

SILVA; Julia da ¹, OLIVEIRA; Clenya Carla Leandro de ², NOGUEIRA; André Luis da Silva Parente ³, MELO; Maria Eduarda Pimentel de ⁴, SANTOS; Leandro Azevedo ⁵

RESUMO

O arroz (*Oryza sativa* L.) representa um dos cereais mais importantes devido à produção e ao consumo no mundo, estando presente na dieta frequente das classes de menor rendimento econômico e na tradicional culinária brasileira, sendo assim, um alimento acessível e nutricionalmente rico. No entanto, é necessário em média 2500 litros de água para produzir 1 quilo de arroz bruto, consistindo em um cereal sensível à escassez hídrica, um fenômeno que tem e tende a se agravar nas próximas décadas. Nessa perspectiva, surge a necessidade de criação de plantas que possam produzir mais grãos de arroz demandando menos água, dessa forma, também tolerando mais os efeitos do estresse por seca. A edição gênica de plantas se apresenta como uma ferramenta para aumentar a tolerância das culturas à condição de seca e para isso é necessário entender as funções dos genes que estejam relacionados com os mecanismos que levam a esse aumento. Com o propósito de expandir as informações a respeito dos genes regulatórios, o presente projeto tem como objetivo obter plantas geneticamente modificadas potencialmente tolerantes à seca selecionando plantas realmente transformadas de não transformadas. Para isso, avaliando o RNA-seq de genes de duas variedades distintas quanto a tolerância a seca de arroz, chegamos a dois genes, chamados, a princípio de UP e EF, com expressão elevada na variedade tolerante às 2 horas após imposição do estresse induzido por PEG6000. O trabalho foi conduzido no Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas do departamento de solos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). A planta de arroz (*oryza sativa*), variedade Nipponbare, modelo para edição gênica, foi a escolhida para a transformação. Foram elaboradas duas construções genéticas para nocaute dos genes selecionados utilizando a tecnologia CRISPR-Cas9, além de outras duas construções para superexpressão dos mesmos genes sob o controle do promotor da ubiquitina do milho. Realizou-se o processo de indução de calos de arroz, infecção deles mediada por *Agrobacterium tumefaciens* com as construções pRGE31-gRNA-UP, pRGE31-gRNA-EF, pIRS-154-UP e pIRS-154-EF; seleção de calos infectados através do antibiótico higromicina (50 mg L⁻¹), indução de parte aérea com meio rico em Cinetina (500 mg L⁻¹), e em seguida, indução de raiz. Utilizamos sequenciamento Sanger como estratégia de confirmação das plantas pRGE31-gRNA e amplificação da região codante para a sequência correspondente a região inicial e final de transcrição da construção IRS154 através de PCR, e visualização das bandas através de eletroforese em gel de agarose. O antibiótico higromicina permitiu que ocorresse a eliminação de calos e plantas negativas para a construção que foi inserida. O sequenciamento Sanger permitiu visualizar a mutação de bases de nucleotídeos que ocorreu no DNA das plantas de arroz que foram nocauteadas com a tecnologia CRISPR/Cas9. A amplificação com os oligos relacionados a região de iniciação e terminação do vetor IRS154 permitiram validar as plantas que realmente apresentam a edição gênica com superexpressão, descartando as falsas positivas. O método seguido e a estratégia de seleção e validação permitiram fazer uma triagem entre plantas positivas para as estratégias de edição gênica escolhida.

PALAVRAS-CHAVE: CRISPR/Cas9, *Oryza Sativa*, edição gênica, estresse abiótico

¹ Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, juliasilvarj13@gmail.com

² Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, clenya.carla1@gmail.com

³ Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, andre_nogueira18@hotmail.com

⁴ Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, mariaeduardaufrrj@yahoo.com

⁵ Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, azevedo.ufrrj@gmail.com

¹ Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, juliasilvarj13@gmail.com
² Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, clenya.carla1@gmail.com
³ Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, andre_nogueira18@hotmail.com
⁴ Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, mariaeduardafrj@yahoo.com
⁵ Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, azevedo.ufrj@gmail.com