

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

Eventos Técnicos & Científicos

4

Julho, 2024

RESUMOS EXPANDIDOS

19^a 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

Métodos de infecção de *Agrobacterium rhizogenes* sobre o crescimento de raízes na transformação transiente de explantes de soja *in vitro*

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

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

Introdução

A biotecnologia é uma importante ferramenta utilizada na indústria, na saúde e também na agricultura, onde o uso de ferramentas biotecnológicas permitiu significativos avanços de produtividade principalmente em commodities como milho e soja. Esses incrementos estão principalmente associados a transgenias que conferem às plantas resistência a herbicidas e a pragas (Azadi et al., 2015). De acordo com Scandizzo e Savastano (2010), o uso de culturas transgênicas permitiu grandes incrementos de produtividade, sendo considerada uma revolução nos sistemas agrícolas quando comparado às técnicas utilizadas no final dos anos 1980. Em soja, a produtividade na safra 2009/2010 foi de aproximadamente 2,9 t/ha e alcançou 3,5 t/ha na safra de 2022/2023, sendo que parte deste aumento nas taxas de produtividade se deve a adoção dos cultivos transgênicos associados a melhores práticas agrícolas e ganhos genéticos (Conab, 2024).

Apesar dos benefícios na transformação genética de plantas, a regulamentação de OGMs (Organismos Geneticamente Modificados) é onerosa e demanda a aprovação de diversas agências reguladoras, o que torna o processo lento e burocrático. Atualmente, novas técnicas como a edição gênica via CRISPR permite a manipulação de genes sem a incorporação de elementos exógenos ao genoma da planta, podendo assim ser considerado como um organismo geneticamente modificado não transgênico (Van Vu et al., 2022).

As técnicas de transformação de plantas são geralmente trabalhosas, com baixa eficiência e na qual cultivares elites são recalcitrantes aos processos de transformação, o que resulta no aumento do tempo necessário desde a transformação até posterior avaliação fenotípica (Son; Park, 2022). A escolha dos genes candidatos à edição é chave para garantir o sucesso do procedimento, uma vez que a edição de um único gene pode resultar em respostas parciais ou nulas, devido à existência de genes homólogos ou em múltiplas cópias. Outra limitação é a baixa eficiência dos RNA guias no processo de edição (Naim et al., 2020).

A transformação transiente é uma abordagem mais simples e rápida que permite a validação de múltiplos guias na edição de diferentes genes candidatos. A transformação mediada por *Agrobacterium rhizogenes* em soja resulta na geração de raízes transgênicas, as quais podem ser posteriormente sequenciadas para confirmação da edição gênica desejada. No entanto, o desenvolvimento e crescimento das raízes podem ser afetados de acordo com a diferentes metodologias de infecção (Kereszt et al., 2007; Ron et al., 2014).

O método mais comumente utilizado na transformação com *A. rhizogenes* é a infiltração a vácuo, que consiste na aplicação de vácuo nos explantes na presença do caldo bacteriano permitindo assim que as bactérias se infiltrem nos tecidos da radícula (Arun et al., 2015; Theboral et al., 2017). Outro método utilizado é a realização de injúrias nos tecidos, as quais podem ser realizadas por perfurações ou pequenas raspagens de forma mecânica, com o auxílio de um bisturi ou uma pequena escova metálica (*brush*) (Yamada et al., 2010). Ambos os métodos apresentam vantagens, o vácuo pela padronização, rapidez e menor demanda de trabalho e o *brush* pela simplicidade, por não requerer nenhum equipamento ou etapa adicional.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento e desenvolvimento radicular de explantes de soja transformados com diferentes métodos de infecção por *Agrobacterium rhizogenes*.

Material e métodos

Inóculo e material vegetal

A estirpe de *A. rhizogenes* utilizada foi K599, transformada com o vetor pRAF-17-Tc. Uma placa de ativação foi preparada com meio LB ágar suplementado com os antibióticos tetraciclina (5 mg/L) e espectinomicina (50 mg/L). A placa foi estriada a partir de um estoque em glicerol mantido a -80 °C, e posteriormente incubada a 28 °C no escuro por 4 dias para a obtenção de colônias isoladas. O inóculo foi preparado a partir de uma única colônia, crescida em 100 mL de meio LB líquido em um erlenmeyer de 250 mL. O meio foi suplementado com os antibióticos descritos acima, e mantido sob agitação em shaker orbital a 160 rpm por 3 dias.

Sementes selecionadas da cultivar BRS 573 foram esterilizadas por expurgo em gás cloro. Aproximadamente 70 sementes foram colocadas em placas de petri de 60 mm de diâmetro mantidas abertas em um recipiente com tampa hermética, contendo 100 mL de hipoclorito de sódio comercial (2,5%) em um béquer ao qual foi adicionado 5 mL de ácido clorídrico concentrado (36 %), para liberação do gás cloro e o recipiente foi fechado. As sementes permaneceram por 16 h em expurgo, posteriormente as placas foram fechadas e seladas com plástico filme e mantidas em refrigeração (4 °C) até o momento do uso.

Transformação e condições de cultivo

As sementes esterilizadas foram entumecidas em placas de petri contendo meio de germinação, com sais da formulação Gamborg, suplementados com 3 % de sacarose e gelificado com 0,6 % de ágar bacteriológico. As sementes foram dispostas sobre o meio com o hilo para baixo, adicionados cerca de 6 mL de água estéril e em seguida as placas foram incubadas em câmara de crescimento a 28 °C e e fotoperíodo de 16h:8h, por 20h.

No dia da transformação o inóculo previamente crescido foi subdividido em 4 tubos falcon de 50 mL e centrifugado a 3.300 x g por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet bacteriano ressuscitado em meio de co-cultivo (CCM), após a ressuspensão foi adicionado 2 µL/mL de acetoseringona (1M), e reservada até o momento da inoculação.

Foram realizados 4 diferentes métodos de infecção: vácuo e *brush*, com e sem o meristema radicular. Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram cortadas ao meio no hilo mantendo o embrião íntegro, as partes contendo o embrião foram imersas em água estéril dentro de uma placa de petri para facilitar a remoção do tegumento, em seguida foram transferidas para uma outra placa contendo o inóculo previamente preparado.

Para os tratamentos que tiveram o meristema radicular removidos, cerca de 2 mm da radícula do embrião foi cortada com o auxílio de um bisturi. Nos tratamentos com o *brush*, suaves raspagens foram realizadas na região correspondente a radícula. Em vácuo, o inóculo e as sementes foram transferidas para um tubo falcon 50 mL e colocadas dentro de um dessecador no qual com auxílio de uma bomba de vácuo foi aplicado um vácuo de 34 KPa por 2 minutos. Os explantes foram então transferidos para os potes de polipropileno (250 mL) contendo 30 mL de meio ágar-água suplementado com IBA (1 mg/mL). Os potes foram transferidos para a câmara de crescimento (28 °C e fotoperíodo de 16h:8h) e mantidos por 10 dias.

Parâmetros avaliados e análises estatísticas

Foram avaliados o comprimento da maior raiz (CMR), a área radicular total (ART), a massa seca de raízes (MSR), e a contagem do número de plantas com sistema radicular bem desenvolvido (N°R). O CMR foi mensurado com uma régua da região do colo até a ponta da maior raiz. A ART foi estimada através de imagens pelo programa SISCOB. A MSR foi obtida pela pesagem em balança analítica após a secagem das raízes em estufa de circulação de ar forçado a 45 °C por 3 dias. O N°R foi obtido por contagem, avaliando a frequência de raízes consideradas bem desenvolvidas, que apresentavam no mínimo 3 raízes com 4 cm de comprimento.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x2, sendo dois níveis de injúria (*vácuo* e *brush*) e com e sem a remoção do meristema apical da raiz. Cada tratamento foi realizado com 4 repetições, sendo cada repetição um pote contendo 10 explantes. Os dados foram testados quanto a normalidade e homogeneidade de variância e posteriormente analisados por ANOVA a 5 % de significância, e as médias separadas pelo teste de Tukey, pelo software estatístico Rstudio, utilizando o pacote AgroR.

Resultados e discussão

De acordo com a análise de variância, não foi observado interação entre os fatores injúria e corte, para nenhuma das variáveis analisadas. Em relação aos fatores principais isolados, o corte não apresentou diferenças significativas, entretanto, para o fator injúria foram observadas significâncias para todas as variáveis (Tabela 1)

Tabela 1. Probabilidade de erro de acordo com a análise de variância (ANOVA), dos fatores, injúria, corte e da interação. (CMR) - Comprimento da maior raiz, (MSR) - Massa seca de raízes, (ART) - Área radicular total e (N°R) - Número de plântulas com raízes desenvolvidas.

	Pr(F)			
	CMR	MSR	ART	N°R
INJÚRIA	0.0249	0.0198	0.0162	0.0009
CORTE	0.5452	0.7565	0.8380	0.0866
INJ x COR	0.6398	0.3542	0.8685	0.5455

O desenvolvimento e crescimento radicular foi afetado principalmente pelo tipo de injúria, sendo a infiltração a vácuo o método que propiciou os melhores resultados. Para o CMR, os tratamentos que receberam a injúria pelo *brush* tiveram médias de 5,14 cm, quando a injúria foi realizada através do vácuo infiltração, o comprimento médio foi de 7,08 cm, correspondendo a um incremento de 37,7 %. Para a MSR, as médias foram de 0,049 para 0,066 entre os tratamentos *brush* e vácuo respectivamente, resultando em 34,7 % de incrementos. Para a ART, os ganhos foram ainda mais expressivos, correspondendo a 51,1 % de aumento onde as médias foram de 12,65 para 19,11 cm²/pote com a utilização do vácuo (Tabela 2).

Vale considerar que, como cada repetição (pote) corresponde à média de 10 explantes, a quantidade de explantes que apresentaram sistema radicular com um bom desenvolvimento (N°R) é um parâmetro relevante a ser considerado, uma vez que a desuniformidade entre os indivíduos dentro de cada repetição não é representada, quando considerado somente o valor médio. Assim, quando analisado o (N°R) ficou evidente que a utilização do vácuo também proporcionou o maior número de plantas com o sistema radicular bem desenvolvido, passando de 3,25 para 6,75 (Tabela 2).

Uma das prováveis causas do melhor desempenho do vácuo em relação ao *brush* é devido a uma menor manipulação do explante, além de ser uma forma de infecção menos agressiva, resultando, em menores danos aos tecidos que permitiu o desenvolvimento de forma mais natural. Em contrapartida, o *brush* resulta em lesões e ferimentos mecânicos nos tecidos do embrião, o

qual, devido à sensibilidade dos períodos iniciais de desenvolvimento, têm maior dificuldade em se desenvolver e crescer, devido a um aumento da oxidação resultante dessas injúrias.

Apesar dos resultados benéficos na utilização do vácuo e da importância de um bom desenvolvimento radicular, vale ressaltar que a eficiência de transformação não foi avaliada no presente trabalho, a qual será realizada posteriormente. De acordo com Yamada et al. (2010), a utilização do brush é recomendada para a transformação de explantes visando a obtenção de brotações, na qual a eficiência de transgenia está ao redor de 4 %, por sua vez a eficiência de transformação utilizando a vácuo infiltração combinado a sonicação, pode atingir até 76 % dependendo da estirpe de *A. rhizogenes* utilizada (Theboral et al., 2017).

Tabela 2. Médias das variáveis: (CMR) - Comprimento da maior raiz, (MSR) - Massa seca de raízes, (ART) - Área radicular total e (N°R) - Número de plântulas com raízes desenvolvidas, de explantes submetidos a transformação *A. rhizogenes*, inoculadas por (B) - Brush ou (V) - Vácuo infiltração, com o meristema radicular (NC) - Não cortado e (C) - Cortado.

CMR						
	NC		C		Média	CV(%)
B	5.20	Ba*	5.09	Ba	5.14	B
V	7.50	Aa	6.66	Aa	7.08	A
Média	6.35	a	5.88	a		
MSR						
	NC		C		Média	CV(%)
B	0.051	Ba	0.047	Ba	0.049	B
V	0.062	Aa	0.070	Aa	0.066	A
Média	0.057	a	0.059	a		
ART						
	NC		C		Média	CV(%)
B	13.09	Ba	12.22	Ba	12.65	B
V	19.16	Aa	19.06	Aa	19.11	A
Média	16.12	a	15.64	a		
N°R						
	NC		C		Média	CV(%)
B	4.25	Ba	2.25	Ba	3.25	B
V	7.25	Aa	6.25	Aa	6.75	A
Média	5.75	a	4.25	a		

*Médias seguidas da mesma letra, maiúsculas entre linhas e minúsculas dentro da linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Conclusões

A utilização da vácuo-infiltração como método de injúria foi superior ao “método de brush” no desenvolvimento e crescimento radicular de explantes de soja transformados com *Agrobacterium rhizogenes*.

O corte do meristema apical radicular não resultou em alterações significativas, nos parâmetros de enraizamento.

Referências

- ARUN, M.; SUBRAMANYAM, K.; MARIASHIBU, T. S.; THEBORAL, J.; SHIVANANDHAN, G.; MANICKAVASAGAM, M.; GANAPATHI, A. Application of sonication in combination with vacuum infiltration enhances the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in Indian soybean cultivars. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 4, p. 2266-2287, 2015. DOI: 10.1007/s12010-014-1360-x.
- AZADI, H.; GHANIAN, M.; GHOOCHANI, O. M.; RAFIAANI, P.; TANING, C. N. T.; HAJIVAND, R. Y.; DOGOT, T. Genetically modified crops: towards agricultural growth, agricultural development, or agricultural sustainability? **Food Reviews International**, v. 31, n. 3, p. 195-221, 2015. DOI: 10.1080/87559129.2014.994816.
- CONAB. **Série histórica das safras: soja**. [2024]. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/serie-historica-das-safras/itemlist/category/911-soja>. Acesso em: 25 jun. 2024.
- KERESZT, A.; LI, D.; INDRASUMUNAR, A.; NGUYEN, C. D.; NONTACHAIYAPOOM, S.; KINKEMA, M.; GRESSHOFF, P. M. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of soybean to study root biology. **Nature protocols**, v. 2, n. 4, p. 948-952, 2007. DOI: 10.1038/nprot.2007.141.
- NAIM, F.; SHAND, K.; HAYASHI, S.; O'BRIEN, M.; MCGREE, J.; JOHNSON, A. A. T.; DUGDALE, B.; WATERHOUSE, P. M. Are the current gRNA ranking prediction algorithms useful for genome editing in plants? **PLoS One**, v. 15, n. 1, p. e0227994, 2020. DOI: 10.1371/journal.pone.0227994.
- RON, M.; KAJALA, K.; PAULUZZI, G.; WANG, D.; REYNOSO, M. A.; ZUMSTEIN, K.; GARCHA, J.; WINTE, S.; MASSON, H.; INAGAKI, S.; FEDERICI, F.; SINHA, N.; DEAL, R. B.; BAILEY-SERRES, J.; BRADY, S. M. Hairy root transformation using *Agrobacterium rhizogenes* as a tool for exploring cell type-specific gene expression and function using tomato as a model. **Plant Physiology**, v. 166, n. 2, p. 455-469, 2014. DOI: 10.1104/pp.114.239392.
- SCANDIZZO, P. L.; SAVASTANO, S. The adoption and diffusion of gm crops in United States: a real option approach. **AgBioForum**, v. 13, p. 142-157, 2010.
- SON, S.; PARK, S. R. Challenges facing CRISPR/Cas9-based genome editing in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 902413, 2022. DOI:10.3389/fpls.2022.902413.
- THEBORAL, J.; ARUN, M.; MANICKAVASAGAM, M.; NATESAN, S.; GANAPATHI, A. Sonification and vacuum infiltration enhanced *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation in soybean. **Innovare Journal of Agriculture Science**, v. 5, n. 2, p. 1-8, 2017.
- VAN VU, T.; DAS, S.; HENSEL, G.; KIM, J. Y. Genome editing and beyond: what does it mean for the future of plant breeding? **Planta**, v. 255, n. 6, p. 130, 2022. DOI: 10.1007/s00425-022-03906-2.
- YAMADA, T.; WATANABE, S.; ARAI, M.; HARADA, K.; KITAMURA, K. Cotyledonary node pre-wounding with a micro-brush increased frequency of *Agrobacterium*-mediated transformation in soybean. **Plant Biotechnology**, v. 27, n. 2, p. 217-220, 2010. DOI: 10.5511/plantbiotechnology.27.217.