

Seminário Parcial de Acompanhamento e Avaliação

Estratégias Biotecnológicas para Obtenção de Soja Resistente à
Ferrugem Asiática

Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

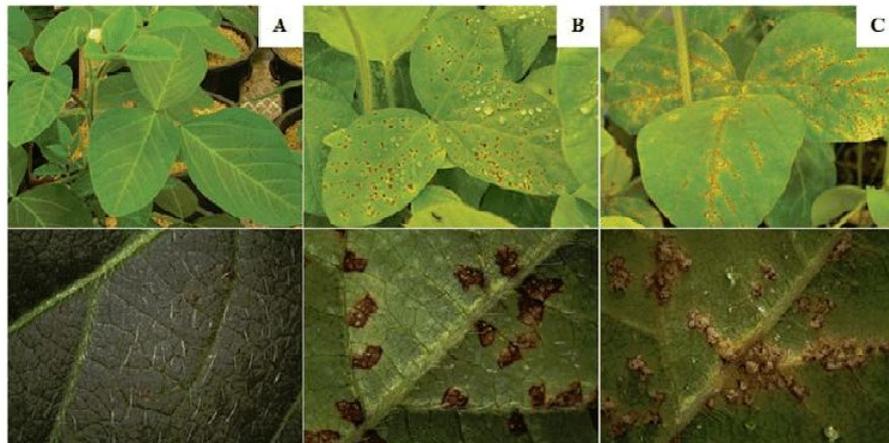
Embrapa Cerrados

Universidade de Brasília

Instituto Mato-grossense do Algodão

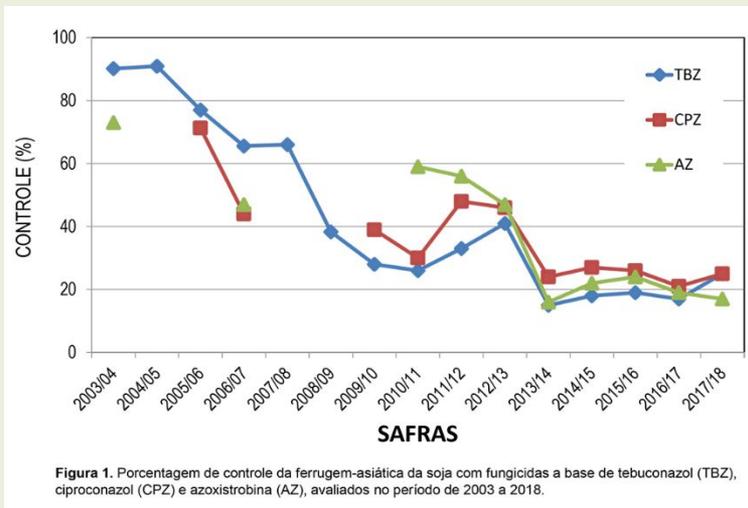
Breve contextualização do projeto e relevância do tema

Ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) 2001-



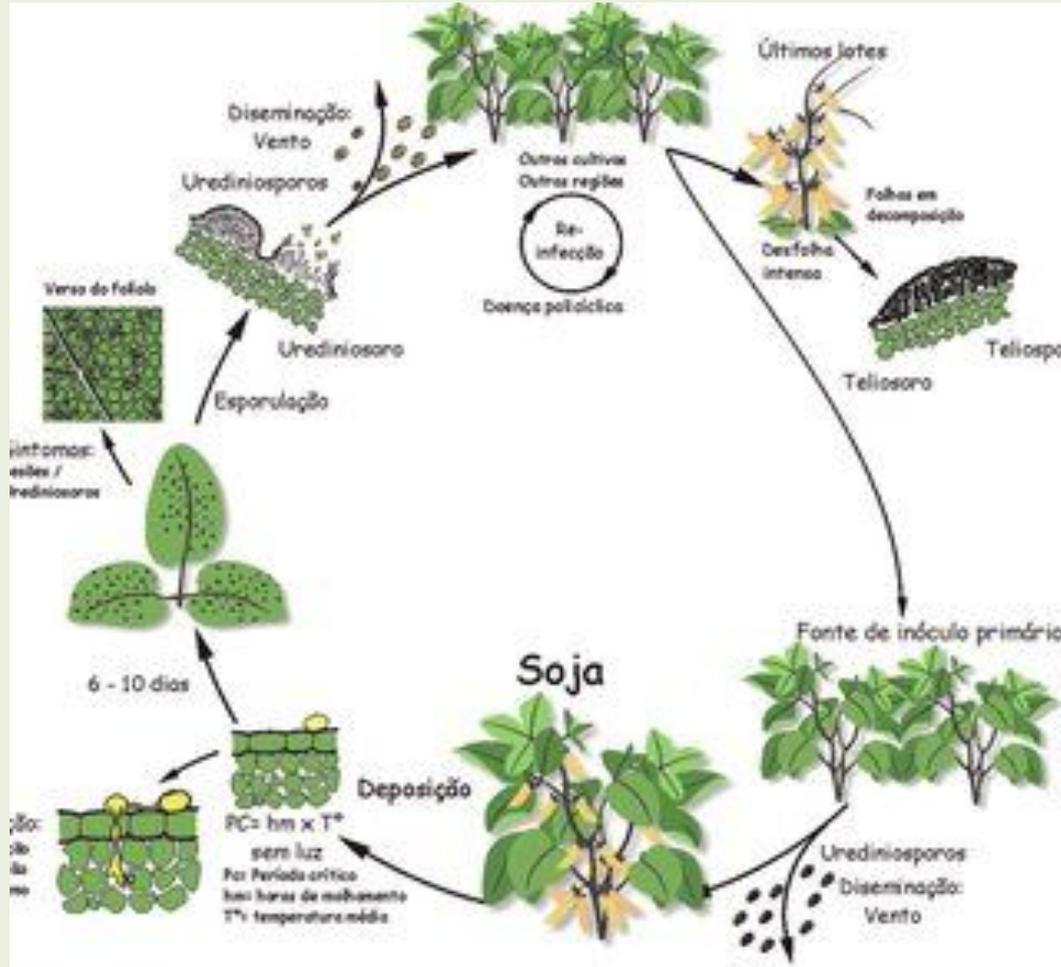
- Praticar o vazio sanitário
 - 14 estados (DF 1 de julho a 30 de setembro).
- Semear em épocas adequadas
- Utilizar cultivares menos suscetíveis
- Adequar corretamente arranjo e nutrição de plantas
- Fazer bom uso dos fungicidas
- Fazer uso de fungicidas de reforço

US\$ ~2,5 bilhões por safra (Embrapa, Aprosoja)
 Custo ambiental
 Surgimento de raças resistentes.

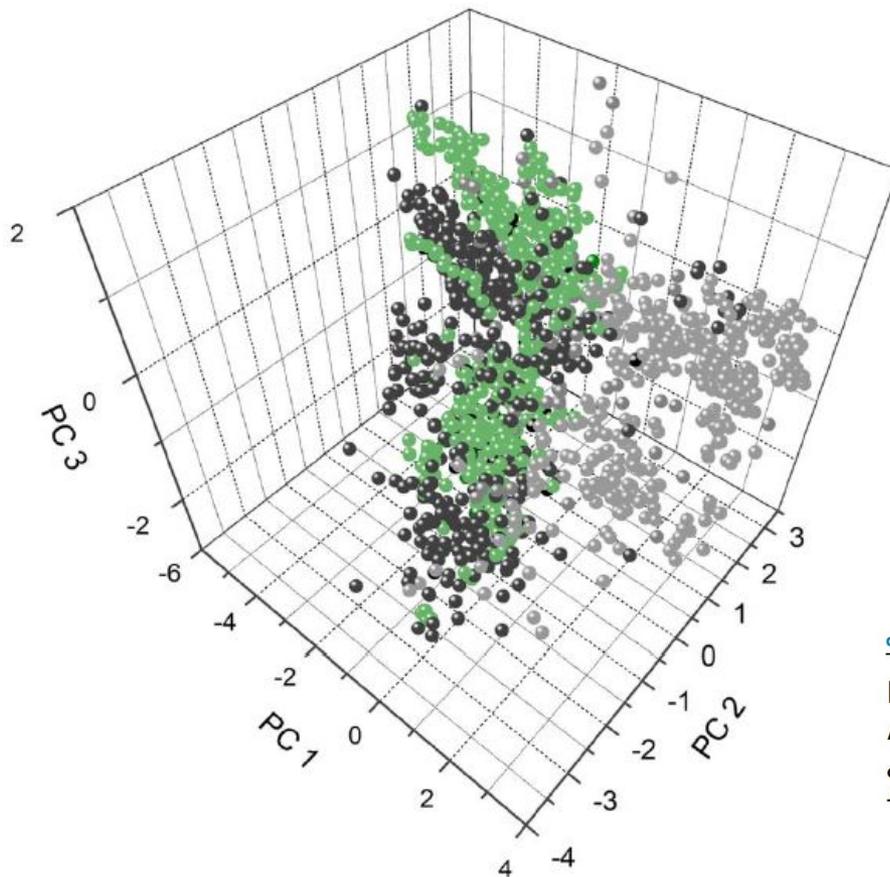


ESTADO	PERÍODOS DE VAZIO SANITÁRIO																	
	JUNHO			JULHO			AGOSTO			SETEMBRO			OUTUBRO			NOVEMBRO		
	1	15	30	1	15	31	1	15	31	1	15	30	1	15	31	1	15	30
TO																		
PA (1)*																		
PA (2)*																		01/09 a 30/10
PA (3)*																		
RO																		
MA (1)*																		
MA (2)*																		
BA																		01/07 a 07/10
PI																		15/08 a 15/10
GO																		
MT																		
MS																		
DF																		
SP																		
MG																		
PR																		10/06 a 10/09
SC																		15/06 a 15/09
PARAGUAI																		01/06 a 30/08

Breve contextualização do projeto e relevância do tema



Breve contextualização do projeto e relevância do tema



Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Universidade Católica de Brasília
Universidade de Brasília

OPEN ACCESS Freely available online

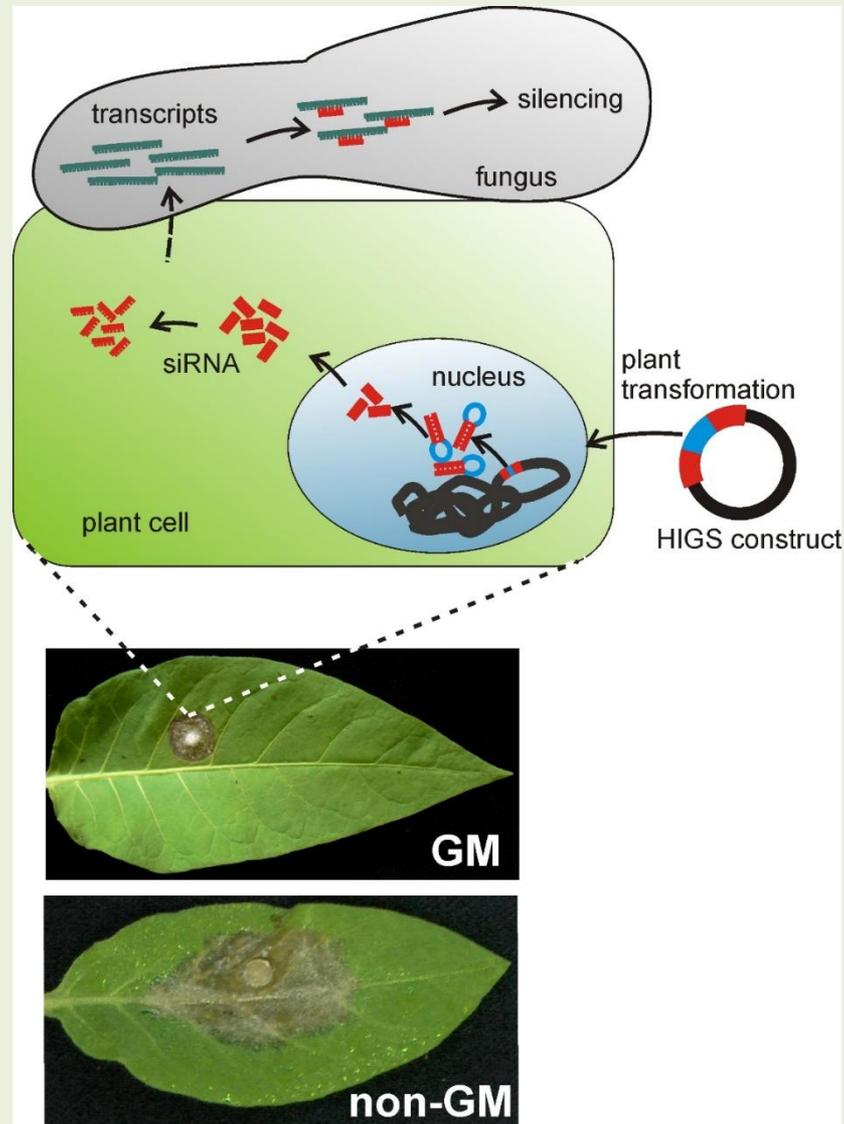
PLOS ONE

Probing Protein Sequences as Sources for Encrypted Antimicrobial Peptides

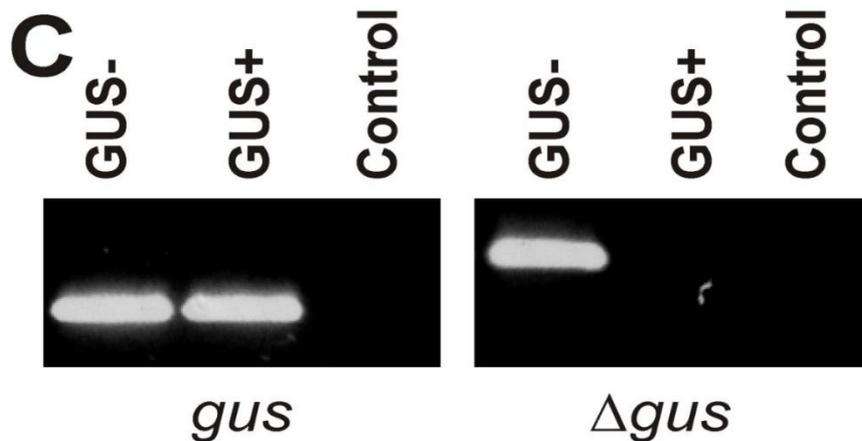
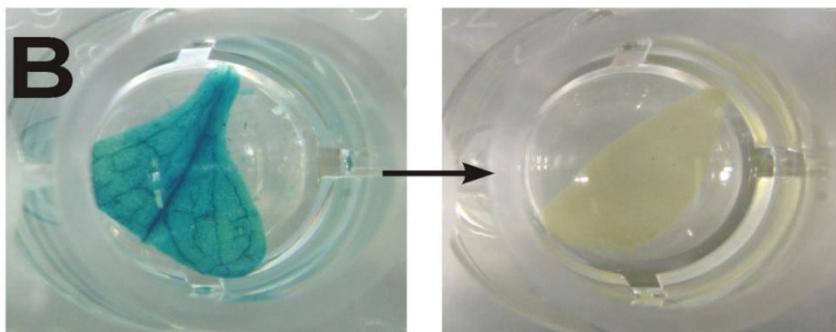
Guilherme D. Brand^{1,5}, Mariana T. Q. Magalhães¹, Maria L. P. Tinoco², Francisco J. L. Aragão², Jacques Nicolí³, Sharon M. Kelly⁴, Alan Cooper⁵, Carlos Bloch Jr.^{1*}

Figure 1. Peptides filtered by Kamal are physicochemically more similar to a sample of antimicrobial peptides than randomly chosen molecules from the same EST database. A principal component analysis was applied to calculated physicochemical properties (see Table S1) of five hundred randomly chosen protein fragments and five hundred putative IAPs filtered from an EST database of *G. max* proteins [14], represented as green and grey spheres respectively, as well as naturally occurring antimicrobial molecules from the Antimicrobial Peptide Database [15], in black. Component loadings are available in Table 1.
doi:10.1371/journal.pone.0045848.g001

Breve contextualização do projeto e relevância do tema



Breve contextualização do projeto e relevância do tema



Tinoco et al. *BMC Biology* 2010, 8:27
<http://www.biomedcentral.com/1741-7007/8/27>



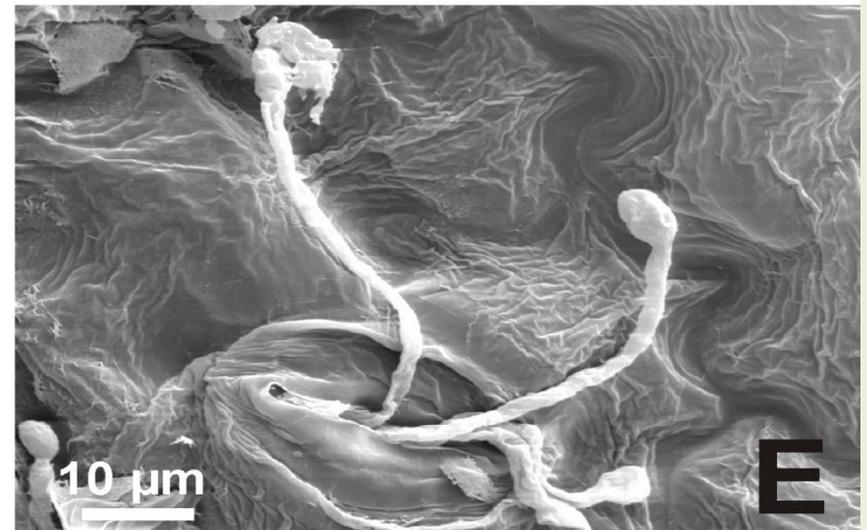
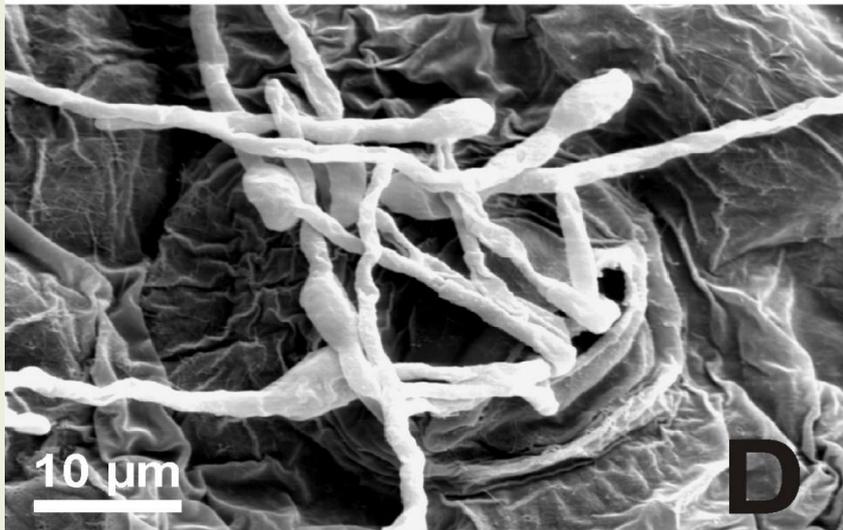
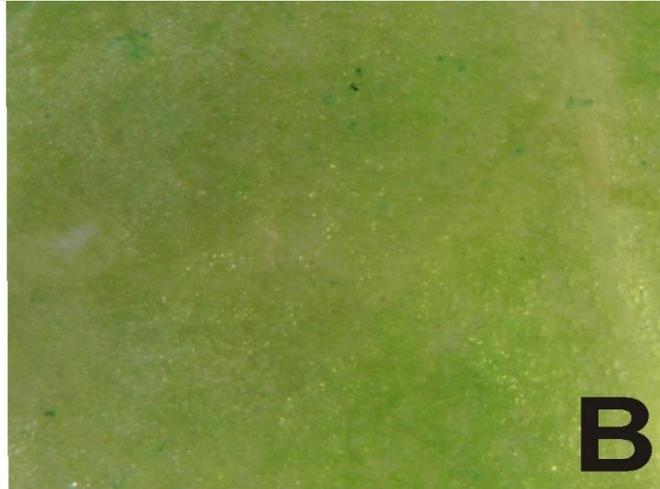
RESEARCH ARTICLE

Open Access

In vivo trans-specific gene silencing in fungal cells by *in planta* expression of a double-stranded RNA

Maria Laine P Tinoco^{1,2,3}, Bárbara BA Dias¹, Rebeca C Dall'Asta^{1,3}, João A Pamphile⁴, Francisco JL Aragão^{1,2,3*}

Breve contextualização do projeto e relevância do tema



Objetivos propostos x realizados

- O objetivo deste projeto é a transformação genética de plantas de soja com vetores baseados em diversas estratégias, para a geração de plantas resistentes à ferrugem asiática.
- Esse projeto possui três pilares: (1) geração de conhecimento, (2) geração de plantas biotecnológicas e (3) formação de pessoal.
- Neste projeto foram propostas quatro estratégias para a obtenção de linhagens geneticamente modificadas de soja com resistência à Ferrugem Asiática (*Phakopsora pachyrhizi*), sendo essas: (1) Host-induced gene silencing (HIGS), (2) Non-expressor of Pathogenesis-Related (NPRs), (3) Superexpressão de calose sintase e (4) de Peptídeos antimicrobianos.

Objetivos propostos x realizados

Para alcançar o objetivo de cumprir as quatro estratégias, foram propostas três metas:

1. Construir pelo menos dois vetores para cada estratégia
2. Obter um mínimo de 10 linhagens geneticamente modificadas de soja com os vetores gerados
3. Desafiar as linhagens obtidas para resistência ao fungo fitopatogênico causador da Ferrugem Asiática: *Phakospora pachyrhizi*

Materiais e Métodos

- Transformação das plantas por *Agrobacterium* e Biobalística com metodologia desenvolvido por nosso grupo (Aragão et al. 2000, Theor Appl Genet (2000) 101:1–6 & Rech et al. (2008) Nature Protocols v. 3.
- Caracterização parcial dos eventos de acordo com Aragão et al. 2000.
- Desafio em casa de vegetação no IMAmt.
- Desafio com folha destacada com esporos numa concentração de 10^5 / mL, e os sintomas foram observados 7 dias após a inoculação (dai).
- Impossibilidade de se realizar os ensaios em casa de vegetação no IMAmt em Primavera do Leste-MT

Resultados parciais alcançados

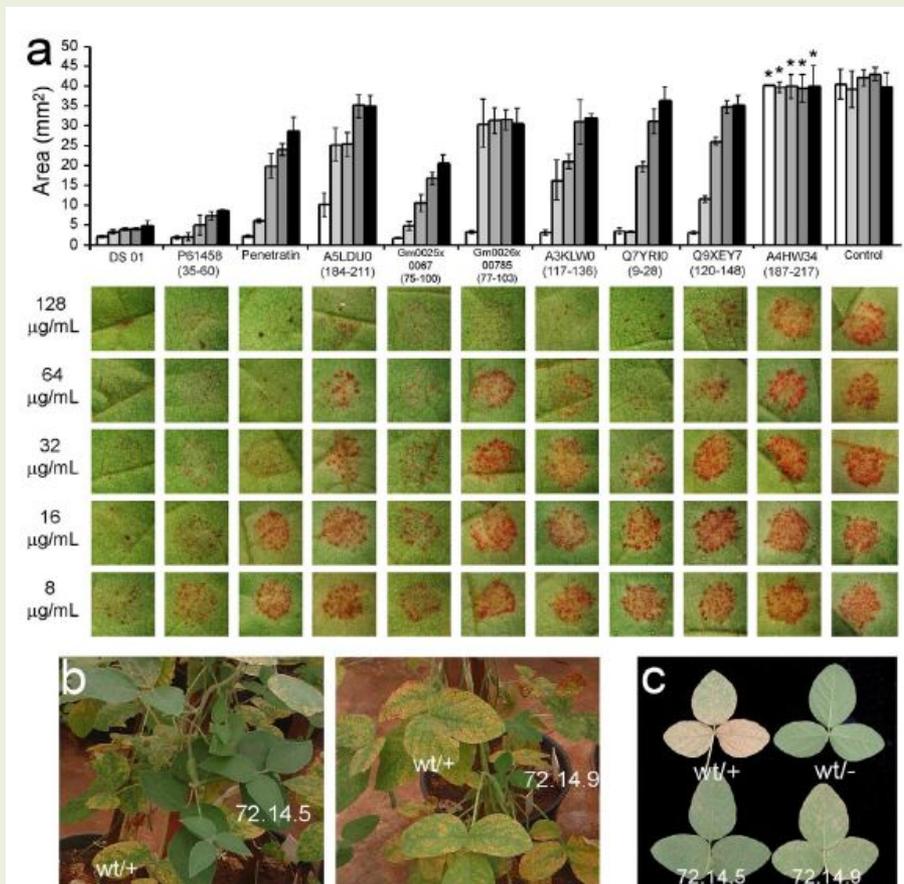
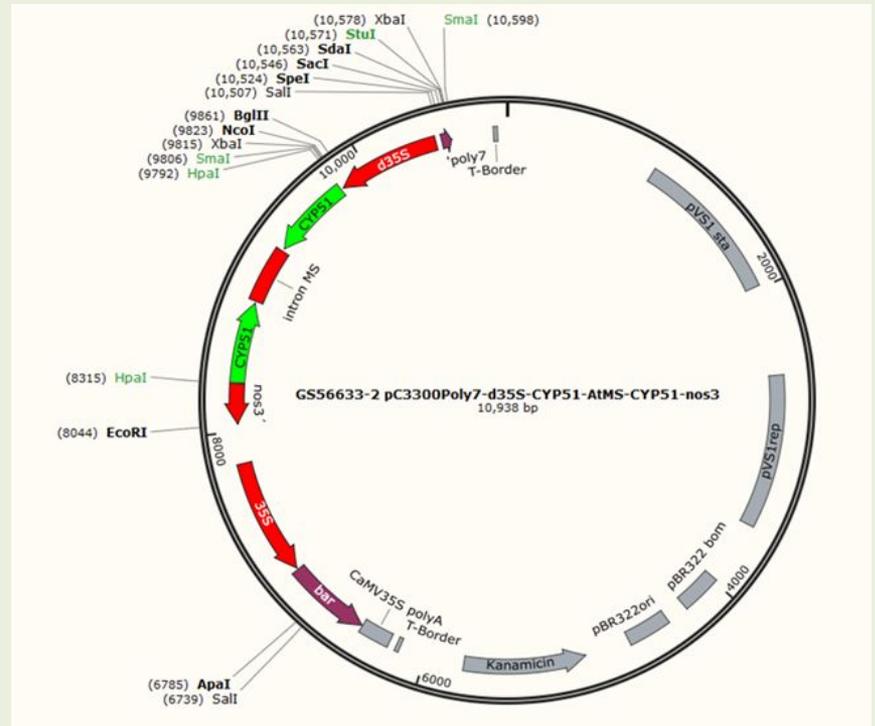
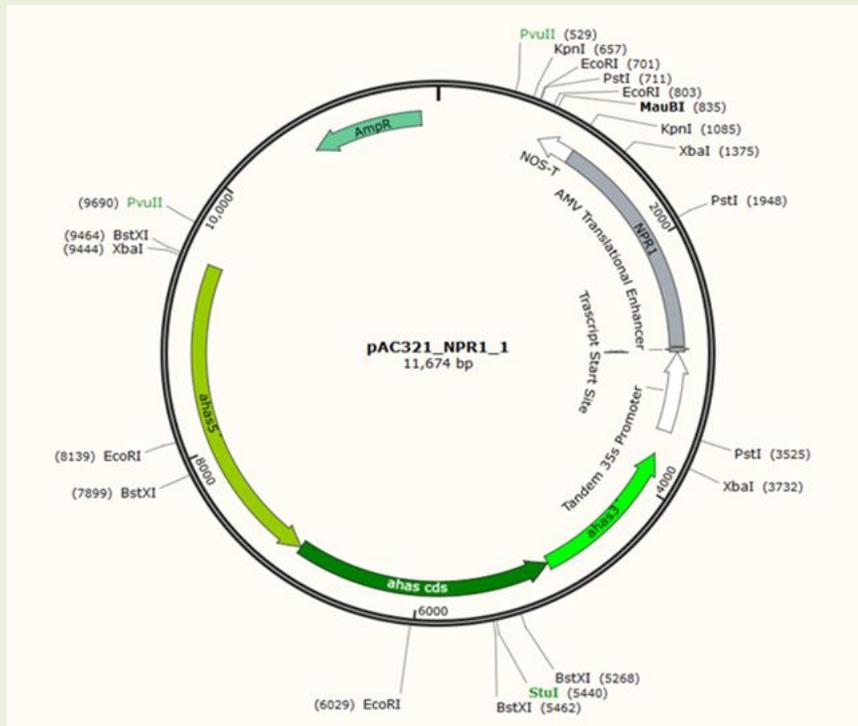


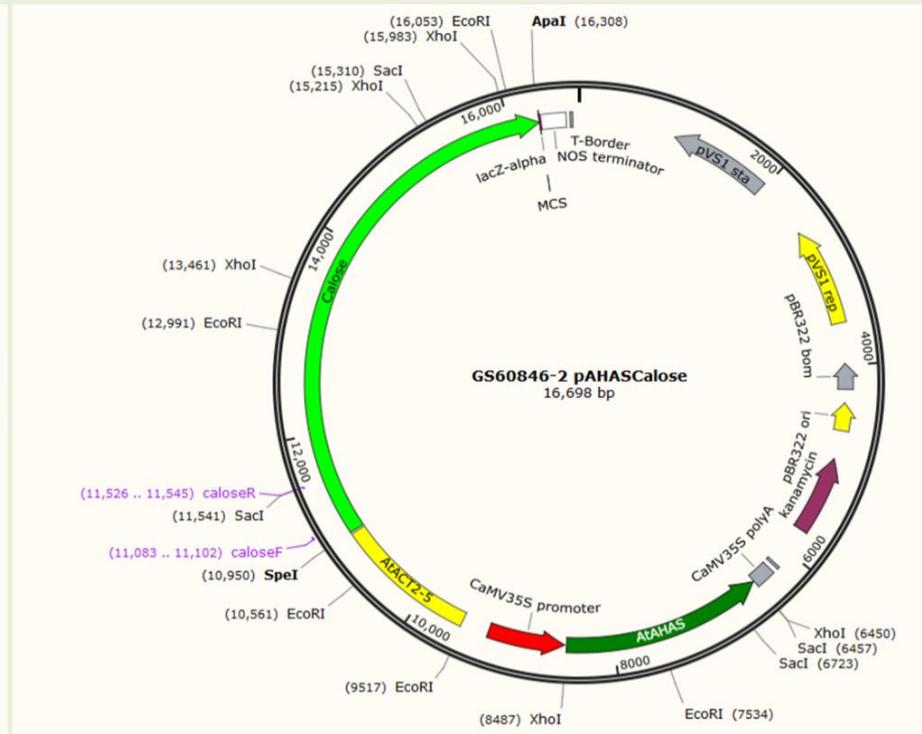
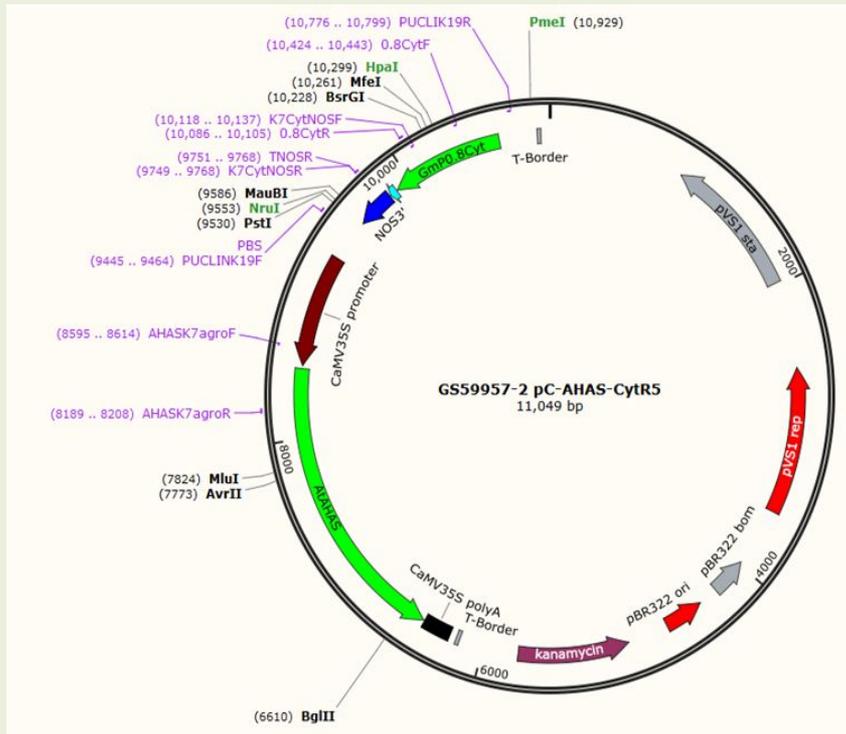
Figure 6. IAPs-induced inhibition of fixation of *Pachyrsora pachyrhizi* spores on soy bean leaves and tolerance of *G. max* transformed with gb[ABM17058.1][213–231] to the Asian rust in the greenhouse. (a) AMPs and IAPs at 8 to 128 µg/mL were co-incubated with 3.5×10^7 /mL *P. pachyrhizi* spores for seven days on the surface of *G. max* leaves, followed by the estimation of the infected area (represented as a histogram graph). Bars correspond to the sample standard deviation ($n=3$). All peptides at all tested concentrations resulted in significantly different pustule areas at a 95% confidence interval except for those marked with an asterisk (*). Wild type and *G. max* plants transformed with a vector containing gb[ABM17058.1][213–231] were grown to the V3 stage and sprayed with a suspension of *P. pachyrhizi* spores (10^6 spores/mL). (b) Transformed plants (72.14.5 and 72.14.9) were co-cultivated with control plants (wt/+) for 15 days. (c) Control linesages, designated as wt/– and wt/+, correspond to wild-type plants subjected to spraying with water alone or the Asian rust spore suspension, respectively. Intra-genic linesages 72.14.5 and 72.14.9 presented a significant reduction in the number of uredia per foliar area (see text). doi:10.1371/journal.pone.0045848.g006

Resultados parciais alcançados

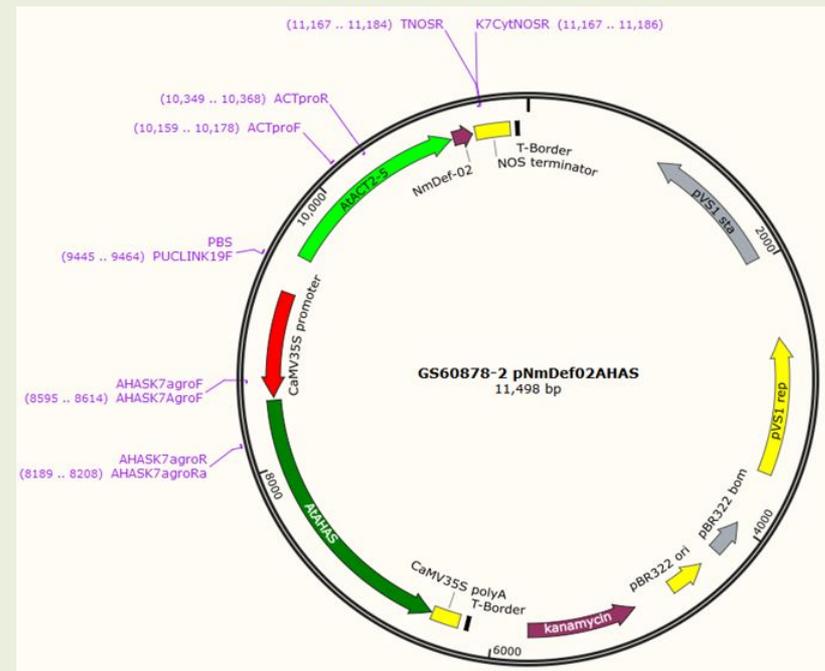
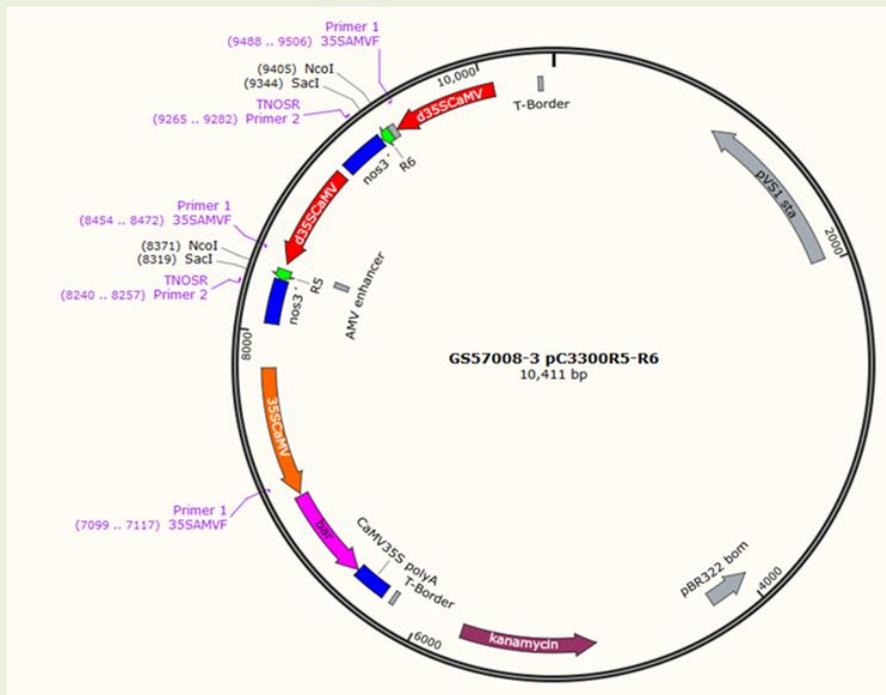
Vetores (8)



Resultados parciais alcançados

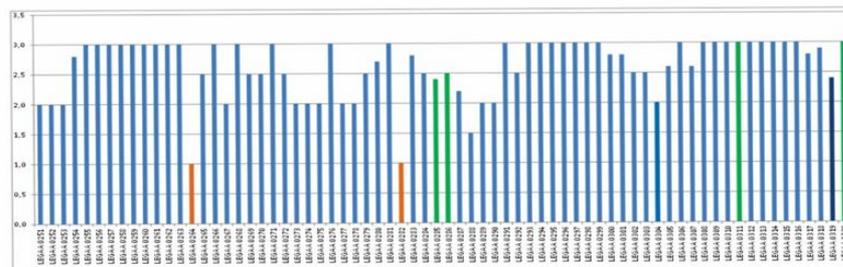
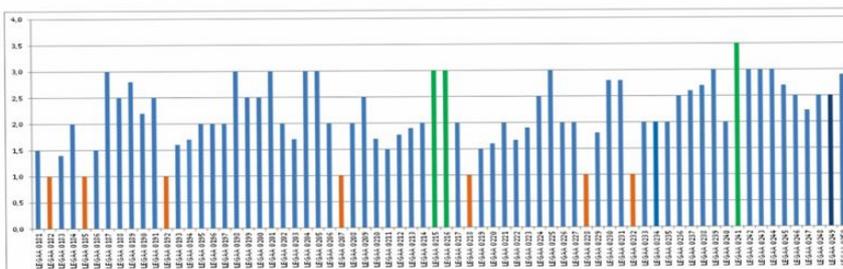
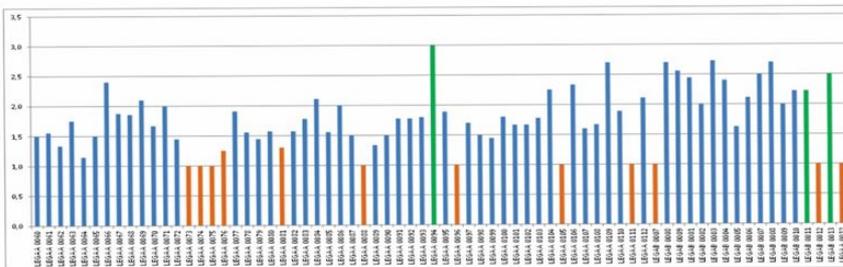
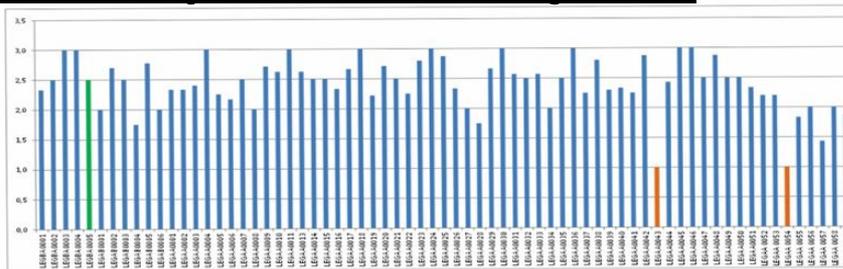


Resultados parciais alcançados



Resultados parciais alcançados

Índice de Esporulação (1-3)



Linhagens

271 linhagens GM

Resultados parciais alcançados

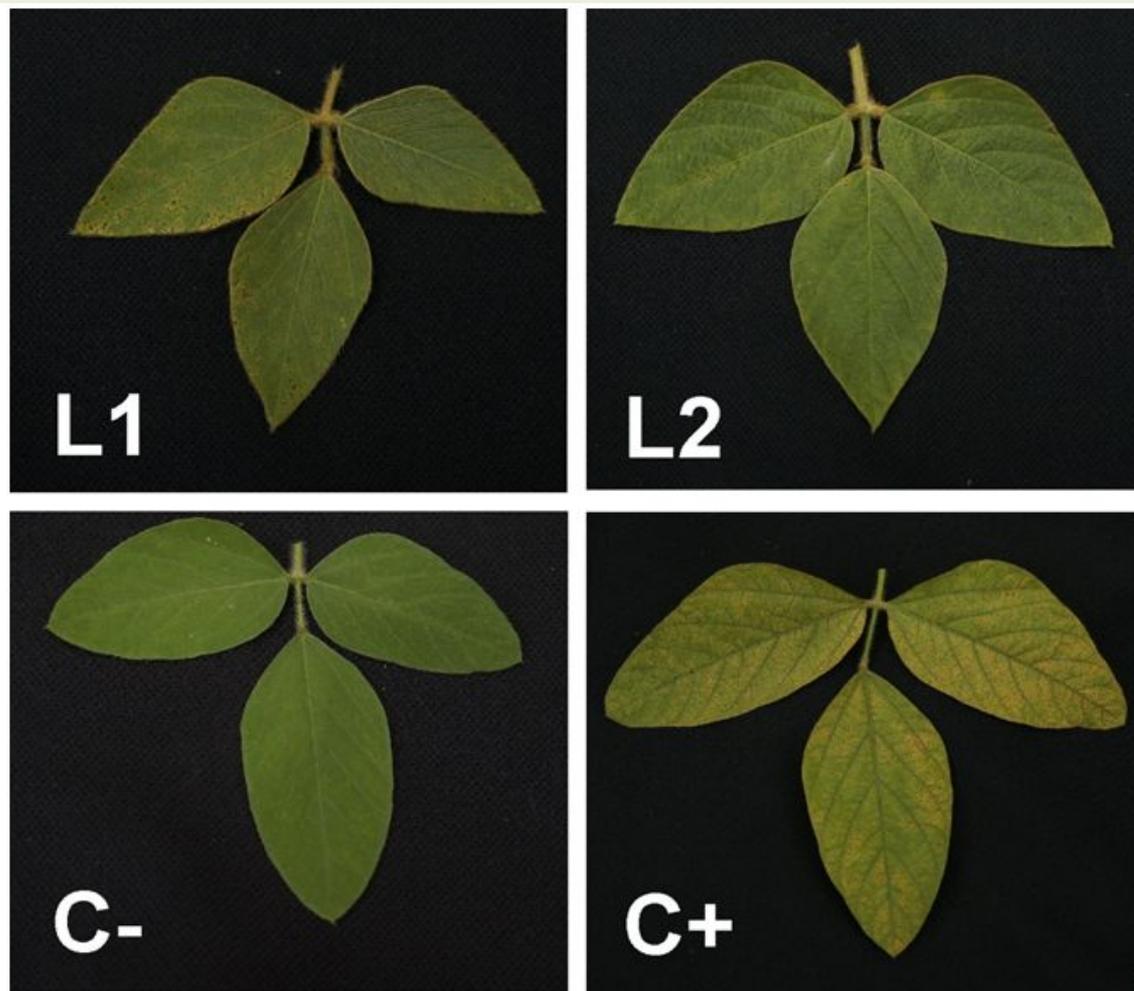
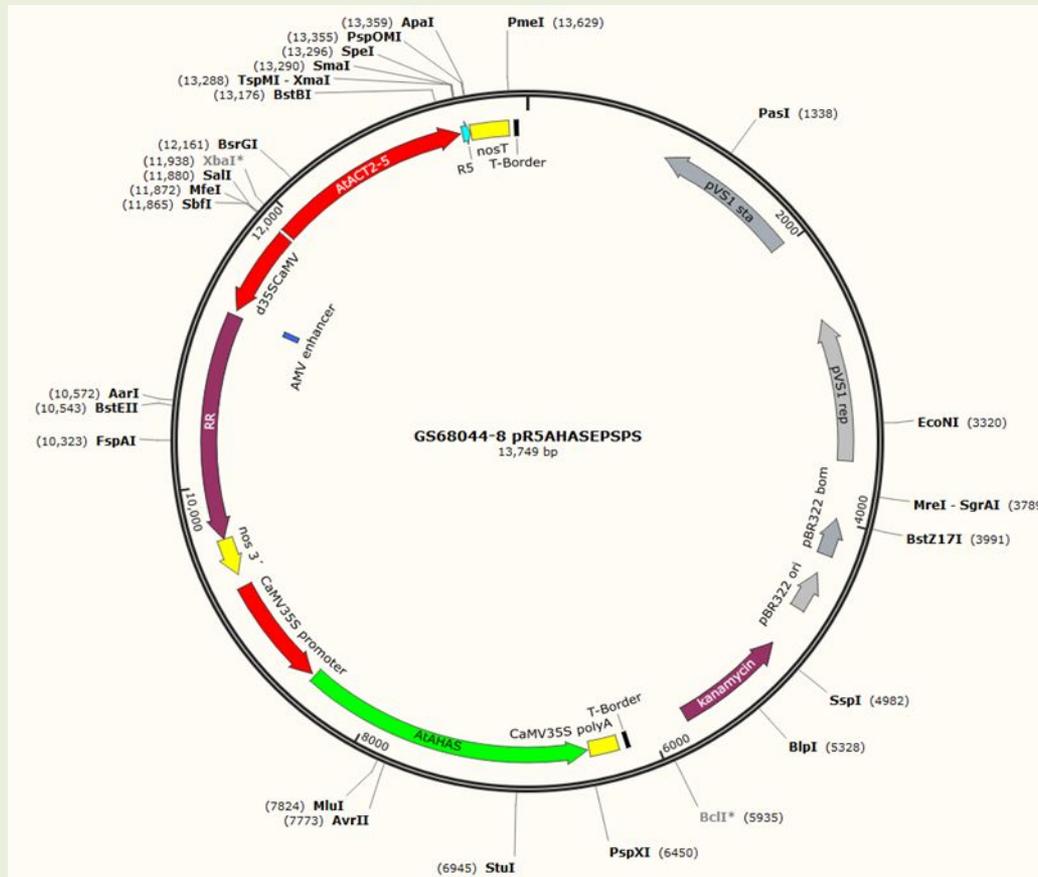


Figura 1: Dano causado pelo fungo *Phakospora pachyrhizi* em folhas de soja de diferentes LGM (L1 e L2) e dos controles (C1 e C2) não geneticamente modificados não inoculado e inoculado com esporos. ¶

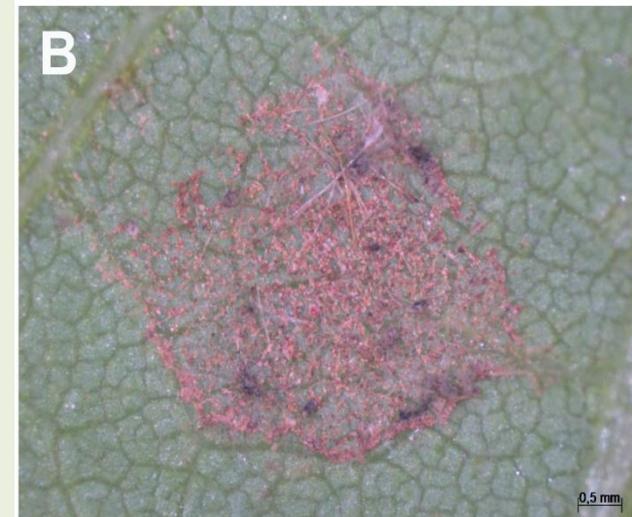
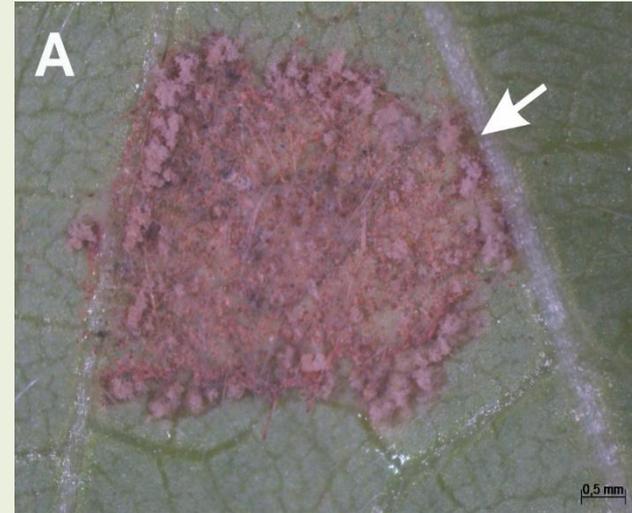
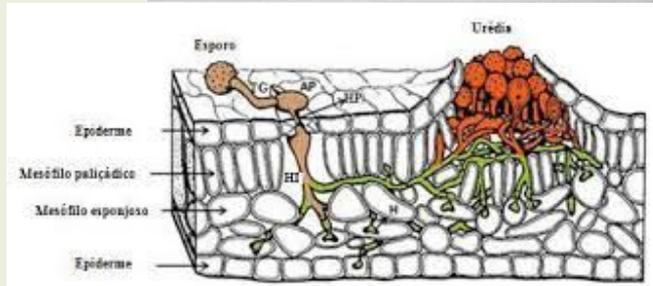
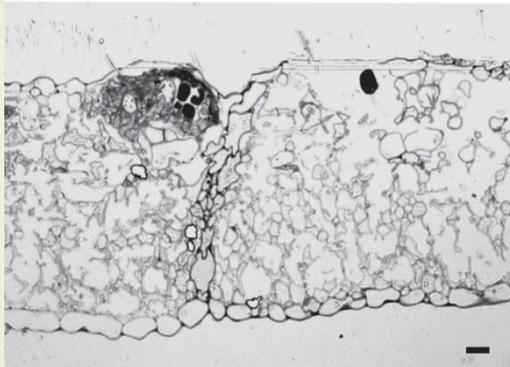
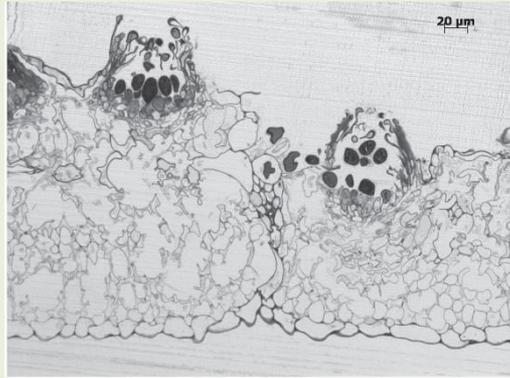
Resultados parciais alcançados

Novos vetores (6)

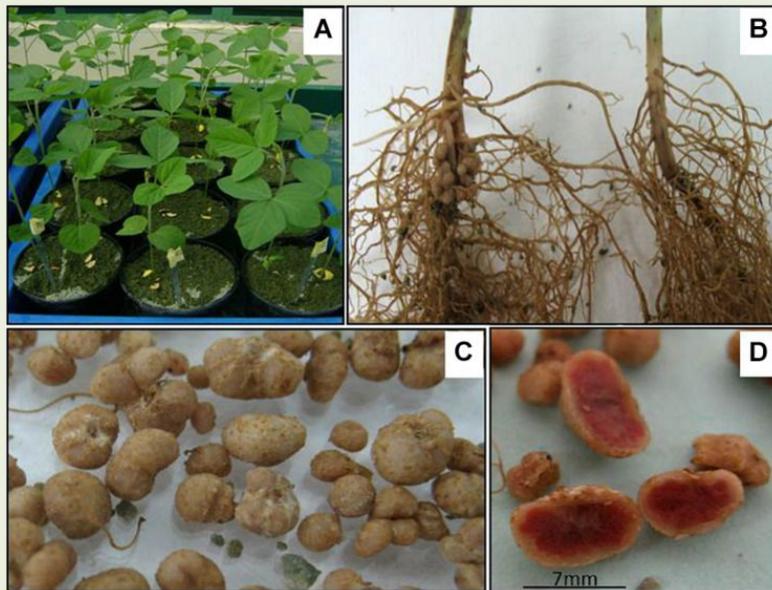
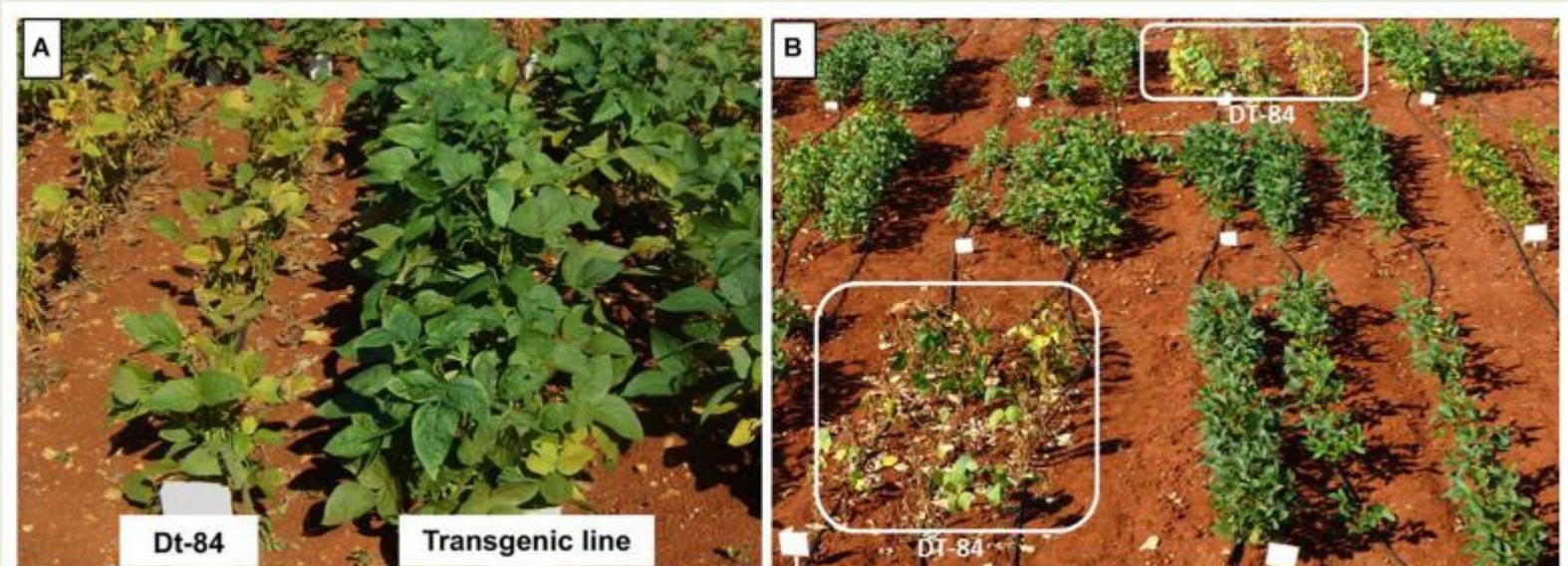


Resultados parciais alcançados

Desafio com *P. pachyrhizi*

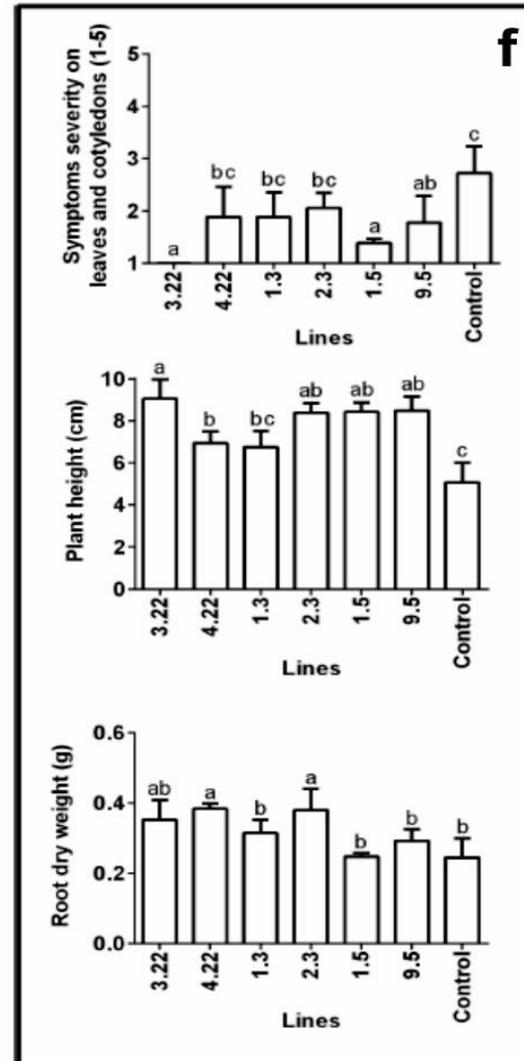
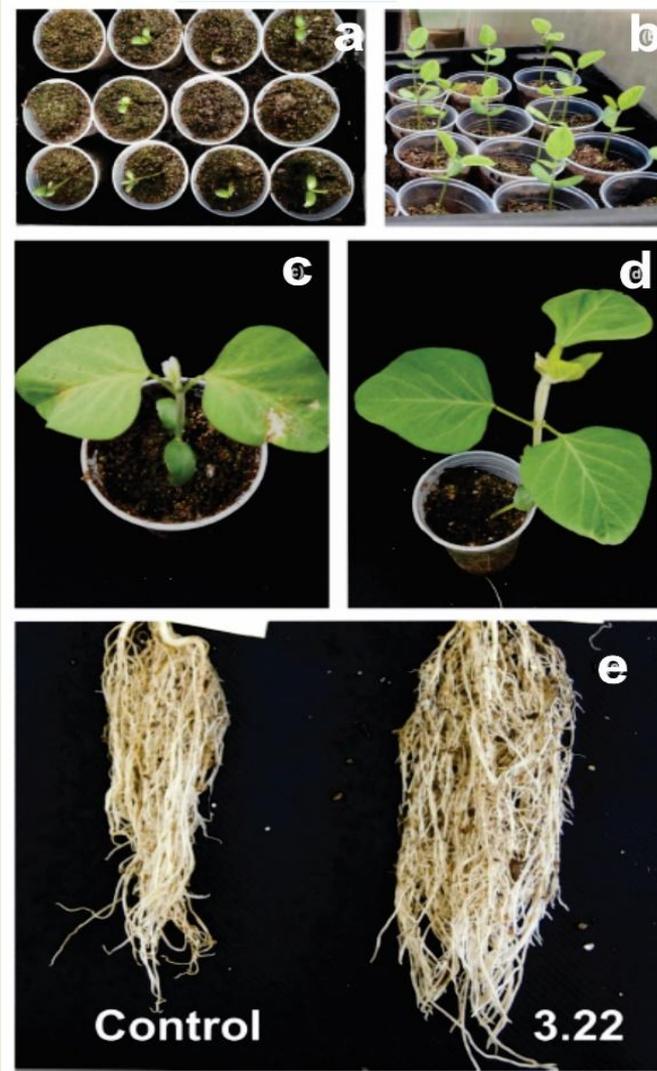


Resultados parciais alcançados



Center for Genetic Engineering and
Biotechnology, Havana, Cuba.

Resultados parciais alcançados



Atividades planejadas x realizadas

Atividade/semestre	%
Avaliação de atividade e da ação antimicrobiana <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> por microscopia de força atômica	100
Construção dos vetores	100%
Transformação das plantas	100%*
Análises Moleculares para presença de genes inseridos	90%
Caracterização molecular	80%
Caracterização celular (MEV-MET)	30%
Testes de resistência (desafio com patógeno)	100%*
Obtenção de gerações segregantes (R1)	90%

Atividades planejadas x realizadas

Cronograma de atividades para o período adicional de julho de 2021 a junho de 2022.

1. Obter novas linhagens de soja geneticamente modificadas para expressar os genes *calose*, *Nmdef02*, *R5*, *thaumatin* e *Gm0025*.
1. Completar a caracterização biológica de plantas da geração R1 e R2 de eventos já gerados e, R₀ e R₁ para os novos eventos gerados. Serão realizadas também estudos da interação *Phakopsora pachyrhizi* x planta (linhagens GM mostrando resistência).
1. Realizar a caracterização dos sítios de integração dos transgenes e sua associação com aspectos de biossegurança, para a determinação do valor agrícola das linhagens resistentes a ferrugem.
1. Realizar bioensaios com todas as linhagens geradas com a estratégia de expressão dos peptídeos antimicrobianos Gm0025 e R5 contra os fungos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phakopsora pachyrhizi* e *Fusarium solani*.
1. Realizar estudo off-target com rizóbio, a fim de determinar se a expressão dos peptídeos antimicrobianos têm influência na nodulação e fixação de nitrogênio.

Atividades planejadas x realizadas

• Cronograma de Atividades¶

¶

Atividade/trimestreα	1α	2α	3α	4α	5α	6α	7α	8α
1.→Obtenção de novas linhagens GMα	α	α	α	α	α	α	α	α
2.→Caracterização biológicaα	α	α	α	α	α	α	α	α
3.→Caracterização molecular plantasα	α	α	α	α	α	α	α	α
4.→Desafios contra <i>S. sclerotiorum</i> , <i>P. pachyrhizi</i> e <i>F. solani</i> α	α	α	α	α	α	α	α	α
5.→Caracterização molecularα	α	α	α	α	α	α	α	α
6.→Estudo do efeito off-targetα	α	α	α	α	α	α	α	α
7.→Estudos de microscopiaα	α	α	α	α	α	α	α	α

Recurso aprovado x gasto

EXECUÇÃO FINANCEIRA			
	Recursos Liberados	Recursos Gastos	Saldo
Capital	96.000,00	47.401,91	48.598,09
Custeio	570.000,00	287.435,98	282.564,02
Bolsa	144.000,00	135.000,00	9.000,00
Saldo		469.837,89	340.162,11
Data da situação 19.05.2021			

Uma janela de desafios por ano (IMA-Mato Grosso)
Avanço de gerações em casa de vegetação (homozigose)
Desafio com múltiplos genótipos
Transformação genética – numero de eventos por construção
Efeito off-target (rizóbio)
Estudo histológico (microscopia)
Desafio com banco de *Fusarium*

Francisco Aragão

Tese doutorado – Unicamp - Cristovan Boutista

Glaucia Cabral

Giovanni Vianna

Carlos Bloch Jr.

Kenny Bonfim

Rodrigo Fragoso

Thais Cipriano

Cíntia Coelho

Rafael Galbieri

Elsa Nogueira

Emanuel Abreu

INPI INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL

10/10/2018 870180139953
15:17



29409161803386915

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2018 070920 8

Obrigado
francisco.aragao@embrapa.br



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

