

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

BETINA DEBASTIANI BENATO

OBTENÇÃO DE PLANTAS DE ARROZ COM NÍVEIS ALTERADOS DE FERRO NOS
GRÃOS ATRAVÉS DE EDIÇÃO GENÔMICA

Porto Alegre

2018

BETINA DEBASTIANI BENATO

**OBTENÇÃO DE PLANTAS DE ARROZ COM NÍVEIS ALTERADOS DE FERRO
NOS GRÃOS ATRAVÉS DE EDIÇÃO GENÔMICA**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido
à Universidade Federal do Rio Grande do
Sul como parte dos requisitos necessários
para a obtenção do grau de Bacharel em
Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Felipe dos Santos Maraschin

Co-orientadora: Dra. Fernanda Lazzarotto

Porto Alegre

2018

Agradecimentos

Ao meu namorado, Felipe por todo amor e companheirismo que me deu forças para superar os momentos mais difíceis;

Ao meus pais, Elizete e Claudio por todo o suporte e incentivo para seguir meus sonhos;

Ao professor, Felipe dos Santos Maraschin, por toda paciência e dedicação ao me orientar durante a graduação;

À minha co-orientadora, Fernanda Lazzarotto, por toda solicitude e amparo intelectual durante o desenvolvimento desse projeto;

Aos meus colegas, Lucas e Nathan, pela irmandade durante a graduação;

Às minhas amigas Bárbara, Bianca, Camila, Laura, Micaela, Nathália e Paula por todos os sorrisos leves que me ajudaram a seguir em frente;

Aos meus colegas de laboratório, em especial à Camila, Cássia e Yohanna, por me ensinarem que ciência não se faz sozinha.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para minha formação pessoal e científica.

Ao CNPq, CAPES e FAPERGS pelo apoio financeiro.

Muito obrigada!

Resumo

Segundo a OMS, a deficiência de ferro é a causa mais comum de anemia no mundo, acometendo cerca de 1,62 bilhões de pessoas. No Brasil, aproximadamente 3 milhões de crianças menores de 5 anos apresentavam anemia em 2006. O RS é o maior produtor de arroz do país e possui caracteristicamente solos ácidos ricos em ferro. O pH baixo aumenta disponibilidade do ferro para as raízes e leva inclusive a sintomas de toxicidade nas plantas de arroz. Mesmo com a alta disponibilidade de ferro para as plantas, os grãos de arroz acumulam muito pouco deste mineral. Desta forma, é essencial elucidar os mecanismos que levam ao aporte de ferro para as sementes com vistas de viabilizar a biofortificação do arroz. 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 em sementes, tornando-os bons alvos para edição genética visando a biofortificação de arroz. Diante disso, o objetivo do presente trabalho é gerar um mutante duplo, perda-de-função simultânea para os genes *OsVIT1* e *OsVIT2*, utilizando a tecnologia de edição gênica mediada por CRISPR/Cas9. Para isso, foi construído um vetor contendo os cassetes para a expressão em células vegetais da enzima Cas9 e o sgRNA que guia o corte da enzima no genoma da planta. A seleção da sequência alvo do RNA guia foi baseada em um alinhamento dos genes *OsVIT1* e *OsVIT2* buscando-se uma região exclusiva e compartilhada entre os dois genes dentre todo o genoma do arroz. Desta forma foi sintetizado apenas um RNA guia para a edição de ambos genes, que foi inserido no plasmídeo binário, originando o vetor pH7Cas9U3pgVIT. Calos de arroz foram transformados utilizando *Agrobacterium tumefaciens* e foram obtidas 10 linhagens transgênicas, que se encontram em processo de regeneração e aclimatação. As plantas obtidas serão avaliadas quanto à presença das mutações nos loci de *OsVIT1* e *OsVIT2* e, se confirmadas, possibilitarão estudos pioneiros sobre os efeitos da perda de função simultânea destes genes na alocação de ferro para as sementes.

Palavras-chave: arroz, biofortificação, ferro, CRISPR.

Abstract

According to WHO, the iron deficiency is the most common cause of anemia worldwide, affecting approximately 1,62 billion people. In Brazil, almost 3 million children younger than 5 years old presented anemia in 2006. The state of Rio Grande do Sul is the major producer of rice in the country and have characteristically acid iron-rich soils. The low pH enhances the iron availability to the roots and can lead to toxicity symptoms in rice plants. Even with the high iron availability to the plants, rice seeds accumulate low amounts of this mineral. Thus, it is essential to elucidate the mechanisms that lead to iron transport to seeds in order to allow rice biofortification. The *OsVIT1* and *OsVIT2* genes are highly expressed in flag leaves and regulate the transport of iron and zinc through the tonoplast to the vacuole. Loss-of-function mutants for each gene presented higher accumulation of iron and zinc on the seed, making them good targets for the genetic editing towards rice biofortification. Therefore, the goal of the present work is to generate a double loss-of-function mutant for the *OsVIT1* and *OsVIT2* genes using the genome editing technology mediated by CRISPR/Cas9 system. For that matter, a vector was constructed containing the cassettes for the Cas9 expression on plant cells and a single guide RNA (sgRNA), which guides the enzyme cut in the plant genome. The selection of the sgRNA was based on an alignment of the *OsVIT1* and *OsVIT2* genes, searching for an exclusive and shared region between them in the rice genome. This sgRNA, that can edit both genes, was inserted in a Cas9 binary plasmid, originating the *pH7Cas9U3pgVIT* vector. Rice calli were transformed with *Agrobacterium tumefaciens* and 10 transgenic lineages were obtained. The regenerated plants will be evaluated for the presence of the mutations on the *OsVIT1* and *OsVIT2* loci and, if confirmed, will enable pioneer studies of the effects of the simultaneous loss of those genes in the allocation of iron to the seeds.

Key-words: rice, biofortification, iron, CRISPR.

Lista de figuras

Figura 1. Mutantes dos genes <i>OsVIT1</i> e <i>OsVIT2</i> alteram acumulação de ferro em grãos de arroz.	11
Figura 2. Padrão da clivagem dos vetores <i>pH7WG2</i> e <i>pRGE32</i>	18
Figura 3. Vetor <i>pH7WG2-Cas9U3pgRNA</i>	19
Figura 4. Regiões alvo do RNA guia nos genes <i>OsVIT1</i> e <i>OsVIT2</i>	20
Figura 5. Esquema ilustrando a estrutura do RNA guia e o mecanismo de reconhecimento da região alvo nos genes <i>OsVIT1</i> (a) e <i>OsVIT2</i> (b).	20
Figura 6. Clivagem do vetor <i>pH7WG2-Cas9U3pgRNA</i>	21
Figura 7. Confirmação da construção <i>pH7WG2-Cas9U3pVIT</i>	21
Figura 8. Confirmação da sequência do sgRNA <i>VIT1/VIT2</i> do vetor <i>pH7WG2-Cas9U3pVIT</i>	22
Figura 9. Indução dos calos de arroz.	22
Figura 10. Seleção dos calos transformados.	23
Figura 11. Regeneração do material in vitro.	23
Figura 12. Detecção do gene <i>HPT</i> nos calos transformados de arroz.	25
Figura 13. Identificação de mutações induzidas pela Cas9.	26

Lista de tabelas

Tabela 1. Primers utilizados 17

Tabela 2. Eventos de transformação em diferentes estágios de regeneração. 24

Sumário

1 INTRODUÇÃO	8
1.1 Impactos da deficiência de ferro	8
1.2 Biofortificação do arroz	9
1.3 Homeostase do ferro.....	9
1.3.1 Genes transportadores de ferro vacuolar	10
2 OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo geral.....	13
2.2 Objetivos específicos	13
3 MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Construção do vetor <i>pH7WG2-Cas9U3pgRNA</i>	14
3.2 Determinação da sequência do RNA guia	14
3.3 Construção do vetor <i>pH7WG2-Cas9U3pVIT</i>	15
3.4 Transformação e regeneração de arroz.....	16
3.5 Genotipagem das plantas	16
4 RESULTADOS	18
4.1 Obtenção do plasmídeo binário <i>pH7WG2-Cas9U3pgRNA</i>	18
4.2 Sequência do RNA guia.....	19
4.3 Obtenção do vetor <i>pH7WG2-Cas9U3pVIT</i>	20
4.4 Indução de calos a partir de sementes de arroz	22
4.7 Regeneração.....	23
4.6 Genotipagem.....	24
5 DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS	27
6 REFERÊNCIAS.....	31

1 INTRODUÇÃO

1.1 Impactos da deficiência de ferro

Atualmente, a deficiência de ferro é considerada uma das mais graves e importantes carências nutricionais do mundo (Powers and Buchanan, 2017) afetando principalmente os países não-industrializados, onde os casos se concentram majoritariamente entre crianças menores de cinco anos e mulheres. Entretanto, esta é a única deficiência nutricional que está significativamente presente, também, nos países desenvolvidos (World Health Organization, 2001). A deficiência desse nutriente é resultado da diminuição das reservas de ferro devido à baixa ingestão e absorção, comprometendo o fornecimento de ferro aos tecidos (Qamar *et al.*, 2015). O estágio mais grave dessa deficiência é associado a anemia (World Health Organization, 2001).

Anemia pode ser definida como o estado em que a qualidade ou quantidade da hemoglobina no sangue se encontram abaixo dos valores normais para a idade e gênero. As causas são múltiplas, entretanto a deficiência de fatores hemopoiéticos são responsáveis pela grande maioria dos casos, sendo eles o ferro, folato e vitamina B12 (DeMaeyer *et al.*, 1985). Estima-se que a deficiência de ferro seja responsável por aproximadamente 50% dos casos de anemia no mundo (Qamar *et al.*, 2015).

A carência de ferro mesmo sem causar anemia pode ter consequências funcionais adversas. Em crianças, pode ser responsável por deficiências na performance cognitiva, comportamental e física. Em adolescentes e adultos, interfere na resposta imune e na morbidade das infecções, além de alterar uso de fontes energéticas pelos músculos modificando, a capacidade física (Berquó *et al.*, 2008). Embora não se disponha de pesquisas populacionais de abrangência nacional, estudos apontam que a prevalência da anemia na população brasileira é alta: em média 35% das crianças menores de cinco anos e 65% das mulheres grávidas (Berquó *et al.*, 2008).

1.2 Biofortificação do arroz

A biofortificação é uma estratégia interessante para resolver o problema da deficiência de ferro, especialmente para pessoas que não podem mudar seus hábitos alimentares devido a questões financeiras, culturais ou religiosas (Schreinert *et al.*, 2017). Além disso, a biofortificação é uma alternativa sustentável e mais efetiva, quando comparada a programas de suplementação nutricional. Enquanto programas de suplementação apresentam eficiência de até 70%, a curto prazo, programas de biofortificação apresentaram eficiência de 93%, a longo prazo (World Health Organization, 2001).

O arroz se apresenta como um alvo ideal para biofortificação por ser considerado um alimento base da alimentação da maior parte da população, principalmente em países em desenvolvimento, onde a anemia decorrente da deficiência de ferro, é mais grave (Becker and Asch, 2005). A produção global de arroz é de 165 milhões de hectares, sendo não apenas o segundo cereal mais cultivado no mundo mas também um modelo para estudos genômicos em monocotiledôneas (Schreinert *et al.*, 2017). No Brasil, são consumidos 12,14 milhões de toneladas de arroz anualmente, sendo 75% da produção cultivada nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Fageria *et al.*, 2014). Outro fator que contribui para a escolha desse cereal como alvo da biofortificação é que os mecanismos de absorção, translocação e homeostase do ferro são bem estabelecidos e descritos (Masuda *et al.*, 2012).

1.3 Homeostase do ferro

O ferro é o quarto elemento mais comum na crosta terrestre, além de ser um micronutriente essencial para animais e plantas. Se encontra, comumente, como minerais de ferro em ambientes naturais, como solos e sedimentos (Hori *et al.*, 2015). Apesar da elevada quantidade de ferro no solo, sua disponibilidade para as raízes é reduzida (Morrissey and Guerinot, 2009). Em solos aeróbicos, ou com pH elevado, o Fe é facilmente oxidado e se encontra predominantemente na forma Fe^{3+} , que é insolúvel e de difícil absorção. Em contrapartida, em solos de pH mais baixo, o Fe está solúvel e prontamente disponível para as plantas na forma Fe^{2+} (Borch *et al.*, 2010).

Já em solos alagados, como em condição anaeróbias, o pH decai e ocorre a redução do Fe^{3+} para Fe^{2+} , estando prontamente disponível (Schreinert *et al.*, 2017).

Uma vez dentro da célula, o ferro é submetido a um controle rígido para evitar que se torne tóxico (Connolly and Lou Guerinot, 2002), e se acredita que a ferritina desempenha um papel fundamental nesse processo (Briat & Lobreaux, 1997). Ferritina é um complexo globular de proteínas com 24 subunidades capaz de armazenar 4500 átomos de Fe de modo a deixá-lo disponível à célula em uma forma não tóxica (Liu *et al.*, 2003). Entretanto, dada a natureza não seletiva de ligação a metais, existe o risco de acumulação de metais indesejados (Rama Kumar and Prasad, 1999), o que dificulta a aplicação da ferritina na biofortificação.

Outro mecanismo importante para a homeostase de Fe é o sequestro vacuolar, que também serve como um armazenamento seguro para a célula (Zhang *et al.*, 2012). Diversos genes foram identificados por regular o transporte de Fe do citoplasma para o vacúolo em *Arabidopsis thaliana*, como *AtNRAMP3* e *AtNRAMP4* (Lanquar *et al.*, 2005; Thomine *et al.*, 2003), *FPN1* e *FPN2* (Morrissey *et al.*, 2009) e o gene *AtVIT1* (*Vacuolar Iron Transporter 1* de *Arabidopsis*) (Kim *et al.*, 2006; Roschzttardtz, *et al.* 2009).

1.3.1 Genes transportadores de ferro vacuolar

O gene *AtVIT1* é altamente expresso em sementes em desenvolvimento e apresenta a capacidade de mediar o sequestro vacuolar de Fe^{2+} e Mn^{2+} , mas não de Cd^{2+} (metal pesado contaminante de solos) (Kim *et al.*, 2006), demonstrando ser um potencial alvo para biofortificação. Foi demonstrado que *AtVIT1* não altera a concentração de ferro, e sim sua localização espacial (Kim *et al.*, 2006). Estudos subsequentes identificaram um gene ortólogo em *Tulipa gesneriana* (*TgVIT1*), que transporta Fe para dentro das pétalas, alterando a coloração das flores (Momonoi *et al.*, 2009). Essas observações sugerem que ortólogos do gene *VIT* podem regular diversos processos fisiológicos, dependendo do organismo em que se encontram.

Em arroz, foram identificados e caracterizados os genes *OsVIT1* e *OsVIT2*, que são altamente expressos na folha-bandeira e bainha foliar. Esses genes são responsáveis pelo aprisionamento de Fe e Zn nos vacúolos desses tecidos,

indisponibilizando esses micronutrientes para o restante da planta. A perda da função desses genes leva ao acúmulo de Fe e Zn em sementes de arroz (Figura 1), entretanto não gera mudanças significativas nos níveis de Mn e Cu. Foi observado, também, que não há alteração na concentração dos metais, e sim uma alteração na distribuição dos mesmos, considerando que houve diminuição da quantidade de Fe e Zn presente na folha-bandeira e bainha foliar (Zhang *et al.*, 2012). Dessa forma, é possível inferirmos que as plantas de arroz tendem a controlar firmemente a translocação de Fe e Zn para as sementes, estabelecendo um estoque de nutrientes na folha bandeira e nas bainhas foliares. Além disso, é possível estabelecer uma conexão direta entre os genes *OsVIT1* e *OsVIT2* e o processo de armazenamento vacuolar de nutrientes (Zhang *et al.*, 2012).

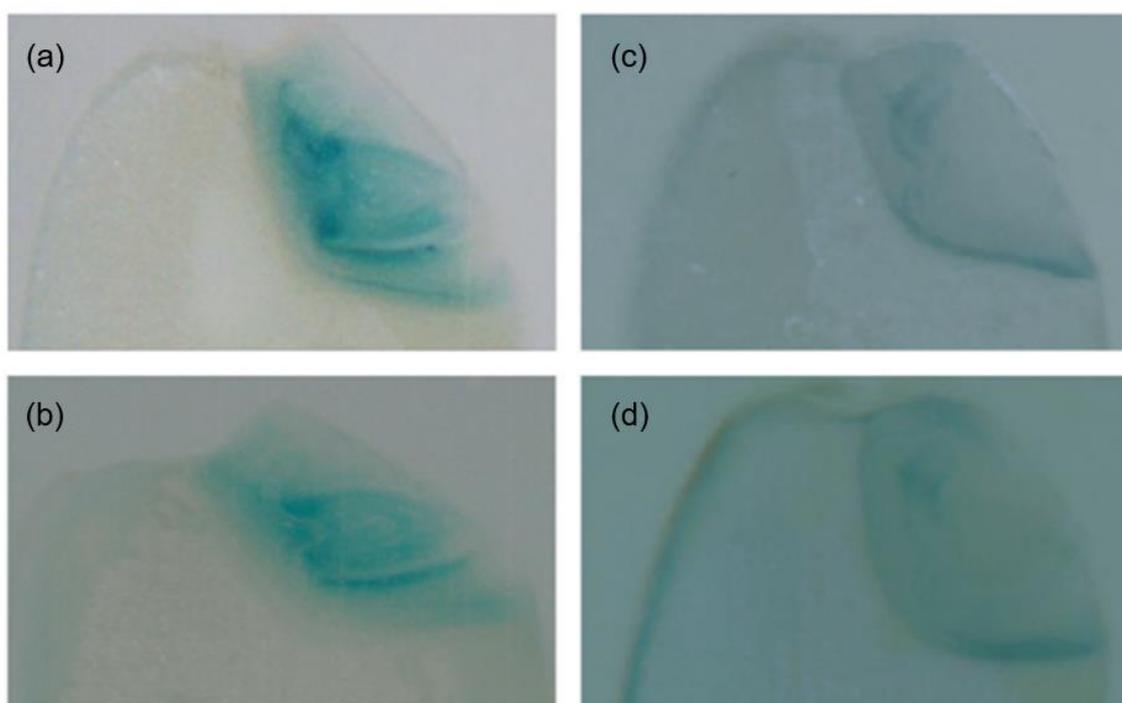


Figura 1. Mutantes dos genes *OsVIT1* e *OsVIT2* alteram acumulação de ferro em grãos de arroz.

Representação da técnica de Perls' staining em sementes de arroz, indicando pela coloração azul a distribuição de ferro em mutantes *osvit1* (a), *osvit2* (b), *OsVIT1/osvit1* (c) e *OsVIT2/osvit2* (d). Adaptado de (Zhang *et al.*, 2012)

Entretanto, as análises desenvolvidas por Zhang et al. 2012 foram baseadas em mutantes simples de cada gene, que foram obtidos a partir de backgrounds genéticos diferentes. O mutante *osvit1* foi isolado no background Zhonghua11 e *osvit2* em Dongjin, o que dificulta a caracterização do efeito da dupla mutação, uma vez que um cruzamento adicionaria muitos fatores externos indesejados. Frente a isso, a obtenção de um mutante duplo *osvit1-osvit2* possibilita o entendimento da perda-de-função simultânea dos genes em arroz, excluindo os fatores externos. A edição mediada por CRISPR possibilita que o RNA guia direcione a Cas9 até as regiões alvo em cada gene. O complexo RNA guia-Cas9 gera a quebra da fita dupla de DNA três nucleotídeos a montante do motivo PAM (Motivo Adjacente ao Protoespaçador). O reparo se dá pelo mecanismo NHEJ (*Non-homologous end joinig*), que por ser propenso a erros resultará em possíveis mutações nessas regiões (Belhaj *et al.*, 2013). Possivelmente, o mutante duplo apresentaria maior concentração de Fe e Zn nos grãos de arroz, quando comparado aos mutantes simples, viabilizando, assim, a biofortificação do arroz.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Gerar mutantes, em arroz, com a perda-de-função simultânea para os genes *OsVIT1* e *OsVIT2* na variedade Nipponbare utilizando a tecnologia de edição gênica mediada por CRISPR/Cas9, visando obter plantas com níveis alterados de ferro e zinco nas sementes, buscando viabilizar a biofortificação deste importante cereal.

2.2 Objetivos específicos

- a. Construção de um vetor binário contendo os genes da Cas9 e RNA guia (*sgRNA*) direcionado para os genes *OsVIT1* e *OsVIT2*;
- b. Transformação de calos de arroz via *Agrobacterium tumefaciens*;
- c. Regeneração das plantas transformadas;
- d. Genotipagem do material transformado;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Construção do vetor *pH7WG2-Cas9U3pgRNA*

O cassete de expressão foi construído no plasmídeo *pH7WG2* (Karimi et al., 2002), um vetor binário que transfere no seu T-DNA a resistência à higromicina. Neste plasmídeo, foi inserido um cassete oriundo do plasmídeo *pRGE32* (Xie and Yang, 2013), contendo a sequência codificante da enzima Cas9 e a região de inserção do RNA guia regulada pelo promotor da RNA polimerase III, responsável pela transcrição do RNA guia.

As manipulações de moléculas de DNA recombinante seguiram protocolos já descritos (Sargent, 1988). Os plasmídeos *pH7WG2* e *pRGE32* foram clivados com as enzimas de restrição *HindIII/SalI* e *HindIII/XhoI* (Thermo Scientific), respectivamente, utilizando 5 µg de DNA de acordo com as especificações do fabricante.

As reações de clivagem foram reveladas em gel de agarose/TBE 0,6% de onde foram purificadas as bandas de 8,9 kb do vetor *pH7WG2* e a de 6,6 kb do *pRGE32*, sem passarem por exposição a luz UV, com o kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN). A ligação dos fragmentos purificados foi realizada com a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen), utilizado 150 ng do vetor e 50 ng do inserto, por três horas à temperatura ambiente. Para confirmar a construção, foi realizada uma digestão utilizando a enzima *EcoRV* (NEB), segundo instruções do fabricante, e o padrão de digestão esperado da molécula recombinante de 13 kb e 2,4 kb foi avaliado por eletroforese em gel de agarose/TBA 0,8% corado com Brometo de Etídeo.

3.2 Determinação da sequência do RNA guia

Os éxons dos genes *OsVIT1* (*LOC_Os04g38940*) e *OsVIT2* (*LOC_Os09g23300*) foram obtidos da versão *Oryza sativa* v7_JGI do Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) e alinhados no software ClustalW (Larkin *et al.*, 2007), buscando-se regiões com alta homologia de sequência. As regiões encontradas foram inseridas na ferramenta on-line CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>), utilizando como parâmetros de busca o genoma de *Oryza sativa* e o PAM 20bp-NGG. Dentre as sequências sugeridas, foi selecionada uma que

apresentou zero *mismatches* entre genes *OsVIT1* e *OsVIT2* e off-targets (25) com 4 ou mais *mismatches* adjacentes ao PAM no genoma.

3.3 Construção do vetor *pH7WG2-Cas9U3pVIT*

Para a inserção da sequência do *sgRNA* selecionado no vetor binário *pH7WG2-Cas9U3pgRNA*, os oligonucleotídeos *sgRNA1 VIT1/VIT2 F* e *sgRNA1 VIT1/VIT2 R*, listados na tabela 1, foram sintetizados (Thermo Scientific) já fosforilados na porção 5', com regiões coesivas ao sítio de *Bsal* como descrito em Xie & Yang, 2013, e denominados *sgRNA1 VIT1/VIT2 F* e *sgRNA1 VIT1/VIT2 R* (Tabela 1).

Para o anelamento dos oligonucleotídeos, foi preparada uma mistura contendo 1 µl do *sgRNA1 VIT1/VIT2 F* (100 pMol), 1 µl do *sgRNA1 VIT1/VIT2 R* (100 pMol) e 8 µl de água ultrapura autoclavada, como descrito por (Xie and Yang, 2013). O anelamento dos oligonucleotídeos foi realizado no programa de temperaturas em termociclador de 10 min a 95°C, seguido de decréscimo de 0,1°C/seg até atingir 25°C e, posteriormente, foi adicionado 190 µl de água ultrapura autoclavada e o dímero de oligonucleotídeos foi armazenado a 4°C.

Um micrograma do vetor *pH7WG2-Cas9U3pgRNA* foi clivado com a enzima *Bsal* por 4 horas a 37°C e o padrão de digestão esperado de 11,5 kb, 3,9 kb e 8 pb foi previamente confirmado por eletroforese. Foram utilizados 50 ng do vetor clivado com *Bsal* e 2 µl do duplex de oligonucleotídeos para a reação de ligação, utilizando a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. O produto de ligação foi transformado em *E. coli* Ominmax e colônias recombinantes foram selecionadas em LB sólido contendo estreptomicina e espectinomicina a 50 mg/L. A confirmação da ligação do *sgRNA* elimina um dos dois sítios de *Bsal* do plasmídeo e este padrão foi confirmado através da digestão do vetor com a enzima *Bsal*, nas condições já descritas, com o padrão eletroforético esperado, do vetor linearizado, de apenas uma banda de 15,5 kb. O plasmídeo binário resultante contém no seu T-DNA os cassetes para a expressão da nuclease Cas9, do *sgRNA* para os genes *OsVIT1* e *OsVIT2* e da resistência à higromicina conferida pelo gene *HPT*.

A região contendo a sequência do RNA guia foi sequenciada utilizando 4,5 pMol do primer T7G RNA R, 150 ng do vetor, no equipamento ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) pela empresa ACTGene, Porto Alegre-RS. O

plasmídeo *pH7WG2-Cas9U3pVIT* foi introduzido em *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 via eletroporação (Main et al., 1995).

3.4 Transformação e regeneração de arroz

Os calos de arroz (*Oryza sativa* subsp. *japonica*) cv. Nipponbare, foram induzidos, transformados via *Agrobacterium tumefaciens* e as plantas foram regeneradas segundo protocolo de Ozawa, 2009, com algumas alterações. Os calos foram induzidos em meio N6D e repicados em meio NB, onde permaneceram por, no máximo, 4 semanas antes de serem novamente repicados para novo meio NB. Após induzidos, os calos foram repicados 3 vezes antes de serem transformados. A bactéria *A. tumefaciens*, contendo o vetor *pH7WG2-Cas9U3pVIT*, foi cultivada por 2 dias em meio LB seletivo sólido, contendo rifampicina (20 mg/ml), estreptomicina (50 mg/ml) e espectinomicina (50 mg/ml). O co-cultivo dos calos com *Agrobacterium* foi de 2 dias, em meio NBA, antes de serem repicados para o meio de seleção, HTC, sem passarem por lavagens para remoção da bactéria, onde permaneceram em estufa, a 28°C no escuro. Após 30 dias em meio de regeneração os calos começaram a apresentar brotações e foram transferidos para meio de enraizamento MS sem antibiótico de seleção, assim como nas fases posteriores.

3.5 Genotipagem das plantas

O DNA dos calos foi extraído segundo protocolo CTAB (Stewart, 1997). Para determinação da transgenia dos calos, foi realizada uma PCR com os primers HPT (Tabela 1).

Para genotipagem dos loci *OsVIT1* e *OsVIT2*, quanto à ocorrência de mutações, foi realizado uma qPCR do DNA total dos calos selecionados como descrito por Yu, et al. 2014. Os primers utilizados para o gene *OsVIT1* foram VIT1 Po F, VIT1 Pf F e VIT1 Po R e para o gene *OsVIT2* foram VIT2 Po F, VIT2 Pf F e VIT2 Po R (Tabela 1), utilizando 100 ng de DNA molde. O experimento foi realizado em duplicata, sendo realizado o cálculo de $\Delta\Delta CT$ (Livak and Schmittgen, 2001), onde a amplificação do fragmento de DNA externo foi considerada como referência e a amplificação

relativa dos fragmentos nas amostras de calos não transformados foi utilizada como controle do experimento.

Tabela 1. Primers utilizados

Primer	Sequência
sgRNA1 VIT1/VIT2 F	GGCACCATCTCCATGGGCCTCGGA
sgRNA1 VIT1/VIT2 R	AAACTCCGAGGCCCATGGAGATGG
T7G RNA R	AAAAAAGCACCGACTCGGTGCCA
VIT1 Po F	CATCCTCGCTCGTGCTCA
VIT1 Po R	GAAAAACTCGGAACCCCTCT
VIT1 Pf F	CCATCTCCATGGGCCTC
VIT2 Po F	CCTGTCCGGCGCCAA
VIT2 Po R	AAGAAGAGGAGGAAAGTTTTATTTTG
VIT2 Pf F	CCATCTCCATGGGCCTC

4 RESULTADOS

4.1 Obtenção do plasmídeo binário *pH7WG2-Cas9U3pgRNA*

Os vetores *pH7WG2* e *pRGE32* foram clivados com as enzimas *HindIII/SalI* e *HindIII/XhoI*, respectivamente (Figura 2) e as bandas de interesse foram purificadas a partir do gel e ligadas, dando origem ao vetor *pH7WG2-Cas9U3pgRNA* (Figura 3a).

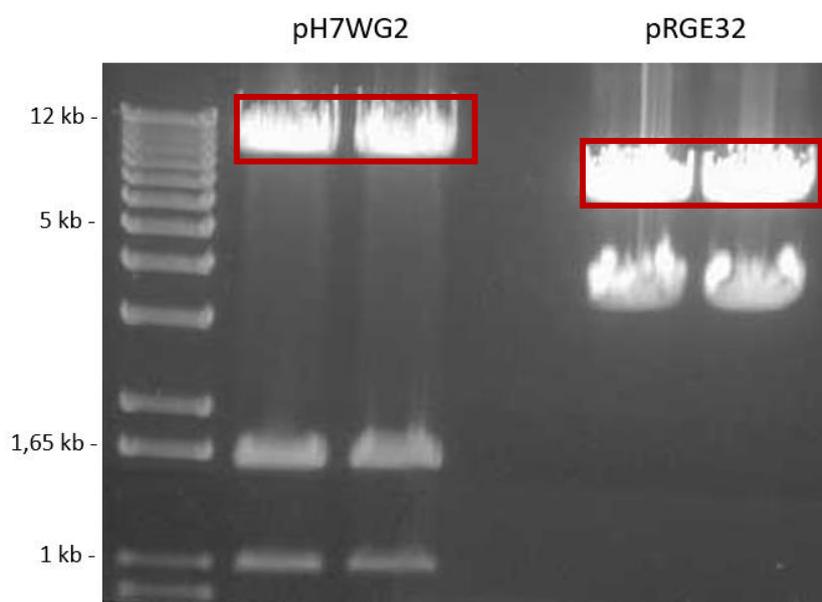


Figura 2. Padrão da clivagem dos vetores *pH7WG2* e *pRGE32*.

Marcador 1 kb Plus DNA Ladder, seguido do vetor *pH7WG2* digerido com as enzimas *HindIII/SalI* e *pRGE32* com *HindIII/XhoI*. Destacadas em vermelho as bandas de interesse de 8,9 kb e 6,6 kb, respectivamente.

A confirmação da identidade do plasmídeo se deu a partir da clivagem do mesmo com a enzima de restrição *EcoRV*, que possui dois sítios de restrição na construção recombinante (Figura 3a), liberando duas bandas de 13 kb e 2,4 kb. Foram obtidas quatro amostras que apresentaram o padrão de bandas esperado (Figura 3b) e a amostra 8 foi selecionada para a inserção do RNA guia. Este plasmídeo foi denominado *pH7WG2-Cas9U3pgRNA* e contém sítios para a enzima *BsaI* flanqueando o ponto de inserção da sequência do *sgRNA*.

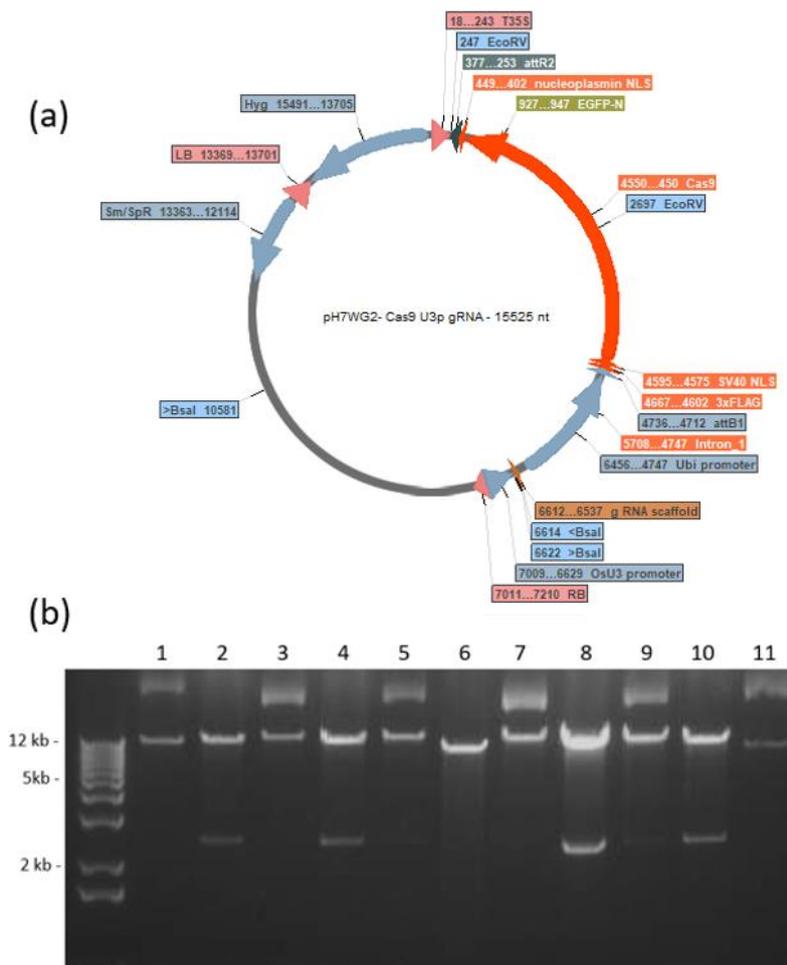


Figura 3. Vetor *pH7WG2-Cas9U3pgRNA*.

(a) Mapa gráfico do vetor construído indicando os sítios de restrição das enzimas *EcoRV* e *Bsal* (b) Resultado da digestão de plasmídeos obtidos de diferentes colônias recombinantes, onde as amostras 2, 4, 8 e 10 apresentam o padrão de bandas esperado para a construção descrita na figura a. Utilizando marcador 1 kb Plus DNA Ladder.

4.2 Sequência do RNA guia

Os genes *OsVIT1* e *OsVIT2* foram alinhados buscando regiões homólogas, visando a utilização de apenas um RNA guia para induzir as mutações em ambos os genes. A sequência selecionada foi CCATCTCCATGGGCCTCGGA, que não apresenta *mismatches* entre os genes e não apresenta *off-targets* sem *mismatches* no genoma de arroz. Os *off-targets* encontrados apresentam *mismatches* em até 4 pb adjacentes ao PAM garantindo que a probabilidade do *sgRNA* parear com essas regiões seja baixa. O gene *OsVIT1* apresenta duas formas de *splicing* alternativo, ambas serão afetadas pela mutação (Figura 4).

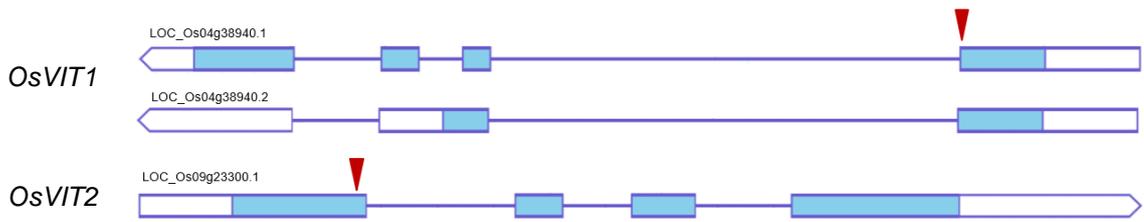


Figura 4. Regiões alvo do RNA guia nos genes *OsVIT1* e *OsVIT2*.

Estrutura genômica dos genes *OsVIT1* e *OsVIT2*. As caixas azuis representam os éxons e as linhas os íntrons, A seta indica o local de reconhecimento do RNA guia em cada um dos genes.

O esquema da figura 5 demonstra que mesmo os genes estando em cromossomos diferentes o RNA guia será capaz de gerar a quebra da fita dupla em ambos, ocasionando diferentes tipos de mutações que serão determinadas posteriormente com o sequenciamento das regiões.

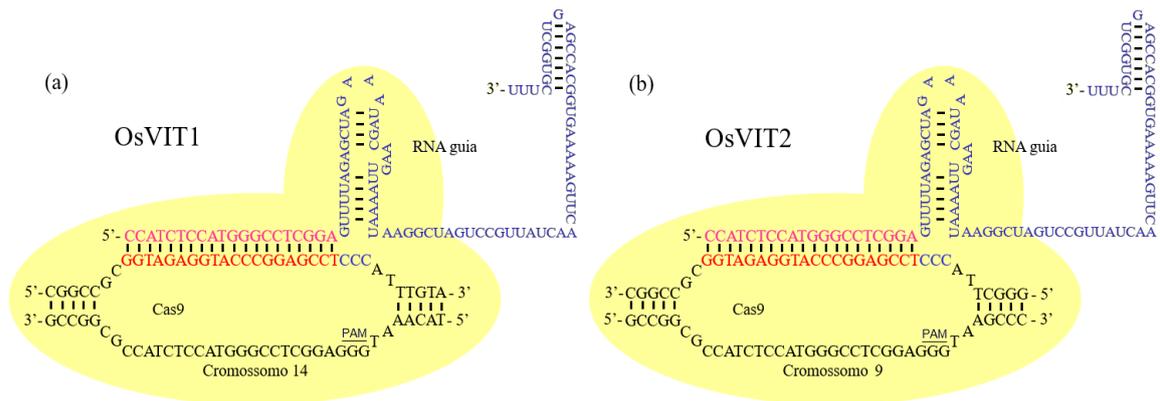


Figura 5. Esquema ilustrando a estrutura do RNA guia e o mecanismo de reconhecimento da região alvo nos genes *OsVIT1* (a) e *OsVIT2* (b).

4.3 Obtenção do vetor *pH7WG2-Cas9U3pVIT*

O vetor *pH7WG2-Cas9U3pgRNA* foi clivado com a enzima *BsaI* (Figura 6), para que a sequência codificante do RNA guia fosse inserida entre dois sítios da enzima.

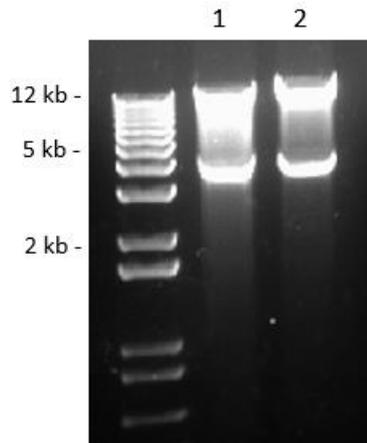


Figura 6. Clivagem do vetor *pHTWG2-Cas9U3pgRNA*.

Padrão de digestão do vetor com a enzima de restrição *Bsa* I, onde as bandas esperadas são de 11,5 kb, 3,9 kb e 8 pb (não é possível visualizar a banda de menor peso molecular), utilizando marcador 1 kb Plus DNA Ladder.

A inserção do *sgRNA* destrói dois sítios de *Bsa*, dessa forma, quando o vetor *pHTWG2-Cas9U3pVIT* for clivado com a enzima *Bsa* ele será apenas linearizado. Foram analisadas 12 colônias recombinantes, cujos plasmídeos foram extraídos e clivados com *Bsa*, onde quatro apresentaram o padrão de clivagem única (Figura 7).

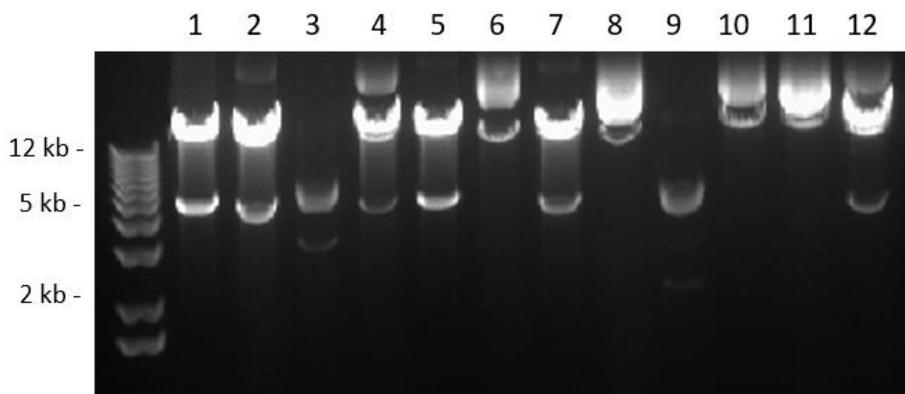


Figura 7. Confirmação da construção *pHTWG2-Cas9U3pVIT*.

Padrão de digestão do vetor com a enzima *Bsa*, onde as amostras 6, 8, 10 e 11 representam o vetor com a inserção da sequência do RNA guia, utilizando marcador 1 kb Plus DNA Ladder.

As amostras 6, 8, 10 e 11, que apresentaram o padrão de clivagem com *Bsa* esperado para a inserção do *sgRNA*, foram sequenciadas e apenas a amostra 8 apresentou a correta inserção da sequência do RNA guia no vetor (Figura 8). Este plasmídeo foi denominado *pHTWG2-Cas9U3pVIT* e foi eletroporado em células de

Agrobacterium tumefaciens EHA105 (Hood et al 1993) via eletroporação (Main et al. 1995).

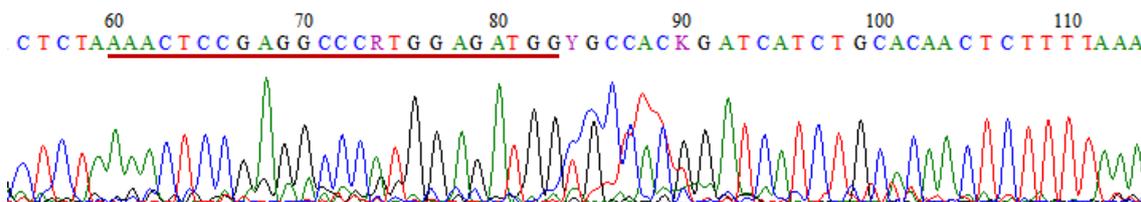


Figura 8. Confirmação da sequência do sgRNA VIT1/VIT2 do vetor *pH7WG2-Cas9U3pVIT*. Eletroferograma do sequenciamento da amostra 8 utilizando o primer reverso T7gRNA R, onde a região sublinhada representa a sequência anti-senso do RNA guia.

4.4 Indução de calos a partir de sementes de arroz

Dezenas de sementes de arroz passaram por meio de indução de calos e foram repicados em meio de proliferação (Figura 9), permanecendo nesse meio por aproximadamente 50 dias até serem transformados com o vetor *pH7WG2-Cas9U3pVIT*.

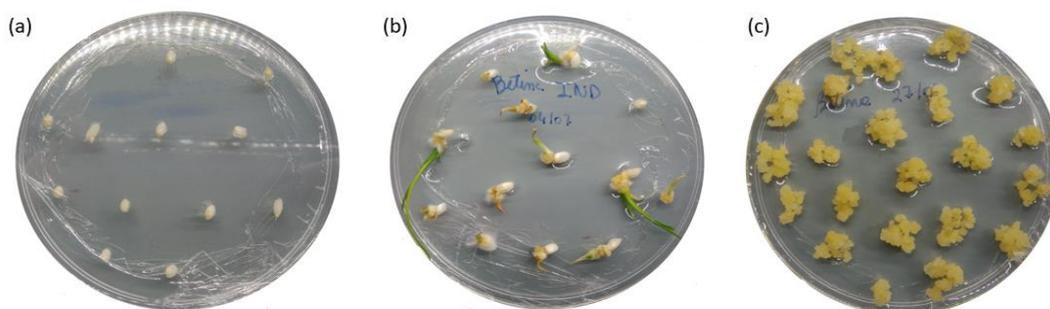


Figura 9. Indução dos calos de arroz.

(a) Sementes de arroz estéreis em meio de indução de calos N6D. (b) Sementes após 12 dias em meio N6D. (c) Calos induzidos e repicados em meio NB.

4.5 Transformação e regeneração dos calos de arroz

Aproximadamente 250 explantes passaram pelo processo de transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Desses, 10 calos apresentaram resistência à higromicina (Figura 10b) e foram repicados separadamente (Figura 10c). Cada calo

resistente foi considerado um evento de transformação distinto, para que possa ser realizada a genotipagem das plantas e a detecção do tipo de mutação sofrida por cada um deles. Cada linhagem foi repicada novamente em meio de seleção para proliferação do material e foram transferidos, posteriormente, para meio de regeneração.

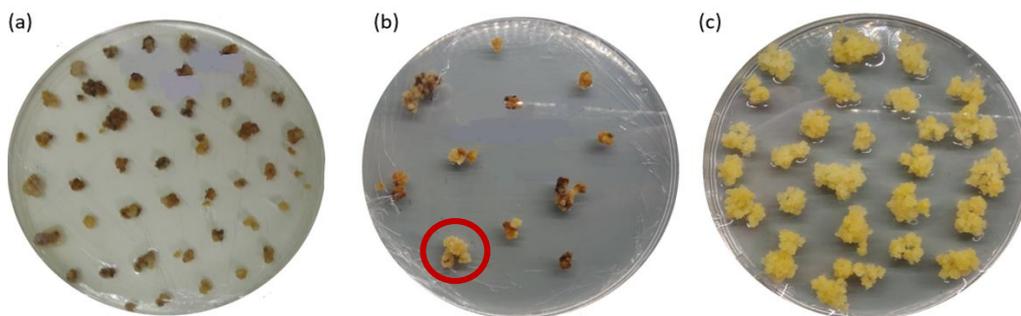


Figura 10. Seleção dos calos transformados.

(a) Calos após 20 dias em meio de seleção HTC. (b) Após 50 dias em meio HTC. Material resistente, destacado pelo círculo vermelho. (c) Calos saudáveis repicados novamente em meio HTC.

4.7 Regeneração

Os calos permaneceram em meio de regeneração até o surgimento de brotações (Figura 11a). O tempo de regeneração foi diferente entre os eventos de transformação, levando de 30 a 60 dias. Com o desenvolvimento da parte aérea, as plantas foram transferidas para meio de enraizamento (Figura 11b) onde permaneceram por aproximadamente 20 dias até serem transferidas para aclimação *ex vitro*.

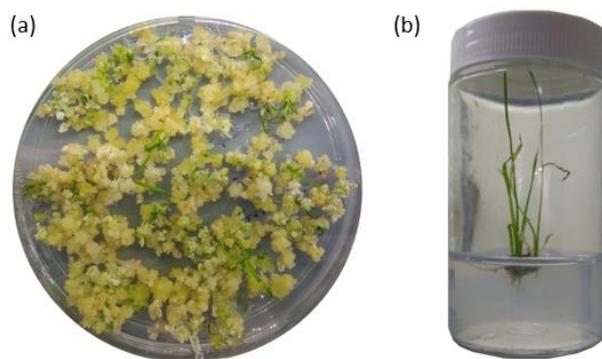


Figura 11. Regeneração do material in vitro.

(a) Calos repicados em meio de regeneração. (b) Material regenerado em meio MS, para o enraizamento.

Dos 10 eventos de transformação obtidos, as linhagens L1, L4, L6, L7, L8, L9 e L10 apresentam plantas regeneradas em meio de enraizamento ou em aclimação. Apenas 3 linhagens e o controle, que representa calos não transformados, não regeneraram plantas até o momento, entretanto apresentam sinais de brotação no meio de regeneração.

Tabela 2. Listagem dos eventos de transformação obtidos e número de plantas em seus respectivos estágios de regeneração.

Evento	Enraizamento	Aclimação
L1	18	8
L2	-	-
L3	-	-
L4	7	7
L5	-	-
L6	2	-
L7	22	10
L8	-	2
L9	1	-
L10	11	4
Controle	-	-

4.6 Genotipagem

Para determinação da transgenia dos calos de arroz, foi realizada amplificação do gene de seleção *hpt* (higromicina fosfotransferase) a partir do DNA genômico dos calos de arroz das linhagens L1 a L10. Todos os eventos de transformação apresentaram amplificação do gene *hpt* (Figura 12) e, com isso, todas as linhagens podem ser consideradas transgênicas pois possuem o T-DNA inserido em seu genoma.

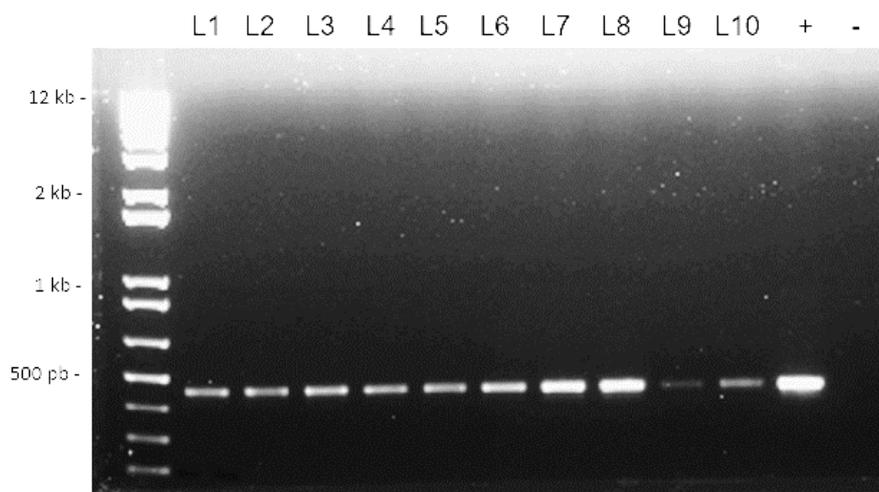


Figura 12. Detecção do gene *hpt* nos calos transformados de arroz.

Eletoforese em gel de agarose/TBE 1% das reações de PCR realizadas a partir do DNA total extraído das 10 linhagens selecionadas dos calos de arroz transformados, utilizando os primers HPT. (M) - marcador 1 kb Plus DNA Ladder, (L1 - L10) reações de PCR das linhagens selecionadas, (+) controle positivo, PCR com DNA molde *pH7WG2-Cas9U3pVIT*, (-) controle negativo da reação de PCR sem DNA molde.

Para a genotipagem dos loci quanto à ocorrência das mutações direcionadas à *OsVIT1* e *OsVIT2*, foi realizada por qPCR a partir do DNA total extraído dos calos e foram comparadas as amplificações relativas dos primers internos frente aos externos (Figura 13). As linhagens L1, L2, L3, L4, L6 e L7 apresentaram amplificação relativa menor do que a do controle, para o gene *OsVIT1*, enquanto que para o gene *OsVIT2*, as linhagens L1, L4, L6, L8, L9, L10 (Figura 13) indicam a presença da mutação. As linhagens que apresentaram amplificação relativa menor simultânea para os dois genes foram L1, L4 e L6, sendo elas possíveis mutantes duplos para os genes *OsVIT1* e *OsVIT2*. A ocorrência das mutações nos genes ainda será confirmada através do sequenciamento dos loci, para que se possa determinar o tipo de e se elas são capazes de ocasionar o nocaute dos genes.

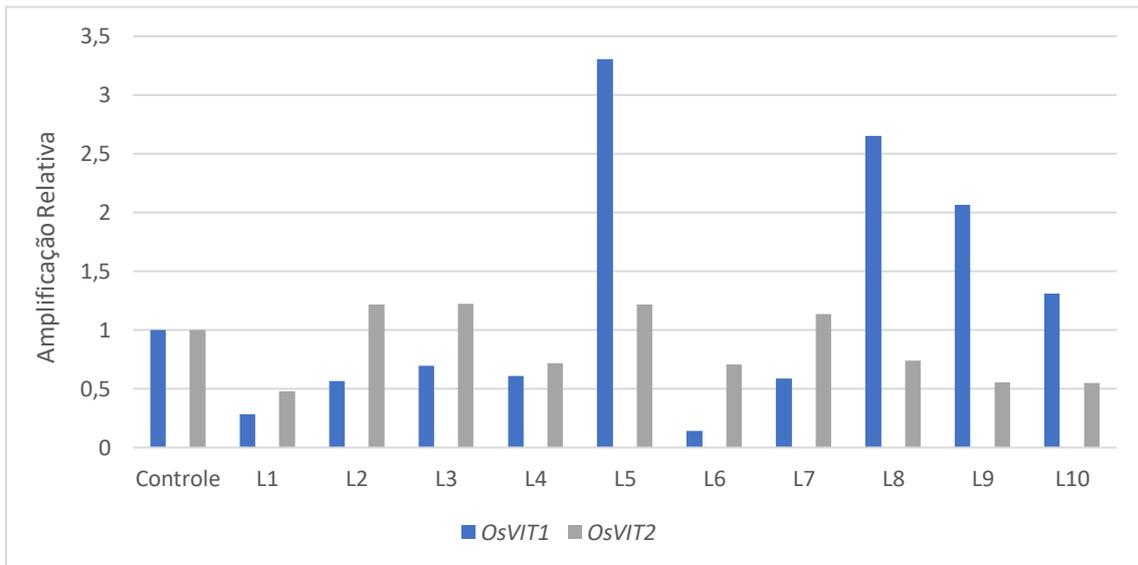


Figura 13. Identificação de mutações induzidas pela Cas9.

Análise por qPCR da ocorrência das mutações nos genes *OsVIT1* e *OsVIT2* nas linhagens transgênicas. Razão da amplificação relativa dos *primers* Pf/Po e primers Po/Po a partir do DNA total dos calos selecionados. (Controle) calo não transformado, (L1-L10) amplificação relativa nas linhagens transgênicas. *OsVIT1*, em azul, e *OsVIT2*, em cinza. Razões de amplificação inferiores a 1 sugerem a ocorrência da mutação no respectivo loci.

5 DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS

A anemia, causada pela deficiência de ferro, é uma das carências nutricionais mais prevalentes no mundo afetando cerca de um terço da população mundial e causando cerca de 800 mil mortes por ano (World Health Organization, 2001). Como solução para esse problema, a biofortificação de alimentos apresenta uma alternativa vantajosa por não provocar alterações nos hábitos alimentares, além de ser uma iniciativa barata e sustentável se comparada a programas de suplementação nutricional. A escolha do arroz como alvo da biofortificação se dá, principalmente, pelo fato de ser um dos cereais mais consumidos em países em desenvolvimento, justamente onde as estatísticas de carência nutricional de ferro são mais alarmantes (Masuda *et al.*, 2012). À vista disso, a busca por possíveis genes alvos que proporcionem a biofortificação dos grãos de arroz se mostra de extrema importância, dado que, até o momento não se tem descrito um mecanismo efetivo para acumulação de ferro em grãos de arroz.

Os genes *OsVIT1* e *OsVIT2* foram caracterizados como sendo transportadores vacuolares de ferro e zinco do citosol para o vacúolo em arroz, aprisionando esses micronutrientes nos tecidos em que são expressos. O efeito da perda-de-função de cada um desses genes mostraram que os mutantes simples deixam de armazenar Fe e Zn na folha bandera e bainha vegetal, passando a acumular esses nutrientes nas sementes (Zhang *et al.*, 2012). Contudo, se desconhece os efeitos da perda-de-função de ambos os genes em plantas de arroz e se esse efeito seria adicionalmente benéfico para a biofortificação de suas sementes.

Visando a geração de um mutante duplo para os genes *OsVIT1* e *OsVIT2*, construímos um vetor binário contendo a sequência codificadora da Cas9 e a sequência do RNA guia (Figura 3a) para obtenção de plantas transgênicas de arroz com o intuito de gerar mutações em ambos os genes (Figura 4). A taxa de sucesso obtida na transformação foi de apenas 4%, diferindo amplamente das taxas encontradas na literatura, superiores a 80% (Li *et al.*, 2015; Ozawa, 2009). Essa variação pode ocorrer devido às diferenças nos protocolos de indução e regeneração dos calos. O protocolo que utilizamos, consistia de um híbrido entre os dois métodos já descritos. Esta adaptação havia sido benéfica para a obtenção de plantas

transgênicas de arroz em trabalhos anteriores (Passaia *et al.*, 2014). Possivelmente a taxa encontrada foi muito inferior por termos utilizado calos de aproximadamente 50 dias de idade, que foram induzidos e repicados duas vezes, enquanto os trabalhos de Li *et al.* e Ozawa utilizaram calos com até 20 dias que foram induzidos e repicados em meio de proliferação apenas uma vez. O meio de proliferação também difere dos protocolos citados anteriormente. Os calos foram induzidos em meio N6D e repicados em meio NB para proliferação, enquanto que os outros protocolos utilizam o meio N6D também para proliferação. Outra possível causa de variação é a diferença no co-cultivo dos calos com a *Agrobacterium tumefaciens*. Ao passo que o co-cultivo foi realizado por 2 dias e em seguida os calos foram repicados em meio HTC (meio NB contendo antibióticos), os trabalhos citados anteriormente sugerem que os calos permaneçam 3 dias em contato com a bactéria e que sejam lavados com água estéril antes de serem repicados em meio N6D contendo antibióticos. Após o co-cultivo, os calos permaneceram em meio de seleção no escuro em estufa, ao passo que os protocolos de Li *et al.* e Ozawa submetem os calos a fotoperíodos de 16 horas de luz e 8 horas de escuro. Com a comparação dos trabalhos é possível concluirmos que protocolos que utilizam calos induzidos a menos tempo e que permaneceram pouco tempo em meio de proliferação apresentaram uma taxa maior de transformação. Provavelmente seja uma boa estratégia induzir um maior número de calos a partir de mais sementes ao invés de mantê-los mais tempo em meio de proliferação, visto que, calos mais jovens apresentam maior suscetibilidade à transformação. A troca dos meios de proliferação e seleção também representam modificações relevantes para elevar a eficiência da transformação.

A detecção do gene HPT no material transformado (Figura 12) comprovou que 100% das linhagens resistentes apresentavam a inserção do T-DNA em seu genoma, sendo esse resultado equivalente ao descrito por Ozawa, 2009. Quanto à taxa de regeneração, proporções distintas foram encontradas para cada uma das linhagens transgênicas (Tabela 2). Enquanto foram obtidas 26 plantas regeneradas da linhagem L1, 14 da L4, 2 da L6, 32 da L7, 2 da L8, 1 da L9 e 15 da L10, nenhuma planta foi obtida até o momento das linhagens L2, L3, L5 e da linhagem não transformada, utilizada como controle. A proporção exata não foi calculada devido à dificuldade de contagem inicial dos calos, por se fragmentarem facilmente. A possível explicação para a divergência nas taxas de regeneração entre as linhagens transgênicas é o local

de inserção do T-DNA no genoma dos calos. Nas linhagens que não apresentaram plantas regeneradas a inserção pode ter ocorrido em regiões relevantes para o desenvolvimento das plantas. Os calos não transformados foram transferidos 30 dias após as demais linhagens, justificando a demora no aparecimento de brotações.

Ao serem analisados os loci dos genes com o intuito de avaliar a ocorrência de mutações (Figura 13), as linhagens L1, L2 L3, L4 L6 e L7 apresentaram amplificação relativa menor quando comparadas ao controle para o gene *OsVIT1*, sugerindo que essas linhagens apresentam mutação nesse gene. Já para *OsVIT2*, as linhagens L1, L4, L6, L8, L9 e L10 apresentaram o padrão referente a ocorrência de mutação nesse gene. Desta forma, possivelmente as linhagens L1, L4 e L6 possuem as mutações nos dois genes. Outra possibilidade é que as mutações nas demais linhagens não sejam bialélicas, ou seja, podem ter ocorrido somente em um dos alelos e assim geraram uma boa amplificação, mesmo tendo sofrido a mutação em um dos loci. Podemos discriminar os homocigotos dos heterocigotos por HRM (High Resolution Melting qPCR) ou até por eletroforese, caso a diferença seja de muitos pares de base. A genotipagem descrita por Yu et al., 2014 é um indicativo da ocorrência de mutações, entretanto não representa um resultado conclusivo. Dessa forma, a realização de experimentos complementares utilizando DNA extraído das folhas das plantas regeneradas se faz necessário para a confirmação dos resultados observados; assim como o sequenciamento das regiões para confirmação dos tipos de mutações em cada locus. Caso os experimentos complementares confirmem o resultado encontrado, essa técnica pode ser utilizada para o *screening* de mutações em estágios iniciais da cultura *in vitro* de arroz, não sendo necessária a regeneração de um grande número de plantas não mutagenizadas.

Após a regeneração, as plantas serão caracterizadas quimicamente quanto ao acúmulo de Fe e Zn nas sementes (Green, 2004) e ao conteúdo de metais, entre eles Mn e Cu que podem ser tóxicos para as plantas, através de ICP-MS (Li et al., 2010). Também será observada a germinação (Freitas et al., 2004) para garantir que o acúmulo dos micronutrientes não afetou o desenvolvimento da semente. As análises devem ser realizadas preferencialmente na geração T2, onde as plantas não carregarão mais o T-DNA e ambos os loci possivelmente se encontrem em homocigose. Para confirmar que o fenótipo observado é resultado da perda-de-função dos genes *OsVIT1* e *OsVIT2*, testes de complementação poderão ser realizados

(Zhang *et al.*, 2012). Caso as plantas mutadas não apresentem maior acúmulo de Fe e Zn nas sementes, possivelmente outros mecanismos celulares são responsáveis pela compensação das funções desempenhadas pelas proteínas truncadas e assim, um novo desenho experimental deve ser desenvolvido para o estudo dessa via. Em contrapartida, se as sementes apresentarem quantidade aumentada desses micronutrientes, a perda-de-função simultânea dos genes *OsVIT1* e *OsVIT2* poderá um mecanismo inovador para geração de arroz biofortificado.

6 REFERÊNCIAS

- Becker, M. and Asch, F.** (2005) Iron toxicity in rice - Conditions and management concepts. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, **168**, 558–573.
- Belhaj, K., Chaparro-Garcia, A., Kamoun, S. and Nekrasov, V.** (2013) Plant genome editing made easy: Targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. *Plant Methods*, **9**, 39.
- Berquó, E., Garcia, S. and Lago, T.** (2008) *Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde da Criança e da Mulher: PNDS 2006*.
- Borch, T., Kretzschmar, R., Skappler, A., Cappellen, P. Van, Ginder-Vogel, M., Voegelin, A. and Campbell, K.** (2010) Biogeochemical redox processes and their impact on contaminant dynamics. *Environ. Sci. Technol.*, **44**, 15–23.
- Briat, J.F. and Lobreaux, S.** (1997) Iron transport and storage in plants. *Mol. Endocrinol. J. Biol. Chem. Sci. Plant Mol. Biol. Mol. Gen. Genet. Prog. Biophys. Mol. Biol. J.W., Fontes, E.B.P. Boston, R.S. Methods Cell Biol. J. Biol. Chem*, **10**, 682–693.
- Connolly, E.L. and Guerinot, M. Lou** (2002) Iron stress in plants. *Genome Biol.*, **3**, 1024–1.
- DeMaeyer, E. M., & Adiels-Tegman, M.** (1985) The prevalence of anaemia in the world. *World Health Stat. Q.*, **38**, 302–16.
- Fageria, N.K., Wander, A.E. and Silva, S.C.** (2014) Rice (*Oryza sativa*) cultivation in Brazil. *Indian J. Agron.*, **59**, 350–358.
- Freitas, R., Dias, D., Oliveira, L. and Almeida, M.** (2004) TESTES FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS NA ESTIMATIVA DO POTENCIAL DE. *Rev. Bras. Sementes*, **26**, 84–91.
- Green, L.S.** (2004) FRD3 Controls Iron Localization in Arabidopsis. *PLANT Physiol.*, **136**, 2523–2531.
- Hori, T., Aoyagi, T., Itoh, H., et al.** (2015) Isolation of microorganisms involved in reduction of crystalline iron(III) oxides in natural environments. *Front. Microbiol.*,

6.

- Karimi, M., Inzé, D. and Depicker, A.** (2002) GATEWAY" vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.*, **7**, 193–195.
- Kim, S.A., Punshon, T., Lanzirotti, A., Li, A., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Kaplan, J. and Guerinot, M. Lou** (2006) Localization of iron in Arabidopsis seed requires the vacuolar membrane transporter VIT1. *Science (80-.)*, **314**, 1295–1298.
- Lanquar, V., Lelièvre, F., Bolte, S., et al.** (2005) Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *EMBO J.*, **24**, 4041–4051.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., et al.** (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, **23**, 2947–2948.
- Li, D., Xu, H., Sun, X., Cui, Z., Zhang, Y., Bai, Y., Wang, X. and Chen, W.** (2015) Differential transformation efficiency of Japonica rice varieties developed in northern China. *Crop Breed. Appl. Biotechnol.*, **15**, 162–168.
- Li, J.-Y., Fu, Y.-L., Pike, S.M., et al.** (2010) The Arabidopsis Nitrate Transporter NRT1.8 Functions in Nitrate Removal from the Xylem Sap and Mediates Cadmium Tolerance. *PLANT CELL ONLINE*, **22**, 1633–1646.
- Liu, X., Jin, W. and Theil, E.C.** (2003) Opening protein pores with chaotropes enhances Fe reduction and chelation of Fe from the ferritin biomineral. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**, 3653–3658.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D.** (2008) Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} Method. In *Asian Perspective*. pp. 139–169.
- Main, G.D., Reynolds, S. and Gartland, J.S.** (1995) Electroporation Protocols for Agrobacterium. In *Agrobacterium Protocols*. pp. 405–412.
- Masuda, H., Ishimaru, Y., Aung, M.S., Kobayashi, T., Kakei, Y., Takahashi, M., Higuchi, K., Nakanishi, H. and Nishizawa, N.K.** (2012) Iron biofortification in rice by the introduction of multiple genes involved in iron nutrition. *Sci. Rep.*, **2**.
- Momonoi, K., Yoshida, K., Mano, S., Takahashi, H., Nakamori, C., Shoji, K., Nitta,**

- A. and Nishimura, M.** (2009) A vacuolar iron transporter in tulip, TgVit1, is responsible for blue coloration in petal cells through iron accumulation. *Plant J.*, **59**, 437–447.
- Morrissey, J., Baxter, I.R., Lee, J., Li, L., Lahner, B., Grotz, N., Kaplan, J., Salt, D.E. and Guerinot, M. Lou** (2009) The Ferroportin Metal Efflux Proteins Function in Iron and Cobalt Homeostasis in Arabidopsis. *Plant Cell*, **21**, 3326–3338.
- Morrissey, J. and Guerinot, M. Lou** (2009) Iron uptake and transport in plants: The good, the bad, and the ionome. *Chem. Rev.*, **109**, 4553–4567.
- Ozawa, K.** (2009) Establishment of a high efficiency Agrobacterium-mediated transformation system of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci.*, **176**, 522–527.
- Passaia, G., Caverzan, A., Fonini, L.S., Carvalho, F.E.L., Silveira, J.A.G. and Margis-Pinheiro, M.** (2014) Chloroplastic and mitochondrial GPX genes play a critical role in rice development. *Biol. Plant.*, **58**, 375–378.
- Powers, J.M. and Buchanan, G.R.** (2017) Potential for Improved Screening, Diagnosis, and Treatment for Iron Deficiency and Iron Deficiency Anemia in Young Children. *J. Pediatr.*, **188**, 8–10.
- Qamar, K., Saboor, M., Qudsia, F., Khosa, S.M., Moinuddin and Usman, M.** (2015) Malabsorption of iron as a cause of iron deficiency anemia in postmenopausal women. *Pakistan J. Med. Sci.*, **31**, 304–308.
- Rama Kumar, T. and Prasad, M.N. V** (1999) Metal Binding Properties of Ferritin in *Vigna mungo* (L.) Hepper (Black Gram): Possible Role in Heavy Metal Detoxification. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **62**, 502–507.
- Roschzttardt, H., Conejero, G., Curie, C. and Mari, S.** (2009) Identification of the Endodermal Vacuole as the Iron Storage Compartment in the Arabidopsis Embryo. *PLANT Physiol.*, **151**, 1329–1338.
- Sargent, T.** (1988) Current protocols in molecular biology. *Anal. Biochem.*, **171**, 223–224.
- Schreinert, et al.** (2017) Dealing with iron metabolism in rice: from breeding for stress tolerance to biofortification. *Genet. Mol. Biol.*, **40**, 312–325.

- Stewart, C.N.** (1997) Rapid DNA Extraction from Plants. In *Fingerprinting Methods Based on Arbitrarily Primed PCR*. pp. 25–28.
- World Health Organization** (2001) Iron Deficiency Anemia. In *Iron Deficiency Anemia. Assessment, Prevention and Control: A guide for program managers*. p. 29.
- Xie, K. and Yang, Y.** (2013) RNA-Guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system. *Mol. Plant*, **6**, 1975–1983.
- Yu, C., Zhang, Y., Yao, S. and Wei, Y.** (2014) A PCR based protocol for detecting indel mutations induced by TALENs and CRISPR/Cas9 in zebrafish. *PLoS One*, **9**, 98282.
- 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.