

## INTRODUÇÃO

A família de proteínas VOZ (Vascular Plant One Zinc Finger) compreende fatores de transcrição exclusivos de plantas, caracterizados pela presença do motivo de ligação ao DNA “dedo de zinco”. Em *Arabidopsis thaliana* o fator de transcrição VOZ está envolvido na ativação e na inibição de genes responsivos a diferentes processos, como florescimento e resposta a estresses bióticos e abióticos. Em arroz, a proteína VOZ é codificada por dois genes, *VOZ1* e *VOZ2*, entretanto, até o momento nenhum trabalho foi realizado identificando os genes alvo do fator de transcrição *VOZ1* e a caracterização funcional desta família gênica. Em vista disso, o presente trabalho tem como objetivo transformar calos de arroz visando a superexpressão do fator de transcrição *VOZ1* e identificar mutantes homocigotos de inserção de T-DNA nocautes para estes genes.

## MATERIAIS E MÉTODOS

**Mutantes de T-DNA:** Sementes de uma linhagem de plantas mutantes para a inserção de T-DNA na região codificante dos genes *VOZ1* e *VOZ2* de arroz foram obtidas a partir do banco de mutantes *Rice Functional Genomic Express database*. Para a identificação de plantas em homocigose para a inserção de T-DNA, o DNA genômico foi extraído pelo método PureGene, (CSIRO Plant Industry) de 4 plantas por linhagem. Análises de PCR (*polymerase chain reaction*) utilizando um primer específico para a borda do T-DNA e um par de primer para uma região interna do gene interrompido foram utilizados visando a identificação das plantas homocigotas.

**Identificação de Genes Alvo de *VOZ1*:** Para a identificação dos genes alvo de *VOZ1* a estratégia escolhida foi a obtenção de plantas transgênicas superexpressando *VOZ1* para posterior experimento de imunoprecipitação da cromatina seguida de sequenciamento de DNA (Chip-seq).

**Construção dos plasmídeos:** Para a obtenção de plantas transgênicas, a construção pENTR-OsVOZ1, que possui a sequência codificadora de *VOZ1* sem stop códon, foi recombinada com vetor de expressão pH7FWG2, o qual permite a fusão da proteína *VOZ1* com a proteína GFP (*Green Fluorescent Protein*). Para o controle negativo do experimento de Chip-seq, a construção pENTR-YFP, contendo a sequência codificadora de *YFP* com stop códon, também foi recombinado com o vetor pH7FWG2.

**Transformação Vegetal:** Calos de arroz foram transformados com as construções obtidas via co-cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* (AGL1).

## RESULTADOS

### Confirmação dos vetores pH7FWG2-YFP e pH7FWG2-OsVOZ1 em *A. tumefaciens*

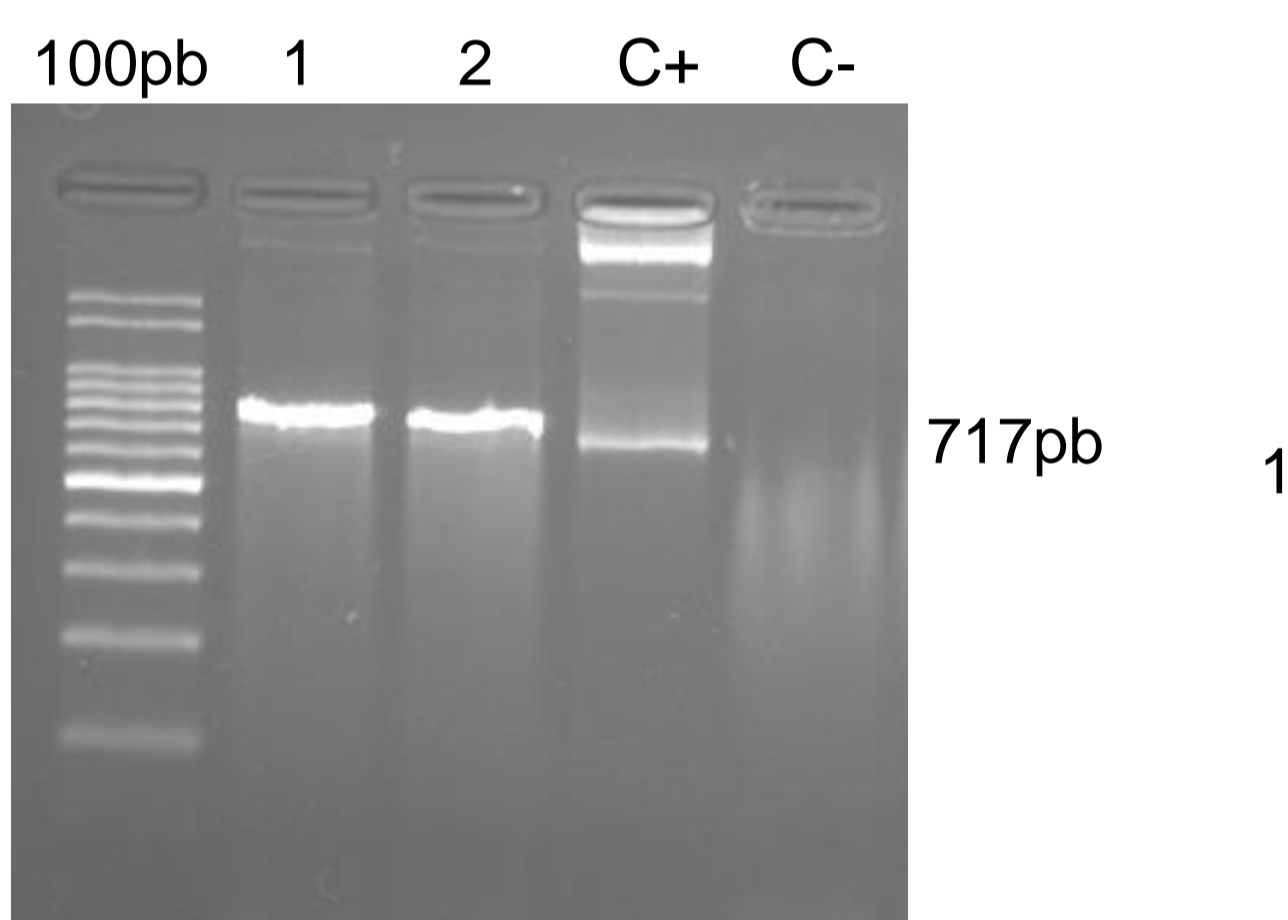


Figura 1: Gel de agarose 1% confirmando a clonagem da região codificadora de *YFP* no vetor pH7FWG2; Controle positivo C+, Controle negativo C-

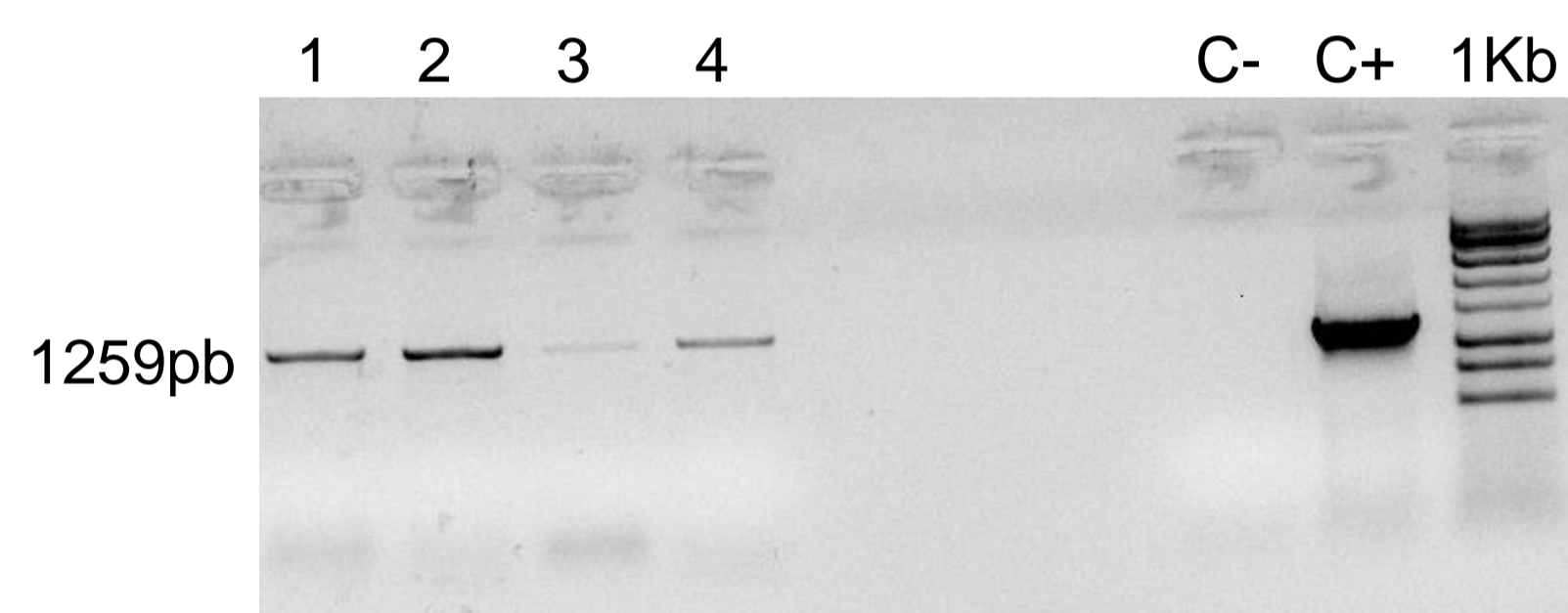


Figura 2: Gel de agarose 1% confirmando a clonagem da região codificadora de *OsVOZ1* no vetor pH7FWG2; Controle positivo C+, Controle negativo C-

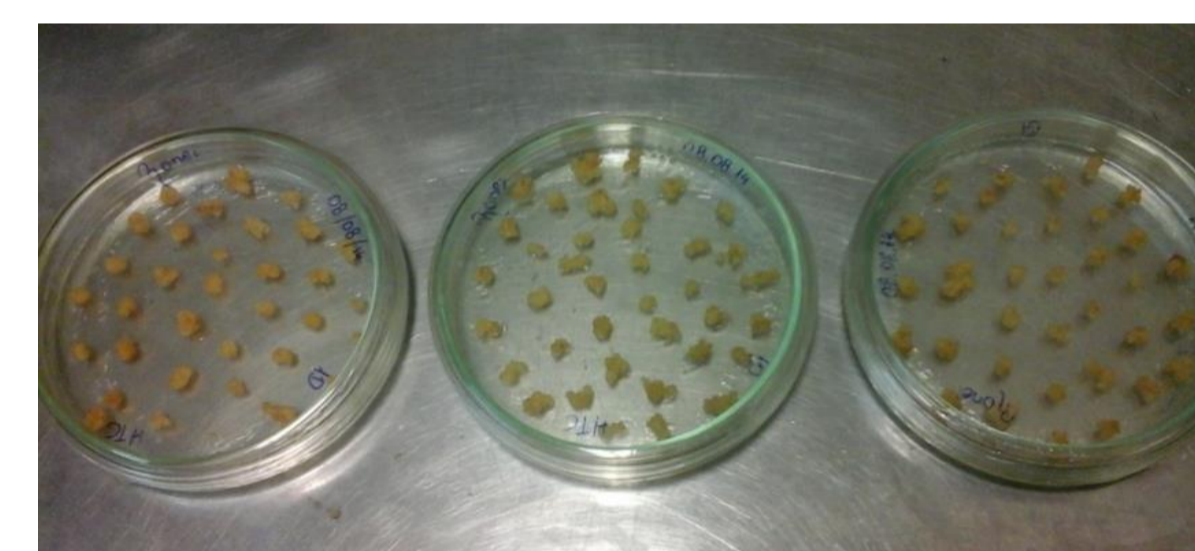


Figura 3: Placas com meio de seleção com higromicina com calos de arroz transformados com a construção pH7FWG2-OsVOZ1

### Extração de DNA e PCR para Análise de Segregação Alélica de Mutantes de Inserção de T-DNA

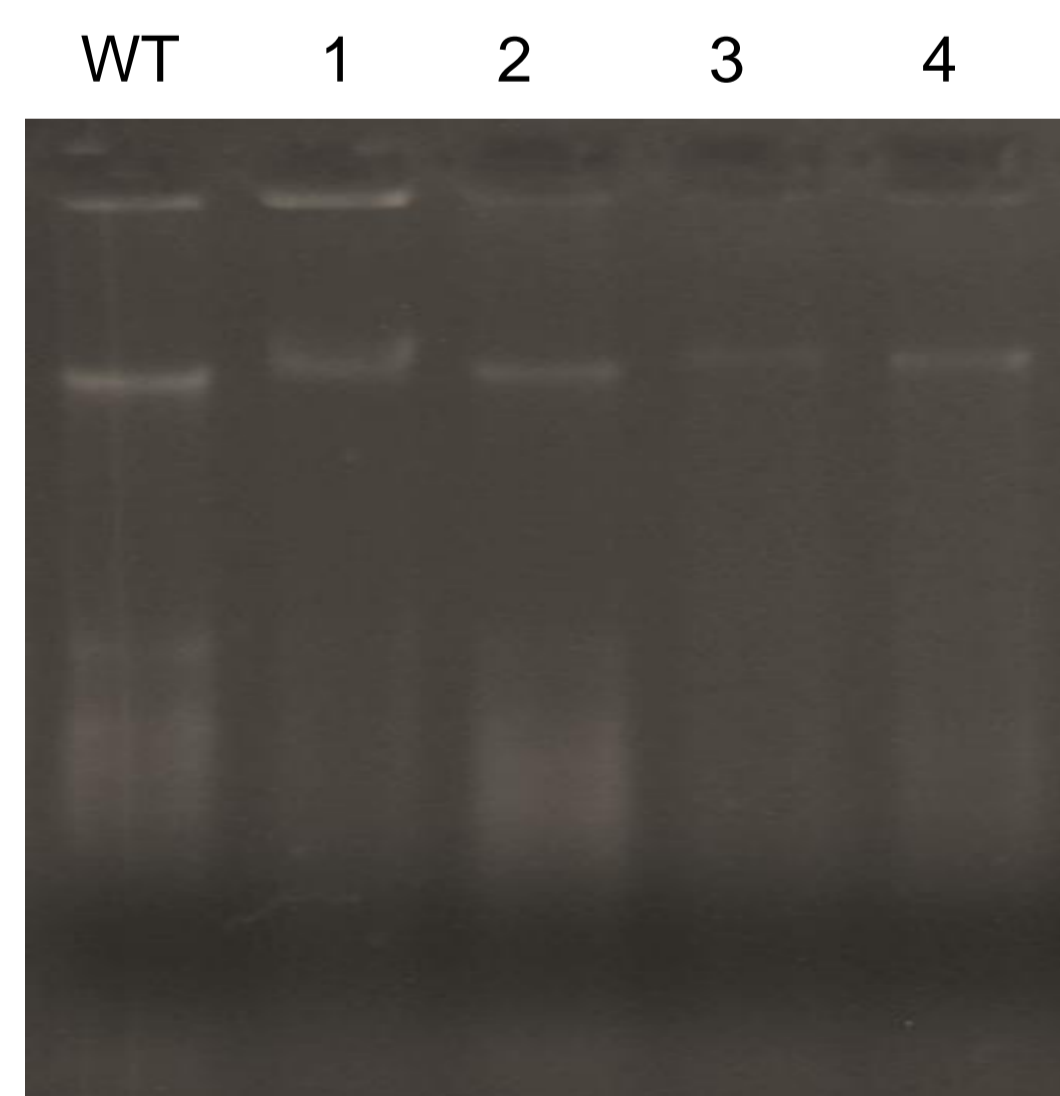


Figura 4: Extração de DNA dos mutantes de *OsVOZ1*. WT – Wild Type; 1-4 – Mutantes de inserção de T-DNA 1-4.

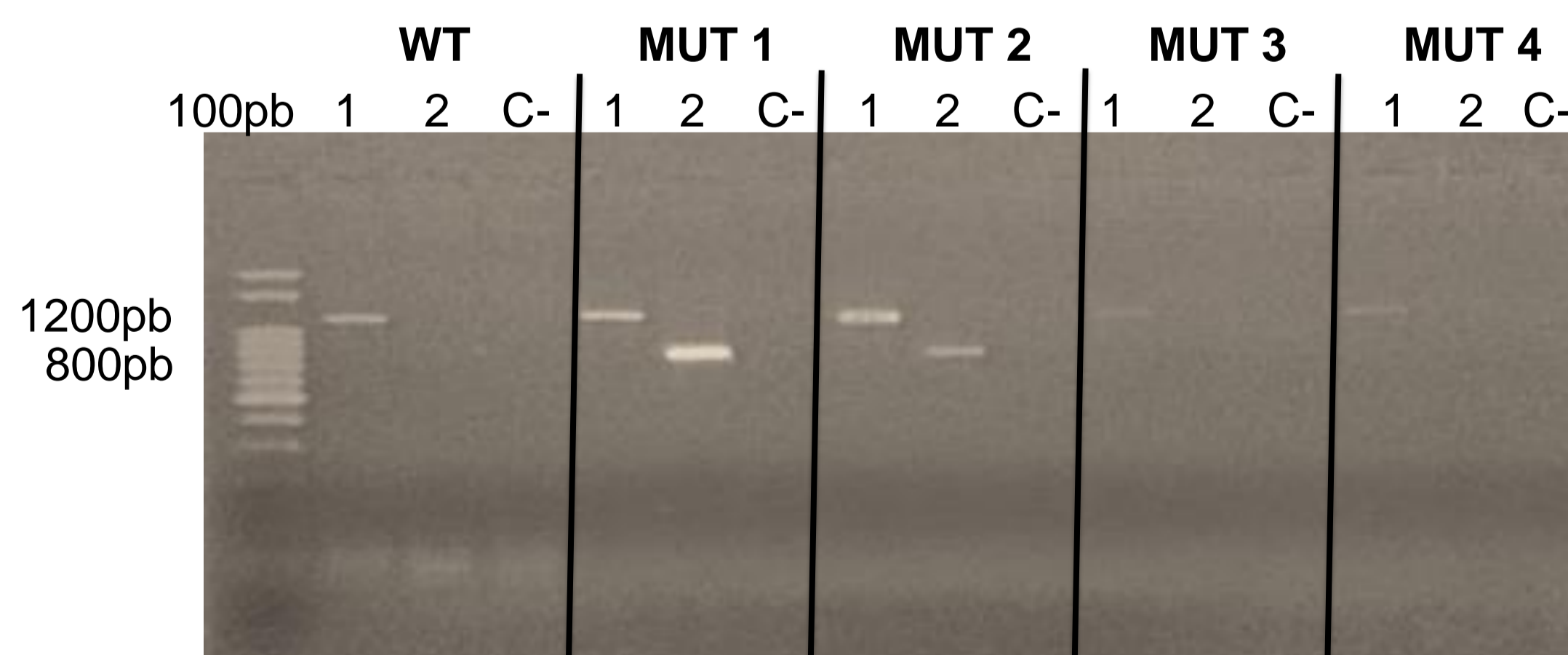


Figura 4: Números 1 e 2 representam a combinação de primers usados no PCR: 1 – F e R do gene *OsVOZ1*; 2 – F do gene *OsVOZ1* e R do T-DNA. WT – Wild Type; MUT 1-4 – Mutantes de inserção de T-DNA 1-4; C- Controle Negativo.

## PERSPECTIVAS

As análises demonstraram que as linhagens mutantes estão em hemizigose para a inserção de T-DNA. As próximas gerações estão sendo cultivadas, para posterior genotipagem afim de identificar linhagens homocigotas para a inserção para a caracterização fenotípica dos mutantes.

Para a identificação de genes alvo de *VOZ1*, as construções pH7FWG2-OsVOZ1 e pH7FWG2-YFP já foram obtidas e transformadas em *Agrobacterium tumefaciens*. Para continuidade do trabalho, calos contendo as construções estão sendo cultivados, com objetivo de obter as plantas transformadas, para serem utilizados no experimento de Chip-seq.