

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

DOCUMENTOS 446

XVII Jornada Acadêmica da Embrapa Soja Resumos expandidos

*Regina Maria Villas Bôas de Campos Leite
Larissa Alexandra Cardoso Moraes
Kelly Catharin*
Editoras Técnicas

Embrapa Soja
Londrina, PR
2022

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Soja
Rod. Carlos João Strass, s/n
Acesso Orlando Amaral, Distrito da Warta
CEP 86065-981
Caixa Postal 4006
Londrina, PR
Fone: (43) 3371 6000
www.embrapa.br/soja
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

**Comitê Local de Publicações
da Embrapa Soja**

Presidente
Alvadi Antonio Balbinot Junior

Secretária-Executiva
Regina Maria Villas Bôas de Campos Leite

Membros
*Claudine Dinali Santos Seixas, Edson Hirose,
Ivani de Oliveira Negrão Lopes, José de Barros
França Neto, Liliane Márcia Mertz-Henning,
Marco Antonio Nogueira, Mônica Juliani
Zavaglia Pereira, Norman Neumaier*

Supervisão editorial
Vanessa Fuzinato Dall'Agnol

Normalização bibliográfica
Valéria de Fátima Cardoso

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica e capa
Marisa Yuri Horikawa

1ª edição
PDF digitalizado (2022).

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 (17. : 2022: Londrina, PR).
Resumos expandidos [da] XVII Jornada Acadêmica da Embrapa Soja / Regina
Maria Villas Boas de Campos Leite... [et al.] editoras técnicas – Londrina:
Embrapa Soja, 2022.
155 p. (Documentos / Embrapa Soja, ISSN 2176-2937 ; n. 446).

1. Soja. 2. Pesquisa agrícola. I. Leite, Regina Maria Villas Bôas de Campos. II.
Moraes, Larissa Alexandra Cardoso. III. Catharin, Kelly. IV. Série.

CDD: 630.2515 (21. ed.)

Identificação de plantas de soja transformadas com sistema CRISPR

POLIZELI, S. R. A.¹; HOSHINO, R. T.²; MARIN, S. R. R.³; MERTZ-HENNING, L. M.⁴; NEPOMUCENO, A. L.⁴

¹UEL - Universidade Estadual de Londrina, Bolsista PIBIC/CNPq, Londrina, PR, suellen.polizeli@colaborador.embrapa.br; ²Embrapa Soja, Bolsista Funarbe, Londrina, PR; ³Analista, Embrapa Soja; ⁴Pesquisador, Embrapa Soja.

Introdução

A transgenia é uma ferramenta biotecnológica muito útil na modificação genética de plantas. Todavia, por questões de biossegurança o lançamento de cultivares transgênicas é longo e oneroso, devido a diversas questões regulatórias (Nepomuceno et al., 2020). Uma solução que se apresenta é a edição genética, que consiste na modificação dos próprios genes da planta sem nenhuma introgessão de genes exógenos ao genoma de interesse. Desse modo, plantas com tais edições genéticas podem ser consideradas convencionais e não organismos transgênicos (Jansing et al., 2019).

Atualmente, transformações utilizando *Agrobacterium tumefaciens* associadas ao sistema CRISPR-Cas são uma poderosa ferramenta na edição genética de plantas. (Sandhya et al., 2020). O sistema CRISPR-Cas foi inicialmente identificado em bactérias e descrito como enzimas que associadas a um RNA-guia (gRNA) desempenham papel de defesa contra infecções ocasionadas por bacteriófagos. As enzimas Cas-9 localizam e clivam o RNA viral através de uma sequência homóloga presente no gRNA (Hille et al., 2018).

Ao utilizar este sistema é possível produzir vetores de plantas contendo a enzima Cas-9, que dependendo do gRNA, torna possível direcionar a clivagem em posição específica do genoma de forma precisa e segura. Após a clivagem o sistema de reparo do DNA da planta pode adicionar ou deletar alguns pares de bases, o que resulta em mutações de fase de leitura, truncamento e inativação dos genes alvos (Gerashchenkov et al., 2020).

Após a transformação com *Agrobacterium*, a “maquinaria de edição” contendo a nuclease Cas-9, o gRNA, e os demais genes relacionados à seleção e à mobilidade do DNA de transferência, se incorporam aleatoriamente no

genoma da planta em apenas um cromossomo, resultando em um hemizigoto. A expressão destes genes de edição leva ao silenciamento do gene alvo. Nesta etapa (T0) a planta editada é transgênica, porém, quando as plantas são autofecundadas ocorre a segregação da “maquinaria de edição”, devido à produção de hemizigotos pela transformação, o que pode resultar em plantas editadas não transgênicas (T1) (Molinari et al., 2020).

A identificação de eventos editados não transgênicos é fundamental para a continuidade de programas de melhoramento que utilizam a edição genômica de plantas por CRISPR-Cas-9. Inicialmente é necessário identificar as plantas que tiveram a maquinaria CRISPR incorporada em seu genoma, e que possuem o potencial de edição e silenciamento do gene alvo, que posteriormente é validado através de sequenciamento da região próxima ao gRNA. Por fim, os transgenes CRISPR podem ser eliminados através da reprodução e triagem das populações segregantes. Assim, o objetivo deste trabalho foi identificar, por PCR convencional eventos de soja com potencial de edição pela presença da maquinaria CRISPR-Cas-9.

Material e Métodos

Plantas de soja transformadas via *Agrobacterium tumefaciens* foram analisadas pela Reação em Cadeia da Polimerase, ou PCR (Polymerase Chain Reaction). A PCR teve por objetivo identificar os eventos transgênicos, uma vez que a maquinaria de edição está integrada ao genoma das plantas. Para tal foram realizadas as seguintes etapas: extração de DNA da soja; amplificação por PCR da nuclease Cas9; e eletroforese em gel de agarose.

Extração de DNA

Dois discos foliares com 5 mm de diâmetro foram coletados de trifólios jovens e transferidos dentro de microtubos resfriados em gelo. Em cada microtubo foram colocadas duas esferas de aço, com 3 mm de diâmetro. Os tecidos foram macerados por sucessivas agitações dos tubos em vórtex intercaladas por congelamento em nitrogênio líquido.

Após a maceração foram adicionados 300 µL do tampão de extração CTAB (Doyle; Doyle, 1987) previamente aquecido a 65°C. Os tubos foram agitados

em vórtex e incubados a 65°C por 30 minutos em banho-maria. Posteriormente foram adicionados 300 µL de clorofórmio, o qual foi misturado por inversões em agitador oscilador por 10 minutos. Na sequência, os tubos foram centrifugados a 14000 g, por 15 minutos.

A fase aquosa (200 µL) foi transferida para novos microtubos, e adicionados 200 µL de isopropanol resfriado a -20°C. Os tubos foram homogeneizados por inversões, seguidas de incubação a -20°C por 30 minutos, para a precipitação do DNA. O pellet de DNA foi obtido por centrifugação a 14000 g, por 15 minutos. O sobrenadante contendo isopropanol foi descartado e o pellet lavado com 200 µL de etanol 70% gelado. O etanol foi descartado e o pellet seco em speed vacuum por 5 minutos. Após a secagem, o DNA foi ressuspenso em 100 µL de tampão TE contendo RNase A, na concentração final de 40 µg mL⁻¹, seguida de incubação a 37°C por 30 minutos. A quantificação e qualidade da extração foi posteriormente confirmada em espectrofotômetro NanoDrop® e a integridade foi observada em gel de agarose 1%.

Amplificação por PCR

A confirmação da presença da maquinaria de edição no genoma da soja foi realizada através de PCR convencional utilizando os primers específicos para nuclease Cas9 que produzem amplicons de 448pb: Cas9-Foward 3' GGAGTTCTACAAGTTCATCAAG5' e Cas9-Reverse 3' AGTGAAGTACTCGTACAGAAGG5'.

As reações foram realizadas com volume final de 25 µL, sendo cada reação composta de 2 µL DNA genômico, 2,5 µL de tampão 10x, 0,2µM de cada primer, 2mM de MgCl₂, 0,4mM de dNTPs, 1U de Taq Polimerase.

As condições de ciclagem utilizadas foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguida por 35 ciclos de desnaturação 95°C por 30 s, anelamento a 55°C por 30 s, extensão a 72°C por 45 s, finalizando com um ciclo de 72°C por 7 min.

Eletroforese em gel de agarose

Os produtos das PCRs foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%, contendo brometo de etídeo em tampão SB. Os géis foram submetidos a uma tensão de 120V por 1h. A presença dos amplicons foi observada em transiluminador UV.

Resultados e Discussão

Na etapa de detecção da maquinaria Cas, foram analisadas 24 plantas de soja oriundas do processo de transformação via *Agrobacterium tumefaciens* com vetor CRISPR. A concentração e a qualidade do DNA são apresentadas na tabela 1. As amostras de DNA extraídas em geral produziram os valores esperados. Em geral, a quantificação de DNA aumenta a confiabilidade dos resultados da PCR, pois garante o uso de quantidades suficientes do DNA alvo evitando resultados falso-negativos. Outro ponto a considerar para uma amplificação eficiente são os inibidores oriundos do processo de extração e das características específicas da amostra. A presença de inibidores pode ser identificada pela relação entre as leituras de absorvância nos comprimentos de onda $A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$, indicativa de contaminação com proteínas, e em $A_{260\text{nm}} / A_{230\text{nm}}$ que informa a presença de compostos como polissacarídeos, sendo aceitável, em ambas as relações, um valor de 1,7 ou superior (Sambrook; Russell, 2001).

Tabela 1. Quantificação espectrofotométrica da concentração e relação de qualidade do DNA (relação da absorção dos comprimentos de onda $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ e $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$) de 24 plantas transformadas via *Agrobacterium tumefaciens*, com vetor CRISPR

ID	Concentração ng/ μ L	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	ID	Concentração ng/ μ L	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
PL1	238	2,2	1,9	PL13	852,4	1,9	2
PL2	523,6	1,8	1,8	PL14	990,1	1,8	1,9
PL3	433,6	1,9	1,9	PL15	845,7	2	2,2
PL4	114,9	1,8	1,8	PL16	537,9	1,9	1,3
PL5	104,8	2	2	PL17	843,1	2	2,2
PL6	493	1,8	1,7	PL18	542,1	1,7	2,0
PL7	398,9	1,9	2	PL19	498,1	1,9	2,2
PL8	159,5	2	2	PL20	445,1	1,8	2,3
PL9	415,4	1,9	2	PL21	384,1	2	1,5
PL10	469,8	1,9	2,1	PL22	877,2	2	2,1
PL11	443,9	1,8	1,8	PL23	212,3	1,6	1,8
PL12	964,1	1,7	1,3	PL24	431	1,8	1,8

Todas as técnicas de quantificação de DNA têm limitações em seu uso e aplicação, portanto, amostras de DNA com alta concentração e relações adequadas, podem ainda apresentar degradação do DNA comprometendo a detecção por PCR, sendo recomendável a verificação da integridade que pode ser realizada através de eletroforese em gel de agarose. Todas as amostras de DNA apresentaram boa integridade com baixa degradação (Figura 1).

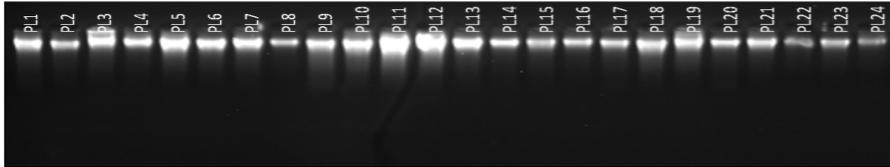


Figura 1. Integridade em gel de agarose 1% de DNA genômico de 24 plantas de soja transformadas via *Agrobacterium tumefaciens*, com vetor CRISPR.

Com os parâmetros de qualidade e quantidade verificados, a PCR convencional resultou em 12 plantas com produto de amplificação de 448pb referente à presença da nucleasse Cas9 (Figura 2). As amostras PL12, PL16 e PL21 apresentaram intensidade de banda inferior, possivelmente devido a presença de inibidores da PCR na amostra, como pode ser constatado pela baixa relação A_{260nm} / A_{230nm} (Tabela 1).

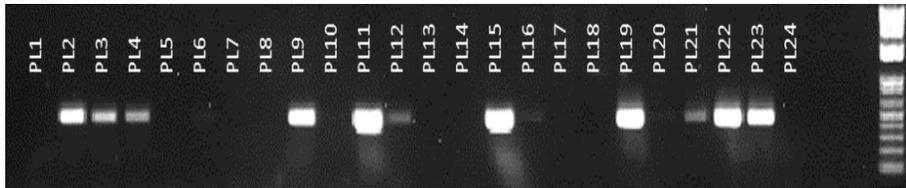


Figura 2. Identificação de plantas transgênicas com maquinaria Cas9 por PCR convencional em gel de agarose 1%. A presença de produto de amplificação de 448pb indica planta transgênica com maquinaria CRISPR-Cas9, ausência de banda indica planta não transgênica. Marcador de DNA 1Kb Plus (Invitrogen®).

A variabilidade genética da soja promove diferentes respostas na eficiência de infecção pela agrobactéria, desenvolvimento e regeneração em cultura *in vitro*, tornando baixa a eficiência de transformação (Donaldson; Simmonds, 2000; Yang et al., 2016) e, ainda, a eficiência de edição das plantas transformadas com sistema CRISPR pode ser afetada por diversos fatores desde a estratégia de construção do vetor (Carrijo et al., 2021) até a forma de entrega dos componentes CRISPR/Cas9 (Sandhya et al., 2020). A somatória desses fatores, reduz ainda mais a eficiência geral do processo e o número de plan-

tas editadas. Assim é fundamental que a etapa inicial de detecção via PCR da maquinaria de edição CRISPR seja eficiente para reduzir falsos negativos e aumentar o potencial de identificação de plantas editadas.

Conclusão

Foram identificadas 12 plantas de soja com maquinaria CRISPR e portanto, com potencial de edição do gene alvo. Será necessário o sequenciamento da região próxima ao gRNA para validar o silenciamento do gene alvo.

Referências

- CARRIJO, J.; ILLA-BERENGUER, E.; LAFAYETTE, P.; TORRES, N.; ARAGÃO, F. J. L.; PARROTT, W.; VIANNA, G. R. Two efficient CRISPR/Cas9 systems for gene editing in soybean. **Transgenic Research**, v. 30, n. 3, p. 239-249, 2021.
- DONALDSON, P. A.; SIMMONDS, D. H. Susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens* and cotyledonary node transformation in short-season soybean. **Plant Cell Reports**, v. 19, n. 5, p. 478-484, 2000.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.
- GERASHCHENKOV, G. A.; ROZHNOVA, N. A.; KULUEV, B. R.; KIRYANOVA, O. Y.; GUMEROVA, G. R.; KNYAZEV, A. V.; VERSHININA, Z. R.; MIKHAILOVA, E. V.; CHERMERIS, D. A.; MATNIYAZOV, R. T.; BAIMIEV, A. K.; GUBAIDULLIN, I. M.; BAIMIEV, A. K.; CHERMERIS, A. V. Design of guide RNA for CRISPR/Cas plant genome editing. **Molecular Biology**, v. 54, n. 1, p. 24-42, 2020.
- HILLE, F.; RICHTER, H.; WONG, S. P.; BRATOVIČ, M.; RESSEL, S.; CHARPENTIER, E. The biology of CRISPR-Cas: backward and forward. **Cell**, v. 172, n. 6, p. 1239-1259, 2018.
- JANSING, J.; SACK, M.; AUGUSTINE, S. M.; FISCHER, R.; BORTESI, L. CRISPR/Cas9-mediated knockout of six glycosyltransferase genes in *Nicotiana benthamiana* for the production of recombinant proteins lacking β -1, 2-xylose and core α -1, 3-fucose. **Plant Biotechnology Journal**, v. 17, n. 2, p. 350-361, 2019.
- MOLINARI, H. B. C.; VIEIRA, L. R.; SILVA, N. V. e; PRADO, G. S.; LOPES FILHO, J. H. (ed.). **Tecnologia CRISPR na edição genômica de plantas: biotecnologia aplicada à agricultura**. Brasília, DF: Embrapa, 2020. 207 p.
- NEPOMUCENO, A. L.; FUGANTI-PAGLIARINI, R.; FELIPE, M. S. S.; MOLINARI, H. B. C.; VELINI, E. D.; PINTO, E. R. de C.; DAGLI, M. L. Z.; ANDRADE FILHO, G.; FERNANDES, P. M. B. Brazilian biosafety law and the new breeding technologies. **Frontiers of Agricultural Science and Engineering**, v. 7, n. 2, p. 204-210, 2020.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning, a laboratory manual**. 3rd ed. [Nova York]: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 800 p.

SANDHYA, D.; JOGAM, P.; ALLINI, V. R.; ABBAGANI, S.; ALOK, A. The present and potential future methods for delivering CRISPR/Cas9 components in plants. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 1-11, 2020.

YANG, J.; XING, G. J.; DU, Q.; SUI, L.; GUO, D. Q.; NIU, L.; YANG, X. D. Effects of different soybean genotypes on the transformation efficiency of soybean and analysis of the t-DNA insertions in the soybean genome. **Soybean Science**, v. 35, p. 562-567, 2016.