



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL de LONDRINA

---

LUCAS VINICIUS DE SOUSA ALCANTARA

**SILENCIAMENTO DO GENE *KT11* VIA  
CRISPR/Cas9 VISANDO O AUMENTO DA  
DIGESTIBILIDADE DA SOJA**

LUCAS VINICIUS DE SOUSA ALCANTARA

**SILENCIAMENTO DO GENE *KT11* VIA  
CRISPR/Cas9 VISANDO O AUMENTO DA  
DIGESTIBILIDADE DA SOJA**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-graduação em  
Biotecnologia da Universidade  
Estadual de Londrina - UEL, como  
requisito parcial para a obtenção do  
título de Mestre.

Orientadora: Prof. Liliane Marcia Mertz  
Henning

Londrina  
2024

LUCAS VINICIUS DE SOUSA ALCANTARA

**SILENCIAMENTO DO GENE *KT11* VIA  
CRISPR/Cas9 VISANDO O AUMENTO DA  
DIGESTIBILIDADE DA SOJA**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-graduação em  
Biotecnologia da Universidade  
Estadual de Londrina - UEL, como  
requisito parcial para a obtenção do  
título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dra. Liliane Marcia Mertz  
Henning  
Embrapa Soja - PR

---

Dra. Isabel Roggia  
Embrapa Soja - PR

---

Dra. Silvana Regina Rockenbach Marin  
Embrapa Soja – PR

Londrina, 29 de abril de 2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

de Sousa Alcantara, Lucas Vinicius .

SILENCIAMENTO DO GENE KTI1 VIA CRISPR/Cas9 VISANDO O AUMENTO DA DIGESTIBILIDADE DA SOJA / Lucas Vinicius de Sousa Alcantara. - Londrina, 2024.

68 f.

Orientador: Liliane Marcia Mertz Henning.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2024.

Inclui bibliografia.

1. Glycine max - Tese. 2. fator antinutricional (FA) - Tese. 3. Kunitz - Tese. 4. CRISPR - Tese. I. Mertz Henning, Liliane Marcia . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU 66

## **AGRADECIMENTOS**

Não posso deixar de expressar minha gratidão à minha família, cujo suporte incondicional foi um pilar essencial nesta minha jornada. A minha grande mãe, Telma Mara de Sousa, cujo amor e dedicação ilimitados me inspiraram a seguir em frente mesmo nos momentos mais desafiadores. Ao meu irmão, Adriano Alcântara, cuja companhia e encorajamento “militar” nunca me deixaram desistir.

Um enorme agradecimento ao meu primo, Vinícius Sousa, por todo apoio, força e motivação durante esta jornada. Um agradecimento especial aos meus tios, Fernando e Edimara, por sempre acreditarem em mim e por sempre me fornecerem apoio incondicional.

Gostaria de dedicar um grande agradecimento à minha namorada, Ana Flávia. Meu amor, sua paciência, compreensão e amor foram fundamentais para que eu conseguisse me levantar e seguir em frente. Você é uma fonte de inspiração e alegria constante, sou profundamente grato por cada momento que compartilhamos e pelo apoio que você me deu ao longo desta jornada.

Ao meu amigo Leonardo Davanço, por toda amizade e parceria ao longo do tempo.

A todos vocês, família e amigos, minha eterna gratidão por serem minha rede de apoio e por tornarem possível essa conquista, sem vocês nada disso teria sido possível.

Gostaria de expressar minha sincera gratidão a todos que contribuíram para o desenvolvimento e a conclusão deste trabalho. Primeiramente, meu profundo agradecimento à minha orientadora, Prof. Dra. Liliane Marcia Mertz Henning, cuja orientação e apoio foram fundamentais para a minha jornada acadêmica.

Um agradecimento especial também às estimadas membros da banca de avaliação, Dra. Isabel Roggia e Dra. Silvana Regina Rockenbach Marin, cujas críticas e sugestões enriqueceram significativamente este trabalho.

Gostaria de agradecer imensamente aos funcionários da Embrapa Soja e da Universidade Estadual de Londrina, cujo ambiente acolhedor e recursos indispensáveis proporcionaram as condições para a realização deste estudo.

Sou imensamente grato à CAPES pela concessão da bolsa de estudos, cujo possibilitaram o desenvolvimento deste estudo.

## RESUMO

ALCANTARA, Lucas Vinicius de Sousa. **SILENCIAMENTO DO GENE *KTI1* VIA CRISPR/Cas9 VISANDO O AUMENTO DA DIGESTIBILIDADE DA SOJA**. 2024. 66 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia – Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024).

A soja [*Glycine max* (L.) Merr.] é uma oleaginosa de importância econômica mundial, rica em aminoácidos e proteínas, é considerada uma das principais fontes para alimentação humana e animal. Mais de 90% da produção é destinada para produção de farelo de soja, o qual é usado na alimentação animal. Aproximadamente 50% da dieta de suínos e 26% de aves são baseadas no consumo de soja. Entretanto, apesar dos aspectos positivos, a soja possui fatores antinutricionais (FAs) que podem afetar a saúde animal, reduzir a qualidade nutricional do farelo e prejudicar a conversão alimentar. Os inibidores de proteases constituem o fator antinutricional mais importante para a soja. O inibidor de tripsina do tipo Kunitz (KTI) é responsável por inibir o funcionamento da tripsina, considerado o FA mais importante na alimentação de animais monogástricos. A tripsina é uma importante enzima animal, envolvida na digestão de diversas proteínas. A inibição da tripsina pode reduzir o crescimento animal entre 30 a 50% devido à hipertrofia/hiperplasia do pâncreas. O KTI no farelo de soja é desativado na indústria por aquecimento. Esse processamento, no entanto, reduz o valor nutricional do farelo pela destruição térmica dos aminoácidos e aumenta o custo energético da produção em 25%. O uso de variedades com baixo KTI ou livre de KTI pode reduzir custos no processamento e também, resultar em melhoria na conversão alimentar dos animais. Para atingir esse objetivo, neste trabalho realizou-se o silenciamento gênico via CRISPR/Cas (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated proteins*), do gene *KTI1* na soja, que é um dos responsáveis pela produção do inibidor de tripsina do tipo Kunitz. Para obtenção das plantas editadas, realizou-se a caracterização do gene alvo por meio de ferramentas da bioinformática, seguido do desenho do RNA guia, o qual foi clonado em vetor contendo os elementos da maquinaria CRISPR/Cas. A transformação genética foi realizada por *Agrobacterium tumefaciens*. As plantas transformadas tiveram a região alvo da edição sequenciadas, a fim de, identificar a ocorrência de mutações. Como resultado foi possível obter plantas editadas com diferentes frequências de edição. Por meio de avanço de geração espera-se obter uma planta estável e em homozigose.

**Palavras-chave:** *Glycine max*; tripsina; Kunitz; CRISPR; fator antinutricional (FA).

## ABSTRACT

ALCANTARA, Lucas Vinicius de Sousa. **KT11 GENE SILENCING USING CRISPR/CAS9 TO INCREASE SOYBEAN DIGESTIBILITY**. 2024. 66 f. Dissertation (Master Degree – Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] is an oilseed of global economic importance, rich in amino acids and proteins, and is considered one of the main sources for human and animal nutrition. More than 90% of production is destined for the production of soybean meal, which is used in animal feed. Approximately 50% of the diet of pigs and 26% of poultry is based on soy consumption. However, despite the positive aspects, soy has anti-nutritional factors (ANF'S) that can affect animal health, reduce the nutritional quality of the bran and impair feed conversion. Protease inhibitors constitute the most important antinutritional factor for soybeans. The kunitz-type trypsin inhibitor (KTI) is responsible for inhibiting the functioning of trypsin, considered the most important ANF in the diet of monogastric animals. Trypsin is an important animal enzyme, involved in the digestion of various proteins. Trypsin inhibition can reduce animal growth by 30 to 50% due to pancreas hypertrophy/hyperplasia. The KTI in soybean meal is deactivated in industry by heating. This processing, however, reduces the nutritional value of the bran through the thermal destruction of amino acids and increases the energy cost of production by 25%. The use of low-KTI or KTI-free varieties can reduce processing costs and also result in improved feed conversion for animals. To achieve this objective, in this work gene silencing was carried out via CRISPR/Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated proteins), of the KTI1 gene in soybean, which is one of those responsible for the production of trypsin inhibitor type Kunitz. To obtain the edited plants, the target gene was characterized using bioinformatics tools, followed by the design of the guide RNA, which was cloned into a vector containing the elements of the CRISPR/Cas machinery. Genetic transformation was carried out by *Agrobacterium tumefaciens*. The transformation plants had the editing target region sequenced in order to identify the occurrence of mutations. As a result, it was possible to obtain plants edited with different editing frequencies. Through generation advancement, it is expected to obtain a stable and homozygous plant.

**Key-words:** inhibitor; trypsin; kunitz; CRISPR; anti-nutritional factor (ANF)

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Principais destinos e usos dos grãos de soja.....16
- Figura 2** – Funcionamento do sistema CRISPR/CAS em procariotos. Uma célula invadida por vírus ou plasmídeo pode integrar parte do genoma invasor como um novo espaçador (em vermelho). O DNA invasor é integrado na forma de espaçadores, conferindo adaptação do hospede..... 25
- Figura 3** – Vetor modular C034p7ioR-35sCas, contendo entre as bordas LB e RB a maquinaria para edição via CRISPR, composta pela sequência do gene de seleção BAR, da endonuclease Cas-9 do promotor AtU6 para controle da transcrição do gRNA..... 32
- Figura 4** – Processo de infecção dos explantes pelo método de *half seed* e etapas da regeneração e seleção dos explantes. A) Sementes após 16h em Meio de Germinação; B) Corte horizontal das sementes; C) Remoção da ponta da radícula; D) Semente após a remoção da ponta da radícula; E) Retirada do tegumento; F) Abertura dos cotilédones; G) Remoção dos primórdios foliares; H) Realização do ferimento com auxílio de micro escova; I) Transferência dos explantes para o Meio de Co-Cultivo Sólido. J) Lavagem com água destilada; K) Explantes antes do corte do hipocótilo; L) Explantes após o corte do hipocótilo; M) Transferência para placas com Meio de Indução de Multibrotamento 1; N) Explantes em Meio de Alongamento; O) Corte dos brotos; P) Imersão em solução de ácido indolbutírico; Q) Transferência dos brotos para o meio de enraizamento; R) Plantas com desenvolvimento adequado para transferência e aclimação em vasos..... 34
- Figura 5** – Gel de agarose 1%, utilizando brometo de etídio para visualização do DNA. A identificação das plantas transgênicas foram realizadas por meio de PCR utilizando primers que se ancoram no promotor AtU6. Para auxiliar a visualização dos resultados, foram utilizados três controles. O “Vetor vazio” (vetor com a presença do promotor AtU6 e sem gRNA) foi utilizado como controle positivo, enquanto o “Negativo” e “Bco, ou branco” foram utilizados como controle para ausência de amplicons. As amostras identificadas como positivas foram as plantas nas quais houve amplificação, confirmando a presença do vetor..... 42
- Figura 6** – Frequência de edição (*indels*) e Knockout-score das linhas geradas em T0..... 43



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|            |                                                                                                                                                                                                        |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| BBi        | Inibidor de Bowman-Birk                                                                                                                                                                                |
| CCK        | Colecistocinina                                                                                                                                                                                        |
| CONAB      | Companhia Nacional de Abastecimento                                                                                                                                                                    |
| CONAMA     | Conselho Nacional do Meio Ambiente                                                                                                                                                                     |
| CQB        | Certificado de Qualidade em Biossegurança                                                                                                                                                              |
| CRISPR/Cas | <i>“Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR - associated proteins”</i> - Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespçadas/CRISPR - Proteínas Associadas |
| CTNBio     | Comissão Técnica de Biossegurança                                                                                                                                                                      |
| EIA/RIMA   | Relatório de Avaliação de Impacto Ambiental                                                                                                                                                            |
| EMBRAPA    | Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária                                                                                                                                                            |
| FAs        | Fatores Antinutricionais                                                                                                                                                                               |
| GM         | Geneticamente Modificado                                                                                                                                                                               |
| gRNA       | RNA Guia                                                                                                                                                                                               |
| HDR        | <i>“Homology Directed Repair”</i> - Reparo Dirigido por Homologia                                                                                                                                      |
| HR         | <i>“Homologous Recombination”</i> -Recombinação Homóloga                                                                                                                                               |
| IAC        | Instituto Nacional de Campinas                                                                                                                                                                         |
| KTI        | Inibidor de tripsina do tipo kunitz                                                                                                                                                                    |
| MAPA       | Ministério da Agricultura e Pecuária                                                                                                                                                                   |
| NCBI       | <i>“National Center of Biotechnology Information”</i> - Centro Nacional de Informação sobre Biotecnologia                                                                                              |
| NHEJ       | <i>“Non homologous End Joining”</i> - União de Extremidades Não Homólogas                                                                                                                              |
| OGM        | Organismo Geneticamente Modificado                                                                                                                                                                     |
| OGMs       | Organismos Geneticamente Modificados                                                                                                                                                                   |
| PIB        | Produto Interno Bruto                                                                                                                                                                                  |
| RN         | Resolução Normativa                                                                                                                                                                                    |

|         |                                                                 |
|---------|-----------------------------------------------------------------|
| RNAi    | Rna Interferente                                                |
| RNPs    | Ribonucleoproteínas                                             |
| SDN     | <i>"Site-directed nucleases"</i> - Nucleases Sítio Dirigidas    |
| SISNAMA | Sistema Nacional do Meio Ambiente                               |
| TI      | <i>"Tumor Inducing"</i> - Indutor de Tumor                      |
| TPM     | <i>"Transcription Per Million"</i> - Transcrito Por Milhão      |
| USDA    | <i>"United States Department of Agriculture"</i> - Departamento |
| de      | Agricultura dos Estados Unidos                                  |
| LB      | <i>"Left Border"</i> - Borda Esquerda                           |
| RB      | <i>"Right Border"</i> - Borda Direita                           |
| PCB     | Protocolo de Cartagena sobre Biossegurança                      |

## SUMÁRIO

|                                                                         |           |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b>                                                     | <b>15</b> |
| <b>2 OBJETIVOS</b>                                                      | <b>18</b> |
| 2.1 OBJETIVO GERAL                                                      | 18        |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS                                               | 18        |
| <b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>                                          | <b>19</b> |
| 3.1 SOJA: HISTÓRICO E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA                             | 19        |
| 3.2 USOS, COMPOSIÇÃO E IMPORTÂNCIA SOCIAL DA SOJA                       | 20        |
| 3.3 FATORES ANTINUTRICIONAIS DA SOJA                                    | 22        |
| 3.3.1 Oligossacarídeos                                                  | 23        |
| 3.3.2 Saponinas                                                         | 24        |
| 3.3.3 Fitatos                                                           | 25        |
| 3.3.4 Lectinas                                                          | 25        |
| 3.3.5 Inibidores De Protease                                            | 26        |
| 3.4 MELHORAMENTO GENÉTICO PARA AUMENTO DA QUALIDADE NUTRICIONAL DA SOJA | 29        |
| 3.5 EDIÇÃO GÊNICA VIA CRISPR/CAS                                        | 31        |
| 3.6 REGULAMENTAÇÃO DE BIOSSEGURANÇA                                     | 35        |
| <b>4 METODOLOGIA</b>                                                    | <b>37</b> |
| 4.1 SELEÇÃO DO GENE ALVO                                                | 37        |
| 4.2 DESENHO DO GUIA (GRNA)                                              | 39        |
| 4.3 CONSTRUÇÃO GÊNICA                                                   | 39        |
| 4.4 TRANSFORMAÇÃO E CULTURA DE TECIDOS                                  | 40        |
| 4.5 IDENTIFICAÇÃO DE PLANTAS TRANSFORMADAS E CONFIRMAÇÃO DA EDIÇÃO      | 42        |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>                                        | <b>43</b> |
| 5.1 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE KTI                                    | 43        |
| 5.2 IDENTIFICAÇÃO DE EVENTOS TRANSGÊNICOS                               | 46        |
| 5.3 IDENTIFICAÇÃO DE PLANTAS EDITADAS.                                  | 49        |
| <b>6 CONCLUSÃO</b>                                                      | <b>52</b> |
| <b>REFERÊNCIAS</b>                                                      | <b>53</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

A soja [*Glycine max* (L.) Merr.] é uma oleaginosa de importância econômica mundial, sendo o Brasil o maior produtor mundial, com uma produção de cerca de 154 milhões de toneladas na safra 2022/23 (CONAB, 2023). Os grãos de soja são empregados para diversas finalidades, tais como a alimentação humana, produção de biodiesel, indústria farmacêutica e de cosméticos, entre outros. Entretanto, aproximadamente 77% da produção é destinada à fabricação de farelo de soja, o qual é utilizado principalmente para produção de carne (ABIOVE, 2023). A soja se consolidou como a principal fonte de proteína vegetal devido à sua alta concentração de proteínas e aminoácidos essenciais (CROMWELL et al., 1991; SHARMA et al., 2014).

O Brasil se destaca na produção e exportação de carne e outros produtos derivados de animais monogástricos, como frango e porco. Portanto, a indústria de alimentação animal desempenha um papel crucial na agropecuária brasileira. Dentro desse contexto, a avicultura brasileira consome mais da metade do volume total de ração produzida, com destaque para a significativa utilização de farelo de soja (ROSTAGNO et al., 2011). Contudo, a inclusão de soja nas rações de animais monogástricos, como suínos e aves, enfrenta desafios devido à presença de fatores antinutricionais (FAs).

Os FAs dificultam a ação das enzimas digestivas, resultando em danos à parede intestinal, reduzindo a digestibilidade dos nutrientes e, conseqüentemente, prejudicando os resultados de desempenho animal (NUNES et al., 2001; BRITO et al., 2006). As rações para animais podem representar até 80% dos custos de produção de carne, e uma conversão alimentar inadequada resulta em um aumento significativo no uso desse insumo, reduzindo drasticamente os lucros. Os inibidores de proteases constituem o fator antinutricional mais importante para a soja, reduzindo significativamente a absorção de proteínas (HYMOWITZ, 1986; LIENER, 1996; HENKEL, 2000; GILLMAN et al., 2015).

As lectinas e o inibidor de tripsina do tipo Kunitz (KTI) são os FAs mais importantes na alimentação de animais. O KTI é responsável por inibir o funcionamento da tripsina, uma importante enzima animal, envolvida na digestão de diversas proteínas. O KTI no farelo de soja é desativado na indústria pelo aquecimento

entre 90,5 a 100°C, contudo, o calor excessivo pode ocasionar a perda de aminoácidos essenciais e a modificação das propriedades benéficas da soja. Além disso, o subprocessamento pode resultar em resíduos de fatores antinutricionais, prejudicando o desempenho animal (CAFÉ et al., 2000; RODRIGUES et al., 2002; BRITO et al., 2006). O uso de variedades com baixo KTI ou livre de KTI podem reduzir gastos com o uso da soja *in natura* como ração (KUNITZ, 1945; COOK et al., 1988; PALACIOS et al., 2004; CHEN et al., 2014).

Um baixo perfil de fatores antinutricionais em grãos é necessário para atender as demandas da indústria, reduzindo os impactos à saúde animal. O uso de cultivares de soja com níveis reduzidos de KTI nos grãos é uma estratégia para melhorar a qualidade das rações, permitindo aumentar a digestibilidade de proteínas. Para redução de fatores antinutricionais, estratégias de melhoramento clássico com o auxílio da biotecnologia podem ser empregadas.

Os genes *KTI1* e *KTI3* são responsáveis por controlar sinergicamente o conteúdo de inibidores de tripsina na soja (WANG et al., 2023). Para o gene *KTI3* existem mutantes naturais que podem ser utilizados no melhoramento para introgressão de alelos nulos. Diversos marcadores moleculares foram desenvolvidos para o controle de *KTI3*, permitindo reduzir com eficiência essa característica. Contudo, os programas de melhoramento não tiveram sucesso para redução de *KTI1* em cultivares de soja (GILLMAN et al., 2015; ROSSO et al., 2021).

Com auxílio da biotecnologia, o silenciamento gênico via CRISPR/Cas (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated proteins*), do gene *KTI1* oferece uma alternativa para formação de novas variedades com baixos teores de fatores antinutricionais. O sistema CRISPR/Cas é uma ferramenta de edição de genoma que teve origem na adaptação de um mecanismo natural de bactérias contra bacteriófagos. A ferramenta CRISPR funciona a partir de dois componentes principais, a enzima Cas e um RNA guia (gRNA). O gRNA possui a função de direcionar a enzima CAS, para clivagem dupla da fita de DNA em um local específico. A quebra da dupla fita provoca a ativação do mecanismo natural de reparo celular, gerando reparos incorretos nos genes-alvo. Deleções ou inserções de bases nitrogenadas podem interromper o funcionamento do gene, reduzindo a expressão de proteínas-alvo (WIEDENHEFT et al., 2012; JINEK et al., 2012; MARRAFFINI, 2015; ANZALONE et al., 2020).

Neste trabalho, o objetivo foi o silenciamento do gene *KT11* na variedade de soja BRS 573 via CRISPR/CAS, visando a melhoria da digestibilidade de proteínas para o consumo animal.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Obter plantas de soja editadas com silenciamento do gene *KT11* visando a redução desse fator antinutricional para melhoria da digestibilidade animal.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter construções gênicas contendo a maquinaria CRISPR/Cas e gRNA para transformação de soja via *Agrobacterium tumefaciens*;
- Gerar plantas transgênicas positivas para a presença da maquinaria CRISPR/Cas;
- Realizar a caracterização molecular para identificação da edição;
- Selecionar plantas editadas para silenciamento do gene *KT11*.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 SOJA: HISTÓRICO E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

A soja (*Glycine max* (L.) Merr.) é uma leguminosa pertencente à família Fabaceae, subfamília Faboideae, tribo Phaseoleae e subtribo Glycininae. É uma cultura anual, com porte ereto e herbáceo, germinação epígea, ciclo de vida de 70 a 200 dias e tipos de crescimento determinado, semi determinado ou indeterminado (SILVA et al., 2022).

É originária da Manchúria, região localizada no nordeste da China (SILVA et al., 2022). Após sua descoberta, seu cultivo expandiu-se para o sul da China e sudoeste da Ásia. O cultivo da soja permaneceu restrito ao oriente por dois mil anos, sendo introduzido no ocidente, pela Europa, apenas no final do século XV e início do século XVI (HARLAN et al., 1975). A chegada da soja às Américas ocorreu entre os séculos XVII e XVIII na região da Pensilvânia nos Estados Unidos, enquanto no Brasil, o primeiro cultivo de soja é datado no ano de 1882 (REIFSCHNEIDER et al., 2010).

Utilizando cultivares trazidas dos Estados Unidos, a primeira tentativa de cultivo de soja no Brasil foi identificada no estado da Bahia. A iniciativa não obteve sucesso, uma vez que as cultivares não conseguiram se adaptar às condições climáticas da região nordeste (EMBRAPA, 2014). Ao contrário do clima quente e seco da Bahia, foi no Rio Grande do Sul que o cultivo de soja prosperou (SEDIYAMA et al., 2009). O sul do Brasil com condições climáticas mais próximas das regiões de origem das cultivares importadas dos Estados Unidos, favoreceu o desenvolvimento da soja (SILVA et al., 2022).

Na década de 1930, o cultivo comercial de soja já acontecia no Rio Grande do Sul, ocupando uma área de aproximadamente 702 ha (SILVA et al., 2022). Por volta de 1950, os investimentos na pesquisa de fertilidade do solo e melhoramento genético permitiram a criação de cultivares adaptadas às condições climáticas brasileiras, fazendo com que o cultivo da soja se expandisse para outras regiões brasileiras (SEDIYAMA et al., 2009). O aumento da área cultivada elevou a produção de soja no Brasil, alterando significativamente a participação do país na produção mundial de soja, que passou de 0,5% para 16% entre 1954 e 1970 (CONAB 2022).

Na década de 1970, a maior parte da soja cultivada no Brasil ainda estava



concentrada no estado do Rio Grande do Sul (DALL'AGNOL, 2016). Nessa época, a cultura abrangia 12 milhões de hectares, com uma produção de 7 milhões de toneladas e uma produtividade média de  $1.748 \text{ kg.ha}^{-1}$  (SILVA et al., 2022). No entanto, na década de 1980, o cultivo de soja foi consolidado no cerrado brasileiro, resultando em uma expansão significativa da produção por unidade de área (LOBATO et al., 2010). O uso de cultivares adaptadas às condições climáticas do centro-oeste brasileiro aumentaram significativamente a área de cultivo (CONAB, 2022), impulsionando a produção nacional.

Bem distante da realidade de 1980, nas safras de 2021/22 e 2022/23 o Brasil se destacou como líder na produção mundial de soja, aumentando cerca de 10 vezes a produção por unidade de área. Na safra de 2021/22 a área cultivada foi de 41,5 milhões de hectares, com uma produção de 125,5 milhões de toneladas e produtividade de  $3.026 \text{ kg.ha}^{-1}$ . Já na safra 2022/23 a produção foi de aproximadamente 154,6 milhões de toneladas, em uma área de aproximadamente 44 milhões de hectares (CONAB, 2023). Com um aumento de apenas 6,2% de área cultivada, o valor da produção aumentou em 23,2% e a produtividade em 15,9% em relação ao ano de 2021 (CONAB, 2023). O cultivo da soja, que representa uma parcela significativa do produto interno bruto (PIB) brasileiro, tem crescido de forma exponencial ao longo das últimas décadas (SILVA et al., 2022). Esse resultado positivo revela a eficiência dos agricultores e da pesquisa brasileira na busca por cultivares mais produtivas e adaptadas às condições climáticas brasileiras (CONAB, 2023).

### 3.2 USOS, COMPOSIÇÃO E IMPORTÂNCIA SOCIAL DA SOJA

A soja é uma das principais commodities mundiais, sendo considerada a fonte de proteína de melhor custo benefício para alimentação animal (EMBRAPA, 2014). O grão de soja, possui alto potencial nutritivo e é bastante versátil, sendo utilizado na alimentação humana, animal e na indústria de biocombustíveis.

Além do alto teor de proteína, a soja se destaca pelo elevado padrão de aminoácidos essenciais entre as proteínas de origem vegetal. É rica em fibras, vitaminas, minerais e lipídios, possuindo diversos aminoácidos como fenilalanina, metionina, treonina, valina, isoleucina, leucina, triptofano e lisina. A composição de

aminoácidos da soja é semelhante ao padrão das proteínas de origem animal, com exceção dos aminoácidos sulfurados metionina e cisteína. O grão de soja possui uma fração protéica altamente significativa, com alto valor biológico. Grande parte das cultivares possuem aproximadamente 30 a 45% de proteínas, 15 a 25% de óleo e 20 a 35% de carboidratos. Além disso, a presença de vitaminas, minerais, antioxidantes e diversos aminoácidos essenciais aumentam consideravelmente o valor nutritivo do grão (KUDEŁKA et al., 2021)

Derivam dos grãos de soja diversos produtos e subprodutos tais como farinha de soja desengordurada para fabricação de produtos alimentícios (barra de cereais, balas, alimentos dietéticos, bebidas à base de soja, proteína texturizada de soja), proteína isolada para uso comestível (aditivos de alimentos e produtos análogos da carne) e usos industriais (formador de espuma, fabricação de fibra), na forma de grão para produção de alimentos como molho de soja, queijo de soja, soja torrada, fermentada e através do óleo cru produz-se óleo refinado, lecitina, glicerol, esteróis (antioxidantes) e ácidos graxos usados na indústria farmacêutica, cosmética e também alimentícia, além de farelo de soja para produção de ração animal (MATTOS et al., 2015).

Cerca de 63% dos grãos de soja brasileira são destinados à exportação, 34% ao processamento e 3% a outros usos (ABIOVE, 2023). Aproximadamente 77% da soja processada é destinada à fabricação de farelo de soja, utilizado na alimentação animal e humana. Os 23% restantes da soja é processada para a fabricação de óleo de soja para alimentação e biodiesel (ABIOVE, 2023).

O farelo de soja, amplamente utilizado como fonte de proteína para animais, possui participação significativa na produção de carnes no mundo, sendo de grande importância para economia brasileira e representa mais de 80% do farelo proteico produzido no mundo (SILVA et al., 2022; USDA, 2022). Outras fontes, como canola, girassol, algodão, amendoim e peixe representam uma pequena parcela do farelo proteico produzido (USDA, 2022). Nesse contexto, a soja se consolidou como fonte protéica das rações animais para produção de carne.

A produção de carnes é um dos pilares da agropecuária brasileira. Segundo a Associação Brasileira de Proteína Animal, o Brasil possui o segundo maior rebanho pecuário do mundo (ABPA, 2022). A produção de carnes suína e aves foi de 19,9 milhões de toneladas no Brasil em 2023 (ABPA, 2023). Aproximadamente 50% da dieta de suínos e 26% de aves são baseadas no consumo de soja, contudo, o uso

de farelo de soja na alimentação é limitado pela presença de diversos fatores antinutricionais (GILLMAN et al., 2015). Os FAs da soja reduzem o desempenho dos animais, principalmente em monogástricos. O desenvolvimento de estratégias para reduzir os FAs na soja é fundamental para impulsionar o mercado de carnes.

### 3.3 FATORES ANTINUTRICIONAIS DA SOJA

Os fatores antinutricionais (FAs) são metabólitos secundários utilizados pelas plantas como um mecanismo de defesa contra predadores. A resistência de uma planta pode ser definida como a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada de um patógeno em seus tecidos. As plantas são incapazes de lutar pela sobrevivência de forma “ativa”, recorrendo a formas alternativas para se protegerem, como a produção de metabólitos secundários (COSTA; ROSA, 2010).

Os FAs são metabólitos secundários que interferem na digestibilidade, absorção ou utilização de nutrientes. Os metabólitos secundários não regulam processo vitais, mas atuam fortemente na interação da planta com o ambiente. A produção de FAs depende do estágio fenológico e condição do ambiente. Os FAs desempenham um papel fundamental na determinação da utilização das plantas para o consumo (HYMOWITZ, 1986; ARMOUR et al., 1998; COSTA; ROSA, 2010; SOUZA et al., 2019). Quando ingeridos por predadores, os FAs podem causar inibição da digestão ou absorção de nutrientes, ou até mesmo efeitos danosos no trato gastrointestinal (HESS et al., 2003; SOUZA et al., 2019).

Plantas ricas em fontes de energia usualmente produzem potentes compostos de defesa. A produção de FAs é um processo complexo, envolvendo uma série de reações. O reconhecimento de sinais exógenos do patógeno ativam o metabolismo celular vegetal e a atividade gênica. Os mecanismos de defesa de uma planta podem ser estruturais ou bioquímicos, podendo ser pré e/ou pós formados após a tentativa de penetração do patógeno no hospedeiro (MORAES et al., 2006; COSTA; ROSA, 2010; SOUZA et al., 2019; WANG et al., 2023).

Os mecanismos bioquímicos são chamados de fatores antinutricionais, ações evolutivas da planta para inibir a herbivoria. Os mecanismos bioquímicos também podem ser divididos em pré ou pós-formados. Os mecanismos bioquímicos pré-formados são substâncias presentes em altas concentrações nos tecidos da planta hospedeira antes do contato com o patógeno. Os mecanismos pós-formados são

substâncias ativadas em resposta à presença do patógeno (CARNEIRO, FERNANDES, 1996; STANGARLIN et al., 2011; SOUZA et al., 2019).

Em soja, os principais FAs de importância nutricional são os taninos, lectinas, fitatos e inibidores de protease que reduzem consideravelmente o perfil nutricional do farelo. Os inibidores de proteases constituem o fator antinutricional mais importante para a soja, reduzindo significativamente a absorção de proteínas dietéticas. Aproximadamente 6% da proteína total da soja é composta por inibidores de proteases. Os inibidores de proteases são altamente alérgicos para humanos e animais (MORAES et al., 2006; COSTA; ROSA, 2010; WANG et al., 2023). Apesar de terem um papel importante nos mecanismos de defesa das plantas, o consumo excessivo de FAs por animais pode levar ao acúmulo de toxinas no organismo, reduzindo o valor nutricional dos alimentos. Algumas vitaminas podem ser destruídas pela presença de fatores antinutricionais. Para mitigar os efeitos adversos dos FAs, processos industriais, como o aquecimento ou fermentação são empregados. Essas técnicas visam desativar ou reduzir a atividade desses compostos, tornando tais alimentos com maior valor biológico para consumo animal (KRISHNAN 2001; MORAES et al., 2006; CHEN et al., 2014; WANG et al., 2023).

### 3.3.1 Oligossacarídeos

A soja crua possui quantidades consideráveis de polissacarídeos não-amiláceos na forma de pectinas, hemiceluloses e oligossacarídeos. Esses componentes aumentam a viscosidade dos alimentos ingeridos, reduzindo a absorção dos nutrientes pela redução na interação entre substratos e enzimas na mucosa intestinal (SMIRICKY et al., 2002).

Além da soja *in natura*, o farelo de soja pode apresentar altos níveis de rafinose e estaquiose. A mucosa do intestino de não-ruminantes como aves e suínos não possuem enzimas  $\alpha$ -1,6-galactosidases, necessárias para conversão dos oligossacarídeos em açúcares simples. A redução na digestão de rafinose e estaquiose podem induzir a uma desregulação da microbiota intestinal, causando inflamação e diarreia. A baixa digestão e absorção desses nutrientes pelo intestino, pode causar desconforto e inchaço abdominal devido a produção excessiva de gases (PARSONS et al., 2000; LIMA et al., 2014).

No intestino grosso, os oligossacarídeos são fermentados a dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), gás hidrogênio (H<sub>2</sub>) e metano (CH<sub>4</sub>) pela microflora do ceco. A presença de fatores antinutricionais, como os oligossacarídeos, rafinose e estaquiose associados à imaturidade do trato gastrointestinal reduz a digestibilidade e disponibilidade de energia deste ingrediente na fase pré-inicial das aves (PARSONS et al., 2000; LIMA et al., 2014).

### 3.3.2 Saponinas

A palavra “saponina” (Sapo, traduzido do latim) significa sabão. No passado, plantas que continham saponinas eram usadas para limpeza. As saponinas são produzidas principalmente em alfafa, soja, leucena, trevo, quilaia e yucca. Sua estrutura tem caráter anfifílico, uma parte possui característica lipofílica (triterpeno ou esteróide) e outra hidrofílica (açúcares). As saponinas são glicosídeos esteróides ou triterpenos, possuindo a capacidade de hemolisar hemácias e de produzir espuma em solução. As classificações entre os grupos de saponinas dependem da estrutura da aglicona (SHIMOYAMADA et al., 1990; DAS et al., 2012; GOEL; MAKKAR, 2012).

Saponinas são substâncias derivadas do metabolismo secundário das plantas, relacionados com o sistema de defesa. São encontrados nos tecidos mais vulneráveis ao ataque fúngico, bacteriano ou predatório dos insetos. A soja é a principal fonte de saponinas, com um conteúdo variando entre 0,5% e 0,6% em peso seco. A quantidade de saponinas na soja depende das variedades e dos fatores ambientais durante o cultivo. Os efeitos antinutricionais das saponinas estão relacionados às modificações na permeabilidade da mucosa intestinal, inibindo o transporte de alguns nutrientes. As saponinas podem causar o rompimento de hemácias e se complexar a grupos esteróides. Contudo, os níveis encontrados na soja são considerados baixos e insuficientes para causarem problemas no desenvolvimento de animais (LIENER, 2000; MONTEIRO et al., 2005; COSTA; ROSA., 2010).

### 3.3.3 Fitatos

O ácido fítico (mioinositol hexaquisfosfato, IP6) ou seus sais fitatos são abundantes em cereais e leguminosas, representando reservas de fosfato para a

planta. Na soja e derivados, o teor de ácido fítico varia de 1% a 2% do peso seco dos grãos. A molécula de ácido fítico apresenta alta capacidade de ligação com cátions divalentes, devido aos seis grupos fosfatos aniônicos. Os sais formados têm baixa solubilidade, reduzindo a absorção no trato gastrointestinal (SNOW et al., 2004; GODOY et al., 2005; KUMAR et al., 2012).

Os principais sais afetados são de cálcio, ferro, magnésio e zinco. Assim, o principal efeito antinutricional do ácido fítico é a diminuição da biodisponibilidade de minerais. O ácido fítico também interage com grupos básicos de proteínas, inibindo a ação *in vitro* de enzimas digestivas. Fitatos são considerados componentes vegetais com a função de armazenamento de nutrientes. Podem formar complexos solúveis resistentes à ação do trato intestinal, participando da inibição de enzimas digestivas como a pepsina, pancreatina e alfa-amilase. O fitato é a principal forma de armazenamento de fósforo nas sementes dos vegetais, representando aproximadamente 80% do conteúdo total. Os fitatos ligam-se a minerais cálcio, magnésio, ferro e zinco, funcionando como forma de armazenamento. Os fitatos podem se ligar aos minerais ingeridos pela dieta. A capacidade de ligação ocorre em função de sua carga negativa, atraindo minerais com valência positiva (REDDY et al., 1989; SILVA; SILVA, 1999; COSTA; ROSA, 2010).

### 3.3.4 Lectinas

A lectina ou fito-hemaglutinina da soja (SBA, do inglês *soybean agglutinin*), é uma família de glicoproteínas tetraméricas de 120 KDa, compostas por dois tipos de subunidades. As subunidades possuem aproximadamente 30 KDa com grande afinidade por compostos N-acetil-D-galactosamina, possuindo quatro locais de ligação. As lectinas ou hemaglutininas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imunológica, capazes de formar ligações com alguns tipos de açúcares. Podem ser monômeros, dímeros ou polímeros da mesma cadeia peptídica, possuindo a capacidade de ligação com açúcares de membranas celulares do corpo humano ou animal. São produzidas na maioria dos vegetais, principalmente em leguminosas e cereais. As lectinas são encontradas em maior número nas sementes, mas também estão presentes em menor quantidade nas raízes, folhas, caules e rizomas (GRANT, 1989; COSTA; ROSA, 2010; BENEVIDES et al., 2011).

As lectinas estão presentes em todos os tecidos vegetais, possuindo

importantes funções para os vegetais. Desempenham grande importância para proteção, podendo ser extremamente tóxicas para diferentes organismos. Possuem a capacidade de reduzir a digestibilidade de proteínas no trato intestinal de animais, causando hipertrofia pancreática. São moléculas resistentes à proteólise no trato gastrointestinal, ligando-se aos receptores da superfície das células epiteliais. As lectinas purificadas da soja inibem o crescimento de animais, provocam dilatação do intestino delgado, causam dano ao seu epitélio e estimulam a hipertrofia e a hiperplasia do pâncreas. Em doses elevadas induzem a redução da massa muscular, dos lipídios e do glicogênio (MAENZ et al., 1999; SOUZA et al., 2019).

### 3.3.5 Inibidores De Protease

Em 1945 o pesquisador Kunitz isolou e caracterizou o primeiro inibidor de tripsina em soja, recebendo o nome de inibidor de tripsina de Kunitz (KTI). Um segundo inibidor de protease foi largamente estudado e caracterizado por Bowman em 1944 e Birk em 1961 (BBI). Atualmente, o termo “inibidor de tripsina” é utilizado para descrever variantes dos inibidores KTI e BBI. O KTI e BBI estão presentes em quantidades variadas em cultivares de soja (BOWMAN, 1944; KUNITZ, 1947; BIRK, 1961; ODANI; IKENAKA, 1977; GILLMAN et al., 2015).

Os inibidores BBI e KTI são proteínas não glicosiladas, genericamente conhecidos como inibidores de tripsina. Entretanto, sua especificidade não se restringe à tripsina, possuindo a capacidade de inibir serinoproteases (quimotripsina e elastase). Algumas isoformas desses dois tipos de inibidores foram caracterizadas, apresentando pequenas diferenças na sequência de aminoácidos, na mobilidade eletroforética e na especificidade de ligação às proteases. O complexo inibidor de protease é semelhante ao formado entre uma enzima e um substrato. Contudo, a ligação entre o inibidor e a protease é extremamente forte, impedindo que o complexo se dissocie com facilidade (KUNITZ, 1945; BENEVIDES et al., 2011; GILLMAN et al., 2015).

O KTI e BBI podem ser classificados pelo peso molecular, os de alto peso molecular possuem 20.000KDa, enquanto os de baixo peso possuem entre 6.000 a 10.00KDa. Os de alto peso são formados por pontes dissulfeto, 181 resíduos de aminoácidos e possuem alta proporção de ligações dissulfeto. Os de baixo peso são formados por 71 resíduos de aminoácidos e capacidade para inibir tripsina e

quimotripsina em sítios de ligações independentes. Os BBI são proteínas de 8KDa responsáveis pela inibição de tripsina, quimotripsina e elastase. Cerca de 80% da inibição da atividade trípica de grãos de soja é causada pela ação do inibidor de tripsina Kunitz. Estes antinutrientes apresentam especificidade para inibir as enzimas proteolíticas e, conseqüentemente, reduzem a digestão protéica de alimentos, proporcionando diminuição no ganho de peso e crescimento dos animais (KUNITZ, 1945; WEI, 1983; ROYCHAUDHURI et al., 2003; GILLMAN et al., 2015).

O inibidor de tripsina *Kunitz* é uma proteína com 21 KDa contendo 181 resíduos de aminoácidos. É considerada uma proteína monomérica e não glicosilada, ligada por pontes de dissulfeto. Na soja, os genes responsáveis pela expressão dos genes *KTI* são altamente regulados durante o ciclo de vida da soja. São expressos em momentos específicos durante a embriogênese, possuindo níveis de expressão diferentes no cotilédone e eixo embrionário (COSTA; ROSA, 2010; BENEVIDES et al., 2011; LIMA et al., 2014; SOUZA et al., 2019; WANG et al., 2023).

A tripsina e a quimotripsina são encontradas em uma grande variedade de plantas, como leguminosas, cereais, frutas e vegetais. A concentração dos inibidores de tripsina nas plantas e em seus frutos e suas sementes depende de uma série de fatores. A variedade, o estágio fisiológico de maturação na época de colheita, os tratamentos culturais, as condições edafoclimáticas durante o cultivo, infestação por insetos, condições de colheita e armazenamento, danos mecânicos à planta e à semente, entre outros (GRANT 1989; BURNS, 1987; LIENER, 1994; KARR-LILIENTHAL et al., 2005; STANGARLIN et al., 2011).

A baixa digestibilidade das proteínas da soja pode ser entendida como resultado de uma combinação de fatores. Os inibidores de tripsina em conjunto com a estrutura quaternária das principais proteínas de reserva da soja (glicina e betaconglucina) são os principais fatores. Os inibidores de tripsina são proteínas capazes de impedir a ação de algumas enzimas digestivas de animais monogástricos e humanos (CROMWELL et al., 1991; LIENER, 1996; LAJOLO et al., 2004).

As presenças de inibidores ativos na dieta causam a inibição do crescimento de animais, associado com a diminuição na digestibilidade da proteína ingerida na dieta, hipertrofia e hiperplasia pancreática (MORAES et al., 2006; LIMA JÚNIOR et al., 2010; SOUZA et al., 2019). A incorporação de inibidores de tripsina a dietas com proteínas pré-digeridas ou aminoácidos livres podem levar a inibição do crescimento. Isso ocorre porque a inibição da proteólise intestinal resulta em aumento na secreção



de enzimas digestivas (tripsina e quimiotripsina) como mecanismo compensatório pela complexação pelos inibidores (WEI, 1983; LIENER, 1994; GENOVESE; LAJOLO, 1998; COSTA, ROSA, 2010).

O aumento da secreção de enzimas digestivas em alguns animais é causado pelo aumento na liberação do hormônio colecistocinina (CCK) pelas células endócrinas do jejuno. A CCK é o agente mediador entre o pâncreas e a tripsina. Quando os níveis de tripsina estão reduzidos, ocorre um aumento na liberação de CCK e, conseqüentemente, ocorre secreção de tripsina pelo pâncreas. Esse aumento na concentração de tripsina suprime a liberação de CCK pela mucosa intestinal. Assim, a complexação da tripsina pelos inibidores provoca aumento na produção de CCK, levando a hipertrofia (aumento do tamanho das células acinares) e hiperplasia (aumento no número de células acinares) do pâncreas (HYMOWITZ, 1986; COOK et al., 1988; PUSZTAI et al., 1997; BUTOLO, 2002).

As enzimas proteolíticas são responsáveis por uma grande variedade de funções fisiológicas. As enzimas ocorrem em todas as formas de organismos vivos e possuem grande importância para conduzir funções metabólicas e reguladoras. Os inibidores de enzimas proteolíticas (tripsina) e amilolítica ( $\alpha$ -amilase) são as mais importantes entre os inibidores encontrados nos alimentos de origem vegetal. Os inibidores de proteases são proteínas capazes de evitar ou reduzir a atuação de enzimas que degradam proteínas animais e microbianas. São sintetizadas e estocadas em sementes e tubérculos, utilizadas como defesa contra a predação (LIENER, 1994; BENEVIDES et al., 2011; STANGARLIN et al., 2011).

Os inibidores de tripsina são resistentes às enzimas digestivas no trato gastrointestinal, aderindo-se ao epitélio intestinal e afetando as vilosidades. Os inibidores de tripsina afetam os processos de digestão, absorção e utilização de nutrientes. A principal função desse fator antinutricional é prevenir o consumo da semente contendo o embrião. A inibição da digestão da semente pelo predador aumenta a probabilidade de sobrevivência do vegetal. A ingestão de inibidores de tripsina reduz a digestibilidade, absorção e aproveitamento das proteínas que são ingeridas através da alimentação. Os inibidores de enzimas digestivas são encontrados com bastante frequência nos alimentos (COSTA; ROSA, 2010, LIMA et al., 2014; SOUZA et al., 2019).

Uma grande variedade de etapas complexas são empregadas na indústria para remoção de inibidores de tripsina, com destaque para utilização de processos

térmicos. O KTI e BBI podem ser irreversivelmente inativados pelo uso de calor. Os inibidores BBI são mais resistentes ao calor. Entretanto, o processo térmico pode reduzir a digestibilidade e a qualidade da proteína de soja devido a formação de reações de Maillard. Além disso, as operações com calor consomem muita energia, elevando o custo do processamento na produção do farelo. Os TIs são monitorados com frequência para controlar os efeitos negativos da aplicação térmica no processamento de soja (CHANG et al., 1987; DI PIETRO, WANG et al., 2023).

### 3.4 MELHORAMENTO GENÉTICO PARA AUMENTO DA QUALIDADE NUTRICIONAL DA SOJA

Entre as décadas de 1900 e 1960, grande parte do melhoramento genético de soja foi desenvolvido nas regiões sul do país. Para o avanço do cultivo de soja no norte do país, as instituições públicas de pesquisa como o Instituto Nacional de Campinas (IAC) e a Embrapa tiveram grande importância. Os estudos desenvolvidos por essas instituições permitiram o desenvolvimento de cultivares de soja com período juvenil longo, retardando o florescimento em dias curtos (SEDIYAMA et al., 2009; SILVA et al., 2022)

Até 1980, as empresas públicas e privadas nacionais ainda eram as principais responsáveis pelo melhoramento de soja e transferência de tecnologia para o mercado interno. Com a aprovação da Lei de Proteção de Cultivares (Lei nº 9.456, 1997), os programas de melhoramento genético aumentaram consideravelmente. As empresas multinacionais tiveram grande importância no desenvolvimento de novas tecnologias, principalmente de cultivares geneticamente modificadas (GMs) (BRASIL, 1997).

O melhoramento genético de soja é um processo constante para o desenvolvimento de novas cultivares. Os programas de melhoramento genético possuem objetivos gerais e específicos, buscando a solução de problemas bióticos e abióticos que interferem na produção de soja. O desenvolvimento de novas cultivares é uma tecnologia que contribuiu significativamente para o aumento de produtividade e estabilidade de produção. As cultivares de soja devem ter alta produtividade, estabilidade de produção e grande adaptabilidade a condições climáticas (MOLINARI et al., 2020; SILVA et al., 2022)

Nos últimos anos, grande parte dos estudos com soja foram direcionados para aumento de produtividade, resistência genética às principais doenças e pragas e

tolerância a fatores ambientais limitantes. Na literatura, um número reduzido de trabalhos científicos abordam o melhoramento genético para aumento da qualidade nutricional da soja. Além disso, a maior parte dos estudos para melhoramento da qualidade nutricional são considerados antigos e não apresentam soluções utilizando cultivares tropicalizadas. A falta de cultivares adaptadas para as condições climáticas brasileiras com quantidades reduzidas de inibidores de tripsina é um fator limitante para nutrição animal no país.

Os genes *KTI1* e *KTI3* são altamente expressos nas sementes de soja, possuindo grande importância para a produção de TIs. A identificação do acesso PI 157740 permitiu um avanço importante nos programas de melhoramento genético para redução de fatores antinutricionais na soja. O acesso possui a atividade de TIs significativamente reduzida devido a uma mutação *frameshift* (mutação genética causada pela adição ou deleção de pares de bases). A mutação *frameshift* resulta na terminação prematura durante a tradução do gene *KTI3*, reduzindo os inibidores de tripsina na soja. Contudo, nenhuma mutação foi identificada para o gene *KTI1* (JOFUKU et al., 1989).

Através do melhoramento clássico, foi possível melhorar a qualidade nutricional de cultivares de soja. Nesse contexto, a Embrapa vem conduzindo trabalhos visando o desenvolvimento de cultivares com melhor qualidade nutricional. Em trabalho conduzido por Carrão-Panizzi et al. (2009) a atividade de inibidores de tripsina Kunitz foi reduzido por meio de melhoramento genético clássico na cultivar BRS 216. Baker et al. (2010) concluíram que é possível produzir grãos com baixo teor de inibidores de tripsina e oligossacarídeos com uso de melhoramento genético, aumentando a disponibilidade de proteínas para o consumo.

O uso de novos marcadores moleculares foi uma técnica importante para reduzir os inibidores de tripsina em soja. Os marcadores moleculares são sequências ou bases nitrogenadas polimórficas em cultivares, responsáveis por alterações em características de interesse. Moraes et al. (2006) desenvolveram marcadores moleculares para seleção de cultivares de soja com menor quantidade de inibidores do tipo Kunitz. O uso de marcadores moleculares em programas de melhoramento é uma ferramenta importante para introgressão de genes em cultivares elite.

Outros trabalhos também utilizaram estratégias de engenharia genética visando a redução de inibidores de tripsina em soja. Song et al. (2017) utilizaram a tecnologia de RNA interferente (RNAi) para desenvolver plantas transgênicas capazes

de reduzir em 77,5% o funcionamento do gene *KTI1*. Haitao et al. (2010) também utilizaram a técnica de RNAi para reduzir significativamente a quantidade de inibidores de tripsina em cultivares de soja. Contudo, o uso de plantas transgênicas apresenta dificuldades legislativas para comercialização, elevado custo de produção e baixa aceitação pela população. Alguns autores utilizaram a tecnologia CRISPR/CAS para o silenciamento do gene *KTI1*. Os autores Wang et al. (2023) obtiveram o silenciamento simultâneo dos genes *KTI1* e *KTI3* na cultivar Williams 82 via CRISPR/CAS, reduzindo significativamente os níveis de inibidores de tripsina na soja.

Atualmente, ferramentas modernas da biotecnologia, como a tecnologia de CRISPR/Cas (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* ou Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas) possibilitam editar genomas de forma precisa, sem necessariamente envolver a introdução de transgenes. Associada a técnica de CRISPR, o sequenciamento completo do genoma da soja em 2010 permitiu ampliar a identificação de genes de interesse.

### 3.5 EDIÇÃO GÊNICA VIA CRISPR/CAS

Por muito tempo, o desenvolvimento de novas variedades estava limitado ao uso de ferramentas baseadas no melhoramento genético clássico. Esse método envolve a hibridação controlada para criar novos genótipos que combinem alelos favoráveis, utilizando a seleção com base na observação do fenótipo (MCCOUCH et al., 2013; BORÉM et al., 2021; SILVA et al., 2022).

Com os avanços na área da biotecnologia e da biologia molecular, surgiram ferramentas complementares ao melhoramento clássico possibilitando acelerar o desenvolvimento de variedades com características de interesse. Desde a década 1970, diversas técnicas de biologia molecular foram fundamentais para auxiliar o melhoramento genético vegetal. A criação da primeira molécula de DNA recombinante por Paul Berg em 1972 teve grande impacto no avanço da biotecnologia, permitindo a geração de organismos transgênicos (JACKSON et al., 1972). Entretanto, as primeiras técnicas utilizadas para produção de variedades transgênicas com o uso de marcadores possuíam algumas restrições. Em especial, a incapacidade de escolher o local específico onde o DNA exógeno é incorporado (PURUGGANAN; FULLER, 2009; QUE et al., 2010; BORÉM et al., 2021).

Aliado aos avanços na biologia molecular, o desenvolvimento de técnicas de

sequenciamento mais rápidas e a custos mais acessíveis tem possibilitado acessar informações do genoma de diversas espécies, incluindo a soja, que teve o sequenciamento do genoma finalizado em 2010. A cultivar Williams 82 foi utilizada como base para o sequenciamento, e essas informações vêm contribuindo para a descoberta de genes de interesse (SCHMUTZ et al., 2010).

Mais recentemente, o desenvolvimento das ferramentas de edição de genomas têm possibilitado promover alterações no DNA de forma precisa. O termo edição gênica refere-se a modificações em locais específicos no DNA de organismos *in vivo*. Para fazer edição é necessário o uso de nucleases específicas, permitindo clivar a molécula de DNA em uma região alvo. A clivagem da molécula alvo libera o mecanismo de reparo da célula, podendo ser direcionados por recombinação homóloga (HR, *Homologous Recombination*) ou por união de extremidades não homólogas (NHEJ, *Non homologous End Joining*). O reparo via HR permite a inserção de sequências na região editada, enquanto o NHEJ é capaz de produzir inserções ou deleções próximas ao sítio de clivagem. Diversos mecanismos de edição gênica foram aperfeiçoados nos últimos anos, permitindo a manipulação do DNA vegetal de forma altamente específica (BALTES et al., 2017; HUANG; PUCHTA, 2019; SATHEESH et al., 2019).

A especificidade na manipulação do DNA possibilitou melhorar diversas características de interesse simultaneamente, acelerando o processo de melhoramento vegetal. Nesse contexto, o sistema CRISPR/CAS teve grande importância para o avanço da edição gênica (JANSING et al., 2019). O uso de nucleases específicas possibilitam a realização de pequenas mudanças no genoma, permitindo clivar o DNA em locais determinados. Organismos gerados com a clivagem do DNA sem a introdução de genes exógenos fogem da classificação tradicional de OGM.

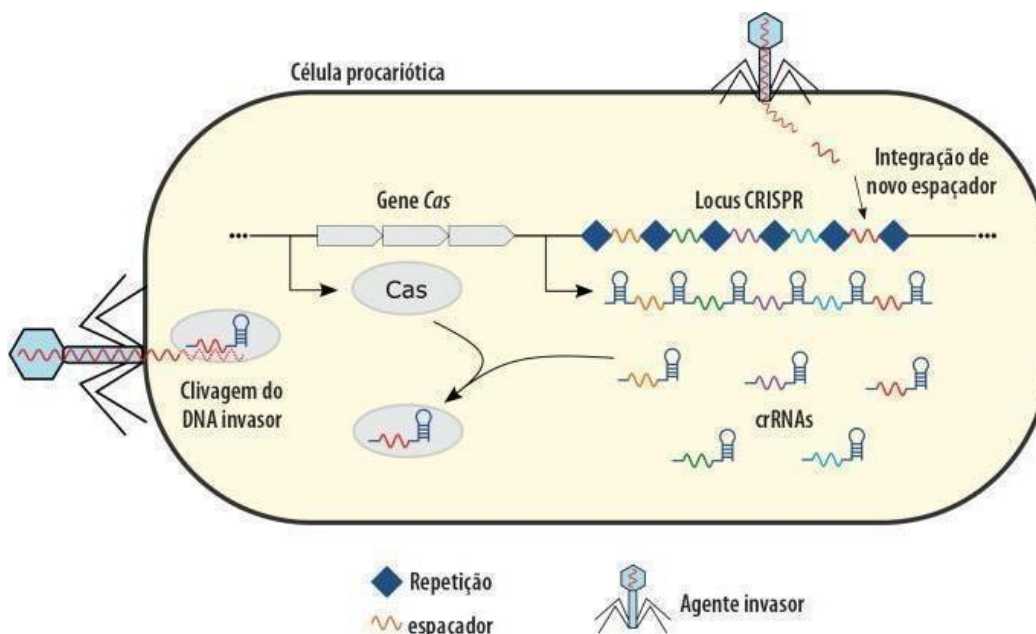
As SDN (do inglês, *Site-directed nucleases*) são nucleases específicas utilizadas para realizar modificações no DNA. Com base na aplicação das SDN, os organismos produzidos podem ser classificados como SDN-1, SDN-2 ou SDN-3. Os organismos SDN-1, são produzidos por pequenas inserções, modificações ou deleções em locais específicos. As pequenas modificações ativam o mecanismo de reparo natural celular, permitindo a união de extremidades não homólogas. Nesse mecanismo, é possível silenciar genes de interesse pela utilização da técnica CRISPR/CAS (GAO, 2018; ZHANG et al., 2019a; JANG; JOUNG, 2019).

Nos organismos SDN-2, uma mudança em um local específico nas bases nitrogenadas (A, T, G, C) é provocada pela quebra da dupla fita de DNA. No local da quebra, um fragmento de DNA da própria espécie é direcionado para reparar a fita. Esse mecanismo é conhecido como HDR (do inglês, *Homology Directed Repair*). Na aplicação SDN-3, o método de HDR pode ser utilizado para inserir um ou mais fragmentos de DNA para expressão de um determinado gene (GAO, 2018; JANG; JOUNG, 2019).

A ferramenta de edição de genomas CRISPR é baseada em um sistema natural de defesa encontrado em procariotos. O sistema CRISPR/CAS é um mecanismo de imunidade adaptativa utilizado por procariotos, bactérias e arqueas para defesa contra-ataque de vírus e plasmídeos. O funcionamento desse sistema foi demonstrado pela primeira vez em 1980 por Emmanuelle Charpentier, da Hannover Medical School na Alemanha, e por sua colega de trabalho Jennifer Doudna, da Universidade de Berkeley na Califórnia (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014; PICKAR-OLIVER; GERSBACH, 2019). Anos após a descoberta do sistema CRISPR, em 2013 o pesquisador Feng et al. (2013) demonstrou o seu funcionamento em células humanas. O trabalho de Feng possibilitou a obtenção da primeira patente sobre a técnica CRISPR.

Nesse mecanismo, o microrganismo invadido é capaz de clivar ácidos nucleicos do invasor (Figura 1). As clivagens dos ácidos nucleicos do invasor são responsáveis por formar pequenos fragmentos do DNA invasor. Os fragmentos do DNA invasor são integrados na região CRISPR do microrganismo invadido. O DNA invasor é integrado na forma de espaçadores, conferindo adaptação do hospedeiro. Com a invasão pelo mesmo vírus ou plasmídeo, o procarioto é capaz de transcrever os novos espaçadores, as transcrições dos espaçadores originam crRNAs (RNA guia), permitindo direcionar as nucleases Cas para clivagem do DNA invasor (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014; ZHANG et al., 2019b).

**Figura 1** – Funcionamento do sistema CRISPR/CAS em procariotos. Uma célula invadida por vírus ou plasmídeo pode integrar parte do genoma invasor como um novo espaçador (em vermelho). O DNA invasor é integrado na forma de espaçadores, conferindo adaptação do hospedeiro.



**Fonte:** Molinari et al. (2020).

A ferramenta CRISPR pode ser aplicada no melhoramento genético de plantas para gerar plantas com características desejáveis. A maquinaria da enzima pode ser inserida de forma direta via ribonucleoproteínas (RNPs) ou por meio de vetores através de transformação genética. No caso da soja, a estratégia de transformação via *Agrobacterium tumefaciens* para inserção do vetor tem sido a alternativa mais utilizada (XIE; YANG, 2013).

A *Agrobacterium tumefaciens* permite a transferência de genes de interesse para novas cultivares. Na forma a qual se encontra na natureza trata-se de um patógeno de solo, responsável pelo surgimento da doença “galha da coroa”. No processo de infecção, a bactéria transfere um fragmento de DNA (T-DNA) portando genes de hormônio de crescimento vegetal para a planta hospedeira. A transferência do T-DNA ocorre pela presença de um plasmídeo indutor de tumor (TI). O aumento na produção de hormônios resulta no desenvolvimento de um tumor, inviabilizando o desenvolvimento da planta (ZHANG et al., 2018; RODRIGUES et al., 2021; ALIU et al., 2022).

Em razão da sua capacidade de transferir T-DNA, a *Agrobacterium tumefaciens* foi modificada para transformação genética de plantas. Para a

transformação, o plasmídeo TI foi desarmado, impedindo a transmissão dos genes causadores de tumor. Em substituição aos genes causadores de tumor, são inseridos novos vetores de transformação na bactéria. Para aplicação da ferramenta CRISPR, os vetores de transformação, possuem entre bordas RB e LB a maquinaria para edição (XU et al., 2020; XU et al., 2022).

### 3.6 REGULAMENTAÇÃO DE BIOSSEGURANÇA

A regulamentação de OGMs em muitos países está fundamentada nas diretrizes do Protocolo de Cartagena sobre Biossegurança (PCB), um acordo internacional adotado em 2000 para garantir a segurança na manipulação de organismos vivos modificados derivados da biotecnologia moderna. O CPB estabelece uma estrutura para a tomada de decisões informadas sobre a liberação de organismos vivos modificados, focando na avaliação de riscos e na adoção de medidas de biossegurança (ENTINE et al., 2021). Países da América Latina, como Argentina, Brasil e Chile, têm desenvolvido regulamentos específicos para técnicas inovadoras de melhoramento, incluindo a edição de genoma (GATICA-ARIAS, 2020). A Argentina foi pioneira ao estabelecer um processo de decisão para determinar se produtos obtidos por essas técnicas devem ser regulamentados como OGMs. Esta abordagem flexível tem sido adotada por outros países da região, permitindo uma adaptação mais ágil às inovações tecnológicas (WHELAN; LEMA, 2017)

No Brasil, a Lei nº 11.105 de 24 de março de 2022 foi promulgada para regulamentar o desenvolvimento de atividades que envolvam organismos geneticamente modificados (OGMs) e seus derivados no Brasil. Essa lei estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização para a construção, cultivo, produção, manipulação, transporte, transferência, importação, exportação, armazenamento, pesquisa, comercialização, consumo, liberação no meio ambiente e o descarte de OGMs e seus derivados no país (BRASIL, 2005).

A Lei nº 11.105, estabelece que qualquer atividade que envolva OGM e seus derivados precisa de autorização da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). Em função do avanço da ciência e do surgimento de novas tecnologias, como as Técnicas Inovadoras de Melhoramento de Precisão (TIMPs), a CTNBio publicou a Resolução Normativa N°16 (RN16), publicada em 15 de janeiro de 2018 (BRASIL, 2018). Essa resolução normativa estabelece os critérios para apresentação



de consulta à CTNBio sobre as tecnologias geradas por meio de TIMPs, que incluem os produtos oriundos de edição gênica.

Conforme a resolução, essas novas ferramentas podem gerar tecnologias que diferem da estratégia de engenharia genética por transgênese, podendo resultar em produtos com ausência de DNA/RNA recombinante no organismo final. A RN16 estimula a inovação e o avanço científico no campo do melhoramento genético de plantas. Isto permite o desenvolvimento de culturas com características melhoradas, tais como resistência a doenças, tolerância a estresses ambientais e melhor qualidade nutricional (BRASIL, 2018). Diferentes estratégias para edição de genomas foram desenvolvidas, permitindo a modificação do DNA sem a introdução de genes exógenos (EMBRAPA, 2018)

Muitas vezes associados a algo não natural, os alimentos transgênicos possuem dificuldade para serem aceitos pelos consumidores. Apesar da grande contribuição histórica de variedades transgênicas para aumento da produção de alimentos, encontrar métodos alternativos para liberação de novos produtos é importante. Os organismos SDN-1 podem não ser considerados OGMs, uma vez que não possuem genes de um doador. Nesse contexto, o uso de organismos SDN-1 é um método interessante para garantir a biossegurança e reduzir os custos de desregulamentação (GAVIOLI; NUNES, 2015; EMBRAPA, 2018).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 SELEÇÃO DO GENE ALVO

O gene *KT11* (Glyma.01G09500) foi escolhido como alvo para o silenciamento. A escolha do alvo foi definida com base em pesquisas bibliográficas em conjunto com análises de bioinformática. A expressão do gene *KT11* foi realizada em bibliotecas de RNAseq de sementes de soja disponibilizadas nos estudos de Kafer et al. (2023) e Jones e Vodkin (2013). A expressão dos genes em TPM (do inglês, *transcription per million*) foi determinada utilizando a versão do genoma da soja Wm82.a4.v1 como referência, a partir do banco de dados do Phytozome v13 (Tabela 1).

**Tabela 1** - Dados para interpretação dos valores de expressão em *TPM* dos genes *KTI*.

| Código | Genótipo      | Tecido     | Estágio                | Armazenamento        | Plataforma                  | Sentido do sequenciamento | Tamanho | Data |
|--------|---------------|------------|------------------------|----------------------|-----------------------------|---------------------------|---------|------|
| 52     | Não informado | Cotilédone | 100- 200mg peso fresco | Liofilizado          | Illumina Genome Analyzer II | Único                     | 75      | 2015 |
| 53     | Não informado | Cotilédone | 100-200mg peso fresco  | Liofilizado          | Illumina HiSeq 2000         | Único                     | 75      | 2013 |
| 54     | Não informado | Cotilédone | 400-500mg peso fresco  | Liofilizado          | Illumina Genome Analyzer II | Pareado                   | 40-130  | 2015 |
| 55     | Não informado | Cotilédone | 400-500mg peso fresco  | Liofilizado          | Illumina HiSeq 2000         | Único                     | 75      | 2013 |
| 56     | Não informado | Cotilédone | Semente seca           | Temperatura ambiente | Illumina Genome Analyzer II | Pareado                   | 40-130  | 2015 |
| 57     | Não informado | Cotilédone | Semente seca           | Temperatura ambiente | Illumina HiSeq 2000         | Único                     | 100     | 2013 |
| 51F    | BRS 413 RR    | Semente    | Semente seca           | Não informado        | Não informado               | Pareado                   | 75      | 2019 |
| 53F    | BRS 413 RR    | Semente    | Semente seca           | Não informado        | Não informado               | Pareado                   | 75      | 2019 |
| 62F    | DM 6563       | Semente    | Semente seca           | Não informado        | Não informado               | Pareado                   | 75      | 2019 |
| 63F    | DM 6563       | Semente    | Semente seca           | Não informado        | Não informado               | Pareado                   | 75      | 2019 |
| 81F    | BRS MG715     | Semente    | Semente seca           | Não informado        | Não informado               | Pareado                   | 75      | 2019 |
| 82F    | BRS MG715     | Semente    | Semente seca           | Não informado        | Não informado               | Pareado                   | 75      | 2019 |

**Fonte:** Phytozome v13 e NCBI.

## 4.2 DESENHO DO GUIA (GRNA)

O gRNA foi desenhado pelo software CRISPRdirect, selecionando a PAM NGG (N, qualquer nucleotídeo) para Cas9, utilizando o genoma Wm82.a4.v1 para verificação de especificidade (NAITO et al., 2015). Os *off-targets* foram verificados através do alinhamento do gRNA + PAM no genoma da soja. O gRNA foi escolhido considerando critérios de ausência de *off-target* na região *seed* + PAM, tamanho de 20 pb e relação GC entre 50 – 70%. A sequência final do gRNA escolhida foi: 5'-GCGATAAAAAGGGCATGTAA-3'.

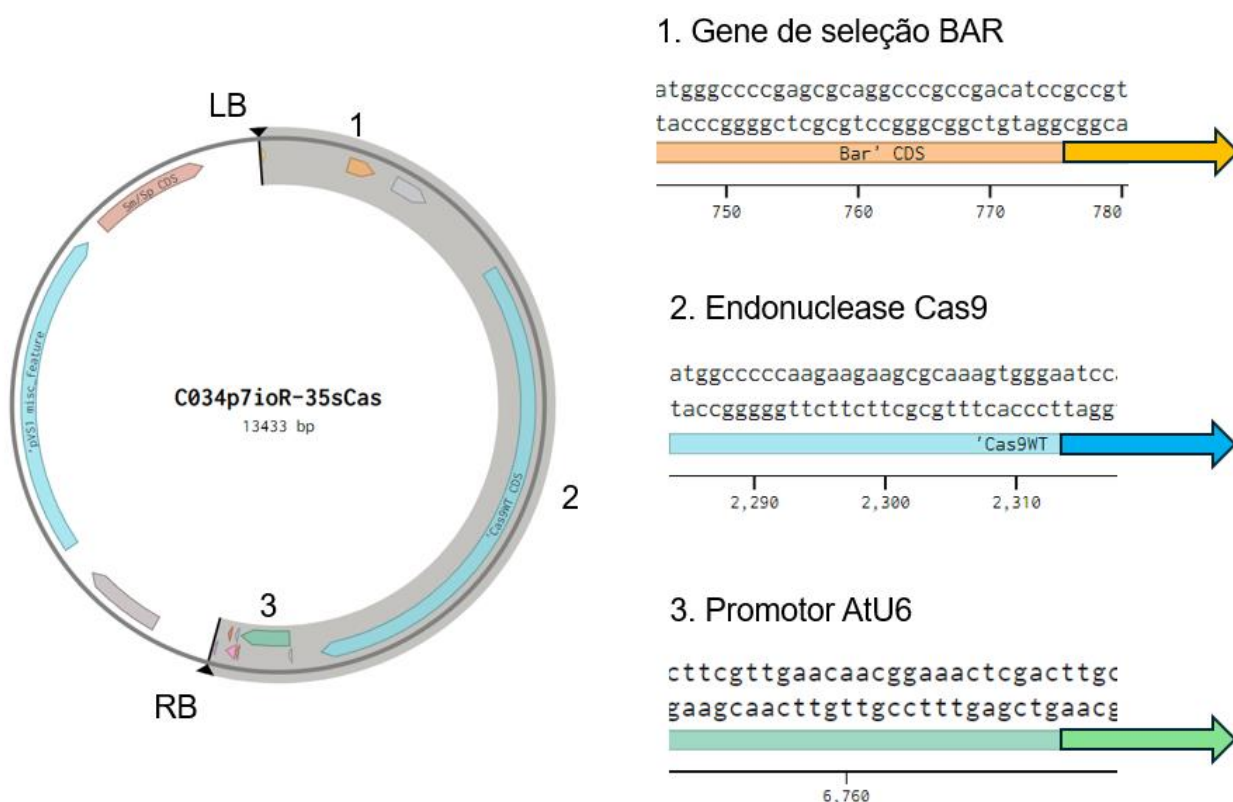
## 4.3 CONSTRUÇÃO GÊNICA

O vetor modular C034p7ioR-35sCas foi desenhado para receber o gRNA (Figura 2). Entre as bordas direita (RB) e esquerda (LB), estão posicionados os elementos necessários para promover a edição. Além disso, o vetor contém a sequência do gene *BAR*, da endonuclease Cas-9 e do promotor *AtU6*, elementos que são essenciais para a expressão da maquinaria de edição. O promotor *AtU6* é responsável pelo controle da transcrição do gRNA. O vetor possui dois sítios *BsmBI*, responsáveis por promover a linearização do vetor para ligação do gRNA (20 bp).

A digestão do vetor, fosforilação do gRNA, anelamento e ligação no vetor digerido foram realizadas de acordo com o protocolo proposto por Shalem et al. (2014). O vetor final foi clonado em células de *Agrobacterium tumefaciens* termocompetentes utilizando o método de choque térmico (Froger & Hall, 2007). As células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* foram preparadas em solução de HEPES (sal sódico) 10mM, CaCl<sub>2</sub> 15 mM, KCL 250 mM e MgCl<sub>2</sub> 55 mM.

Para verificar se o gRNA foi inserido no vetor modular, foi realizado uma PCR utilizando o primer *AtU6* (5'-CCCTGGGAATCTGAAAGAAGAG-3') que faz o anelamento na região do promotor e gRNA como *primer* reverso. Todos os produtos de PCR foram visualizados num gel de agarose a 1,0% e preparados utilizando uma reação de 25 uL, composto por 1x de tampão, 2.0 mmol L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 400 µmol L<sup>-1</sup> dNTP, 0.2 µmol L<sup>-1</sup> para cada primer e 0.01 ul de Taq polimerase. As condições de amplificação foram de desnaturação a 95°C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 95°C por 30 s, anelamento a 55°C por 30 s, extensão a 72°C por 30 s e 72°C por 7 min.

**Figura 2** – Vetor modular C034p7ioR-35sCas, contendo entre as bordas LB e RB o gene de seleção BAR controlado pelo promotor 35S e a maquinaria para edição via CRISPR. A maquinaria é composta pela endonuclease Cas-9 e pelo promotor AtU6 para controle da transcrição do gRNA.

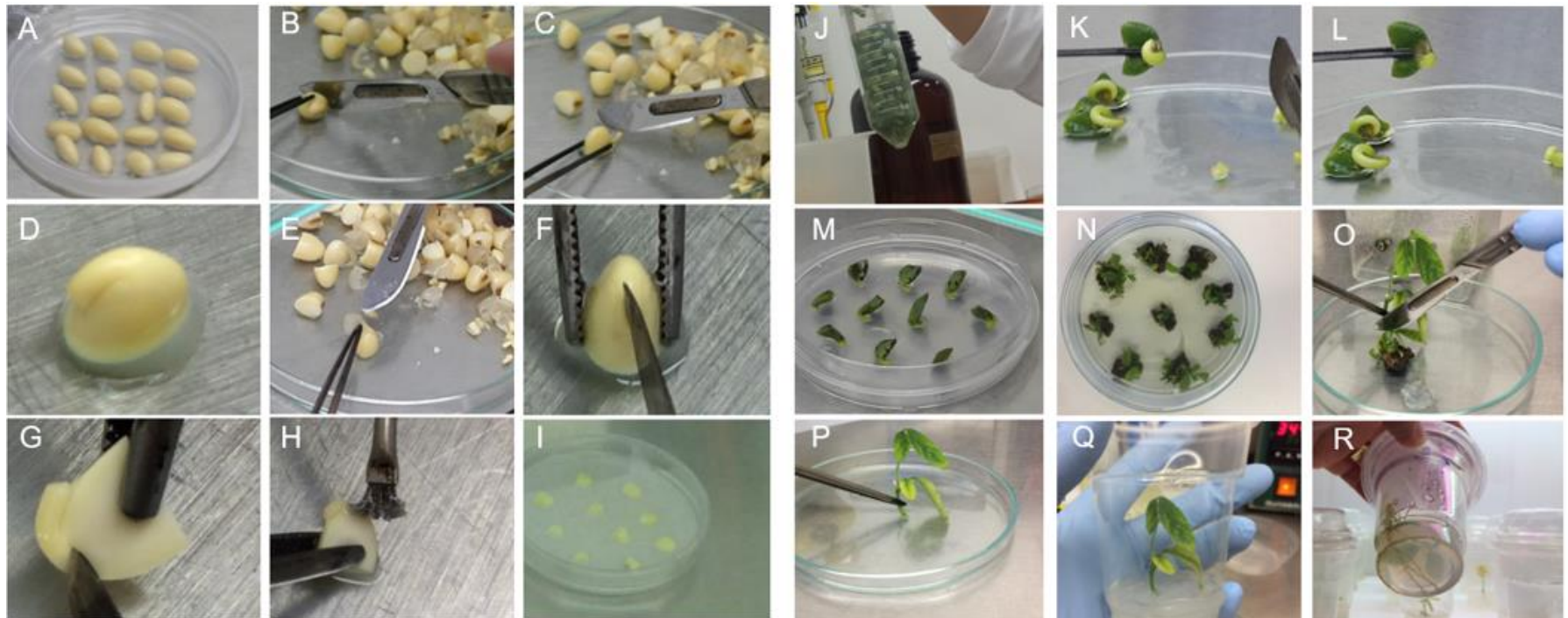


**Fonte:** Autor, 2024.

#### 4.4 TRANSFORMAÇÃO E CULTURA DE TECIDOS

Para a transformação via *Agrobacterium tumefaciens* foi utilizado o método de *half-seed* (do inglês, meia semente), descrito por Paz et al. (2006) e adaptado pela Embrapa Soja (KANAMORI et al., 2017). No protocolo são utilizadas quatro etapas, sendo elas, crescimento de *Agrobacterium tumefaciens* para o co-cultivo, assepsia e germinação das sementes para preparo dos cotilédones, infecção dos explantes, regeneração e seleção de plantas em cultura de tecidos (Figura 3).

**Figura 3** – Processo de infecção dos explantes pelo método de *half seed* e etapas da regeneração e seleção dos explantes. A) Sementes após 16h em Meio de Germinação; B) Corte horizontal das sementes; C) Remoção da ponta da radícula; D) Semente após a remoção da ponta da radícula; E) Retirada do tegumento; F) Abertura dos cotilédones; G) Remoção dos primórdios foliares; H) Realização do ferimento com auxílio de micro escova; I) Transferência dos explantes para o Meio de Co-Cultivo Sólido. J) Lavagem com água destilada; K) Explantes antes do corte do hipocótilo; L) Explantes após o corte do hipocótilo; M) Transferência para placas com Meio de Indução de Multibrotamento 1; N) Explantes em Meio de Alongamento; O) Corte dos brotos; P) Imersão em solução de ácido indolbutírico; Q) Transferência dos brotos para o meio de enraizamento; R) Plantas com desenvolvimento adequado para transferência e aclimação em vasos.



**Fonte:** Kanamori et al., 2017.

#### 4.5 IDENTIFICAÇÃO DE PLANTAS TRANSFORMADAS E CONFIRMAÇÃO DA EDIÇÃO

Para identificação das plantas transformadas, foram utilizados *primers* específicos flanqueando as regiões do gene *Atu6*. Os *primers* utilizados foram 5'-GTCGACGAATTCCTTCGTTGAACAACG-3' (u6-Cloning-F) e 5'-GGTACCGACAAAAAAGCACCGACTC-3' (u6-Cloning-R). Posteriormente, para identificação de plantas editadas, o DNA das plantas transformadas foi extraído, amplificado por PCR convencional e sequenciado pelo método de Sanger (SANGER et al., 1977).

Para identificação de plantas editadas foram utilizados *primers* específicos flanqueando a região do gRNA. As condições para amplificação do DNA pela PCR foram de: desnaturação a 95 °C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 95°C por 30 s, anelamento a 55 °C por 30 s, extensão a 72 °C por 45s e 72 °C por 7 minutos. Para o sequenciamento, o DNA amplificado foi purificado com o Kit da Wizard SV Gel e PCR Clean-Up Sytem (EUA) de acordo com as recomendações do fabricante.

O DNA purificado foi utilizado para o sequenciamento, que foi realizado em sequenciador ABI 3530 DNA Analyzer Applied Biosystems, utilizando o kit de sequenciamento BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Invitrogen, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A análise do sequenciamento foi realizada pelo software Inference of CRISPR Edits (ICE) (Synthego, Red Wood City, CA, USA).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE *KTI*

A família dos genes *KTI* em soja se apresenta em múltiplas cópias sendo os genes expressos em diversos tecidos da soja, incluindo sementes, folhas, caules e raízes. Especificamente, dois genes *KTI* estão localizados no cromossomo (Chr) Chr01, um gene no Chr3, 14 genes no Chr8, 14 genes no Chr9, dois genes no Chr12, um gene no Chr15, oito genes no Chr16, um gene no Chr18 e um gene no Chr19.

A Tabela 2 agrupa os dados para análise de expressão em TPM dos genes da família *KTI*. Com relação ao gene *KTI1* (Glyma.01G095000), verificou-se uma expressão significativa nos cotilédones e sementes (Tabela 2). O maior valor de expressão para o gene *KTI1* foi verificado nas sementes secas do genótipo DM 6563, possuindo 4491 TPM (62F). Outros estudos também encontraram uma expressão significativa do *KTI1* em sementes de soja.

Wang et al. (2023) analisando a expressão via PCR em tempo real de quatro genes *KTI*, verificaram uma expressão significativa de *KTI1* em sementes de soja da variedade Williams 82. Gillman et al. (2015) avaliando 520 acessos de soja para identificar linhas com quantidades reduzidas de inibidores de tripsina e quimiotripsina, encontraram uma alta expressão de *KTI1* em sementes. Além disso, os trabalhos de Moraes et al. (2006), Perez-Maldonado et al. (2003) e Jofuku et al. (1989) também reportaram uma expressão aumentada de *KTI1* em sementes de soja.



**Tabela 2** – Expressão dos genes *KTI* em *TPM*.

| Gene_id                           | 52   | 53   | 54 | 55   | 56 | 57   | 51F  | 53F  | 62F  | 63F  | 81F  | 82F  | Phytozome/Gene atlas                               |
|-----------------------------------|------|------|----|------|----|------|------|------|------|------|------|------|----------------------------------------------------|
| <b>Glyma.01G095000<br/>(KTI1)</b> | 1302 | 1529 | 1  | 1413 | 0  | 986  | 2208 | 1808 | 4491 | 1331 | 2287 | 1852 | <b>Altamente expresso em sementes</b>              |
| Glyma.06G219900                   | 2    | 3    | 0  | 1    | 0  | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | Altamente expresso em folhas                       |
| Glyma.08G341100                   | 6    | 47   | 0  | 11   | 0  | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | Altamente expresso em folhas                       |
| Glyma.08G341300                   | 0    | 0    | 0  | 0    | 0  | 53   | 19   | 11   | 46   | 11   | 36   | 20   | Alto em raízes/folhas/flores/nódulos               |
| Glyma.08G341400                   | 0    | 0    | 0  | 0    | 0  | 81   | 21   | 15   | 137  | 24   | 47   | 43   | Alto em raízes/folhas/flores/nódulos               |
| Glyma.08G341500                   | 1282 | 1364 | 37 | 1316 | 1  | 1019 | 1252 | 968  | 1393 | 408  | 3289 | 2645 | Altamente expresso em sementes                     |
| Glyma.08G341600                   | 67   | 224  | 0  | 46   | 0  | 0    | 2    | 0    | 0    | 0    | 4    | 4    | Altamente expresso em folhas                       |
| Glyma.08G341800                   | 0    | 12   | 0  | 37   | 1  | 165  | 82   | 57   | 499  | 134  | 261  | 217  | Altamente expresso em folhas                       |
| Glyma.08G341900                   | 0    | 0    | 0  | 0    | 0  | 5    | 0    | 0    | 5    | 0    | 7    | 0    | Alto em caule/flor                                 |
| Glyma.08G342000                   | 0    | 8    | 0  | 0    | 0  | 24   | 13   | 6    | 26   | 9    | 4    | 0    | Coexpressão com genes em folhas                    |
| Glyma.08G342100                   | 1    | 11   | 0  | 59   | 0  | 292  | 173  | 147  | 1068 | 317  | 665  | 532  | Coexpressão com genes em folhas                    |
| Glyma.08G342300                   | 701  | 1130 | 2  | 1084 | 0  | 45   | 34   | 13   | 49   | 15   | 15   | 27   | Alto em flor/folha/raiz/semente/espiga/parte aérea |
| Glyma.18G191400                   | 0    | 0    | 0  | 1    | 0  | 3    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | Baixa expressão em sementes/nódulos                |
| Glyma.09G155000                   | 28   | 101  | 0  | 96   | 0  | 40   | 12   | 5    | 77   | 20   | 4    | 3    | Alto em raízes/folhas/flores/caules/polegares      |
| Glyma.16G206300                   | 0    | 2    | 0  | 3    | 0  | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | Alto em vagem/semente                              |

**Fonte:** lucas aqui coloque vc como o autor, os dados do phytozome são apenas os da ultima coluna. Os demais vieram das bibliotecas do laboratório

A redução de inibidores de tripsina é fundamental para melhorar a qualidade nutricional da soja, aumentando a digestão de proteínas. Estes compostos têm efeitos diretos sobre a fisiologia de pragas e herbívoros, impedindo-os de consumir alimentos que contenham inibidores de tripsina. Em estudos realizados com alfafa, os inibidores de tripsina *Msti-94* e *Msti-16* demonstraram possuir o efeito semelhante a um veneno no estômago de pulgões, reduzindo significativamente as taxas de sobrevivência e reprodução dos insetos (ZHAO et al., 2019). Assim, foi observado na literatura que plantas com um número reduzido de inibidores de tripsina são mais suscetíveis ao ataque de patógenos e herbívoros (LI et al., 2008; JUNKER et al., 2012; ARNAIZ et al., 2018; ZHAO et al., 2019; WANG et al., 2023).

No trigo, os inibidores das enzimas tripsina e  $\alpha$ -amilase foram identificados como as principais moléculas de resistência para defesa contra pragas e parasitas (JUNKER et al., 2012). Além disso, os pesquisadores Arnaiz et al. (2018) observaram que o silenciamento dos genes *AtKTI4* e *AtKTI5* aumentaram a suscetibilidade a *Tetranychus urticae* em *Arabidopsis thaliana*. No estudo de Li et al. (2008), o silenciamento do gene *AtKT101* via RNAi aumentou o número de lesões em tecidos foliares após a infiltração da toxina fumonisina B1, responsável por provocar morte celular programada.

Apesar de não terem sido descritos efeitos semelhantes em plantas de soja na literatura, Wang et al. (2023) identificaram que linhagens de soja com *KTI* reduzido possuem maior suscetibilidade a diversos patógenos, incluindo todas as raças de nematoide do cisto (*Heterodera glycines*), *Diaporthe aspalathi*, *Cercospora kukuchii*, vírus da necrose da haste da soja e *Peronospora manshurica*. Esses resultados indicam que os genes *KTI* da soja possuem uma função importante para defesa da planta.

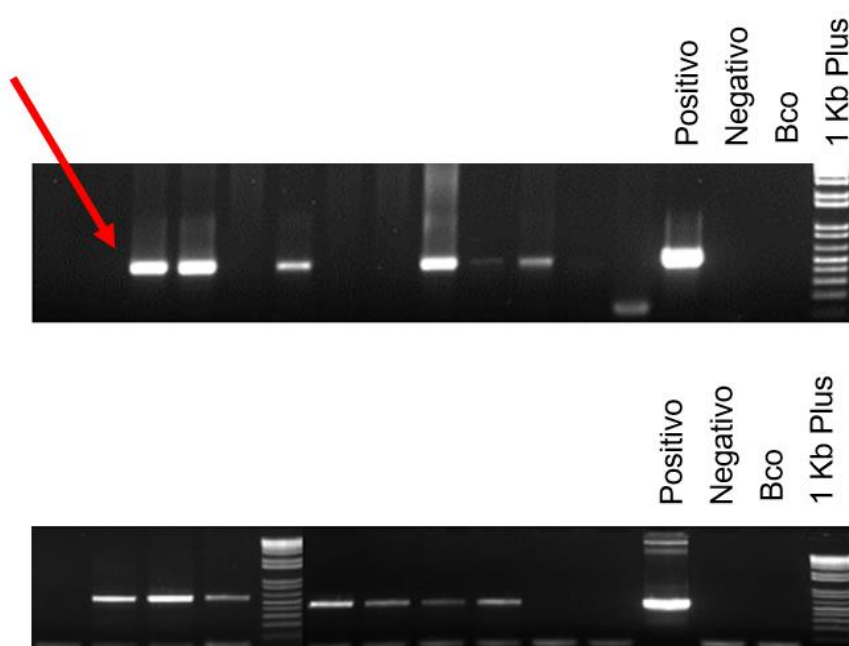
Contudo, considerando que o *KTI1* é expresso exclusivamente nas sementes de soja, o silenciamento deste gene pode não interferir na imunidade da planta em outros tecidos. Portanto, a investigação dos efeitos na defesa em plantas de soja com edição para o gene *KTI1* devem ser realizadas no futuro.

## 5.2 IDENTIFICAÇÃO DE EVENTOS TRANSGÊNICOS

A análise das plantas na geração T0 por meio de PCR convencional indicaram a presença do promotor AtU6, demonstrando que os eventos foram transformados com o vetor de interesse (Figura 4). Neste estudo, foram transformadas 890 sementes de soja utilizando o protocolo de *half-seed* (PAZ et al., 2006). Como resultado, 13 plantas foram identificadas transgênicas, mostrando um avanço significativo com uma eficiência de transformação (ET) de 1.46%. O tamanho do amplicon gerado foi de 564 pb, confirmando a transformação dos eventos.

**Figura 4** – Gel de agarose 1%, utilizando brometo de etídio para visualização do DNA.

A identificação das plantas transgênicas foi realizada por meio de PCR utilizando primers que se ancoram no promotor AtU6. Para auxiliar a visualização dos resultados, foram utilizados três controles. O “Vetor vazio” (vetor com a presença do promotor AtU6 e sem gRNA) foi utilizado como controle positivo, enquanto o “Negativo” e “Bco, ou branco” foram utilizados como controle para ausência de amplicons. As amostras identificadas como positivas foram as plantas nas quais houve amplificação, confirmando a presença



**Fonte:** Autor, 2023.

A eficiência de transformação por *Agrobacterium tumefaciens* para a maioria dos genótipos de soja tem permanecido em geral abaixo de 5% (YAMADA et al., 2012; JIA et al., 2015; LI et al., 2017). Paz et al. (2006) utilizando o método de *half-seed* encontraram uma eficiência média geral de transformação de 3,8%, a qual foi 1,5 vezes maior em comparação com os nós cotiledonares. As primeiras plantas de soja transgênicas foram produzidas pela utilização de nós cotiledonares como fonte de explantes (HINCHEE et al., 1988). Desde então, muitos pesquisadores usaram nós cotiledonares de soja como explantes para transformação via *Agrobacterium tumefaciens* (DI et al., 1996; ZHANG et al., 1999).

Os nós cotiledonares têm uma eficiência de regeneração mais alta do que outros tipos de explantes na soja (KIM et al., 1990; SATO et al., 1993; LIU et al., 2004). No entanto, a taxa de transformação deste método é muito baixa. Em geral, os protocolos de transformação para soja ainda permanecem com baixa eficiência em comparação com outras culturas, como arroz 23% e milho 30–40% (LIN; ZHANG, 2005; GE et al., 2006; ISHIDA et al., 1996; YANG et al., 2006).

Ao todo, grande parte dos estudos têm utilizado variedades modelo de soja, como Jack, Bert e Williams, e outros genótipos específicos devido à sua facilidade de transformação (PAZ et al., 2004, 2006; ZENG et al., 2004; LUTH et al., 2015). Por outro lado, transformações de soja com alta ET foram relatadas utilizando genótipos específicos. Por exemplo, foi obtido uma eficiência de transformação de 23,1% com a variedade Zhonghuang13 e uma média de 14% para o genótipo DS-9712 (ZHANG et al., 2014; HADA et al., 2018).

Todavia, a transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* com alta eficiência foi alcançada em apenas um número limitado de linhagens elite (ZHANG et al., 2014; ARUN et al., 2015; LI et al., 2017; CHEN et al., 2018). A transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* é o método mais utilizado para produção de soja transgênica devido diversos motivos, incluindo a sua operação simples, alta reprodutibilidade e baixo custo experimental. Além do protocolo de *half-seed*, diversos tipos de tecido podem ser usados como explantes, como nós foliares primários, epicótilos e hipocótilos, embriões imaturos e gemas axilares (XU et al., 2020; XU et al., 2022).

A soja transgênica cobre 50% da área global de cultivos transgênicos, ocupando 94,1 milhões de hectares, e por isso desempenha um papel importante na

produção de soja em todo o mundo (NANDULA, 2019). Em conjunto com a técnica de transgenia, a edição do genoma de soja mediada por CRISPR/Cas9 tem sido utilizada para silenciar genes envolvidos em diversas características, como a altura da planta, desenvolvimento de nós, caules e flores (JIA et al., 2015; XU et al., 2022). Diversas plantas com características alteradas foram obtidas, demonstrando o potencial dessa tecnologia para aprimoramento de características das culturas (XU et al., 2020).

Neste trabalho, apesar da aplicação bem-sucedida da técnica de *half-seed* para gerar mutantes de soja, o atual protocolo de transformação mediado por *Agrobacterium tumefaciens* permanece dependente do genótipo. Essa limitação dificulta a adoção generalizada da técnica CRISPR/Cas9 em programas de melhoramento de soja. Na literatura, diversos motivos foram atribuídos para explicar a dificuldade em obter plantas transgênicas de soja, em especial a recalcitrância dos genótipos e a existência de quimeras são fatores importantes (XU et al., 2022).

A suscetibilidade dos genótipos de soja para infecção via *Agrobacterium tumefaciens* é um fator chave para aumentar a eficiência de transformação genética (SONG et al., 2013; PAREDDY et al., 2020). Jia et al. (2015) avaliando os genótipos Williams 82, Shennong 9 e Bert verificaram uma alta eficiência de transformação e melhor suscetibilidade à infecção por *Agrobacterium tumefaciens*, enquanto os genótipos General, Liaodou 16 e Kottman apresentaram uma suscetibilidade relativamente fraca e baixa ET.

Plantas quimeras são formadas pela infecção parcial de *Agrobacterium tumefaciens*, resultando na incorporação do T-DNA em apenas algumas células (XU et al., 2022). Posteriormente, as células não transformadas possuem o potencial para gerar brotos que não expressam as características introduzidas pelo T-DNA. O quimerismo na transformação é responsável pela não transmissão dos transgenes para gerações subsequentes, seja completamente ou em uma proporção menor do que o esperado pela genética mendeliana (PAREDDY et al., 2020).

Portanto, minimizar o quimerismo é necessário para aumentar a eficiência de transformação em genótipos de soja. Melhorias para reduzir escapes ou taxa quimérica foram feitas pela utilização de agentes de seleção, como os genes BAR e AHAS, responsáveis por conferir resistência aos herbicidas glufosinato de amônio e imazapir, respectivamente (ARAGÃO et al., 2000; RECH et al., 2008; WANG et al., 2023).

### 5.3 IDENTIFICAÇÃO DE PLANTAS EDITADAS.

A Figura 5 apresenta a frequência de edição (*indels*, inserções ou deleções de bases) e o escore de knockout (*knockout-score*) das linhas transformadas em T0. As frequências de edição variaram significativamente entre as amostras, indo de 14% a 95%. A amostra 8AC40-1 teve a maior frequência de edição, com 95% e um escore de knockout significativo de 76. A amostra 15AC37-3 apresentou a menor frequência de edição, com 14% e um escore de knockout de 14.

Outros estudos também reportaram uma alta variação na frequência de edição utilizando CRISPR/Cas9 em genótipos de soja. Lu e Tian. (2022) encontraram uma variação de 3-100% na eficiência de edição para o gene que sintetiza para a enzima *Phytoene Desaturase* (PDS) em plantas de soja. Cai et al., (2018), observaram uma variação de 35.7-72.2% na eficiência de edição utilizando CRISPR/Cas9 em plantas de soja transgênicas geradas em T0.

**Figura 5** – Frequência de edição (*indels*) e Knockout-score das linhas geradas em T0.



Fonte: Autor, 2023.

Ao todo, a utilização do sistema CRISPR/Cas para edição genômica em plantas tem sido eficaz no desenvolvimento de variedades geneticamente melhoradas. Diversas características foram modificadas por essa tecnologia, incluindo resistência a doenças, tolerância a estresses abióticos e o aumento da produtividade agrícola (WANG et al., 2014; MA et al., 2015). Além disso, diversas espécies de plantas também foram melhoradas pelo uso de CRISPR/Cas9, como arroz, algodão, tomate, milho e trigo (ZHOU et al., 2014; WANG et al., 2017; GAO et al., 2017; RODRÍGUEZ-LEAL et al., 2017; QI et al., 2016; ČERMÁK; CURTIN, 2017).

Neste estudo, o sistema CRISPR/Cas9 foi utilizado para induzir mutações no gene *KT11* via NHEJ resultando na obtenção de 9 plantas editadas com diferentes frequências de edição. Considerando que o mecanismo NHEJ atua como mecanismo de reparo do DNA, podendo causar mutações do tipo inserções ou deleções no sítio de clivagem (SATHEESH et al., 2019) a produção de inibidor de tripsina oriundo do gene *KT11* pode ter sido interrompida. A expressão dos genes no local onde houve

reparo por NHEJ podem ser parcialmente ou totalmente interrompidas, e as proteínas codificadas podem não ser funcionais (MARRAFFINI, 2015; ANZALONE et al., 2020).

Essas linhas editadas são promissoras para serem utilizadas no avanço de geração visando a obtenção de mutantes em homozigose e OGM-free, os quais possuem potencial para apresentar reduzida atividade antinutricional.



## 6 CONCLUSÃO

Com o uso da técnica de transformação via *Agrobacterium tumefaciens*, foi possível obter construções gênicas que integraram com sucesso a maquinaria CRISPR/Cas e o gRNA para o gene *KT11* em uma cultivar elite de soja, resultando na obtenção de 13 plantas transgênicas.

Das 13 plantas transgênicas obtidas, 9 apresentaram uma alta frequência de edição no gene *KT11*. Entre essas, a linha 8AC40-1, por apresentar alta frequência de edição, foi selecionada para o avanço de geração com o objetivo de desenvolver plantas homozigotas que sejam livres de OGM e com níveis reduzidos do fator antinutricional *KT11*.

A utilização da tecnologia CRISPR/Cas associada a *Agrobacterium tumefaciens* para a edição do gene *KT11* na soja, mostrou ser uma abordagem promissora, para tornar a soja mais nutritiva e adequada para o consumo humano e animal.

## REFERÊNCIAS

ABIOVE - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ÓLEOS VEGETAIS. **Estatísticas**. 2023. Disponível em: <https://abiove.org.br/estatistica/>. Acesso em 25 mar. 2024.

ABPA - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Estatísticas: Desempenho de Produção**. In: Central de inteligência de aves e suínos. Embrapa Suínos e Aves. 2022. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas>>. Acesso em: 09 mai. 2024.

ABPA - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Estatísticas setoriais**. 2023. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas>>. Acesso em: 13 abril. 2024.

ALIU, E.; LEE, L.; WANG, K. CRISPR RNA-guided integrase enables high-efficiency targeted genome engineering in *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Biotechnology Journal**, v. 20, p. 1916-1927, 2022.

ANZALONE, A. V.; KOBLAN, L. W.; LIU, D. R. Genome editing with CRISPR–Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. **Nature Biotechnology**, v. 38, n. 7, p. 824–844, 2020. DOI: 10.1038/s41587-020-0561-9.

APROSOJA BRASIL – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS TRABALHADORES DE SOJA. **A soja**. Disponível em: <https://aprosojabrasil.com.br/a-soja/>. Acesso em: 15 nov. 2013.

ARAGÃO, F. J. L.; SAROKIN, L.; VIANNA, G. R.; RECH, E. L. Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] plants at a high frequency. **Theor. Appl. Genet**, v. 101, p. 1–6, 2000. doi: 10.1007/s001220051441

ARMOUR, J. C.; PERERA, R. L. C.; BUCHAN, W. C.; GRANT, G. Protease inhibitors and lectins in soya beans and effects of aqueous heat-treatment. **Journal of Science Food and Agriculture**, v. 78, p. 225–231, 1998.

ARNAIZ, A., TALAVERA-MATEO, L., GONZALEZ-MELENDI, P., MARTINEZ, M., DIAZ, I., SANTAMARIA, M. E. Arabidopsis kunitz trypsin inhibitors in defense against spider mites. **Front. Plant Sci**, v. 9, p. 986, 2018. doi: 10.3389/fpls.2018.00986

ARUN, M., SUBRAMANYAM, K., MARIASHIBU, T. S., THEBORAL, J., SHIVANANDHAN, G., MANICKAVASAGAM, M., GANAPATHI, A. Application of sonication in combination with vacuum infiltration enhances the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in Indian soybean cultivars. **Appl. Biochem. Biotechnol**, v. 175, p. 2266–2287, 2015. doi: 10.1007/s12010-014-1360-x

BACHLAVA, E., R. E. DEWEY, J. W. BURTON, AND A. J. Mapping candidate genes for oleate biosynthesis and their association with unsaturated fatty acid seed content in soybean. **Molecular Breeding**, v. 23, p. 337-347, 2009.

BAKER, K. M.; KIM, B.G.; STEIN, H.H. 2010. Amino acid digestibility in conventional, high protein, or low oligosaccharide varieties of full-fat soybeans and in soybean meal by weanling pigs. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v. 162, p. 66-73, 2010.

BALTES, N. J.; GIL-HUMANES, J.; VOYTAS, D. F. Genome engineering and agriculture: opportunities and challenges. In: WEEKS, D. P.; YANG, B. (Ed.). **Gene editing in plants**. San Diego: Elsevier, 2017. p. 1–26.

BENEVIDES, C. M. J.; SOUZA, M. V.; SOUZA, R. D. B.; LOPES, M. V. Fatores antinutricionais em alimentos: revisão. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 18, n. 2, p. 67-79, 2011.

BIRK, Y. Purification and some properties of a highly active inhibitor of trypsin and  $\alpha$ -chymotrypsin from soybeans. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 54, p. 378-381, 1961.

BORÉM, A.; MIRANDA, G. V; NETO, R. F. Melhoramento de Plantas. **São Paulo: Oficina de textos**, 8 ed., 2021.

BOWMAN, D. E. Fractions derived from soy beans and navy beans which retard tryptic digestion of casein. **Exp. Biol. Med.**, v. 57, p. 139-140, 1944.

BRASIL. **Lei nº 9.456, de 25 de abril de 1997**. Institui a Lei de Proteção de Cultivares e dá outras providências. Brasília: Congresso Nacional, 1997.

BRASIL. **Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005**. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2004-2006/2005/Lei/L11105.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2005/Lei/L11105.htm). Acesso em 14 fev. 2024.

BRASIL. **Resolução Normativa nº 16, de 15 de janeiro de 2018**. Disponível em: [https://ctnbio.mctic.gov.br/resolucoes-normativas/asset\\_publisher/OgW431Rs9dQ6/content/resolucao-normativa-n%C2%BA-16-de-15-de-janeiro-de-2018](https://ctnbio.mctic.gov.br/resolucoes-normativas/asset_publisher/OgW431Rs9dQ6/content/resolucao-normativa-n%C2%BA-16-de-15-de-janeiro-de-2018). Acesso em 20 fev. 2024.

BRITO, C.O.; ALBINO, L. F. T.; ROSTAGNO, H. S.; GOMES, P. C.; DIONIZIO, M. A.; CARVALHO, D. C. Adição de complexo multienzimático em dietas à base de soja extrusada e desempenho de pintos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, p.457-461, 2006.

BURNS, R. A. Protease inhibitor in processed plant foods. **Journal of Food Protection**, Des Moines, Iowa, v. 50, n. 2, p. 161-165, 1987.

BUTOLO, J. E. **Qualidade de ingredientes na alimentação animal**. Campinas, SP, 2002. 430p.

CÂMARA, M. A.; NODARI, R. O.; GUILAM, M. C. R. Regulamentação sobre bio(in)segurança no Brasil: a questão dos alimentos transgênicos. **Revista Internacional Interdisciplinar INTERthesis**, Santa Catarina, v. 10, n. 1, p. 261-286, 2013.

CAFÉ M. B.; SAKOMURA, N. K.; JUNQUEIRA O.M.; CARVALHO, M.R.B.; DEL BIANCHI, M. Determinação do Valor Nutricional das Sojas Integrais Processadas para Aves. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.2 n.1, 2000.

CAI, Y.; CHEN, L.; SUN, S.; WU, C.; YAO, W.; JIANG, B.; HAN, T.; HOU, W. CRISPR/Cas9-Mediated Deletion of Large Genomic Fragments in Soybean. **International Journal of Molecular Sciences**, v.19, p.3835, 2018.

CARNEIRO, M. A. A.; FERNANDES, G. W. Herbivoria. **Ciência Hoje**, v. 20, n. 118, p. 35-39, 1996.

CARRÃO-PANIZZI, M. C.; PIPOLO, A.; MANDARINO J. M. G.; ARANTES N. E. Breeding specialty soybean cultivars for processing and value-added utilization at Embrapa in Brazil. In: **WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE**, 8., 2009, Beijing. Abstracts. Beijing: 2009. p. 1-4. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/34299/1/id30102.pdf>. Acesso em: 23 novembro 2023.

ČERMÁK, T.; CURTIN, S.J. Design and assembly of CRISPR/Cas9 reagents for gene knockout, targeted insertion, and replacement in wheat. **Methods in Molecular Biology**, v.1679, p.187-212, 2017.

CHANG, C. J.; TANKSLEY, T. D.; KNABE, D. A.; JR.; ZEBROWSKA, T. Effects of different heat treatments during processing on nutrient digestibility of soybean meal in growing swine. **J. Anim. Sci.**, v. 65, p. 1273-1282, 1987. DOI: 10.2527/jas1987.6551273x.

CHEN, L., CAI, Y., LIU, X., GUO, C., SUN, S., WU, C.; JIANG, B.; HAN, T.; HOU, W. Soybean hairy roots produced in vitro by Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation. **Crop J.** v. 6, p. 162–171, 2018. doi: 10.1016/j.cj.2017.08.006

CHEN, Y.; XU, Z.; ZHANG, C.; KONG, X.; HUA, Y. Heat-induced inactivation mechanisms of kunitz trypsin inhibitor and bowman-birk inhibitor in soymilk processing. **Food Chem.**, v. 154, p. 108–116, 2014. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.12.092.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Boletim da safra de grãos: 12º levantamento - safra 2022/23**. 2023. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agrutanras/graos/boletim-da-safra-de-graos>. Acesso em: 23 dezembro 2023.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Séries Históricas das Safras**. 2022. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/serie-historica-das-safras>. Acesso em 23 jan. 2023.

COOK, D. A.; JENSEN, A. H.; FRALEY, J. R.; HYMOWITZ, T. Utilization by growing and finishing pigs of raw soybeans of low kunitz trypsin i utante r content. **J. Anim. Sci.**, v. 66, p. 1686–1691, 1988. DOI: 10.2527/jas1988.6671686x

COSTA, N. L.; SANTANA, A. C. Estudo da concentração de mercado ao longo da cadeia produtiva da soja no Brasil. **Revista de Estudos Sociais**, UFMT, v. 16, p. 111, 2014.

COSTA, N. M. B.; ROSA, C. D. O. B. **Alimentos funcionais: componentes bioativos e efeitos fisiológicos**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2010.

CROMWELL, G. L.; STAHLY, T. S.; MONEGUE, H. J. Amino acid supplementation of meat meal in lysine-fortified, corn-based diets for growing-finish ing pigs. **Journal of Animal Science**, v. 69, p. 4898–4906, 1991. DOI: 10.2527/1991.69124898x

DALL'AGNOL, A. A. **Embrapa Soja no contexto do desenvolvimento da soja no Brasil: histórico e contribuições**. Brasília: Embrapa, 2016.

DAS, T. K.; BANERJEE, D.; CHAKRABORTY, D.; PAKHIRA, M. C.; SHRIVASTAVA, B.; KUHAD, R. C. Saponin: role in animal system. **Veterinary World**, v. 5, n. 4, p. 248-254, 2012.

DI PIETRO, C. M.; LIENER, I. E. Heat inactivation of the Kunitz and Bowman-Birk soybean protease inhibitors. **J. Agric. Food Chem.**, v. 37, p. 39-44, 1989.

DI, R.; PURCELL, V.; COLLINS, G. B.; GHABRIAL, S. A. Production of transgenic soybean lines expressing the bean pod mottle virus coat protein precursor gene. **Plant Cell Rep**, v. 15, p. 746–750, 1996. doi: 10.1007/BF00232220

DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science**, v. 346, n. 6213, p. 1077-1086, 2014.

ENTINE, JON; LEMA, MARTÍN A.; WHELAN, ANGUS I.; WEIYI, CHEN; STEIN, ALAN J. Regulatory approaches for genome edited agricultural plants in select countries and jurisdictions around the world. **Transgenic Research**, v. 30, n. 3, p. 551-584, 2021.

EMBRAPA. **O agronegócio da soja nos contextos mundial e brasileiro**. Londrina: Embrapa Soja, 2014.

EMBRAPA. **Transgenia: quebrando barreiras em prol da agropecuária brasileira**, 2018. Disponível em: <https://www.Embrapa.br/tema-transgenicos/sobre-o-tema>. Acesso em: 20 jan. 2023.

FENG, Z.; ZHANG, B.; DING, W.; LIU, X.; YANG, D. L.; WEI, P.; CAO, F.; ZHU, S.; ZHANG, F.; MAO, Y.; ZHU, J. K. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. **Cell Research**, v. 23, p. 1229-1232, 2013.

FROGER, A.; HALL, J. E. Transformation of plasmid DNA into E. coli using the heat shock method. **Journal of Visualized Experiments**, v.6, e253, 2007. DOI: <https://doi.org/10.3791/253>

GAO, G. The future of CRISPR technologies in agriculture. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.19, p. 275–276, 2018.

GAO, W.; LONG, L.; TIAN, X.; XU, F.; LIU, J.; SINGH, P.K.; BOTELLA, J.R.; SONG, C. Genome editing in cotton with the CRISPR/Cas9 system. **Frontiers in Plant Science**, v.8, p.1364, 2017.

GATICA-ARIAS, A. The regulatory current status of plant breeding technologies in some Latin American and the Caribbean countries. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 141, p. 1-14, 2020.

GAVIOLI, A. P. R.; NUNES, J. S. A soja transgênica no Brasil e suas influências à saúde e ao meio ambiente. **Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente**, v. 6, n. 2, p. 1-16, 2015.

GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Atividade inibitória de tripsina em produtos derivados de soja (Glycine Max) consumidos no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 3, p. 309-312, 1998.

GE, X.; CHU, Z.; LIN, Y.; WANG, S. A tissue culture system for different germplasms of indica rice. **Plant Cell Rep**, v. 25, p.392–402, 2006. doi: 10.1007/s00299-005-0100-7

GILLMAN, J. D.; KIM, W. S.; KRISHNAN, H. B. Identification of a new soybean Kunitz trypsin inhibitor mutation and its effect on Bowman-Birk protease inhibitor content in soybean seed. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 1352–1359, 2015. DOI: 10.1021/jf505220p.

GODOY, S.; CHICCO, C.; MESCHY, F.; REQUENA, F. Phytic phosphorus and phytase activity of animal feed ingredients. **Interciência**, v. 30, p. 24-28, 2005.

GOEL, G.; MAKKAR, H. P. Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins. **Tropical Animal Health and Production**, v. 44, n. 4, p. 729-739, 2012.

GRANT, G. Anti-nutritional effects of soybean: a review. **Progress in Food and Nutrition Science**, v. 13, n. 3/4, p. 317-348, 1989.

HADA, A.; KRISHNAN, V.; MOHAMED JAABIR, M. S.; KUMARI, A.; JOLLY, M.; PRAVEEN, S.; SACHDEV, A. Improved Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of soybean [Glycine max (L.) Merr.] following optimization of culture conditions and mechanical techniques. **In Vitro Cell. Dev. Pl**, v. 54, p. 672–688, 2018. doi: 10.1007/s11627-018-9944-8

HAITAO, Z.; YONGPING, F.; PIWU, W. Construction of RNAi expression vector of Kunitz trypsin inhibitor gene from soybean. **Soybean Science**, v. 29, n. 5, p. 742-746, 2010.

HARLAN, J.R. **Crops and man**. Madison, Winsconsin: ASA, CSS of Am., 1975. 295p.

HENKEL, J. Soy. Health claims for soy protein, questions about other components. **FDA Consum.**, v. 34, p. 18 – 20, 2000.

HESS, H. D.; KREUZER, M.; DÍAZ, T. E.; LASCANO, C. E.; CARULLA, J. E.; SOLIVA, C. R.; MACHMÜLLER, A. Saponin rich tropical fruits affect fermentation and

methanogenesis in faunated and defaunated rumen fluid. **Animal Feed Science and Technology**, v. 109, n. 1–4, p. 79–94, 2003. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0377-8401\(03\)00212-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0377-8401(03)00212-8).

HINCHEE, M. A. W.; CONNOR-WARD, D. V.; NEWELL, C. A.; MCDONNELL, R. E.; SATO, S. J.; GASSER, C. S.; CHARLES S.; FISCHHOFF, D. A.; RE, D. B.; FRALEY, R. T.; HORSCH, R. B. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. **Biotechnology** v. 6, p. 915–922, 1988. doi: 10.1038/nbt0888-915

HUANG, T. K.; PUCHTA, H. CRISPR/Cas-mediated gene targeting in plants: finally a turn for the better for homologous recombination. **Plant Cell Rep**, v.38, p. 443–453, 2019.

HYMOWITZ, T. Genetics and breeding of soybeans lacking the kunitz trypsin inhibitor. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 199, p. 291–298, 1986. DOI: 10.1007/978-1-4757-0022-0\_18.

ISHIDA, Y.; SAITO, H.; OHTA, S.; HIEI, Y.; KOMARI, T.; KUMASHIRO, T. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Nat. Biotechnol**, v. 14, p. 745–750, 1996. doi: 10.1038/nbt0696-745

JACKSON, D. A., SYMONS, R. H., & BERG, P. Biochemical Method for Inserting New Genetic Information into DNA of Simian Virus 40: Circular SV40 DNA Molecules Containing Lambda Phage Genes and the Galactose Operon of *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 69, n. 10, p. 2904–2909, 1972.

JANG, G.; JOUNG, Y. H. CRISPR/Cas-mediated genome editing for crop improvement: current applications and future prospects. **Plant Biotechnology Reports**, v.13, p.1–10, 2019.

JANSING, J.; SCHIERMEYER, A.; SCHILLBERG, S.; FISCHER, R.; BORTESI, L. Genome editing in agriculture: technical and practical considerations. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 12, p. 1–33, 2019. DOI: 10.3390/ijms20122888.

JIA, Y.; YAO, X.; ZHAO, M.; ZHAO, Q.; DU, Y.; YU, C.; XIE, F. Comparison of soybean transformation efficiency and plant factors affecting transformation during the *Agrobacterium* infection process. **Int. J. Mol. Sci**, v. 16, p. 18522–18543, 2015. doi: 10.3390/ijms160818522

JINEK, M.; CHYLINSKI, K.; FONFARA, I.; HAUER, M.; DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. **Science**, v. 337, n. 6096, p. 816–821, 2012. DOI: 10.1126/science.1225829.

JOFUKU, K. D.; SCHIPPER, R. D.; GOLDEBERG, R. B. A frameshift mutation prevents kunitz trypsin inhibitor mRNA accumulation in soybean embryos. **Plant Cell**, v. 1, p. 567, 1989. DOI: 10.1105/tpc.1.4.427.

JONES, S.I.; VODKIN, L.O. Using RNA-Seq to profile soybean seed development from fertilization to maturity. **PLoS ONE**, 8, e59270, 2013

JUNKER, Y.; ZEISSIG, S.; KIM, S. J.; BARISANI, D.; WIESER, H.; LEFFLER, D. A.; ZEVALLOS, V.; LIBERMANN, T.A.; DILLON, S.; FREITAG, T. L.; KELLY, C. P.; SCHUPPAN, D. Wheat amylase trypsin inhibitors drive intestinal inflammation via activation of toll-like receptor 4. **J. Exp. Med**, v. 209, p. 2395–2408, 2012. doi: 10.1084/jem.20102660

KAFER, J. M.; MOLINARI, M. D. C.; HENNING, F. A.; KOLTUN, A.; MARQUES, V. V.; MARIN, S. R. R.; NEPOMUCENO, A. L.; MERTZ-HENNING, L. M. Transcriptional Profile of Soybean Seeds with Contrasting Seed Coat Color. **Plants**, v. 12, p. 1555, 2023.

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***. Circular Tecnica 128, 2017. ISSN: 2176-2864

KARR-LILIENTHAL L. K.; GRIESHOP C. M.; SPEARS K. K.; FAHEY J. G. C. Amino acid, carbohydrate, and fat composition of soybean meals prepared at 55 commercial U.S. soybean processing plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, v. 53, n. 6, p. 2146-2150, 2005.

KIM, J. H.; LAMOTTE, C. E.; HACK, E. Plant regeneration in vitro from primary leaf nodes of soybean (*Glycine max*) seedlings. **J. Plant Physiol**, v. 136, p. 664–669, 1990. doi: 10.1016/S0176-1617(11)81341-6

KRISHNAN, H. B. Characterization of a soybean [*Glycine max* (L. utante.) mutant with reduced levels of Kunitz trypsin inhibitor. **Plant Science**, v. 160, p. 979–986, 2001.

KUDEŁKA, W.; KOWALSKA, M.; POPIS, M. Quality of soybean products in terms of essential amino acids composition. **Molecules**, [S.l.], v. 26, n. 16, p. 5071, 2021.

KUMAR, V.; SINHA, A. K.; MAKKAR, H. P. S.; DE BOECK, G.; BECKER, K. Phytate and phytase in fish nutrition. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 96, n. 3, p. 335-364, 2012.

KUNITZ, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor II. General properties. **Journal of General Physiology**, v. 30, p. 291-310, 1947.

KUNITZ, M. Crystallization of a trypsin inhibitor from soybean. **Science**, v. 101, p. 668 – 669, 1945.

LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I.; PRYME, I. F.; DALE, T. M. Beneficial (Antiproliferative) Effects of Different Substances In: MUZQUIZ, M. et al. (eds.) Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds and oilseeds. Wageningen. **Wageningen Academic**, 2004. p. 123-135.



LEE, S. W. Current status on the modification of the scope for GMO regulation on the gene edited plants with no remnants of inserted foreign DNA fragments. **J Plant Biotechnol**, v. 46, p. 137-142, 2019.

LI, J.; BRADER, G.; PALVA, E. T. Kunitz trypsin inhibitor: an antagonist of cell death triggered by phytopathogens and fumonisin b1 in arabidopsis. **Mol. Plant**, v. 1, 482–495, 2008. doi: 10.1093/mp/ssn013

LI, S.; CONG, Y.; LIU, Y.; WANG, T.; SHUAI, Q.; CHEN, N.; GAI, J.; LI, Y. Optimization of Agrobacterium-mediated transformation in soybean. **Front. Plant Sci**, v. 8, p. 246, 2017. doi: 10.3389/fpls.2017.00246

LIENER, I. E. Effects of processing on antinutritional factors in legumes: the soybean case. **Archivos Latinoamericanos Nutricion**, v. 44, p. 48S–54S, 1996.

LIENER, I. E. Implication of antinutritional compounds in soybean foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Philadelphia, v. 34, p. 31-67, 1994.

LIENER, I. E. Non-nutritive factors and bioactive compounds in soy. In: SOCIETY FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY AND MEDICINE. Soy in animal nutrition. **Savoy**: 2000. p. 13-45.

LIMA JÚNIOR, D. M.; MONTEIRO, P. B. S.; RANGEL, A. H. N.; MACIEL, M. V.; OLIVEIRA, S. E. O.; FREIRE, D. A. Fatores anti-nutricionais para ruminantes. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.3, n.4, p.132-143, 2010.

LIMA, C. B.; COSTA, F. G. P.; LUDKE, J. V.; DE LIMA JÚNIOR, D. M.; DEALBUQUERQUE MARIZ, T. M.; PEREIRA, A. A.; DE ALMEIDA, A. C. A. Fatores antinutricionais e processamento do grão de soja para alimentação animal. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 10, n. 4, p. 24-33, 2014.

LIN, Y. J.; ZHANG, Q. Optimising the tissue culture conditions for high efficiency transformation of indica rice. **Plant Cell Rep**, v. 23, p. 540–547, 2005. doi: 10.1007/s00299-004-0843-6

LIU, H. K.; YANG, C.; WEI, Z. M. Efficient Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of soybeans using an embryonic tip regeneration system. **Planta**, v. 219, p. 1042–1049, 2004. doi: 10.1007/s00425-004-1310-x

LOBATO, A. S.; CARVALHO, D. R.; SILVA, M. A.; BRITO, M. S. S. **A formação histórico-territorial do Mato Grosso, as Transformações e impactos decorrentes da expansão da soja**. Revista Para Onde?!, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 1-20, 2010.

LU, Q. S. M.; TIAN, L. An efficient and specific CRISPR-Cas9 genome editing system targeting soybean phytoene desaturase genes. **BMC Biotechnology**, v. 22, p.7, 2022.

LUTH, D.; WARNBERG, K.; WANG, K. Soybean [Glycine max (L.) merr]. **Methods Mol. Biol**, v. 1223, p. 275–284, 2015. doi: 10.1007/978-1-4939-1695-5\_22

MA, X.; ZHANG, Q.; ZHU, Q.; LIU, W.; CHEN, Y.; QIU, R.; WANG, B.; YANG, Z.; LI, H.; LIN, Y.; XIE, Y.; SHEN, R.; CHEN, S.; WANG, Z.; CHEN, Y.; GUO, J.; CHEN, L.; ZHAO, X.; DONG, Z.; LIU, Y-G. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. **Molecular plant**, v. 8, n. 8, p. 1274-1284, 2015.

MAENZ, D. D.; IRISH, G. G.; CLASSEN, H. L. Carbohydrate-binding and agglutinating lectins in raw and processed soybean meals. **Animal Feed Science and Technology**, v. 76, n. 3-4, p. 335-343, 1999.

MATTOS, E. C.; ATUI, M. B.; SILVA, A. M.; FERREIRA, A. R.; NOGUEIRA, M. D.; SOARES, J. S.; MARCIANO, M. A. M. Estudo da identidade histológica de subprodutos de soja (*Glycine max* L.). **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 74, n. 2, p. 104-110, 2015.

MARRAFFINI, L. A. CRISPR-Cas immunity in prokaryotes. **Nature**, v. 526, n. 7571, p. 55–61, 2015. DOI: 10.1038/nature15386.

MCCOUCH, S.; BAUTE, G. J.; BRADEEN, J.; BRAMEL, P.; BRETTING, P. K.; BUCKLER, E.; BURKE, J. M.; CHAREST, D.; CLOUTIER, S.; COLE, G.; DEMPEWOLF, H.; DINGKUHN, M.; FEUILLET, C.; GEPTS, P.; GRATTAPAGLIA, D.; GUARINO, L.; JACKSON, S.; KNAPP, S.; LANGRIDGE, P.; LAWTON-RAUH, A.; LIJUA, Q.; LUSTY, C.; MICHAEL, T.; MYLES, S.; NAITO, K.; NELSON, R. L.; PONTAROLLO, R.; RICHARDS, C. M.; RIESEBERG, L.; ROSS-IBARRA, J.; ROUNSLEY, S.; HAMILTON, R. S.; SCHURR, U.; STEIN, N.; TOMOOKA, N.; VAN DER KNAAP, E.; VAN TASSEL, D.; TOLL, J.; VALLS, J.; VARSHNEY, R. K.; WARD, J.; WAUGH, R.; WENZL, P.; ZAMIR, D. Feeding the future. **Nature**, v. 499, n. 7456, p. 23–24, 2013. DOI: 10.1038/499023a.

MOLINARI, H. B. C.; VIEIRA, L. R.; SILVA, N. V.; PRADO, G. S.; LOPES FILHO, J. H. **Tecnologia CRISPR na edição genômica de plantas: biotecnologia aplicada à agricultura**. 1. ed. Brasília: Embrapa Agroenergia, 2020.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAUJO, E.; AMORIM, E. L. C. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

MORAES, R. M. A.; SOARES, T. C. B.; COLOMBO, L. R.; SALLA, M. F. S.; BARROS, J. G. A.; PIOVESAN, N. D.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Assisted selection by specific DNA markers for genetic elimination of the kunitz trypsin inhibitor and lectin in soybean seeds. **Euphytica**, v. 149, p. 221, 2006.

NAITO, Y.; HINO, K.; BONO, H.; UI-TEI, K. CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites. **Bioinformatics**, v.31, p.1120-1123, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu743>

NANDULA, V. K. Herbicide resistance traits in maize and soybean: current status and future outlook. **Plants**, v. 8, p. 377, 2019. doi: 10.3390/plants8090337

NUNES, R.V.; ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; GOMES, P. C.; TOLEDO, R. S. Composição bromatológica, energia metabolizável e equações de predição da energia

do grão e de subprodutos do trigo para pintos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.3, p.785-793, 2001

ODANI, S.; IKENAKA, T. Studies on soybean trypsin inhibitors: X. Isolation and partial characterization of four soybean double-headed proteinase inhibitors. **J. Biochem.**, v. 82, p. 1513-1522, 1977.

PALACIOS, M. F.; EASTER, R. A.; SOLTWEDEL, K. T.; PARSONS, C. M.; DOUGLAS, M. W.; HYMOWITZ, T.; PETTIGREW, J. E. Effect of soybean variety and processing on growth performance of young chicks and pigs. **J. Anim. Sci.**, v. 82, p. 1108 – 1114, 2004.

PAREDDY, D., CHENNAREDDY, S., ANTHONY, G., SARDESAI, N., MALL, T., MINNICKS, T.; KARPOVA, O.; CLARK, L.; GRIFFIN, D.; BISHOP, B.; SHUMWAY, N.; PON SAMUEL, P.; SMITH, K.; SARRIA, R. Improved soybean transformation for efficient and high throughput transgenic production. **Transgenic Res**, v. 29, p. 267–281, 2020. doi: 10.1007/s11248-020-00198-8

PARSONS, C. M.; YHANG, Y.; ARABA, M. Nutritional evaluation of soybean meals varying in oligosaccharide content. **Poultry Science**, v. 79, p. 1127-1131, 2000.

PAZ, M. M.; MARTINEZ, J. C.; KALVIG, A. B.; FONGER, T. M.; WANG, K. Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation. **Plant Cell Report**, v. 25, p. 206-213, 2006.

PAZ, M. M.; SHOU, H.; GUO, Z.; ZHANG, Z.; BANERJEE, A. K.; WANG, K. Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant. **Euphytica**, v. 136, p. 167–179, 2004 doi: 10.1023/B:EUPH.0000030669.75809.dc

PEREZ-MALDONADO, R. A.; MANNION, P. F.; FARRELL, D. J. Effects of heat treatment on the nutritional value of raw soybean selected for low trypsin inhibitor activity. **Br. Poult. Sci.** v. 44, p. 299 – 308, 2003.

PICKAR-OLIVER, A.; GERSBACH, C. A. The next generation of CRISPR–Cas technologies and applications. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 20, p. 490–507, 2019. DOI: 10.1038/s41580-019-0131-5

PURUGGANAN, M. D.; FULLER, D. Q. The nature of selection during plant domestication. **Nature**, v.457, n. 7231, p. 843–848, 2009. DOI: 10.1038/nature07895.

PUSZTAI, A.; GRANT, G.; BARDOCZ, S.; BAINTENER, K.; GELENCSEI, E.; EWEN SWB. Both free and complexed trypsin inhibitors stimulate pancreatic secretion and change duodenal enzyme levels. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, **Bethesda**, v. 35, p. G340-G350, 1997.

QI, W.; ZHU, T.; TIAN, Z.; LI, C.; ZHANG, W.; SONG, R. High-efficiency CRISPR/Cas9 multiplex gene editing using the glycine tRNA-processing system-based strategy in maize. **BMC Biotechnology**, v.16, p.58, 2016.

QUE, Q.; CHILTON, M. D. M.; DE FONTES, C. M.; HE, C.; NUCCIO, M.; ZHU, T.; WU, Y.; CHEN, J. S.; SHI, L. Trait stacking in transgenic crops: challenges and opportunities. **GM Crops**, v. 1, n. 4, p. 220–229, 2010. DOI: 10.4161/gmcr.1.4.13439.

RECH, E. L.; VIANNA, G. R.; ARAGAO, F. J. High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants. **Nat. Protoc**, v. 3, p. 410–418, 2008. doi: 10.1038/nprot.2008.9

REDDY, N. R.; PIERSON, M. D.; SATHE, S. K.; SALUNKLE, D. K. Phytates in cereals and legumes. **C R C Press**, 159p, 1989.

REIFSCHNEIDER, F. J. B.; HENZ, G. P.; RAGASSI, C. F.; ANJOS, U. G. dos; FERRAZ, R. M. **Novos ângulos da história da agricultura no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/868764/novos-angulos-da-historia-da-agricultura-no-brasil>. Acesso em: 24 jan. 2023.

RODRÍGUEZ-LEAL, D.; LEMMON, Z.H.; MAN, J.; BARTLETT, M.E.; LIPPMAN, Z.B. Engineering Quantitative Trait Variation for Crop Improvement by Genome Editing. **Cell**, v.171, p.470-480, 2017.

RODRIGUES, P. B.; ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L. F. T.; GOMES, P. C.; NUNES, R. V.; TOLEDO, R. S. Valores Energéticos da Soja e Subprodutos da Soja, Determinados com Frangos de Corte e Galos Adultos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.31, n.4, p.1771-1782, 2002.

RODRIGUES, S.D.; KARIMI, M.; IMPENS, L.; VAN LERBERGE, E.; COUSSENS, G.; AESAERT, S.; ROMBAUT, D.; HOLTAPPELS, D.; IBRAHIM, H.M.M.; VAN MONTAGU, M.; WAGEMANS, J.; JACOBS, T. B.; CONINCK, B.; PAUWELS, L. Efficient CRISPR-mediated base editing in *Agrobacterium* spp. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 118, p. 1–8, 2021.

ROSSO, M. L.; SHANG, C.; SONG, Q.; ESCAMILLA, D.; GILLENWATER, J.; ZHANG, B. Development of breeder-friendly KASP markers for low concentration of kunitz trypsin inhibitor in soybean seeds. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 22, n. 5, p. 2675, 2021. DOI: 10.3390/ijms22052675.

ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L.; GOMES, P. C.; OLIVEIRA, R. F.; LOPES, D. C.; FERREIRA, A. S.; BARRETO, S. L. T.; EUCLIDES, R. F. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais** 3.ed. Viçosa: Editora UFV, 2011.

ROYCHAUDHURI, R.; SARATH, G.; ZEECE, M.; MARKWELL, J. Reversible denaturation of soybean Kunitz trypsin inhibitor. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s.l.], v. 412, p. 20–26, 2003.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.74, p.5463-5467, 1977. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>.

SATHEESH, V.; ZHANG, H.; WANG, X.; LEI, M. Precise editing of plant genomes – prospects and challenges. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 96, p. 115–123, 2019. DOI: 10.1016/j.semcdb.2019.04.010.

SATO, S.; NEWELL, C.; KOLACZ, K.; TREDO, L.; FINER, J.; HINCHEE, M. Stable transformation via particle bombardment in two different soybean regeneration systems. **Plant Cell Rep.** v. 12, p. 408–413, 1993. doi: 10.1007/bf00234702

SCHMUTZ, J.; CANNON, S. B.; SCHLUETER, J.; MA, J.; MITROS, T.; NELSON, W.; HYTEN, D. L.; SONG, Q.; THELEN, J. J.; CHENG, J.; XU, D.; HELLSTEN, U.; MAY, G. D.; YU, Y.; SAKURAI, T.; UMEZAWA, T.; BHATTACHARYYA, M. K.; SANDHU, D.; VALLIYODAN, B.; LINDQUIST, E.; PETO, M.; GRANT, D.; SHU, S.; GOODSTEIN, D.; BARRY, K.; FUTRELL-GRIGGS, M.; ABERNATHY, B.; DU, J.; TIAN, Z.; ZHU, L.; GILL, N.; JOSHI, T.; LIBAULT, M.; SETHURAMAN, A.; ZHANG, X.-C.; SHINOZAKI, K.; NGUYEN, H. T.; WING, R. A.; CREGAN, P.; SPECHT, J.; GRIMWOOD, J.; ROKHSAR, D.; STACEY, G.; SHOEMAKER, R. C.; JACKSON, S. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. **Nature**, [s.l.], v. 463, p. 178–183, 2010. DOI: 10.1038/nature08670.

SEDIYAMA, T.; TEIXEIRA, R. C.; BARROS, H. B. **Origem, evolução e importância econômica.** In: SEDIYAMA, T. (Ed.). Tecnologias de produção e usos da soja. Londrina: Mecenias, p. 1-5, 2009.

SHALEM, O.; SANJANA, N.E.; HARTENIAN, E.; SHI, X.; SCOTT, D.A.; MIKKELSEN, T.S.; HECKL, D.; EBERT, B.L.; ROOT, D.E.; DOENCH, J.G.; ZHANG, F. Genome-scale CRISPRCas9 knockout screening in human cells. **Science**, v.343, p.84-87, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1247005>.

SHARMA, S.; KAUR, M.; GOYAL, R.; GILL, B.S. Physical characteristics and nutritional composition of some new soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) genotypes. **Journal of Food Science and Technology**, v.51, p.551-557, 2014.

SHIMOYAMADA, M.; KUDO, S.; OKUBO, K.; YAMAUCHI, F.; HARADA, K. Distributions of saponin constituents in some varieties of soybean plant. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 54, n. 1, p. 77-81, 1990.

SILVA, F.; BORÉM, A.; SEDIYAMA, T. C.; MARA, G. **Soja: do plantio à colheita.** 2. ed. Viçosa: UFV, 2022.

SILVA, M. R.; SILVA, M. A. A. P. d. Aspectos nutricionais de fitatos e taninos. **Revista de Nutrição**, p. 122-132, 1999.

SMIRICKY, M. R.; GRIESHOP, C. M.; ALBIN, D. M.; WUBBEN, J. E.; GABERT, V. M.; FAHEY Jr, G. C. The influence of soy oligosaccharides on apparent and true ileal amino acid digestibilities and fecal consistency in growing pigs. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 2433-2441, 2002.

SNOW, J. L.; BAKER, D. H.; PARSONS, C. M. Phytase, citric acid, and 1 $\alpha$ -hydroxycholecalciferol improve phytate phosphorus utilization in chicks fed a corn-soybean meal diet. **Poultry Science**, v. 83, n. 7, p. 1187-1192, 2004.

SONG, B.; MENG, L.S.; LI, B.; WANG, P.W.; FU, Y.P. Construction and transformation of seed-specific expression RNAi vector of Kunitz trypsin inhibitor gene from soybean. **Chinese Journal of Oil Crop Sciences**, [s.l.], v. 39, n. 3, p. 315, 2017. DOI: 10.7505/j.issn.1007-9084.2017.03.004.

SOUZA, C. G.; MOURA, A. K. B.; SILVA, J. N. P.; SOARES, K. O.; SILVA, J. V. C.; VASCONCELOS, P. C. Fatores anti-nutricionais de importância na nutrição animal: composição e função dos compostos secundários. **Pubvet**, v. 13, n. 5, p. 1-19, 2019. <http://dx.doi.org/10.31533/pubvet.v13n5a327.1-19>.

STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; TOLEDO, M. V.; PORTZ, R. L.; PASCHOLATI, S. F. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 10, n. 1, p. 18-46, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1818/sap.v10i1.5268>.

USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Oilseeds: World Market and Trade**. 2022. Disponível em: <https://www.fas.usda.gov/data/oilseeds-world-markets-and-trade>. Acesso em 24 jan. 2023.

WANG, Z.; SHEA, Z.; ROSSO, L.; SHANG, C.; LI, J.; BEWICK, P.; LI, Q.; ZHAO, B.; ZHANG, B. Development of new mutant alleles and markers for *KT11* and *KT13* via CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis to reduce trypsin inhibitor content and activity in soybean seeds. **Front Plant Sci**, v. 14, p. 1111680, 2023. DOI: 10.3389/fpls.2023.1111680.

WANG, Y.; GENG, L.; YUAN, M.; WEI, J.; JIN, C.; LI, M.; YU, K.; ZHANG, Y.; JIN, H.; WANG, E.; CHAI, Z.; FU, X.; LI, X. Deletion of a target gene in Indica rice via CRISPR/Cas9. **Plant Cell Reports**, v.36, p.1333-1343, 2017.

WHELAN, A. I.; LEMA, M. A. A research program for the socioeconomic impacts of gene editing regulation. **GM Crops & Food**, v. 8, n. 1, p. 74-83, 2017.

WEI, C. H. Crystallization of two cubic forms of soybean trypsin inhibitor e-I, a member of the Bowman-Birk inhibitor family. **Journal of Biological Chemistry**, v. 258, p. 9357–9359, 1983.

WIEDENHEFT, B.; STERNBERG, S. H.; DOUDNA, J. A. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. **Nature**, v. 482, n. 7385, p. 331–338, 2012. DOI: 10.1038/nature10886.

XIE, K.; YANG, Y. RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. **Molecular Plant**, v. 6, n. 6, p. 1975–1983, Nov. 2013.

XU, H.; GUO, Y.; QIU, L.; RAN, Y. Progress in Soybean Genetic Transformation Over the Last Decade. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 1-14, 2022. DOI: 10.3389/fpls.2022.900318.

XU, H.; ZHANG, L.; ZHANG, K.; RAN, Y. Progresses, challenges, and prospects of genome editing in soybean (*Glycine max*). **Frontiers in Plant Science**, v. 11, art. 571138, p. 1-14, 2020. DOI: 10.3389/fpls.2020.571138.

YAMADA, T.; TAKAGI, K.; ISHIMOTO, M. Recent advances in soybean transformation and their application to molecular breeding and genomic analysis. **Breed. Sci**, v. 61, p. 480–494, 2012. doi: 10.1270/jsbbs.61.480

YANG, A.; HE, C.; ZHANG, K. Improvement of *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic calluses from maize elite inbred lines. **In Vitro Cell Dev. Biol. Plant**, v. 42, p. 215–219, 2006. doi: 10.1079/IVP2006768

ZENG, P.; VADNAIS, D. A.; ZHANG, Z.; POLACCO, J. C. Refined glufosinate selection in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. **Plant Cell Rep.** v. 22, p. 478–482, 2004. doi: 10.1007/s00299-003-0712-8

ZHANG, F.; CHEN, C.; GE, H.; LIU, J.; LUO, Y.; LIU, K.; CHEN, L.; XU, K.; ZHANG, Y.; TAN, G.; LI, C. Efficient soybean regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation using a whole cotyledonary node as an explant. **Biotech. App. Biochem**, v. 61, p. 620–625, 2014. doi: 10.1002/bab.1207

ZHANG, Q.; ZHANG, Y.; LU, M. H.; CHAI, Y. P.; JIANG, Y. Y.; ZHOU, Y.; WANG, X.C.; CHEN, Q. J. A novel ternary vector system united with morphogenic genes enhances CRISPR/Cas delivery in maize. **Plant Physiology**, v. 181, n. 4, p. 1441–1448, 2019b. DOI: 10.1104/pp.19.00767.

ZHANG, S.; ZHANG, R.; SONG, G.; GAO, J.; LI, W. HAN, X.; CHEN, M.; LI, Y.; LI, G. Targeted mutagenesis using the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated CRISPR-Cas9 system in common wheat. **BMC Plant Biol**, v. 18, p. 308, 2018. DOI: 10.1186/s12870-018-1496-x

ZHANG, Y.; MALZAHN, A.A.; SRETENOVIC, S.; YIPING, QI. The emerging and uncultivated potential of CRISPR technology in plant science. **Nat. Plants**, v. 5, p. 778–794, 2019. DOI: 10.1038/s41477-019-0461-5

ZHANG, Z. Y.; XING, A. Q.; STASWICK, P.; CLEMENTE, T. E. The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean. **Plant Cell Tiss Org**, v. 56, p. 37–46, 1999. doi: 10.1023/A:1006298622969

ZHAO, H.; ULLAH, H.; MCNEILL, M. R.; DU, G.; HAO, K.; TU, X.; ZHANG, Z.. Inhibitory effects of plant trypsin inhibitors Msti-94 and Msti-16 on *Therioaphis trifolii* (Monell) (Homoptera: Aphididae) in alfalfa. **Insects**, v. 10, n. 154, p. 1-18, 2019. DOI: 10.3390/insects10060154.

ZHOU, H.; LIU, B.; WEEKS, D.P.; SPALDING, M.H.; YANG, B. Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice. **Nucleic Acids Res**, v.42, p.10903-10914, 2014.