

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Soja
Ministério da Agricultura e Pecuária*

Eventos Técnicos & Científicos

4

Julho, 2024

RESUMOS EXPANDIDOS

19ª Jornada Acadêmica da Embrapa Soja

**30 e 31 de julho de 2024
Londrina, PR**

Embrapa Soja
Londrina, PR
2024

Embrapa Soja
Rodovia Carlos João Strass, acesso Orlando Amaral, Distrito de Warta
Caixa Postal 231, CEP 86001-970, Londrina, PR
Fone: (43) 3371 6000
Fax: (43) 3371 6100
www.embrapa.br/soja
<https://www.embrapa.br/fale-conosco/sac/>

Comitê de Publicações da Embrapa Soja
Presidente: *Roberta Aparecida Carnevalli*
Secretário-executivo: *Regina Maria Villas Bôas de Campos Leite*
Membros: *Claudine Dinali Santos Seixas, Clara Beatriz Hoffmann-Campo, Fernando Augusto Henning, Ivani de Oliveira Negrão Lopes, Leandro Eugênio Cardamone Diniz, Maria Cristina Neves de Oliveira, Mônica Juliani Zavaglia Pereira e Norman Neumaier*

Edição executiva: *Vanessa Fuzinatto Dall'Agnol*
Normalização: *Valéria de Fátima Cardoso*
Diagramação: *Marisa Yuri Horikawa*
Organização da publicação: *Regina Maria Villas Bôas de Campos Leite, Larissa Alexandra Cardoso Moraes, Kelly Catharin*

1ª edição
Publicação digital: PDF

As opiniões emitidas nesta publicação são de exclusiva e de inteira responsabilidade dos autores, não exprimindo, necessariamente, o ponto de vista da Embrapa.

É de responsabilidade dos autores a declaração afirmando que seu trabalho encontra-se em conformidade com as exigências da Lei nº 13.123/2015, que trata do acesso ao Patrimônio Genético e ao Conhecimento Tradicional Associado.

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) Embrapa Soja

Jornada Acadêmica da Embrapa Soja (19. : 2024: Londrina, PR).
Resumos expandidos [da] XIX Jornada Acadêmica da Embrapa Soja, Londrina, PR, 30 e 31 de julho de 2024 -- Londrina : Embrapa Soja, 2024.
PDF (111 p.) -- (Eventos técnicos & científicos / Embrapa Soja, ISSN 0000-0000 ; 4)
1. Soja. 2. Pesquisa agrícola. I. Título. II. Série.

CDD (21. ed.) 630.2515

Eficiência de antibióticos na inibição da estirpe EHA-105 de *Agrobacterium tumefaciens*

Camila Bayer⁽¹⁾, Maria Teresa Magnani Coppo⁽²⁾, Thais Monteiro Miranda⁽³⁾, Bárbara Nicole Dabolt⁽⁴⁾, Alexandre Lima Nepomuceno⁽⁵⁾, Liliane Marcia Mertz-Henning⁽⁵⁾

⁽¹⁾Estudante de Agronomia, Centro Universitário Filadélfia, bolsista PIBIC/CNPq, Londrina, PR. ⁽²⁾Estudante de Agronomia, Universidade Norte do Paraná, bolsista PIBIC/CNPq, Londrina, PR. ⁽³⁾Estudante de Agronomia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS. ⁽⁴⁾Estudante de Agronomia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, PR. ⁽⁵⁾Pesquisador, Embrapa Soja, Londrina, PR.

Introdução

As bactérias são ferramentas importantes para a biotecnologia, dentre as quais podemos destacar *Escherichia coli*, empregada para a clonagem de genes e construção de vetores e *Agrobacterium tumefaciens* que é utilizada na transformação de plantas (Hwang et al., 2017). Desta forma, os antibióticos são importantes agentes seletivos para a seleção de recombinantes e para a inibição do crescimento da *Agrobacterium* sp. após o processo de transformação.

Meropenem (M) é um antibiótico carbapenêmico que tem uma excelente atividade antimicrobiana contra quase todas as bactérias aeróbicas e anaeróbicas clinicamente relevantes, comumente aplicado para o tratamento de infecções contra bactérias resistentes a antibióticos beta-lactâmicos de espectro estendido (Edwards, 1995; Mukhopadhyay et al., 2019). Cefotaxima (CF) é empregada em laboratório para a inibição da *Agrobacterium* spp (Jones; Thornsberry, 1982; Priya et al., 2012; Nauerby et al., 1997). Espectinomicina (SP) e canamicina (CN) são utilizadas em laboratórios de biotecnologia como agentes seletivos, no qual a resistência a esses antibióticos é conferida através de genes integrados as construções dos vetores de clonagem e transformação (Alvarez; Ordás, 2013).

Entretanto, a resistência a antibióticos pode variar de acordo com a estirpe bacteriana utilizada. Para a estirpe EHA-105 de *A. tumefaciens*, que é uma das mais virulentas e eficientes na transformação de plantas, a resistência a antibióticos passa a ser um problema no posterior cultivo *in vitro* (Torregrosa et al., 2002). O cultivo *in vitro* é uma importante etapa após a transformação para o desenvolvimento e regeneração dos explantes, e a contaminação por bactérias é o principal empecilho durante este processo (Scherwinski-Pereira, 2010).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de diferentes antibióticos sobre o crescimento da estirpe EHA-105 de *Agrobacterium tumefaciens*.

Material e métodos

Estirpe bacteriana e preparação do inóculo

A estirpe EHA-105 de *Agrobacterium tumefaciens* foi ativada a partir de um estoque em glicerol (25%) mantido a -80 °C. A ativação foi realizada por esgotamento com o auxílio de uma alça bacteriológica para a obtenção de colônias isoladas. O meio de cultura utilizado foi o LB ágar, preparado seguindo as recomendações do fabricante. A placa de ativação foi incubada por 72h a 28 ± 2 °C no escuro.

O inóculo foi preparado em meio LB líquido suplementado com rifampicina (50 mg/L), a estirpe utilizada apresenta resistência cromossômica a este antibiótico. Foi inoculado uma colônia em 10 mL de meio líquido em tubo falcon de 50 mL, submetido a agitação orbital a 160 rpm e 28 °C por 24 horas.

Após o período de incubação a bactéria atingiu a fase estacionária de crescimento (1,9 em O.D. 600). Esta cultura foi utilizada para avaliação de todos os antibióticos pela metodologia da difusão em poço sobre “top ágar”.

Preparo das placas de difusão em top ágar

Inicialmente foi adicionando cerca de 15 mL de LB ágar (ágar 1,5%), em seguida, após a completa solidificação, foram dispostas a base cortada de ponteiras estéreis de 200 µL sobre o meio, de forma circular e equidistante. As ponteiras, tem como função formar um poço no qual foram posteriormente adicionados os antibióticos.

Paralelamente, foram misturados LB ágar e LB líquido na proporção de 1:1, desta forma, reduzindo a concentração do ágar pela metade (ágar 0,75%). O LB com ágar reduzido foi inoculado com equivalente a 0,4 µL/ mL da cultura estacionária, somente quando o meio apresentava uma temperatura próxima a 40 °C. Imediatamente após a inoculação, 15 mL do meio inoculado foi cuidadosamente vertido no centro das placas previamente preparadas, contendo o LB ágar (1,5%) com as bases das ponteiras dispostas sobre o meio. Após a completa solidificação do meio inoculado (aproximadamente 30 minutos), as ponteiras foram removidas cuidadosamente com o auxílio de uma pinça estéril.

Foram avaliados quatro antibióticos em triplicata, totalizando 12 placas. Os tratamentos consistiram em cinco diferentes concentrações para cada um dos antibióticos. As concentrações avaliadas variaram de acordo com cada antibiótico, no qual a concentração na terceira dose foi definida como o padrão recomendado na literatura. Somente água destilada autoclavada foi utilizada na dose zero. Em cada poço foi adicionado 40 µL do antibiótico em suas respectivas concentrações. Os antibióticos e as concentrações avaliadas estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Antibióticos e suas respectivas concentrações utilizados na inibição do crescimento da estirpe EHA-105.

Antibióticos	Concentrações avaliadas (mg/L)				
	0	100	200	400	800
Cefotaxima	0	100	200	400	800
Canamicina	0	25	50	100	200
Espectinomicina	0	25	50	100	200
Meropeném	0	12,5	25	50	100

Variáveis analisadas e análise estatística

As avaliações consistiram em medições do diâmetro do halo de inibição realizadas ao 1° , 4° e 6° dias após a inoculação. O experimento foi conduzido em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) e os dados avaliados por ANOVA a 5% de significância e posteriormente ajustados ao modelo de regressão não linear de Mitscherlich, no software Rstudio, utilizando o pacote AgroReg.

Resultados e discussão

Todos os antibióticos avaliados apresentaram efeito de inibição contra a estirpe EHA-105, contudo, a eficiência variou significativamente dependendo do antibiótico e da dose utilizada (Tabela 2). O M e a CF foram os antibióticos que apresentaram a maior inibição, ajustando-se ao modelo não linear de Mitscherlich (Figura 1). As inibições aumentaram rapidamente em função das doses, tendendo a se estabilizar a partir da terceira dose. Para o M, a maior inibição no primeiro dia foi de 3,97 cm na dose de 100 mg/L, entretanto, o uso de concentração quatro vezes menor do antibiótico (25 mg/L), apresentou 75% dessa inibição, sendo, portanto, a dose com melhor custo-benefício.

Tabela 2. Médias do halo de inibição de diferentes antibióticos em função das doses no decorrer dos dias de avaliação.

Meropeném						
DOSE	1º DIA	4º DIA	6º DIA			
0,0	0,00	e	0,00	d	0,00	d
12,5	2,50	d	2,47	c	2,23	c
25,0	2,97	c	3,07	b	2,83	b
50,0	3,43	b	3,60	a	3,40	a
100,0	3,97	a	3,97	a	3,80	a
CV(%)	1,74		6,39		6,98	

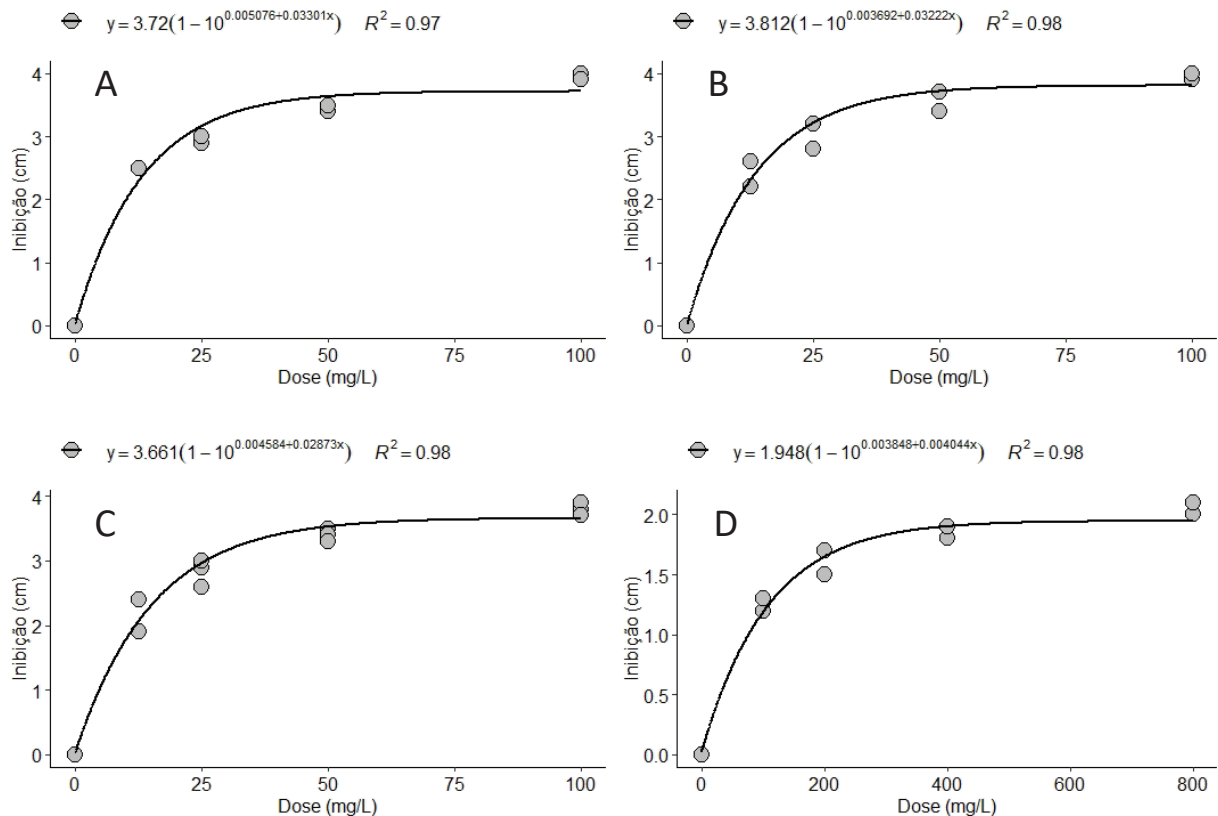
Cefotaxima						
DOSE	1º DIA	4º DIA	6º DIA			
0	0,00	e	0,00	c	0,00	-
100	1,27	d	0,00	c	0,00	-
200	1,57	c	0,00	c	0,00	-
400	1,83	b	1,80	b	0,00	-
800	2,03	a	2,17	a	1,90	-
CV(%)	5,10		8,61		-	

Canamicina						
DOSE	1º DIA	4º DIA	6º DIA			
0	0	b	0	b	0	-
25	0	b	0	b	0	-
50	0	b	0	b	0	-
100	0	b	0	b	0	-
200	2,5	a	2,4	a	0	-
CV(%)	-	-	-	-	-	-

Espectinomicina						
DOSE	1º DIA	4º DIA	6º DIA			
0	0	b	0	-	0	-
25	0	b	0	-	0	-
50	0	b	0	-	0	-
100	0	b	0	-	0	-
200	1,1	a	0	-	0	-
CV(%)	-	-	-	-	-	-

*Médias seguidas das mesmas letras não diferem pelo teste Tukey a 5% de significância.

A CF apresentou o mesmo ajuste de inibição em função das doses, todavia, com uma inibição máxima estimada em 1,95 cm. Em relação ao M, a CF inibiu cerca de 50% menos (Figura 1D). Além de apresentar menor potencial de inibição, a CF mostra-se viável somente na dose de 200 mg/L, cerca de 10x a concentração do M.

**Figura 1.** Ajustes de Mitscherlich do halo de inibição em função da dose. (A) Meropeném dia 1; (B) Meropeném dia 4; (C) Meropeném dia 6; (D) Cefotaxima dia 1.

Para a CN e SP, os desempenhos foram inferiores, havendo somente inibição na maior dose avaliada (200 mg/L), com 2,5 e 1,1 cm de inibição respectivamente (Tabela 2). Estes resultados não eram esperados, uma vez que, a estirpe utilizada não apresentava nenhum tipo de resistência a esses antibióticos, sendo estes comumente utilizados como agentes seletivos em vetores de transformação, na concentração de 50 mg/L (Brasileiro; Carneiro, 1998). Apesar disso, a utilização destes antibióticos em meio líquido inibe o crescimento bacteriano, não sendo recomendado o seu uso em meio semissólido.

Progressivamente, observou-se uma perda da atividade antimicrobiana e o crescimento da bactéria nas placas contendo os antibióticos CF, CN e SP. A redução da atividade, foi evidente na CF, na qual as doses de 400 e 800 mg/L apresentaram alguma inibição no 4° dia e somente a maior dose no 6° dia. Não foi observada nenhuma inibição no 4° e 6° dia para SP e para CN no 6° dia (Tabela 2). Todavia o M mostrou-se estável no decorrer de todo o período. Contudo a estabilidade do M pode variar dependendo da solução de reconstituição do antibiótico, da concentração final e da temperatura (Patel; Cook, 1997).

Conclusões

Meropeném foi o melhor antibiótico para a inibição da estirpe EHA-105 de *Agrobacterium tumefaciens*, o qual apresentou o melhor custo-benefício, estabilidade e eficiência. A dose recomendada é a de 25 mg/L.

Referências

ALVAREZ, J. M.; ORDÁS, R. J. Stable *Agrobacterium*-mediated transformation of maritime pine based on kanamycin selection. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 681792, 2013. DOI: 10.1155/2013/681792.

BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. de C. (ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI; EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 309 p.

EDWARDS, J. R. Meropenem: a microbiological overview. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 36, suppl_A, p. 1-17, 1995.

HWANG, H.; YU, M.; LAI, E. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: biology and applications. **The Arabidopsis Book**, v. 15, e0186, 2017. DOI: 10.1199/tab.0186.

JONES, R. N.; THORNSBERRY, C. Cefotaxime: a review of in vitro antimicrobial properties and spectrum of activity. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 4, n. suppl. 2, p. S300-S315, 1982.

MUKHOPADHYAY, S.; WADE, K. C.; PUOPOLO, K. M. Drugs for the prevention and treatment of sepsis in the newborn. **Clinics in Perinatology**, v. 46, n. 2, p. 327-347, 2019.

NAUERBY, B.; BILLING, K.; WYNDAELE, R. Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration compared to carbenicillin and cefotaxime in concentrations suitable for elimination of *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Science**, v. 123, n. 1-2, p. 169-177, 1997.

PATEL, P. R.; COOK, S. E. Stability of meropenem in intravenous solutions. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 54, n. 4, p. 412-421, 1997.

PRIYA, A. M.; PANDIAN, S. K.; MANIKANDAN, R. The effect of different antibiotics on the elimination of *Agrobacterium* and high frequency *Agrobacterium*-mediated transformation of indica rice (*Oryza sativa* L.). **Czech Journal of Genetic Plant Breeding**, v. 48, n. 3, p. 120-130, 2012. DOI: 10.17221/77/2011-CJGPB

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. (ed.). **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. 446 p.

TORREGROSA, L.; IOCCO, P.; THOMAS, M. R. Influence of *Agrobacterium* strain, culture medium, and cultivar on the transformation efficiency of *Vitis vinifera* L. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 53, n. 3, p. 183-190, 2002.