

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Programa de Pós-Graduação em Agronomia



Dissertação

**Estratégias de melhoramento para o menor acúmulo de arsênio em
grãos de arroz irrigado**

Ana Marina Pedrolo

Pelotas, 2018.

Ana Marina Pedrolo

**Estratégias de melhoramento para o menor acúmulo de arsênio em
grãos de arroz irrigado**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Fitomelhoramento).

Orientador: Camila Pegoraro, Dra.

Co-orientador: Antônio Costa de Oliveira, Ph.D.

Pelotas, 2018.

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

P372e Pedrolo, Ana Marina

Estratégias de melhoramento para o menor acúmulo de arsênio em grãos de arroz irrigado / Ana Marina Pedrolo ; Camila Pegoraro, orientadora ; Antônio Costa de Oliveira, coorientador. — Pelotas, 2018.

74 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Oryza sativa. 2. Quantificação de As. 3. CRISPR/Cas9. I. Pegoraro, Camila, orient. II. Oliveira, Antônio Costa de, coorient. III. Título.

CDD : 633.18

Ana Marina Pedrolo

**Estratégias de melhoramento para o menor acúmulo de arsênio em
grãos de arroz irrigado**

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 16/02/2018

Banca examinadora:

Prof. Dra. Camila Pegoraro (Orientadora)

Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Ariano Martins de Magalhães Júnior

Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dra. Beatriz Helena Gomes Rocha

Doutora em Ciências e Tecnologia de Sementes pela Universidade Federal de Pelotas

Dr. Eduardo Venske

Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Aos meus pais Carlos (*in memoriam*) e
Roselene, por todo amor, carinho e exemplo.

Dedico

Agradecimentos

A Deus, pela vida, proteção, luz e força em todos os momentos dessa caminhada.

À minha orientadora Camila Pegoraro, por todo incentivo, conhecimentos e ensinamentos repassados. Obrigada por estar sempre disponível para me ajudar. Obrigada por acreditar em mim.

Aos professores Luciano Maia e Antônio Costa de Oliveira pelos conhecimentos e ensinamentos transmitidos.

Ao meu pai Carlos (*in memoriam*), que não pôde acompanhar essa jornada de perto, mas que em vida me mostrou o exemplo de amor, caráter e bondade. Obrigada por me guiar durante todo esse caminho.

À minha mãe Roselene, por todo amor, carinho, apoio, força, dedicação e principalmente por me ensinar a nunca desistir dos meus sonhos.

Às minhas amigas irmãs Ana Carolina Galdino e Bruna Oliveira por toda a amizade, companheirismo, carinho e incentivo. Obrigada por esses seis anos de convivência, vocês fazem parte da minha família.

Às minhas colegas e amigas Cássia Stafen e Bruna Possebon obrigada por toda ajuda, carinho, apoio e amizade. Obrigada pelas risadas, pelo ombro amigo nos momentos difíceis, e pelos conselhos e segredos compartilhados.

À estagiária e amiga Luciana Dallegrave Schroeder obrigada pela imensa ajuda durante esses dois anos. Obrigada pela amizade, carinho, conselhos, apoio e pelos divertidos milk-shakes de final de tarde.

Às minhas companheiras de laboratório Vívian Viana e Viviane Kopp da Luz por toda amizade, ajuda e conhecimento trocado. Obrigada por estarem sempre dispostas a ajudar e a ensinar. Sem vocês tudo teria sido muito mais difícil.

Aos colegas Carlos Bussanello, Railson Schreinert Dos Santos e Eduardo Venske pelas conversas e por toda a ajuda.

À Embrapa pela infraestrutura cedida e ao pesquisador Dr. Ariano Martins de Magalhães Júnior por toda ajuda e disponibilidade.

À Universidade Federal do ABC e ao professor Bruno Lemos Batista por todo auxílio na quantificação das amostras.

Ao CNPq pela concessão de bolsa auxílio, e a Universidade Federal de Pelotas e Centro de Genômica e Fitomelhoramento pelo espaço cedido para realização deste trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram, meu mais sincero muito obrigada!

Resumo

PEDROLO, A. M. **Estratégias de melhoramento para o menor acúmulo de arsênio em grãos de arroz irrigado**. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Fitomelhoramento). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas - RS, 2018.

O arroz (*Oryza sativa*) é o alimento básico na dieta de mais da metade da população mundial, entretanto sua qualidade poderá estar sendo ameaçada pelo acúmulo de arsênio (As) nos grãos. O As é um metaloide considerado altamente tóxico e cancerígeno. Na natureza o As pode estar presente como formas orgânicas ou inorgânicas. As inorgânicas como o arsenato e arsenito são consideradas significativamente mais tóxicas que as orgânicas. O arroz irrigado é o cereal com maior eficiência em absorver e acumular As. Dentre os fatores que contribuem para isso está a forma de cultivo sob sistema irrigado, pois em condições de anaerobiose a mobilidade e biodisponibilidade de As(III) é favorecida, e o As(III) e o silício compartilham os mesmos transportadores para serem absorvidos. A proteína OsLsi2 responsável pelo efluxo de silício e As(III) desempenha papel fundamental no acúmulo de As nos grãos de arroz. Para mitigar o problema de exposição ao As através do consumo de arroz podem ser desenvolvidos genótipos que apresentem menor absorção e acúmulo desse elemento. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi caracterizar genótipos de arroz quanto ao acúmulo de As em grãos e realizar edição do gene *OsLsi2*. Foi feita a caracterização de 93 genótipos de arroz das subespécies japônica e indica quanto o acúmulo de As em grãos descascados (arroz integral) e descascados e polidos (arroz tipo branco). Os teores de As nos grãos foram obtidos através da utilização da ferramenta de espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS). Os genótipos Basmati 370, BRS Querência, EMPASC 101, EMPASC 104, EMPASC 105, IRGA 424 CL, IRAT 124, IRGA 420, Jasmine 85, SC 173, SC 460, SCS 112, SCS 117 CL, SCS 114 AndoSan, Tetep apresentaram os menores teores de As nos grãos e são indicados para serem utilizados em programas de melhoramento visando a obtenção de genótipos com baixos acúmulo de As. Para interromper o efluxo de As em plantas de arroz buscou-se fazer a edição do gene *OsLsi2*. O sistema CRISPR/Cas9 foi a ferramenta utilizada para a tentativa de edição. A transformação das plantas de arroz foi de forma indireta via infecção por *Agrobacterium tumefaciens*. A construção *CRISPR/Cas9:OsLsi2* foi inserida em *Agrobacterium tumefaciens* e posteriormente estas foram utilizadas para infectar 310 mesocótilos. Ainda serão testadas via PCR 51 plantas possivelmente transformadas para confirmar a inserção da construção *CRISPR/Cas9:OsLsi2*.

Palavras-chave: *Oryza sativa*; quantificação de As; CRISPR/Cas9.

Abstract

PEDROLO, A. M. **Breeding strategies to decrease the accumulation of arsenic in irrigated rice grains**, Dissertation (Master of Science) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Fitomelhoramento). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas - RS, 2018.

Rice (*Oryza sativa*) is a staple food for more than half of the world population, a cause of concern, since its quality is being threatened by the accumulation of arsenic (As) in its grains. Arsenic is a highly toxic and carcinogenic metalloid. In nature, arsenic may be present as organic or inorganic forms. Inorganics such as arsenate and arsenite are considered to be significantly more toxic than organic ones. Among the factors that contribute to arsenic accumulation is the paddy rice cultivation system, which is the most common, since under anaerobic conditions the mobility and bioavailability of As(III) is favored. As(III) and silicon (Si) share the same carriers and OsLSI2, responsible for both Si and As(III) efflux, plays a fundamental role in the accumulation of this element. To mitigate the problem of exposure to As through rice consumption, new cultivars that absorb and accumulate lower amounts of this element must be developed. Thus, the objective of this work was to characterize rice genotypes for the accumulation of arsenic in grains and to perform the *OsLsi2* gene edition. The characterization of 93 rice genotypes of the japonica and indica subspecies were carried out in order to observe the accumulation of arsenic in both brown and polished (white) grains. The accumulation of arsenic in the grains were obtained through the use of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). The genotypes Basmati 370, BRS Querencia, EMPASC 101, EMPASC 104, EMPASC 105, IRGA 424 CL, IRAT 124, IRGA 420, Jasmine 85, SC 173, SC 460, SCS 112, SCS 117 CL, SCS 114 AndoSan and Tetep presented the lowest levels of arsenic and are indicated to be used in breeding programs to obtain genotypes with low accumulation of this element. To interrupt the efflux of arsenic in rice plants, the *OsLsi2* gene was edited. The CRISPR / Cas9 system was the tool used for the editing attempt. The transformation of the rice plants was indirectly made through infection by *Agrobacterium tumefaciens*. The CRISPR/Cas9:OsLsi2 construct was inserted into *Agrobacterium tumefaciens* and subsequently these were used to infect 310 mesocotyls. PCR will be tested 51 possibly transformed plants to confirm the insertion of the CRISPR/Cas9:OsLsi2 construct.

Keywords: *Oryza sativa*; As quantification; CRISPR/Cas9.

Lista de Figuras

Revisão bibliográfica

- Figura 1 - Rotas de absorção e metabolismo do arsênio em células de raízes de plantas de arroz. O arsenato – As(V) é absorvido via transportadores de fosfato (Pi). O arsenito – As(III) é absorvido via canais de aquaporinas. OsLsi2 é responsável pelo efluxo do As(III) em direção ao xilema. As(V) é reduzido a As(III) pela enzima arsenato redutase (AR). As(III) pode se complexar com fitoquelatinas (PCs) e ser transportado para os vacúolos através do transportador OsABCC1. MMA e DMA são também absorvidos pelo transportador OsLsi1 e o efluxo dessas formas de As é ainda desconhecida..22
- Figura 2 - Partes que compõem um grão de arroz.....25
- Figura 3 - No sistema CRISPR sequencias protoespaçadoras serão transcritas originando o crRNA. O crRNA se hibridiza com o tracrRNA, resultando no RNA guia (gRNA). O gRNA se complexa com a Cas9 para direcionar a clivagem da região do DNA que é complementar aos 20 nucleotídeos do gRNA e que se encontra ao lado de uma sequência PAM..29
- Figura 4 - Esquema da edição de genomas pelo sistema CRISPR/Cas9. A Cas9 direcionada pelo gRNA cliva a dupla fita do DNA alvo (DSB) desencadeando mecanismos de reparo. A DSB pode ser reparada por recombinação homóloga, que utiliza uma sequência homóloga a região que foi clivada, ou por recombinação não homóloga a qual gera *indels* na região clivada..30
- Figura 5 - Os mutantes homozigotos com os genomas editados e sem a inserção transgênica podem ser selecionados por autofecundação das plantas na geração GE₀. Na geração GE₁ são selecionadas as plantas que apresentam a edição, mas não a construção transgênica..31

Capítulo I - Identificação de genótipos de arroz com menor acúmulo de arsênio no grão

Figura 1 - Distribuição do teor de arsênio (ng g^{-1}) em grãos descascados de 93 genótipos de arroz.....37

Figura 2 - Distribuição do teor de arsênio (ng g^{-1}) em grãos polidos de 93 genótipos de arroz.37

Figura 3 - Correlação entre os genótipos de arroz no tratamento descascado e no tratamento polido para o teor de arsênio.....39

Capítulo II - Edição do gene *OsLsi2* visando menor acúmulo de arsênio em grãos de arroz

Figura 1 - Representação esquemática do plasmídeo utilizado para edição do gene *OsLsi2*. XbaI: sítio de restrição para a endonuclease XbaI. LB: left border – borda esquerda. Hygro: sequência do gene cuja proteína confere resistência ao antibiótico higromicina (na planta). 35S: promotor do *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) - promotor utilizado para o gene Hygro. EcoRI: sítio de restrição para a endonuclease EcoRI. WhU6: promotor do gene ubiquitina - promotor usado para o RNAguia. SgRNA: RNA guia. HindIII: sítio de restrição para a endonuclease HindIII. 35S: promotor para o gene *ZmCas9*. T7: promotor da enzima NheI. NheI: sítio de restrição NheI. *ZmCas9*: sequência gene *ZmCas9* que codifica a proteína Cas9. Stul: sítio de restrição para a endonuclease Stul. RB: *right border* - borda direita. XhoI: sítio de restrição para a endonuclease XhoI. Kan: sequência do gene cuja proteína confere resistência ao antibiótico canamicina (na bactéria). pUCori: Origem de replicação em *E. coli*. pVSori: origem de replicação em *Agrobacterium*.43

Figura 2 - Mesocótilos após a coleta: (a) imersos em solução bacteriana de <i>Agrobacterium</i> contendo o plasmídeo CRISPR/Cas9:OsLsi2; (b) secos em papel filtro estéril para retirada do excesso de solução bacteriana; (c) em placas de Petri com meio MS + acetoseringona (150 mg L ⁻¹).....	45
Figura 3 - Mesocótilos após o período de três dias de co-cultivo.....	46
Figura 4 - Amplificação da região U6-gRNA das colônias de <i>Agrobacterium</i> transformadas com a construção CRISPR/Cas9:OsLsi2. M: Marcador utilizado - LowDNA Mass Ladder. C+: controle positivo - amplificação plasmídeo. 1 e 8: DNA plasmidial das colônias. C-: controle negativo - água DEPC estéril.....	47
Figura 5 - Após seleção com higromicina (a) plantas não transformadas (b) plantas possivelmente transformadas.....	48
Figura 6 - Amplificação da região U6-gRNA das plantas de arroz infectadas com <i>Agrobacterium</i> . 1 ao 17: amostras de DNA plantas de arroz. C+: controles positivos - DNA plasmidial colônia 1 e colônia 8 respectivamente. C-: controle negativo - DNA de duas plantas selvagens da cultivar Nipponbare e água DEPC estéril..	48
Figura 7 - Plantas possivelmente transformadas em meio de regeneração.....	49

Lista de Tabelas

Capítulo II - Edição do gene *OsLsi2* visando menor acúmulo de arsênio em grãos de arroz

Tabela 1 - Iniciadores utilizados para a amplificação da região U6-gRNA.....44

Lista de Abreviaturas

ANA	Ácido naftalenoacético
AR	Arsenito Redutase
As	Arsênio
As(III)	Arsenito
As(III)-PC	Complexo arsenito-fitoquelatinas
As(OH) ₃	Ácido arsenioso
As(V)	Arsenato
AsB	Arsenobetaína
AsC	Arsenocolina
As-i	Arsênio inorgânico
BAP	6-benzyl amino purine
Cas9	do inglês <i>CRISPR associated nuclease 9</i>
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
CRISPR	do inglês <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat</i>
DMA(V)	Ácido Dimetilarsínico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSB	Do inglês <i>double strand break</i>
gRNA	RNA guia
HNO ₃	Ácido nítrico
IARC	do inglês <i>International Agency for Research on Cancer</i>
ICP-MS	Espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente
<i>Indels</i>	Inserções e deleções
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
Lsi1	Transportador de influxo de ácido silícico
Lsi2	Transportador do efluxo de silício
MIPs	Proteínas intrínsecas de membranas
MMA(V)	Ácido Monometilarsínico
MS	Meio de cultura Murashige-Skoog
NIPs	Proteínas tipo nodulina-26
OsLsi2	do inglês gene <i>Low silicon rice 2</i>
PAM	Motivo protoespaçador adjacente
PC	Fitoquelatinas
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pre-crRNA	Pré RNA não codificador
RH	Recombinação homóloga
RNA	Ácido ribonucleic
RNH	Recombinação não homóloga
Si(OH) ₄	Ácido silícico
tracrRNA	do inglês <i>trans-activating CRISPR RNA</i>
WHO	do inglês <i>World Health Organization</i>

Sumário

Resumo.....	8
Abstract.....	9
Lista de Figuras.....	10
Lista de Tabelas.....	13
Lista de Abreviaturas.....	14
Introdução geral	16
1. Revisão Bibliográfica	18
1.1. Arroz.....	18
1.2. Arsênio no arroz.....	19
1.3. Quantificação de arsênio em grãos de arroz.....	26
1.4. Sistema CRISPR/Cas9	27
2. Identificação de genótipos de arroz com menor acúmulo de arsênio no grão	33
2.1. Introdução	33
2.2. Material e Métodos.....	34
2.3. Resultados e Discussão.....	36
2.4. Conclusão	40
3. Edição do gene <i>OsLsi2</i> visando menor acúmulo de arsênio em grãos de arroz	41
3.1. Introdução	41
3.2. Material e métodos.....	43
3.3. Resultados	46
3.4. Considerações finais.....	49
Considerações gerais.....	50
Referências	52
Apêndices.....	62

Introdução geral

O arsênio (As) é um metaloide altamente tóxico e cancerígeno. A exposição a esse elemento pode levar ao desenvolvimento de diferentes tipos de câncer e ainda causar doenças que afetam o sistema respiratório, circulatório e neurológico. A contaminação por As pode ser oriunda de fontes antropogênicas e naturais, e até o presente momento foi evidenciado em diferentes países incluindo Argentina, Bangladesh, Bolívia, Brasil, Chile, China, Gana, Grécia, Índia, Japão, Coréia, México, Mongólia, Nepal, Nova Zelândia, Polônia, Taiwan, Vietnã e EUA. Entretanto, no Sudeste Asiático essa situação é ainda mais preocupante (KOMOROWICZ; BARAŁKIEWICZ, 2016; SYU et al., 2015).

As formas químicas de As presentes no solo podem variar. Sua especiação, solubilidade e biodisponibilidade podem ser afetadas pela condição redox, propriedades físico-químicas do solo, pH, matéria orgânica, textura do solo e pelos óxidos de Fe e Mn (LI et al., 2014). As principais espécies de As presentes no solo são as inorgânicas como o arsenato - As(V), predominante em ambientes aeróbicos, e como arsenito - As(III), presente em ambientes anaeróbicos. Formas orgânicas de As também podem ser encontradas, sendo o ácido dimetilarsínico - DMA(V) e o ácido monometilarsônico - MMA(V), as mais comuns (CHEN et al., 2017).

A exposição humana ao As pode ocorrer devido ao consumo de água e alimentos contaminados (YANG; ROSEN, 2016). O arroz é considerado o cereal com maior habilidade em captar e acumular As devido às condições de anaerobiose, característica de solos irrigados, que favorecem a mobilização e biodisponibilidade de As, e a utilização da via de absorção de silício, cujo elemento é altamente eficaz (CHEN et al., 2015). Diferentes genes codificam proteínas envolvidas no transporte do As (III) em arroz, porém, o gene *Low silicone rice 2* (*OsLsi2*) apresenta papel fundamental nesse processo, pois seu silenciamento resulta em drástica redução do acúmulo de As em grãos de arroz (MA et al., 2008).

A adoção de determinadas práticas de manejo e a obtenção de novos genótipos são formas que podem ser utilizadas para reduzir o acúmulo de As em grãos de arroz (ISLAM et al., 2016). Para o desenvolvimento de novos genótipos

podem ser empregadas técnicas de melhoramento clássico, através do cruzamento entre genitores e posterior seleção, ou técnicas de melhoramento moderno, por meio de ferramentas de biotecnologia, como transformação genética de plantas ou edição de genomas.

O passo inicial para o melhoramento clássico é a caracterização de um grupo de genótipos visando identificar genitores promissores para serem utilizados em cruzamentos direcionados. Uma ferramenta muito útil para a seleção de genótipos contrastantes quanto ao acúmulo de As é a espectrometria de massas, pois através dela é possível quantificar o teor de As nos grãos.

Por outro lado, ferramentas moleculares como a edição de genomas também podem ser utilizadas na obtenção de novos genótipos. A edição gênica pode gerar inserções, deleções ou substituições de nucleotídeos, resultando em perda, ganho ou mudança de função em genes alvo. No melhoramento genético de plantas esse mecanismo é explorado, principalmente para se atingir melhoria na resistência a estresses bióticos e abióticos e aperfeiçoar mecanismos fisiológicos. Dentre as diferentes técnicas de edição de genomas existentes, a tecnologia CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat*) - Cas9 (CRISPR-associated nuclease 9) vem se destacando como uma ferramenta revolucionária devido a sua possível aplicação em diferentes áreas da biologia (DING et al., 2016).

O sistema CRISPR/Cas9 pode ser utilizado como alternativa às ferramentas tradicionais de engenharia genética, com o objetivo de resolver situações biológicas não solucionadas por essas ferramentas, e para a maior aceitação de alimentos provenientes de plantas cujo genoma tenha sido editado (ARAKI; ISHII, 2015). Dessa forma, a utilização da tecnologia CRISPR/Cas9 para realizar a edição de genes envolvidos na absorção de As pode ser uma estratégia para o desenvolvimento de genótipos de arroz com menor acúmulo desse elemento no grão.

Além do desenvolvimento de genótipos com menor capacidade de absorver e acumular As nos grãos, pode-se utilizar o beneficiamento pós-colheita como uma estratégia prática e viável para reduzir a ingestão de As através do consumo de arroz. A distribuição do As nos grãos não é uniforme, sendo encontrada uma concentração até 20 vezes maior desse elemento nas partes mais externas. Sendo assim, o processo de remoção da casca e posterior polimento podem resultar na significativa redução dos teores de As (SOUZA et al., 2015).

Apesar da importância global do acúmulo de As em arroz, a maioria das pesquisas tem sido desenvolvidas em países como Bangladesh, Índia, China e Estados Unidos, com pouco foco em outras regiões (SEYFFERTH et al., 2014). Dentre as regiões pouco exploradas está o Brasil, nono produtor mundial de arroz, com uma produção de aproximadamente 12 mil toneladas na safra de 2016/2017 (CONAB, 2017), onde já foi observada a presença de As em amostras de arroz consumidas no país (CIMINELLI et al., 2017; MATAVELI et al., 2016).

Objetivo geral:

Caracterização de genótipos de arroz quanto ao acúmulo de arsênio em grãos e edição do gene *OsLsi2*.

Objetivos específicos:

- I. Identificar genótipos de arroz com menor acúmulo de As para utilização em cruzamentos direcionados.
- II. Redução da translocação de As em arroz através da edição do gene *OsLsi2*.

Hipótese:

Há variabilidade genética para acúmulo de As entre diferentes genótipos de arroz e a edição do gene *OsLsi2* resultará em menor acúmulo desse elemento no grão.

1. Revisão Bibliográfica

1.1. Arroz

O arroz faz parte do gênero *Oryza*, da subfamília Ehrhartoideae, da família Poaceae, e da tribo Oryzeae (NCBI taxonomy, 2018). O gênero *Oryza* é composto por 24 espécies, sendo apenas duas delas cultivadas, a *Oryza sativa* (arroz cultivado asiático) e a *Oryza glaberrima* (arroz cultivado africano) (KELLOGG, 2009). *O. sativa* é uma espécie anual, autógama, diploide com $x=12$ cromossomos ($2n=2x=24$ cromossomos), dividida em três subespécies (indica, japônica e javânica) (MENGUER; SPEROTTO; RICACHENEVSKY, 2017). É cultivada na Ásia, Europa, Américas e alguns países da África. Seu centro de origem é o sudeste asiático e sua domesticação ocorreu provavelmente no sul da Índia (MAGALHÃES JR; OLIVEIRA, 2008; MUTHAYYA et al., 2014).

O arroz é uma das culturas mais importantes do mundo tanto no âmbito econômico quanto social, sendo cultivado e consumido na Ásia, África, Europa, Américas e Oceania. Esse cereal é o alimento base da dieta de mais de três bilhões de pessoas e pode ser responsável por fornecer cerca de 20% das calorias e 15% das proteínas necessárias à dieta humana. A média mundial de consumo anual de arroz por pessoa é de 70kg. Nos países Asiáticos esse valor ultrapassa os 80kg. Na América Latina, o Brasil destaca-se como o maior consumidor do cereal (45 kg/pessoa/ano) (SOSBAI, 2016).

Os dez maiores países produtores de arroz são, em ordem decrescente: China, Índia, Indonésia, Bangladesh, Vietnã, Tailândia, Myanmar, Filipinas, Brasil e Japão. A área utilizada no cultivo do arroz é de aproximadamente 168 milhões de hectares e a produção prevista para safra 2017/2018 é de aproximadamente 483 milhões de toneladas (USDA, 2017). O Brasil é o maior produtor fora da Ásia, na safra de 2016/2017 a produção foi de 12 milhões de toneladas, sendo o Estado do Rio Grande do Sul responsável por 70% desse total (CONAB, 2017).

Aproximadamente 90% do arroz produzido no mundo é cultivado sob o sistema irrigado, no qual a cultura passa a maior parte do seu ciclo parcialmente submerso por uma lâmina d'água (GEISSELER; LINQUIST; LAZICKI, 2017). Essa condição favorece uma maior mobilização de As, o que facilita sua absorção pelas plantas de arroz (SOUZA et al., 2015). Além disso, fontes de água contaminadas com esse elemento vêm sendo utilizadas para irrigação da cultura, principalmente em países do sudeste Asiático (SRIVASTAVA et al., 2016). Sendo assim, a qualidade do arroz está ameaçada pela contaminação por As gerando um risco para a saúde humana (SEYFFERTH et al., 2014).

1.2. Arsênio no arroz

O arsênio (As) é o trigésimo terceiro elemento químico da tabela periódica com massa atômica 75. Devido as suas características físico-químicas é classificado como um ametal, porém no contexto toxicológico é considerado um metal pesado altamente prejudicial à saúde humana. Na crosta terrestre é o vigésimo elemento mais abundante, no mar é o décimo quarto e no corpo humano é o décimo segundo (JOMOVA et al., 2011; MANDAL; SUZUKI, 2002). Aproximadamente 245 minerais apresentam As em sua composição (BISSSEN; FRIMMEL, 2003). Este elemento também está presente na atmosfera, nos solos, na água, em sedimentos, bem como em organismos (BARRA et al., 2000).

O As pode ser encontrado em diferentes formas químicas. O arsenito – As(III) é a forma mais tóxica de As e juntamente com o arsenato – As(V) fazem parte das espécies inorgânicas. Ambos são considerados significativamente mais tóxicos que as formas orgânicas compostas pelo ácido monometilarsônico - MMA(V), ácido dimetilarsínico - DMA(V), arsenobetaína - AsB e arsenocolina - AsC. As espécies inorgânicas podem ser aproximadamente 100 vezes mais tóxicas que as orgânicas (AHMED BAIG et al., 2010).

As fontes mais comuns de As no meio ambiente são de origem natural como rochas vulcânicas, rochas sedimentares marinhas e combustíveis fósseis (carvão e petróleo) (O'REILLY et al., 2010). Atividades antropogênicas como o uso de agrotóxicos e fertilizantes que apresentam As em sua composição, irrigação com água contaminada, descarte de resíduos industriais, atividades de mineração e

fundição de determinados minerais também podem levar ao aumento dos níveis de As no ambiente (BISSSEN; FRIMMEL, 2003; KOMOROWICZ; BARAŁKIEWICZ, 2016).

Devido à alta toxicidade, os compostos inorgânicos de As (As-i) são classificados como potenciais carcinógenos de classe 1, não havendo um limiar abaixo do qual não sejam nocivos à saúde humana (CHEN et al., 2016; MONDAL; POLYA, 2008). A exposição prolongada, principalmente às formas inorgânicas de As, além de poder levar ao desenvolvimento de diferentes tipos de câncer, como o de pele, bexiga, pulmão e rins, também pode ocasionar desordens cardiovasculares, neurológicas, renais e respiratórias (SAHOO; KIM, 2013). Quando os compostos de As entram na corrente sanguínea, rapidamente são distribuídos em diferentes tecidos do corpo, podendo se acumular no fígado e nos rins. Após um período de exposição ao As, formas inorgânicas podem ser encontradas acumuladas em maior concentração em cabelos, unhas e ossos (SOUZA et al., 2015). Como uma forma de tentar contornar a contaminação por As o organismo realiza a biometilação que consiste em converter o As inorgânico em As orgânico, o qual é eliminado através da urina, porém uma parte considerável do arsênio ainda fica retida no corpo não sendo eliminada (CULLEN, 2014; MONDAL; POLYA, 2008; SAKURAI, 2003).

Os problemas causados pela contaminação por As vêm ocorrendo em diferentes países do mundo incluindo Argentina, Bangladesh, Bolívia, Brasil, Chile, China, Gana, Grécia, Índia, Japão, Coreia, México, Mongólia, Nepal, Nova Zelândia, Polônia, Taiwan, Vietnã e EUA (AWASTHI et al., 2017; SAHOO; KIM, 2013). Entretanto, no Sudeste Asiático, como Bangladesh e alguns estados da Índia essa situação é ainda mais grave. Nesses locais, fontes de águas utilizadas para o consumo humano e irrigação de culturas destinadas à alimentação apresentam altas concentrações de As (BRAMMER; RAVENSCROFT, 2009).

As principais fontes de exposição humana ao As são o consumo de água e alimentos contaminados (YANG; ROSEN, 2016). A concentração de As encontrada em fontes de água podem variar entre $0,5\mu\text{g.L}^{-1}$ e $5.000\mu\text{g.L}^{-1}$. Entretanto, o limite permitido recomendado pela WHO (*World Health Organization*) é de $10\mu\text{g.L}^{-1}$ de As inorgânico. Estudos realizados mostraram que a água consumida por milhões de pessoas que vivem no sudeste Asiático pode apresentar uma concentração 10 vezes maior de As-i que o permitido (FERNÁNDEZ-LUQUEÑO et al., 2013; MEMON et al., 2016; RAHAMAN et al., 2013).

O arroz é considerado uma das maiores fontes alimentares de contaminação por As, especialmente nos países em que ele é o alimento básico da dieta. Os grãos de arroz podem apresentar uma concentração até 10 vezes maior de As que outros cereais como o milho, o trigo e a aveia (CHEN et al., 2017; SOHN, 2015). O alto teor de As encontrado no arroz pode ser devido a diferentes fatores, incluindo: (i) utilização de água contaminada com As para irrigação (LIN et al., 2013; MCCARTY; HANH; KIM, 2011), (ii) condições de hipoxia e anaerobiose características de solos alagados que influenciam na disponibilidade e especiação do As (LI et al., 2009b; ZHANG et al., 2015) e (iii) o arroz é um hiperacumulador de silício e a absorção desse elemento ocorre através de canais de aquaporinas, os quais são responsáveis também pela absorção de As(III) (SRIVASTAVA et al., 2016; ZHAO; MCGRATH; MEHARG, 2010).

No sistema convencional de cultivo, o arroz fica parcialmente coberto por uma lâmina de água durante grande parte do seu ciclo. Em muitos locais, a água utilizada para a irrigação da cultura está contaminada com As, e esse processo intensifica a concentração desse elemento na camada superficial do solo, levando ao aumento da sua disponibilidade para ser absorvido pelas plantas (LIN et al., 2013; SHARMA et al., 2014). O arsenito é a forma predominante de As encontrado em solos alagados. A presença de lâmina de água durante o cultivo do arroz promove uma condição de anaerobiose. Esse tipo de ambiente favorece a redução de arsenato em arsenito (ABEDIN; CRESSER, 2002).

As formas químicas do As diferem no grau de toxidez e na maneira em que são absorvidas pelas plantas de arroz. O As(V) é absorvido da solução do solo por meio de transportadores de fosfato de alta afinidade (BAKHAT et al., 2017; CATARECHA et al., 2007; WU et al., 2011). O arsenato é um análogo químico do fosfato, ou seja, apresentam estrutura química semelhante, por isso compartilham o mesmo canal transportador para serem absorvidos (KAMIYA et al., 2013).

Os transportadores de fosfato identificados em arroz, por serem responsáveis pela entrada de arsenato nas células, são os produtos dos genes *OsPT1* (*PHOSPHATE TRANSPORTER 1*) (KAMIYA et al., 2013) e o *OsPT8* (*PHOSPHATE TRANSPORTER 8*) (WU et al., 2011) (Figura 1). A proteína codificada por *OsPT1* é responsável tanto pela absorção quanto pela translocação do As(V) da raiz para a parte aérea em plantas de arroz. As proteínas codificadas pelos genes *OsPHF1* (*PHOSPHATE TRANSPORTER TRAFFIC FACILITATOR 1*) e *OsPHR2*

(*PHOSPHATE STARVATION RESPONSE 2*) são facilitadores do transporte de fosfato e também estão associadas ao processo de absorção e transporte de As(V) (AWASTHI et al., 2017). Foi reportado que a diminuição da expressão do gene *OsPT1*, pode reduzir em até 60% a absorção de As(V) em plântulas da cultura e a superexpressão do gene *OsPT8* aumenta significativamente a absorção de As(V) (KAMIYA et al., 2013; WANG et al., 2016; WU et al., 2011).

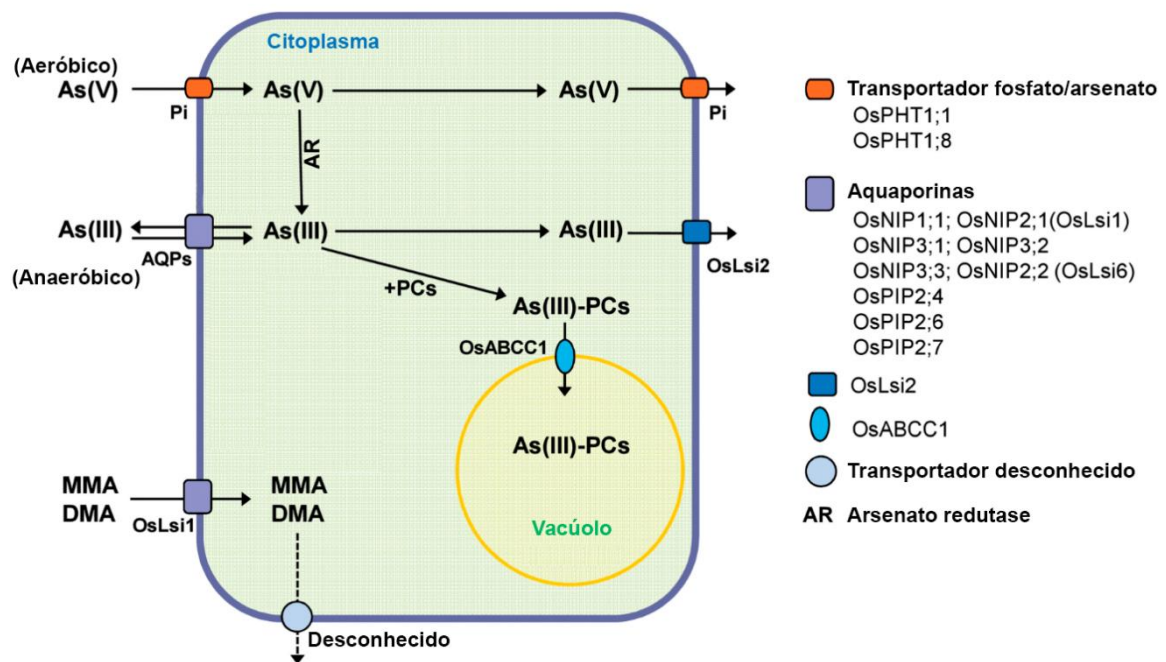


Figura 1 - Rotas de absorção e metabolismo do arsênio em células de raízes de plantas de arroz. O arsenato – As(V) é absorvido via transportadores de fosfato (Pi). O arsenito – As(III) é absorvido via canais de aquaporinas. OsLsi2 é responsável pelo efluxo do As(III) em direção ao xilema. As(V) é reduzido a As(III) pela enzima arsenato redutase (AR). As(III) pode se complexar com fitoquelatinas (PCs) e ser transportado para os vacúolos através do transportador OsABCC1. MMA e DMA são também absorvidos pelo transportador OsLsi1 e o efluxo dessas formas de As é ainda desconhecida. Fonte: Adaptado de LI; WANG; SONG, 2016.

No citosol o As(V) pode ser reduzido a As(III) pela ação da enzima arsenato redutase (AR) (CHAO et al., 2014) (Figura 1). Em arroz foram identificadas três arsenato redutases, codificadas pelos genes *OsHAC1;1* (*Sulfurtransferase 5*), *OsHAC1;2* (*Sulfurtransferase 6*) (SHI et al., 2016), e *OsHAC4* (*Sulfurtransferase 8*) (XU et al., 2017). Após haver a reação de redução o As(III) é complexado pelas fitoquelatinas (PC). Isso ocorre devido à alta afinidade entre o As(III) e radical sulfidríla (-SH) do grupamento tiol presente nas fitoquelatinas (CHEN et al., 2016). O complexo As(III)-PC é sequestrado pelo vacúolo por meio do transportador

codificado pelo gene *OsABCC1* (Figura 1). Quando o As(III) é retido no vacúolo das células das raízes e folhas, há uma significativa redução na quantidade de As(III) disponível para ser translocado até os grãos (SONG et al., 2014).

O arsenito é absorvido através de proteínas intrínsecas de membrana (MIPs), também denominadas canais de aquaporinas presentes nas células das raízes do arroz. Mais especificamente, através do transportador de influxo de ácido silícico Lsi1 (codificado pelo gene *OsNIP2;1*, também denominado *OsLsi1*), uma proteína tipo nodulina-26 (NIPs) que pertence à família das MIPs (MOSA et al., 2012; XU et al., 2015). A nomenclatura arsenito, refere-se a um oxiânion, entretanto na solução do solo a forma predominante de As(III) é como ácido arsenioso – $\text{As}(\text{OH})_3$, uma molécula neutra não dissociada (ZHAO et al., 2009). O As(III) e o ácido silícico – $\text{Si}(\text{OH})_4$, partilham da mesma via de absorção, pois os dois se encontram como moléculas neutras não dissociadas, têm valores de pKa elevados (9,2 e 9,3 para ácido arsenioso e ácido silícico, respectivamente) e suas moléculas apresentam tamanho e forma semelhante, ambas tetraédricas (MA; YAMAJI, 2006).

Além da Lsi1, as proteínas codificadas pelos genes *OsNIP1;1* (*NOD26 like intrinsic protein 1;1*), *OsNIP2;2* (*Low silicon rice 6*), *OsNIP3;1* (*NOD26 like intrinsic protein 3;1*), *OsNIP3;2* (*NOD26 like intrinsic protein 3;2*) e *OsNIP3;3* (*NOD26-like intrinsic protein 3-3*) também da subfamília das NIPs, apresentam permeabilidade para As(III). Porém, a eficiência de absorção de As(III) por elas é significativamente menor quando comparadas com a Lsi1 (BIENERT et al., 2008; MA et al., 2008). Da mesma forma, as proteínas codificadas pelos genes *OsPIP2;4* (*Plasma membrane intrinsic protein 2;4*), *OsPIP2;6* (*Plasma membrane intrinsic protein 2;6*) e *OsPIP2;7* (*Plasma membrane intrinsic protein 2;7*) pertencentes a outra subfamília das aquaporinas também desempenham um papel secundário na absorção de As(III) (MOSA et al., 2012) (Figura 1).

No interior das células o As(III) é transportado para o xilema por uma proteína transportadora de efluxo de silício denominada Lsi2, um possível transportador de aníons. As proteínas Lsi1 e Lsi2 estão localizadas na membrana plasmática de células da endoderme e exoderme das raízes, onde ocorrem as estrias de Caspary. Lsi1 e Lsi2 diferem apenas na localização polar, enquanto a Lsi1 localiza-se no lado distal (externo) da membrana plasmática a Lsi2 está no lado proximal (interno) (MA et al., 2006, 2007, 2008). A disposição diferencial de Lsi1 e Lsi2 nas células facilita o transporte de As entre células e tecidos (MA et al., 2007)

(Figura 1). Portanto, a função conjunta dessas duas proteínas produz um fluxo eficiente de Si e As(III), desde a absorção pelas raízes, condução em direção ao xilema até a translocação para outros tecidos da planta (CHEN et al., 2017; ZHAO; MCGRATH; MEHARG, 2010).

Estudos feitos por Ma et al. (2008), para identificar a função dos genes *Lsi1* e *Lsi2* relacionada ao influxo e efluxo de As(III), revelaram que um mutante de arroz para o gene *Lsi1* apresentou redução de 60% no influxo de As(III) a curto prazo, quando comparado com seu tipo selvagem, porém não houve diferença significativa na concentração de As nos grãos provenientes da linhagem *Lsi1*. Em contrapartida, mutações para *Lsi2* demonstraram diminuição dos teores de As no xilema e nos grãos das linhagens mutantes. Dessa forma, mesmo que a perda de função do gene *OsLsi1* influencie na absorção de As(III), o efluxo do mesmo em direção ao xilema mediado pela proteína codificada pelo gene *OsLsi2* é determinante para controlar o acúmulo de As nos grãos de arroz (ZHAO et al., 2009).

O arsenito é a espécie de As predominante em solo alagados, porém através da ação de microrganismos o As(III) pode ser transformado em formas metiladas como o ácido monometilarsônico - MMA(V) e ácido dimetilarsínico - DMA(V) (HUANG, 2014). Ainda são poucos os estudos relacionados à absorção de formas orgânicas de As, o que já se sabe é que o MMA(V) e o DMA(V) também são absorvidos pelas proteínas tipo nodulina-26 (NIPs), porém de forma menos eficiente que o As(III) (BAKHAT et al., 2017; LI et al., 2009a). Embora a absorção de MMA e DMA seja menor, a translocação das espécies orgânicas das raízes até a parte aérea é mais eficiente (RAAB et al., 2007). Estudos sobre a translocação de espécies metiladas para os grãos de arroz evidenciaram que o DMA é translocado com uma eficiência dez vezes maior que as espécies inorgânicas de As. Além disso, o DMA apresenta maior mobilidade através do xilema e floema que o As(III) (CAREY et al., 2010; RAAB et al., 2007).

O principal problema da contaminação por As no arroz é o acúmulo desse elemento nos grãos. Enquanto o xilema é responsável por transportar As para as partes vegetativas, é por meio do floema que o As chega até os grãos (SONG et al., 2014; YAMAJI; MA, 2011). Carey et al. (2010), analisaram o transporte das duas formas predominantes de As em grãos, As(III) e DMA, durante o desenvolvimento da cariopse do arroz através do fornecimento dessas duas fontes de As em solução para panículas cortadas. Quando a haste da panícula foi bloqueada o transporte via

floema ficou comprometido levando a uma redução de 55% e 90% dos teores de DMA e As(III), respectivamente. Isso evidencia a importância do floema no transporte de As para os grãos (AWASTHI et al., 2017; CAREY et al., 2010; SONG et al., 2014).

A distribuição de As nas diferentes estruturas que compõem os grãos de arroz não segue um padrão uniforme. A casca e o farelo (camada compreendida entre o pericarpo e a capa de aleurona), camadas mais externas, apresentam maiores concentrações de As que o endosperma (Figura 2). Além disso, as espécies orgânicas e inorgânicas também apresentam um padrão diferenciado de distribuição. Enquanto o As(III) é a principal forma encontrada no farelo, no endosperma o DMA é a espécie de As predominante (LOMBI et al., 2009; SUN et al., 2008; ZHENG et al., 2011). Entretanto, até o momento não se sabe quais são as proteínas responsáveis pelo transporte do As entre as diferentes estruturas dos grãos (PUNSHON et al., 2017).

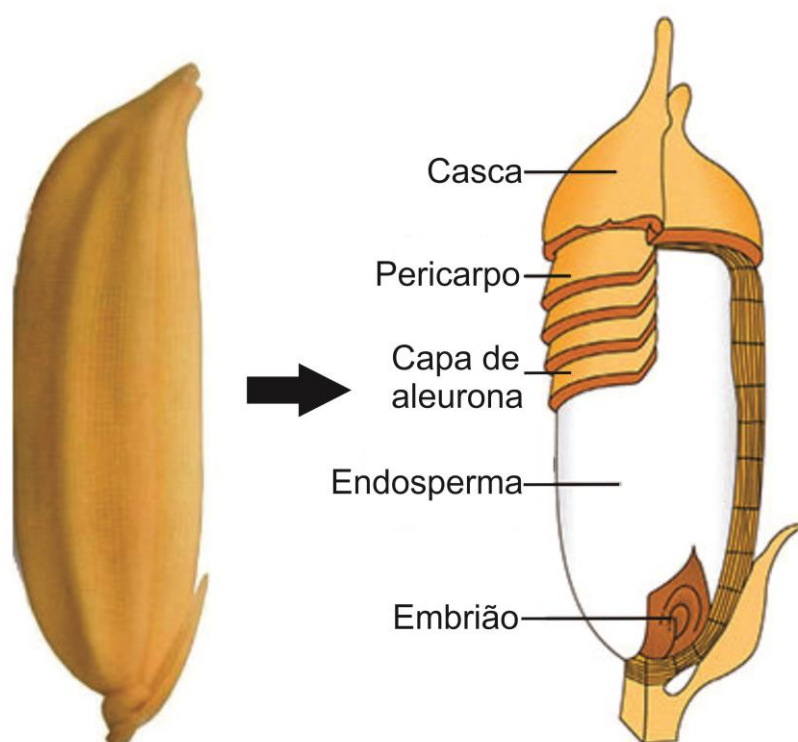


Figura 2 - Partes que compõem um grão de arroz. Fonte: Adaptado de JULIANO, 1984.

O padrão de acúmulo de As nos grãos pode ser influenciado pelo genótipo, por fatores fisiológicos, local onde a planta é cultivada e o método de beneficiamento utilizado nos grãos na pós-colheita (BAKHAT et al., 2017). O arroz integral, aquele

que é apenas descascado, apresenta maiores teores de As que o arroz tipo branco, que além de descascado é também polido (CIMINELLI et al., 2017; LOMBI et al., 2009; NORTON et al., 2013; TORRES-ESCRIBANO et al., 2008). Além disso, o arroz pode ser parcialmente cozido antes de sofrer qualquer processamento para absorver os nutrientes contidos na casca, nesse caso, o As também pode ser absorvido durante esse processo. Consequentemente, o arroz parboilizado pode conter maiores concentrações de As que o arroz tipo branco ou integral não parboilizados (CIMINELLI et al., 2017).

A diminuição do acúmulo de As em grãos de arroz pode ser obtida através da utilização de práticas específicas de manejo e pelo desenvolvimento de novos genótipos (AWASTHI et al., 2017; WU et al., 2015). Para obtenção de genótipos pode-se utilizar técnicas de melhoramento, ou seja, seleção de genótipos que apresentem baixo teor de As, utilização destes como genitores em cruzamentos, seguido de seleção. Entretanto, o tempo necessário para atingir o objetivo por meio desse método é longo. Uma alternativa para reduzir o tempo para a obtenção de genótipos é a utilização de técnicas de melhoramento moderno, como a transformação genética de plantas ou a edição de genomas. O sistema CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeat*)-Cas9 (CRISPR-associated nuclease 9) é uma das técnicas de edição de genomas que pode ser empregada no desenvolvimento de genótipos com menor acúmulo de As nos grãos.

1.3. Quantificação de arsênio em grãos de arroz

A ingestão de arroz vem sendo considerada a maior fonte alimentar de contaminação por As. O limite de As em grãos de arroz permitido pela Organização Mundial da Saúde – OMS (*World Health Organization* – WHO) é de 1 mg Kg⁻¹ de arsênio total e de 0,2 mg kg⁻¹ de As-i. Em amostras coletadas em diversos países foram encontrados valores bem acima dos limites recomendados, inclusive no Brasil (SURIYAGODA; DITTERT; LAMBERS, 2018).

Uma ferramenta que vem sendo largamente utilizada para quantificar o As presente em grãos de arroz é a espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS). Essa técnica utiliza etiquetas elementares adequadas para rotular biomoléculas alvo, podendo ser utilizada para quantificação de várias

biomoléculas, incluindo proteínas, DNA, bactérias, células, vírus e elementos químicos, com alta precisão (LIU et al., 2017).

O uso da ICP-MS vem se mostrando eficiente na detecção de arsênio em alimentos e água (JACKSON; PUNSHON, 2015; KOMOROWICZ; BARAŁKIEWICZ, 2016). No entanto, para análises de especiação desse elemento é necessária a utilização de técnicas cromatográficas acopladas ao ICP-MS, como a cromatografia líquida de alta resolução (HPLC). Em arroz, análises em HPLC-ICP-MS possibilitam a quantificação de As orgânico (MMA e DMA) e inorgânico [(As(V) e As(III)], demonstrando os níveis desse elemento em grãos provenientes de diferentes genótipos e regiões (KIM et al., 2013; MAHER et al., 2017; NARUKAWA et al., 2015; NOOKABKAEW et al., 2013).

1.4. Sistema CRISPR/Cas9

O sistema CRISPR/Cas9, é proveniente do sistema imune de bactérias e arqueas e nesses microrganismos tem como função detectar e degradar DNA invasor oriundo de vírus e plasmídeos (BARRANGOU et al., 2007; DOUDNA; CHARPENTIER, 2014). A clivagem do DNA é feita pela endonuclease Cas9, guiada por um curto RNA que parecia com uma pequena sequência do DNA alvo. Esse mecanismo de ação permite que o sistema CRISPR/Cas9 seja empregado para introduzir modificações específicas em genomas de procariotos e eucariotos (ESTRELA; CATE, 2016; JIANG et al., 2013; NISSIM et al., 2014).

O acrônimo CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) significa Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas. O loco CRISPR é formado por uma série de curtas sequencias palindrômicas de 21 a 48 pares de bases, regularmente espaçadas por sequencias variáveis de 26 a 72 pares de bases, de origem extracromossômica ou plasmidial (*spacers*) e por genes *Cas* (*CRISPR-associated proteins*) (DEVEAU; GARNEAU; MOINEAU, 2010; DOMINGUEZ; LIM; QI, 2016; KIM et al., 2013).

Existem três tipos de sistema CRISPR/Cas9. Nos tipos I e III, encontrados em bactérias e arqueas, a sequência de DNA exógena é clivada a partir da ação de múltiplas proteínas Cas que se complexam com RNA CRISPR formando ribonucleoproteínas. Já no sistema do tipo II, presente apenas em bactérias, a Cas9

guiada por um rna guia (Grna) é a única proteína necessária para realizar a quebra da cadeia dupla de DNA (MAKAROVA et al., 2011; SONTHEIMER; BARRANGOU, 2015). A tecnologia CRISPR/Cas9 utilizada na edição genômica, originou-se do sistema CRISPR/Cas do tipo II derivado da bactéria *Streptococcus pyogenes* (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014; GASIUNAS et al., 2012).

Para que a edição ocorra, primeiramente o loco CRISPR é transcrito em um pré RNA não codificador (pre-crRNA) que é hibridizado com outro RNA não codificante chamado *trans-activating* CRISPR RNA (tracrRNA), formando uma cadeia dupla de RNA. Esse RNA fita dupla é processado pela RNaseIII e convertido em uma molécula híbrida denominada RNA guia (gRNA), responsável por direcionar a nuclease Cas9 (ESVELT et al., 2013; JINEK et al., 2012; KHATODIA et al., 2016). A extremidade 5' do gRNA é formada por 20 nucleotídeos que se ligam através da ação da Cas9, pelo processo comum de pareamento de bases DNA-RNA, em uma sequência alvo. A jusante da sequência do DNA alvo está localizado um motivo protoespaçador adjacente (PAM) NGG, no qual N pode ser qualquer nucleotídeo seguido por duas guaninas (Figura 3) (SANDER; JOUNG, 2014).

A quebra da dupla fita do DNA (DSB) alvo é possível devido aos domínios enzimáticos presentes na estrutura da Cas9. O domínio HNH é responsável por clivar a fita complementar a sequência de 20 nucleotídeos do RNA guia, enquanto o domínio RuvC faz a clivagem da fita não complementar (JINEK et al., 2014; SHUI et al., 2016). Em resposta a quebra da dupla fita de DNA a célula ativa mecanismos de reparo por recombinação homóloga – RH (*homology directed repair*) ou por recombinação não homóloga – RNH (*nonhomologous end-joining*).

Em plantas existem três aplicações do sistema CRISPR/Cas9 para a edição de genomas. A primeira delas é quando a DSB gerada pela Cas9 é reparada por recombinação não homóloga. Nesse caso, há formação de *indels* (inserções ou deleções de bases), que podem alterar a ordem de leitura das trincas no momento da tradução. Essas *indels* podem se inserir em regiões codificadoras de genes ou em regiões promotoras, levando ao impedimento da produção de proteínas ou resultando na produção de proteínas truncadas (Figura 4). A segunda ocorre quando o reparo da DSB é feito por recombinação homóloga. Para que possa haver a recombinação, juntamente com a Cas9 e o gRNA é introduzido um curto DNA alvo de reparo contendo a sequência homóloga da região afetada (Figura 4). Esse tipo de mecanismo pode resultar em mutações pontuais por substituição, ou inserção de

transgene alvo e rearranjo do gene (DING et al., 2016; KHATODIA et al., 2016; YIN; KAUFFMAN; ANDERSON, 2017). A terceira categoria é largamente utilizada para estudar relações epistáticas em vias gênicas. Para isso, são feitas múltiplas edições em diferentes sítios do genoma utilizando a Cas9 e múltiplos gRNAs (XING et al., 2014).

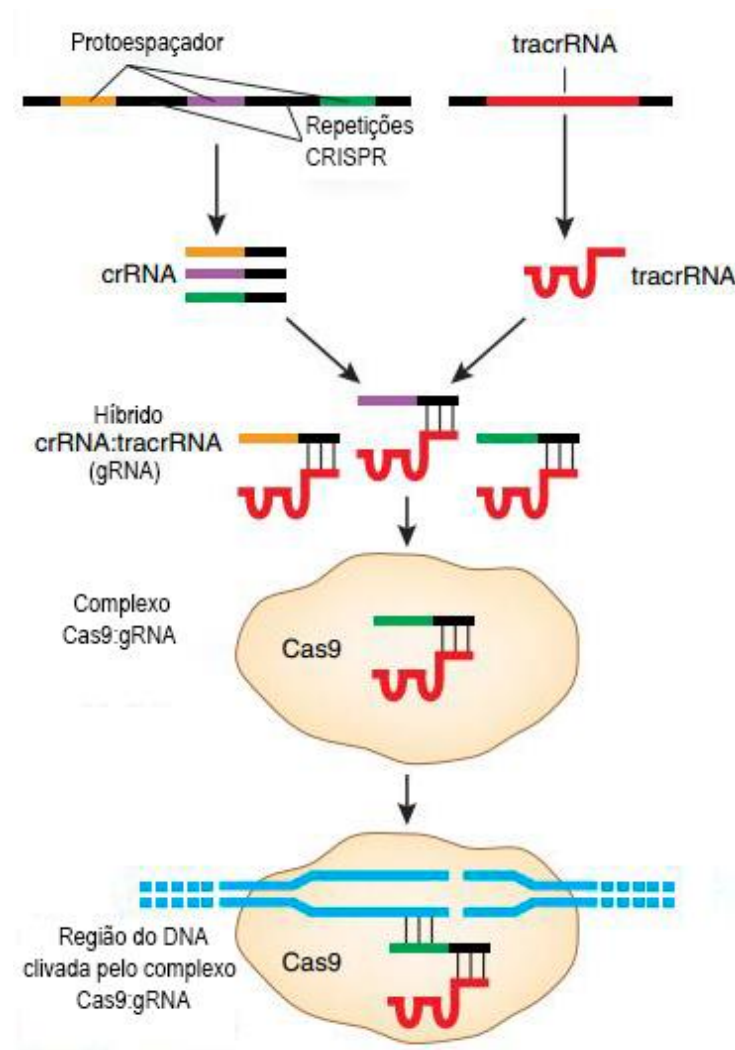


Figura 3 - No sistema CRISPR sequências protoespaçadoras serão transcritas originando o crRNA. O crRNA se hibridiza com o tracrRNA, resultando no RNA guia (gRNA). O gRNA se complexa com a Cas9 para direcionar a clivagem da região do DNA que é complementar aos 20 nucleotídeos do gRNA e que se encontra ao lado de uma sequência PAM. Fonte: Adaptado de SANDER et al., 2014.

Em plantas existem três aplicações do sistema CRISPR/Cas9 para a edição de genomas. A primeira delas é quando a DSB gerada pela Cas9 é reparada por recombinação não homóloga. Nesse caso, há formação de *indels* (inserções ou deleções de bases), que podem alterar a ordem de leitura das trincas no momento

da tradução. Essas *indels* podem se inserir em regiões codificadoras de genes ou em regiões promotoras, levando ao impedimento da produção de proteínas ou resultando na produção de proteínas truncadas (Figura 4). A segunda ocorre quando o reparo da DSB é feito por recombinação homóloga. Para que possa haver a recombinação, juntamente com a Cas9 e o gRNA é introduzido um curto DNA alvo de reparo contendo a sequência homóloga da região afetada (Figura 4). Esse tipo de mecanismo pode resultar em mutações pontuais por substituição, ou inserção de transgene alvo e rearranjo do gene (DING et al., 2016; KHATODIA et al., 2016; YIN; KAUFFMAN; ANDERSON, 2017). A terceira categoria é largamente utilizada para estudar relações epistáticas em vias gênicas. Para isso, são feitas múltiplas edições em diferentes sítios do genoma utilizando a Cas9 e múltiplos gRNAs (XING et al., 2014).

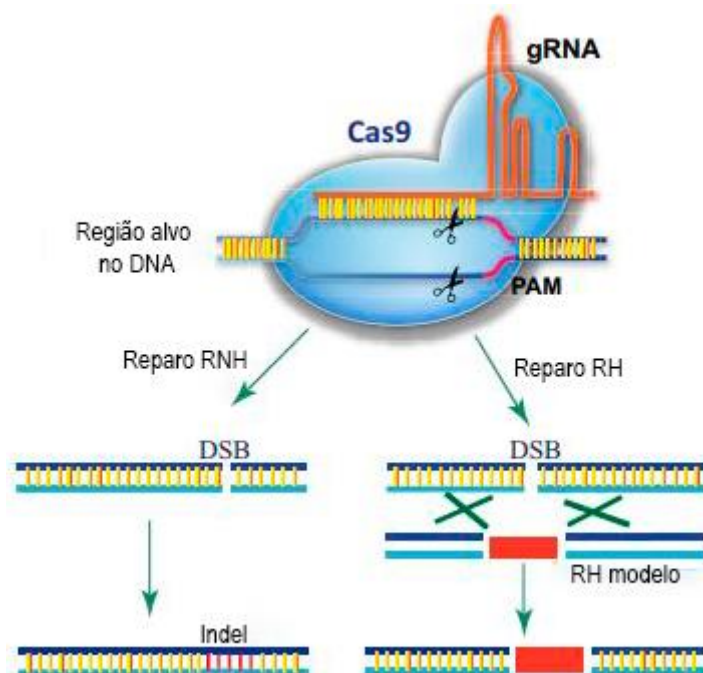


Figura 4 - Esquema da edição de genomas pelo sistema CRISPR/Cas9. A Cas9 direcionada pelo gRNA cliva a dupla fita do DNA alvo (DSB) desencadeando mecanismos de reparo. A DSB pode ser reparada por recombinação homóloga, que utiliza uma sequência homóloga a região que foi clivada, ou por recombinação não homóloga a qual gera *indels* na região clivada. Fonte: Adaptado de DING et al., 2016.

O método mais utilizado para introduzir o sistema CRISPR/Cas9 em genomas é através da utilização de vetores plasmidiais (DING et al., 2016). Estes são compostos do cassete de expressão contendo, de maneira geral, a sequência codificadora da Cas9 e do gRNA. Os plasmídeos podem ser transferidos para as

células vegetais através de transformação mediada por *Agrobacterium*, eletroporação de protoplastos e bombardeamento (biobalística) (ZHANG et al., 2017).

O sistema CRISPR/Cas9 é uma alternativa às outras técnicas normalmente empregadas pela engenharia genética. Com a utilização do CRISPR/Cas9 é possível resolver situações biológicas que não são solucionadas por essas técnicas. Além disso, alimentos que são oriundos de plantas que tiveram seus genomas editados através do sistema CRISPR/Cas9 apresentam maior aceitação. Isso acontece, pois, levando em consideração a regulamentação que caracteriza um organismo geneticamente modificado o produto final oriundo de uma planta editada através do CRISPR/Cas9 pode não se enquadrar como um transgênico (ARAKI; ISHII, 2015).

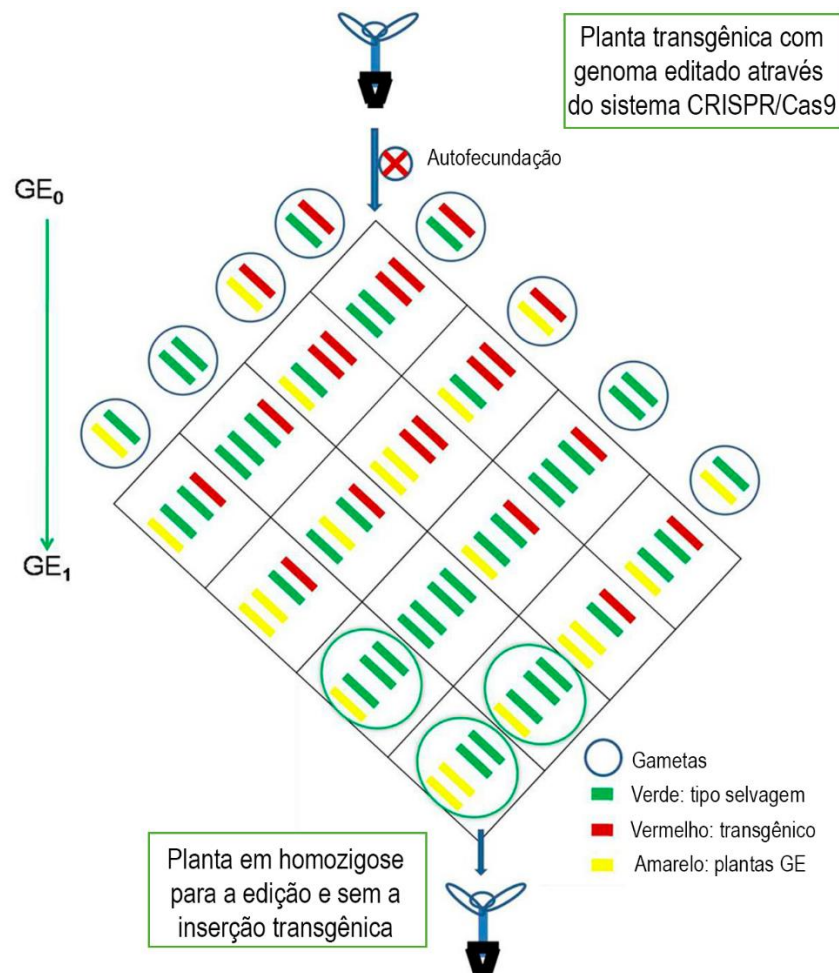


Figura 5 - Mecanismo de eliminação do transgenes da planta editada. Os mutantes homozigotos com os genomas editados e sem a inserção transgênica podem ser selecionados por autofecundação das plantas na geração GE₀. Na geração GE₁ são selecionadas as plantas que apresentam a edição, mas não a construção transgênica. Adaptado de KHATODIA et al., 2016.

Durante o processo de melhoramento genético, o cassete de expressão contendo o gRNA e a Cas9 é inserido no genoma da planta para que seja feita a edição do gene alvo. Após ocorrer a edição, a construção contendo as sequências exógenas pode ser removida devido a segregação, dessa forma a planta segue apenas com a mutação e sem a inserção transgênica. Para que isso ocorra, primeiramente é selecionada uma planta mutante (GE_0) que seja heterozigota (Cc) para a presença da construção e homozigota (EE) ou heterozigota (Ee) para a edição. Esta então é autofecundada podendo gerar plantas GE_1 editadas, mas sem presença da construção (Figura 5) (KHATODIA et al., 2016).

Capítulo I

2. Identificação de genótipos de arroz com menor acúmulo de arsênio no grão

2.1. Introdução

O arsênio (As) é um metaloide tóxico classificado pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) como um carcinógeno de classe 1 (CHEN et al., 2016). A frequente exposição a esse elemento pode levar ao desenvolvimento de graves doenças como câncer de pele, rim e pulmão (JOSEPH; DUBEY; MCBEAN, 2015). Nos últimos anos o número de pessoas intoxicadas pelo As devido à ingestão de alimentos e água contaminados aumentou significativamente no Sul e Sudeste da Ásia, especialmente na Índia, Bangladesh, Vietnã e China. Nesses países, fontes de água subterrâneas são usadas para o consumo e para a irrigação do arroz, as quais apresentam altas concentrações de As, trazendo riscos à saúde humana (CHEN et al., 2016; SHARMA; SINGH; SIDDIQI, 2014). No Brasil, embora o problema ainda não seja grave como nesses países, já foram encontradas amostras de arroz (*Oryza sativa* L.), consumidas pela população, com significativos teores de As (CIMINELLI et al., 2017).

O arroz é considerado a principal fonte alimentar de contaminação por As, pois além de ser o alimento básico da dieta de mais da metade da população mundial é o cereal com maior eficiência em absorver esse elemento (AWASTHI et al., 2017). As plantas podem acumular formas orgânicas e inorgânicas de As e sua toxicidade depende da especiação química em que ele se encontra. O arsenato - As(V) e o arsenito - As(III) são formas inorgânicas e significativamente mais tóxicas que o ácido monometilarsônico – MMA(V) e o ácido dimetilarsínico – DMA(V) (espécies orgânicas) (LI et al., 2009b). O As(III) e o As(V) representam aproximadamente 50% do As presente nos grãos de arroz (MEHARG et al., 2009). Esse acúmulo está associado com as condições em que a planta é cultivada, sendo

em anaerobiose o As(III) a principal forma encontrada. Solos inundados favorecem a mobilização desse íon devido a sua alta solubilidade. Sendo assim, ele é absorvido mais facilmente pelas raízes e translocado posteriormente para outras partes da planta (HUANG; HU; DECKER, 2011).

O arroz pode acumular As em diferentes órgãos e tecidos da planta, entretanto, a maior preocupação em relação à questão do conceito de alimento seguro é com o teor de As encontrado nos grãos, já que é a parte destinada ao consumo. O As não apresenta distribuição uniforme nas diferentes partes do grão, pois a casca e o farelo podem conter até dez vezes mais As que o endosperma (LIN et al., 2013; SMITH et al., 2008). Durante o beneficiamento a retirada somente da casca origina o arroz integral. Já o arroz do tipo branco é obtido quando o grão é descascado e polido, o que consiste na remoção do farelo, camada que compreende o pericarpo e a aleurona e está localizada entre a casca e o endosperma. De maneira geral, o arroz integral apresenta maiores quantidades de As que o tipo branco polido.

A utilização de genótipos que tenham teores reduzidos de As é fundamental para mitigar os problemas de contaminação, já que a capacidade de absorver e acumular As pode variar entre genótipos de arroz (SOHN, 2014). Dessa forma, se faz necessário a identificação e seleção de genótipos que tenham capacidade de acumular menos As nos grãos. Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo quantificar o acúmulo de As nos grãos de diferentes genótipos de arroz submetidos a dois tipos de beneficiamento, e identificar quais apresentam menor acúmulo para posterior utilização em cruzamentos visando à obtenção de genótipos com menor teor desse elemento.

2.2. Material e Métodos

Foram avaliados 93 genótipos de arroz (*Oryza sativa*) das subespécies indica e japônica (Apêndice 1) na safra 2016/2017 em área experimental da Embrapa Clima Temperado, estação experimental Terras Baixas, no município de Capão do Leão, RS. O sistema de cultivo utilizado foi o irrigado e o delineamento experimental foi de blocos casualizados, com três repetições em linhas de m cada, espaçadas a 0,20m, com uma densidade de semeadura de 45 sementes por linha. Durante o ciclo

o manejo foi feito de acordo com as recomendações técnicas para a cultura (SOSBAI, 2014).

A colheita foi realizada quando as plantas estavam no estágio maturação fisiológica dos grãos. As amostras de cada genótipo foram divididas em duas subamostras. Em uma delas os grãos foram apenas descascados (integral), já na outra, além de descascados os grãos foram polidos (tipo branco). Ambos os processos foram feitos na Embrapa, Estação Experimental Terras Baixas com o auxílio de engenho de prova Suzuki. Posteriormente todas as amostras foram moídas em moinho modelo MA020 no laboratório do Centro de Genômica e Fitomelhoramento da Universidade Federal de Pelotas.

Para quantificar o conteúdo total de As presente nos grãos foi feita a digestão das amostras de acordo com Batista et al. (2014). Primeiramente, tubos cônicos do tipo falcon de 15mL foram pesados vazios para realizar o cálculo preciso do fator de diluição. Em cada tubo foram colocadas amostras com 160 a 180mg de arroz moído. Foi adicionado 1,2mL de ácido nítrico (HNO_3) sub-destilado e os tubos permaneceram durante 48h à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) sendo feita a agitação esporadicamente. Após essa etapa, os tubos foram mantidos em banho maria com água aquecida a 90°C durante 2h e posteriormente deixados esfriar. Foi feito o ajuste do volume final para 14mL com água ultrapura autoclavada e então os tubos foram pesados novamente para o cálculo do fator de diluição. Esse procedimento foi realizado nas dependências do Centro de Genômica e Fitomelhoramento.

Para a quantificação total de As as amostras digeridas foram enviadas para o laboratório de Ciência Naturais e Humanas, da Universidade Federal do ABC. As amostras foram injetadas em um espectrômetro de massa de plasma acoplado indutivamente (ICP-MS Agilent 7900, Hachioji, Japão). Em cada lote de digestão e análise foram utilizadas amostras em branco, as quais continham apenas 1mL HNO_3 e 14mL de água ultrapura autoclavada. Todos os parâmetros operacionais do ICP-MS estão no apêndice 2. As soluções de calibração para o As foram preparadas diluindo padrão de calibração para este elemento (10mg L^{-1} PerkinElmer, EUA) em HNO_3 5% v / v. O padrão de calibração variou de $1\text{-}200\mu\text{g L}^{-1}$.

Os dados da variável acúmulo total de As no grão foram submetidos ao teste de normalidade dos resíduos utilizando o teste de Shapiro-Wilk ($p \leq 0,05$). Posteriormente, foi feita a análise da variância (ANOVA) para o conjunto de dados (p

$\leq 0,05$) (SAS, 2013). Para avaliar a diferença de acúmulo de As nos grãos foi utilizado o teste de Tukey ($p < 0,05$). A análise de distribuição normal foi baseada na média dos genótipos mais um desvio padrão e menos um desvio padrão. A análise de correlação de Pearson ($p \leq 0,05$) foi feita para comparar o comportamento do acúmulo de As entre os dois tratamentos.

2.3. Resultados e Discussão

O acúmulo total de As variou entre os genótipos e entre as formas de beneficiamento. Um grupo de 14 genótipos (Brilhante, Amarelo B, Selenio, EEA 405, BR IRGA 411, Arborio, IRAT 162, Lemont, Nourin Mochi, Jasmine, Tomoe Mochi, IRGA 428, Koshihikari, EMPASC 100) apresentou o maior teor de As nos grãos integrais, em quantidades muito superiores às permitidas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), que sugere um limite de 1000 ng g^{-1} (SAIFULLAH et al., 2018). Por outro lado, nove genótipos apresentaram menor acúmulo de As (Jasmine 85, SC 460, EMPASC 104, EMPASC 101, SCS114 Ando, SC 173, Tetep, IRGA 424 CL, SCS 112), estando esses dentro dos limites permitidos pela OMS. Os outros 70 genótipos se mantiveram distribuídos ao redor da média, e também acima dos limites permitidos (Figura 1).

Nos grãos polidos o teor de As foi menor em 12 genótipos (BRS Querencia, SCS 117 CL, IRGA 420, EMPASC 105, EMPASC 101, EMPASC 104, Basmati 370, SCS114 Ando, SC 460, IRAT 124, SCS 112, Tetep) (Figura 2), a maioria dos quais já haviam apresentado menor acúmulo em grãos integrais. O maior acúmulo de As em grãos polidos foi observado em 14 genótipos (Brilhante, Selenio, Nourin Mochi, Amarelo B, SCS 119 Rubi, SCS 115 CL, Tomoe Mochi, IRAT 162, Bluebelle, Arborio, Lemont, Koshihikari, Jasmine, EMPASC 100), dos quais grande parte também se destacou em grãos integrais pelo maior acúmulo de As. Os demais genótipos se mantiveram distribuídos em torno da média. Tanto os genótipos que apresentaram maior acúmulo de As, quanto os que se mantiveram na média continuam fora dos limites permitidos pela OMS.

De maneira geral, as duas distribuições de frequências dos genótipos em estudo estão de acordo com o teste de médias ($p \leq 0,05$) (Apêndices 3 e 4).

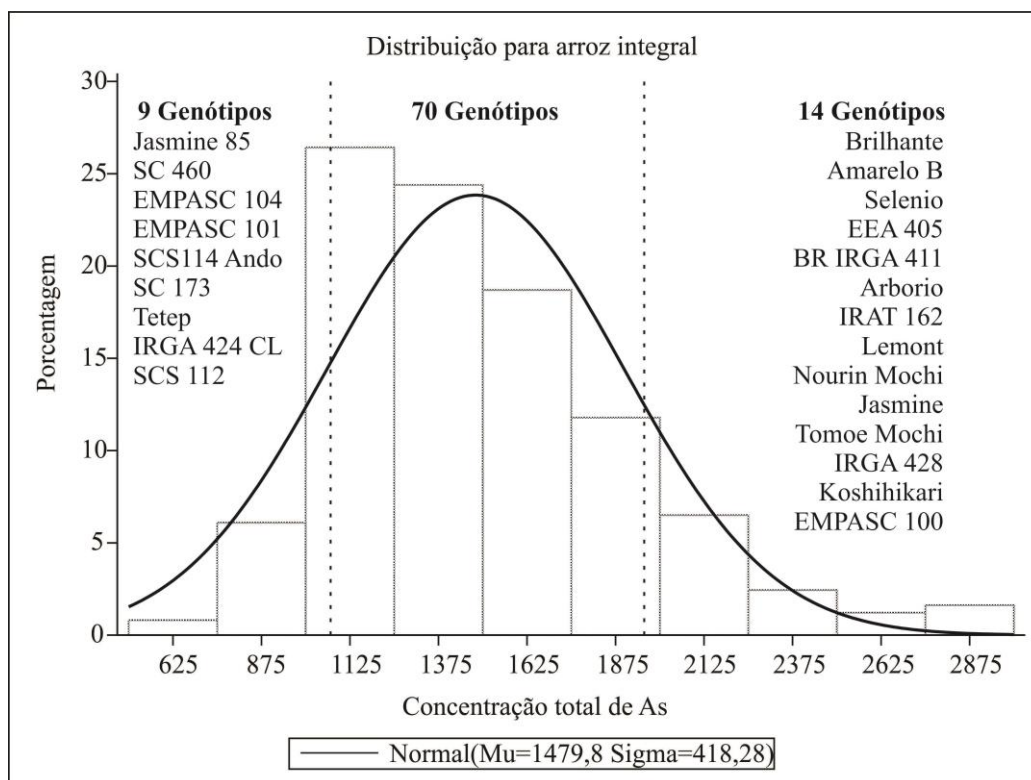


Figura 1 - Distribuição do teor de arsênio em grãos integrais de 93 genótipos de arroz.

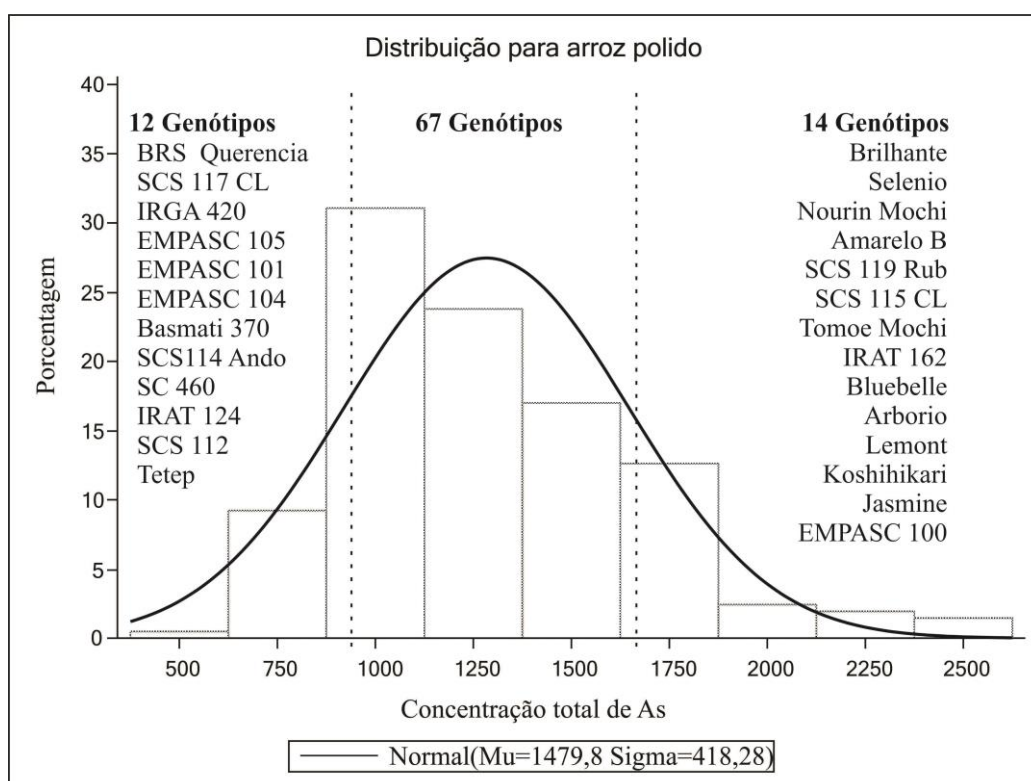


Figura 2 - Distribuição do teor de arsênio em grãos polidos de 93 genótipos de arroz.

Considerando o limite máximo de As permitido em arroz, e a caracterização de genótipos quanto ao acúmulo de As obtida neste estudo, é possível sugerir um

grupo de genótipos para cultivo e/ou utilização em blocos de cruzamento visando o desenvolvimento de novas cultivares de arroz. Dentre esses genótipos pode-se destacar Basmati 370, BRS Querencia, EMPASC 101, EMPASC 104, EMPASC 105, IRGA 424 CL, IRAT 124, IRGA 420, Jasmine 85, SC 173, SC 460, SCS 112, SCS 117 CL, SCS 114 AndoSan, Tetep.

Neste estudo os níveis de As nos grãos integrais variaram de 753,2 a 2811ng.g⁻¹, enquanto que nos grãos polidos o teor de As encontrado foi de 689,5 a 2288ng.g⁻¹. Verifica-se que o beneficiamento reduz o teor de As, no entanto não o suficiente para enquadrar os genótipos com maior acúmulo dentro dos limites permitidos. Esses resultados demonstram a importância do genótipo de arroz cultivado no acúmulo desse elemento.

Em um estudo desenvolvido por Batista et al. (2011), avaliando 44 amostras de grãos de arroz oriundos de genótipos cultivados no Brasil, foi demonstrado que teor de As variou de 271 a 428ng.g⁻¹ e de 109 a 376ng.g⁻¹ no arroz integral e polido, respectivamente. A variação encontrada no conteúdo de As entre os dois estudos pode ser explicada por diferenças genotípicas, visto que o arroz apresenta uma alta variabilidade genética quanto ao acúmulo desse elemento (KURAMATA et al., 2013; NORTON et al., 2014), como pode ser observado nesse estudo. Outro fator determinante para a variação do teor de As em grãos é o ambiente, pois genótipos cultivados sob sistema irrigado, e em locais que o solo e a água contêm elevado teor de As apresentam maiores concentrações de As em seus grãos (BHATTACHARYA, 2017; HU et al., 2013; ISLAM et al., 2016).

Em países do sul e sudeste Asiático especialmente Bangladesh, China e Índia, o problema de contaminação por As através do consumo de arroz é bastante grave. Nesses locais, esse cereal é o alimento básico da dieta, sendo consumido em altas quantidades pela população (CHOU et al., 2014; ZHAO; MCGRATH; MEHARG, 2010). Nos últimos anos, foram encontrados em amostras de arroz oriundas dessas localidades teores de As mais altos que 2000 ng g⁻¹, esses valores são duas vezes superiores ao recomendado pela OMS (BAKHAT et al., 2017). Neste estudo, os valores encontrados para As nos grãos integrais e polidos nos genótipos que apresentaram os maiores teores, assim como nos que se mantiveram na média, foram superiores aos 1000ng.g⁻¹, sendo a concentração de As nesses genótipos semelhante ao encontrado nos grãos provenientes de cultivos asiáticos. Dessa forma, embora poucas pesquisas tenham sido feitas sobre o assunto no Brasil, o

problema de contaminação por As via consumo de arroz no País precisa ser estudada.

Analisando os dados verificou-se a existência de uma alta correlação (0,95) para o acúmulo de As entre grãos integrais e polidos (Figura 3). Esse resultado sugere que os genótipos mantêm o padrão de acúmulo de As durante o beneficiamento, e que esse elemento mantém a mesma localização no grão entre os diferentes genótipos. Estudos desenvolvidos por Lombi et al. (2009), Rahman et al. (2007) e Smith et al. (2009), analisando a concentração de As em diferentes partes do grão, demonstraram que a deposição desse elemento é mais notável no pericarpo e aleurona, as camadas mais externas dos grãos, sendo pouco presente no endosperma. No entanto, neste estudo verificou-se que o polimento, ou seja, a retirada das camadas externas não resulta em grandes perdas de As, evidenciando que esse elemento pode estar mais internalizado no grão. Conforme o que foi observado nos genótipos IRGA 424 CL, Jasmine 85 e SC 173, que apresentaram baixos teores de As total nos grãos integrais, porém não mantiveram esse comportamento nos grãos polidos.

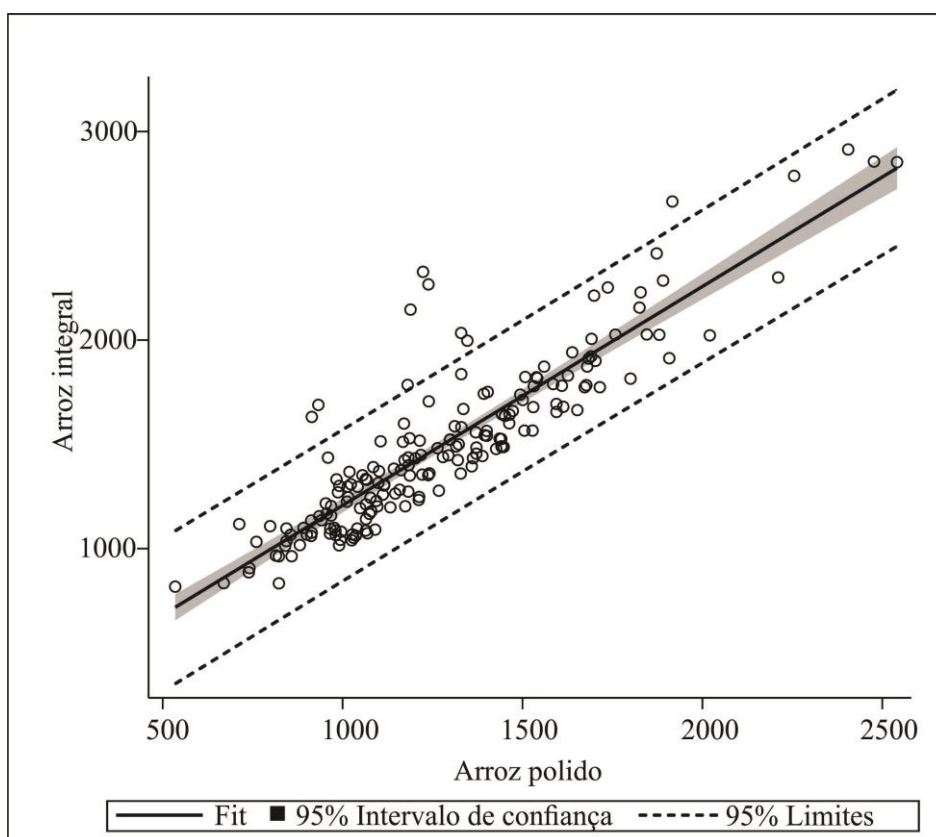


Figura 3 – Correlação entre o teor de arsênio no grão integral e no arroz polido em grupo diverso de 93 genótipos de arroz sob cultivo no sul do Brasil.

2.4. Conclusão

Há genótipos de arroz cultivados no Brasil que apresentam níveis muito elevados de As em grãos, mesmo após polimento. Por outro lado, alguns genótipos se destacam pela menor concentração desse elemento no grão.

Capítulo II

3. Edição do gene *OsLsi2* visando menor acúmulo de arsênio em grãos de arroz

3.1. Introdução

O arsênio (As) é encontrado em toda a crosta terrestre, principalmente como componente de muitos minerais. Além de fontes naturais, atividades antropogênicas podem aumentar a concentração desse elemento no meio ambiente (BASU et al., 2014). Diferentes espécies de As podem ser encontradas, entretanto as formas inorgânicas, isto é, o arsenito [As(III)] e arsenato [As(V)], são consideravelmente mais tóxicas que as formas orgânicas (SHARMA et al., 2014). A exposição humana ao As pode ser devido ao consumo de água e alimentos contaminados (SRIVASTAVA et al., 2016; WANG et al., 2016).

A ingestão de arroz (*Oryza sativa* L.) é considerada uma das principais fontes alimentares de exposição ao As, essa situação vem requerendo. Esse cereal é o alimento básico da dieta de aproximadamente três bilhões de pessoas em todo o mundo (CHEN et al., 2017; SOHN, 2014). Em comparação com outros cereais como o milho, trigo e aveia, o arroz é uma das culturas mais afetadas pela contaminação por As. Isso se deve principalmente a dois fatores, o sistema de cultivo, pois solos alagados facilitam a mobilidade do arsenito, forma predominante de As nessas condições, e a eficiência em absorver silício favorece a absorção de As(III), pois eles compartilham os mesmos transportadores (ZHANG et al., 2015; ZHAO; MCGRATH; MEHARG, 2010).

A ação conjunta dos transportadores Lsi1 e Lsi2 (*LOW SILICON RICE*) controla e promove uma eficiente absorção e acúmulo de silício em arroz. Devido a semelhança entre as moléculas a absorção e translocação do As(III) ocorre através dos mesmos transportadores. Tanto a proteína Lsi1 quanto a Lsi2 localizam-se na membrana plasmática de células da endoderme e exoderme das raízes, onde

ocorrem as estrias de Caspary. Entretanto, Lsi1 faz parte da família das aquaporinas, e está localizada no lado distal, participando do processo influxo de As(III). Já a Lsi2 encontra-se no lado proximal, promovendo o efluxo desse elemento das raízes para o xilema, e é classificada como um possível transportador de ânions (MA et al., 2006, 2007, 2008).

Para identificar e caracterizar a função das proteínas Lsi1 e Lsi2 na absorção e translocação do As(III) em arroz, Ma et al. (2008) induziram mutação no gene *OsNIP2;1(OsLsi1)* que codifica o transportador Lsi1. A partir disso, verificaram que nas plantas mutantes a absorção de As(III) reduziu significativamente quando comparadas com seu tipo selvagem, evidenciado que a proteína Lsi1 desempenha um papel fundamental no influxo do As(III).

O mutante de arroz *lsi2* foi obtido a partir da seleção de sementes M3 tratadas com o agente mutagênico N-metil-N-nitrosourea (MNU). Essa mutação gerou a modificação de uma única base no primeiro éxon do gene *OsLsi2*. No tipo selvagem foi verificada a presença de uma guanina e no mutante *lsi2* uma adenina, causando a alteração de aminoácido na posição 115, no qual a serina foi substituída por asparagina. Essa mutação produziu uma proteína Lsi2 truncada, resultando na redução do transporte de As(III) para o xilema e consequentemente menor acúmulo do mesmo em tecidos jovens e nos grãos (MA et al., 2007, 2008). Sendo assim, modificações nesse gene podem ser uma alternativa eficaz para mitigar os problemas de contaminação por As(III) através do consumo de arroz.

O gene *OsLsi2* (*LOW SILICON RICE 2*) está localizado no cromossomo três do arroz. Este, é estruturalmente composto por dois éxons, um íntron e apresenta 1416 pares de base na região codificadora. A proteína predita é formada por 472 aminoácidos, atua na membrana e apresenta 11 domínios transmembranares (MA et al., 2007).

Dessa forma, para a obtenção de genótipos de arroz com menores teores de As nos grãos pode-se associar o conhecimento prévio sobre o gene *OsLsi2* e técnicas de edição gênica, dentre as quais destaca-se o sistema CRISPR/Cas9. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi reduzir o efluxo de As em plantas de arroz através da edição do gene *OsLsi2* visando a obtenção de uma proteína truncada.

3.2. Material e métodos

Para silenciar o gene *OsLsi2* (Os03t0107300) foi feita a sua edição através da tecnologia CRISPR/Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*). Primeiramente, foi desenhado um RNA guia endereçado para o gene alvo utilizando o programa CRISPR-P (<http://cbi.hzau.edu.cn/crispr/>), 23 pares de bases da região codificadora (1419 pb) foram selecionados para a síntese do gRNA. A sequência correspondente ao gene *OsLsi2* foi obtida no banco de dados RAP-DB (*Rice Annotation Project Data Base*) (<http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>) (Apêndice 5). A sequência do gRNA (GGGCGGTGACGACGCAGACGCGG) foi enviada para empresa *Sigma Aldrich*, responsável pela construção do plasmídeo. O plasmídeo apresenta o gene de resistência para os agentes seletivos canamicina para bactérias e higromicina para as plantas (Figura 1). Como não foi sintetizada uma sequência homóloga à região alvo, o reparo da quebra da dupla fita de DNA foi feito por recombinação não homóloga.

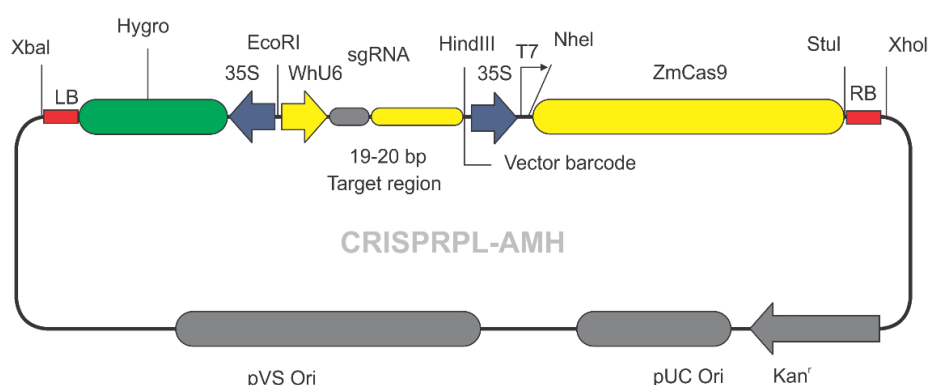


Figura 1 - Representação esquemática do plasmídeo utilizado para edição do gene *OsLsi2*. XbaI: sítio de restrição para a endonucleases XbaI. LB: left border – borda esquerda. Hygro: sequência do gene cuja proteína confere resistência ao antibiótico higromicina (na planta). 35S: promotor do *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) - promotor utilizado para o gene Hygro. EcoRI: sítio de restrição para a endonuclease EcoRI. WhU6: promotor do gene ubiquitina - promotor usado para o RNA guia. SgRNA: RNA guia. HindIII: sítio de restrição para a endonuclease HindIII. 35S: promotor para o gene *ZmCas9*. T7: promotor da enzima NheI. NheI: sítio de restrição NheI. *ZmCas9*: sequência gene *ZmCas9* que codifica a proteína Cas9. StuI: sítio de restrição para a endonucleases StuI. RB: *right border* - borda direita. XhoI: sítio de restrição para a endonucleases XhoI. Kan: sequência do gene cuja proteína confere resistência ao antibiótico canamicina (na bactéria). pUCori: Origem de replicação em *E. coli*. pVSori: origem de replicação em *Agrobacterium*.

Para realizar a transformação via *Agrobacterium tumefaciens*, inicialmente o plasmídeo contendo a construção *CRISPR/Cas9:OsLsi2* foi inserido via

eletroporação (cubeta de 2mm; 25µF; 200 Ω; 2400V) em células eletrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens* CEPA LBA 4404. Após o choque, as células foram mantidas a 28°C durante 1 hora, sob agitação. Posteriormente, estas foram estriadas em placas de Petri contendo meio LB (Luria-Bertani) (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) sólido acrescido dos antibióticos canamicina (100mg L⁻¹) e rifampicina (50mg L⁻¹). As placas foram incubadas a 28°C durante 48h em BOD na ausência de luz. Oito colônias individuais foram selecionadas para extração do DNA plasmidial. Para essa etapa, primeiramente foram colocados oito pré inóculos das colônias (1 a 8) de *Agrobacterium tumefaciens* contendo a construção de interesse em meio LB líquido acrescido de rifampicina (50 mg L⁻¹) e canamicina (100mg L⁻¹). Essas colônias foram encubadas a 28°C, sob agitação durante 20hs (D.O.=0.7). A extração de DNA plasmidial foi feita com a utilização do kit Qiaprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen, Cat. No. 27.106).

Para confirmar a presença da construção *CRISPR/Cas9:OsLsi2* em *Agrobacterium* e nas plantas, foram desenhados iniciadores para amplificar a região U6-gRNA, cujo o tamanho é de 362 pb. Os iniciadores podem ser visualizados na tabela 1.

Tabela 1 - Iniciadores utilizados para a amplificação da região U6-gRNA.

Iniciadores U6-gRNA	Sequência
Senso	GACCAAGCCCGTTATTCTGAC
Antisenso	AAGTCTGATGCAGCAAGCGAG

A reação de amplificação foi realizada em um volume final de 13µL contendo 50ng de DNA, 6,75µL de *GoTaq Green Master Mix* (Promega), 1,25µL de cada *primer* (10µM) e 3,75µL de água. O programa da amplificação foi constituído de um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por dois minutos, seguido de 30 ciclos de 95°C por 30 segundos; 60°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos com um ciclo final a 72°C por 5 minutos. A amplificação e o tamanho dos produtos foram verificados por eletroforese em gel de agarose 2% corado com *GelRed*.

O plasmídeo contendo a construção *CRISPR/Cas9:OsLsi2* foi inserido em plantas de arroz através da infecção de 310 mesocótilos, utilizando-se *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA 4404. Para a infecção dos mesocótilos, inicialmente foram repicadas colônias de *Agrobacterium* transformadas com o

plasmídeo, e transferidas para tubos do tipo falcon de 25mL contendo LB líquido, rifampicina (50mg L^{-1}) e canamicina (100mg L^{-1}). Estes foram então incubados a 28°C , com uma agitação de 60rpm durante 24 horas (D.O.=0.7).

Para a obtenção dos mesocótilos, sementes descascadas da cultivar Nipponbare (*Oryza sativa* spp. *japonica*) foram desinfetadas durante um minuto com álcool 70% e por dois minutos com mercúrio 1%. Após a desinfestação, as sementes foram lavadas quatro vezes com água ultrapura estéril, secas em papel filtro estéril, e acondicionadas em frascos contendo meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) acrescido de ANA (ácido naftalenoacético). Esses frascos foram incubados em BOD a 25°C durante 7 dias na ausência de luz. Os mesocótilos foram isolados a partir da excisão das plântulas feita em fluxo laminar com o auxílio de lupa e bisturi.

Após a coleta, os mesocótilos foram infectados com *A. tumefaciens* contendo o plasmídeo *CRISPR/Cas9:OsLsi2*, através da imersão dos mesmos em solução bacteriana durante 30 minutos (Figura 2a). Em seguida os mesocótilos foram secos em papel filtro estéril para retirada do excesso de meio, transferidos para placas de Petri contendo meio MS sólido e acetoseringona (150mg L^{-1}) (Figura 2b e 2c), e incubados em co-cultivo durante três dias no escuro em BOD a 25°C (Figura 3).



Figura 2 - Mesocótilos após a coleta: (a) imersos em solução bacteriana de *Agrobacterium* contendo o plasmídeo *CRISPR/Cas9:OsLsi2*; (b) secos em papel filtro estéril para retirada do excesso de solução bacteriana; (c) em placas de Petri com meio MS + acetoseringona (150 mg L^{-1}). Fonte: Arquivo pessoal, 2017.

Passado o período de co-cultivo, os mesocótilos foram lavados com água destilada estéril acrescida de cefotaxima (200mg L^{-1}) durante 30 minutos e secos em papel filtro estéril. Após, os mesocótilos foram transferidos para meio MS acrescido de 6-benzyl amino purine (BAP) (3mg L^{-1}) e cefotaxima (200mg L^{-1}), e incubados BOD a 25°C com fotoperíodo de 16 horas.



Figura 3 - Mesocótilos após o período de três dias de co-cultivo. Fonte: Arquivo pessoal, 2017.

Depois de três semanas, as plântulas foram transferidas para meio MS acrescido de 20mg L^{-1} de higromicina (agente seletivo) e 3mg L^{-1} de BAP, e incubadas na BOD a 25°C com fotoperíodo de 16 horas. As plântulas foram mantidas no meio de seleção durante duas semanas, tempo recomendado para morte total de mesocótilos de arroz não transformados (dados não mostrados). Após este período, as plântulas que sobreviveram foram transferidas novamente para meio de regeneração (MS acrescido de 3mg L^{-1} de BAP + 200mg L^{-1} de cefotaxima).

Após 30 dias foi feita extração de DNA foliar das plantas regeneradas, seguindo o protocolo de extração CTAB modificado (SAGHAI-MARROF, 1984). A verificação da qualidade, integridade e quantificação do DNA foi feita através de gel de agarose 1%.

O DNA foi submetido à PCR, seguindo as mesmas condições de reação descritas anteriormente. Em todas as reações de PCR foram utilizados como controle: DNA plasmidial como controle positivo (colônias contendo a construção), DNA da planta não transformada (cv. Nipponbare) como controle negativo e água DEPC estéril (controle da reação).

3.3. Resultados

Para confirmar se o plasmídeo contendo a construção *CRISPR/Cas9:OsLsi2* foi inserido em *Agrobacterium tumefaciens*, foi realizada uma análise de PCR. A partir da extração do DNA plasmidial foram selecionadas as colônias 1 e 8 para serem testadas via reação de PCR, a qual indicou que as células estavam transformadas

(Figura 4). Dessa forma, elas estavam aptas a serem utilizadas para a infecção das plantas de arroz.

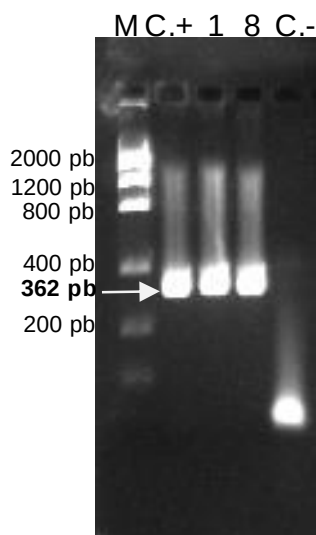


Figura 4 - Amplificação da região U6-gRNA das colônias de *Agrobacterium* transformadas com a construção CRISPR/Cas9:OsLsi2. M: Marcador utilizado - *LowDNA Mass Ladder*. C+: controle positivo - amplificação plasmídeo. 1 e 8: DNA plasmidial das colônias. C-: controle negativo - água DEPC estéril. Fonte: Arquivo pessoal, 2017

Foram coletados no total 310 mesocótilos, dos quais alguns foram infectados com a colônia 1 e outros com a colônia 8. Primeiramente, 220 plantas foram submetidas ao meio de seleção com higromicina, restando 17 plantas possivelmente transformadas. As plantas que não estavam transformadas morreram após a seleção com higromicina e as possivelmente transformadas, embora tenham resistido ao meio seletivo apresentaram alguns sinais de estresse (Figura 5a e 5b). As plantas remanescentes foram submetidas à análise de PCR para verificar a presença da construção. A partir do resultado obtido com a reação de PCR verificou-se que as plantas não receberam a construção *CRISPR/Cas9:OsLsi2* (Figura 6).

A confirmação das plantas possivelmente transformadas pela técnica de PCR se faz necessário, pois mesmo utilizando o agente seletivo, algumas plantas não transformadas, ou seja, que não apresentam o gene de resistência a higromicina podem sobreviver, como foi observado nesse estudo. Isso pode acontecer devido a diferença nos estádios de diferenciação dos tecidos durante a regeneração, resultando em uma resposta diferencial ao agente seletivo, ou ainda, os tecidos podem desenvolver um mecanismo de proteção frente a exposição ao agente seletivo (LACERDA, 2007).

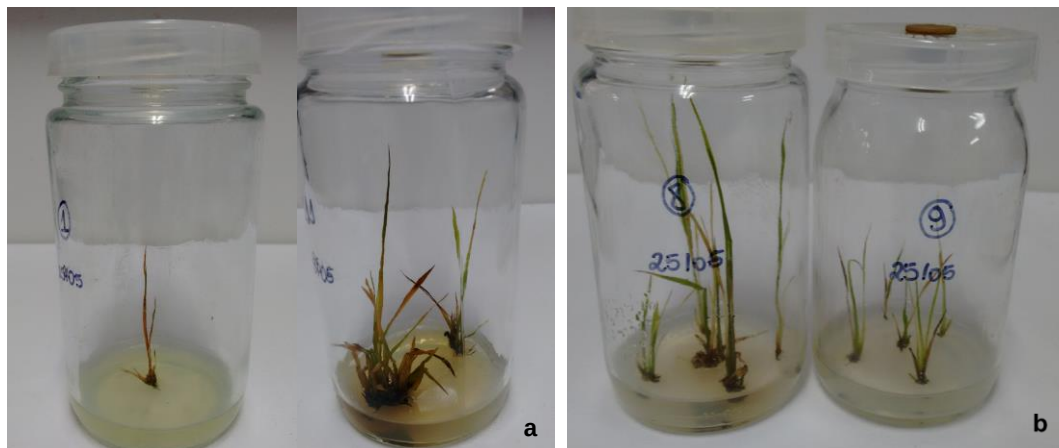


Figura 5 - Após seleção com higromicina (a) plantas mortas evidenciando que não estão transformadas, (b) plantas possivelmente transformadas. Fonte: Arquivo pessoal, 2017.

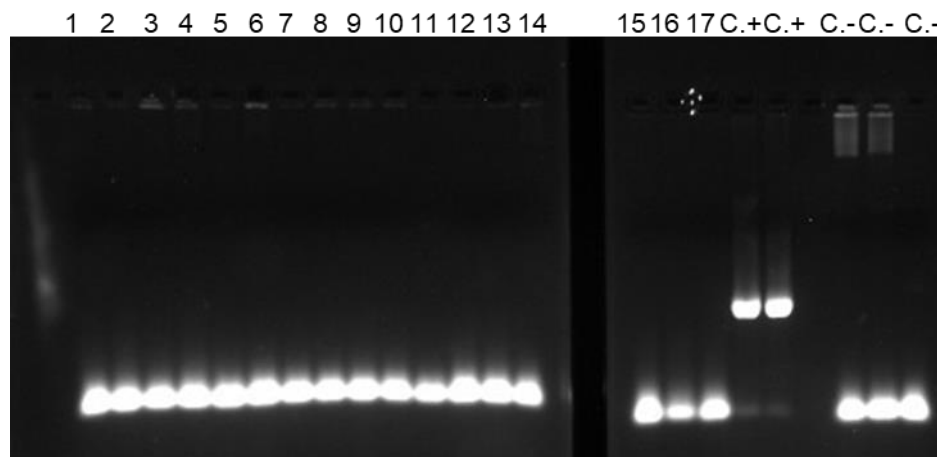


Figura 6 - Amplificação da região U6-gRNA das plantas de arroz infectadas com Agrobacterium. 1 ao 17: amostras de DNA plantas de arroz. C+: controles positivos - DNA plasmidial colônia 1 e colônia 8 respectivamente. C-: controle negativo - DNA de duas plantas selvagens da cultivar Nipponbare e água DEPC estéril. Fonte: Arquivo pessoal, 2017.

Outras 90 plantas passaram pela seleção com higromicina, destas, 51 possivelmente transformadas sobreviveram e estão em meio de regeneração (MS acrescido de BAP + cefotaxima) (Figura 7). Posteriormente, será realizada a coleta de material vegetal para extração de DNA e confirmação via PCR.



Figura 7 - Plantas possivelmente transformadas em meio de regeneração. Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

3.4. Considerações finais

A estratégia utilizada para obtenção de genótipos de arroz com menor acúmulo de As parece promissora, no entanto a metodologia empregada para a infecção de plantas foi pouco eficiente e pode ser reconsiderada. Porém, deve-se levar em consideração que nem todas as plantas possivelmente transformadas foram analisadas e que o tempo de execução do estudo foi curto. Nesse sentido, a continuidade dessa pesquisa em longo prazo poderá trazer resultados mais concretos.

Considerações gerais

O acúmulo de arsênio em grãos de arroz é influenciado pelo genótipo, dessa forma pode-se explorar a variabilidade existente na espécie para selecionar aqueles que apresentam menor acúmulo de As nos grãos para utiliza-los na obtenção de genótipos com reduzido teor. No Brasil ainda é pouco estudada a presença do arsênio através do consumo de arroz contaminado. Entretanto, genótipos cultivados no País já demonstram teores elevados desse elemento, sendo necessário direcionar esforços para evitar problemas de saúde nos consumidores.

Neste estudo, foi avaliado o teor de As total em grupo de genótipos de arroz, verificando que alguns genótipos acumulam As no grãos em quantidades superiores as permitidas, reforçando a hipótese de que a contaminação por As pode se tornar um problema sério no Brasil.

Por outro lado, este estudo possibilitou a identificação de genótipos cujo acúmulo de As no grãos está abaixo do permitido. Dessa forma, os genótipos Basmati 370, BRS Querência, EMPASC 101, EMPASC 104, EMPASC 105, IRGA 424 CL, IRAT 124, IRGA 420, Jasmine 85, SC 173, SC 460, SCS 112, SCS 117 CL, SCS 114 AndoSan, Tetep podem ser indicados para cultivo ou utilização como genitores no desenvolvimento de novas cultivares. Para os genótipos testados, o polimento dos grãos de arroz, não gerou grandes reduções de As, evidenciando assim que esse elemento pode estar mais internalizado no grão, e que mais estudos devem ser conduzidos.

A caracterização de genótipos quanto ao acúmulo de As desenvolvida neste estudo, juntamente com pesquisas em Instituições parceiras (Embrapa e UFABC), são o ponto de partida para iniciar um programa de melhoramento de arroz para essa característica.

Considerando o tempo demandado para o desenvolvimento de novos genótipos através do método de hibridação seguido de seleção, a utilização de ferramentas biotecnológicas pode ser uma estratégia para acelerar esse processo, ou mesmo para criar nova variabilidade, até então inexistente.

Recentemente, a tecnologia CRISPR/Cas9 surgiu como uma alternativa muito promissora para edição, consequentemente com uso potencial no melhoramento de plantas.

Neste estudo buscou-se editar um dos genes cuja proteína está envolvida no transporte de As para os grãos de arroz. Para esse fim utilizou-se o sistema CRISPR/Cas9. Em função da técnica empregada para a infecção de plantas, assim como do curto espaço de tempo disponível, não foi possível chegar a conclusões sólidas. No entanto, a finalização da etapa de obtenção de plantas transformadas será concluída em breve.

Referências

- ABEDIN, M. J.; CRESSER, M. S. Arsenic accumulation and metabolism in Rice (*Oryza sativa* L). **Environmental Science & Technology**, v. 36, n. 5, p. 962–968, 2002.
- AHMED BAIG, J. et al. Speciation and evaluation of Arsenic in surface water and groundwater samples: A multivariate case study. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, n. 5, p. 914–923, 2010.
- ARAKI, M.; ISHII, T. Towards social acceptance of plant breeding by genome editing. **Trends in Plant Science**, v. 20, n. 3, p. 145–149, 2015.
- AWASTHI, S. et al. The Journey of Arsenic from Soil to Grain in Rice. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. June, p. 1–13, 2017.
- BAKHAT, H. F. et al. Arsenic uptake, accumulation and toxicity in rice plants: Possible remedies for its detoxification: A review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 10, p. 9142–9158, 2017.
- BARRA, C. M.; SANTELLI, R. E.; ABRÃO, J. J.; DE LA GUARDIA, M. Especificação de arsênio - Uma Revisão. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 58–70, 2000.
- BARRANGOU, R. et al. CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. **Science**, v. 315, n. 5819, p. 1709–1712, 23 mar. 2007.
- BASU, A. et al. A review on sources, toxicity and remediation technologies for removing arsenic from drinking water. **Research on Chemical Intermediates**, v. 40, n. 2, p. 447–485, 2014.
- BATISTA, B. L. et al. Identification and quantification of phytochelatins in roots of rice to long-term exposure: Evidence of individual role on arsenic accumulation and translocation. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 6, p. 1467–1479, 2014.
- BATISTA, B. L. et al. Speciation of arsenic in rice and estimation of daily intake of different arsenic species by Brazilians through rice consumption. **Journal of Hazardous Materials**, v. 191, n. 1–3, p. 342–348, 2011.
- BHATTACHARYA, P. Assessment of Arsenic Accumulation by Different Varieties of Rice (*Oryza sativa* L.) Irrigated with Arsenic-contaminated Groundwater in West Bengal (India). **Environmental Pollution and Protection**, v. 2, n. 3, p. 92–99, 17 ago. 2017.
- BIENERT, G. P. et al. A subgroup of plant aquaporins facilitate the bi-directional diffusion of As(OH)₃ and Sb(OH)₃ across membranes. **BMC Biology**, v. 6, n. lli, p.1-15, 2008..

BISSEN, M.; FRIMMEL, F. H. Arsenic - A review. Part I: Occurrence, toxicity, speciation, mobility. **Acta Hydrochimica et Hydrobiologica**, v. 31, n. 1, p. 9–18, 2003.

BRAMMER, H.; RAVENSCROFT, P. Arsenic in groundwater: A threat to sustainable agriculture in South and South-east Asia. **Environment International**, v. 35, n. 3, p. 647–654, 2009.

CAREY, A.-M. et al. Grain Unloading of Arsenic Species in Rice. **Plant Physiology**, v. 152, n. 1, p. 309–319, 2010.

CATARECHA, P. et al. A Mutant of the Arabidopsis Phosphate Transporter PHT1;1 Displays Enhanced Arsenic Accumulation. **the Plant Cell Online**, v. 19, n. 3, p. 1123–1133, 2007.

CHAO, D. Y. et al. Genome-wide Association Mapping Identifies a New Arsenate Reductase Enzyme Critical for Limiting Arsenic Accumulation in Plants. **PLoS Biology**, v. 12, n. 12, 2014.

CHEN, T. C. et al. Association between arsenic and different-sized dissolved organic matter in the groundwater of black-foot disease area, Taiwan. **Chemosphere**, v. 159, p. 214–220, 2016.

CHEN, Y. et al. Arsenic Transport in Rice and Biological Solutions to Reduce Arsenic Risk from Rice. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. March, 2017.

CHEN, Y. et al. The role of nodes in arsenic storage and distribution in rice. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 13, p. 3717–3724, 2015.

CHOU, M. L. et al. Distribution and accumulation of arsenic in rice plants grown in arsenic-rich agricultural soil. **Agronomy Journal**, v. 106, n. 3, p. 945–951, 2014.

CIMINELLI, V. S. T. et al. Dietary arsenic exposure in Brazil: The contribution of rice and beans. **Chemosphere**, v. 168, p. 996–1003, 2017.

Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos – 4º Levantamento**. CONAB, 2017. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em 27 de dezembro de 2017.

CULLEN, W. R. Chemical mechanism of arsenic biomethylation. **Chemical Research in Toxicology**, v. 27, n. 4, p. 457–461, 2014.

DEVEAU, H.; GARNEAU, J. E.; MOINEAU, S. CRISPR/Cas System and Its Role in Phage-Bacteria Interactions. **Annual Review of Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 475–493, 2010.

DING, Y. et al. Recent Advances in Genome Editing Using CRISPR/Cas9. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. May, p. 1–12, 2016.

DOMINGUEZ, A. A.; LIM, W. A.; QI, L. S. Beyond editing: Repurposing CRISPR-Cas9 for precision genome regulation and interrogation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 17, n. 1, p. 5–15, 2016.

DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science**, v. 346, n. 6213, 2014.

ESTRELA, R.; CATE, J. H. D. Energy biotechnology in the CRISPR-Cas9 era. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 38, p. 79–84, 2016.

ESVELT, K. M. et al. Orthogonal Cas9 proteins for RNA-guided gene regulation and editing. **Nature Methods**, v. 10, n. 11, p. 1116–1121, 29 set. 2013.

FERNÁNDEZ-LUQUEÑO, F. et al. Heavy metal pollution in drinking water - a global risk for human health: A review. **African Journal of Environmental Science and Technology**, v. 7, n. 7, p. 567–584, 2013.

GASIUNAS, G. et al. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 39, p. E2579–E2586, 2012.

GEISSELER, D.; LINQUIST, B. A.; LAZICKI, P. A. Effect of fertilization on soil microorganisms in paddy rice systems – A meta-analysis. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 115, p. 452–460, 2017.

HU, P. et al. Water management affects arsenic and cadmium accumulation in different rice cultivars. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 35, n. 6, p. 767–778, 2013.

HUANG, J. H. Impact of microorganisms on arsenic biogeochemistry: A review. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 225, n. 2, 2014.

HUANG, J. H.; HU, K. N.; DECKER, B. Organic arsenic in the soil environment: Speciation, occurrence, transformation, and adsorption behavior. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 219, n. 1–4, p. 401–415, 2011.

ISLAM, S. et al. Arsenic accumulation in rice: Consequences of rice genotypes and management practices to reduce human health risk. **Environment International**, v. 96, p. 139–155, 2016.

JACKSON, B. P.; PUNSHON, T. Recent Advances in the Measurement of Arsenic, Cadmium, and Mercury in Rice and Other Foods. **Current Environmental Health Reports**, v. 2, n. 1, p. 15–24, 2015.

JIANG, W. et al. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 233–239, 2013.

JINEK, M. et al. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. **Science**, v. 337, n. 6096, p. 816–821, 17 ago. 2012.

JINEK, M. et al. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. **Science**, v. 343, n. 6176, 2014.

JOMOVA, K. et al. Arsenic: Toxicity, oxidative stress and human disease. **Journal of Applied Toxicology**, v. 31, n. 2, p. 95–107, 2011.

JOSEPH, T.; DUBEY, B.; MCBEAN, E. A. Human health risk assessment from arsenic exposures in Bangladesh. **Science of the Total Environment**, v. 527–528, p. 552–560, 2015.

JULIANO, B. O. Rice starch: production, properties and uses. In: WHISTLER, R. L. et al. (Ed.). *Starch: chemistry and technology*. 2nd. ed. Orlando: Academic, 1984. p. 507-527.

KAMIYA, T. et al. Phosphate deficiency signaling pathway is a target of arsenate and phosphate transporter OsPT1 is involved in As accumulation in shoots of rice. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 59, n. 4, p. 580–590, 2013.

KELLOGG, E. A. The evolutionary history of Ehrhartoideae, Oryzeae, and *Oryza*. **Rice**, v. 2, n. 1, p. 1–14, 2009.

KHATODIA, S. et al. The CRISPR/Cas Genome-Editing Tool: Application in Improvement of Crops. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. April, p. 1–13, 2016.

KIM, J. Y. et al. Determination of arsenic species in rice grains using HPLC-ICP-MS. **Food Science and Biotechnology**, v. 22, n. 6, p. 1509–1513, 2013.

KOMOROWICZ, I.; BARAŁKIEWICZ, D. Determination of total arsenic and arsenic species in drinking water, surface water, wastewater, and snow from Wielkopolska, Kujawy-Pomerania, and Lower Silesia provinces, Poland. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 188, n. 9, 2016.

KURAMATA, M. et al. Genetic diversity of arsenic accumulation in rice and QTL analysis of methylated arsenic in rice grains. **Rice**, v. 6, n. 1, p. 1–10, 2013.

LACERDA, A. L. M. *Brachiaria brizantha*: caracterização de cDNA de ovários e identificação de explantes para transformação via biobalística. 2007. 96 f., il. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular)-Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

LI, J. et al. Mechanisms controlling arsenic uptake in rice grown in mining impacted regions in South China. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, 2014.

LI, J.; WANG, J.; ZEIGLER, R. S. The 3, 000 rice genomes project: new opportunities and challenges for future rice research. **GigaScience**, v. 3, n. 8, p. 1–3, 2014.

LI, N.; WANG, J.; SONG, W. Y. Arsenic uptake and translocation in plants. **Plant and Cell Physiology**, v. 57, n. 1, p. 4–13, 2016.

LI, R. Y. et al. Mitigation of arsenic accumulation in rice with water management and silicon fertilization. **Environmental Science and Technology**, v. 43, n. 10, p. 3778–3783, 2009b.

LI, R.-Y. et al. The Rice Aquaporin Lsi1 Mediates Uptake of Methylated Arsenic Species. **Plant Physiology**, v. 150, n. 4, p. 2071–2080, 2009a.

LIN, S. C. et al. Accumulation of arsenic in rice plant: a study of an arsenic-contaminated site in Taiwan. **Paddy and Water Environment**, v. 13, n. 1, p. 11–18, 2013.

LIU, D. et al. Advances and perspectives on the use of CRISPR/Cas9 systems in plant genomics research. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 30, p. 70–77, 2016.

LIU, Z. et al. Application of inductively coupled plasma mass spectrometry in the quantitative analysis of biomolecules with exogenous tags: A review. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 93, p. 78–101, 2017.

LOMBI, E. et al. Speciation and distribution of arsenic and localization of nutrients in rice grains. **New Phytologist**, v. 184, n. 1, p. 193–201, out. 2009.

MA, J. F. et al. A silicon transporter in rice. **Nature**, v. 440, n. 7084, p. 688–691, 2006.

MA, J. F. et al. An efflux transporter of silicon in rice. **Nature**, v. 448, n. 7150, p. 209–212, 2007.

MA, J. F. et al. Transporters of arsenite in rice and their role in arsenic accumulation in rice grain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 29, p. 9931–9935, 2008.

MA, J. F.; YAMAJI, N. Silicon uptake and accumulation in higher plants. **Trends in Plant Science**, v. 11, n. 8, p. 392–397, 2006.

MAGALHÃES JÚNIOR, A. M.; OLIVEIRA, A. C. Arroz. In: **Origem e evolução de plantas cultivadas**. Rosa Lia Barbieri; Elisabeth Regina Tempel Stumpf – Editores Técnicos. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p.187-218, 2008.

MAHER, W. A. et al. Measurement of As species in rice by HPLC-ICPMS after extraction with sub-critical water and hydrogen peroxide. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 32, n. 6, p. 1129–1134, 2017.

MAKAROVA, K. S. et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 6, p. 467–477, 2011.

MANDAL, B. K.; SUZUKI, K. T. Arsenic round the world: A review. **Talanta**, v. 58, n. 1, p. 201–235, 2002.

MATAVELI, L. R. V. et al. Total Arsenic, Cadmium, and Lead Determination in Brazilian Rice Samples Using ICP-MS. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2016, p. 1–9, 2016.

MCCARTY, K. M.; HANH, H. T.; KIM, K.-W. Arsenic geochemistry and human health in South East Asia. **Reviews on Environmental Health**, v. 26, n. 1, p. 71–78, 2011.

MEHARG, A. A. et al. Geographical Variation in Total and Inorganic Arsenic Content of Polished (White) Rice Geographical Variation in Total and Inorganic Arsenic Content of Polished (White) Rice. **Environmental Science & Technology**, v. 43, n. 5, p. 1612–1617, 2009.

MEHARG, A. A. et al. Speciation and Localization of Arsenic in White and Brown Rice Grains. **Environmental Science & Technology**, v. 42, n. 4, p. 1051–1057, fev. 2008.

MEMON, A. H. et al. Contaminants Exposure and Impacts on Drinking Water of Johi Subdivision of Sindh, Pakistan. **Science Letters**, v. 4, n. 1, p. 78–83, 2016.

MENGUER, P. K.; SPEROTTO, R. A.; RICACHENEVSKY, F. K. A walk on the wild side: *Oryza* species as source for rice abiotic stress tolerance. **Genetics and Molecular Biology**, v. 40, n. 1, p. 238–252, 2017.

MONDAL, D.; POLYA, D. A. Rice is a major exposure route for arsenic in Chakdaha block, Nadia district, West Bengal, India: A probabilistic risk assessment. **Applied Geochemistry**, v. 23, n. 11, p. 2986–2997, 2008.

MOSA, K. A. et al. Members of rice plasma membrane intrinsic proteins subfamily are involved in arsenite permeability and tolerance in plants. **Transgenic Research**, v. 21, n. 6, p. 1265–1277, 2012.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Plant Physiology*, v.15, p.473-479, 1962.

MUTHAYYA, S. et al. An overview of global rice production, supply, trade, and consumption. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1324, n. 1, p. 7–14, 2014.

NARUKAWA, T. et al. Reversed Phase Column HPLC-ICP-MS Conditions for Arsenic Speciation Analysis of Rice Flour. **Analytical Sciences**, v. 31, n. 6, p. 521–527, 2015.

NCBI Taxonomy: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/> - acessado em 27 dezembro de 2018.

NISSIM, L. et al. Multiplexed and Programmable Regulation of Gene Networks with an Integrated RNA and CRISPR/Cas Toolkit in Human Cells. **Molecular Cell**, v. 54, n. 4, p. 698–710, 2014.

NOOKABKAEW, S. et al. Determination of arsenic species in rice from Thailand and other Asian countries using simple extraction and HPLC-ICP-MS analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 28, p. 6991–6998, 2013.

NORTON, G. J. et al. Effect of organic matter amendment, arsenic amendment and water management regime on rice grain arsenic species. **Environmental Pollution**, v. 177, p. 38–47, 2013.

NORTON, G. J. et al. Genome wide association mapping of grain arsenic, copper, molybdenum and zinc in rice (*Oryza sativa* L.) grown at four international field sites. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, 2014.

O'REILLY, J. et al. Arsenic contamination of natural waters in San Juan and La Pampa, Argentina. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 32, n. 6, p. 491–515, 2010.

PUNSHON, T. et al. Understanding arsenic dynamics in agronomic systems to predict and prevent uptake by crop plants. **Science of the Total Environment**, v. 581–582, p. 209–220, 2017.

RAAB, A. et al. Uptake and translocation of inorganic and methylated arsenic species by plants. **Environmental Chemistry**, v. 4, n. 3, p. 197–203, 2007.

RAHAMAN, S. et al. Arsenic contamination: A potential hazard to the affected areas of West Bengal, India. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 35, n. 1, p. 119–132, 2013.

RAHMAN, M. A. et al. Accumulation of arsenic in tissues of rice plant (*Oryza sativa* L.) and its distribution in fractions of rice grain. **Chemosphere**, v. 69, n. 6, p. 942–948, 2007.

SAGHAI-MAROOF, M.A. et al. Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.81, p.8014-8018, 1984.

SAHOO, P. K.; KIM, K. A review of the arsenic concentration in paddy rice from the perspective of geoscience. **Geosciences Journal**, v. 17, n. 1, p. 107–122, 2013.

SAIFULLAH et al. Opportunities and challenges in the use of mineral nutrition for minimizing arsenic toxicity and accumulation in rice: A critical review. **Chemosphere**, v. 194, n. December, p. 171–188, 2018.

SAKURAI, T. Biomethylation of arsenic is essentially detoxicating event. **Journal of Health Science**, v. 49, n. 3, p. 171–178, 2003.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2 ed. **Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1989. 1626 p.

SANDER, J. D.; JOUNG, J. K. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. **Nature Biotechnology**, v. 32, n. 4, p. 347–350, 2014.

SAS Institute. 2013. The SAS system for Windows. Version 9.3. **SAS Inst., Inc. Cary, NC**.

SEYFFERTH, A. L. et al. Arsenic concentrations in paddy soil and rice and health implications for major rice-growing regions of cambodia. **Environmental Science and Technology**, v. 48, n. 9, p. 4699–4706, 2014.

SHARMA, A. K. et al. Review of arsenic contamination, exposure through water and food and low cost mitigation options for rural areas. **Applied Geochemistry**, v. 41, p. 11–33, 2014.

SHARMA, B.; SINGH, S.; SIDDIQI, N. J. Biomedical implications of heavy metals induced imbalances in redox systems. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

SHI, S. et al. OsHAC1;1 and OsHAC1;2 Function as Arsenate Reductases and Regulate Arsenic Accumulation. **Plant Physiology**, v. 172, n. 3, p. 1708–1719, 2016.

SHUI, B. et al. The Rise of CRISPR / Cas for Genome Editing in Stem Cells. v. 2016, 2016.

SMITH, E. et al. Arsenic uptake and speciation in rice plants grown under greenhouse conditions with arsenic contaminated irrigation water. **Science of the Total Environment**, v. 392, n. 2–3, p. 277–283, 2008.

SMITH, E. et al. Localization and speciation of arsenic and trace elements in rice tissues. **Chemosphere**, v. 76, n. 4, p. 529–535, 2009.

SOCIEDADE SUL BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO - SOSBAI. Arroz irrigado: Recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil. In: XXXI REUNIÃO TÉCNICA DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 2016, Bento Gonçalves. Anais. Pelotas, 2016. 199 p.

SOCIEDADE SUL BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO - SOSBAI. Arroz irrigado: Recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil. In: XXX REUNIÃO TÉCNICA DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 2014, Bento Gonçalves. Anais. Santa Maria, 2014. 192 p.

SOHN, E. Contamination: The toxic side of rice. **Nature**, v. 514, n. 7524, p. S62–S63, 30 out. 2014.

SONG, W.-Y. et al. A rice ABC transporter, OsABCC1, reduces arsenic accumulation in the grain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 44, p. 15699–15704, 2014.

SONTHEIMER, E. J.; BARRANGOU, R. The Bacterial Origins of the CRISPR Genome-Editing Revolution. **Human Gene Therapy**, v. 26, n. 7, p. 413–424, jul. 2015.

SOUZA, J. M. O. et al. Arsênio e arroz: Toxicidade, metabolismo e segurança alimentar. **Química Nova**, v. 38, n. 1, p. 118–127, 2015.

SRIVASTAVA, S. et al. Arsenic Transport, Metabolism and Toxicity in Plants. **International Journal of Plant and Environment**, v. 2, n. 1–2, p. 279–285, 25 out. 2016.

SUN, G.-X. et al. Inorganic Arsenic in Rice Bran and Its Products Are an Order of Magnitude Higher than in Bulk Grain. **Environmental Science & Technology**, v. 42, n. 19, p. 7542–7546, out. 2008.

SURIYAGODA, L. D. B.; DITTEK, K.; LAMBERS, H. Mechanism of arsenic uptake, translocation and plant resistance to accumulate arsenic in rice grains. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 253, n. June 2017, p. 23–37, 2018.

SYU, C. H. et al. Arsenic accumulation and speciation in rice grains influenced by arsenic phytotoxicity and rice genotypes grown in arsenic-elevated paddy soils. **Journal of Hazardous Materials**, v. 286, p. 179–186, 2015.

TORRES-ESCRIBANO, S. et al. Total and inorganic arsenic concentrations in rice sold in Spain, effect of cooking, and risk assessments. **Environmental Science and Technology**, v. 42, n. 10, p. 3867–3872, 2008.

USDA, 2017. Economic Research Service - Rice Outlook. August 14, 2017. Disponível em: <https://www.ers.usda.gov/webdocs/publications/84727/rcs-17h.pdf?v=42961>. Acesso em: janeiro de 2018.

WANG, P. et al. The role of OsPT8 in arsenate uptake and varietal difference in arsenate tolerance in rice. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 21, p. 6051–

World Health Organization – WHO. Expert Committee on Food Additives. JECFAc; Discussion paper on possibility to develop a code of practice for the prevention and reduction of arsenic contamination in rice: seventh session, Moscow, Russian Federation, 2013.

WU, C. et al. Effects of silicon (Si) on arsenic (As) accumulation and speciation in rice (*Oryza sativa* L.) genotypes with different radial oxygen loss (ROL). **Chemosphere**, v. 138, p. 447–453, 2015.

WU, Z. et al. Investigating the Contribution of the Phosphate Transport Pathway to Arsenic Accumulation in Rice. **Plant Physiology**, v. 157, n. 1, p. 498–508, 2011.

XING, H. L. et al. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. **BMC Plant Biology**, v. 14, n. 1, p. 1–12, 2014.

XU, J. et al. OSHAC4 is critical for arsenate tolerance and regulates arsenic accumulation in rice. **New Phytologist**, v. 215, n. 3, p. 1090–1101, 2017.

XU, W. et al. Arabidopsis NIP3;1 plays an important role in arsenic uptake and root-to-shoot translocation under arsenite stress conditions. **Molecular Plant**, v. 8, n. 5, p. 722–733, 2015.

YAMAJI, N.; MA, J. F. Further characterization of a rice silicon efflux transporter, Lsi2. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 57, n. 2, p. 259–264, 2011.

YANG, H. C.; ROSEN, B. P. New mechanisms of bacterial arsenic resistance. **Biomedical Journal**, v. 39, n. 1, p. 5–13, 2016.

YIN, H.; KAUFFMAN, K. J.; ANDERSON, D. G. Delivery technologies for genome editing. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 16, n. 6, p. 387–399, 2017.

ZHANG, K. et al. Progress in Genome Editing Technology and Its Application in Plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. February, 2017.

ZHANG, S. Y. et al. Diversity and abundance of arsenic biotransformation genes in paddy soils from southern china. **Environmental Science and Technology**, v. 49, n. 7, p. 4138–4146, 2015.

ZHAO, F. J. et al. Arsenic uptake and metabolism in plants. **The New phytologist**, v. 181, n. 4, p. 777–94, 2009.

ZHAO, F.-J.; MCGRATH, S. P.; MEHARG, A. A. Arsenic as a Food Chain Contaminant: Mechanisms of Plant Uptake and Metabolism and Mitigation Strategies. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, n. 1, p. 535–559, 2010.

ZHENG, M. et al. Spatial distribution of arsenic and temporal variation of its concentration in rice. **New Phytologist**, v. 189, n. 1, p. 200–209, jan. 2011.

Apêndices

Apêndice 1

Características dos 93 genótipos (*Oryza sativa* spp. *indica* e *Oryza sativa* spp. *japonica*) cultivados na safra 2016/2017 para a quantificação do teor de arsênio em grãos de arroz.

Genótipo	Espécie	Genótipo	Espécie
Amarelo B	<i>O. sativa</i> spp. <i>japonica</i>	IAS 12-9 Formosa	<i>O. sativa</i> spp. <i>japonica</i>
Amaroo	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>	IRAT 124	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>
Arbório	<i>O. sativa</i> spp. <i>japonica</i>	IRAT 162	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>
Austral	<i>O. sativa</i> spp. <i>japonica</i>	IRGA 417	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>
Basmati 370	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>	IRGA 418	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>
Bluebelle	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>	IRGA 419	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>
BR IRGA 409	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>	IRGA 420	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>
BR IRGA 410	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>	IRGA 424 CL	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>
BR IRGA 411	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>	IRGA 427	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>
BR IRGA 412	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>	IRGA 428	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>
BR IRGA 413	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>	IRGA 429	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>
BR IRGA 414	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>	Japonês de Várzea	<i>O. sativa</i> spp. <i>japonica</i>
Brilhante	<i>O. sativa</i> spp. <i>japonica</i>	Jasmine	<i>O. sativa</i> spp. <i>japonica</i>
BRS 358	<i>O. sativa</i> spp. <i>japonica</i>	Jasmine 85	<i>O. sativa</i> spp. <i>japonica</i>
BRS 6 Chui	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>	Koshihikari	<i>O. sativa</i> spp. <i>japonica</i>
BRS 7 Taim	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>	Lemont	<i>O. sativa</i> spp. <i>japonica</i>
BRS AG	<i>O. sativa</i> spp. <i>japonica</i>	M1150	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>
BRS Agrisul	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>	M1313	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>
BRS Atalanta	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>	M1341	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>
BRS Bojuru	<i>O. sativa</i> spp. <i>japonica</i>	M1410	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>
BRS CIRAD 302	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>	M443	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>
BRS Firmeza	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>	Meio Chumbinho	<i>O. sativa</i> spp. <i>japonica</i>
BRS Formoso	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>	MNA PB 0405	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>
BRS Fronteira	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>	Nourin Mochi	<i>O. sativa</i> spp. <i>japonica</i>
BRS Ligeirinho	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>	OR 63-252	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>
BRS Pampa	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>	Puitá Inta CL	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>
BRS Pampeira	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>	Qualimax	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>
BRS Pelota	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>	Rexoro	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>
BRS Querência	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>	Sambuc	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>
BRS Sinuelo CL	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>	SC 173	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>
BRSA 701 CL	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>	SC 460	<i>O. sativa</i> spp. <i>japonica</i>
Cachinho	<i>O. sativa</i> spp. <i>japonica</i>	SCS 112	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>
Cacho Grande	<i>O. sativa</i> spp. <i>japonica</i>	SCS 114 AndoSan	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>
Carnaroli	<i>O. sativa</i> spp. <i>japonica</i>	SCS 115 CL	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>
Carolina	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>	SCS 116 Satoru	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>
EEA 404	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>	SCS 117 CL	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>
EEA 405	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>	SCS 118 Marques	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>
EMPASC 100	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>	SCS 119 Rubi	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>

EMPASC 101	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>	SCS 121 CL	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>
EMPASC 103	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>	SCS BRS 111	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>
EMPASC 104	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>	SCS BRS Tio Taka	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>
EMPASC 105	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>	Selenio	<i>O. sativa</i> spp. <i>japonica</i>
EPAGRI 106	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>	Soulanet	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>
EPAGRI 107	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>	Tetep	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>
EPAGRI 108	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>	Tomoe Mochi	<i>O. sativa</i> spp. <i>japonica</i>
EPAGRI 109	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>	Zebu	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>
Guri Inta CL	<i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i>		

Apêndice 2

Condições e parâmetros operacionais para análise ICP-MS.

Monitored Isotopes

<i>Helium Mode (LoD in $\mu\text{g L}^{-1}$)</i>	^{24}Mg (0.005), ^{31}P (32.9), ^{43}Ca (1.5), ^{52}Cr (0.006), ^{55}Mn (0.04), ^{57}Fe (0.3), ^{59}Co (0.0007), ^{63}Cu (0.01), ^{66}Zn (0.24), ^{75}As (0.11), ^{82}Se (0.25)
Internal standard (all modes)	^{193}Ir 10 $\mu\text{g L}^{-1}$
Peak pattern / Replicates / Sweeps	3 / 2 / 100
Radio Frequency Power	1550 W
Argon Flow Rate	15 L min^{-1}
Sample uptake / speed / stabilize	8 s / 0.4 rps / 4 s
Nebulizer pump (acquisition)	0.25 rps (all modes)
Carrier Nebulizer Gas Flow rate	1.07 L min^{-1}
Nebulizer type	Mira Mist™
Spray chamber	UHMI Quartz Spray Chamber
<i>Temperature</i>	2°C
Torch (2.5mm) sample depth	8 mm
Interface	Nickel cones
<i>Sampler cone</i>	1.0 mm
<i>Skimmer</i>	0.9 mm
Collision cell	Helium > 99.999 %

LoD: Limit of detection; rps: rotation per second.

Apêndice 3

Médias do acúmulo de As em grãos descascados (arroz integral) dos 93 genótipos de arroz.

Genótipos	Médias	
Brilhante	2810,5	A
Amarelo B	2601,3	A B
Selenio	2578,1	A B
EEA 405	2418,2	A B C
BR IRGA 411	2344,9	A B C D
Arbório	2162,7	A B C D E
IRAT 162	2156,2	A B C D E F
Lemont	2130,1	A B C D E F G
Nourin Mochi	2105,6	A B C D E F G H
Jasmine	2033,4	A B C D E F G H I
Tomoe Mochi	1959,5	B C D E F G H I J
IRGA 428	1920	B C D E F G H I J K
Koshihikari	1917,3	B C D E F G H I J K
EMPASC 100	1903,4	B C D E F G H I J K
Carolina	1862,9	B C D E F G H I J K L
SCS 119 Rubi	1843,8	B C D E F G H I J K L M
EEA 404	1827,1	B C D E F G H I J K L M
BRS Bojuru	1820,3	B C D E F G H I J K L M
Cacho Grande	1812,8	B C D E F G H I J K L M
BRS AG	1768,8	C D E F G H I J K L M N
MNA PB 0405	1656,2	C D E F G H I J K L M N O
SCS 115 CL	1652,8	C D E F G H I J K L M N O
BR IRGA 414	1639,8	C D E F G H I J K L M N O P
Carnaroli	1636,8	C D E F G H I J K L M N O P
BRS Pampa	1636,4	C D E F G H I J K L M N O P
Rexoro	1626	C D E F G H I J K L M N O P
SCS BRS 111	1600,5	D E F G H I J K L M N O P
BRS Agrisul	1593,4	D E F G H I J K L M N O P
Amaroo	1582,5	D E F G H I J K L M N O P
IAS 12-9 Formosa	1569,3	D E F G H I J K L M N O P
M1341	1541,4	E F G H I J K L M N O P Q
EPAGRI 106	1537,1	E F G H I J K L M N O P Q
Qualimax	1534,3	E F G H I J K L M N O P Q
BRS Pelota	1511,5	E F G H I J K L M N O P Q
Puitá Inta CL	1510,2	E F G H I J K L M N O P Q
Sambuc	1483,7	E F G H I J K L M N O P Q
BRS 6 Chui	1480,4	E F G H I J K L M N O P Q
IRGA 419	1476,1	E F G H I J K L M N O P Q
BRS CIRAD 3	1475	E F G H I J K L M N O P Q
BRS Formoso	1465,1	E F G H I J K L M N O P Q

Continua...

...Continuação

EMPASC 105	1459	E F G H I J K L M N O P Q
BRS 701 CL	1457,7	E F G H I J K L M N O P Q
Guri Inta CL	1448	E F G H I J K L M N O P Q
OR 63-252	1445,8	E F G H I J K L M N O P Q
BRS Atalanta	1445,6	E F G H I J K L M N O P Q
BR IRGA 413	1442,5	E F G H I J K L M N O P Q
M1150	1431,3	E F G H I J K L M N O P Q
BRS Sinuelo CL	1428,7	E F G H I J K L M N O P Q
IRGA 417	1428,5	E F G H I J K L M N O P Q
Japonês de Várzea	1395,1	E F G H I J K L M N O P Q
Austral	1376,6	E F G H I J K L M N O P Q
M443	1375,6	E F G H I J K L M N O P Q
SCS 116 Satoru	1369,2	F G H I J K L M N O P Q
BRS Firmeza	1351,1	G H I J K L M N O P Q
Meio Chumbinho	1349,3	G H I J K L M N O P Q
M1313	1348,4	G H I J K L M N O P Q
Cachinho	1347,1	G H I J K L M N O P Q
EPAGRI 107	1327	H I J K L M N O P Q
BRS Ligeirinho	1326,6	H I J K L M N O P Q
BRS 7 Taim	1319,3	H I J K L M N O P Q
IRGA 420	1318,6	H I J K L M N O P Q
IRGA 418	1302,9	I J K L M N O P Q
BRS Querência	1295,4	I J K L M N O P Q
BR IRGA 410	1288,9	I J K L M N O P Q
IRGA 427	1279,5	I J K L M N O P Q
IRGA 429	1276,7	I J K L M N O P Q
SCS BRS Tio Taka	1268,6	I J K L M N O P Q
BR IRGA 412	1250,2	I J K L M N O P Q
EPAGRI 108	1244,4	I J K L M N O P Q
M1410	1217,9	J K L M N O P Q
EPAGRI 109	1213,3	J K L M N O P Q
Soulanet	1211,9	J K L M N O P Q
BR IRGA 409	1211,1	J K L M N O P Q
Zebu	1207,3	J K L M N O P Q
BRS Pampeira	1203,5	J K L M N O P Q
SCS 118 Marques	1183	J K L M N O P Q
SCS 121 CL	1169	J K L M N O P Q
BRS 358	1166,7	K L M N O P Q
Bluebelle	1160,3	K L M N O P Q
EMPASC 103	1130	K L M N O P Q
IRAT 124	1092,2	L M N O P Q
Basmati 370	1080,1	L M N O P Q

Continua...

...Continuação

SCS 117 CL	1076	L M N O P Q
BRS Fronteira	1064,4	M N O P Q
Jasmine 85	1058,4	M N O P Q
SC 460	999,5	N O P Q
EMPASC 104	987,1	N O P Q
SC 460	999,5	N O P Q
EMPASC 104	987,1	N O P Q
EMPASC 101	965	O P Q
SCS 114 AndoSan	960,5	O P Q
SC 173	858,2	P Q
Tetep	857,3	P Q
IRGA 424 CL	768	Q
SCS 112	753,2	Q

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Apêndice 4

Médias do acúmulo de As em grãos polidos (arroz tipo branco) dos 93 genótipos de arroz.

Genótipos	Média	
Brilhante	2287,5	A
Selenio	2163,8	A B
Nourin Mochi i	2148	A B C
Amarelo B	2063,9	A B C D
SCS 119 Rubi	1924,5	A B C D E
SCS 115 CL	1908	A B C D E F
Tomoe Mochi	1880,2	A B C D E F
IRAT 162	1868	A B C D E F G
Bluebelle	1857,1	A B C D E F G H
Arbório	1818,9	A B C D E F G H I
Lemont	1781,8	A B C D E F G H I J
Koshihikari	1709,5	A B C D E F G H I J
Jasmine	1679,9	A B C D E F G H I J K
EMPASC 100	1676,1	A B C D E F G H I J K
BRS 7 Taim	1594,6	A B C D E F G H I J K L
MNA PB 0405	1583,4	A B C D E F G H I J K L M
EEA 404	1572,6	A B C D E F G H I J K L M
Rexoro	1570,8	A B C D E F G H I J K L M
Carnaroli	1566,1	A B C D E F G H I J K L M
BRS Pampa	1562,7	A B C D E F G H I J K L M
Cacho Grande	1531,9	A B C D E F G H I J K L M
IRGA 419	1518,4	A B C D E F G H I J K L M
EPAGRI 106	1505	A B C D E F G H I J K L M
IAS 12-9 Formosa	1464	A B C D E F G H I J K L M
Carolina	1457,7	A B C D E F G H I J K L M
Amaroo	1457,5	A B C D E F G H I J K L M
Guri Inta CL	1442,4	A B C D E F G H I J K L M
SCS BRS 111	1426,2	A B C D E F G H I J K L M
BRS AG	1406,8	A B C D E F G H I J K L M
BR IRGA 414	1391,9	A B C D E F G H I J K L M
BR IRGA 413	1390,1	B C D E F G H I J K L M
BRS 358	1386,7	B C D E F G H I J K L M
BRS Bojuru	1383,7	B C D E F G H I J K L M
BRS CIRAD 302	1381,1	B C D E F G H I J K L M
Zebu	1378,5	B C D E F G H I J K L M
M1341	1374,3	B C D E F G H I J K L M
Puita Inta	1313,6	B C D E F G H I J K L M
SCS 116 Satoru	1279,2	B C D E F G H I J K L M
BRS Sinuelo CL	1272,8	B C D E F G H I J K L M

Continua...

...Continuação

IRGA 417	1262,9	C D E F G H I J K L M
BRS Agrisul	1261,5	C D E F G H I J K L M
OR 63-252	1252,4	C D E F G H I J K L M
Meio Chumbinho	1250	D E F G H I J K L M
Qualimax	1246,5	D E F G H I J K L M
M443	1240,7	D E F G H I J K L M
IRGA 428	1238,2	D E F G H I J K L M
EEA 405	1231,2	D E F G H I J K L M
BRSA 701 CL	1208,3	D E F G H I J K L M
BRS Atalanta	1207,5	D E F G H I J K L M
Sambuc	1206,5	D E F G H I J K L M
EPAGRI 107	1206,2	D E F G H I J K L M
BRS 6 Chui	1198,8	D E F G H I J K L M
Soulanet	1190,8	D E F G H I J K L M
M1313	1185,6	D E F G H I J K L M
BRS Firmeza	1181,7	D E F G H I J K L M
IRGA 427	1179,8	D E F G H I J K L M
BR IRGA 411	1157,9	E F G H I J K L M
Japonês de Várzea	1156	E F G H I J K L M
Austral	1154,3	E F G H I J K L M
Cachinho	1148,5	E F G H I J K L M
SCS 118 Marques	1141,2	E F G H I J K L M
BR IRGA 412	1137,8	E F G H I J K L M
EPAGRI 109	1113,7	E F G H I J K L M
Jasmine 85	1092,3	E F G H I J K L M
BR IRGA 410	1090	E F G H I J K L M
IRGA 424 CL	1089,8	E F G H I J K L M
M1410	1080	E F G H I J K L M
SCS 121 CL	1072,9	E F G H I J K L M
BRS Ligeirinho	1065,2	E F G H I J K L M
BRS Pelota	1054,2	E F G H I J K L M
BRS Formoso	1045,7	E F G H I J K L M
BRS Pampeira	1045,3	E F G H I J K L M
M1150	1020,4	F G H I J K L M
SC 173	1019,5	F G H I J K L M
EPAGRI 108	1019,3	F G H I J K L M
IRGA 429	1012,6	F G H I J K L M
IRGA 418	977,1	G H I J K L M
BRS Fronteira	972	H I J K L M
SCS BRS Tio Taka	958	I J K L M
EMPASC 103	936,4	I J K L M

Continua...

...Continuação

BR IRGA 409	923,9	I J K L M
BRS Querência	914	J K L M
SCS 117 CL	908,2	J K L M
IRGA 420	907,6	J K L M
EMPASC 105	899,2	J K L M
EMPASC 101	894,3	J K L M
EMPASC 104	891,8	J K L M
Basmati 370	886,3	J K L M
SCS 114	811,3	K L M
AndoSan		
SC 460	787,8	K L M
IRAT 124	786,7	K L M
SCS 112	739,4	L M
Tetep	689,5	M

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Apêndice 5

Região codificadora (CDS) do gene *OsLsi2*

>Os03t0107300-01 Anion transporter, Silicon efflux transporter, Arsenic species (As) uptake

```

ATGAGTGAGCTTGCGTCGGCGCCCAAGGTGGCGCTTGGATCGATCGCGTTCGCGGTGTTCTGG
ATGATGGCGGTGTTCCCGTCGGTGCCGTTCTGCCGATCGGGCGGACGGCGGGGTCGCTGCTG
AGCGCGGTGCTGATGGTGATATTCCACGTGATCAGCCcgcgacgacgctacgcctccatcgacctcccaatcctgg
gcctcctcttcgccaCCATGGTGGTGGGCAGCTACCTCCGGAACGCCGGGATGTTCAAGCACCTGGGG
CGTCTGCTGGCGTGGAAGAGCCAGGGCGGGCGCGACCTCATGTGCCGCGTCTGCGTCGTCACC
GCCCTCGCCAGCGCCCTCTTCACCAACGACACCTGCTGCGTCGTCCTCACCGAGTTCGTCTCTCG
AGCTCGCCGCGGAGCGCAACCTCCCCGCCAAGCCCTTCCTCTCGCCCTCGCCTCCAGCGCCA
ACATCGGCTCCGCCGCCACCCCCATCGGCAACCCCCAGAACCTGGTCATCGCCTTCAATAGCAA
GATCACCTTCCCCAAGTTCCTCATGGGAATCCTCCCGGCCATGCTCGTCGGGATGGCCGTCAAC
ATGGTCATGCTGCTCTGCATGTACTGGAGGGAGCTGGGCGGAGGGGCCGAGCTCAGCGTCGAC
GGCAAGCAGATGGAGGCGGTGGAGGAAGGCAGGTCGCCGGCGTCGGCCAAGAGCACGCCGCA
GCTGAACGGCAACGGCAACACGATGATGTGCTGGAGATGTGCGGAGAACATAACGACCAAGCAC
CCATGGTTCATGCAGTGCACGGAGGCGCGGCGGAAGCTGTTCTCAAGAGCTTCGCGTACGTG
GTGACGGTGGGGATGGTGGTGGCCTACATGGTGGGGCTCAACATGTCGTGGACGGCCATCACC
ACGGCGCTGGCGCTGGTGGTGGTCGACTTCCGCGACGCCGAGCCGTGCCTGGACACCGTGTCC
TACTCGCTGCTCGTCTTCTTCTCCGGGATGTTTCATCACCGTCAGCGGCTTCAACAAGACGGGCCT
CCCGGGAGCCATCTGGGacttcatggccccctactccaaggtcaacagcgctcggcgcatctccgtcctctccgtcatcatcctcctc
ctctccaacctcgcatcaaacgtaccaacggTGCTTCTTATGGGTGATGAGGTGGCGAAGGCGGCGGCGCTGA
TATCGCCGCGCGGCGGTGACGACGTCGTGGCTGCTGCTGGCGTGGGTGAGCACGGTGGCGGGG
AACCTGTCGCTGCTGGGGTCGGCGGCGAACCTGATAGTGTGCGAGCAGGCGAGGAGGGCGCC
CAGGAACGCCTACGACCTCACCTTCTGGCAGCACATCGTCTTCGGCGTCCCATCCACCCTCATC
GTCACCGCCGTCGGCATACCCCTCATCGGCAAGATCTGA

```

Apêndice 6

Foi encaminhado para Coordenação de Inovação Tecnológica da Universidade Federal de Pelotas o pedido de patente da edição do gene *OsLsi2* através do uso da tecnologia CRISPR/Cas9, visando a tradução de uma proteína truncada, como meio de interromper o transporte de arsênio para os grãos de arroz.

Pedido registrado sob o número: 23110.104107/2017-31.