

## Aplicação da tecnologia CRISPR no silenciamento de genes DRIP para obtenção de tolerância à seca em feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*)

Guilherme Souza Prado<sup>1</sup>, Thaísa Tessutti Pinheiro, Rosana Pereira Vianello, Paula Arielle Mendes Ribeiro Valdisser, Gesimária Ribeiro Costa Coelho e Josias Correa de Faria

<sup>1</sup> Graduação em Biotecnologia, Pós-doutorado. E-mail: gsprado25@gmail.com

**Resumo** - O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) é a leguminosa mais importante para consumo humano direto mundialmente, e uma fonte de macro e micronutrientes. Fatores ambientais, como o estresse abiótico, podem afetar drasticamente a produção desta cultura, sendo o estresse hídrico um dos fatores de maior relevância na perda de produtividade. Nesse contexto, sabe-se que a expressão dos genes ortólogos *DRIP1* e *DRIP2* em feijão é central na regulação negativa da resposta ao estresse hídrico, por promover a degradação da proteína DREB2A, que naturalmente proporciona tolerância em condições de estresse. Previamente, nossa equipe conduziu a validação de um método de edição de genoma via CRISPR/Cas para o feijoeiro comum, sob o pretexto de que este sistema é de grande utilidade para a modulação de características, inserindo ou deletando genes de forma precisa e sítio-direcionada. Assim, foi realizada a aplicação deste sistema de edição para silenciar genes *DRIP*. Para isso, foi delineado um sistema plasmidial de CRISPR/Cas9 para expressão da enzima Cas9 e do RNA-guia (gRNA), baseada em transcrição por RNA-polimerase II utilizando o promotor CaMV 35S. O sistema de processamento de cada gRNA utilizou duas ribozimas flanqueando a sequência de cada gRNA: HH (*hammerhead*) e HDV (*hepatitis D virus*) a 5' e 3', respectivamente, de forma similar à utilizada na validação do sistema de edição para feijoeiro comum. Os vetores de expressão, denominados pCas9-AHAS-DRIP1 e pCas9-AHAS-DRIP2, foram usados para transformar meristema apical de embriões via biobalística, e os explantes regenerados em meio seletivo acrescido de imazapyr foram caracterizados, via PCR, quanto à presença do gene marcador de seleção *ahas*. Dessa forma, foi possível obter 9 eventos transformados (2 de DRIP1 e 7 de DRIP2) que devem agora ser caracterizados quanto à edição genômica e tolerância à seca. Este trabalho representa, portanto, um grande avanço nas aplicações recentes da engenharia de genoma à Biotecnologia Vegetal.

Termos para indexação: CRISPR/Cas, DREB2A, edição de genoma, estresse abiótico.