

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

DOCUMENTOS 453

18^a 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
2023

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
Adeney de Freitas Bueno

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, Leandro Eugênio Cardamone
Diniz, Marco Antonio Nogueira, Mônica Juliani
Zavaglia Pereira e Norman Neumaier*

Supervisão editorial
Vanessa Fuzinato Dall’Agnol

Bibliotecária
Valéria de Fátima Cardoso

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica e capa
Marisa Yuri Horikawa

1ª edição
PDF digitalizado (2023).

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 (18. : 2023: Londrina, PR).
Resumos expandidos [da] XVIII Jornada Acadêmica da Embrapa Soja / Regina
Maria Villas Bôas de Campos Leite... [et al.] editoras técnicas – Londrina:
Embrapa Soja, 2023.
161 p. (Documentos / Embrapa Soja, ISSN 2176-2937 ; n. 453).

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.)

Silenciamento gênico via CRISPR/Cas de fatores antinutricionais da soja visando melhoria da digestibilidade animal

FIGLIANO, G. C.¹; 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; ²Bolsista Funarbe/Embrapa Soja; ³Analista, Embrapa Soja; ⁴Pesquisador(a), Embrapa Soja.

Introdução

O Brasil ocupa a posição de maior produtor mundial de soja, com uma produção aproximada de 155 milhões de toneladas de soja produzidas na safra 2022/2023 (Conab, 2023), a qual é destinada principalmente para a alimentação animal. No entanto, a introdução da soja nas rações de animais monogástricos como suínos e aves, apresenta limitações em virtude da presença de fatores antinutricionais (FA), que dificultam a atuação de enzimas digestivas, causando danos à parede intestinal com diminuição da digestibilidade dos nutrientes e consequentemente, prejudicando os resultados de desempenho zootécnicos (Nunes et al., 2001; Brito et al., 2006). Em outras palavras, a soja se consolidou como fonte proteica das rações animais, apesar de apresentar componentes antagônicos que impedem a utilização de seu potencial nutritivo por completo, levando a um menor aproveitamento da ração e queda na produtividade desse setor.

Para a utilização da soja como constituinte efetivo na alimentação humana e animal há necessidade de processamento térmico adequado a fim de inativar os FAs. Entretanto, esses procedimentos apresentam alto custo, e o calor excessivo pode resultar na perda de aminoácidos essenciais e na alteração de propriedades benéficas da soja. Por outro lado, podem deixar resíduos de FAs quando não conduzidos de forma satisfatória. Assim, tanto o sub quanto o super processamento são prejudiciais para o desempenho animal (Café et al., 2000; Rodrigues et al., 2002; Brito et al., 2006). Portanto, fica evidente a importância do estudo dos FAs e das principais estratégias utilizadas para diminuir e/ou eliminar o efeito desses compostos na nutrição de animais monogástricos, visando melhorar a digestibilidade dos nutrientes e o valor de energia metabolizável da ração.

A manipulação genética desses FAs possibilita limitar a atividade inibitória. Trabalhos reportam a manipulação genética desses genes em linhagens de soja por meio de melhoramento genético via hibridação, tanto no Brasil (Moraes et al., 2006; Brune et al., 2010) como na literatura internacional (Schmidt et al., 2015). Estudos foram realizados para desenvolver genótipos de soja com quantidades baixíssimas ou nulas de fatores antinutricionais (Krishnan; Kim, 2003; Donald et al., 2007; Carpentieri-Pipolo, 2015), portanto, esses genes já foram funcionalmente caracterizados na cultura de interesse.

O método mais utilizado para transferir um alelo de um doador para um genótipo elite é o retrocruzamento; entretanto, o processo é laborioso e consome muito tempo e recursos, particularmente para alelos recessivos. Além disso, na maioria das situações o doador não é uma linhagem adaptada, sendo provável que ocorra a passagem de genes indesejáveis. Isso explica a inexistência de cultivares de soja com essa característica no mercado atual. Uma alternativa para superar esse cenário adverso é a utilização de ferramentas de edição de genomas, como CRISPR/Cas, para geração de cultivares de soja com essas características.

Neste trabalho visamos utilizar o sistema CRISPR/Cas para aumentar a velocidade da geração de cultivares de soja altamente produtivas com alelo nulo de um fator antinutricional da soja.

Material e Métodos

Identificação do gene alvo, síntese e clonagem do RNA guia (gRNA)

A sequência do gene alvo da edição foi obtida a partir do banco de dados do Phytozome e comparada nas duas versões do genoma de soja disponíveis *Glycine max* a2.v1 e *Glycine max* a4.v1 (Phytozome v13). Posteriormente essa sequência foi alinhada com o genoma da cultivar de soja BRS 537 (cultivar utilizada no processo de edição), apresentando 100% de similaridade. Realizou-se a caracterização do gene alvo na soja a fim de identificar a presença de cópias e parálogos. Para isso, fez-se a busca da sequência de aminoácidos dos genes pertencentes a família interesse no banco de dados Phytozome v13, a partir do genoma referência da soja (Wm82.a2.v1 e Wm82.

a4.v1). Em seguida, realizou-se o alinhamento das sequências e a construção da árvore filogenética através dos softwares Muscle (Edgar, 2004) e iTOL (Letunic; Bork, 2019), respectivamente. A porcentagem de similaridade físico-química foi obtida a partir do software Persephone¹.

Posteriormente realizou-se o desenho dos gRNAs para o gene de interesse por meio do software CRISPRDirect (Naito et al., 2015). Foram selecionados os guias mais promissores e altamente específicos, com ausência de *off-targets* na região do guia + PAM. Em seguida esses gRNAs foram clonados em um vetor binário capaz de se multiplicar tanto em *Escherichia coli* quanto em *Agrobacterium tumefaciens*. O vetor contém os seguintes elementos: sequência para expressar a enzima Cas9 sob controle do promotor 35S do *Cauliflower mosaic virus* (CaMV), sequência do gene *Bar* (marcador de seleção) que confere resistência ao herbicida glufosinato de amônio também sob controle do promotor 35S, além de dois gRNAs do gene alvo na soja sob controle do promotor U6 de *Arabidopsis thaliana*.

Transformação genética e caracterização molecular das plantas obtidas

A construção gênica contendo todos os elementos necessários para expressão do sistema CRISPR/Cas e os dois gRNAs do gene alvo foi inserida em soja por meio de transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*, seguida da regeneração por cultura de tecidos via organogênese, gerando plantas na geração T0. Essas plantas foram caracterizadas por meio de PCR para confirmação da presença da maquinaria da Cas9 e posteriormente realizou-se o sequenciamento para confirmação da edição. Para tal, foi realizado em sequenciador ABI 3530 DNA Analyzer Applied Biosystems com a utilização do kit de sequenciamento *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Invitrogen, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

Resultados e Discussão

Pela análise *in silico* foram identificados 21 genes pertencentes a família de interesse e que apresentaram o domínio característico. A similaridade físico-química da sequência proteica do gene mais próximo ao gene editado foi de 62%, indicando que se trata de um gene de cópia única.

¹ <https://web.persephonesoft.com>

A análise das plantas na geração T0 por meio de PCR convencional indicou a presença da maquinaria da enzima Cas, o que demonstra que as plantas foram transformadas com o vetor de interesse. Em seguida, confirmou-se a ocorrência de edição através do sequenciamento da região do alvo. As plantas na geração T0 geralmente apresentam inserção do vetor em apenas um dos cromossomos (hemizigotas para o vetor). Dessa forma, por meio do avanço de geração através de autofecundação foi possível selecionar uma planta editada sem a inserção do vetor no final do processo, a qual foi denominada Evento AF12-13. Como resultado da edição foi encontrada apenas mutação na região do gRNA 2 do gene alvo, originando novo alelo.

A análise do resultado do sequenciamento da região alvo da edição foi realizada através software ICE (Synthego - CRISPR Performance Analysis), uma ferramenta que permite analisar dados de edição a partir de resultados de sequenciamento pelo método de Sanger. A ferramenta compara a sequência da região alvo da edição do alelo selvagem com a sequência da planta editada e gera dados sobre a eficiência e o tipo de edição. A mutação identificada no evento AF12-13 consiste na deleção de quatro nucleotídeos.

Por meio do software Muscle² foi possível prever os efeitos na proteína em decorrência da mutação gerada. A deleção dos 4 nucleotídeos alterou o quadro de leitura (frameshit) modificando a tradução a partir do ponto em que ocorreu a mutação e alterando a sequência de aminoácidos da proteína. Essas modificações afetam a estabilidade da proteína. Conforme análise pelo software ExPASy³, as mudanças em decorrência da mutação fazem com que a proteína seja classificada como instável, caracterizando uma proteína não funcional. Dessa maneira, a ferramenta CRISPR/Cas foi eficiente em gerar uma nova mutação para obtenção de soja com redução nos fatores antinutricionais.

² <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>

³ <https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>

Referências

- BRITO, C. O.; ALBINO, L. F. T.; ROSTAGNO, H. S.; GOMES, P. C.; DIONIZIO, M. A.; CARVALHO, D. C. O. Adição de complexo multienzimático em dietas à base de soja extrusada e desempenho de pintos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, p. 457-461, 2006.
- BRUNE, M. F. S. S.; PINTO, M. D. O.; PELUZIO, M. D. C. G.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. D. Biochemical and nutritional evaluation of a soybean line lacking the Kunitz trypsin inhibitor and lectins. **Food Science and Technology**, v. 30, p. 657-663, 2010.
- CAFÉ, M. B.; SAKOMURA, N. K.; JUNQUEIRA, O. M.; CARVALHO, M. R. B.; DEL BIANCHI, M. Determinação do valor nutricional das sojas integrais processadas para aves. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 2, n. 1, 2000. DOI: 10.1590/S1516-635X2000000100010.
- CARPENTIERI-PIPOLO, V. UEL 175: a novel lipoxygenase-free soybean cultivar with kunitz trypsin inhibitor absence. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 15, n. 3, p. 191-192, 2015.
- CONAB. **Boletim da safra de grãos: 8º levantamento – safra 2022/23**. Brasília, DF, 2023. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safra/safra-graos/boletim-da-safra-de-graos>. Acesso em: 15 maio 2023.
- DONALD, L.; VADIM, B.; MARINA, K.; MONICA, A.; SCHMIDT, E. M.; HERMAN, N. C. Reduction of protease inhibitor activity by expression of a mutant Bowman-Birk gene in soybean seed. **Plant Molecular Biology**, v. 64, p. 397-408, 2007.
- EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, p. 1792-1797, 2004.
- KRISHNAN, H. B.; KIM, W. S. A four-nucleotide base-pair deletion in the coding region of the Bowman-Birk protease inhibitor gene prevents its accumulation in the seeds of glycine microphylla PI440956. **Planta**, n. 217, p. 523-527, 2003.
- LETUNIC, I.; BORK, P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. W1, p. W256-W259, 2019.
- MORAES, R. M. A. de; SOARES, T. C. B.; COLOMBO, L. R.; SALLA, M. F. S.; BARROS, J. G. de A.; PIOVESAN, N. D.; BARROS, E. G. de; MOREIRA, M. A. Assisted selection by specific DNA markers for genetic elimination of the kunitz trypsin inhibitor and lectin in soybean seeds. **Euphytica**, v. 149, n. 1, p. 221-226, 2006.
- NAITO, Y.; HINO, K.; BONO, H.; UI-TEI, K. CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites. **Bioinformatics**, v. 31, n. 7, p. 1120-1123, 2015.
- NUNES, R. V.; ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; GOMES, P. C.; TOLEDO, R. S. Composição bromatológica, energia metabolizável e equações de predição da energia do grão e de subprodutos do trigo para pintos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 3, p. 785-793, 2001.
- RODRIGUES, P. B.; ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; GOMES, P. C.; NUNES, R. V.; TOLEDO, R. S. Valores energéticos da soja e subprodutos da soja, determinados com frangos de corte e galos adultos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 4, p. 1771-1782, 2002.
- SCHMIDT, M. A.; HYMOWITZ, T.; HERMAN, E. M. Breeding and characterization of soybean triple null; a stack of recessive alleles of kunitz trypsin inhibitor, soybean agglutinin, and P34 allergen nulls. **Plant Breeding**, v. 134, n. 3, p. 310-315, 2015.