

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

ISSN 3085-9514

**Eventos Técnicos
& Científicos**

5

Julho, 2025

Resumos expandidos
20ª Jornada Acadêmica
da Embrapa Soja

30 de junho e 1º de julho de 2025
Londrina, PR

Embrapa Soja
Londrina, PR
2025

Embrapa Soja

Rod. Carlos João Strass, s/n
Acesso Orlando Amaral, Caixa postal
4006, CEP 86085-981, Distrito de
Warta, Londrina, PR
(43) 3371 6000
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações**Presidente**

Roberta Aparecida Carnevalli

Secretária-executiva

*Regina Maria Villas Bôas
de Campos Leite*

Membros

*Clara Beatriz Hoffmann-Campo,
Claudine Dinali Santos Seixas, Claudio
Guilherme Portela de Carvalho,
Fernando Augusto Henning, Leandro
Eugênio Cardamone Diniz, Liliane
Márcia Mertz-Henning, Maria Cristina
Neves de Oliveira e Norman Neumaier*

Organização da publicação

*Regina Maria Villas Bôas
de Campos Leite
Liliane Márcia Mertz-Henning
Kelly Catharin*

Normalização

Valéria de Fátima Cardoso

Capa

Vanessa Fuzinatto Dall'Agnol

Diagramação

*Vanessa Fuzinatto Dall'Agnol e
Marisa Yuri Horikawa*

Publicação digital: PDF**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 (20. : 2025: Londrina, PR).

Resumos expandidos [da] XX Jornada Acadêmica da Embrapa Soja, Londrina, PR,
30 de junho e 1 de julho de 2025 – Londrina : Embrapa Soja, 2025.

PDF (153 p.) - (Eventos técnicos & científicos / Embrapa Soja, ISSN 3085-9514; 5)

1. Soja. 2. Pesquisa agrícola. I. Título. II. Série.

CDD (21. ed.) 630.2515

Inativação de lectina em soja por CRISPR-Cas9: Avaliação da hemaglutinação

Giovana Zanella Gusmão⁽¹⁾, Rodrigo Thibes Hoshino⁽²⁾, João Matheus Kafer⁽³⁾, Alexandre Lima Nepomuceno⁽⁴⁾, Liliâne Marcia Mertz-Henning⁽⁴⁾

⁽¹⁾ Estudante de Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina, Bolsista PIBIC/CNPq, Londrina, PR. ⁽²⁾ Engenheiro-agrônomo, doutor, bolsista da Fundação de Apoio à Pesquisa e ao Desenvolvimento (FAPED), Londrina, PR. ⁽³⁾ Engenheiro-agrônomo, doutorando em Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR. ⁽⁴⁾ Engenheiro-agrônomo, doutor, pesquisador da Embrapa Soja, Londrina, PR.

Introdução

A soja (*Glycine max* Merril.) se destaca como uma das leguminosas mais importantes globalmente, reconhecida por seu elevado valor nutricional, que inclui aproximadamente 40% de proteína, 20% de óleo e 30% de carboidratos (George et al., 2008; Choi et al., 2022; Padalkar et al., 2023). Essa composição a torna fundamental para diversas utilizações industriais, desde a alimentícia e farmacêutica até a de bioenergia. Seu principal uso, no entanto, é na formulação de rações para alimentação animal, servindo como uma importante fonte proteica.

Apesar de seus benefícios nutricionais, a utilização da soja é limitada pela presença de fatores antinutricionais. Esses compostos, como o inibidor de tripsina de Kunitz (KTI), o ácido fítico, os oligossacarídeos da família da rafinose (RFOs) e, também, as aglutininas da soja (lectinas), afetam negativamente a digestibilidade e a absorção de nutrientes no trato gastrointestinal (Choi et al., 2022; Padalkar et al., 2023). A mitigação desses fatores é essencial para otimizar o uso da soja em dietas humanas e na nutrição animal.

As lectinas de soja, ou aglutininas, são glicoproteínas que, apesar de não possuírem atividade enzimática, são prejudiciais por sua capacidade de se ligar a carboidratos. Em plantas, as lectinas desempenham papéis variados, desde a sinalização em respostas a estresses bióticos e abióticos até a regulação de processos e defesa contra pragas (Coninck; Van Damme, 2021, 2022). No entanto, quando ingeridas por animais monogástricos, as lectinas ativas podem se ligar aos receptores glicanos da parede intestinal, resultando em alterações na morfologia do epitélio e na consequente redução da digestão e absorção de nutrientes (Moraes et al., 2006; George et

al., 2008), além de causar a aglutinação de eritrócitos sanguíneos (hemaglutinação).

A inativação desses fatores antinutricionais são feitas por meio de métodos de processamento, que visam melhorar o valor nutricional e a palatabilidade da soja, como aquecimento, torrefação e aplicação de alta pressão, entre outros, porém resultam no aumento dos custos. Atualmente, avanços na biotecnologia têm aberto novas perspectivas. A edição genômica, particularmente através da tecnologia CRISPR-Cas9, surge como uma alternativa para inativar genes específicos, como o da lectina, diretamente no genoma da planta. Essa abordagem permite desenvolver cultivares de soja com perfis nutricionais melhorados, promovendo maior digestibilidade, melhor aproveitamento nutricional das rações e redução nos custos de processamento, além de maior aceitação no mercado.

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade de hemaglutinação das lectinas de um evento de soja editado por CRISPR-Cas9.

Material e Métodos

A coleta e o preparo do material foram realizados no laboratório LAMON, da Universidade Estadual de Londrina (UEL), o qual está equipado e certificado para trabalhos com amostras biológicas e resíduos contaminantes.

Preparo dos eritrócitos para o teste de hemaglutinação

O teste de hemaglutinação foi conduzido com adaptações do método de Adamcová et al. (2021). Inicialmente, utilizou-se sangue humano tipo A, rico em carboidratos GalNac, essencial para a detecção da lectina. O sangue foi coletado de voluntários sob aprovação do comitê de ética e armazenado em tubos de coleta com citrato de sódio para evitar coagulação.

Para a obtenção dos eritrócitos, 2 mL de sangue humano foram centrifugados a 500 g por 5 minutos. As frações de linfócitos e plasma foram cuidadosamente removidas. Em seguida, as células foram lavadas três vezes com Solução Salina Tampão Fosfato (PBS 0,1%). Posteriormente, formou-se uma solução de eritrócitos a 2% em PBS. Essa solução foi então tratada com Tripsina (0,05% em PBS, preparada no momento do teste) e lavada novamente três vezes com PBS

para remover o excesso de Tripsina, preparando os eritrócitos para as diluições seriadas com as amostras.

Preparo e extração das amostras

As amostras de soja (genótipo AF12-13-1, ausente de lectina, e seu background BRS 537, cultivar não editada) e de feijão preto (controle positivo) foram moídas e armazenadas sob refrigeração até o uso. Para extrair a lectina solúvel, 5 g de cada amostra moída foram diluídas em 30 mL de PBS e submetidas à agitação a 250 RPM por 1 hora. As soluções foram então armazenadas sob refrigeração overnight.

Após a extração, 5 mL de cada extrato proteico foram centrifugados a 2850 g por 5 minutos. O sobrenadante foi recuperado e centrifugado novamente na mesma velocidade para garantir a remoção de partículas. Este extrato purificado foi utilizado para preparar as diluições seriadas.

Realização do teste de hemaglutinação

As amostras dos genótipos AF12-13-1 (AF), BRS 537 não editada (BRS) e feijão preto (FJ) foram submetidas a 10 diluições seriadas (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512 e 1/1024). As diluições foram distribuídas em placas de reação, em duplicata, na mesma proporção da solução de eritrócitos tratados com tripsina.

A reação de hemaglutinação foi observada visualmente, com o auxílio de estereomicroscópio e microscópio. A presença de lectinas ativas foi caracterizada pela deformação e aglutinação dos eritrócitos, que se apresentam com forma irregular. A ausência de lectina ativa foi observada pela precipitação dos eritrócitos no fundo da placa, formando um ponto compacto.

Resultados e Discussão

O teste de hemaglutinação demonstrou ser eficaz na discriminação qualitativa da atividade das lectinas entre os diferentes genótipos de soja e o controle. Três perfis distintos de aglutinação foram observados, conforme ilustrado na Figura 1.

O feijão preto (FJ), utilizado como controle positivo, exibiu a maior atividade hemaglutinante. A aglutinação foi prontamente detectada em todas as diluições testadas, inclusive na diluição mais alta (1/1024), confirmando a alta concentração de lectinas ativas nesta

amostra (Figura 1). Este achado está em conformidade com dados da literatura, que apontam o feijão preto como tendo uma atividade hemaglutinante oito vezes superior à da soja (Adamcová et al., 2021).

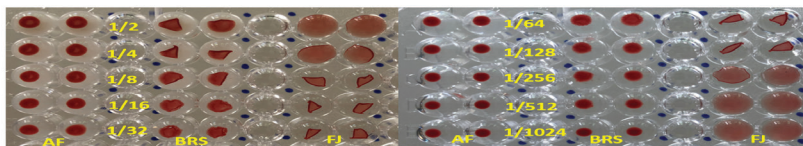


Figura 1. Hemaglutinação observada em teste de placa dos genótipos: editado - AF12-13-1 (AF), selvagem - BRS 537 não editada (BRS), e controle - feijão preto (FJ), em diluição seriada.

A comparação entre o genótipo de soja editado (AF12-13-1) e seu genótipo selvagem BRS 537 não editada (BRS) revelou o silenciamento efetivo do gene da lectina no genótipo editado, resultando em uma alteração fenotípica clara na atividade de hemaglutinação. Foram observadas diferenças entre os genótipos em praticamente todas as diluições, com exceção da diluição mais elevada (1/1024) (Figura 1). Observou-se que, mesmo na diluição de 1/512, onde a sedimentação dos eritrócitos apresentava similaridade em tamanho e coloração, o genótipo não editado BRS 537 (BRS) demonstrou irregularidades nas bordas dos precipitados, indicando alguma atividade residual da lectina. Em contraste, o genótipo AF12-13-1 não exibiu atividade aparente a partir da diluição 1/128 (Figura 2).

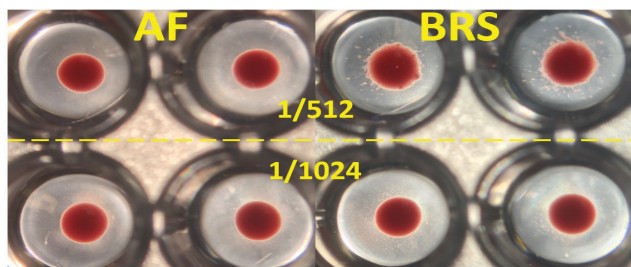


Figura 2. Detalhe da hemaglutinação observada nos genótipos: editado - AF12-13-1 (AF) e selvagem - BRS 537 não editada (BRS), nas maiores diluições. Bordas irregulares indicam lectinas ativas.

Além das observações macroscópicas em placas, a análise microscópica (400x) confirmou a ausência de aglutinação no genótipo editado AF12-13-1, onde os eritrócitos foram observados livres e dis-

persos. No genótipo BRS 537 não editada (BRS), por sua vez, foi possível identificar a formação de pequenos agregados de eritrócitos, reforçando a presença de lectinas ativas (Figura 3).

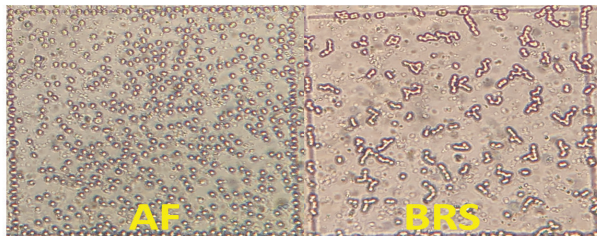


Figura 3. Microscopia dos eritrócitos na diluição 1/128 a 400x de ampliação: Eritrócitos livres no genótipo editado - AF12-13-1 (AF); formação de agregados no genótipo selvagem - BRS 537 não editada (BRS).

Conclusão

A edição genômica por CRISPR-Cas9 inativou efetivamente a lectina na soja. O método da hemaglutinação foi eficaz para demonstrar a ausência de atividade de lectina no genótipo editado. A aplicação da tecnologia CRISPR-Cas9 é viável para o desenvolvimento de cultivares de soja com perfil nutricional aprimorado.

Referências

- ADAMCOVÁ, A.; LAURSEN, K. H.; BALLIN, N. Z. Lectin activity in commonly consumed plant-based foods: Calling for method harmonization and risk assessment. **Foods**, v. 10, n. 11, 2796, 2021.
- CHOI, S. W.; LY, S.; LEE, J. H.; OH, H. S.; KYM, S. Y.; KIM, N. H.; CHUNG, J. I. Breeding of penta null soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] for five antinutritional and allergenic components of lipoxygenase, KTI, lectin, 7S α' subunit, and stachyose. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, article 910249, 2022.
- CONINCK, T. de; VAN DAMME, E. J. M. Plant lectins: Handymen at the cell surface. **The Cell Surface**, v. 8, 100091, 2022.
- CONINCK, T. de; VAN DAMME, E. J. M. Review: The multiple roles of plant lectins. **Plant Science**, v. 313, 111096, 2021.
- GEORGE, M. A.; BHIDE, S. V.; THENGANE, R. J.; HOSSEINI, G. H.; MANJAYA, J. G. Identification of low lectin mutants in soybean. **Plant Breeding**, v. 127, n. 2, p. 150-153, 2008.

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. 1-2, p. 221-226, 2006.

PADALKAR, G.; MANDLIK, R.; SUDHAKARAN, S.; VATS, S.; KUMAWAT, S.; KUMAR, V.; RANI, A.; RATNAPARKHE, M. B.; JADHAV, P.; BHAT, J. A.; DESHMUKH, R.; SHARMA, T. R.; SONAH, H. Necessity and challenges for exploration of nutritional potential of staple-food grade soybean. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 117, 105093, 2023.