

INSTITUTO FEDERAL DO PARANÁ

ENGENHARIA AGRONÔMICA

RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO:
Pesquisa em Biotecnologia Vegetal – Embrapa Soja – Londrina, PR

JOÃO VITOR DA SILVA

IVAIPORÃ

2023

JOÃO VITOR DA SILVA

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO:
Pesquisa em Biotecnologia Vegetal – Embrapa Soja – Londrina, PR**

Relatório de Estágio Curricular Supervisionado
apresentado ao Curso Superior de Engenharia
Agrônômica do Instituto Federal do Paraná,
Campus Ivaiporã, como requisito para
conclusão do curso.

Orientador: Prof. Dr. Denis Santiago da Costa
Supervisora: Dr^a. Liliane Marcia Mertz
Henning

IVAIPORÃ
2023

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	4
2	DESENVOLVIMENTO.....	5
2.1	PLANO DE ESTÁGIO.....	5
2.2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	6
2.2.1	Tecnologia CRISPR-Cas	6
2.2.2	Transformação genética de plantas.....	7
2.2.3	Tecnologia de RNAi	8
2.2.4	Proteção do dsRNA.....	8
2.3	ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	10
2.3.1	Linha de pesquisa de edição gênica via CRISPR-Cas	10
2.3.2	Linha de pesquisa de controle de pragas e plantas espontâneas via RNAi	11
2.3.3	Outras linhas de pesquisa.....	14
2.3.4	Atividades de rotina.....	16
2.3.5	Importância do conhecimento teórico na realização das atividades.....	17
2.3.6	Participação em eventos	17
3	CONCLUSÃO.....	18
4	REFERÊNCIAS	19

1 INTRODUÇÃO

A Embrapa Soja (Centro Nacional de Pesquisa de Soja) é uma das 43 unidades de pesquisa da Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). Essa unidade foi fundada em 1975 no município de Londrina, possuindo o objetivo de desenvolver tecnologias para produção de soja no Brasil. A princípio, foi instalada junto à Empresa Paranaense de Classificação de Produtos (Claspar), em seguida se mudando para junto do Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR) no mesmo ano. Em 1989, com sede própria, a unidade foi transferida para o distrito de Warta (Londrina-PR), em uma fazenda experimental com área de 350 ha.

Até meados de 1970, o plantio comercial de soja (*Glycine max*) era restrito a áreas com latitudes maiores ou iguais a 30°, por possuírem clima temperado ou subtropical. Graças às pesquisas desenvolvidas na Embrapa Soja, foram desenvolvidas variedades com adaptação ao clima tropical em baixas latitudes, por consequência, tornando viável o cultivo de soja em diversas regiões do Brasil. Desde então, a Embrapa Soja vem tornando-se referência mundial na área de pesquisa com essa cultura em regiões tropicais. Além do melhoramento genético clássico desenvolvido com a cultura, outras tecnologias e estratégias têm sido estudadas e desenvolvidas na unidade. Entre as quais estão as ligadas ao manejo da fertilidade dos solos; ao manejo adequado da cultura em distintos ecossistemas brasileiros; ao manejo integrado de pragas, doenças e plantas espontâneas; à aplicação da biotecnologia ao melhoramento de cultivares, à manutenção da microbiota do solo e ao controle de pragas e doenças; entre diversas outras.

Adicionalmente às pesquisas desenvolvidas com a cultura da soja, a unidade é encarregada pela maior parte da pesquisa envolvendo a cultura do girassol (*Helianthus annuus*) no país. Também atuando em conjunto com a Embrapa Trigo, localizada em Passo Fundo - RS, e o Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná (IDR-Paraná) na pesquisa de trigo (*Triticum* spp.) para o estado. Outras unidades estão envolvidas com parcerias de pesquisa para o Paraná, sendo as principais, a Embrapa Milho e Sorgo (Sete Lagoas – MG) e a Embrapa Arroz e Feijão (Santo Antônio de Goiás – GO).

A Embrapa Soja dispõe de uma estrutura de 22.390 m², sendo dividida em 34 casas de vegetação, 34 laboratórios, auditório com 3 salas de apoio, biblioteca, restaurante, garagens, galpões, cozinha experimental e prédios administrativos. Além da área construída e da área experimental ao redor desta, a unidade também conta com outra área, denominada Fazenda Maravilha, que possui 121 ha e é localizada no Distrito de Maravilha (35 km do centro de

Londrina). Atualmente há 311 funcionários no quadro de pessoal da Embrapa Soja, sendo 66 pesquisadores formados em distintas áreas do conhecimento, além de outros empregados especializados, que atuam em apoio à pesquisa, tanto em campo, como nos laboratórios e administração (Embrapa, 2023).

Entre os diversos departamentos de pesquisa, encontra-se o laboratório de biotecnologia vegetal, onde as atividades de estágio foram desenvolvidas. A área de biotecnologia também possui duas casas de vegetação e licença para a utilização do criadouro de percevejos pertencente ao departamento de entomologia. A equipe é formada por pesquisadores, analistas, técnicos, pós-doutorandos, doutorandos, mestrandos, bolsistas de iniciação científica e estagiários formados ou que estão se formando em diferentes áreas do conhecimento, como a engenharia agrônômica, biologia, farmácia, química, genética, biotecnologia e bioprocessos, entre outros.

Atualmente a área de biotecnologia conta com duas principais linhas de pesquisa: a de edição genômica de soja via CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) para a melhoria de características nutricionais e de resistência a estresse abiótico, e a de utilização de RNAi (RNA interferente) para controle de pragas e plantas espontâneas.

Portanto, o objetivo do estágio foi prover conhecimento prático ao aluno por meio do acompanhamento e auxílio a profissionais em experimentos envolvidos às linhas de pesquisa trabalhadas no setor de biotecnologia vegetal da Embrapa Soja.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 PLANO DE ESTÁGIO

O estágio foi programado para o período de 01 de agosto a 30 de setembro, de forma em que a carga horária prevista fosse devidamente cumprida. A princípio, as atividades previstas pelo plano de estágio eram as seguintes: caracterização molecular e fisiológica de genótipos de soja editados para a melhoria da qualidade nutricional, extração de ácidos nucleicos (DNA e RNA), análise de PCR e PCR em tempo real, quantificação dos teores de lectina e inibidores de tripsina e cultivo de plantas em casa de vegetação, acompanhamento das atividades de rotina do laboratório de biotecnologia vegetal, na cultura de tecidos para obtenção de plantas transgênicas e editadas e participação nas reuniões de laboratório para discussão dos resultados dos experimentos. Porém, com o andamento do estágio, outras atividades foram

desenvolvidas. Além dos laboratórios de biotecnologia vegetal, as casas de vegetação, salas de tecnologia de aplicação e o criadouro de percevejos da unidade também foram utilizados para a execução das atividades.

2.2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.2.1 Tecnologia CRISPR-Cas

O sistema CRISPR é um mecanismo de imunidade adaptativa mediada por RNA/proteína presente em bactérias e arqueas. Tal sistema possibilita a clivagem de ácidos nucleicos de vírus ou plasmídeos invasores, evitando seu desenvolvimento, o que garante a defesa contra esses invasores. A sigla CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced ShortPalindromic Repeats* ou Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas) refere-se ao arranjo gênico de pequenas regiões regulatórias repetitivas, contendo genes de RNAs pequenos e não codificantes, que conferem especificidade à defesa bacteriana, o CRISPR RNA (crRNA) e o transativador de crRNA (tracrRNA), ausente em alguns tipos de sistema CRISPR-Cas (do inglês *CRISPR associated protein*) é a nuclease capaz de clivar e destruir o DNA invasor.

Em procariotos, durante o processo de imunização, pequenos fragmentos de DNA exógeno (do invasor) são integrados na região CRISPR do cromossomo hospedeiro. Essa integração ocorre na forma de novos espaçadores (*spacers*) das regiões repetitivas, promovendo a adaptação do hospedeiro contra uma nova infecção pelo mesmo invasor. Caso ocorra uma subsequente invasão pelo mesmo vírus ou plasmídeo, a transcrição da região regulatória CRISPR (agora contendo novos espaçadores) e seu processamento para formação de crRNAs maduros (algumas vezes dependente de tracrRNA) resultam no reconhecimento do invasor: a região 5' do crRNA contendo o *spacer* parecia com a sequência do DNA exógeno na região do espaçador-precursor (protospacer), que é então destruído pela nuclease Cas. A especificidade e a degradação do elemento invasor na maioria dos sistemas CRISPR-Cas também são determinadas por uma pequena sequência de 2-5 pares de base, localizada próxima à sequência-alvo (*protospacer*) no DNA invasor, conhecida como motivo PAM (do inglês *protospacer adjacent motif*) (Lopes-Filho et al., 2020).

Entre as aplicações de CRISPR-Cas9, destacam-se as alterações da expressão gênica (silenciamento, repressão, indução e ganho de função), alterações em aminoácidos para modular e alterar a atividade de proteínas, introdução de genes exógenos para gerar novas características em espécies cultivadas, identificação e análise de módulos gênicos

determinantes de características fenotípicas de interesse agrícola para acelerar a domesticação de plantas, e sua aplicação na biologia sintética. As projeções para o futuro próximo indicam o uso da Cas9 para transferência de genes, tolerância aos estresses bióticos e abióticos, modulação da transcrição, melhoramento do sistema fotossintético de plantas, engenharia de receptores, produção de plantas haploides e a criação de novas espécies para cultivo (Vasconcelos & Figueiredo, 2015).

As sequências dos genes alvos associadas às características desejadas são obtidas a partir do banco de dados do *Phytozome*. Posteriormente essas sequências são alinhadas com o genoma da cultivar de soja desejada para a edição gênica, para assim detectar similaridade. Em seguida, o desenho dos gRNAs (RNA guia) para os genes de interesse é realizado por meio do software CRISPRDirect (Naito et al., 2015). Os guias mais promissores, altamente específicos e com ausência de *off-targets* na região do guia + PAM são selecionados. Então esses gRNAs são clonados em um vetor binário capaz de se multiplicar tanto em *Escherichia coli* quanto em *Agrobacterium tumefaciens* (Polizeli et al., 2023).

2.2.2 Transformação genética de plantas

A transformação é a transferência de genes para o genoma de um organismo de maneira controlada e assexual, sendo uma etapa no processo de edição via CRISPR, esta possibilita a inserção do gene de interesse, fazendo com que este possa ser incorporado e multiplicado no interior das células da planta transformada. Para isso, fazem-se necessárias as etapas de identificação e isolamento do gene de interesse. Em seguida, o gene é ligado a vetores plasmidiais, que são inseridos em bactérias (*Escherichia coli* ou *Agrobacterium Tumefaciens*), para que a clonagem do plasmídeo com o gene ocorra.

A partir disso, a técnica pode seguir por meio de dois processos principais. O primeiro e mais utilizado na atualidade é o método de transformação a partir de *Agrobacterium tumefaciens*, uma bactéria encontrada no solo. Esse microrganismo possui a capacidade de transferir DNA para algumas espécies de eudicotiledôneas. Esse mecanismo pode ser aproveitado para a transferência do gene para o genoma da planta a partir da inserção do plasmídeo com o gene de interesse na bactéria, que é utilizada para infectar o explante desejado. A segunda via de transformação é a biobalística, método no qual o gene é aderido a partículas metálicas e bombardeado para dentro das células da planta. Dessa forma, o gene pode ser assimilado e replicado no interior do núcleo das células da planta bombardeada (Andrade, 2003).

2.2.3 Tecnologia de RNAi

A interferência mediada por RNA (RNAi) é um processo que acontece de forma natural em diferentes organismos, tais como plantas, animais e fungos, por exemplo. Esse processo ocorre com objetivo de proteção, podendo ativar uma resposta de defesa do organismo quando este sofre com a invasão de determinados patógenos. A via de RNAi é ativada pela presença de moléculas de RNA de fita dupla ("*double stranded RNAs*" ou dsRNAs), o que resulta na degradação específica de sequência de RNAs homólogos (da mesma origem dos dsRNAs ativadores). O mecanismo de RNAi inicia a partir de moléculas dsRNA longas clivadas por nucleases (Dicer), assim dando origem a RNAs menores (de 20 a 24 nucleotídeos), intitulados "pequenos RNAs de interferência" ("*small interfering RNAs*" ou siRNAs). Então os siRNAs são reconhecidos e associados ao complexo de silenciamento induzido por RNA ("*RNA-induced silencing complex*" ou RISC). Após ser incorporado ao RISC, somente uma fita de siRNA é preservada, ganhando a capacidade de identificar e degradar sequências de RNA complementares a ela, por meio do bloqueio da tradução de mRNAs em proteínas essenciais ou pela degradação de genomas de RNA virais (Rêgo et al., 2016).

Existem alguns métodos de aproveitar-se desse fenômeno para o controle de determinados alvos. Um desses envolve a incorporação do RNAi às plantas por modificação genética, fazendo com que ocorra a expressão desse mecanismo contra uma espécie alvo. Outras maneiras são a aplicação exógena de dsRNAs específicos por pulverização nas plantas ou alvos ou por meio de iscas contendo a formulações da molécula. Para isso, é necessária a realização do sequenciamento genético do organismo alvo, seguido pela identificação de genes essenciais que sejam específicos, para que outros organismos não sejam afetados (Yang et al., 2011).

As principais vantagens do uso dessa técnica envolvem a capacidade de biodegradação da molécula de dsRNA e a sua alta especificidade, que garantem que organismos além dos alvos não sejam afetados, assim protegendo polinizadores e inimigos naturais de pragas, também não afetando os humanos e demais organismos (Li et al., 2022).

2.2.4 Proteção do dsRNA

Um dos problemas enfrentados para utilização da tecnologia de RNA interferente é a dificuldade de se manter a molécula de dsRNA estável até que adentre organismo alvo, já que os ácidos nucleicos são facilmente degradados por fatores ambientais, tais como temperatura,

radiação solar e pela ação enzimática, principalmente, quando essas enzimas são sintetizadas pelo próprio organismo alvo, etc (Song et al, 2018; Cooper et al., 2019; Wytinck et al., 2020). Esse problema é observado nos percevejos, que secretam enzimas digestivas com a saliva no momento da alimentação (Roza- Gomes et. al, 2011).

Outro desafio encontrado é a passagem das moléculas pelas barreiras protetoras da espécie testada. Por serem hidrofílicas e possuírem carga elétrica negativa, a passagem das moléculas de dsRNA pela membrana plasmática é dificultada (Laisney et al., 2021). Além disso, a parede celular presente nas plantas, geralmente, acaba impedindo a passagem de moléculas maiores que 20 nm (Uslu et al., 2020; Niu et al., 2021; Pardo et al., 2022).

Nesse contexto, surge a necessidade de proteger a molécula de dsRNA a ser aplicada. Algumas práticas nanotecnológicas estão sendo empregadas nessa linha de pesquisa para evitar a desnaturação das moléculas do material genético, entre as quais estão: o uso de nanopartículas de quitosana, nanopartículas de hidróxidos duplos lamelares (HDL), lipossomas, nanocápsulas e nanoesferas.

A quitosana é um biopolímero produzido através da desacetilação alcalina da quitina presente no exoesqueleto de crustáceos (Cao et al., 2019). A sua alta carga positiva é capaz de formar complexos polieletrólitos com nucleotídeos carregados negativamente por interação eletrostática (Katas & Alpar, 2006; Cao et al., 2019). As nanopartículas de hidróxidos duplos lamelares (HDL) ou nanofolhas de hidróxidos duplos são sistemas bidimensionais nanoestruturados a base de argilas biocompatíveis. Suas camadas formadas por hidróxidos de magnésio e alumínio possuem carga positiva, o que permite a complexação com os ácidos nucleicos, que são moléculas aniônicas (Mitter et al., 2017). Os lipossomas são vesículas esféricas compostas por uma ou mais bicamadas lipídicas formadas vesículas unilamelares e/ou multilamelares com uma ou várias bicamadas concêntricas, que envolvem um núcleo aquoso. Nestas estruturas, a presença de lipídios catiônicos ou agentes tensoativos que induzem uma carga positiva, possibilitam a interação destas moléculas com as moléculas de dsRNAs (Kaphle et al., 2018).

As nanopartículas poliméricas são utilizadas como carreadores de bioativos e, em linhas gerais, possuem um diâmetro entre 100 a 400 nm. As nanocápsulas são compostas por um invólucro polimérico que recobre um núcleo oleoso, estruturas onde o bioativo fica depositado. Enquanto nas nanoesferas o bioativo fica retido ou adsorvido em uma estrutura polimérica maciça, formada por um núcleo sólido, já que não há óleo em sua composição (Zielinska et al., 2020). No presente estudo, esses compostos são utilizados com a finalidade de proteger o

dsRNA dos fatores bióticos e abióticos já citados por meio da complexação com esse material. Além disso, quando ocorre a complexação, essas moléculas são compactadas, o que pode facilitar a entrada nas células do organismo alvo.

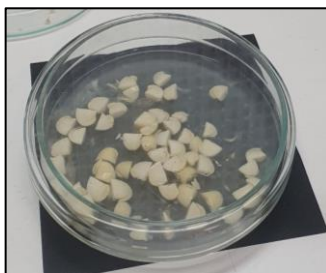
2.3 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

2.3.1 Linha de pesquisa de edição gênica via CRISPR-Cas

As atividades que foram desenvolvidas nessa linha de pesquisa envolvem as etapas de transformação genética de plantas descritas na Circular Técnica 128 (Kanamori et al., 2017).

Primeiramente, são realizados cortes nas sementes embebidas em Meio de Germinação (MG) em cerca de 2/3 abaixo do eixo embrionário. Então, o tegumento é removido e o eixo embrionário é cortado ao meio (Figura 01).

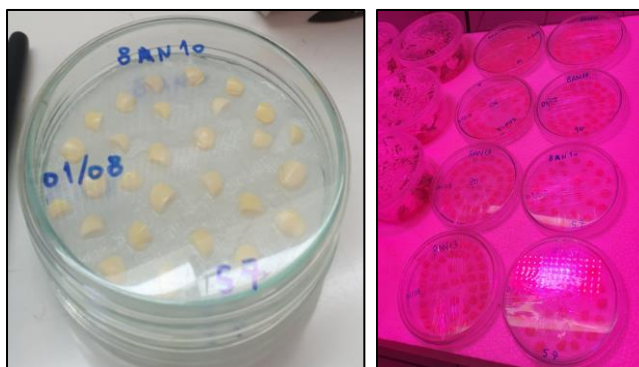
Figura 01. Explantes após corte no eixo embrionário.



Fonte: O autor, 2023.

Em seguida, os primórdios foliares são removidos e são realizadas injúrias com uma escova de metal na área próxima onde esses se instalavam. As sementes feridas são submergidas em meio líquido contendo *Agrobacterium tumefaciens* com o gene de interesse introduzido e, após isso, são dispostas em meio de co-cultivo sólido (MCC) e mantidas em câmara UV por cinco dias (Figura 02).

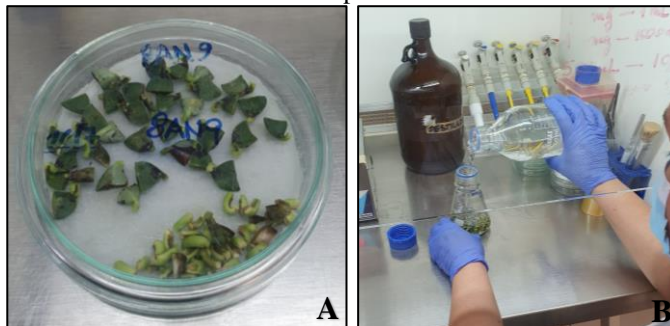
Figura 02. Explantes em MCC sólido transferidos para câmara UV.



Fonte: O autor, 2023.

Após a germinação, os explantes (Figura 03 A) são selecionados, lavados com água destilada esterilizada e, em seguida, as brotações dos hipocótilos são cortadas, de modo a deixar cerca de 3 mm, então passam por uma etapa de desinfecção em hipoclorito de sódio 3% e são enxaguadas com água destilada (Figura 03 B). O processo de desinfecção se repete três vezes para evitar possíveis contaminações.

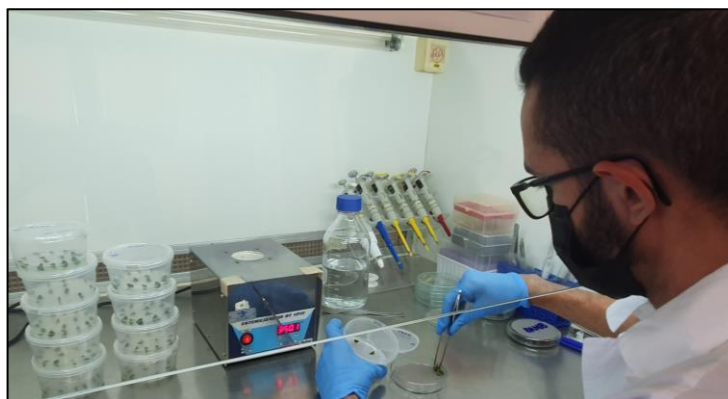
Figura 03. A: Explantes após período de germinação e corte do excesso das brotações; B: higienização dos explantes.



Fonte: O autor, 2023.

A seguir, o excesso de umidade é retirado dos explantes e, após isso, esses são transferidos para meio de indução de multibrotamento solidificado (MIB1) sem adição de agente seletivo, permanecendo em câmara UV até seu crescimento (Figura 04).

Figura 04. Transferência dos explantes para MIB1.



Fonte: O autor, 2023.

Assim como as anteriores, as etapas posteriores têm sequência conforme a metodologia proposta por Kanamori et al. (2017), porém estas não foram realizadas pelo estagiário durante o período de estágio.

2.3.2 Linha de pesquisa de controle de pragas e plantas espontâneas via RNAi

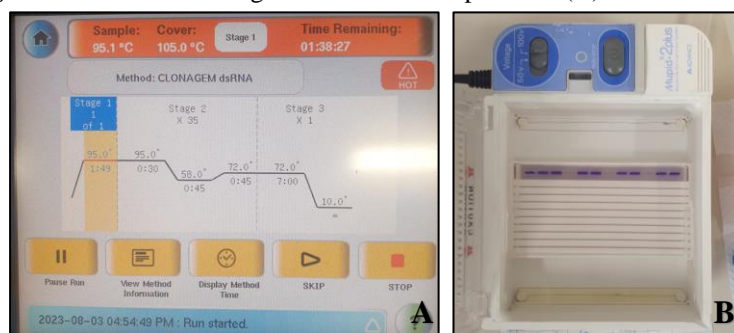
Essa linha de pesquisa conta com três principais etapas experimentais realizadas no setor de biotecnologia vegetal da Embrapa Soja, a produção do dsRNA, o encapsulamento das

moléculas de dsRNA e os bioensaios com a aplicação do dsRNA no organismo alvo. O uso da tecnologia de RNAi é desenvolvida para o controle de Capim amargoso (*Digitaria insularis*), percevejo marrom (*Euschistus heros*) e percevejo barriga-verde (*Diceraeus melacanthus*).

Dentro da etapa de produção do dsRNA existem diversos passos a serem realizados. Inicialmente é realizada a extração de RNA total dos organismos alvos, então é feita a quantificação desse material por meio de espectrofotometria (nanodrop), seguida da verificação da integridade do mesmo por eletroforese em gel de agarose a 3% (assim como nas etapas de eletroforese posteriores).

Após isso, é feita a Transcriptase reversa usando kit “Superscript® III Reverse Transcriptase” (Invitrogen™) para a síntese de cDNA (DNA complementar), em seguida é realizado o PCR com os primers dos genes de interesse para cada organismo alvo. A confirmação da amplificação do produto de PCR é feita por gel de eletroforese (Figura 05).

Figura 05. Análise de integridade do material por PCR (A) e eletroforese (B).



Fonte: O autor, 2023.

Seguida a confirmação dos fragmentos, os mesmos são digeridos com a enzima de restrição (*BsmBI*) e simultaneamente com o plasmídeo. O procedimento tem sequência com a reação de ligação entre o fragmento do gene alvo ao plasmídeo.

De posse do plasmídeo com o gene de interesse, é realizada a transformação genética em *E. coli* (cepa *DH5α*) via choque térmico, as colônias oriundas do processo de transformação são testadas por PCR para confirmar a presença do gene de interesse.

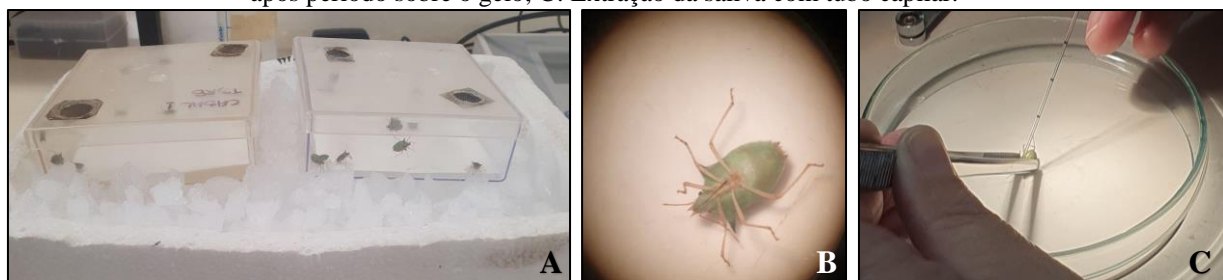
As colônias que apresentarem resultado positivo são então cultivadas em meio LB líquido contendo antibiótico (Ampicilina). Uma alíquota é retirada para estoque e o restante é utilizado para extração do plasmídeo com o uso do kit “QIAprep® Spin Miniprep” (Qiagen™), em seguida é feito novamente uma confirmação por PCR e uma quantificação.

O passo seguinte consiste em uma nova transformação genética, que desta vez é feita em *E. coli* da cepa *HT115*, seguindo conforme a descrição da etapa anterior.

Após a produção do dsRNA, esse material passa pelos distintos processos de

nanoencapsulamento em quitosana, HDL, lipossomas, nanocápsulas ou nanoesferas, separadamente. Em seguida, as diferentes formulações são avaliadas por meio de eletroforese em gel de agarose, garantindo que o material genético foi realmente protegido quando este não migra dentro do gel, ficando preso no poço. Outra etapa de avaliação é realizada por meio da exposição das formulações à saliva dos percevejos, seguida da verificação da integridade por eletroforese. Para isso, a saliva é coletada com auxílio de tubos capilares após a submissão dos insetos a baixas temperaturas (Figura 07).

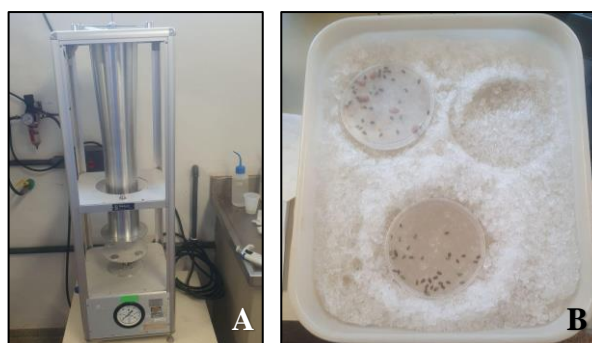
Figura 07. A: percevejos mantidos sobre o gelo para diminuição de seu metabolismo; B: percevejo após período sobre o gelo; C: Extração da saliva com tubo capilar.



Fonte: O autor, 2023.

Os bioensaios com percevejos são realizados de duas maneiras, com a aplicação direta por via cutânea ou por via oral. Quando a aplicação é feita por via cutânea, é empregada a Torre de Potter (Figura 08 A), que pulveriza as formulações de dsRNA, de forma semelhante à que seria conduzida em campo, sobre os insetos. Para isso, no dia anterior às aplicações, são separados em torno de 40 percevejos para cada tratamento e acondicionados em caixas para ambientação. Logo antes de iniciar a aplicação, os percevejos são acomodados em placas de Petri com gelo para diminuir seu metabolismo, dessa forma evitando sua fuga (Figura 08 B). Após a aplicação os percevejos permanecem em repouso por 30 minutos e posteriormente são separados em um “n” de 10 insetos em cada gerbox e mantidos sob condições controladas de umidade e temperatura.

Figura 08. A: torre de Potter; B: percevejos sobre o gelo para a diminuição de seu metabolismo.

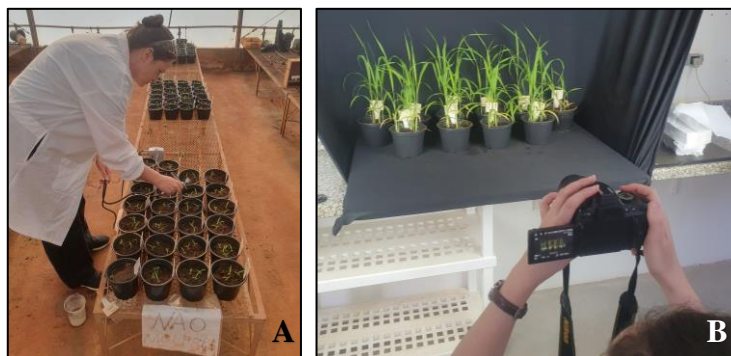


Fonte: O autor, 2023.

Para a testagem da ação do dsRNA sobre os percevejos por via oral, as formulações de nanopartículas e nanopartículas com dsRNA são depositadas em pequenos poços feitos em parafilm plástico e, em seguida, posicionados em caixas plásticas contendo percevejos que permaneceram por um dia sem ingestão de alimentos ou água. Como controle experimental são utilizados percevejos sem exposição a tratamento (mantidos com alimento) e percevejos sobre as mesmas condições tratados com água. Para as duas metodologias, os experimentos são observados diariamente, avaliando-se a diferença de letalidade entre os diferentes tratamentos.

Na avaliação dos efeitos do dsRNA sobre o capim amargoso, as formulações são pulverizadas sobre as plantas com 15 a 20 dias após emergência (Figura 10 A). Além da aplicação das formulações de dsRNA, esse experimento conta com tratamentos com aplicação isolada e conjunta de glifosato. Os parâmetros avaliados nessa metodologia são o número de perfilhos e o peso da matéria seca, além da comparação fenotípica entre tratamentos, registrada por meio de fotografias. Todas as avaliações ocorrem no período de 15 a 20 dias após as aplicações (Figura 10 B).

Figura 10. A: Aplicação das formulações de dsRNA sobre capim amargoso; B: Avaliações do efeito do dsRNA sobre o capim amargoso.



Fonte: O autor, 2023.

2.3.3 Outras linhas de pesquisa

Além das duas principais linhas de pesquisa já citadas, foi possível acompanhar e auxiliar na etapa de biobalística em um experimento de silenciamento gênico transiente, o qual tinha o objetivo de identificar genes que garantem resistência da soja ao mosaico dourado do feijoeiro (*Bean Golden Mosaic Virus*). Para isto, uma solução contendo um gene que é capaz de quebrar uma determinada sequência de bases nitrogenadas é bombardeada com partículas de ouro em folhas de plantas de soja com 15 dias de idade (Figura 11 A). Em seguida, as folhas são borrifadas com água destilada para evitar a desidratação e a consequente não introdução do gene bombardeado. Após dois dias em câmara de crescimento a 22°C e cobertas por plástico,

as plantas são transferidas para uma câmara climática para crescimento de plantas (Fitotron[®]) e, passadas três semanas do bombardeamento, os sintomas começam a se manifestar (Figura 11 B). Dessa forma, quando há a presença de dos sintomas da doença, é possível afirmar que a sequência silenciada era a responsável pela resistência da planta à doença.

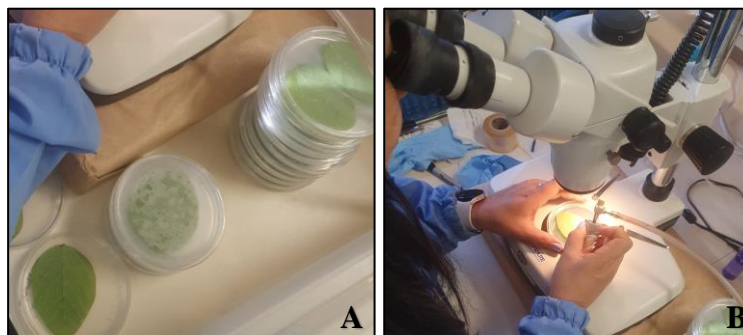
Figura 11. A: processo de biobalística; B: Manifestação dos sintomas da virose.



Fonte: O autor, 2023.

Também houve a possibilidade de participar de uma demonstração prática de isolamento de ferrugem-asiática (*Phakopsora pachyrhizi*). A ferrugem é uma das doenças mais importantes para a cultura da soja, porém, por ser um fungo biotrófico, o seu estudo se torna mais complexo. Para enfrentar esse problema, foi desenvolvida uma técnica de isolamento que busca manter as folhas da planta vivas por um maior período de tempo. Para isso, as folhas são higienizadas com hipoclorito e água e, em seguida, são depositadas em placas de Petri contendo meio nutritivo, que as conserva por um maior tempo (Figura 12 A). Então os esporos são inoculados diretamente nas folhas, e as placas são mantidas em câmara com temperatura e umidade controladas. Após o período de cultivo do fungo, os esporos são recolhidos com um coletor improvisado, que é constituído de uma bomba de vácuo ligada a uma mangueira com um filtro e um eppendorf em sua ponta (Figura 12 B).

Figura 12. A: meio para cultivo de *P. pachyrhizi*; B: Coleta de esporos do fungo.



Fonte: O autor, 2023.

2.3.4 Atividades de rotina

Além das atividades já citadas, também foram realizados procedimentos de rotina, que apesar de simples, são de extrema importância para a manutenção do ambiente laboratorial. Entre esses, estão as práticas realizadas antes e após cada um dos experimentos, como: a higienização e organização dos equipamentos e bancadas; a reposição dos materiais utilizados; o descarte correto de resíduos orgânicos e inorgânicos, contaminados ou não, de maneira correta; manutenção das plantas nas casa de vegetação pertencentes ao setor de biotecnologia vegetal e a manutenção do criadouro de percevejos, que é feita duas vezes por semana.

A manutenção do criadouro de percevejos consiste, primeiramente, na transferência dos insetos no 5º instar e adultos das caixas em que já estavam para caixas limpas e com alimento novo (vagens de feijão, plantas de milho, e sementes de amendoim e de soja). Os ovos (Figuras 13 A e B) são coletados e colocados para eclodir em gerboxes contendo vagens de feijão (Figura 13 C). Além disso, é realizada a troca do alimento distribuído nas gerboxes nas semanas anteriores e, quando são detectados insetos que atingiram a fase adulta, esses são realocados para caixas plásticas contendo alimento, um eppendorf com vitaminas do complexo B e duas faixas de TNT (tecido não tecido), que auxiliam na oviposição (Figura 13 D). Os percevejos marrons são alimentados com vagens e grãos de soja e amendoim, enquanto que nas caixas contendo percevejos barriga verde também são adicionados copos plásticos com plantas de milho (um copo com cerca de quatro plantas em cada). Após a manutenção, os recipientes contendo os insetos e/ou seus ovos são retornados à câmara de incubação, onde a temperatura, a umidade e o fotoperíodo são monitorados. Por fim, o material utilizado é higienizado.

Figura 13. Ovos de percevejos barriga verde (A) e marrom (B). C: gerboxes com ninfas de percevejo; D: Caixas com percevejos na fase adulta.



Fonte: O autor, 2023.

Na manutenção das plantas da casa de vegetação, essas são raleadas em duas etapas. Na

primeira, após a emergência das plântulas, são deixadas cerca de 10 por vaso. Na segunda, cerca de 15 a 20 dias após emergência, são deixadas apenas três plantas, bem espaçadas entre si, em cada vaso. Além do raleio, as plantas também são irrigadas periodicamente para que a desidratação não interfira nos resultados dos bioensaios.

2.3.5 Importância do conhecimento teórico na realização das atividades

O conhecimento teórico adquirido durante o período de graduação teve grande importância para a adequada realização das práticas laboratoriais executadas no estágio. Para compreender as metodologias nos laboratórios de biologia molecular e de transformação e edição gênica, foi necessário resgatar o aprendizado obtido nas disciplinas de biologia celular, bioquímica, microbiologia, fisiologia vegetal e biotecnologia vegetal.

A bioquímica, que engloba a biologia molecular, é imprescindível para a compreensão de fenômenos biológicos, sendo a principal base para um profissional em biotecnologia.

A disciplina teórica de microbiologia, possibilitou o entendimento do funcionamento dos vetores plasmidiais, enquanto que o conhecimento prático nessa área, adquirido durante a iniciação científica e realização do trabalho de conclusão de curso, foi importante para entender a dinâmica laboratorial, desde a necessidade e procedimentos de esterilização do material, os protocolos de biossegurança, até o preparo de meios de cultura, inoculação e cultivo de bactérias para a replicação dos vetores.

Noções de biotecnologia vegetal foram utilizadas durante os procedimentos transformação genética bactérias, PCR e eletroforese e, juntamente com o que foi aprendido em fisiologia vegetal, também foram importantes durante a realização da transformação genética de plantas.

O conhecimento em entomologia agrícola também facilitou no manejo dos percevejos. Conhecer o hábito de alimentação e o ciclo de desenvolvimento de hemípteros, que são hemimetábolos, auxiliou na manutenção das populações e também na seleção de insetos nos instares ideais para a utilização nos bioensaios.

2.3.6 Participação em eventos

Assim que iniciado o período de estágio, o estagiário recebe acesso ao curso “Rotinas e Práticas de Acadêmicos na Embrapa Soja”, que conta a apresentação das leis que alunos e profissionais devem seguir ao entrarem na Embrapa Soja, contando também com aulas teóricas

e práticas (em forma de vídeos) sobre a rotina laboratorial, a utilização correta de equipamentos e os procedimentos que garantem a biossegurança nesses ambientes.

Mais um ponto importante durante o estágio foi a participação em eventos. No dia 05 de agosto, foi realizado o Dia de Campo de Inverno da Embrapa Soja, teve início com uma palestra de apresentação das duas novas cultivares de trigo (BRS Coleiro) e triticale (BRS Tambaqui) desenvolvidas pela Embrapa. Em seguida, o público foi guiado à vitrine tecnológica da Embrapa Soja, que contou com estações onde foram ministradas palestras sobre a cultura do trigo, sendo estas: apresentação de cultivares de trigo e triticale da Embrapa e do IDR, manejo de planta daninhas, manejo outonal, melhoria de sistemas de produção, mercado e qualidade industrial.

Outro evento realizado durante o período de estágio foi a “38ª Reunião de Pesquisa de Soja (RPS 2023)”, que ocorreu nos dias 23 e 24 de agosto, ao qual foi possível a participação na apresentação do painel “Genética avançada”. O painel contou com três palestras: “TIMPs: Atualizações na legislação no Brasil e no mundo”, ministrada por Paulo Barroso (ex-presidente da CTNBio); “Aplicações da edição gênica no melhoramento genético da cultura da soja”, com o palestrante Alexandre Nepomuceno (pesquisador e chefe-geral na Embrapa Soja); e “Predição e seleção genômica ampla aplicado ao melhoramento da soja”, Willian Giordani (melhorista de soja da Corteva Agriscience).

Outra atividade importante foi a participação em apresentações do laboratório de biotecnologia da Embrapa Soja para visitantes em excursões de turmas de ensino médio.

3 CONCLUSÃO

A realização desse estágio possibilitou estender o aprendizado na área de biotecnologia vegetal de forma prática, o que não seria viável no Campus Ivaiporã até o presente momento, devido à falta de infraestrutura e equipamentos. Foi possível presenciar as dificuldades de um profissional que atua na área de pesquisa e desenvolvimento, bem como variadas formas de driblá-las. A diversidade de profissionais de áreas distintas possibilitou, além de uma expansão de conhecimentos diversos, uma maior compreensão de fenômenos por diferentes pontos de vista, com base em cada uma dessas formações e vivências dos profissionais acompanhados. Além disso, o estágio contribuiu para que o aluno tivesse certeza de pela qual pós-graduação e área de atuação profissional irá optar.

4 REFERÊNCIAS

ANDRADE, S. R. M. **Trasformação de plantas**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2003. 28 p. (Documentos / Embrapa Cerrados, ISSN 1517-5111; 102).

CAO, Y.; TAN, Y. F.; WONG, Y. S.; LIEW, M. W. J.; VENKATRAMAN, S. Recent Advances in Chitosan-Based Carriers for Gene Delivery. **Marine Drugs**, Singapura 639798, v. 17, n. 6, p. 381, 2019.

COOPER, A. M.; SILVER, K.; ZHANG, J.; PARK, Y.; ZHU, K. Y. Molecular mechanisms influencing efficiency of RNA interference in insects. **Pest Management Science**, Manhattan, v. 75, n. 1, p. 18-28, 2019.

Embrapa. **Embrapa Soja**. 2023. Disponível em: <https://www.embrapa.br/soja>. Acesso em: 06 set. 2023.

KAPHLE, A.; NAVYA, P. N.; UMAPATHI, A.; DAIMA, H. K. Nanomaterials for agriculture, food and environment: applications, toxicity and regulation. **Environmental Chemistry Letters**, Tumakuru, v. 16, n. 1, p. 43-58, 2017.

KATAS, H.; ALPAR, H. O. Development and characterisation of chitosan nanoparticles for siRNA delivery. **Journal Of Controlled Release**, Londres, v. 115, n. 2, p. 216-225, 2006.

KANAMORI, N.; MERTZ-HENNING, L. M.; MARIN, S. R. R.; SILVEIRA, C. A.; MARINHO, J. P.; NEPOMUCENO, A. L. **Metodologia para transformação de soja via *Agrobacterium tumefaciens***. Londrina, PR: Embrapa Soja, 2017. 6 p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 128).

LAISNEY, J.; ROSE, V. L.; WATTERS, K.; DONOHUE, K. V.; UNRINE, J. M. Delivery of short hairpin RNA in the neotropical brown stink bug, *Euschistus heros*, using a composite nanomaterial. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Lexington, v. 177, p. 104906, 2021.

LI, X.; LIU, X.; LU, W.; YIN, X.; AN, S. Application progress of plant-mediated RNAi in pest

control. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, Zhengzhou, v. 10, n., p. 1-12, 2022.

LOPES-FILHO, J. H.; SILVA, V. C. H.; SANTOS, J. C.; DANTE, R. A.; GERHARDT, I. R.; YASSITEPE, J. E. C. T.; FERNANDES, F. R. Introdução à edição genômica em plantas. *In*: Molinari H. B. C.; VIEIRA, L. R.; SILVA, N. V.; PRADO, G. S.; LOPES-FILHO, J. H. (1ª ed.). **Tecnologia CRISPRna edição genômica de plantas**. Brasília: Embrapa, 2020. Cap. 1. p. 11-47.

MITTER, N.; WORRALL, E. A.; ROBINSON, K. E.; LI, P.; JAIN, R. G.; TAOCHY, C.; FLETCHER, S. J.; CARROLL, B. J.; LU, G. Q.; XU, Z. P. Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses. **Nature Plants**, Brisbane, v. 3, n. 2, p. 1-12, 2017.

NAITO, Y.; HINO, K.; BONO, H.; UI-TEI, K. CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites. **Bioinformatics**, Oxforde, v. 31, p. 1120-1123, 2015.

NIU, D.; HAMBY, R.; SANCHEZ, J. N.; CAI, Q.; YAN, Q.; JIN, H. RNAs — a new frontier in crop protection. **Current Opinion in Biotechnology**, Nanjing, v. 70, p. 204-212, 2021.

PARDO, D. Z.; GAINES, T.; LAMEGO, F. P.; AVILA, L. A. RNAi as a tool for weed management: challenges and opportunities. **Advances In Weed Science**, Pelotas, v. 40, n. 1, p. 1-5, 2022.

POLIZELI, S. R. A.; FIGLIANO, G. C.; HOSHINO, R. T.; MARIN, S. R. R.; NEPOMUCENO, A. L.; MERTZ-HENNING, L. M. **Expressão transiente em embriões de soja para validação in vivo de gRNAs visando a edição genica via CRISPR/Cas**. *In*: 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).

RÊGO, C. M.; INOUE-NAGATA, A. K.; NAKASU, E. Y. T. **RNAi: uma estratégia a ser**

explorada para a indução de resistência a viroses em tomateiro. Embrapa, 2016. Disponível em: [https://www.embrapa.br/en/busca-de-noticias/-/noticia/18758440/rnai-uma-estrategia-a-ser-explorada-para-a-inducao-de-resistencia-a-viroses-em-tomateiro#:~:text=mecanismo%20de%20RNAi-,RNA%20interferente%20ou%20interfer%C3%Aancia%20mediada%20por%20RNA%20\(RNAi\)%20%C3%A9%20um,pat%C3%B3genos%20C%20tais%20como%20os%20v%C3%ADrus](https://www.embrapa.br/en/busca-de-noticias/-/noticia/18758440/rnai-uma-estrategia-a-ser-explorada-para-a-inducao-de-resistencia-a-viroses-em-tomateiro#:~:text=mecanismo%20de%20RNAi-,RNA%20interferente%20ou%20interfer%C3%Aancia%20mediada%20por%20RNA%20(RNAi)%20%C3%A9%20um,pat%C3%B3genos%20C%20tais%20como%20os%20v%C3%ADrus). Acesso em: 18 out. 2023.

ROZA-GOMES, M. F.; SALVADORI, J. R.; PEREIRA, P. R. V. S.; PANIZZZI, A. R. Injúrias de quatro espécies de percevejos pentatomídeos em plântulas de milho. **Ciência Rural**, São Miguel do Oeste, v. 41, n. 7, p. 1115-1119, 2011.

SONG, X. S.; GU, K. X.; DUAN, X. X.; XIAO, X. M.; HOU, Y. P.; DUAN, Y. B.; WANG, J. X.; YU, N.; ZHOU, M. G. Secondary amplification of siRNA machinery limits the application of spray-induced gene silencing. **Molecular Plant Pathology**, Nanjing, v. 19, n. 12, p. 2543-2560, 2018.

USLU, V. V.; BASSLER, A.; KRCZAL, G.; WASSENEGGER, M. High-Pressure-Sprayed Double Stranded RNA Does Not Induce RNA Interference of a Reporter Gene. **Frontiers In Plant Science**, Neustadt An Der Weinstrasse, v. 11, p. 1-9, 2020.

Vasconcelos, M. J. V.; Figueiredo, J. V. S. **Tecnologia CRISPR-Cas para edição genômica.** Sete Lagoas, MG. Embrapa Milho e Sorgo, 2015. 37 p. (Documentos / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1518-4277; 197).

WYTINCK, N.; MANCHUR, C. L.; LI, V. H.; WHYARD, S.; BELMONTE, M. F. DsRNA Uptake in Plant Pests and Pathogens: insights into RNAi-based insect and fungal control technology. **Plants**, Basiléia, v. 9, n. 12, p. 1780, 2020.

YANG, G.; YOU, M.; VASSEUR, L.; ZHAO, Y.; LIU, C. Development of RNAi in Insects and RNAi-Based Pest Control. In: STOYTCHIEVA, M. (ed.). **Pesticides in the Modern World - Pests Control and Pesticides Exposure and Toxicity Assessment.** Sofia: Intech, 2011. Cap. 2. p. 27-38.

ZIELIŃSKA, A.; CARREIRÓ, F.; OLIVEIRA, A. M.; NEVES, A.; PIRES, B.; VENKATESH, D. N.; DURAZZO, A.; LUCARINI, M.; EDER, P.; SILVA, A. M.; ANTONELLO SANTINI, A.; SOUTO, E. B. Polymeric Nanoparticles: production, characterization, toxicology and ecotoxicology. **Molecules**, Coimbra, v. 25, n. 16, p. 3731, 2020.