

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências

Ruth Michel

**Desenvolvimento de planta transgênica de soja resistente à Ferrugem Asiática
por meio do silenciamento de um gene do fungo *Phakopsora pachyrhizi* via
RNAi produzido pelo hospedeiro**

Porto Alegre -RS
2019

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências

Ruth Michel

**Desenvolvimento de planta transgênica de soja resistente à Ferrugem Asiática
por meio do silenciamento de um gene do fungo *Phakopsora pachyrhizi* via
RNAi produzido pelo hospedeiro**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado no Instituto de Biociências
da UFRGS como requisito básico para a conclusão do Curso de Bacharelado
em Ciências Biológicas.

Orientadora:

Maria Helena Bodanese Zanettini

Coorientador:

Ricardo Luís Mayer Weber

Porto Alegre -RS
2019

CIP - Catalogação na Publicação

Michel, Ruth
Desenvolvimento de planta transgênica de soja resistente à Ferrugem Asiática por meio do silenciamento de um gene do fungo *Phakopsora pachyrhizi* via RNAi produzido pelo hospedeiro / Ruth Michel. -- 2019.

27 f.

Orientadora: Maria Helena Bodanese-Zanettini.

Coorientador: Ricardo Luis Mayer Weber.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Bacharelado em Ciências Biológicas, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Ferrugem Asiática da Soja. 2. Bombardeamento de partículas. 3. Silenciamento gênico. I. Bodanese-Zanettini, Maria Helena, orient. II. Weber, Ricardo Luis Mayer, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

À toda equipe do laboratório: Maria Helena, Ricardo, Luisa, Lariane, Giulia e Felipe. Todos foram muito especiais nesta caminhada e sou eternamente grata por me ajudarem;

À toda equipe da genética vegetal, principalmente a Letícia por ter feito muitos litros de meio de cultura;

Ao meu namorado, por todo o suporte emocional;

À minha família: minha irmã, meu pai, minha mãe e minha vó, por acreditaram em mim sempre;

Aos meus amigos Nátali, Camila e Odone, que me faziam sorrir todos os dias;

Aos meus colegas da Souza Cruz;

À banca examinadora, Dr. Giancarlo e Dra. Márcia, por aceitarem meu convite para banca;

A Deus, por me trazer até aqui apesar de tudo.

SUMÁRIO

Resumo	6
1 . Introdução	7
1.1 Justificativa.....	8
1.2 Objetivo	9
2 . Metodologia	9
2.1 Seleção e assepsia do material vegetal.....	9
2.2 Estabelecimento da cultura embriogênica.....	10
2.3 Vetor e construção gênica.....	11
2.4 Bombardeamento de partículas	12
2.5 Seleção	13
2.6 Maturação e aclimação	14
2.7 Análise Molecular	15
3 . Resultados e Discussão.....	16
3.1 Vetor e construção gênica.....	16
3.2 Plantas obtidas após seleção com Imazapyr	16
4 . Considerações Finais.....	20
5 . Referências	20
6 . Anexos	23
Anexo I.....	23
Anexo II.....	26

RESUMO

A Ferrugem Asiática da Soja (FA) é uma doença causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, sendo de grande importância por gerar perdas em grande escala em lavouras. Assim, muitos esforços têm sido feitos por pesquisadores para desenvolver cultivares de soja que sejam resistentes à FA. A abordagem desde estudo foi utilizar a tecnologia de Silenciamento Gênico Induzido pelo Hospedeiro. O objetivo é a obtenção de plantas estavelmente transformadas de soja que expressem um RNA de interferência (RNAi) que visa ao silenciamento do gene alvo do fungo. Resultados preliminares, envolvendo bombardeamento de conjuntos de embriões somáticos, seleção de embriões Imazapyr-resistentes, regeneração e a sobrevivência de plantas infectadas em casa de vegetação indicam a possível obtenção de três eventos independentes de transformação.

Palavras-chave: Ferrugem Asiática; Silenciamento Gênico; Bombardeamento de partículas.

ABSTRACT

Asian soybean rust (ASR) is a disease caused by the fungus *Phakopsora pachyrhizi*, remarkably important due to its capacity to generate great losses on soybean fields. Thus, efforts have been performed by researchers to develop soybean cultivars resistant to ASR. The approach of this study was to use the *Host Induced Gene Silencing*. The objective is to obtain stable transformed soybean plants that express a RNA interference (RNAi) that aims at silencing the target gene of the fungus. Preliminary results, involving bombardment of somatic embryo clusters, selection of Imazapyr-resistant embryos, regeneration and survival of infected plants in the greenhouse indicate the likely obtention of 3 independent transgenic events.

Key-words: Soybean Asian Rust; Gene Silencing; Particle bombardment.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] no mundo; com a safra 2018/2019 gerando cerca de 115 milhões de toneladas (CONAB, 2019). A soja é exportada, principalmente, sob forma de grão, majoritariamente pelo estado do Mato Grosso do Sul, seguido por Mato Grosso e Rio Grande do Sul, tendo somado 3,3 bilhões de dólares na safra de 2019 (EMBRAPA, 2019).

Um dos principais fatores que pode impactar esta produtividade, contudo, é a Ferrugem Asiática da Soja, uma doença causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*. Esta doença foi inicialmente detectada no Brasil no ano de 2001 e, desde então, tem sido fonte de grande preocupação para produtores rurais, uma vez que pode causar perdas na lavoura de até 100% de forma muito rápida, por tratar-se de um fungo esporulante (Andrade e Andrade, 2002). O ciclo de infestação inicia quando os uredosporos do fungo atingem a superfície das folhas, formando estruturas de fixação e absorção de nutrientes do mesófilo do hospedeiro. Logo, com a formação de soros na folha infectada, mais esporos se formam e atacam novamente as plantas vizinhas. Os principais sintomas incluem manchas de tom bronze na face adaxial das folhas e de tom ferrugem na face abaxial (Goellner et al., 2010).

Em sua tese de doutorado, a Dra. Michelle Pires Rincão (Rincão, 2016), orientada pela Dra. Francismar Corrêa Marcelino-Guimaraes (Embrapa Soja - Londrina/PR), desenvolveu plantas de soja que foram transformadas transientemente utilizando a metodologia VIGS (do inglês, *Virus Induced Gene Silencing* - silenciamento gênico induzido por vírus). A construção utilizada para a engenharia genética continha um gene que gerava uma molécula de RNA capaz de silenciar a expressão de um gene do fungo, o qual é essencial para sua infecção no tecido do hospedeiro. Os dados obtidos neste estudo mostraram que o silenciamento pelo método VIGS resultou numa redução significativa (~60%) no nível de transcritos do gene alvo, detectado por RT-qPCR. Além disto, em bioensaios, foi verificada grande redução na severidade da doença (tamanho das lesões, número de urédias, entre outros parâmetros). Uma tecnologia conhecida como RNA de interferência (RNAi), tem sido usada como estratégia para o silenciamento gênico, principalmente no campo da medicina. Muitos estudos mostram a eficácia do RNAi como um supressor

da fase de tradução, no processo de produção de proteínas, com resultados promissores para o tratamento de doenças como câncer, HIV e malária (Reddy, 2007). Mais recentemente, muitas pesquisas têm sido desenvolvidas utilizando esta técnica para produzir plantas geneticamente modificadas capazes de resistir a pestes (Huvenne e Smaghe, 2010) e de tolerar estresses abióticos (Manavalan et al., 2012; Pradhan et al., 2015), além de aumentar significativamente a eficiência metabólica (South et al., 2019).

O Silenciamento Gênico Induzido pelo Hospedeiro (do inglês, *Host Induced Gene Silencing*) é uma técnica baseada em RNAi que, diferentemente do método VIGS, irá integrar-se ao genoma da planta e produzir constitutivamente esta molécula de RNA 'silenciador' (Govindarajulu et al. 2015). Desta forma, a característica desejada poderá ser passada para as gerações seguintes durante o programa de melhoramento.

1.1 JUSTIFICATIVA

Em relação ao aspecto econômico, como já citado, o Brasil é o segundo maior produtor de soja do mundo, ficando apenas atrás dos Estados Unidos com aproximadamente 35 milhões de hectares plantados anualmente (EMBRAPA, 2018). Nos próximos trinta anos, essa produtividade deverá aumentar ainda mais, uma vez que a expectativa é de que a população mundial aumente em 2 bilhões de pessoas até 2050 (FAO, 2009)

Até a safra 2008/2009, os custos da ferrugem-asiática desde sua introdução no Brasil, em 2001, foram estimados em US\$ 11,85 bilhões, que compreendem perda de produtividade e custos ligados à aplicação e compra de fungicidas. Assim, a praga é considerada uma das mais dispendiosas em termos financeiros e de manejo (Lima et al. 2012).

Entre as diversas formas de manejo da doença, destacam-se o controle químico e o controle genético, por apresentarem facilidade na manutenção da lavoura. Atualmente, o controle químico, com o uso de fungicidas preventivos e corretivos, é o mais utilizado. Contudo, o alto preço destes agroquímicos, a contaminação do ambiente pelo seu uso indiscriminado e a crescente dificuldade de controle, devido à

resistência do patógeno, geram uma pressão no mercado para a criação de cultivares-elite, que resistam à infestação. Atualmente, não há variedades transgênicas comerciais, e as variedades desenvolvidas por melhoramento tradicional não dispensam o uso concomitante dos fungicidas (Godoy et al.,2016)

1.2 OBJETIVO

Baseado em todos os aspectos supracitados, em parceria com a Dra. Francismar, o objetivo do presente projeto é a obtenção de plantas de soja estavelmente transformadas que expressem um RNAi que visa ao silenciamento do gene alvo do fungo.

As etapas realizadas incluem: o estabelecimento da cultura *in vitro* de embriões somáticos de soja, a transformação genética destes por bombardeamento de partículas, a seleção de embriões transformados, a regeneração de plantas e a comprovação da inserção do transgene por PCR.

2. METODOLOGIA

2.1 SELEÇÃO E ASSEPSIA DO MATERIAL VEGETAL

Duas cultivares de soja - IAS-5 e Bragg - foram semeadas em campo aberto na Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A colheita foi realizada quando as plantas atingiram o estágio fenológico R5, com legumes imaturos contendo grãos de 3 – 5 mm de comprimento, que não preenchem completamente as cavidades (Neumaier et al., 2000).

O processo de assepsia dos legumes foi realizado em capela de fluxo laminar, imergindo-os por um minuto em álcool 70%, posteriormente por 15 minutos em hipoclorito de sódio 4% com duas gotas de Tween-20, que age como um detergente e, por último, lavando-os três vezes em água destilada estéril, para retirar qualquer resquício dos produtos desinfestantes anteriores.

Em seguida, com pinças estéreis, os legumes foram abertos e suas sementes imaturas foram retiradas. A parte da semente contendo o embrião zigótico foi

descartada e os cotilédones foram colocados em placas de Petri, com a superfície abaxial em contato com meio de cultura D40, composto por sais MS (Murashige & Skoog, 1962), Vitaminas B5 (Gamborg et al. 1968), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) a 40 mg L⁻¹, sacarose a 6% e agente gelificante Phytigel a 0,3%, e pH 7.0 ¹. As culturas foram mantidas a 25 °C, fotoperíodo de 16 horas de claro e 8 horas de escuro, com intensidade luminosa de 22.5 μEm^{-2s-1} (Figura 1).

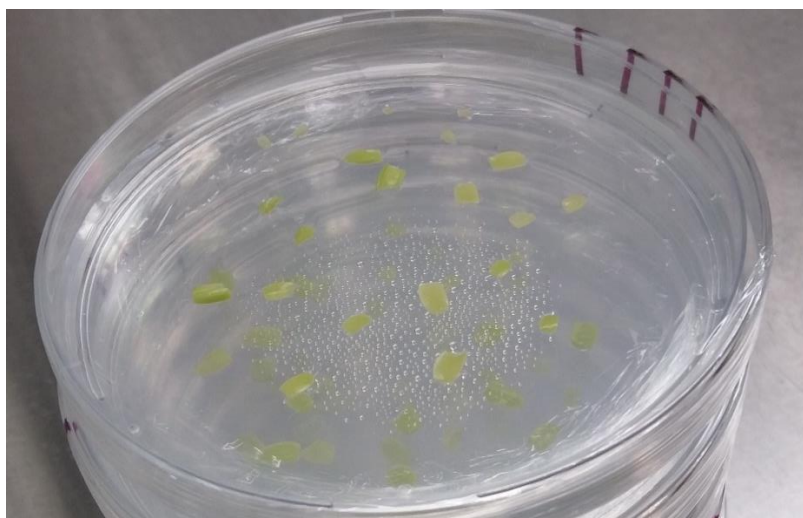


Figura 1 – Cotilédones de soja em meio D40. A alta concentração de 2,4-D no meio induz a formação de embriões somáticos nas extremidades do tecido, que fica exposto ao meio por 40 dias. Fonte: Ruth Michel

2.2 ESTABELECIMENTO DA CULTURA EMBRIOGÊNICA

Após 40 dias em meio D40, os embriões somáticos foram excisados e transferidos para meio D20 (Figura 2), de mesma composição que o meio D40, mas com metade da concentração de 2,4-D e pH ajustado para 5.7 (Wright et al., 1991). A cada 21 dias, os conjuntos embriogênicos eram repicados para meio de cultura novo. Este processo foi mantido por aproximadamente 8 meses na sala de cultura *in vitro*, do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Genética (UFRGS).

¹ Tal pH mostrou-se mais eficaz na indução de embriões somáticos por tornar absorção de 2,4-D mais lenta e gradual (Santarém et al., 1997)



Figura 2 – Embriões somáticos excisados em meio D20, com metade da concentração de 2,4-D do meio D40. Tal concentração do regulador de crescimento irá induzir a proliferação dos embriões somáticos excisados. Fonte: Ruth Michel

2.3 VETOR E CONSTRUÇÃO GÊNICA

Duas diferentes construções plasmidiais – pAHASRNAi2:2740 (Anexo I a) e pAHASRNAi2:4692 (Anexo I b) - foram desenvolvidas e enviadas pelo grupo da Dra. Francismar. Elas derivam do plasmídeo “pBGMVRNAiAHAS”, desenvolvido pelo pesquisador da EMBRAPA, Dr. Francisco Aragão (Aragão et al., 2013). A região do T-DNA dos plasmídeos utilizados contém fragmentos do gene alvo (cada construção foi desenvolvida visando regiões diferentes do gene alvo) no sentido senso e anti-senso, separados por um *intron*, e o gene *ahas*, que confere resistência ao herbicida Imazapyr.

Os plasmídeos estavam em *Escherichia coli* em quatro amostras diferentes, denominadas 2-1, 2-2, 4-1, 4-2, sendo que as de número 2 são da construção pAHASRNAi2:2740 e as de número 4 da construção pAHASRNAi2:4692. Assim, as bactérias foram plaqueadas em meio LB sólido com 50 mg L⁻¹ de canamicina (37°C,

overnight), e posteriormente inoculadas em LB líquido com 50 mg L⁻¹ de canamicina (37°C, 150 rpm, *overnight*). Logo, foi realizada a extração plasmidial em triplicata (MiniPrep – Ludwig®) e digestão com a enzima de restrição *EcoRV*, para confirmar a identidade das construções. Ao final, 4 das 12 extrações possuíam fragmentos com tamanho esperado e foram utilizados para o bombardeamento de partículas.

2.4 BOMBARDEAMENTO DE PARTÍCULAS

O protocolo de transformação genética utilizado foi desenvolvido por Droste et al. (2002). Os conjuntos embriogênicos previamente cultivados foram selecionados conforme seu estado fisiológico e morfologia. Aproximadamente 20 destes foram dispostos em cada placa de petri contendo meio D20 novo, por 48 horas (Figura 3).

No dia do bombardeamento, as placas foram mantidas semi-abertas por 15 minutos, dentro da capela de fluxo laminar, para reduzir o turgor dos tecidos vegetais. Uma solução contendo 5 µl do plasmídeo (1 µg µl⁻¹), 25 µl de partículas de tungstênio (100 mg ml⁻¹), 25 µl de CaCl₂ (2.5 M) e 10 µl de espermidina (0.2 M) foi utilizada no bombardeador de partículas de baixa pressão.

Foram realizados dois experimentos de transformação. No primeiro, cada construção foi utilizada para bombardear cinco placas por cultivar. Como controle, foram bombardeadas com partículas livres de DNA, cinco placas de cada cultivar. No segundo experimento, foram bombardeadas cinco placas/cultivar com a construção pAHASRNAi2:2740 e três placas/cultivar com a construção pAHASRNAi2:4692, além de cinco placas/cultivar, com partículas livres de DNA (controle).

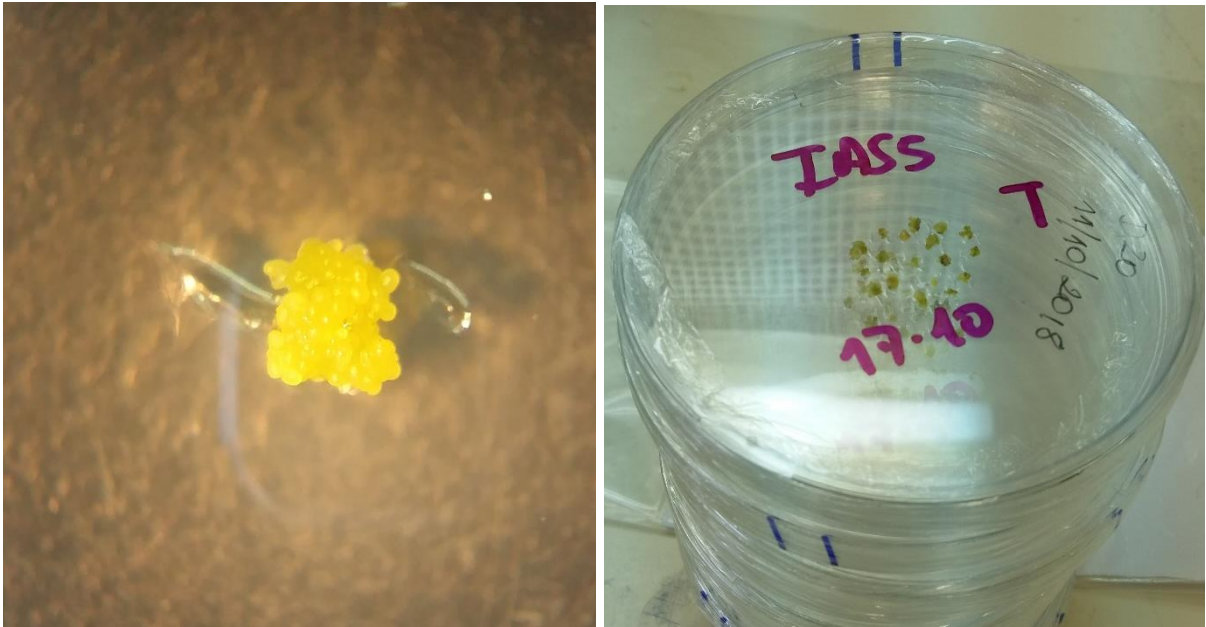


Figura 3 – Conjunto embriogênico em estado fisiológico saudável, com morfologia ideal para bombardeamento, o que inclui células esféricas e coloração verde clara (à esquerda). Conjuntos embriogênicos centralizados em meio D20, para bombardeamento (à direita). O posicionamento destes no centro da placa é importante porque o feixe que contém a solução com a construção de DNA atinge exatamente esta posição quando se utiliza o bombardeador de baixa pressão. Fonte:

Ruth Michel

2.5 SELEÇÃO

Os conjuntos de embriões bombardeados foram mantidos no mesmo meio por 10 dias, quando então foram transferidos para o primeiro meio de proliferação D20 contendo Imazapyr, esterilizado por filtração. Não há registro na literatura de seleção de embriões somáticos de soja com Imazapyr. Dessa forma, foi necessário estabelecer uma concentração ótima. À metade do total de placas foram adicionados 25 μM de Imazapyr, e à outra metade 50 μM , aleatoriamente. O subcultivo foi feito durante 3 meses com repicagens para meio novo a cada 15-21 dias mantendo a mesma concentração de herbicida da placa antiga. Cada conjunto embriogênico obtido ao final da etapa de seleção é considerado um evento independente de transformação.

2.6 MATURAÇÃO E ACLIMATAÇÃO

Os conjuntos sobreviventes da etapa anterior foram transferidos para meio MSM6AC (Finer & McMullen, 1991), composto por sais MS, Vitaminas B5, 6% de maltose, 0,5% de carvão ativado 0,3% de Phytigel, com pH ajustado para 5.8 (Figura 4). Além dos embriões submetidos ao bombardeamento, conjuntos de embriões somáticos, com a mesma idade fisiológica, foram colocados em meio de maturação, para servir como controle do potencial de conversão em plantas das culturas embriogênicas utilizadas como alvo para o experimento.

Após 30 dias, para uma segunda etapa de seleção, os embriões histodiferenciados foram transferidos para meio MSM6 com Imazapyr 50 μ M, porém sem carvão ativado, e subcultivados por mais 30 dias

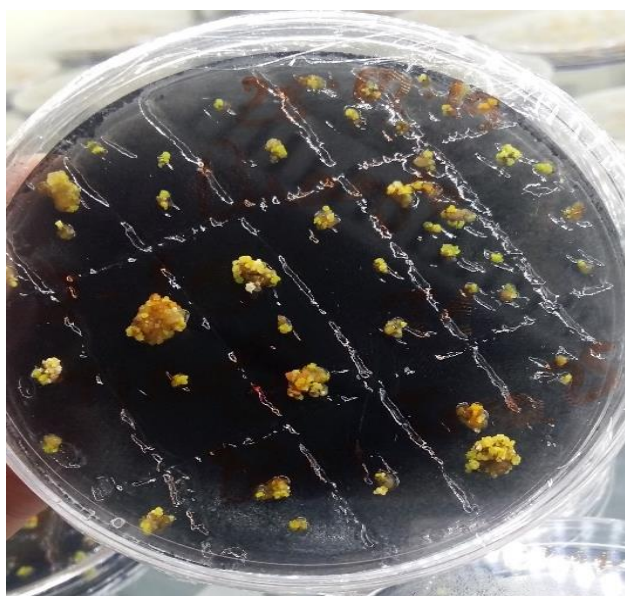


Figura 4 – Conjuntos embriogênicos em meio MSM6AC. O carvão ativado, que dá a coloração preta ao meio, serve para absorver o 2,4-D remanescente nas células, induzindo a histodiferenciação. Fonte: Ruth Michel

Após o período de maturação, os embriões histodiferenciados foram transferidos para placas de Petri estéreis, sem meio de cultura, para dessecação. Após 48 horas, os embriões foram colocados em meio MS, sem nenhum regulador de crescimento ou herbicida (denominado meio MS0), para dar início ao processo germinação.

À medida que as raízes começavam a crescer, os embriões eram transferidos para o mesmo meio, porém em recipientes maiores, para que a plântula pudesse se desenvolver. Assim que era observado o primeiro trifólio e a raiz se encontrasse alongada, as plântulas eram transplantadas para copos de plástico contendo vermiculita, umedecidos com solução nutritiva e cobertos com copos plásticos transparentes, dando início, assim, à etapa de aclimação (Figura 5)

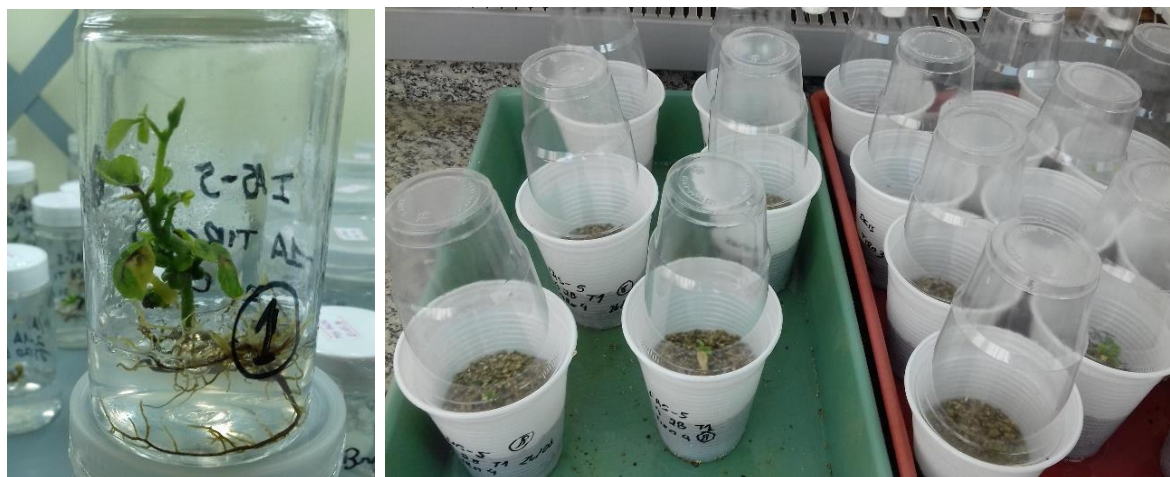


Figura 5 – Plântula após processo de seleção, com crescimento radicular e já com trifólios em meio MS0 e plântulas em aclimação. O processo de aclimação é importante para a adaptação gradual da planta a um ambiente pobre em nutrientes e com menos água disponível. Fonte: Ruth Michel

Os copos foram mantidos em uma sala de cultura de plantas, com luminosidade, temperatura e umidade controladas. As plantas foram expostas gradualmente à umidade ambiente, sendo transferidas para vasos de 5L, contendo substrato apropriado para o crescimento das mesmas. Posteriormente, as plantas foram transferidas para casa de vegetação, e mantidas até completarem o ciclo de crescimento e produzirem sementes.

2.7 ANÁLISE MOLECULAR

Das plantas obtidas foi retirado um trifólio para extração de DNA (Anexo II). A confirmação do estado transgênico está sendo realizada por PCR, utilizando primers específicos para cada vetor e fragmento do gene (senso e antisenso) (Tabela I). O produto da amplificação por PCR, será analisado em um gel de agarose 1%

Tabela 1 - Amplicons estimados de cada par de primers

pAHASRNai2_Fow1 + pAHASRNai2_Rev1	zero	475 pb	2740	<ul style="list-style-type: none"> • pAHASRNai2_Fow1 + 2740_Rev (<u>sense</u>)= 456 pb • pAHASRNai2_Rev2 + 2740_Fow (<u>antisense</u>)= 504 pb
	2740	875 pb		
	4692	766 pb		
pAHASRNai2_Fow2 + pAHASRNai2_Rev2	zero	511 pb	4692	<ul style="list-style-type: none"> • pAHASRNai2_Fow1 + 4692_Rev (<u>sense</u>)= 494 pb • pAHASRNai2_Rev2 + 4692_Fow (<u>antisense</u>)= 526 pb
	2740	911 pb		
	4692	802 pb		

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.2 TECIDO ALVO PARA A TRANSFORMAÇÃO

Como alvo para a transformação foram utilizados conjuntos de embriões somáticos obtidos a partir de cotilédones de embriões zigóticos das cultivares de soja IAS-5 e Bragg. Embora essas cultivares não sejam mais comercialmente utilizadas, a escolha é justificada pois os protocolos de cultura de tecidos *in vitro* já estão muito bem estabelecidos para ambas. No eventual desenvolvimento de um produto transgênico com potencial aplicação comercial, as plantas obtidas deverão ser introduzidas em programa de melhoramento para que a característica seja introgridido em cultivares elite.

3.2 PLANTAS OBTIDAS APÓS SELEÇÃO COM IMZAPYR

No total, 64 plantas (43 de IAS e 21 de Bragg) foram obtidas após o processo de seleção com herbicida Imazapyr e foram aclimatados em vermiculita, sendo que 6 dessas eram controles bombardeados com partículas livres de DNA. Esse “escape” pode representar uma falha no processo de seleção, já que não havia um protocolo bem estabelecido para embriões somáticos de soja utilizando Imazapyr. Contudo, interessantemente, todos estes 6 morreram na etapa de aclimação, o que indica que as outras plantas bombardeadas com as construções de interesse, que passaram pelo

mesmo processo, são potencialmente transgênicas. A aclimação costuma ser muito estressante para as plântulas, pois é o primeiro contato delas com solo e com um ambiente pouco nutritivo. Assim, é esperado que uma parte considerável não sobreviva. Foram obtidas 8 plantas da construção pAHASRNAi2:2740: quatro Bragg, de dois eventos independentes, e quatro IAS-5 de dois eventos independentes. Da construção pAHASRNAi2:4692, foram obtidas 3 plantas, duas Bragg, de eventos independentes e uma IAS-5.

Em geral, a maioria das plantas comerciais de soja contém uma sequência que confere resistência à glifosato ou dicamba, os dois herbicidas mais utilizados nas lavouras. Porém, a escolha do vetor que contém o gene *ahas*, que confere resistência à Imazapyr se deu pelo fato de que seria possível utilizar uma construção já existente e que pertence a pesquisadores da EMBRAPA, o que reduz o custo do processo e evita qualquer problema envolvendo propriedade intelectual. O herbicida em questão, da classe de inibidores de ALS, representa uma alternativa para uso em campo (Metz, 2018). Tal composto age inibindo a atividade enzimática da acetolactato sintase, que participa da biossíntese de leucina, valina e isoleucina, três aminoácidos-chave na capacidade mitótica das células e no transporte de fotossintatos (Shaner et al., 1995). Cabe ressaltar que não existem eventos de soja comerciais que possuem resistência à Imazapyr (CTNBIO, 2019)

Já na casa de vegetação, era esperado que as plantas gerassem sementes, para posteriormente realizar bioensaios inoculando *P. pachyrhizi*. Contudo, ocorreu uma contaminação do fungo dentro da estufa, o que fez com que várias plantas morressem e/ou não florescessem ou produzissem legumes. A doença foi diagnosticada em estágio inicial por um especialista na área de fitotecnia. A ferrugem é uma doença severa e de rápida infestação. Atualmente, são feitas várias aplicações com fungicidas preventivos e curativos, principalmente das classes de azóis e estrobirulinas dependendo da suscetibilidade da lavoura à infestação (Godoy, 2007). O ciclo se inicia quando o uredinósporo, forma de reprodução assexuada do fungo, é formado na urédia e é solto no ar. Este coloniza a folha do hospedeiro, formando um cone apressorial, o qual é adjacente às hifas, estruturas necessárias à penetração na epiderme e, posteriormente, no mesófilo. As hifas, por sua vez, dão origem a haustórios, especializados na absorção de nutrientes. O ciclo dá continuidade com a formação de lesões, que são urédias geradoras de uredinósporos (Goellner et al.,

2010). Os sintomas iniciais da ferrugem incluem áreas cloróticas em forma poligonal, na superfície abaxial, delimitadas pelas nervuras; essas lesões vão se tornando mais escuras, passando por tons castanho-claro e escuro e castanho avermelhado, até o momento em que a folha torna-se completamente amarelada e a desfolha ocorre. Dessa forma, dependendo do estágio fenológico que a ferrugem ataca, pode ocorrer, além da desfolha, também a morte de flores e abortamento de legumes (Fiallos, 2012).

Após este incidente, as 4 plantas que se encontravam aparentemente com menor número lesões que as plantas controle são putativamente transgênicas sendo elas de quatro diferentes eventos independentes de transformação: três da construção pAHASRNAi2:2740 e um da construção pAHASRNAi2:4692 (Figura 6). Este é um importante dado que corrobora a ideia de que tais plantas podem ser transgênicas, apesar de não haver comprovação molecular até o momento. Otimizações de protocolo (principalmente na temperatura de anelamento e na quantidade de DNA molde) estão sendo realizadas para que o resultado à respeito do estado transgênico das plantas seja conclusivo. Uma nova extração de DNA foi realizada, no caso de haver presença de algum inibidor (New England Biolabs, 2012).



Figura 6 – Plantas contaminadas por ferrugem asiática. À esquerda, uma planta bombardeada com a construção pAHASRNAi2:2740, apresentando manchas cloróticas e lesões (urédias) em ambas faces da folhas. À direita, uma planta controle, não bombardeada, com a doença em estado mais avançado. Nesta etapa, toda a planta já está comprometida pela doença, ocorrendo inclusive a morte das flores e a desfolha. Fonte: Ruth Michel

Como próximos passos, as sementes geradas serão multiplicadas, e encaminhadas para a realização de um bioensaio que analisará os mesmos parâmetros do trabalho da Dra. Michele Rincão: nível de esporulação, número de urédias por lesão, número de urédias abertas por lesão e severidade da doença (Rincão, 2016).

Por tratar-se de um inserto criado para técnica de RNAi, o T-DNA de cada uma destas construções contém dois fragmentos distintos do gene do fungo a ser silenciado: um em senso e outro em antisenso, dando origem a uma estrutura em forma de grampo durante a transcrição. Este grampo irá ligar-se à sequência alvo, evitando que a maquinaria molecular do fungo consiga processar o transcrito.

Caso os resultados futuros venham a ser positivos, esta nova tecnologia será um importante passo na agricultura brasileira, visto que as perdas por ferrugem desde 2001 até 2011 somam US\$ 22 bilhões, contabilizando perda de grãos, de arrecadação e custos de controle (EMBRAPA, 2011). Algumas empresas brasileiras como EMBRAPA e TMG oferecem tecnologias que auxiliam no manejo da ferrugem. Algumas delas como, por exemplo, a cultivar TMG 7067 oferece, além da tecnologia Inx (que confere resistência à ferrugem), a resistência a outras doenças e a tolerância à glifosato. A soja BRS 511, desenvolvida pela EMBRAPA Soja, também possui esta tecnologia, chamada SHIELD. Porém, é importante lembrar que ambas cultivares não eliminam o uso de fungicidas, elas apenas ajudam a retardar o desenvolvimento da doença, evitando a multiplicação do fungo.

No Google Patents, ferramenta de pesquisa de patentes online que compreende depósitos feitos em todo o mundo, encontramos, até o momento, 2753 resultados compreendendo os termos “soybean” “asian rust” e “resistance”. Os principais depositantes são a Nissan Chemical Corporation (15.9%), BASF (9.4%) e a Bayer Crop Science (5.1%), o que indica a relevância do desenvolvimento de cultivares resistentes. Outro fato importante é que grande parte delas possui pedidos de proteção no território brasileiro, indicando que o nosso mercado é visado para uma

cultivar com estas características. Além disso, somente em trabalhos acadêmicos, encontramos 15200 resultados para os mesmos termos, indicando um esforço *multi-stakeholder*.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As etapas de seleção e de aclimatação dão indícios de que algumas das plantas obtidas podem ser transgênicas, e tal resultado será confirmado por análises moleculares. Caso afirmativo, futuros testes serão realizados para identificar fenotipicamente a diferença entre tais plantas transgênicas e plantas controle. A perspectiva é de que este trabalho possa contribuir para o avanço nas pesquisas envolvendo resistência à ferrugem asiática da soja.

4. REFERÊNCIAS

ALTMAN, J. Pesticide interactions in crop production. In: Pesticide Interactions in Crop Production: Beneficial and Deleterious Effects. [s.l: s.n.].

ANDRADE, P. J. M.; ANDRADE, DF de AA. Ferrugem Asiática: uma ameaça à sojicultura brasileira. Embrapa Agropecuária Oeste-Circular Técnica (INFOTECA-E), 2002.

ARAGÃO, F et al. Molecular characterization of the first commercial transgenic common bean immune to the Bean golden mosaic virus. Journal of Biotechnology, [s. l.], 2013.

CONAB. V. 6 - SAFRA 2018/19 - N. 11 - Décimo primeiro levantamento | AGOSTO 2019: Acompanhamento da safra brasileira - grãos. 2019. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras>>. Acesso em: 01 dez. 2019.

CTNBIO. Resumo Geral de Plantas Geneticamente modificadas aprovadas para Comercialização. 2019. Disponível em: <cntbio.mcti.gov.br>. Acesso em: 05 dez. 2019.

DROSTE, A.; PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Transgenic fertile plants of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] obtained from bombarded embryogenic tissue. *Euphytica*, [s. l.], 2002.

EMBRAPA. Custos Ferrugem Asiática da Soja: Consórcio Antiferrugem. 2019. Disponível em: <<http://www.consorcioantiferrugem.net/#/conteudos/view/5>>. Acesso em: 01 dez. 2019.

EMBRAPA. Soja em números (safra 2018/2019). 2019. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>>. Acesso em: 01 dez. 2019.

FAO. How to Feed the World in 2050. Insights from an expert meeting at FAO, [s. l.], 2009.

GODOY, C. et al. Asian soybean rust in Brazil: Past, present, and future. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, [s. l.], 2016.

GARCÉS FIALLOS, F. A FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA CAUSADA POR *Phakopsora pachyrhizi* Sydow e Sydow. *Ciencia y Tecnología*, [s. l.], 2012.

GARDESTRÖM, J. Disturbance history influences stressor impacts: effects of a fungicide and nutrients on microbial diversity and litter decomposition. In: *FRESHWATER BIOLOGY 2016*, Anais.

GODOY, C. V. et al. Eficiência de fungicidas para controle da ferrugem asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2006/07. Resultados sumarizados dos ensaios em rede. *Embrapa Soja. Circular técnica*, 2007.

GOVINDARAJULU, M. et al. Host-induced gene silencing inhibits the biotrophic pathogen causing downy mildew of lettuce. *Plant Biotechnology Journal*, [s. l.], 2015.

GOELLNER, K. et al. *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust. *Molecular Plant Pathology*, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 169–177, 2010.

HE, C.; HOLME, J.; ANTHONY, J. Crop Breeding. *Crop Breeding*, [s. l.], v. 1145, p. 75–86, 2016.

HUVENNE, H.; SMAGGHE, G. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: A review. *Journal of Insect Physiology*, 2010.

KUMAR SAHOO, K.. RNAi Mediated Drought and Salinity Stress Tolerance in Plants. *American Journal of Plant Sciences*, [s. l.], 2015.

LIMA, W. F. et al. Resistência da soja à ferrugem-asiática avaliada pela análise da produtividade de grãos. *Summa Phytopathologica*, [s. l.], 2012.

MANAVALAN, L. P. et al. RNAi-mediated disruption of squalene synthase improves drought tolerance and yield in rice. *Journal of Experimental Botany*, [s. l.], 2012.

MEDICE, R. et al. Óleos essenciais no controle da ferrugem Asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. *Ciencia e Agrotecnologia*, [s. l.], 2007.

METZ, LH et al. Controle de plantas daninhas na soja cultivance® com a combinação de [Imazapic+ Imazapyr] em pré-emergência e diferentes herbicidas em pós-emergência em aplicações únicas e sequenciais. In: Embrapa Algodão-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: ENCONTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS AGROSSUSTENTÁVEIS; JORNADA CIENTÍFICA DA EMBRAPA AGROSSILVIPASTORIL, 6., 2017, Sinop.[Trabalhos apresentaos...]. Sinop: Embrapa Agrossilvipastoril, 2017., 2018.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.. Murashige1962Revised.Pdf. *Physiologia Plantarum*, [s. l.], v. 15, p. 474–497, 1962.

NEW ENGLAND BIOLABS. PCR Troubleshooting Guide. [2019]. Disponível em: <<https://international.neb.com/tools-and-resources/troubleshooting-guides/pcr-troubleshooting-guide>>. Acesso em: 01 dez. 2019.

NEUMAIER, N., NEPOMUCENO, A. L., FARIAS, J. R. B., & OYA,, T. (2000). Estádios de desenvolvimento da cultura de soja. Estresses em soja. *Passo Fundo: Embrapa Trigo*, 19-44.

NICOLSKY, R. Inovação tecnológica industrial e desenvolvimento sustentado. *Parcerias Estratégicas*, [s. l.], 2001.

RAAB, R. M.; STEPHANOPOULOS, G.. Dynamics of gene silencing by RNA interference. *Biotechnology and Bioengineering*, [s. l.], 2004.

RECH, E. L.; VIANNA, G. R.; ARAGÃO, F. J. L. High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants. *Nature Protocols*, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 410–418, 2008.

REDDY, L. S.; SAROJAMMA, V.; RAMAKRISHNA, V. Future of RNAi in Medicine : A Review. *World Journal of Medical Sciences* 2, [s. l.], 2007

RINCÃO, M.P Validação funcional de genes essenciais e efetores de *P. pachyrhizi*. 2016. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

SANTAREM, E. R.; PELISSIER, B.; FINER, J. J. Effect of explant orientation, pH, solidifying agent and wounding on initiation of soybean somatic embryos. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, [s. l.], 1997.

SCHMITZ, H K. et al. Sensitivity of *Phakopsora pachyrhizi* towards quinone-outside-inhibitors and demethylation-inhibitors, and corresponding resistance mechanisms. *Pest Management Science*, [s. l.], 2014.

SOUTH, P. F. et al. Synthetic glycolate metabolism pathways stimulate crop growth and productivity in the field. *Science*, [s. l.], 2019. PRADHAN, Akash; NAIK, Nupur;

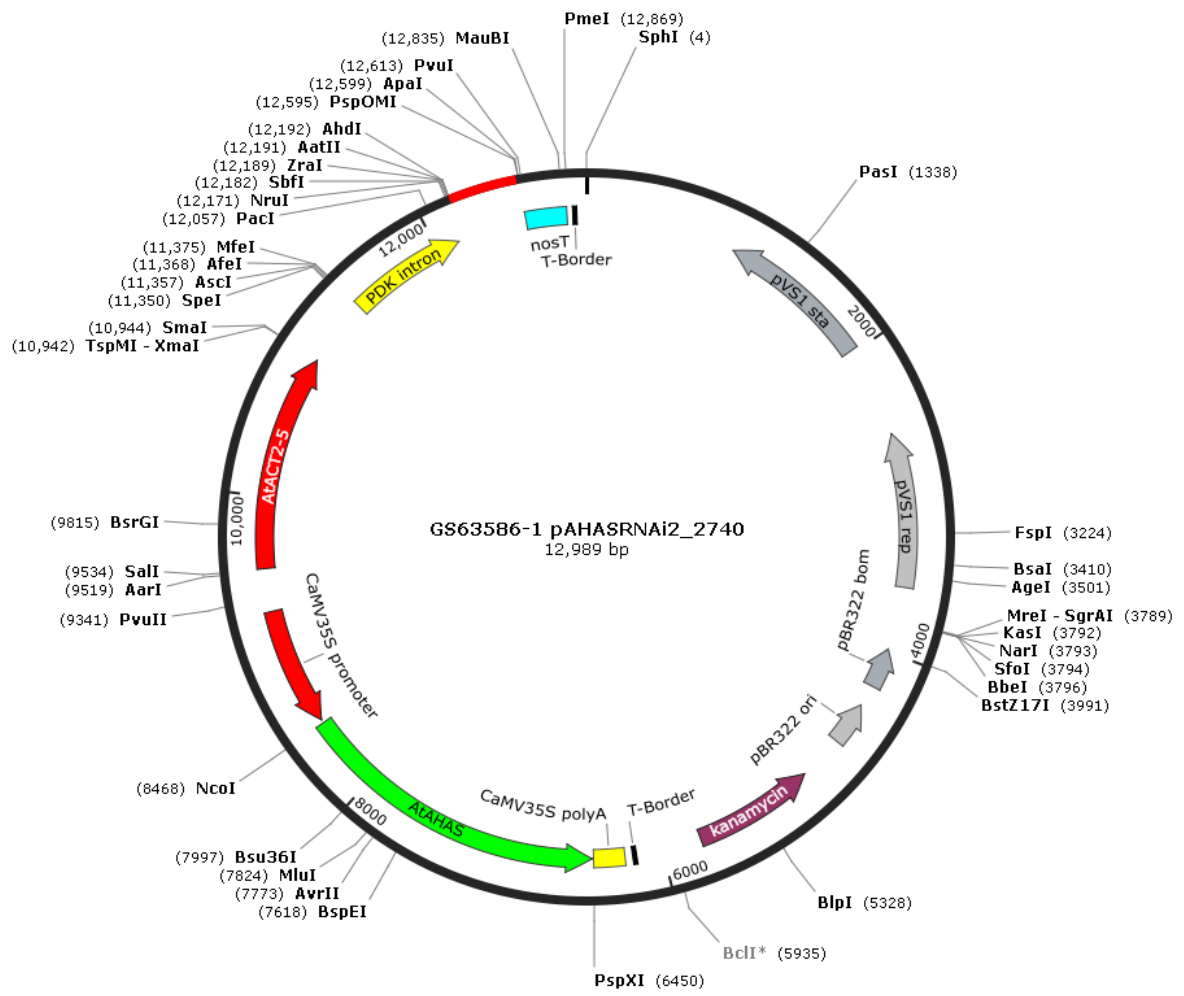
WARD, N. A. et al. Effects of *Simplicillium lanosoniveum* on *Phakopsora pachyrhizi* , the Soybean Rust Pathogen, and Its Use as a Biological Control Agent . *Phytopathology*, [s. l.], 2012.

WRIGHT, M. S. et al. A simple method for the recovery of multiple fertile plants from individual somatic embryos of soybean [*Glycine max* (L.) merrill]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, [s. l.], 1991.

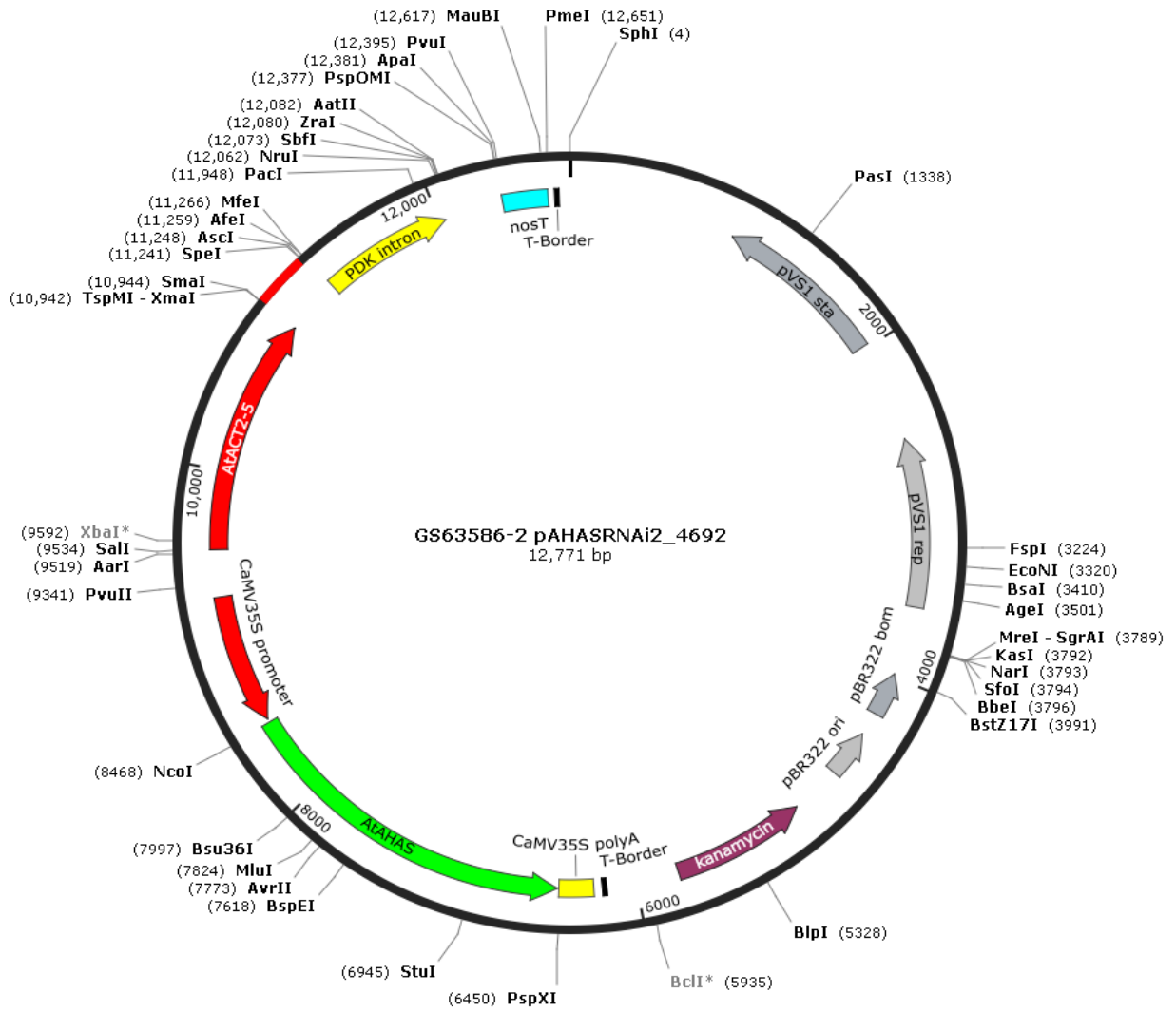
5. ANEXOS

Anexo I

a) VETOR pAHASRNAi2:2740



b) VETOR pAHASRNAi2:4692



Anexo II

PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA

1. Pré-aquecer 700 μ L de CTAB + 16 μ L de β -mercaptoetanol (2% do volume) + 0,1mg/mL (3 μ L) de proteinase K em banho-maria (65°C);
2. Macerar o tecido vegetal (diretamente nos eppendorfs ou com nitrogênio líquido), acrescentar os 719 μ L da solução a cima, vórtex. Deixar em banho-maria (65°C) por 45 minutos;
3. Retirar o material do banho-maria deixando-o atingir a temperatura ambiente;
4. Adicionar 750 μ L da mistura CIA (clorofórmio: álcool isoamílico 24:1) e agitar manualmente os eppendorfs por 15 minutos;
5. Centrifugar por 15 minutos a 7500rpm;
6. Coletar 600 μ L do sobrenadante e transferir para um novo tubo. Adicionar 600 μ L de CIA 24:1 e agitar os eppendorfs manualmente por 15 minutos;
7. Centrifugar por 15 minutos a 7500rpm. Obs.: Caso o sobrenadante fique sujo, repetir o passo 6;
8. Transferir a fase aquosa para um novo tubo e adicionar $\frac{1}{2}$ do volume de acetato de amônio 7.5M e 1 volume de Isopropanol gelado (-20°C). O volume de isopropanol considera o volume total (volume do sobrenadante + volume do acetato). Misturar por inversão;
9. Incubar as amostras a -20°C (freezer) overnight. Alternativamente, pode-se deixar as amostras por 30 minutos no freezer -80°C;
10. Centrifugar por 10 minutos a 12000rpm. Descartar o sobrenadante, vertendo-o com cuidado para não perder o pellet;
11. Adicionar 1mL de etanol 70% ao tubo com o pellet. Homogeneizar no vórtex e centrifugar por 10 minutos a 12000rpm;
12. Remover o etanol. Deixar os tubos abertos por 20 minutos, até que o pellet esteja seco. Alternativamente, secar por 15 minutos no speed-vac;

13. Ressuspender o DNA em 30 μ L de TE ou água Mili-Q autoclavada.

Tampão CTAB

- 100mM Tris HCL pH8;
- 1,4M NaCl;
- 2% CTAB;
- 20mM EDTA 4Na;
- 1% PVP 40000;