающие конкретные последовательности ДНК генов-мишеней *ZM_gsc1* и *Zm_gex2* кукурузы. Специфические последовательности гид-ПНК к нескольким участкам этих генов синтезированы и клонированы в CRISPR/Cas-вектор pKir1.1, экспрессирующий некодирующую РНК (sgRNA, гид-ПНК) и нуклеазу Cas9. Полученные CRISPR/Cas9- конструкции введены в геном генетически маркированной кукурузы КМ, используя технологию агробактериальной трансформации кукурузы методами *in planta* и *in vitro* (на незрелых зародышах). В 2019 г. было получено 2094 и 5191 зерен кукурузы после агробактериальной трансформации *in planta* при использовании CRISPR/Cas9-конструкции с гид-ПНК к генам *ZM_gsc1* и *Zm_gex2*, соответственно. Анализ встройки Т-ДНК проводился методом ПЦР со специфическими праймерами.

Работа выполнена по Программе фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2020 г. (№ гос. регистрации AAAA-A17-117102740101-5) и при финансовой поддержке грантов РФФИ №20-016-00020а (*Zm_gex2*) и №20-316-80020 мол-эв-а (*Zm_gsc1*).