

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

ISSN 3085-9514

***Eventos Técnicos
& Científicos***

8

Junho, 2026

**Resumos expandidos
21ª Jornada Acadêmica
da Embrapa Soja**

30 de junho e 1º de julho de 2026
Londrina, PR

Embrapa Soja
Londrina, PR
2026

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 Carnevali

Secretária-executiva

*Regina Maria Villas Bôas
de Campos Leite*

Membros

*Adonis Moreira, 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*

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 (21. : 2026: Londrina, PR).

Resumos expandidos [da] XXI Jornada Acadêmica da Embrapa Soja, Londrina,
PR, 30 de junho e 1 de julho de 2026 – Londrina : Embrapa Soja, 2026.

PDF (157 p.) - (Eventos técnicos & científicos / Embrapa Soja, ISSN 3085-9514; 8)

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

CDD (21. ed.) 630.2515

Avaliação de eYGFp-uv no Monitoramento de Eventos Transgênicos em Soja no Sistema CRISPR/Cas

William Renan Godoy Reis⁽¹⁾, João Matheus Kafer⁽²⁾, Rodrigo Thibes Hoshino⁽²⁾, Barbara Selhorst Nabhan⁽³⁾, Liliane Marcia Mertz-Henning⁽⁴⁾, Alexandre Lima Nepomuceno⁽⁴⁾

⁽¹⁾ Estudante de Agronomia, Centro Universitário Filadélfia, bolsista PIBIC/CNPq, Londrina, PR; ⁽²⁾ Bolsista Pós-Doc Faped/Embrapa Soja, Londrina, PR; ⁽³⁾ Mestranda, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR; ⁽⁴⁾ Pesquisador, Embrapa Soja, Londrina, PR.

Introdução

O avanço das Tecnologias Inovadoras de Melhoramento de Precisão (TIMPs) tem ampliado as possibilidades de desenvolvimento de cultivares superiores por meio da edição genômica (Freitas-Alves et al., 2025). No entanto, a aplicação dessas ferramentas em soja (*Glycine max*) ainda enfrenta limitações técnicas, principalmente devido à baixa eficiência dos processos de transformação e regeneração *in vitro*, especialmente em cultivares elite (Xu et al., 2022).

Além disso, a seleção de eventos transformados representa um gargalo significativo. O uso de marcadores baseados na resistência a herbicidas, como o gene *bar*, apresenta eficiência dependente da concentração do agente seletivo e das condições de cultivo, podendo resultar em “escapes”, ou seja, na sobrevivência de tecidos não transformados (Hada et al., 2016). Nesse contexto, mesmo após a transformação e regeneração de plantas, a confirmação da transgenia ainda requer análises moleculares (PCR) aumentando o custo e o tempo na obtenção dos eventos transgênicos (Xu et al., 2020).

Outro aspecto importante da edição de plantas no sistema CRISPR/Cas é a segregação de eventos editados não transgênicos. A edição somente ocorre após a inserção da maquinaria de edição no genoma da planta via transgenia (T0), todavia a edição e a transgenia segregam independentemente na geração seguinte (T1); este processo permite a seleção de eventos editados não transgênicos. A utilização de marcadores visuais facilita o avanço de gerações ao permitir a triagem visual na progênie T1, sem a necessidade de genotipagens

onerosas. Essa abordagem acelera a identificação de indivíduos transgênicos, e otimizam a seleção de linhagens editadas livres do DNA exógeno da maquinaria CRISPR/Cas.

Desta forma, o uso de proteínas fluorescentes, como a eYGF-uv, surge como uma alternativa promissora por permitir a identificação visual, precoce e não destrutiva de tecidos e sementes transgênicas (Shimizu et al., 2017; Parveez; Majid, 2018; Subedi; Schrick, 2022). Assim a utilização do eYGF-uv como marcador visual pode reduzir a ocorrência de escapes e minimizar a necessidade de genotipagens ao longo do processo. O objetivo deste trabalho foi avaliar o marcador visual eYGF-uv em diferentes etapas da transformação de soja em sistema de edição via CRISPR/Cas.

Material e Métodos

Foi utilizado o vetor CRISPR/Cas pGS76244, contendo no T-DNA os cassetes para expressão: do gene *BAR* (resistência ao glufosinato de amônio), nuclease Cas12, RNA-guia (Inserto), e gene que codifica para o marcador visual eYGF-uv, sob respectivos promotores constitutivos e terminadores de acordo com a Figura 1.



Figura 1. Mapa do T-DNA contendo o cassete de edição CRISPR/Cas12.

O plasmídeo foi sintetizado por empresa especializada, clonado em *Escherichia coli* (DH5α), e posteriormente introduzido em *Agrobacterium tumefaciens* (EHA105) por choque térmico, com seleção em meio contendo antibióticos adequados.

A transformação da cultivar elite de soja BRS 573 foi realizada via infecção de nó cotiledonar, de acordo com o protocolo descrito por Kanamori et al. (2017). O crescimento do inóculo bacteriano foi ajustado para densidade ótica de 0,6 - 0,9 (OD600), centrifugado e as células bacterianas ressuspensas em meio de co-cultivo suplementado com acetoseringona (0,2 mM).

Sementes pré-embebidas foram submetidas à excisão do eixo embrionário e injúria mecânica na região do nó cotiledonar para facilitar a infecção bacteriana. Após o co-cultivo (7 dias), os explantes foram

lavados e transferidos para meios de indução de multibrotamento (MIB1 e MIB2) por 15 dias cada, sob pressão seletiva de glufosinato de amônio (3 mg/L e 6 mg/L).

Explantos com multibrotações foram transferidos para meio de alongamento (MA), com subcultivos quinzenais. Brotações alongadas (>2 cm) foram submetidas ao enraizamento em meio ME. As plântulas enraizadas foram aclimatizadas em substrato de areia e vermiculita (1:1) e, posteriormente, transferidas para casa de vegetação até o final do ciclo.

A expressão do marcador eYGFP-uv foi avaliada por excitação ao comprimento de luz 365 nm, com lanterna UV (Alonefire® SV004, 10 W), ao longo das fases *in vitro* e *ex vitro*. A fluorescência foi utilizada para identificação visual de eventos transformados, discriminação de plantas “escape” e monitoramento da expressão da maquinaria de edição genômica. Os padrões de fluorescência foram registrados por documentação fotográfica.

Resultados e Discussão

A integração do marcador eYGFP-uv no vetor pGS76244 permitiu o monitoramento em tempo real da presença da maquinaria de edição genômica. A fluorescência foi observada nas fases de indução de brotos (MIB1 e MIB2), alongamento (MA), enraizamento (ME) e desenvolvimento *ex vitro*.

Foram inoculados 283 explantes. Após a fase de indução inicial obteve-se 184 explantes apresentando múltiplas brotações em meio MIB1. Ao final da fase MIB2, 53 explantes apresentaram algum sinal de fluorescência associada à expressão do eYGFP-uv, correspondendo a aproximadamente 28,8% de explantes com qualquer sinal visual de transgenia.

Ao final de MIB2 os explantes sem fluorescência foram descartados, permitindo a eliminação precoce de eventos “escape” e redução na progressão de tecidos não transformados. Nas fases iniciais (MIB1 e MIB2), a fluorescência ocorreu em pequenas regiões dos explantes, indicando que a transformação ocorre de forma pontual e não homogênea (Figura 2A-B). Nesta etapa também se observou a formação de calos quiméricos com fluorescências internas, o que poderia ex-

plicar a presença de explantes com multibrotações não transgênicas se desenvolvendo em meio seletivo (Figura 2C).

Durante a fase de alongamento (MA), a fluorescência permitiu a distinção entre brotações transgênicas e não transgênicas, permanecendo estável nos tecidos vegetativos ao longo de todo o desenvolvimento *in vitro* (Figura 2D-E).

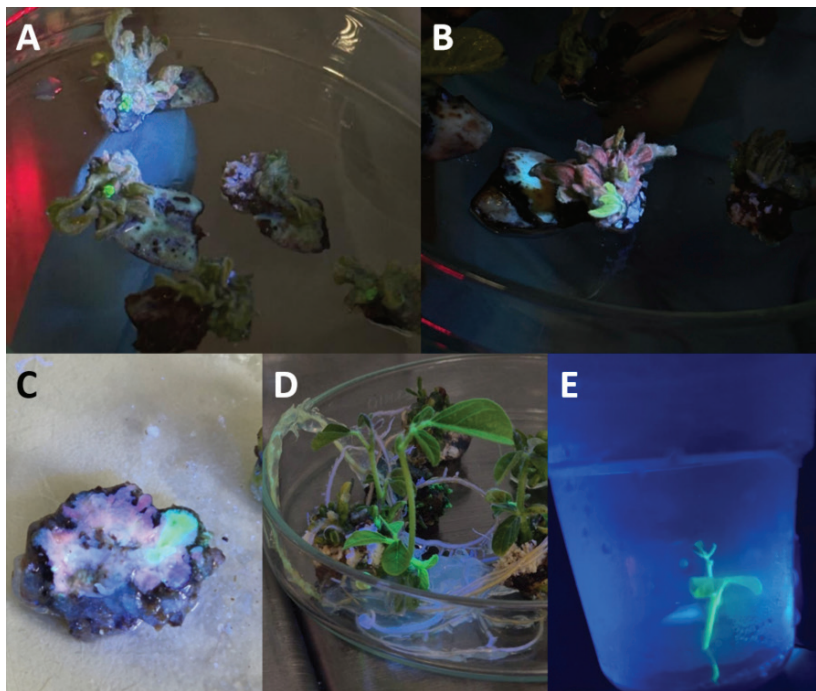


Figura 2. Desenvolvimento de explantes transgênicos *in vitro* sob luz UV-365 nm. Pequenas brotações transgênicas se desenvolvendo em MIB1 (A); brotos transgênicos maiores em desenvolvimento em MIB2 (B); porção interna de um calo quimérico expressando eYFP-uv (C); brotação alongada em meio MA (D); plântula em meio de enraizamento (E).

Na fase *ex vitro*, quando as plantas estão sob luz branca ou natural, não é possível observar nenhuma diferença visível entre os eventos transgênicos e não transgênicos. Todavia em ambientes escuros sob iluminação UV-365 nm, foi possível discriminar três classes fenotípicas com base no padrão de fluorescência: plantas não transgênicas, quiméricas e totalmente transgênicas.

As plantas não transgênicas apresentam coloração avermelhada enquanto as plantas transgênicas exibem fluorescência verde e uniforme em todos os tecidos, podendo variar de intensidade conforme o evento gerado (Figura 3A). As plantas quiméricas apresentaram um padrão mosaico, variegado e bicolor vermelho e verde, tanto nas folhas quanto nas vagens (Figura 3B e 3C). A expressão do eYGFP-uv, também pode ser observada em flores e nos embriões em desenvolvimento, demonstrando a manutenção da expressão ao longo do ciclo (Figura 3D e 3E).

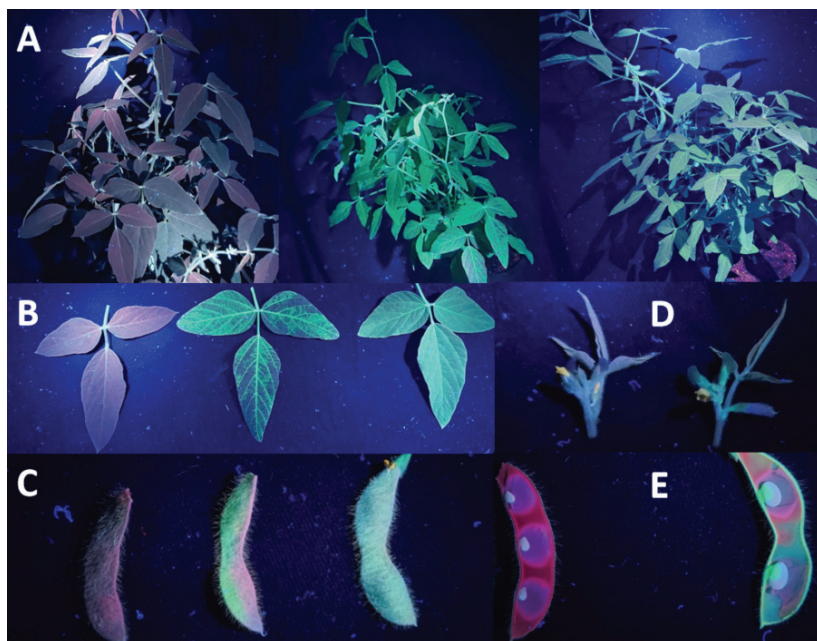


Figura 3. Desenvolvimento *ex vitro* de: plantas (A), folhas (B) e vagens (C), não transgênicas, quiméricas e totalmente transgênicas. Flores (D) e sementes em desenvolvimento (E), não transgênicas e transgênicas, sob luz UV-365 nm.

Os resultados demonstram que a seleção baseada exclusivamente em herbicida não é suficiente para eliminar o desenvolvimento de plantas escape, e na ausência do marcador visual a genotipagem (PCR) é imprescindível, porém mesmo assim esta é incapaz de discriminar eventos quiméricos.

Em contraste, o uso do marcador eYGFP-uv permite a identificação visual, precoce e não destrutiva de eventos completamente positivos. Este marcador atua como um filtro contra plantas “escape”, que frequentemente sobrevivem à seleção química com glufosinato de amônio. Além da seleção precoce, a grande vantagem no contexto das TIMPs é a facilitação do avanço de geração. Essa estratégia não apenas reduz drasticamente os custos operacionais com PCR e extração de DNA, mas também acelera a “limpeza” do *background* genético da cultivar elite.

A utilização do eYGFP-uv apresenta vantagens estratégicas significativas quando comparada aos marcadores de seleção visual e histoquímica tradicionalmente empregados. Diferente do sistema GUS (β -glucuronidase), que resulta na morte do tecido, o eYGFP-uv permite uma triagem não destrutiva e em tempo real.

Embora sistemas baseados em pigmentação, como GmW1 e RUBY, permitam a identificação visual de eventos transformados (Chen et al., 2023, 2024), sua eficiência pode variar. Em relação ao RUBY, que depende da expressão coordenada de três genes (betalaínas), o eYGFP-uv destaca-se pela sua simplicidade genômica e menor carga metabólica para a célula vegetal, sendo um cassete único e compacto. Além disso, marcadores como dsRed2 e a eGFP convencional exigem sistemas de iluminação e filtros de emissão específicos de alto custo para a sua visualização (Yan et al., 2026).

Em contraste, a variante eYGFP-uv é otimizada para detecção sob luz ultravioleta de amplo espectro (365 nm), permitindo o uso de dispositivos de baixo custo, como lanternas portáteis de LED UV, possibilitando triagem rápida e não destrutiva ao longo do processo.

Esses resultados reforçam a importância de marcadores visuais no monitoramento da transformação vegetal. Conforme demonstrado por Yuan et al. (2021), a utilização do eYGFP-uv foi incorporada com sucesso na transformação por organogênese indireta de calos de *Arabidopsis*, tabaco e papoula. Nossos resultados demonstraram também a viabilidade do marcador visual na transformação estável via organogênese direta de cultivares elite de soja.

Conclusão

A aplicação do eYGFP-uv integrada ao protocolo de transformação e edição genômica no sistema CRISPR/Cas representa uma estratégia eficiente para reduzir a ocorrência de escapes e otimizar a seleção de eventos transformados em soja.

Referências

- CHEN, L.; CAI, Y.; LIU, X.; YAO, W.; WU, S.; HOU, W. The RUBY reporter for visual selection in soybean genome editing. **aBIOTECH**, v. 5, p. 209-213, 2024. DOI: 10.1007/s42994-024-00148-6.
- CHEN, L.; YUAN, S.; CAI, Y.; YAO, W.; SU, Q.; CHEN, Y.; ZHANG, J.; HOU, W. See the color, see the seed: GmW1 as a visual reporter for transgene and genome editing in soybean. **The Crop Journal**, v. 11, p. 311-315, 2023. DOI: 10.1016/j.cj.2022.07.004.
- FREITAS-ALVES, N. S.; MOREIRA-PINTO, C. E.; TÁVORA, F. T. P. K.; PAES-DE-MELO, B.; ARRAES, F. B. M.; LOURENCO, I. T.; MOURA, S. M.; OLIVEIRA, A. C.; MORGANTE, C. V.; QI, Y.; SA, M. F. G. de. CRISPR/Cas genome editing in soybean: challenges and new insights to overcome existing bottlenecks. **Journal of Advanced Research**, v. 73, p. 53-72, 2025. DOI: 10.1016/J.JARE.2024.08.024.
- HADA, A.; KRISHNAN, V.; PUNJABI, M.; BASAK, N.; PANDAY, V.; JEEVARAI, T.; MARATHE, A.; GUPTA, A. K.; JOLLY, M.; KUMAR, A.; DAHUJA, A.; MANICKAVASAGAM, M.; GANAPATHI, A.; SACHDEV, A. Refined glufosinate selection and its extent of exposure for improving the *Agrobacterium*-mediated transformation in Indian soybean (*Glycine max*) genotype JS-335. **Plant Biotechnology**, v. 33, n. 5, p. 341-350, 2016. DOI: 10.5511/plantbiotechnology.15.0901a.
- KANAMORI, N.; MERTZ-HENNING, L. M.; MARIN, S. R. R. **Metodologia para transformação de soja via *Agrobacterium tumefaciens***. Londrina: Embrapa Soja, 2017. 6 p. (Embrapa Soja. Circular técnica, 128).
- PARVEEZ, G. K. A.; MAJID, N. A. Green fluorescent protein as a visual selection marker for oil palm transformation. **Industrial Crops and Products**, v. 115, p. 134-145, 2018. DOI: 10.1016/j.indcrop.2018.02.016.
- SHIMIZU, A.; SHIRATORI, I.; HORII, K.; WAGA, I. Molecular evolution of versatile derivatives from a GFP-like protein in the marine copepod *Chiridius poppei*. **PLoS One**, v. 12, e0181186, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0181186.

SUBEDI, B.; SCHRICK, K. EYFP fusions to HD-Zip IV transcription factors enhance their stability and lead to phenotypic changes in *Arabidopsis*. **Plant Signaling & Behaviour**, v. 17, 2119013, 2022. DOI: 10.1080/15592324.2022.2119013.

XU, H.; GUO, Y.; QIU, L.; RAN, Y. Progress in soybean genetic transformation over the last decade. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, 900318, 2022. DOI: 10.3389/fpls.2022.900318.

XU, H.; ZHANG, L.; ZHANG, K.; RAN, Y. Progresses, challenges, and prospects of genome editing in soybean (*Glycine max*). **Frontiers in Plant Science**, v. 11, 571138, 2020. DOI: 10.3389/fpls.2020.571138.

YAN, T.; QIAN, X.; PAN, H.; HAN, J.; WANG, Q.; LIU, C.; GUO, D.; LIU, X. From seed to whole plant: An innovative visual marker system to enhance selection efficiency in soybean genome editing. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 25, p. 820-823, 2026. DOI: 10.1016/j.jia.2025.06.010.

YUAN, G.; LU, H.; TANG, D.; HASSAN, M. M.; Li, Y.; CHEN, J. G.; TUSKAN, G. A.; YANG, X. Expanding the application of a UV-visible reporter for transient gene expression and stable transformation in plants. **Horticulture Research**, v. 8, 234, 2021. DOI: 10.1038/s41438-021-00663-3.