

Obtenção de plantas de arroz com níveis alterados de ferro nos grãos através de edição genômica

INTRODUÇÃO

O ferro é abundante na crosta terrestre, entretanto, está disponível majoritariamente em suas formas insolúveis. Plantas desenvolveram dois mecanismos que possibilitam aquisição de ferro, sendo eles a redução e a quelação. O arroz, por possuir os dois mecanismos, é conhecido como uma fonte de ferro, no entanto mesmo quando cultivado em solos de baixo pH, em que o ferro se encontra mais disponível para as raízes, os grãos de arroz acumulam muito pouco deste mineral. Foi demonstrado por Zhang *et al.*, 2012 que os genes OsVIT1 e OsVIT2, são altamente expressos em folhas bandeira e regulam o transporte de Fe e Zn através do tonoplasto até os vacúolos. Mutantes perda-de-função para cada um dos genes apresentaram acúmulo de Fe e Zn nas sementes, tornando-os bons alvos para a edição genética visando a biofortificação. Entretanto, até hoje, se desconhece o efeito da perda de função simultânea de ambos os genes no acúmulo de Fe e Zn em sementes de arroz.

OBJETIVO

Geração de mutante duplo, perda-de-função simultânea, para os genes OsVIT1 e OsVIT2, utilizando a tecnologia de edição gênica mediada por CRISPR/Cas9. Desta forma esperamos obter plantas com níveis aumentados de Fe e Zn em sementes de arroz buscando viabilizar para a biofortificação deste importante cereal.

MATERIAIS E MÉTODOS

O cassete contendo o sgRNA e o gene codificador da Cas9 foi subclonado a partir de um fragmento HindIII/XhoI do plasmídeo pRGE32 no plasmídeo binário pH7WG2. A confirmação da construção pH7WG2-Cas9 U3p gRNA foi realizada através da digestão com a enzima de restrição BsaI, resultando em um padrão de bandas de 11.558 pb, 3.959 pb e 8 pb. (Figura 1b)

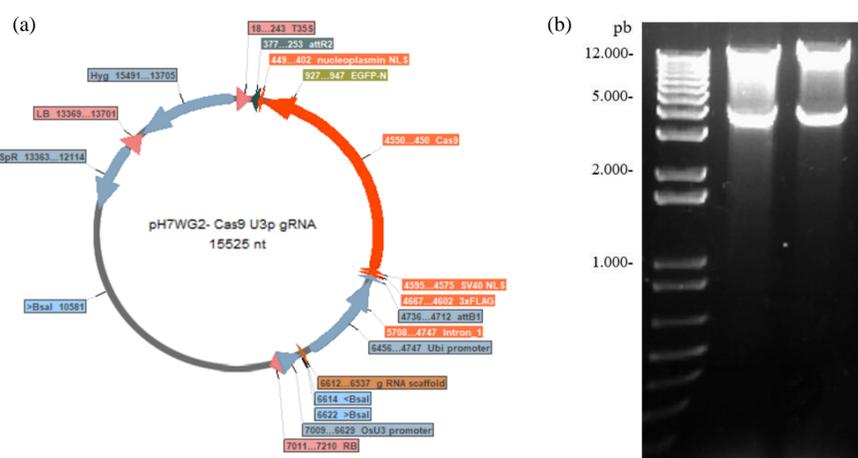


Figura 1. Vetor pH7WG2-Cas9 U3p gRNA. (a) Mapa gráfico do vetor gerado pelo programa Serial Cloner. (b) Padrão de bandas do vetor digerido com a enzima BsaI, utilizando marcador de 1 kb Plus DNA Ladder.

A seleção da sequência alvo do RNA guia foi baseada em um alinhamento dos genes OsVIT1 e OsVIT2 com uso da ferramenta CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>), buscando-se uma região exclusiva compartilhada entre os dois genes dentro de todo genoma de arroz. Desta forma, foi sintetizado apenas um RNA guia para a edição simultânea dos dois genes.



Figura 2. Estrutura genômica dos genes VIT1 e VIT2. As caixas azuis representam os exons e as linhas os introns. A seta indica o local de reconhecimento do RNA-guia em cada um dos genes. O gene OsVIT1 apresenta duas formas de splicing alternativo, ambas serão afetadas pela mutação.

Betina Debastiani Benato¹; Felipe dos Santos Maraschin¹.

¹ Departamento de Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, RS

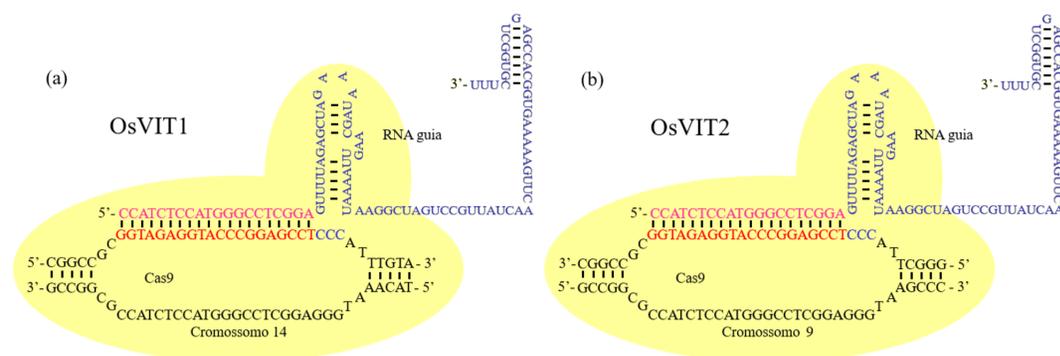


Figura 3. Estrutura dos sgRNAs em relação às regiões genômicas dos genes OsVIT1 (a) e OsVIT2 (b).

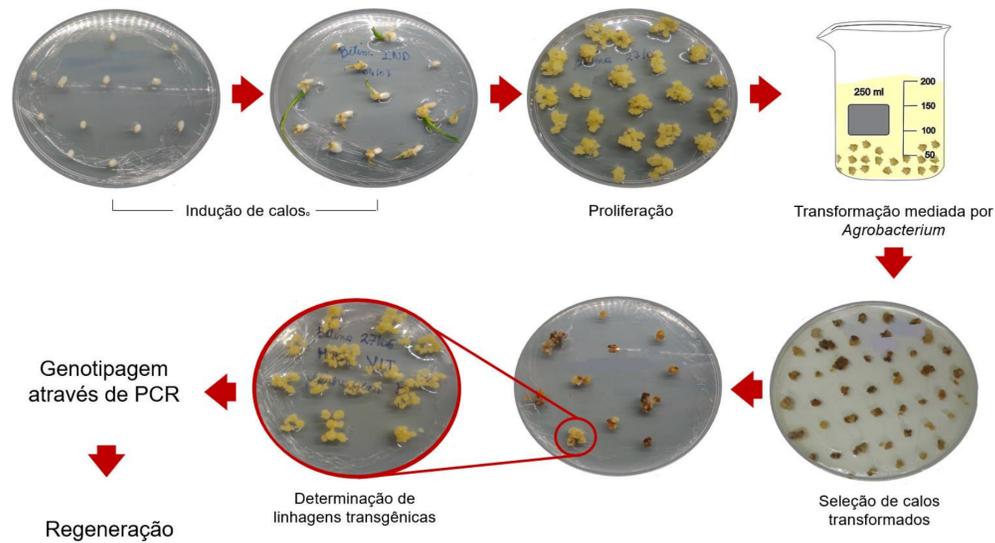


Figura 4. Etapas da transformação de calos de arroz com o vetor responsável pela edição dos genes OsVIT1 e OsVIT2.

RESULTADOS

Explantos transformados	> 250
Calos resistentes	10

Cada calo resistente foi considerado um evento de transformação e já se encontram em fase de regeneração.

REFERÊNCIA

Zhang, Y., Xu, Y. H., Yi, H. Y., and Gong, J. M. (2012). Vacuolar membrane transporters OsVIT1 and OsVIT2 modulate iron translocation between flag leaves and seeds in rice. *Plant J.* 72, 400–410. doi: 10.1111/j.1365-313X.2012.05088.x

APOIO