



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Biologia Celular

Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas - Biologia Molecular

NÁTTANY SOUZA COSTA

**PIRAMIDAÇÃO DE ESTRATÉGIAS BIOTECNOLÓGICAS PARA O CONTROLE
DE *Meloidogyne incognita* NA CULTURA DA SOJA**

BRASÍLIA, DF

2025



Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas - Biologia Molecular

NÁTTANY SOUZA COSTA

**PIRAMIDAÇÃO DE ESTRATÉGIAS BIOTECNOLÓGICAS PARA O CONTROLE
DE *Meloidogyne incognita* NA CULTURA DA SOJA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre.

Orientadora: Dra. Maria Fátima Grossi-de-Sa

BRASÍLIA, DF

2025

AGRADECIMENTOS

À minha família. À minha mãe Andréia, por todo amor, apoio incondicional, companheirismo e por nunca ter medido esforços para que eu pudesse ir atrás dos meus sonhos. Seus empenhos foram essenciais para a minha jornada. Ao meu pai, Igor, por despertar em mim, desde a infância, o gosto pela ciência. Seus ensinamentos e incentivos foram fundamentais para minha trajetória. À minha irmã, Marjory, pelo companheirismo constante, por iluminar meus dias com sua alegria e por me inspirar a sempre ser uma pessoa melhor. Ao meu namorado e companheiro de vida, Luis, por estar sempre ao meu lado e por acreditar em mim mais do que eu mesma.

À minha orientadora, Dra. Fátima Grossi, pela confiança depositada em mim e pela oportunidade de integrar seu grupo de pesquisa, um ambiente rico em oportunidades e composto por mentes brilhantes.

À Dra. Carolina Morgante, por todo conhecimento compartilhado e por abrir as portas do Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga (LIMPP) para mim.

À Dra. Nayara Sabrina pela incrível contribuição para com esse projeto, pela amizade, paciência e disposição em me ensinar desde os primeiros experimentos e protocolos com os quais tive contato no LIMPP.

Aos membros da banca. Ao Dr. Marcio Alves, Dr. Elibio Rech e Dra. Isabela Tessutti por aceitarem contribuir com este trabalho e com minha formação.

Aos colegas de laboratório, Raíre Cavalcante, Lorena Loiola, Luanna Pinheiro, Thuanne Ribeiro, Maria Eugênia e Daniele Pinheiro pelas contribuições com os experimentos aqui realizados.

A todos os meus amigos do LIMPP, por tornarem meus dias mais leves e divertidos, por sempre torcerem por mim e por estarem dispostos a me ajudar sempre que precisei.

À minha amiga, Sara, por dividir o mesmo neurônio comigo, por estar sempre ao meu lado e me fazer sentir especial a cada instante.

A todos os colegas de trabalho do LIMPP, pelo acolhimento e pela valiosa contribuição para a minha formação acadêmica.

À Universidade de Brasília, pela oportunidade de aprimorar minhas habilidades acadêmicas e científicas em um ambiente tão intelectualmente e culturalmente enriquecedor.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pela estrutura de ponta disponibilizada para a execução deste projeto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

“Em algum lugar, algo incrível está esperando
para ser descoberto” Carl Sagan.

RESUMO

A soja é um dos principais produtos agrícolas do mundo e desempenha um papel fundamental na economia agrícola brasileira. No entanto, apesar de estar em constante expansão, sua produção enfrenta desafios, sobretudo o parasitismo por nematoides formadores de galhas (NFG) do gênero *Meloidogyne*. O gênero é composto por endoparasitas obrigatórios que invadem as raízes das plantas hospedeiras para estabelecer um sítio de alimentação. Esse processo resulta na formação de galhas, constituídas por aglomerados celulares, que dificultam a absorção eficiente de água e nutrientes pela planta parasitada, causando prejuízos ao seu desenvolvimento e produtividade. As metodologias tradicionais de controle dos NFG, incluindo rotação de culturas, uso de nematicidas químicos, controle biológico e emprego de cultivares moderadamente resistentes, não são eficazes, resultando em prejuízos anuais de bilhões de dólares em todo o mundo. Dessa forma, o desenvolvimento de estratégias biotecnológicas para incorporar novas fontes de resistência em cultivares elite apresenta grande potencial. Diante disso, este estudo teve como objetivo a aplicação conjunta de duas abordagens biotecnológicas para o controle do NFG *Meloidogyne incognita* na soja: (1) a superexpressão do gene *AdEXLB8*, relacionado à tolerância das plantas aos nematoides; e (2) o silenciamento gênico induzido pelo hospedeiro (SGIH), por meio de RNAi, tendo como alvos genes fundamentais para a sobrevivência ou infecção do NFG, incluindo aqueles responsáveis pela codificação de *cisteína protease*, *isocitrato liase*, *fator de splicing* e o efector *16D10*. Plantas de soja geneticamente transformadas (GM) foram obtidas e genotipadas para a presença e expressão de transgenes por PCR e por ensaios imunoenzimáticos (ELISA). Na geração T2, plantas de três eventos independentes de transformação foram desafiadas a *M. incognita* em bioensaio em casa de vegetação. Sessenta dias após a inoculação, as plantas GM apresentaram reduções médias significativas no número de galhas por grama de raiz (28,6%), nas massas de ovos por grama de raiz (48,6%), no número de ovos por grama de raiz (59,4%) e no fator de reprodução (FR) estimado do nematoide (43,4%), em relação às plantas não transformadas (NT). A expressão de *AdEXLB8* em raízes de plantas GM dos três eventos de transformação analisados foi elevada e ausentes nas plantas NT. Análises histológicas das galhas revelaram sítios de alimentação com desenvolvimento prejudicado naquelas provenientes de raízes transgênicas em detrimento das NT. Portanto, os dados indicam que a piramidação das estratégias biotecnológicas empregadas neste estudo foi eficaz na redução da suscetibilidade da soja a *M. incognita*, além de promover práticas agrícolas mais sustentáveis e com menor dependência de defensivos químicos no manejo de NFG.

Palavras-chave: Nematoides formadores de galhas; *Glycine max*; Transgenia; Superexpressão gênica; RNA interferente.

ABSTRACT

Soybean is one of the world's major agricultural commodities and plays a crucial role in Brazil's agricultural economy. However, despite its continuous expansion, soybean production faces significant challenges, particularly parasitism by root-knot nematodes (RKN) of the *Meloidogyne* genus. This genus comprises obligate endoparasites that invade the roots of host plants to establish a feeding site. This process leads to the formation of galls, consisting of cellular clusters, which impair the efficient absorption of water and nutrients by the parasitized plant, ultimately affecting its development and productivity. Traditional RKN control methods, including crop rotation, chemical nematicides, biological control, and the use of moderately resistant cultivars, have shown limited effectiveness, resulting in annual global economic losses amounting to billions of dollars. Therefore, the development of biotechnological strategies to incorporate novel resistance sources into elite cultivars presents significant potential. In this context, the present study aimed to evaluate the combined application of two biotechnological approaches for controlling *Meloidogyne incognita* in soybean: (1) overexpression of the *AdEXLB8* gene, associated with plant tolerance to nematodes; and (2) host-induced gene silencing (HIGS) via RNA interference (RNAi), targeting essential genes for RKN survival or infection, including those encoding cysteine protease, isocitrate lyase, splicing factor, and the 16D10 effector. Genetically modified (GM) soybean plants were generated and genotyped for transgene presence and expression using PCR and enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). In the T2 generation, plants from three independent transformation events were challenged with *M. incognita* in a greenhouse bioassay. Sixty days post-inoculation, GM plants exhibited significant reductions in key parasitism indicators compared to non-transformed (NT) plants, including a 28.6% decrease in the number of galls per gram of root, a 48.6% reduction in egg masses per gram of root, a 59.4% decrease in the number of eggs per gram of root, and a 43.4% reduction in the estimated nematode reproduction factor (RF). Furthermore, *AdEXLB8* expression was elevated in the roots of GM plants across all three transformation events analyzed, while absent in NT plants. Histological analyses of galls revealed impaired feeding site development in transgenic roots compared to NT roots. Thus, the data indicate that the pyramiding of biotechnological strategies employed in this study was effective in reducing soybean susceptibility to *M. incognita*, while also promoting more sustainable agricultural practices with reduced reliance on chemical nematicides for RKN management.

Keywords: Root-knot nematodes; *Glycine max*; Transgenics; Gene overexpression, RNA interference.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
2.1 NEMATOIDES FITOPARASITAS E SEUS IMPACTOS NA AGRICULTURA	12
2.2 MECANISMOS DE PARASITISMO DE <i>Meloidogyne spp.</i> E MÉTODOS DE CONTROLE	13
2.3 BIOTECNOLOGIA NO MELHORAMENTO DE CULTIVARES.....	18
2.4 SILENCIAMENTO GÊNICO INDUZIDO PELO HOSPEDEIRO VIA RNA INTERFERENTE	20
2.5 EXPANSINAS.....	25
3 HIPÓTESE	26
4 OBJETIVOS.....	27
4.1 OBJETIVO GERAL	27
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
5.1 CONSTRUÇÃO DO CASSETE DE EXPRESSÃO.....	27
5.2 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE SOJA.....	28
5.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE PLANTAS GENETICAMENTE TRANSFORMADAS	28
5.4 DESAFIO DAS PLANTAS TRANSGÊNICAS AO NEMATOIDE <i>Meloidogyne</i> <i>incognita</i>	30
5.5 ANÁLISE DE EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE <i>AdEXLB8</i>	31
5.6 ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS GALHAS.....	31
6 RESULTADOS	32
6.1 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE SOJA.....	32
6.2 REDUÇÃO DA SUSCETIBILIDADE DE PLANTAS GM à <i>M. incognita</i>	35
6.3 SUPEREXPRESSÃO DE <i>AdEXLB8</i> EM RAÍZES DE PLANTAS TRANSGÊNICAS	36
6.4 ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM GALHAS DAS LINHAGENS DE SOJA GM	37
7 DISCUSSÃO	38
8 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	44
REFERÊNCIAS	45
9 MATERIAL SUPLEMENTAR	59

1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merr.), originária da China (Guo *et al.*, 2010), é um dos produtos agrícolas mais importantes do mundo, destacando-se como valiosa fonte de proteína tanto para o consumo humano quanto para a produção de ração de alta qualidade para animais (Hartman; West; Herman, 2011; Hamawaki *et al.*, 2019). No Brasil, a sua produção é um dos pilares da economia agrícola. Em 2022, o país se consolidou como o maior produtor e exportador mundial de soja e alcançou em 2024 a produção de 147 milhões de toneladas (CONAB, 2024; FAO, 2022). Além de seu impacto econômico, o cultivo da soja é vital para segurança alimentar mundial (Hartman; West; Herman, 2011). Apesar de estar em constante expansão, a produção de soja enfrenta desafios e um que se destaca é o parasitismo por fitonematoides, que compromete a produtividade das lavouras e exige soluções agrícolas inovadoras para manter o crescimento sustentável da produção (Lima *et al.*, 2017; Vieira-Filho, 2024). Esses nematoides parasitas de plantas (NPP) são responsáveis por perdas econômicas significativas na agricultura, podendo reduzir a produtividade anual em até 12% e gerar prejuízos de bilhões de dólares (Nicol *et al.*, 2011; Bernard; Egnin; Bonsi, 2017). Entre os principais nematoides responsáveis por esses danos, sobressaem os nematoides formadores de galhas (NFG), do gênero *Meloidogyne*, os quais foram considerados o grupo mais significativo de nematoides fitopatogênicos na patologia molecular (Jones *et al.*, 2013). *Meloidogyne incognita* é uma das espécies do gênero mais citada, provocando prejuízos consideráveis em diversas culturas de grande importância econômica (Abad *et al.*, 2008). Os juvenis pré-parasitários (ppJ2) de *Meloidogyne spp.* invadem as raízes de seus hospedeiros inicialmente pela zona de alongamento e migram intercelularmente até a ponta da raiz. Posteriormente, penetram no cilindro vascular, onde estabelecem seu local de alimentação (Vieira; Engler; Almeida-Engler, 2013). Ali, selecionam de quatro a oito células vivas do tecido vascular da raiz, nas quais injetam suas secreções que transformam células vegetais em células gigantes (CG) de alimentação que fornecerão os nutrientes necessários para o desenvolvimento do nematoide (Quentin; Abad; Favery, 2013). Essas CG são caracterizadas por mudanças fisiológicas e morfológicas. Tornam-se hipertrofiadas e multinucleadas devido a múltiplos ciclos de divisão mitótica, sem citocinese (Almeida-Engler *et al.*, 1999). O resultado é a formação de galhas, que impedem uma absorção eficiente de água e de nutrientes pelas raízes de plantas parasitadas e consequentemente reduz o crescimento e a produtividade (Melakeberhan, 1987; Lu *et al.*, 2014).

Abordagens de manejo têm sido adotadas para mitigar os danos provocados por esses parasitas obrigatórios. Metodologias como rotação de culturas, uso de nematicidas químicos, controle biológico e plantio de cultivares resistentes têm sido amplamente aplicadas. No entanto, poucas delas conseguem contornar de maneira eficaz essa ameaça (Desaeger; Dickson; Locascio, 2017). No contexto da soja, uma das culturas mais afetadas por fitonematoides, essas abordagens tornam-se ainda mais cruciais, dado o impacto econômico substancial da leguminosa (Lima *et al.*, 2017).

Nesse sentido, a engenharia genética de plantas se apresenta como uma alternativa promissora no combate aos nematoides por meio do desenvolvimento de genótipos vegetais menos suscetíveis. A superexpressão *in planta* de genes de resistência tem sido amplamente empregada na pesquisa de melhoramento vegetal com o objetivo de contornar os efeitos de estresses bióticos e abióticos (Brasileiro *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2022; Basso *et al.*, 2023; Araújo *et al.*, 2024). Genes pertencentes à família das expansinas têm destaque como potenciais alvos para o aumento da resistência em cultivares. Estudos recentes evidenciaram que a regulação da expressão dos genes dessa família pode desempenhar um papel importante no fortalecimento das defesas das plantas contra patógenos, incluindo nematoides (Guimarães *et al.*, 2017a, b; Basso *et al.*, 2023). Além disso, essa modulação também pode contribuir para aumentar a tolerância das plantas a condições adversas, como seca e salinidade (Cosgrove, 2015; Brasileiro *et al.*, 2021). Entre os genes da subfamília expansina-like B (*EXLB*), o *AdEXLB8* destaca-se por sua expressão altamente específica e responsiva a múltiplos estresses (Guimarães *et al.*, 2017a). A superexpressão desse gene em raízes pilosas (*hairy roots*) de soja e de amendoim resultou em uma redução significativa na formação de galhas de *M. javanica* e *M. arenaria*, respectivamente, reforçando seu potencial como ferramenta molecular para o melhoramento genético de culturas mais tolerantes a NFG (Guimarães *et al.*, 2017a, b).

O silenciamento gênico induzido pelo hospedeiro (SGIH) via RNAi de genes essenciais à sobrevivência ou ao parasitismo de fitonematoides tem sido estudado de forma abrangente e aplicado no desenvolvimento de plantas mais tolerantes a esses parasitas (Banerjee *et al.*, 2017; Lisei-de-Sá *et al.*, 2021; Kumar *et al.*, 2022; Moreira *et al.*, 2024). Souza-Júnior *et al.* (2013) ao estudarem o impacto do *knockdown* de três proteases — uma aspártica (*Mi-ASP-1*), uma serina (*Mi-SER-1*) e uma cisteína (*Mi-CPL-1*) — em *M. incognita* via SGIH, demonstraram que essas proteínas desempenham papéis importantes em diferentes processos de desenvolvimento do nematoide, como na alimentação, na embriogênese e na reprodução. Além disso, o SGIH de *Mi-CPL-1*, por si só, reduziu significativamente a capacidade de parasitismo de *M. incognita* em plantas de tomate, resultando em uma diminuição de 60–80% nos níveis de infecção e

reprodução do parasita (Shingles *et al.*, 2007; Dutta *et al.*, 2015). Esses estudos ressaltam como o metabolismo desempenha um papel central no parasitismo de *M. incognita*, com proteases e vias metabólicas específicas influenciando processos críticos do parasitismo. Nesse âmbito, a via do glioxilato surge como outro componente essencial. Nessa via, nematoides utilizam lipídios armazenados para gerar energia, especialmente em períodos de escassez ou nos estágios iniciais do parasitismo. Esse processo envolve as enzimas malato sintase (MS) e isocitrato liase (ICL) (Wadsworth e Riddle, 1989). Com o intuito de entender melhor o papel da ICL no parasitismo de *M. incognita*, foi analisada a supressão do gene por meio de SGIH em plantas de tabaco superexpressando o dsRNA para o gene da enzima do nematoide (*Mi-ICL*). Os resultados mostraram que não foi observada nenhuma alteração na formação de galhas, no entanto, houve reduções de 52 a 77% na oviposição do nematoide, indicando que o gene pode estar envolvido no estágio inicial de desenvolvimento e na reprodução de *M. incognita* (Lourenço-Tessutti *et al.*, 2015). Genes relacionados ao processamento do RNA mensageiro (mRNA) fazem parte de outra categoria previamente estudada para silenciamento gênico em nematoides. Nesses organismos, o gene associado ao fator de *splicing* é essencial para o desenvolvimento e desempenha um papel fundamental no metabolismo do RNA (Yadav, Veluthambi e Subramaniam, 2006). A superexpressão do dsRNA para o gene do fator de *splicing* de *M. incognita* (*Mi-FS*) em plantas de tabaco e *Arabidopsis thaliana*, visando o SGIH, conferiu uma defesa eficiente contra o NFG (Yadav, Veluthambi e Subramaniam, 2006; Kumar *et al.*, 2017). Outra classe de genes que tem sido muito investigada para silenciamento gênico em fitonematoides é a de efetores (Bournaud *et al.*, 2018; Mendes *et al.*, 2021; Moreira *et al.*, 2022). Huang *et al.* (2006) validaram o gene efector *16D10* de *Meloidogyne spp.* como essencial ao parasitismo de NFG. A expressão *in vivo* de dsRNA *16D10* em *A. thaliana* resultou em resistência eficaz contra as quatro principais espécies do gênero. Foram observadas reduções de 63-90% no número de galhas nas raízes das plantas transgênicas quando comparadas com o controle (não transgênicas).

Portanto, considerando o sucesso da biotecnologia no estudo e desenvolvimento de genótipos vegetais mais tolerantes a diferentes tipos de estresses e diante da necessidade urgente de novas estratégias para mitigar os efeitos negativos causados por NFG na cultura da soja, este estudo teve como objetivo desenvolver um genótipo de soja geneticamente modificado (GM) com menor suscetibilidade à *M. incognita*, um dos nematoides mais prejudiciais à produção da leguminosa (Lima *et al.*, 2017). A fim de atingir esse propósito, foram empregadas duas estratégias biotecnológicas de forma combinada, para a transformação genética dos embriões de soja. A primeira estratégia buscou a superexpressão do gene *AdEXLB8*, cuja função já foi

previamente associada ao aumento da resistência de plantas a NFG (Guimarães *et al.*, 2017b, c; Brasileiro *et al.*, 2021). A segunda, consistiu no SGIH via RNA interferente, de quatro genes essenciais à sobrevivência ou à infectividade do fitonematoide na planta: *Mi-CPL-1*, *Mi-ICL*, *Mi-FS* e *16D10*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 NEMATOIDES FITOPARASITAS E SEUS IMPACTOS NA AGRICULTURA

Os nematoides são o grupo de animais multicelulares mais abundante do planeta (Van den Hoogen *et al.*, 2019). Esses organismos possuem uma distribuição global, habitando uma vasta gama de ambientes, incluindo ecossistemas marinhos, de água doce e terrestres. Alguns nematoides foram documentados em locais extremos, como desertos, fontes termais e mares polares (Schafer, 2016). O tamanho dos nematoides é variável, desde organismos microscópicos com menos de 100 µm, como *Grifiella minutum*, um nematoide marinho, até grandes parasitas de animais, como *Placentonema gigantesca*, que parasita cachalotes e pode ultrapassar 8 metros de comprimento (Shah e Mahamood, 2017). Esses animais são caracterizados por um corpo alongado em formato de verme, uma anatomia flexível, transparente e de simetria bilateral, bem como uma cutícula composta por colágeno com função de revestimento e proteção (Wharton, 2012; Wilschut e Geisen, 2021). Enquanto algumas espécies adotam um estilo de vida livre, alimentando-se de microrganismos, matéria orgânica em decomposição ou predando insetos e outros nematoides, outras são parasitas de plantas ou animais, sendo os NPP, denominados fitonematoides (Maggenti, 1981; Schafer, 2016).

Os fitonematoides estão entre os principais fatores limitantes da produção agrícola mundial (Carneiro; Lima; Correia, 2017). Com a capacidade de infectar uma ampla variedade de espécies vegetais, tanto monocotiledôneas quanto dicotiledôneas, esses organismos atacam raízes, caules e folhas, comprometendo a absorção de água e nutrientes (Shah e Mahamood, 2017). Como consequência, as plantas perdem vigor, levando a significativas perdas econômicas na agricultura, com reduções na produção anual de até 12%, o que representa prejuízos de bilhões de dólares (Nicol *et al.*, 2011; Bernard; Egnin; Bonsi, 2017). Entre os fitonematoides mais prejudiciais, os endoparasitas destacam-se por sua capacidade de invadir os tecidos vegetais e se instalar no interior da planta hospedeira. Aqueles que causam mais impactos na produção agrícola são os NFG (*Meloidogyne* spp.), os nematoides formadores de

cistos (NFC) (*Heterodera* spp. e *Globodera* spp.) e os nematoides das lesões radiculares (*Pratylenchus* spp.) (Jones *et al.*, 2013). Nesse contexto, *Meloidogyne* spp. foram classificados como o grupo mais relevante de NPP na patologia molecular, de acordo com um estudo que identificou e classificou os dez principais fitonematoídeos de maior impacto (Jones *et al.*, 2013). Três espécies de NFG - *M. incognita*, *M. javanica* e *M. enterolobii* - sozinhas provocam prejuízos anuais que somam US\$ 6,5 bilhões no mercado da soja (Barros *et al.*, 2022). Nesse âmbito, *M. incognita* se destaca por sua capacidade de infectar as raízes de quase todas as plantas cultivadas, tornando-o talvez um dos patógenos mais prejudiciais às culturas agrícolas (Trudgill e Blok, 2001).

2.2 MECANISMOS DE PARASITISMO DE *Meloidogyne* spp. E MÉTODOS DE CONTROLE

A espécie *M. incognita* é considerada a mais endêmica das Américas entre as 98 espécies do gênero catalogadas até o momento, que abriga os NFG (Jones *et al.*, 2013). Os NFGs receberam esse nome devido à sua capacidade de induzir a formação de estruturas chamadas galhas ou nódulos nas raízes das plantas infectadas. O processo de indução das galhas ocorre após o estabelecimento do nematoídeo na planta. Inicialmente, a parede celular é perfurada pelo estilete do parasita e degradada com a ajuda de proteínas secretadas pelo NFG juvenil de segundo estágio pré-parasita (ppJ2, do inglês, *pre-parasitic juvenile 2*), após o reconhecimento de sinais químicos atrativos liberados pelas raízes (Wieczorek, 2015; Wang, Masler, Rogers, 2018). Ao penetrar a coifa da raiz, o agora juvenil de segundo estágio (J2) desloca-se pelos tecidos corticais até alcançar o cilindro vascular, onde estabelece seu sítio de alimentação. Ali, seleciona de 4 a 8 células vegetais para sua nutrição. Esse processo é mediado pela secreção de proteínas efetoras de sua glândula dorsal, que não apenas permitem a captação de água e nutrientes no sítio de alimentação, mas também suprimem as respostas de defesa da planta, favorecendo o parasitismo (Abad *et al.*, 2008; Quentin; Abad; Favery, 2013). Durante a infecção, o nematoídeo induz alterações celulares, levando à formação de CG. Essas células resultam de sucessivas divisões mitóticas sem citocinese, podendo conter até 100 núcleos e atingir um tamanho 400 vezes maior que as células vasculares normais da raiz (Caillaud *et al.*, 2008; Abad *et al.*, 2008). O contínuo extravasamento de citoplasma das células infectadas transforma a região em um foco de intensa atividade metabólica, promovendo a proliferação celular ao redor do NFG e formando as galhas, que são o principal sintoma da infecção (Subedi,

Thapa, Shrestha, 2020). Quando a estrutura de alimentação está completamente desenvolvida, inicia-se a fase sedentária do nematoide que, ao começar a se alimentar, sofre ecdise e passa para o estágio J3 (Bernard; Egnin; Bonsi, 2017). O desenvolvimento continua e, após mais duas ecdises, o nematoide chega ao estágio adulto, no qual pode se desdiferenciar em macho ou fêmea (Bellafiore *et al.*, 2008). Os machos, raramente observados, retornam ao solo, enquanto as fêmeas permanecem nas raízes, onde continuam seu desenvolvimento. Diferentemente de outros patógenos vegetais, *M. incognita* se reproduz por partenogênese mitótica, tornando desnecessária a presença de machos para a fecundação da célula gametogênica (Castagnone-Sereno e Danchin, 2014). Quando maduras, as fêmeas depositam na superfície da raiz uma massa de ovos envolta por uma matriz gelatinosa protetora, que pode abrigar internamente de centenas a milhares de ovos (Castagnone-Sereno, 2006). A prole dentro dos ovos sofre sua primeira ecdise e atinge a forma de juvenil de primeiro estágio (J1), que continua seu desenvolvimento e, ao eclodir, atinge o estágio de ppJ2, indo em direção ao solo para infectar novas raízes (Bellafiore *et al.*, 2008). Ao penetrar uma nova raiz, o NFG inicia mais um ciclo de vida, que tem duração aproximada de 30 dias e, como descrito, apresenta: um estágio inicial de ovo, quatro estádios juvenis (J1, J2, J3 e J4) e a fase madura (fêmea) (Kavitha; Jonathan; Nakkeeran, 2011) (**Figura 1**).

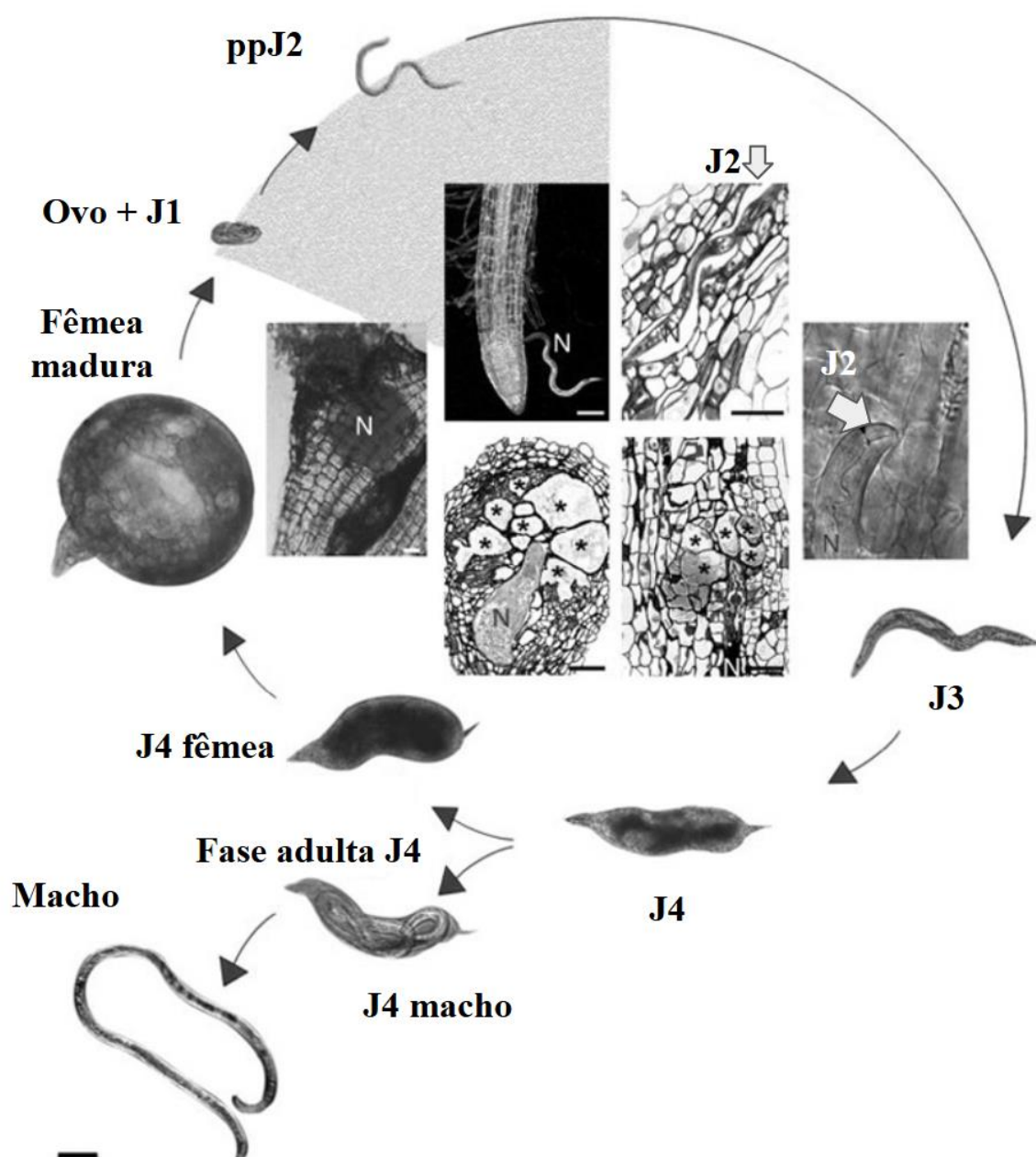


Figura 1 – Ciclo de vida do NFG *Meloidogyne incognita* (Fonte: Adaptado de Abad et al., 2008). Em sua fase infectiva, juvenis de segundo estágio pré-parasita (ppJ2) penetram a coifa da raiz com o auxílio do estilete e passam a ser denominados juvenis de segundo estágio (J2). Os J2 deslocam-se até o cilindro vascular onde induzem a transformação de células radiculares em células gigantes de alimentação (*) que passam a fornecer nutrientes essenciais ao nematoide. Nesse estágio o parasita torna-se sedentário e sofre três ecdises sucessivas (J3, J4 e fase adulta). Eventualmente, machos podem se desenvolver e abandonar as raízes. As fêmeas maduras produzem ovos que são depositados na superfície radicular dentro de uma matriz protetora. No interior dos ovos, ocorre a embriogênese seguida pela primeira ecdise, resultando na formação de novos juvenis de primeiro estágio (J1) que ao eclodirem, se tornam juvenis pré-parasitas de segundo estágio (ppJ2), reiniciando o ciclo. Barra de escala, 50 µm.

É importante ressaltar a maneira como esses fitonematoides contornam os mecanismos de defesa de suas plantas hospedeiras. No decorrer da evolução, as plantas, organismos sésseis e suscetíveis a estresses como ataque de predadores e patógenos, desenvolveram estratégias de

defesa imunológica capazes de identificar e reagir ao estresse por meio de adaptações em sua morfologia e fisiologia, como também a nível molecular (Nawaz *et al.*, 2023). Em termos morfológicos, as plantas podem, por exemplo, induzir a queda de folhas ou diminuir o tamanho das raízes. Já no nível fisiológico e molecular, elas podem ativar mecanismos que utilizam metabólitos secundários, geralmente relacionados à defesa vegetal e à sua interação com o ambiente (Hassan *et al.*, 2021). Essas reações atenuam os impactos de condições adversas, garantindo a sobrevivência e a produtividade da planta (Jan *et al.*, 2021). A defesa inicial das plantas é formada por paredes celulares resistentes, cutículas cerosas, e metabólitos secundários com ação antimicrobiana (Wan *et al.*, 2021). Essa barreira impede parte dos organismos patogênicos, porém aqueles que a atravessam, como os NFG, enfrentam uma segunda barreira de defesa: o sistema imunológico intracelular da planta (Nishad *et al.*, 2020). O sistema imunológico inato das plantas é composto por duas camadas que permitem a detecção e a resposta a diferentes tipos de ataques bióticos (Jones e Dangl, 2006; Boller e He, 2009; Zhou e Zhang, 2020). A primeira camada é ativada quando a planta reconhece padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês, *pathogen-associated molecular patterns*) ou a danos celulares (DAMPs, do inglês, *damage-associated molecular patterns*) por meio de receptores localizados na superfície celular. Ocorre então a indução da imunidade desencadeada por padrões (PTI, do inglês, *pattern-triggered immunity*), que tem um papel essencial na limitação da invasão de patógenos (Zipfel *et al.*, 2004; Jones e Dangl, 2006; Melotto *et al.*, 2006). Para superar essa barreira, muitos patógenos, como bactérias, fungos e nematoides, liberam efetores virulentos no interior das células vegetais, com o objetivo de suprimir a resposta imunológica da planta (Xin; Kvitko; He, 2018; Rocafort; Fudal; Mesarich, 2020). Como resposta a esses efetores, as plantas ativam uma segunda via imunológica, geralmente mais intensa, que é a imunidade desencadeada por efetores (ETI, do inglês, *effector-triggered immunity*). A ETI ocorre quando receptores intracelulares de repetição rica em leucina (NLRs, do inglês, *nucleotide-binding leucine-rich repeats*) reconhecem diretamente ou indiretamente os efetores (Jones e Dangl, 2006). Nos últimos anos, houve grandes avanços na compreensão de como PTI e ETI se comunicam para proporcionar uma defesa eficaz. Tem-se observado que ambas as respostas imunológicas geram sinais sobrepostos, como cascatas de proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK, do inglês, *mitogen-activated protein kinase*), fluxos de cálcio, produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), reprogramação transcricional e sinalização de fito-hormônios (Yuan *et al.*, 2021). Além disso, a PTI pode levar a uma resposta de hipersensibilidade, causando a morte celular no local da infecção, com o objetivo de bloquear o crescimento e a propagação do patógeno (Yin *et al.*, 2022). O embate entre o NFG e o sistema

imunológico da planta se dá ao passo de que proteínas efetoras destes parasitas interferem nos mecanismos moleculares desencadeados pelas PTI e ETI, como por exemplo quando essas moléculas efetoras interagem com MAPK visando inativar a sinalização de defesa e favorecer o seu parasitismo (Bird, 1974; Siddique *et al.*, 2022). Essa interferência dos efetores, se bem sucedida, pode induzir a suscetibilidade desencadeada por efetores (ETS, do inglês, *effector-triggered susceptibility*), uma estratégia dos patógenos para contornar a imunidade induzida pela PTI e permitir a sua proliferação no hospedeiro (Yuan *et al.*, 2021).

O parasitismo de *M. incognita* causa danos significativos ao sistema radicular das plantas hospedeiras ao comprometer a translocação de água e nutrientes. Isso reduz o crescimento das raízes e leva a sintomas semelhantes aos de estresse hídrico e deficiência nutricional (Bartlem; Jones; Hammes, 2014). Plantas afetadas frequentemente apresentam prejuízos no desenvolvimento e clorose internerval, caracterizada pelo clareamento progressivo das folhas, que podem adquirir tonalidades amareladas ou avermelhadas em função dos danos radiculares (Danchin *et al.*, 2013). Além dos prejuízos diretos provocados pelos nematoides, as lesões formadas nas raízes durante o processo de penetração do ppJ2 facilitam a invasão de fungos e bactérias (Mitiku, 2018). Esses impactos afetam diretamente o rendimento das culturas, representando um desafio para a agricultura, dado que as perdas anuais devido aos fitonematoides chegam a bilhões de dólares (Bernard; Egnin; Bonsi, 2017).

Devido à natureza endoparasita de *Meloidogyne spp.*, o controle eficaz continua sendo um desafio (Subedi; Thapa; Shrestha, 2020). Entre as estratégias de manejo, o uso de nematicidas químicos ainda é o método de controle de curto prazo mais adotado contra NFG (Hajihassani *et al.*, 2020). Entretanto, ao longo dos últimos anos, diversos compostos químicos a base de brometo de metila, aldicarbe, carbamatos e organofosforados, foram descontinuados devido a preocupações relacionadas à saúde humana e aos impactos ambientais (Ntalli *et al.*, 2016; Oka, 2020). Uma estratégia segura é a rotação de culturas com plantas não hospedeiras do parasita. Essa alternativa pode reduzir a densidade populacional de nematoides no solo e contribuir para atenuação dos prejuízos causados pelo parasitismo (Bernard; Egnin; Bonsi, 2017). No entanto, a ampla gama de hospedeiros de *Meloidogyne spp.* e a presença de diversas espécies de NFG no mesmo ambiente, muitas vezes reduz a eficácia da técnica. Além disso, o plantio de certas culturas pode não trazer o retorno financeiro esperado pelo agricultor, dificultando a implementação da metodologia (Forghani e Hajihassani, 2020). A utilização de cultivares resistentes a NFG tem se mostrado uma abordagem eficiente no manejo desses parasitas. Para a cultura da soja, existem, no mercado brasileiro, diversas cultivares resistentes

ou moderadamente resistentes a NFG, mas quase todas são descendentes de uma única fonte de resistência: a cultivar norte-americana ‘Bragg’ (Dias *et al.*, 2010).

2.3 BIOTECNOLOGIA NO MELHORAMENTO DE CULTIVARES

Para atender às demandas do setor agrícola, a biotecnologia tem desempenhado um papel fundamental no melhoramento de cultivares, possibilitando o desenvolvimento de plantas com maior produtividade, resistência a pragas e tolerância a condições ambientais adversas (Rolla *et al.*, 2014; Ribeiro *et al.*, 2017; Das *et al.*, 2023). Seu uso na agricultura, cresceu paralelamente ao aumento da população mundial que segue em expansão, e deve atingir mais de 9 bilhões de pessoas até 2050, trazendo a necessidade de uma produção ainda maior de alimentos (Basso; Neves; Grossi-de-Sa, 2024). A contribuição da biotecnologia no setor agrícola é positiva para a economia e para a saúde humana, pois contribuem para aumentar os lucros de agricultores, promover a segurança alimentar global, ao permitir um maior número de produção de alimentos, e reduzir o uso de produtos químicos para controle de ervas daninhas e pragas (Klumper e Qaim, 2014; ISAAA, 2019; Turnbull; Lillemo; Hvoslef-Eide, 2021). Esses fatores contribuíram para uma melhor aceitação das culturas GM. Segundo o ISAAA, essas culturas são vistas como a tecnologia agrícola que se disseminou mais rapidamente na história da agricultura moderna (ISAAA, 2019). Com 206,3 milhões de hectares plantados no ano de 2023 em 27 países e regiões. Desses, 56,9 milhões de hectares foram cultivados no Brasil, onde a soja representa 98% da área cultivada por transgênicos, dada a grande importância da leguminosa para a economia agrícola nacional (Cheng *et al.*, 2024; CONAB, 2024).

A compreensão detalhada da genética das plantas e das funções dos seus genes é fundamental para o avanço das cultivares biotecnológicas. Nesse contexto, as abordagens ômicas, têm se mostrado essenciais para investigar os fundamentos genéticos e moleculares que regulam o metabolismo vegetal. Os recentes avanços nas técnicas ômicas têm aprimorado a análise dos genomas, transcriptomas, proteomas e metabolomas das plantas durante a interação com patógenos, permitindo uma compreensão mais detalhada da resposta da planta à infecção e a identificação de possíveis genes de resistência (Yang *et al.*, 2021; Arraes *et al.*, 2022). Além disso, essas abordagens contribuem para elucidar o ciclo de vida dos patógenos e identificar novos fatores de virulência, bem como seus respectivos alvos nos organismos hospedeiros (Gomez-Casati *et al.*, 2016). A aplicação dessas ferramentas é essencial para desvendar os

mecanismos envolvidos na patogenicidade e para o desenvolvimento de estratégias voltadas ao melhoramento de cultivares com maior resistência a doenças.

A seleção de uma metodologia de transformação genética eficaz é outro passo importante no desenvolvimento de culturas GM (Altpeter *et al.*, 2016). Os dois principais métodos de transformação de plantas são classificados com base no sistema de entrega de DNA, que pode ser por bombardeamento de partículas (biobalística) (Sanford, 1988), que utiliza a aceleração de micro projéteis de ouro ou tungstênio revestidas com moléculas de interesse, para entrega em células e tecidos ou por transferência de T-DNA (DNA de transferência) via *Agrobacterium*, sendo esse último, o mais comumente utilizado (Hinchee *et al.*, 1988; Xu *et al.*, 2022). O método de biobalística se destaca por sua capacidade de transformar também organelas e permitir a entrega não apenas de sequências de DNA, mas também de uma variedade de materiais, como RNAs, proteínas, nanopartículas e complexos. No entanto, sua principal desvantagem está na introdução de muitas cópias do transgene, além do custo relativamente elevado (Xu *et al.*, 2022). A transformação utilizando *Agrobacterium* oferece uma taxa considerável de inserção de genes em cópia única, além de ser um processo relativamente simples e de baixo custo. No entanto, sua limitação está no fato de permitir apenas a transferência de plasmídeos de DNA, ao contrário do método biolístico, que possibilita a entrega de fragmentos de DNA, RNAs e proteínas (Hwang; Yu; Lai, 2017). A capacidade natural de *Agrobacterium spp.*, que são bactérias fitopatogênicas, de transferir o T-DNA para plantas hospedeiras através de sua infiltração em tecidos vegetais danificados, é explorada nessa metodologia (Gelvin, 2000). Com o objetivo de obter os principais benefícios de cada um desses métodos de transformação, Paes-de-Melo *et al.* (2020) desenvolveram um protocolo de transformação genética de soja que combina a aceleração de micropartículas de tungstênio para gerar ferimentos no eixo embrionário do explante, com a posterior infiltração de *A. tumefaciens* nos ferimentos ocasionados, a fim de transferir o T-DNA com sequências de interesse, em cópia única ou em poucas cópias, para o genoma do hospedeiro. O protocolo permitiu a transformação estável de soja com uma eficiência média de 9,84% com grande reprodutibilidade (Paes-de-Melo *et al.*, 2020).

O T-DNA faz parte do vetor binário utilizado na transformação via *Agrobacterium* e é composto principalmente por sequências que delimitam a região a ser transferida pela bactéria (bordas esquerda e direita), genes de interesse, sequências promotoras e terminadoras, além de genes de seleção, que permitem a identificação de células transformadas com sucesso e genes repórteres, que facilitam a visualização da transformação (Gelvin *et al.*, 2003; Komari *et al.*, 2006). As regiões promotoras desses vetores são elementos fundamentais para o processo de

transformação, uma vez que estão relacionadas com a regulação e estabilidade da expressão gênica (Basso *et al.*, 2020a). A utilização de promotores constitutivos permite a superexpressão constante de genes de interesse agrônômico em plantas transgênicas em seus variados tecidos ou em tecidos específicos, a depender do promotor selecionado. O promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (*CaMV35S*) (Odell; Nagy; Chua, 1985) é amplamente utilizado na produção de plantas GM, sendo o promotor constitutivo mais empregado nesse contexto. Sua popularidade se deve à capacidade de induzir altos níveis de expressão de transgenes, especialmente em dicotiledôneas (Gudynaite-Saavitch; Johnson; Miki, 2009; Yoo *et al.*, 2005). Sequências promotoras de ubiquitina são frequentemente utilizadas na construção de T-DNAs para transformação de plantas, visto que possibilitam uma expressão constitutiva alta e algumas podem levar a níveis de expressão gênica superiores aos do promotor 35S. Esse desempenho é atribuído ao fato de os genes de ubiquitina apresentarem expressão ampla na maioria dos tecidos vegetais. Exemplos disso são os promotores de ubiquitina isolados de algodão (*pUceA1.7*) e soja (*pUceS8.3*), que demonstram alta eficiência na regulação da expressão gênica em diversos tecidos vegetais, resultando em níveis de expressão mais elevados que os do promotor *CaMV35S* (Viana *et al.*, 2011; Fragoso *et al.*, 2022). Adicionalmente, em estratégias de piramidação gênica existe a necessidade de se utilizar uma maior diversidade de promotores, pois múltiplas cópias de uma mesma sequência promotora podem ocasionar em silenciamento gênico dependente de homologia (Basso *et al.*, 2020a).

2.4 SILENCIAMENTO GÊNICO INDUZIDO PELO HOSPEDEIRO VIA RNA INTERFERENTE

O RNA interferente (RNAi), descrito pela primeira vez em nematoides da espécie *Caenorhabditis elegans* por Fire *et al.* (1998), é um mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional conservado em eucariotos e que foi observado em diferentes espécies de vegetais e animais (Sen; Blau, 2006; Carthew; Sontheimer, 2009; Berezikov, 2011; Jones; Giorgi; Urwin, 2011). Esse mecanismo, pode existir de duas formas: a primeira envolve o silenciamento via microRNAs (miRNA) de mRNA do próprio organismo para fins de manutenção ou de desenvolvimento celular; a segunda, utiliza pequenos RNAs de interferência (siRNA, do inglês, *small interfering RNA*), como método de defesa contra vírus de RNA ou contra a atividade de transposons (Voinnet, 2001; Baulcombe, 2004). As duas vias (microRNA e siRNA) são ativadas pela presença de um RNA de dupla fita (dsRNA), que desencadeia uma cascata de reações até a degradação do mRNA alvo (Baulcombe, 2004). No mecanismo direcionado por

siRNA, quando um dsRNA é detectado pela maquinaria de RNAi da célula eucariótica, a endonuclease do tipo RNase III, específica para RNA de fita dupla (DICER), cliva o dsRNA em siRNAs de 21-24 nucleotídeos de comprimento, de um modo dependente de ATP. Esses siRNAs são reconhecidos pelo complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC, do inglês, *RNA-Induced Silencing Complex*), composto por diversas proteínas, onde terão suas fitas separadas. Uma das fitas permanece no complexo RISC juntamente com a enzima argonata e servirá de guia para localização de sequências de mRNA complementares pelo complexo proteico, que ao identificar uma complementariedade de bases perfeita entre o siRNA e o mRNA-alvo, o cliva. Este processo leva a degradação do mRNA alvo e consequentemente o silenciamento gênico (**Figura 2**) (Baulcombe, 2004; Wilson e Doudna, 2013).

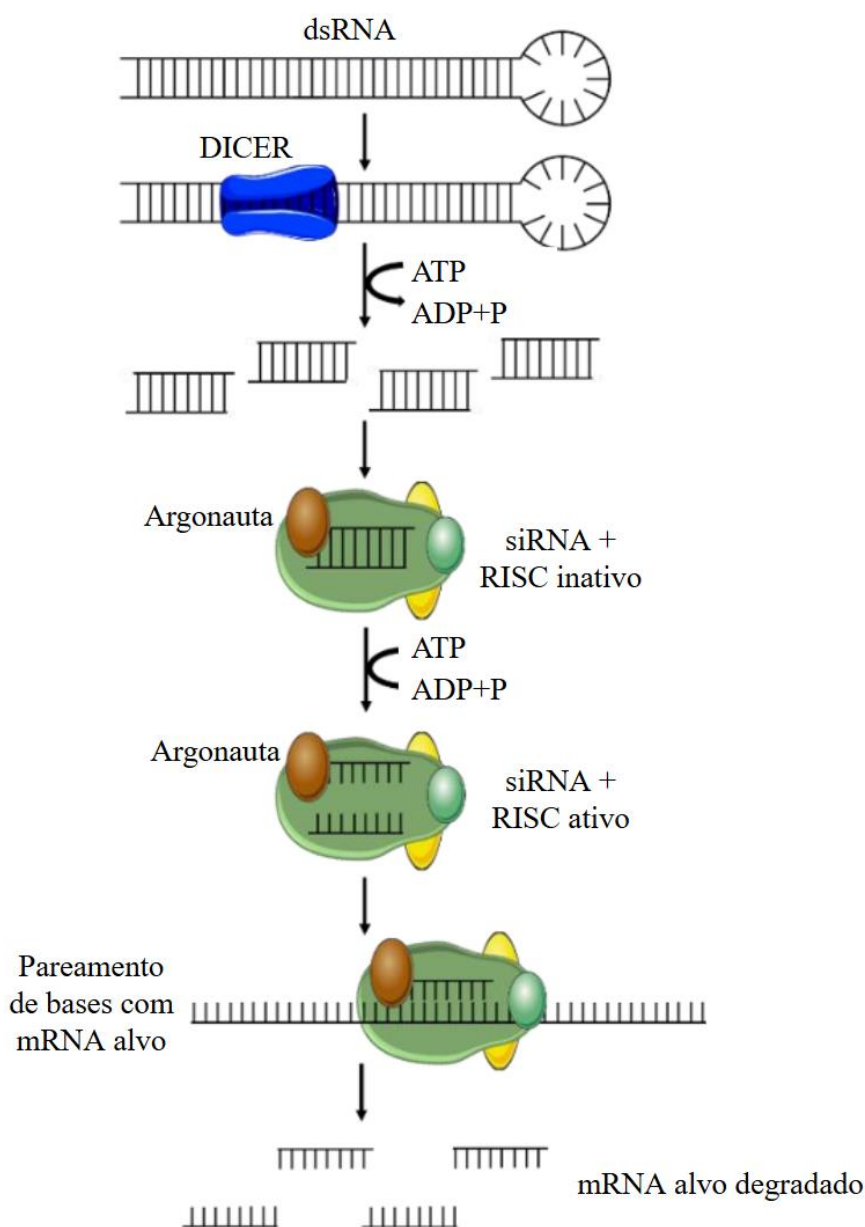


Figura 2 - Ilustração esquemática do mecanismo de RNAi direcionado por siRNA (Fonte: Adaptado de Silva, 2020). O processo é iniciado pela presença de um RNA de fita dupla (dsRNA), que é reconhecido e clivado pela endonuclease DICER, de um modo dependente de ATP, gerando pequenos RNAs de interferência (siRNAs) com aproximadamente 21 a 24 nucleotídeos. Em seguida, o siRNA é incorporado ao Complexo de Silenciamento Induzido por RNA (RISC), que separa as duas fitas do siRNA. Uma das fitas é degradada enquanto a outra é retida ao complexo e funciona como guia. A proteína Argonauta, componente essencial do RISC, direciona a fita guia até o mRNA-alvo, promovendo seu reconhecimento por complementariedade de bases e, consequentemente, sua degradação pelo complexo, impedindo a síntese da proteína correspondente.

Com a identificação do mecanismo de RNAi mediado por siRNAs, tornou-se evidente o potencial da técnica para o controle de pragas. Desde então o RNAi tem sido alvo de estudos para o manejo de NFG na agricultura. Um exemplo é o desenvolvimento de plantas GM que propiciam SGIH (Lourenço-Tessutti *et al.*, 2015; Lisei-de-Sa *et al.*, 2021; Moreira *et al.*, 2024). Nessa abordagem, a planta hospedeira atua como uma fonte contínua de moléculas de dsRNA e siRNA, direcionadas aos mRNAs de genes essenciais do nematoide. Para isso, a planta transgênica deve carregar uma construção gênica para a superexpressão de moléculas de dsRNA, obtidas por meio da clonagem de um fragmento de cDNA (DNA complementar) do gene-alvo do nematoide, disposto em orientações senso e antisenso, separadas por um íntron ou uma região espaçadora. Ao ser transcrita, essa sequência forma uma estrutura de dsRNA em formato de *hairpin*. Esse dsRNA pode ser ingerido pelo nematoide enquanto se alimenta da célula vegetal ou fragmentado em siRNAs pela enzima DICER da própria planta, sendo posteriormente assimilado pelo nematoide. Ao ser ingerida, a molécula ativa a maquinaria de RNAi do nematoide que degrada o mRNA complementar, provocando redução da expressão do gene alvo (**Figura 3**) (Smith *et al.*, 2000; Dutta; Banakar; Rao, 2015; Banerjee *et al.*, 2017).

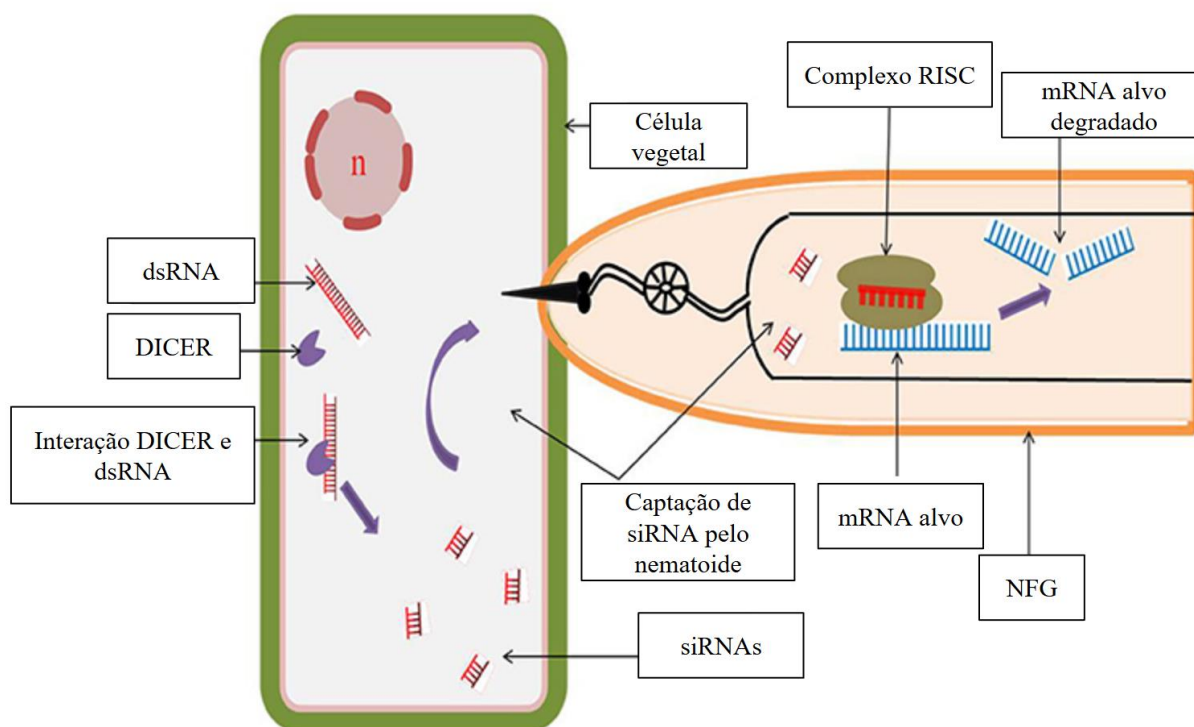


Figura 3 - Processo do silenciamento gênico induzido pelo hospedeiro (SGIH), via RNAi, de genes do nematoide formador de galhas (NFG) Fonte: Adaptado de Banerjee *et al.*, 2017). A planta transgênica produz continuamente dsRNA em formato de *hairpin*, direcionado a genes essenciais do nematoide. Durante o processo de alimentação, o dsRNA pode ser ingerido diretamente pelo nematoide ou processado em siRNAs pelas DICER da própria planta. Após a ingestão das moléculas, a maquinaria de RNAi do nematoide é ativada, reduzindo a expressão do gene-alvo por meio da degradação do mRNA correspondente pelo complexo RISC.

O gene *Mi-cpl-1* é responsável pela síntese de uma proteinase cisteína em *M. incognita* exercendo função vital na digestão de proteínas, dado que sua expressão foi localizada nas células intestinais dos nematoides no estágio J2 e em fêmeas (Neveu; Abad; Castagnone-Sereno 2003; Shingles *et al.*, 2007). Souza-Júnior *et al.* (2013) detectaram a expressão desse gene em todas as fases do NFG, apresentando níveis ligeiramente mais elevados em ovos e nos estádios juvenis (J2, J3 e J4). A superexpressão de dsRNA em plantas de tomate para o SGIH do gene *Mi-cpl-1* de *M. incognita* ocasionou uma diminuição de 60 a 80% na infecção e na proliferação do nematoide (Dutta *et al.*, 2015). Souza-Júnior *et al.* (2013) observaram que a reprodução de *M. incognita* foi afetada em raízes de tabaco com superexpressão de dsRNA direcionado ao mesmo gene, resultando em uma redução de 42% na quantidade de ovos. Embora a formação de galhas nessas plantas não tenha sido alterada, houve uma diminuição de 45% no número total de galhas e de 32% nas massas de ovos em plantas de tabaco selvagem inoculadas com a prole de fêmeas que parasitaram plantas transgênicas superexpressando o dsRNA para o gene *Mi-cpl-1*, em comparação ao controle (nematoides que parasitaram plantas não transgênicas). Esses resultados sugerem que o gene da proteinase cisteína está possivelmente envolvido na reprodução, embriogênese e virulência de *M. incognita*. Além disso, evidenciaram que o

silenciamento gênico impacta não apenas os nematoides expostos diretamente ao dsRNA, mas também sua prole. Outro gene de *M. incognita* que foi validado como potencial alvo de SGIH foi o gene que codifica a enzima isocitrato liase – *Mi-ICL* (Lourenço-Tessutti *et al.*, 2015). Essa enzima, juntamente com a malato sintase (MS), é essencial ao ciclo do glioxilato. A via permite que os nematoides aproveitem lipídios armazenados para produzir energia, especialmente durante períodos de inanição ou estágios iniciais de parasitismo. Essa via é caracterizada pela ação das enzimas MS e isocitrato liase (ICL), que evitam etapas de descarboxilação (Wadsworth e Riddle, 1989; McCarter *et al.*, 2003). Lourenço-Tessutti *et al.* (2015) foram os primeiros a demonstrar que *Mi-ICL* é expresso no estágio ppJ2 de *M. incognita* nas células intestinais e na extremidade da cauda, regiões, onde o armazenamento de lipídios é mais abundante. Com o objetivo de ampliar a compreensão acerca da função da ICL no processo de parasitismo de *M. incognita*, a supressão do gene por meio de SGIH foi analisada e resultou em reduções de 52 a 77% na oviposição em plantas de tabaco superexpressando o dsRNA para o gene *Mi-ICL*. No entanto, não foi observado efeito significativo na formação de galhas, o que sugere que esse gene está relacionado ao desenvolvimento inicial e à reprodução do nematoide.

O *splicing* alternativo de pré-mRNA é reconhecido como uma das principais fontes de diversidade proteica em organismos mais complexos, como vertebrados (Black, 2000). Nos nematoides, o gene relacionado ao fator de *splicing* é um gene de manutenção indispensável para o desenvolvimento do organismo e exerce função crucial no metabolismo de RNA (Yadav; Veluthambi; Subramaniam, 2006). Plantas de tabaco transgênicas superexpressando o dsRNA para o gene *Mi-FS* (fator de *splicing* de *M. incognita*) visando o SGIH, proporcionou ao hospedeiro uma defesa eficaz contra o NFG. Ao suprimir quase que totalmente o mRNA alvo do patógeno, apenas 2 das 25 plantas transgênicas inoculadas com o nematoide desenvolveram galhas, as quais eram consideravelmente reduzidas em quantidade e dimensão (Yadav; Veluthambi; Subramaniam, 2006). De forma similar, Kumar *et al.* (2017) obtiveram reduções de até 74,5% no número de galhas e de até 86,6% no número de massas de ovos de *M. incognita* em plantas de *A. thaliana* que superexpressavam o dsRNA para o mesmo gene, quando comparadas com plantas controle (não transgênicas). A sequência de dsRNA para o gene *Mi-FS* foi piramidada com as correspondentes aos genes *Mi-CPL-1* e *Mi-ICL* em plantas transgênicas de algodão, para suprimir a expressão desses três genes essenciais de *M. incognita* através do SGIH. A estratégia de piramidação se mostrou eficiente em reduzir os impactos causados pela infecção do NFG alvo, ao passo que foram reportadas reduções significativas no número de galhas, de massas de ovos e no fator de reprodução do nematoide nas raízes de algodão transgênicas que carregavam a abordagem de RNAi (Lisei-de-Sa *et al.*, 2021).

Outra categoria de genes explorada de forma abrangente para o silenciamento gênico via RNAi em fitonematoides é a dos efetores (Bournaud *et al.*, 2018; Mendes *et al.*, 2021; Moreira *et al.*, 2024). Estes genes, expressos na glândula esofágica de NFG, são primordiais no desenvolvimento de CG nas raízes de plantas hospedeiras (Huang *et al.*, 2003; Davis; Hussey, Baum, 2004). Huang *et al.* (2006a), descreveram que o peptídeo efector *16D10* atua diretamente em um fator de transcrição putativo de vegetais para induzir o crescimento de raízes. Posteriormente, concluíram que o gene que codifica o peptídeo tem função crucial no parasitismo de NFG ao demonstrarem que o SGIH de *16D10* em plantas de *A. thaliana* possibilitou o aumento de resistência do hospedeiro contra quatro espécies de *Meloidogyne*. Em seus experimentos, evidenciaram diminuições de 63 a 90% e de 69 a 93% no número de galhas e de ovos, respectivamente, nas raízes de *Arabidopsis* transgênicas, quando inoculadas com *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* e *M. hapla*, em contraste com raízes não transgênicas (Huang *et al.*, 2006b).

2.5 EXPANSINAS

As expansinas vegetais são proteínas que exercem modificações na parede celular de maneira não enzimática e estão vinculadas à extensão e relaxamento de células em tecidos em expansão e desenvolvimento (McQueen-Mason; Durachko; Cosgrove, 1992; Cosgrove, 2000). Elas também desempenham papel nas respostas a estresses abióticos e bióticos, incluindo seca, salinidade, variações de temperatura (frio e calor), estresse oxidativo, herbivoria e infecção por fitopatógenos (Marowa; Ding; Kong, 2016). Isso sugere que essas proteínas fazem parte de um mecanismo comum de defesa das plantas contra condições adversas. No entanto, não estão totalmente esclarecidos os mecanismos pelos quais as expansinas contribuem para a tolerância das plantas a diferentes tipos de estresse (Guimarães *et al.*, 2017a). Essas proteínas, de 250 a 300 aminoácidos de comprimento, estão presentes em todo o reino vegetal e são caracterizadas pela presença de um peptídeo de sinalização N-terminal sucedido por dois domínios fortemente conservados, DPBB e CBM63 (Cosgrove, 2015). A partir da avaliação da sequência filogenética, a superfamília das expansinas vegetais foi classificada em duas subfamílias predominantes, α -expansina (EXPA) e β -expansina (EXPB), que foram objeto de diversos estudos, e outras duas pouco exploradas, designadas expansina-like A e B (EXLA e EXLB) (Kende *et al.*, 2004; Marowa; Ding; Kong, 2016). Estas últimas se distinguem pela ausência de determinados domínios conservados presentes nas subfamílias EXPA e EXPB (Li *et al.*, 2002). Até o presente momento, os estudos têm se dedicado a investigar o mecanismo de ação e a função biológica das expansinas. Desde a última década, a fim de revelar genes para utilização

no melhoramento genético de plantas, genótipos de *Arachis* selvagens resistentes a múltiplos estresses vêm sendo alvo de estudos de prospecção gênica (Janila *et al.*, 2016; Guimarães *et al.*, 2017a; Mota *et al.*, 2021). Guimarães *et al.* (2017a) identificaram 40 genes putativos de expansina na análise do genoma de *A. duranensis* e todos tiveram suas expressões moduladas em resposta a dois estresses abióticos (tratamento com luz UV e déficit hídrico) e a um estresse biótico (infecção com *M. arenaria*). Entre os genes analisados, *AdEXLB8* despertou o interesse dos autores ao apresentar uma resposta altamente específica a cada tipo de estresse. A superexpressão de *AdEXLB8* em raízes pilosas (*hairy roots*) de soja inoculadas com o nematoide *M. javanica*, reduziu em 82% a formação de galhas em comparação com as raízes do grupo controle (Guimarães *et al.*, 2017a). Os autores relataram existir uma relação direta entre a expressão endógena de *EXLB8* em diferentes espécies de *Arachis* e o aumento da resistência ao nematoide *M. arenaria*. Ensaios de RT-qPCR indicaram uma maior expressão do transcrito de *EXLB8* na espécie mais resistente (*A. stenosperma*), uma expressão moderada na espécie com resistência intermediária (*A. duranensis*), e uma expressão reduzida no genótipo menos resistente (*A. hypogaea* ‘Runner’), quando as plantas foram inoculadas com o fitopatógeno. A superexpressão do gene *AdEXLB8* em *hairy roots* transformadas da cultivar de amendoim suscetível a nematoide, *A. hypogaea* ‘Runner’, demonstrou eficiência na resistência a *M. arenaria*. Sessenta dias após a infecção pelo nematoide, houve uma redução de 98% na formação de galhas e na quantidade de massas de ovos em comparação ao grupo controle (Guimarães *et al.*, 2017b). A superexpressão de *AdEXLB8* em plantas de tabaco aumentou a tolerância do vegetal ao nematoide *M. incognita*, ao fungo fitoparasita *Sclerotinia sclerotiorum* e à seca (Brasileiro *et al.*, 2021). Essa resistência aumentada contra os dois tipos de estresse, biótico e abiótico, levou os autores a inferirem que *AdEXLB8* está associada a alterações estruturais na parede celular e a ativação de caminhos de sinalização de hormônios vegetais envolvidos na defesa, apesar de que a maneira como essa proteína influencia na resposta aos estresses ainda não está esclarecida.

3 HIPÓTESE

A piramidação de duas estratégias biotecnológicas: (1) Superexpressão constitutiva do gene *AdEXLB8* e (2) o uso do SGIH, via RNAi dos genes do nematoide cisteína protease (*Mi-CPL-1*), isocitrato liase (*Mi-ICL*), fator de *splicing* (*Mi-FS*) e *16D10*, potencializará a redução da suscetibilidade de plantas de soja a *M. incognita*.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Reduzir a suscetibilidade de plantas de soja à *M. incognita* por meio do desenvolvimento de um genótipo GM engenheirado pela piramidação de duas estratégias biotecnológicas: a superexpressão de um gene de resistência e o uso do SGIH, via RNAi de genes do fitonematoide.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver plantas GM de soja da cultivar BRS 284 superexpressando simultaneamente o transgene *AdEXLB8*, que codifica uma expansina de *A. duranensis*, e moléculas de dsRNA para a indução do silenciamento dos genes *Mi-CPL-1*, *Mi-ICL*, *Mi-FS* e *16D10* de *M. incognita* pela planta hospedeira, durante o parasitismo.
- Avaliar a susceptibilidade de plantas GM a *M. incognita* em bioensaios em casa de vegetação.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 CONSTRUÇÃO DO CASSETE DE EXPRESSÃO

O cassete de expressão, denominado *ExpMinc2* (**Figura 4**), utilizado para a transformação de soja, foi projetado para a expressão do gene *AdEXLB8* (acesso GenBank nº KX588115) de *A. duranensis* (região CDS) sob o controle do promotor constitutivo de algodão *pUceA1.7*, que apresenta altas expressões em tecidos de raízes (Viana *et al.* 2011). O cassete de expressão foi sintetizado pela Epoch Life Science Inc. (Missouri City, Texas, EUA) e clonado no vetor binário pCambia 0380 (Schoch *et al.*, 2020) (NCBI: txid118382), flanqueado pelas sequências das bordas esquerda (LB, *left border*) e direita (RB, *right border*). Para a expressão dos fragmentos de dsRNA, foram clonadas *in tandem*, as sequências codificadoras dos genes *16D10* (132 pb; acesso GenBank nº DQ087264), *Mi-CPL-1* (201 pb; acesso GenBank nº AJ557572), *Mi-ICL* (234 pb; acesso GenBank nº MZ313562) e *Mi-FS* (200 pb; acesso GenBank nº AW828516) de *M. incognita*. Os fragmentos foram clonados em cadeias senso e antisenso separadas pelo íntron piruvato desidrogenase quinase (PDK, do inglês *Pyruvate*

Dehydrogenase Kinase) de 748 pb (Smith *et al.*, 2000) para a formação do *hairpin* responsável pela ativação da maquinaria de RNA interferente, sob regulação do promotor constitutivo de soja *pUceS8.3* (Fragoso *et al.*, 2022). O gene *ahas*, controlado por seu promotor *pAHAS* e o gene *bar*, controlado pelo promotor *pCAMV35S*, foram incluídos para conferir tolerância aos herbicidas Imazapyr e glufosinato de amônio, respectivamente.

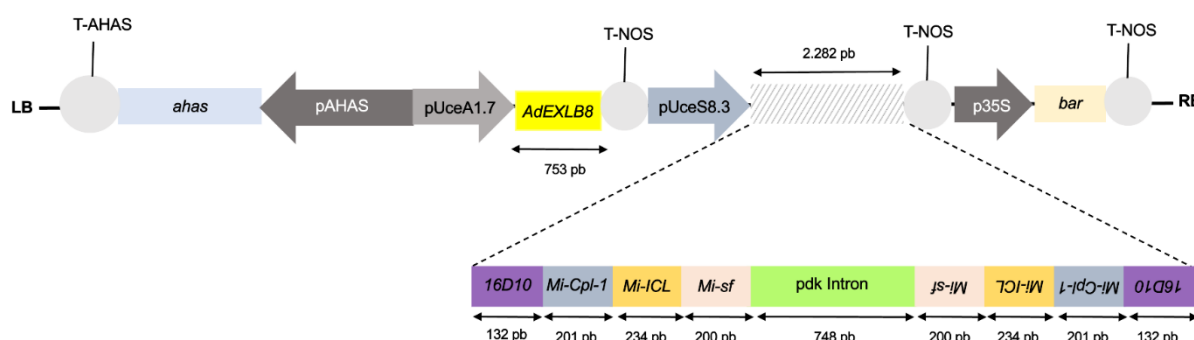


Figura 4 - Cassete de expressão *ExpMinc2* (Fonte: Compilação do autor). O cassete de expressão (T-DNA) é composto por duas sequências promotoras, *pUceA1.7* e *pUceS8.3* que controlam, respectivamente, a expressão do gene *AdEXLB8* e dos fragmentos de dsRNA *in tandem* senso e anti-senso provenientes de quatro diferentes genes de *M. incognita* (*Mi-CPL*, *Mi-ICL*, *Mi-FS* e *16D10*) seguidos pelos terminadores *T-NOS*. Os marcadores de herbicidas incluíram o gene da aceto-hidroxiácido sintase (*ahas*), controlado por seu promotor (*pAHAS*) e terminador (*T-AHAS*), e o gene de resistência ao glufosinato de amônia (*bar*), controlado pelo promotor *pCAMV35S* e *T-NOS*.

5.2 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE SOJA

Foram submetidos a transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* 500 embriões de soja BRS 284 (Embrapa, 2019) que foram transformados com o cassete de expressão descrito no item 5.1 (Paes-de-Melo *et al.*, 2020). Em seguida, os embriões foram transferidos para frascos magenta contendo o herbicida de seleção, Imazapyr (600 nM) e meio de cultivo para regeneração e desenvolvimento de raízes (Paes-de-Melo *et al.*, 2020). Após um período de 3 a 6 semanas na cultura *in vitro*, as plântulas regeneradas foram submetidas ao processo de aclimação em casa de vegetação a 24°C, sendo transplantadas para sacos plásticos de muda (25 x 35 cm) contendo solo fertilizado e cobertas com um saco plástico transparente para proteção. Após uma semana, o saco plástico de aclimação foi removido para seu completo desenvolvimento e caracterização molecular.

5.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE PLANTAS GENETICAMENTE TRANSFORMADAS

A genotipagem de eventos de soja GM foi realizada pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação do transgene *AdEXLB8*, utilizando-se de um par de primers que flanqueiam uma região de 475 pb compreendida entre o final da sequência do promotor *pUceAl.7* e o início do gene *AdEXLB8*. Para isso, foi extraído o DNA total a partir de dois discos foliares frescos de aproximadamente 1 cm de diâmetro cada, pelo método CTAB (Doyle e Doyle, 1987). A PCR foi executada de acordo com o fabricante do kit GoTaq® DNA Polymerase (Promega, Madison, WI, EUA) utilizando 40 ng de DNA genômico e 0,2 µM de oligonucleotídeos específicos (**Tabela 1**), de acordo com o programa: 95°C por 2 min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos e finalizado com um ciclo de extensão final a 72°C por 5 min. Como controle negativo, foi utilizado o DNA genômico de plantas BRS 284 não transformadas (NT), plantas não transgênicas que passaram pelo processo de regeneração *in vitro* e como controle positivo, o cassete de expressão *ExpMinc2*, utilizado para a transformação de soja. Os produtos de PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,0% (m/v) corado com brometo de etídio (50 µg/mL).

As plantas identificadas como GM (T0) foram mantidas em casa de vegetação para autofecundação, obtenção de sementes e avanço de geração. Plantas das gerações T1 e T2 foram genotipadas por PCR, seguindo o mesmo protocolo descrito acima. Adicionalmente, essas plantas foram caracterizadas molecularmente pelo ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA, do inglês *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) para a detecção da proteína PAT (fosfinotricina acetiltransferase), codificada pelo gene *bar*, presente no cassete de expressão utilizado na transformação. O ELISA indireto foi realizado de acordo com Ribeiro et al. (2017) usando anticorpos policlonais produzidos em coelhos contra PAT (MBS1491343, MyBioSource), a partir de amostras de proteínas extraídas de quatro discos foliares frescos de aproximadamente 1,0 cm cada, de acordo com Aragão e Ribeiro (2015) e foram posteriormente quantificadas pelo método de Bradford (1976). Seguindo os mesmos protocolos citados anteriormente, também foi realizado o ELISA indireto contra *AdEXLB8*, a partir de um peptídeo sintético (CRAFGTVFDVENPP), produzido na empresa GenScript® (New Jersey, EUA). Na ausência da proteína *AdEXLB8* purificada para quantificação, foi feito o cálculo de absorbância A450nm relativa à NT (controle negativo – plantas não transformadas).

Tabela 1 - Oligonucleotídeos utilizados na caracterização molecular por PCR e qPCR das plantas de soja. Tamanho do amplicon (fragmento amplificado) em pares de bases (pb). Tm: Temperatura de dissociação utilizada nos experimentos.

Gene alvo	Aplicação	Primer Forward (5'-3')	Primer Reverse (5'-3')	Tamanho do Amplicon	Tm
<i>AdEXLB8</i>	PCR	GGAGGATCTCTCAGC TACTT	CTCCATAGTCATCGC AGTATTC	475 pb	60°C
<i>AdEXLB8</i>	qPCR	ATGCATCCGCAGAGC TTTTCA	GTAGCTGCGCTCATT CACCT	110 pb	60°C
<i>CYP</i>	qPCR	CGGGACCAGTGTGCT TCTTCA	CCCCTCCACTACAAA AGGCTCG	154 pb	60°C
<i>ELF</i>	qPCR	GACCTTCTTCGTTTCT CGCA	CGAACCTCTCAATCA CACGC	161 pb	60°C

5.4 DESAFIO DAS PLANTAS TRANSGÊNICAS AO NEMATOIDE *Meloidogyne incognita*

Para avaliar a suscetibilidade de plantas GM ao nematoide, plantas de três eventos independentes de transformação (Ev1, Ev2 e Ev3) e o controle negativo (plantas NT), foram desafiadas à *M. incognita* raça 1 em experimentos em casa de vegetação. Dez plantas da geração T2 de cada um dos três eventos de transformação foram cultivadas em tubetes de 290 mL e inoculadas com 1.000 juvenis ppJ2 de *M. incognita*, quinze dias após a semeadura. O inóculo de *M. incognita* raça 1 foi multiplicado em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. cv. Santa Clara) cultivado em casa de vegetação por três meses. A coleta dos fitonematoídeos ocorreu 90 dias após a inoculação e seus os ovos foram extraídos de acordo com Hussey e Barker (1973). As raízes infectadas de tomateiro foram lavadas, coletadas e processadas em liquidificador por 20 segundos, sendo então imersas em uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5%. Em seguida, o material triturado foi filtrado com o uso de peneiras de 100, 200 e 500 *mesh* e lavado em água corrente para eliminar completamente os resíduos de hipoclorito, seguindo as orientações de Vrain (1977). Para a eclosão dos ppJ2, os ovos extraídos foram mantidos em água à temperatura ambiente, utilizando uma adaptação da técnica do funil de Baermann (Baermann *et al.*, 1917). O funil foi substituído por uma peneira revestida com três folhas de papel toalha, na qual o extrato contendo os ovos foi depositado. Os ppJ2 eclodidos foram coletados a cada dois dias e armazenados a 4°C. Após uma semana da eclosão, os ppJ2 foram concentrados, quantificados usando uma câmara de Peters e inoculados nas plantas. A inoculação se deu pela pipetagem da solução de nematoídeos em dois orifícios de aproximadamente 2 cm de profundidade, adjacentes ao caule da planta.

Sessenta dias após a inoculação (DAI), as plantas foram desenterradas e as raízes foram lavadas, pesadas e analisadas quanto ao número de galhas, de massa de ovos e de ovos,

expressos por grama de raiz fresca. Foi estimado o fator de reprodução do nematoide, calculado pela razão entre a população final e a população inicial do mesmo (PF/PI). Os dados foram submetidos a análise de variância (one-way ANOVA; $p < 0,05$) seguido de teste múltiplo de médias (Tukey).

5.5 ANÁLISE DE EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE *AdEXLB8*

O nível de expressão do transcrito de *AdEXLB8* foi analisado por PCR em tempo real. Para isso, o RNA total das amostras de raízes da geração T2 foi extraído utilizando PureLink™ Plant RNA Reagent (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), sua concentração foi estimada por meio de espectrofotômetro (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Massachusetts, EUA) e a integridade verificada por eletroforese em gel de agarose 1,0% (m/v) corado com brometo de etídio (0,1 µg/mL). Um total de 1.000 ng de RNA foi empregado para a síntese de cDNA com 10 mM de oligo-dT NVd30 e 1 U de enzima Transcriptase Reversa do Vírus da Leucemia Murina Moloney (M-MLV RT; Sigma Aldrich), seguindo as orientações dos fabricantes. As amostras de cDNA foram diluídas na proporção 1:10 (v/v) em água livre de nucleases.

O ensaio de PCR em tempo real foi conduzido por meio do CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) de acordo com o programa: 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 10 s e 60°C por 30 segundos, além da curva de dissociação do DNA. Na reação foram utilizados 0,5 µM de primers específicos, 5 µL de qPCR Sybr Master Mix 2x (Cellco, São Carlos, SP, Brasil) e 4 µL de cDNA (1:10), em um volume total de 10 µL. O nível da expressão gênica em soja foi normalizado com a expressão dos genes endógenos do citocromo P450 (CYP) e do fator de elongação (ELF) (Miranda *et al.*, 2013). A eficiência da amplificação foi calculada pelo PCR Miner Software (Zhao e Fernald, 2005) e a expressão relativa no Software SatqPCR (Rancurel *et al.*, 2019). O experimento de PCR em tempo real para amplificação do transcrito de *AdEXLB8* foi realizado com três réplicas biológicas independentes, com quatro plantas em cada, analisadas em triplicatas técnicas.

5.6 ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS GALHAS

Galhas de plantas de soja GM e NT foram dissecadas aos 60 DAI e fixadas em glutaraldeído 2,0%. As galhas fixadas foram gradualmente desidratadas em etanol (30%, 50%, 70%, 80% e 100%) e incluídas em Technovit 7100 (Kulzer GmbH, Wehrheim, Alemanha),

seguindo o protocolo do fabricante. Em seguida, as galhas foram seccionadas em cortes de 3,0 μm e coradas com azul de toluidina a 0,05%. As seções foram montadas entre uma lâmina de vidro e uma lamínula usando DPX (Sigma-Aldrich, EUA) e observadas em microscopia de campo claro com uma câmera digital AxioCamHRc (Carl Zeiss, Alemanha).

6 RESULTADOS

6.1 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE SOJA

Dos 500 embriões da cultivar de soja BRS 284 submetidos ao processo de transformação genética via *A. tumefaciens* com o cassete de expressão *ExpMinc2* (**Figura 4**), 30 plantas foram regeneradas e aclimatadas em casa de vegetação. Entre as plantas aclimatadas, 15 foram identificadas como GM pela genotipagem via PCR pela amplificação de uma região de 475 pb (**Figura 5**), resultando em uma eficiência de transformação de 3,0%, calculada pela razão entre o número de plantas GM obtidas e a quantidade total de embriões submetidos ao processo de transformação. Destes 15 eventos, 10 foram selecionados e empregados para o avanço de geração.

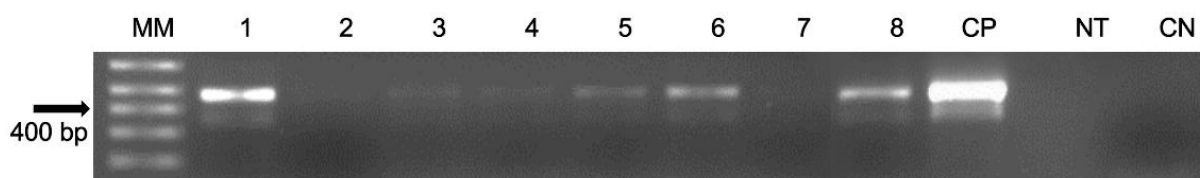


Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR da caracterização molecular de plantas T0 (Fonte: Compilação do autor). Amplicons do gene *AdEXLB8* com 475 pb. MM: Marcador Molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™). CP: Controle positivo da reação. NT: DNA de planta não transformada. CN: Controle negativo da reação, amostra formada por apenas mix de PCR, sem *template*.

Em T1 as plantas foram caracterizadas por PCR, para a identificação da presença do transgene, e por ELISA para a detecção da proteína PAT, codificada pelo gene *bar* presente no cassete de transformação. O teste ELISA das plantas T1 indicou uma variação na estimativa indireta da expressão da proteína PAT entre as amostras, com valores oscilando entre 10,69 e 48,75 $\mu\text{g/g}$ de tecido foliar fresco (**Figura 6**). Dezoito plantas apresentaram resultado positivo para ambas as triagens na caracterização molecular. Destes, 10 foram selecionados de acordo com o nível de quantificação proteica observado no ELISA e pela disponibilidade de sementes, para avanço de geração. Foram semeadas 15 sementes de cada indivíduo para a obtenção de linhagens T2.

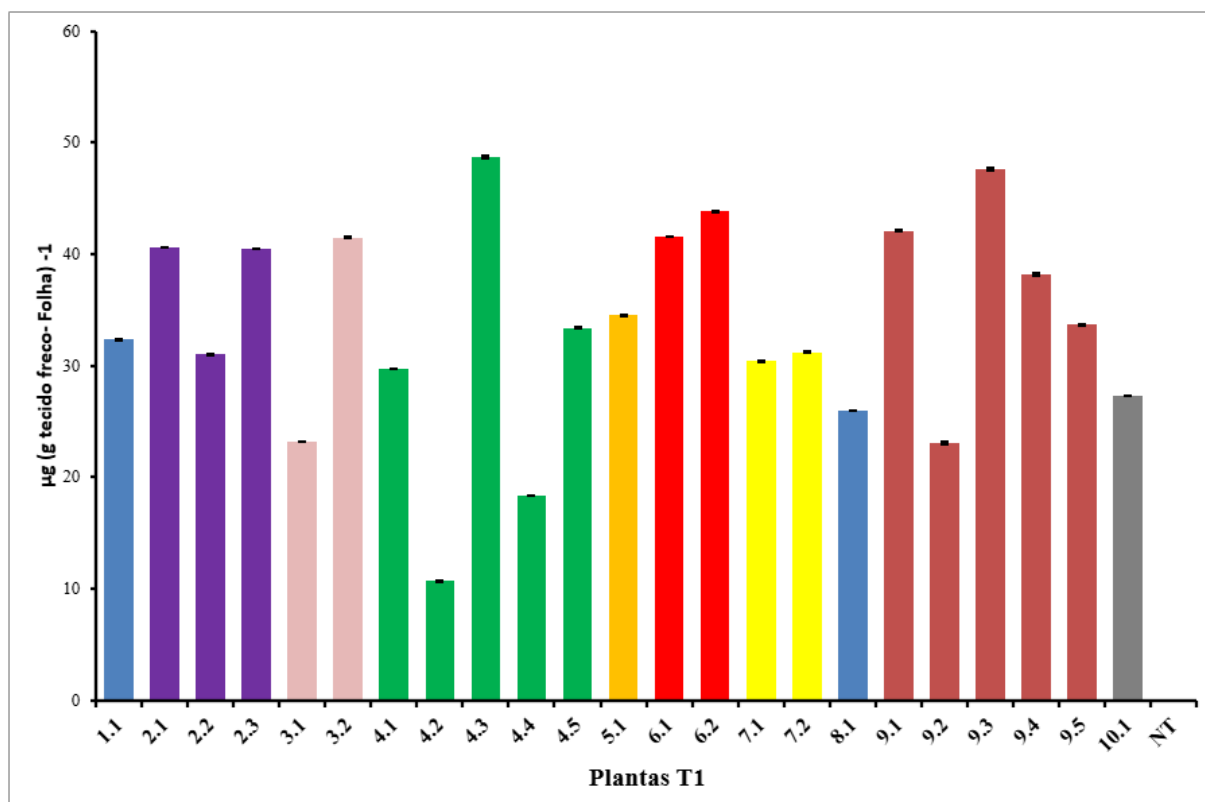


Figura 6 – Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) para detecção da proteína PAT em plantas T1 (Fonte: Compilação do autor). Quantificação da proteína PAT por ELISA indireto usando o anticorpo anti-BAR. Foram analisados 23 indivíduos de 10 eventos transgênicos (indicados nas barras com cores diferentes) e uma planta não transformada (NT). Barras de erro representam o desvio padrão das triplicatas técnicas.

Em T2, as plantas foram analisadas por PCR seguindo os mesmos padrões utilizados em T1 e semeadas para avanço de geração. Adicionalmente, plantas T2 PCR positivas, pertencentes a três eventos independentes de transformação (Ev1, Ev2 e Ev3), foram triadas por ELISA. A triagem permitiu a quantificação da expressão da proteína PAT em todas as amostras analisadas com valores oscilando entre 9,83 e 35,28 µg/g de tecido foliar fresco (**Figura 7**). Destas, 10 plantas com maior expressão da proteína, em cada um dos três eventos, foram selecionadas para o bioensaio com *M. incognita* em casa de vegetação.

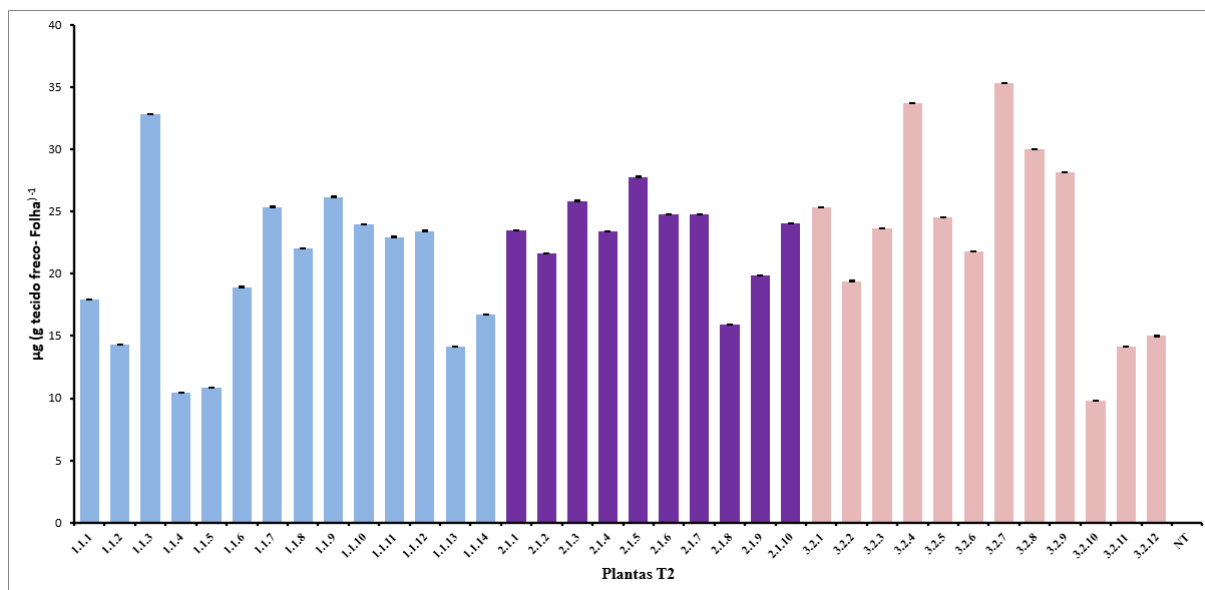


Figura 7 – Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) para detecção da proteína PAT em plantas T2 (Fonte: Compilação do autor). Quantificação da proteína PAT por ELISA indireto usando o anticorpo anti-BAR. Foram analisados 35 indivíduos de 3 eventos transgênicos e uma planta não transformada (NT). Barras de erro representam o desvio padrão das triplicatas técnicas.

Posteriormente, a especificidade do anticorpo anti-AdEXLB8 para detecção da proteína correspondente em três plantas GM de soja superexpressando *AdEXLB8* foi testada por ELISA. Como controle negativo foi utilizada uma planta NT e como controle positivo, seis plantas de *Arachis duranensis* (espécie doadora do gene). Foi possível observar valores de absorbância maiores nas plantas transgênicas, em comparação ao controle NT.

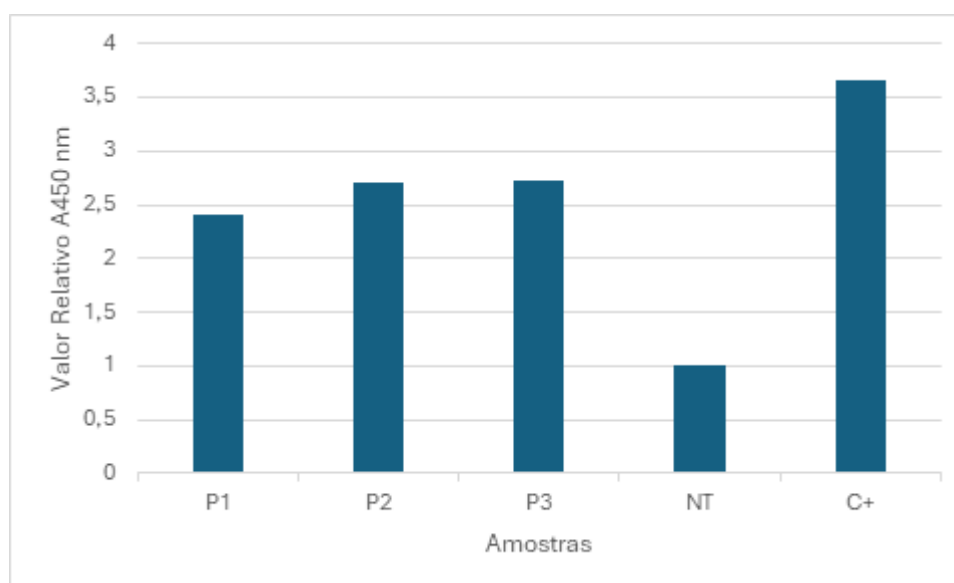


Figura 8 – Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) para detecção da proteína *AdEXLB8* em plantas GM da geração T3 (Fonte: Compilados do autor). Valores relativos da absorbância A450nm de três plantas transgênicas de soja da geração T3: P1, P2, P3; da planta NT (planta não transformada – controle negativo) e do C+ (controle positivo) *Arachis duranensis* (média de 6 plantas), utilizando o anti-*AdEXLB8*.

6.2 REDUÇÃO DA SUSCETIBILIDADE DE PLANTAS GM À *M. incognita*

Plantas de três eventos independentes de transformação da geração T2 foram inoculadas com *M. incognita* a fim de avaliar a suscetibilidade das plantas de soja GM ao nematoide. Plantas dos três eventos analisados apresentaram reduções significativas nos valores das variáveis analisadas, em comparação a plantas NT (controle). As plantas GM exibiram reduções médias de 28,6% e 48,6% no número de galhas e de massas de ovos, respectivamente. Quanto ao número de ovos, foi observada uma redução média de 59,4% entre os eventos GM, quando comparados com plantas NT. Já o fator de reprodução do nematoide foi reduzido em média 43,4% nos eventos analisados (**Figura 9**). Não foram observadas diferenças significativas entre plantas dos três eventos transgênicos analisados e para a variável fator de reprodução, plantas do Ev2 não diferiram significativamente de NT. Foi observada visualmente, porém não quantificada, uma redução no tamanho das galhas de raízes de plantas GM parasitadas por *M. incognita*, em comparação às observadas nas raízes de plantas não transgênicas (**Figura 10**).

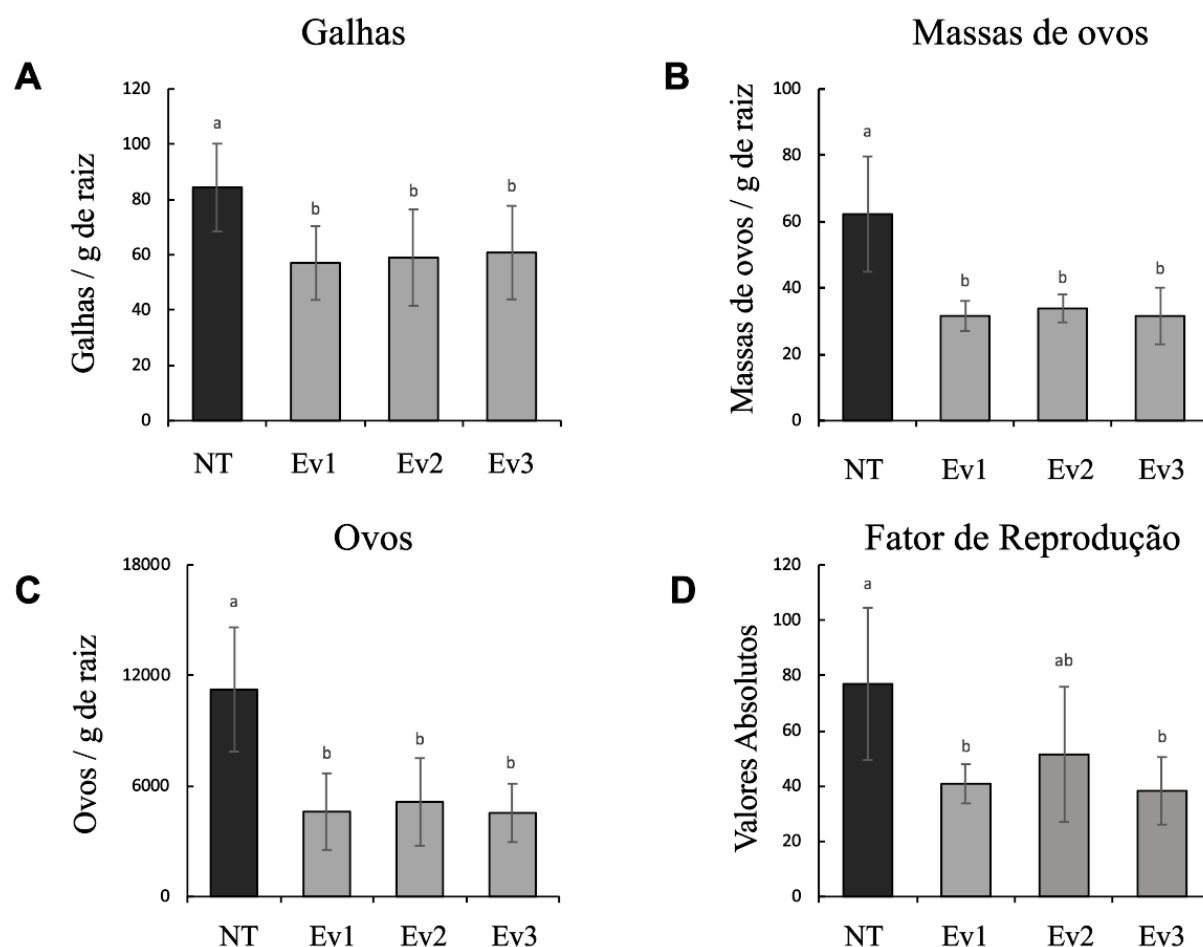


Figura 9 – Redução da suscetibilidade de plantas geneticamente modificadas a *M. incognita* (Fonte: Compilação do autor). Avaliação do número de galhas por grama de raiz (A), de massas de ovos por grama de raiz (B), de ovos por grama de raiz (C) e estimativa do fator de reprodução do nematoide (D) em plantas de três eventos independentes de transformação na geração T2 (Ev1, Ev2 e Ev3) e plantas não transformadas (NT), usadas

como controle. As barras representam valores médios e as barras de erro representam o desvio padrão. Letras distintas indicam significância (ANOVA unidirecional, teste post-hoc de Tukey, $P < 0,05$; $N = 10$).

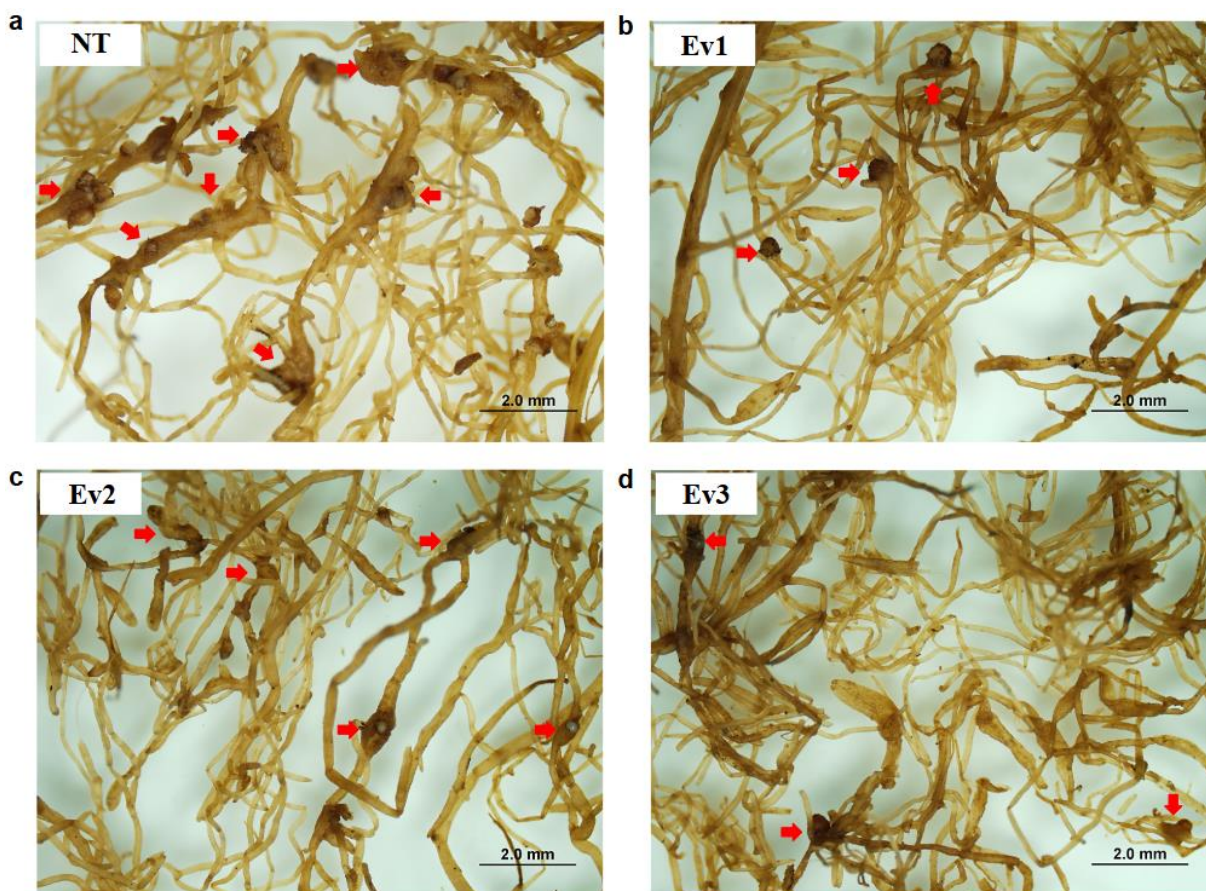


Figura 10 - Raízes de plantas geneticamente modificadas contendo galhas induzidas por *M. incognita* durante 60 DAI (Fonte: Compilação do autor). Raízes de plantas não transgênicas (NT) utilizadas como controle (a) e raízes de eventos transgênicos Ev1 (b), Ev2 (c) e Ev3 (d). Setas vermelhas indicam galhas.

6.3 SUPEREXPRESSÃO DE *AdEXLB8* EM RAÍZES DE PLANTAS TRANSGÊNICAS

A superexpressão do transgene *AdEXLB8* em raízes de plantas GM da geração T2 foi confirmada por RT-qPCR. Três eventos independentes de transformação foram analisados, com quatro amostras de cDNA provenientes de raízes GM para cada evento e para o controle NT. Os resultados mostraram que a expressão relativa média do gene variou entre 1 e 4,5, sem diferenças estatísticas significativas entre os eventos analisados (**Figura 11**).

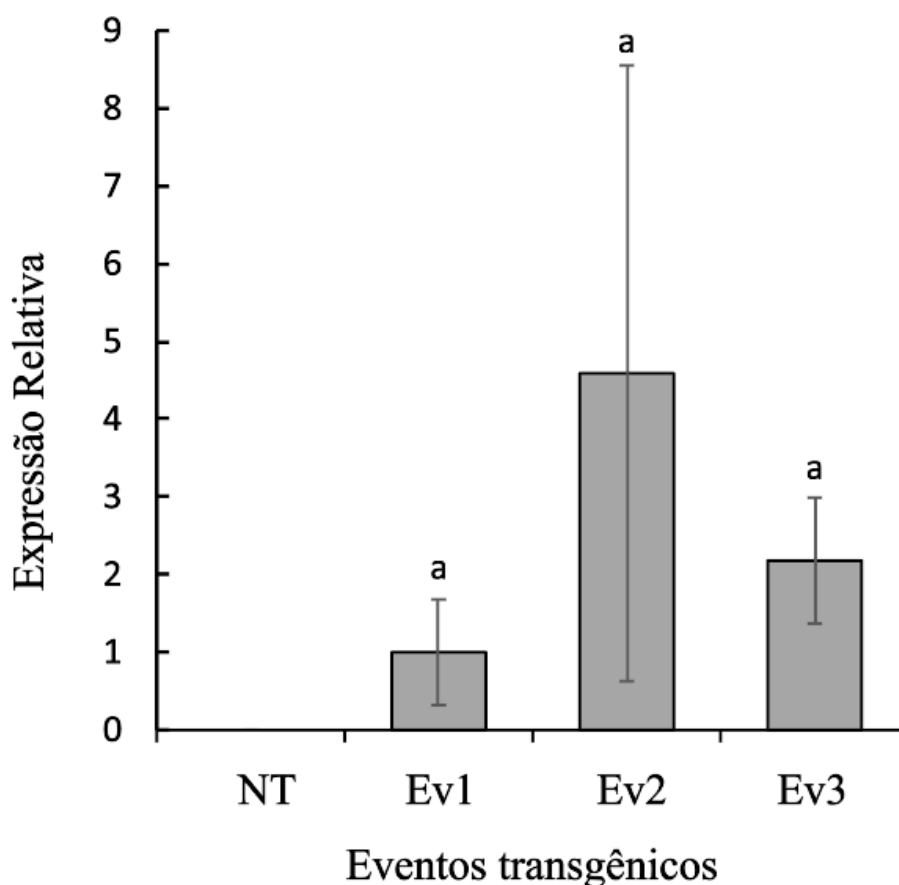


Figura 11 - Expressão relativa de *AdEXLB8* nas raízes de soja transgênica (Fonte: Compilação do autor). Superexpressão do transgene *AdEXLB8* avaliada por RTqPCR, em relação aos genes endógenos da soja (CYP e ELF), em plantas de três eventos independentes de transformação da geração T2 (Ev1, Ev2 e Ev3) e no controle, plantas não transformadas (NT). Barras representam o desvio padrão (Tukey ($p < 0,05$), $N = 4$).

6.4 ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM GALHAS DAS LINHAGENS DE SOJA GM

Análises histológicas das galhas induzidas por *M. incognita* aos 60 DAI revelaram alterações na morfologia das galhas nas linhagens transgênicas em comparação às plantas NT. As galhas das plantas NT apresentaram células gigantes bem desenvolvidas, preenchidas com citoplasma denso. Em contraste, as plantas GM de soja exibiram galhas com desenvolvimento atrasado ou abortado caracterizadas por células gigantes vazias, sugerindo a incapacidade do nematoide em estabelecer seu sítio de alimentação. Além disso, algumas galhas das plantas GM apresentaram células gigantes com *wall stubs*, que são resíduos de parede celular, indicando tentativas malsucedidas de divisão celular (**Figura 12**).

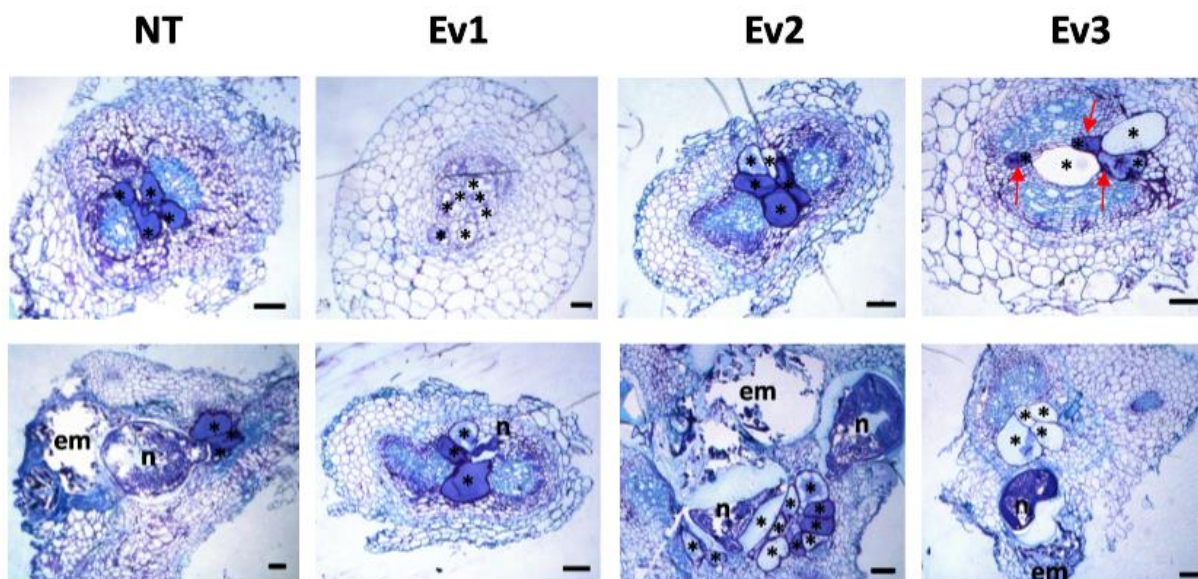


Figura 12 - Morfologia histológica de galhas em linhagens geneticamente modificadas (GM) de soja (Fonte: Compilação do autor). Secções de galhas induzidas por *M. incognita* nas raízes de plantas GM (Ev1, Ev2 e Ev3) e NT visualizadas em microscopia de campo claro. Setas vermelhas apontam para *wall stubs*; asterístico, células gigantes; n, nematoide; em, massas de ovos. Barra= 100µm.

7 DISCUSSÃO

Os NFG representam o grupo de nematoides que mais ameaça a produção agrícola mundial, e *Meloidogyne incognita* está entre as espécies mais devastadoras (Jones *et al.*, 2013; Bernard; Egnin; Bonsi, 2017). As formas de controle atuais, que se concentram principalmente no uso de nematicidas químicos e no desenvolvimento de cultivares resistentes por meio de melhoramento genético convencional, têm apresentado eficácia limitada (Wheeler *et al.*, 2014; Desaegeer; Dickson; Locascio, 2017). *M. incognita* segue vencendo o número restrito de cultivares resistentes disponíveis, enquanto diversos nematicidas foram banidos ou estão sendo gradualmente retirados do mercado devido aos seus impactos negativos no meio ambiente e na saúde humana (Silva *et al.*, 2014; Oka, 2020). Diante desse cenário, o desenvolvimento de estratégias inovadoras e ecologicamente sustentáveis para o controle de *M. incognita* torna-se essencial para promover sistemas agrícolas mais equilibrados e sustentáveis a longo prazo.

A engenharia genética tem possibilitado o desenvolvimento de culturas agrícolas aprimoradas, com características como resistência a fatores bióticos e abióticos, além de tolerância a herbicidas. Esses avanços contribuem para a redução dos custos de produção, diminuição no uso de pesticidas e herbicidas, o que, por sua vez, reduz o impacto ambiental e aumenta a eficiência agrícola. Esse impacto positivo é particularmente evidente na produção

de soja, milho e algodão, cujos rendimentos têm aumentado de maneira expressiva devido à introdução de variantes geneticamente modificadas (Brookes e Barfoot, 2020).

No melhoramento genético de plantas, a piramidação de genes é uma estratégia biotecnológica que permite a manipulação simultânea de múltiplos genes em uma planta-alvo, sendo amplamente utilizada no melhoramento genético moderno para aumentar a resistência a pragas em diversas culturas, uma vez que pode apresentar uma resistência maior e mais durável do que aquelas em que se utiliza um gene único (Halpin 2005; Shehryar *et al.*, 2020; Rajput *et al.*, 2023). A exemplo disso tem-se a variedade comercial de milho Genuity® SmartStax™, desenvolvida por meio do cruzamento de linhagens parentais transgênicas, que contém um conjunto de transgenes piramidados composto por seis genes *cry* distintos e confere resistência a diversas espécies de insetos das ordens Lepidoptera e Coleoptera (Storer; Thompson; Head, 2012). Chan *et al.* (2015) demonstraram, por meio de um sistema de superexpressão gênica dupla, que a utilização de um inibidor de cisteína proteinase de planta (*CeCPI*) juntamente com uma quitinase fúngica (*PjCHI-1*) em tomate (*Solanum lycopersicum*) pode aumentar a resistência a *M. incognita*. Além disso, diversos genes endógenos de NFG foram analisados por meio da metodologia de RNAi, cujo silenciamento resultou em fenótipos promissores para o desenvolvimento de culturas GM mais resistentes a esses parasitas (**Tabela S1**). Como exemplo, a piramidação de sequências de dsRNAs em plantas de algodão transgênicas, direcionada ao SGIH de três genes essenciais de *M. incognita*, reduziu significativamente a capacidade reprodutiva do nematoide nessas plantas (Lisei-de-Sá *et al.*, 2021). Considerando o potencial da piramidação de genes no desenvolvimento de genótipos vegetais mais tolerantes ao estresse biótico, este estudo apresentou uma abordagem inovadora para a redução da suscetibilidade de plantas de soja ao nematoide *M. incognita*, por meio da piramidação de duas estratégias biotecnológicas, a superexpressão do gene *AdEXLB8* e o SGIH de quatro genes críticos do nematoide: Cisteína protease - *Mi-CPL-1* (Dutta *et al.*, 2015), isocitrato liase - *Mi-ICL* (Lourenço-Tessutti *et al.*, 2015), fator de *splicing* - *Mi-FS* (Kumar *et al.*, 2017) e o efector *16D10* (Huang *et al.*, 2006b).

O cassete de expressão *ExpMinc2* (**Figura 4**) utilizado no processo de transformação genética foi projetado tendo em foco a expressão do gene *AdEXLB8* e dos fragmentos de dsRNA para os genes alvo de silenciamento em *M. incognita*, sob o controle dos promotores constitutivos *pUceA1.7* e *pUceS8.3*, respectivamente (Viana *et al.*, 2011; Fragoso *et al.*, 2022). Em estratégias de piramidação gênica, a utilização de diferentes promotores garante uma maior expressão dos transgenes ao evitar que diversas réplicas de uma mesma sequência promotora possam favorecer o silenciamento gênico dependente de homologia (Basso *et al.*, 2020a). O

promotor *pUceA1.7* foi selecionado para controlar a expressão de *AdEXLB8* por apresentar uma expressão alta e estável em raízes, local alvo da infecção por NFG (Viana *et al.*, 2011; Basso *et al.*, 2020a). Adicionalmente, a escolha do *pUceS8.3* para direcionar as sequências de dsRNA foi baseada em sua capacidade de conduzir efetivamente a superexpressão dessas moléculas em CG formadas por nematoides, em genótipos de soja transgênica (Fragoso *et al.*, 2022). Uma maior quantidade de cópias de um transgene pode interferir na sua expressão e promover até seu silenciamento gênico (Ribeiro *et al.*, 2021). Com o objetivo de contornar esta possibilidade, a técnica de transformação genética mediada por *A. tumefaciens* foi eleita em detrimento da biobalística convencional, que leva a maiores chances de múltiplas inserções do transgene no genoma da planta alvo, além da incorporação de outros componentes presentes no esqueleto do vetor, que não são essenciais para expressão gênica (Rivera *et al.*, 2012). A metodologia de transformação via *Agrobacterium* permite a integração do T-DNA na planta pela bactéria sem transferir sequências desnecessárias do vetor binário, além de assegurar um controle mais preciso sobre o número de cópias integradas, geralmente resultando em uma única cópia no genoma vegetal (Hansen e Chilton, 1996). Aqui, o processo de transformação genética de soja com o cassete de expressão *ExpMinc2* (**Figura 4**), realizado via *A. tumefaciens* conforme descrito por Paes-de-Melo *et al.* (2020), alcançou uma eficiência de 3%, com 15 plantas transgênicas T0 PCR-positivas obtidas a partir de 500 embriões transformados (**Figura 5**). Essa eficiência ficou abaixo da média reportada no protocolo utilizado neste trabalho (Paes-de-Melo *et al.*, 2020). No entanto, o valor obtido está dentro do intervalo observado em outras pesquisas envolvendo a transformação de soja, que frequentemente registram taxas de transformação entre 1% e 4%, dependendo da metodologia empregada e do genótipo utilizado (Paz *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2013; Testroet *et al.*, 2017).

O presente estudo avaliou a suscetibilidade de plantas de soja GM *ExpMinc2* à *M. incognita* por meio de três eventos independentes de transformação da geração T2. Os resultados obtidos demonstraram uma resposta positiva das plantas GM ao ataque do nematoide, com reduções significativas nas variáveis analisadas em comparação às plantas NT. Essas reduções indicam uma possível resistência parcial das plantas GM ao parasitismo de *M. incognita*, refletindo a eficácia das estratégias biotecnológicas empregadas. Em relação ao número de galhas, as plantas GM apresentaram uma redução média de 28,6% (**Figura 9a**) em comparação às plantas NT, o que é consistente com estudos prévios que indicam que a formação de galhas é uma das principais variáveis utilizadas para avaliar a resistência das plantas ao ataque de fitonematoides (Dong *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2017; Brasileiro *et al.*, 2021). Conforme observado por Dong *et al.* (2007) e Coyne e Ross (2014), a diminuição na quantidade

de galhas indica a habilidade da planta em resistir ou atenuar a infestação por fitonematoides, como *M. incognita*. Portanto é positivo o papel das estratégias aqui exploradas na redução da infestação por *M. incognita* nas plantas de soja GM *ExpMinc2*, apoiado pela produção reduzida de galhas nessas plantas. A redução do número de galhas causadas por NFG também foi relatada em *hairy roots* de soja que superexpressavam o gene *AdEXLB8*. Reduções de 82% foram observadas nessas raízes, em comparação com plantas controle, quando inoculadas com *M. javanica* (Guimarães *et al.*, 2017a). Por outro lado, Souza-Júnior *et al.* (2013) e Lourenço-Tessutti *et al.* (2015) relataram que não houve reduções significativas no número de galhas formadas por *M. incognita* em suas plantas de tabaco superexpressando o dsRNA para *Mi-CPL-1* e *Mi-ICL*, respectivamente.

O número de massas de ovos é um indicador reprodutivo que auxilia na avaliação da quantidade de fitonematoides que atingem a maturidade em uma planta. Visto que fêmeas adultas NFG geram descendência em uma única massa de ovos, essa quantidade reflete o número de fêmeas reprodutoras e fornece uma referência maior do nível de resistência (Coney e Ross, 2014). Assim, a redução significativa de 48,6% (**Figura 9b**) no número de massas de ovos observada nas plantas de soja *ExpMinc2* também é um indicativo da eficácia das modificações genéticas na redução da propagação do nematoide. De maneira semelhante, a formação de massas de ovos de *M. incognita* também foi afetada em 86,6% em plantas de *A. thaliana* carregando o dsRNA para silenciamento de *Mi-FS* (Kumar *et al.*, 2017). Em relação ao número de ovos, foi observada uma redução média de 59,4% nas plantas GM *ExpMinc2* (**Figura 9c**), o que é um indicador promissor da supressão da reprodução do nematoide. A diminuição do número de ovos é um fator crítico, pois reflete a capacidade da planta em limitar a disseminação do parasita, afetando diretamente a continuidade da infestação (Coyne e Ross, 2014). Essa redução no número de ovos está alinhada com outros estudos que demonstram a eficácia de modificações genéticas na diminuição da propagação de nematoides (Lisei-de-Sa *et al.*, 2021 Basso *et al.*, 2023; Moreira *et al.*, 2024). Nesse âmbito, Lourenço-Tessutti *et al.* (2015), reportaram reduções de 52% a 77% na oviposição de *M. incognita* em plantas de tabaco transgênicas superexpressando o dsRNA para SGIH do gene *Mi-ICL* e sugeriram o envolvimento do gene no desenvolvimento e reprodução de NFG. O FR também foi significativamente reduzido nas linhagens de soja *ExpMinc2*. Em média, a capacidade de reprodução do nematoide foi reduzida em 43,4% nos eventos GM (**Figura 9d**), o que sugere que os parasitas enfrentaram dificuldades em se proliferar nessas plantas. O mesmo efeito foi observado em linhagens transgênicas de algodão superexpressando sequências de dsRNA direcionadas a três dos quatro genes-alvo de *M. incognita* avaliados neste estudo (*Mi-CPL-1*,

Mi-ICL e *Mi-FS*, em comparação com *Mi-CPL-1*, *Mi-ICL*, *Mi-FS* e *16D10*) (Lisei-de-Sa *et al.*, 2021). Os autores relataram reduções de 60 a 78% no FR do NFG. Além disso, a estratégia de piramidação desses três genes levou a reduções significativas na formação de galhas (57–64%) e massas de ovos (58–67%), sugerindo que os genes *Mi-CPL-1*, *Mi-ICL* e *Mi-FS* desempenham uma função essencial no metabolismo, desenvolvimento e propagação de *M. incognita*.

Uma observação visual adicional, embora não quantificada, foi a redução no tamanho das galhas nas plantas de soja *ExpMinc2* (**Figura 10**) sugerindo que *M. incognita* teve dificuldades em estabelecer seu sítio de alimentação nessas linhagens. Essa observação é corroborada com os resultados observados nas análises histológicas das galhas (**Figura 12**). Nas plantas controle, as galhas apresentaram CG bem desenvolvidas e repletas de um denso citoplasma, característica comumente observadas em cultivares suscetíveis, nas quais os sítios de alimentação tendem a se expandir podendo até comprometer a distribuição de metabólitos pela planta através do tecido vascular (Almeida-Engler *et al.*, 2016; Wubben *et al.*, 2019). O oposto foi observado nas plantas GM que exibiam galhas com desenvolvimento retardado e repletas de CG vazias, desprovidas de citoplasma denso e dos componentes necessários para sustentar a alimentação do NFG. Além disso, algumas galhas das plantas GM apresentaram a formação de *wall stubs*, que são remanescentes de parede celular resultantes de tentativas falhas de eventos mitóticos, geralmente formadas durante uma interação planta-nematoide incompatível (Grundler; Sobczak; Golinowski, 1998; Almeida-Engler *et al.*, 2004; Banora *et al.*, 2011).

A superexpressão do gene *AdEXLB8* nas raízes das plantas transgênicas mostrou-se eficiente no estudo atual, com níveis de expressão relativa entre 1 e 4,5 (**Figura 11**). A literatura ainda apresenta divergências quanto ao papel das expansinas nas interações planta-micróbio. Enquanto algumas pesquisas indicam que a supressão de genes de expansinas reduz a infecção por patógenos e simbiontes (Gal *et al.*, 2006; Ding *et al.*, 2008; Marowa; Ding; Kong, 2016), outras sugerem que a superexpressão de expansinas pode mediar mecanismos de defesa contra NFG (Guimarães *et al.*, 2017 b; Brasileiro *et al.*, 2021; Basso *et al.*, 2023). Neste estudo, verificamos que a superexpressão de um gene de expansina da sub-família EXLB, *AdEXLB8*, nas raízes de soja, combinada com o SGIH de genes essenciais de *M. incognita*, contribuiu para a redução da suscetibilidade da planta ao NFG. Embora não seja possível determinar com certeza se essa redução foi resultado exclusivo da superexpressão da expansina, do SGIH ou da interação entre ambas as estratégias, evidências sugerem que a atividade de *AdEXLB8* pode induzir modificações na parede celular, impactando o processo de infecção dos nematoides, que dependem dessa interação com a estrutura celular vegetal para se estabelecerem no hospedeiro

(Brasileiro *et al.*, 2021). Apesar de o papel das expansinas na defesa contra NFG ainda não ter sido elucidado, Brasileiro *et al.* (2021) sugeriram que alterações biomecânicas na parede celular, induzidas pela superexpressão de *AdEXLB8*, podem ativar de forma contínua as respostas de defesa da planta que desencadeiam a sinalização de fitormônios frequentemente relacionados ao estresse vegetal, como o ácido abscísico (ABA) e o ácido jasmônico (JA) (Yang *et al.*, 2019). Além disso, um experimento de validação realizados em sistemas de *hairy roots* de amendoim, no qual o gene *AdEXLB8* foi superexpresso, demonstrou reduções significativas de 98% no número de galhas formadas nas raízes transgênicas após a inoculação com *M. arenaria* evidenciando o papel crucial de *AdEXLB8* na resistência a esses patógenos (Guimarães *et al.*, 2017b).

Para avaliar os efeitos da putativa ingestão de dsRNAs e/ou siRNAs pelos nematoides na expressão de seus genes *Mi-CPL-1*, *Mi-ICL*, *Mi-FS* e *I6D10*, ensaios de RT-qPCR a partir de amostras de RNA de galhas induzidas por *M. incognita* nas raízes das plantas de soja transgênicas foram realizados. As análises mostraram que não houve diferença estatística significativa entre a expressão dos genes alvo de silenciamento em nematoides que se alimentaram das plantas transgênicas de soja *ExpMinc2* e de plantas NT. Acredita-se que esse resultado tenha sido causado pelo alto desvio padrão observado no grupo controle, em razão do número limitado de amostras de RNA íntegro (apenas 3 de cada evento) disponíveis para as análises, uma vez que é pouco provável obter resultados confiáveis e reprodutíveis com amostras de tamanho reduzido (Maleki *et al.*, 2019; Andrade, 2020). Portanto, o experimento será refeito com um grupo amostral maior, a fim de possibilitar conclusões mais robustas e confiáveis.

8 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste estudo, foram desenvolvidas plantas de soja GM por meio da combinação de duas abordagens biotecnológicas. A primeira estratégia consistiu na superexpressão do gene *AdEXLB8*, enquanto a segunda envolveu a superexpressão de sequências de dsRNA para o silenciamento de quatro genes essenciais (*Mi-CPL-1*, *Mi-ICL*, *Mi-FS* e *16D10*) de *M. incognita*. Os resultados obtidos demonstraram a eficácia da transformação genética, com a confirmação da inserção do cassete de expressão *ExpMinc2*, conforme indicado nas caracterizações moleculares. Além disso, pode-se concluir que a estratégia adotada reduziu a suscetibilidade das plantas de soja ao parasitismo de *M. incognita*, pois foram observadas intercorrências no processo de infecção do nematoide, incluindo a diminuição na formação de galhas, dificuldades de estabelecimento no sítio de alimentação e redução na capacidade reprodutiva do nematoide.

Por fim, os dados obtidos neste estudo ressaltam a importância da piramidação de estratégias para desenvolver plantas resistentes a fitonematoides. Esses resultados têm o potencial de promover uma agricultura mais sustentável, diminuindo a dependência de produtos químicos.

REFERÊNCIAS

- ABAD, P. *et al.* Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 8, p. 909-915, 2008.
- ALMEIDA-ENGLER, J. *et al.* A cellular outlook of galls induced by root-knot nematodes in the model host *Arabidopsis thaliana*. **Nematoda**, v. 1, n. e062016, 2016.
- ALMEIDA-ENGLER, J. *et al.* Dynamic cytoskeleton rearrangements in giant cells and syncytia of nematode-infected roots. **The Plant Journal**, v. 38, n. 1, p. 12-26, 2004.
- ALMEIDA-ENGLER, J. *et al.* Molecular markers and cell cycle inhibitors show the importance of cell cycle progression in nematode-induced galls and syncytia. **The Plant Cell**, v.11, n.5, p.793-807, 1999.
- ALTPETER, F. *et al.* Advancing crop transformation in the era of genome editing. **The Plant Cell**, v. 28, n. 7, p. 1510-1520, 2016.
- ANDRADE, C. Sample size and its importance in research. **Indian Journal of Psychological Medicine**, v. 42, n. 1, p. 102-103, 2020.
- ARAGÃO, F. J. L.; RIBEIRO, A. G. Detecção de proteínas pela técnica de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. **Manual de transformação genética de plantas**. 2. ed. rev. ampl. Brasília, DF: Embrapa. p. 329 -342. 2015.
- ARAÚJO, A. C. *et al.* Ectopic expression of a truncated NLR gene from wild *Arachis* enhances resistance to *Fusarium oxysporum*. **Frontiers in Plant Science**, v. 15, p. 1486820, 2024.
- ARRAES, F. B. M. *et al.* Integrated omic approaches reveal molecular mechanisms of tolerance during soybean and *Meloidogyne incognita* interactions. **Plants**, v. 11, n. 20, p. 2744, 2022.
- BAERMANN, G. *et al.* A simple method for the detection of *Ankylostomum* (nematode) larvae in soil tests. **Mededelingen uit het Geneeskundig Laboratorium te Weltevreden**, v. 57, p. 131-137, 1917.
- BANERJEE, S. *et al.* RNA interference: a novel source of resistance to combat plant parasitic nematodes. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 834, 2017.
- BANORA, M. Y. *et al.* Feeding cells induced by phytoparasitic nematodes require γ -tubulin ring complex for microtubule reorganization. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 12, p. e1002343, 2011.
- BARROS, F. M. do R. *et al.* Interactions between soil bacterial diversity and plant-parasitic nematodes in soybean plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 88, n. 17, p. e00963-22, 2022.

BARTLEM, D. G.; JONES, M. G. K.; HAMMES, U. Z. Vascularization and nutrient delivery at root-knot nematode feeding sites in host roots. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 7, p. 1789–1798, 2014.

BASSO, M. F. *et al.* Insights obtained using different modules of the cotton *uceA1.7* promoter. **Planta**, v. 251, p. 1-11, 2020a.

BASSO, M. F. *et al.* *MiDaf16-like* and *MiSkn1-like* gene families are reliable targets to develop biotechnological tools for the control and management of *Meloidogyne incognita*. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 6991, 2020b.

BASSO, M. F. *et al.* Overexpression of the *GmEXPA1* gene reduces plant susceptibility to *Meloidogyne incognita*. **Plant Cell Reports**, v. 42, n. 1, p. 137-152, 2023.

BASSO, M. F.; NEVES, M. F.; GROSSI-DE-SA, M. F. Agriculture evolution, sustainability and trends, focusing on Brazilian agribusiness: a review. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 7, 1296337, 2024.

BAULCOMBE, D. RNA silencing in plants. **Nature**, v. 431, p. 356–363, 2004.

BELLAFIGLIORE, S. *et al.* Direct identification of the *Meloidogyne incognita* secretome reveals proteins with host cell reprogramming potential. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 10, p. e1000192, 2008.

BEREZIKOV, E. Evolution of microRNA diversity and regulation in animals. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 12, p. 846–860, 2011.

BERNARD, G. C.; EGNIN, M.; BONSI, C. The impact of plant-parasitic nematodes on agriculture and methods of control. **Nematology-Concepts, Diagnosis and Control**, v. 1, p. 121-151, 2017.

BAKHETIA, M. *et al.* RNA interference of dual oxidase in the plant nematode *Meloidogyne incognita*. **Molecular Plant-Microbe Interactions Journal**, v. 18, n. 10, p. 1099-1106, 2005.

BIRD, A. F. Plant response to root-knot nematode. **Annual Review of Phytopathology**, v. 12, n. 1, p. 69-85, 1974.

BLACK, D. L. Protein diversity from alternative splicing: a challenge for bioinformatics and post-genome biology. **Cell**, v. 103, n. 3, p. 367-370, 2000.

BOLLER, T.; HE, S. Y. Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. **Science**, v. 324, n. 5928, p. 742-744, 2009.

BOURNAUD, C. *et al.* *Meloidogyne incognita* PASSE-MURAILLE (*MiPM*) gene encodes a cell-penetrating protein that interacts with the CSN5 subunit of the COP9 signalosome. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 904, 2018.

- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BRASILEIRO, A. C. M. *et al.* Ectopic expression of an expansin-like B gene from wild *Arachis* enhances tolerance to both abiotic and biotic stresses. **The Plant Journal**, v. 107, n. 6, p. 1681-1696, 2021.
- BROOKES, G; BARFOOT, P. GM crop technology use 1996-2018: farm income and production impacts. **GM Crops & Food**, v. 11, n. 4, p. 242-261, 2020.
- CAILLAUD, M. C. *et al.* MAP65-3 microtubule-associated protein is essential for nematode-induced giant cell ontogenesis in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 20, n. 2, p. 423-437, 2008.
- CARNEIRO, R. M. D. G.; LIMA, F. S. O.; CORREIA, V. R. Methods and tools currently used for the identification of plant parasitic nematodes. In: **Nematology - Concepts, Diagnosis and Control**. InTech, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.69403>. Acesso em: 8 de janeiro de 2025.
- CARTHEW, R. W.; SONTHEIMER, E. J. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 642–655, 2009.
- CASTAGNONE-SERENO, P. Genetic variability and adaptive evolution in parthenogenetic root-knot nematodes. **Heredity**, v. 96, n. 4, p. 282-289, 2006.
- CASTAGNONE-SERENO, P.; DANCHIN, E. G. J. Parasitic success without sex – the nematode experience. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 27, p. 1323–1333, 2014.
- CHAN, Y. L. *et al.* Pyramiding taro cystatin and fungal chitinase genes driven by a synthetic promoter enhances resistance in tomato to root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Plant Science**, v. 231, p. 74-81, 2015.
- CHARLTON, W. L. *et al.* Additive effects of plant expressed double-stranded RNAs on root knot nematode development. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 7, p. 855–864, 2010.
- CHAUDHARY, S. *et al.* Host-induced silencing of *Mi-msp-1* confers resistance to root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in eggplant. **Transgenic Research**, v. 28, n. 3–4, p. 327–340, 2019.
- CHEN, J. *et al.* A novel *Meloidogyne graminicola* effector, *MgGPP*, is secreted into host cells and undergoes glycosylation in concert with proteolysis to suppress plant defenses and promote parasitism. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 4, p. 1–24, 2017.
- CHENG, X. *et al.* Trends in the global commercialization of genetically modified crops in 2023. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 23, n. 12, p. 3943-3952, 2024.
- CONAB. Boletim da Soja: Safra 2023/2024. **Companhia nacional de abastecimento**. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/>. Acesso em: 10 dez. 2024.

COSGROVE, D. J. New genes and new biological roles for expansins. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 3, n. 1, p. 73-78, 2000.

COSGROVE, D. J. Plant expansins: diversity and interactions with plant cell walls. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 25, p. 162-172, 2015.

COYNE, D. L.; ROSS, J. L. Protocol for nematode resistance screening root-knot nematodes *Meloidogyne spp.* Ibadan, Nigeria: **International Institute of Tropical Agriculture (IITA)**, 2014.

DANCHIN, E. G. J. *et al.* Identification of novel target genes for safer and more specific control of root-knot nematodes from a pan-genome mining. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 10, 2013.

DAS, S. *et al.* Role of biotechnology in creating sustainable agriculture. **PLOS Sustainability and Transformation**, v. 2, n. 7, p. e0000069, 2023.

DAVIS, E. L.; HUSSEY, R. S.; BAUM, T. J. Getting to the roots of parasitism by nematodes. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 3, p. 134-141, 2004.

DESAEGER, J.; DICKSON, D. W.; LOCASCIO, S. J. Methyl bromide alternatives for control of root-knot nematode (spp.) in tomato production in Florida. **Journal of Nematology**, v. 49, n. 2, p. 140-149, 2017.

DIAS, W. P. *et al.* *Nematoides em soja: Identificação e controle*. Londrina: Embrapa Soja, 2010. (Circular Técnica, n. 76). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/854178/1/CT76eletronica.pdf>. Acesso em: 20 dez. 2025.

DING, X. *et al.* Activation of the indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3-8 suppresses expansin expression and promotes salicylate- and jasmonate-independent basal immunity in rice. **The Plant Cell**, v. 20, n. 1, p. 228-240, 2008.

DINH, P. T. Y. *et al.* Plant-mediated RNA interference of effector gene *Mc16D10L* confers resistance against *Meloidogyne chitwoodi* in diverse genetic backgrounds of potato and reduces pathogenicity of nematode offspring. **Nematology**, v. 16, n. 6, p. 669–682, 2014a.

DINH, P. T. Y. *et al.* RNA Interference of effector gene *Mc16D10L* confers resistance against *Meloidogyne chitwoodi* in *Arabidopsis* and potato. **Nematology**, v. 104, n. 10, p. 1098–1106, 2014b.

DONG, W. *et al.* Comparison of methods for assessing resistance to *Meloidogyne arenaria* in peanut. **Journal of Nematology**, v. 39, n. 2, p. 169–175, 2007.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 9, p. 11–15, 1987.

DUBREUIL, G. *et al.* Transcriptome analysis of root-knot nematode functions induced in the early stages of parasitism. **New Phytologist**, v. 176, n. 2, p. 426–436, 2007.

DUTTA, T. K. *et al.* Tomato transgenic plants expressing hairpin construct of a nematode protease gene conferred enhanced resistance to root-knot nematodes. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1–14, 2015.

DUTTA, T. K.; BANAKAR, P.; RAO, U. The status of RNAi-based transgenic research in plant nematology. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1–7, 2015.

EMBRAPA Soja. Cultivar de soja BRS 284. Londrina: Embrapa Soja, 2019. Disponível em: https://bs.sede.embrapa.br/2019/relatorios/soja_brs284.pdf. Acesso em: 01 dez. 2025.

FAIRBAIRN, D. J. *et al.* Host-delivered RNAi: an effective strategy to silence genes in plant parasitic nematodes. **Planta**, v. 226, n. 6, p. 1525–1533, 2007.

FANELLI, E. *et al.* Analysis of chitin synthase function in a plant parasitic nematode, *Meloidogyne artiellia*, using RNAi. **Gene**, v. 349, p. 87–95, 2005.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Statistical Yearbook 2022**. Roma, p. 382, 2022.

FIRE, A. *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, n. 6669, p. 806–811, 1998.

FORGHANI, F; HAJIHASSANI, A. Recent advances in the development of environmentally benign treatments to control root-knot nematodes. **Frontiers in plant science**, v. 11, p. 1125, 2020.

FRAGOSO, R. R. *et al.* Functional characterization of the *pUceS8.3* promoter and its potential use for ectopic gene overexpression. **Planta**, v. 256, n. 69, p. 1-18, 2022.

GAL, T. Z. *et al.* Expression of a plant expansin is involved in the establishment of root knot nematode parasitism in tomato. **Planta**, v. 224, p. 155-162, 2006.

GELVIN, Stanton B. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 1, p. 16-37, 2003.

GOMEZ-CASATI, D. F. *et al.* Omics approaches for the engineering of pathogen resistant plants. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 19, n. 1, p. 89-98, 2016.

GRUNDLER, F. M. W; SOBCZAK, M; GOLINOWSKI, W. Formation of wall openings in root cells of *Arabidopsis thaliana* following infection by the plant-parasitic nematode *Heterodera schachtii*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 104, p. 545-551, 1998.

GUDYNAITE-SAVITCH, L.; JOHNSON, D. A.; MIKI, B. L. A. Strategies to mitigate transgene-promoter interactions. **Plant Biotechnology Journal**, v. 7, p. 472–485, 2009.

GUIMARÃES, L. A. *et al.* Ex vitro hairy root induction in detached peanut leaves for plant–nematode interaction studies. **Plant Methods**, v. 13, p. 1-10, 2017b.

- GUIMARÃES, L. A. *et al.* Genome-wide analysis of expansin superfamily in wild *Arachis* discloses a stress-responsive expansin-like B gene. **Plant Molecular Biology**, v. 94, p. 79-96, 2017a.
- GUO, J. *et al.* A single origin and moderate bottleneck during domestication of soybean (*Glycine max*): implications from microsatellites and nucleotide sequences. **Annals of Botany**, v. 106, n. 3, p. 505-514, 2010.
- HADA, A. *et al.* Host-mediated RNAi for simultaneous silencing of different functional groups of genes in *Meloidogyne incognita* using fusion cassettes in *Nicotiana tabacum*. **Plant Cell Reports**, v. 40, n. 12, p. 2287-2302, 2021.
- HAJIHASSANI, A. *et al.* Characterization of resistance to major tropical root-knot nematodes (*Meloidogyne spp.*) in *Solanum sisymbriifolium*. **Phytopathology**, v. 110, n. 3, p. 666-673, 2020.
- HALPIN, C. Gene stacking in transgenic plants—the challenge for 21st century plant biotechnology. **Plant biotechnology journal**, v. 3, n. 2, p. 141-155, 2005.
- HAMAWAKI, O.T. *et al.* Evaluation of soybean breeding lineages to new sources of root-knot nematode resistance. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 43, p. e009519, 2019.
- HANSEN, G.; CHILTON, M. “Agrolistic” transformation of plant cells: integration of T strands generated in planta. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 25, p. 14978-14983, 1996.
- HARTMAN, G.L.; WEST, E.D.; HERMAN, T.K. Crops that feed the World .2 Soybean-worldwide production, use, and constraints caused by pathogens and pests. **Food Security**, v.3, p.5–17, 2011.
- HASSAN, M. U. *et al.* Heat stress in cultivated plants: Nature, impact, mechanisms, and mitigation strategies - A review. **Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology**, v. 155, n. 2, p. 211-234, 2021.
- HINCHEE, M. A.W. *et al.* Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. **Nature Biotechnology**, v. 6, n. 8, p. 915-922, 1988.
- HUANG, G. *et al.* A profile of putative parasitism genes expressed in the esophageal gland cells of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 16, n. 5, p. 376–381, 2003.
- HUANG, G. *et al.* A root-knot nematode secretory peptide functions as a ligand for a plant transcription factor. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 19, n. 5, p. 463-470, 2006a.
- HUANG, G. *et al.* Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 103, n. 39, p. 14302–14306, 2006b.

- HUSSEY, R. S.; BARKER, K. R. A comparison of methods collecting inocula of *Meloidogyne spp.* including a new technique. **Plant Disease Reporter**, v. 57, n. 12, p. 1025-1028, 1973.
- HWANG, H. H.; YU, M.; LAI, E. M. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: biology and applications. **The Arabidopsis Book**, v. 15, n. e0186, 2017.
- IBERKLEID, I. *et al.* Fatty acid-and retinol-binding protein, *Mj-FAR-1* induces tomato host susceptibility to root-knot nematodes. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. 1–14, 2013.
- IBRAHIM, H. M. M. *et al.* Post-transcriptional gene silencing of root-knot nematode in transformed soybean roots. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 90–99, 2011.
- ISAAA. ISAAA Brief 55-2019: Executive Summary Biotech Crops Drive Socio Economic Development and Sustainable Environment in the New Frontier. **International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications**, 2019.
- JAN, R. *et al.* Plant secondary metabolite biosynthesis and transcriptional regulation in response to biotic and abiotic stress conditions. **Agronomy**, v. 11, n. 5, p. 968, 2021.
- JANILA, P. *et al.* Genomic tools in groundnut breeding program: status and perspectives. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 289, 2016.
- JAOUANNET, M. *et al.* The root-knot nematode calreticulin *Mi-CRT* is a key effector in plant defense suppression. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 26, n. 1, p. 97–105, 2013.
- JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature Reviews**, v. 444, n. 7117, p. 323-329, 2006.
- JONES, J. T. *et al.* Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 14, n. 9, p. 946-961, 2013.
- JONES, L. M.; GIORGI, C.; URWIN, P. E. *C. elegans* as a resource for studies on plant parasitic nematodes. **Genomics and Molecular Genetics of Plant-nematode Interactions**, p. 175-220, 2011.
- JOSHI, I. *et al.* Conferring root-knot nematode resistance via host-delivered RNAi-mediated silencing of four *Mi-msp* genes in *Arabidopsis*. **Plant Science**, v. 298, p. 110592, 2020.
- JOSHI, I. *et al.* Gall-specific promoter, an alternative to the constitutive *CaMV35S* promoter, drives host-derived RNA interference targeting *Mi-msp2* gene to confer effective nematode resistance. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 1007322, 2022.
- KAKRANA, A. *et al.* Identification, validation and utilization of novel nematode-responsive root-specific promoters in *Arabidopsis* for inducing host-delivered RNAi mediated root-knot nematode resistance. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 2049, 2017.

- KAMARAJU, D. *et al.* Host-induced RNA interference targeting the neuromotor gene FMRamide-like peptide-14 (*Mi-flp14*) perturbs *Meloidogyne incognita* parasitic success in eggplant. **Plant Cell Reports**, v. 43, n. 7, p. 178, 2024.
- KAVITHA, P. G.; JONATHAN, E. I.; NAKKEERAN, S. Life cycle, histopathology and yield loss caused by root knot nematode, *Meloidogyne incognita* on Noni. **Madras Agricultural Journal**, v. 98, n. 10-12, p. 386-389, 2011.
- KENDE, H. *et al.* Nomenclature for members of the expansin superfamily of genes and proteins. **Plant Molecular Biology**, v. 55, p. 311-314, 2004.
- KLUMPER, W.; QAIM, M. A meta-analysis of the impacts of genetically modified crops. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. e111629, 2014.
- KOMARI, T. *et al.* Binary vectors and super-binary vectors. **Agrobacterium Protocols**, p. 15-42, 2006.
- KUMAR, A. *et al.* Host-delivered RNAi-mediated root-knot nematode resistance in *Arabidopsis* by targeting splicing factor and integrase genes. **Journal of General Plant Pathology**, v. 83, n. 2, p. 91–97, 2017.
- KUMAR, A. *et al.* Host-delivered RNAi-mediated silencing of the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) effector genes, *Mi-msp10* and *Mi-msp23*, confers resistance in *Arabidopsis* and impairs reproductive ability of the root-knot nematode. **Planta**, v. 256, n. 4, p.74, 2022.
- LI, Y. *et al.* Plant expansins are a complex multigene family with an ancient evolutionary origin. **Plant Physiology**, v. 128, n. 3, p. 854-864, 2002.
- LIMA, F. S. *et al.* Nematodes affecting soybean and sustainable practices for their management. **Soybean–Basis of Yield, Biomass and Productivity**, p. 95-110, 2017.
- LIN, B. *et al.* A novel effector protein *MJ-NULG1a* targeted to giant cell nuclei plays a role in *Meloidogyne javanica* parasitism. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 26, n. 1, p. 55–66, 2013.
- LIN, B. *et al.* A novel nematode effector suppresses plant immunity by activating host reactive oxygen species-scavenging system. **New Phytologist**, v. 209, n. 3, p. 1159–1173, 2016.
- LISEI-DE-SÁ, M. E. *et al.* Pyramiding dsRNAs increases phytonematode tolerance in cotton plants. **Planta**, v. 254, n. 6, p. 121, 2021.
- LOURENÇO-TESSUTTI, I. T. *et al.* Knock-down of heat-shock protein 90 and isocitrate lyase gene expression reduced root-knot nematode reproduction. **Phytopathology**, v. 105, n. 5, p. 628–637, 2015.
- LU, P. *et al.* Physiological effects of *Meloidogyne incognita* infection on cotton genotypes with differing levels of resistance in the greenhouse. **Journal of Nematology**, v. 46, n. 4, p. 352, 2014.

MAGGENTI, A. R. Nematodes: development as plant parasites. **Annual Review of Microbiology**, v. 35, p. 135-154, 1981.

MALEKI, F. *et al.* Size matters: how sample size affects the reproducibility and specificity of gene set analysis. **Human Genomics**, v. 13, p. 1-12, 2019.

MAROWA, P.; DING, A.; KONG, Y. Expansins: roles in plant growth and potential applications in crop improvement. **Plant Cell Reports**, v. 35, p. 949-965, 2016.

MCCARTER, J. P. *et al.* Analysis and functional classification of transcripts from the nematode *Meloidogyne incognita*. **Genome Biology**, v. 4, n. 4, p. R26, 2003.

MCQUEEN-MASON, S.; DURACHKO, D. M.; COSGROVE, D. J. Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. **The Plant Cell**, v. 4, n. 11, p. 1425-1433, 1992.

MELAKEBERHAN, H. *et al.* Effect of *Meloidogyne incognita* on plant nutrient concentration and its influence on the physiology of beans. **Journal of Nematology**, v. 19, n. 3, p. 324, 1987.

MELOTTO, M. *et al.* Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. **Cell**, v. 126, n. 5, p. 969-980, 2006.

MENDES, R. A. G. *et al.* In planta RNAi approach targeting three *M. incognita* effector genes disturbed the process of infection and reduced plant susceptibility. **Experimental Parasitology**, v. 238, p. 108246, 2022.

MENDES, R. A. G. *et al.* *Minc00344* and *Mj-NULG1a* effectors interact with *GmHub10* protein to promote the soybean parasitism by *Meloidogyne incognita* and *M. javanica*. **Experimental Parasitology**, v. 229, p. 108153, 2021.

MIRANDA, V. J. *et al.* Validation of reference genes aiming accurate normalization of qPCR data in soybean upon nematode parasitism and insect attack. **BMC Research Notes**, v. 6, p. 1-10, 2013.

MITIKU, M. Plant-parasitic nematodes and their management: A review. **Agricultural Research and Technology**, v. 8, n. 1, p. 30-38, 2018.

MOREIRA, V. J. V. *et al.* In planta RNAi targeting *Meloidogyne incognita* *Minc16803* gene perturbs nematode parasitism and reduces plant susceptibility. **Journal of Pest Science**, v. 97, n. 1, p. 411-427, 2024.

MOREIRA, V. J. V. *et al.* *Minc03328* effector gene downregulation severely affects *Meloidogyne incognita* parasitism in transgenic *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, v. 255, n. 2, p. 44, 2022.

MOTA, A. P. Z. *et al.* Defining the combined stress response in wild *Arachis*. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 11097, 2021.

NAWAZ, M. *et al.* A review of plants strategies to resist biotic and abiotic environmental stressors. **Science of the Total Environment**, p. 165832, 2023.

NEVEU, C.; ABAD, P.; CASTAGNONE-SERENO, P. Molecular cloning and characterization of an intestinal cathepsin L protease from the plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 63, n. 3, p. 159–165, 2003.

NGUYEN, C. N. *et al.* A root-knot nematode small glycine and cysteine-rich secreted effector, *MiSGCR1*, is involved in plant parasitism. **New Phytologist**, v. 217, n. 2, p. 687–699, 2018.

NICOL, J. M. *et al.* Current nematode threats to world agriculture. **Genomics and Molecular Genetics of Plant-nematode Interactions**, p. 21-43, 2011.

NISHAD, R. *et al.* Modulation of plant defense system in response to microbial interactions. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1298, 2020.

NIU, J. *et al.* *Msp40* effector of root-knot nematode manipulates plant immunity to facilitate parasitism. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–13, 2016.

NIU, J. *et al.* RNAi silencing of the *Meloidogyne incognita* *Rpn7* gene reduces nematode parasitic success. **European Journal of Plant Pathology**, v. 134, n. 1, p. 131–144, 2012.

NTALLI, N. *et al.* Acetic acid, 2-undecanone, and (E)-2-decenal ultrastructural malformations on *Meloidogyne incognita*. **Journal of Nematology**, v. 48, n. 4, p. 248–260, 2016.

ODELL, J. T.; NAGY, F.; CHUA, N. H. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. **Nature**, v. 313, p. 810–812, 1985.

OKA, Y. From old-generation to next-generation nematicides. **Agronomy**, v. 10, n. 9, p. 1387, 2020.

PAES-DE-MELO, B. *et al.* Soybean embryonic axis transformation: combining biolistic and *Agrobacterium*-mediated protocols to overcome typical complications of in vitro plant regeneration. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 1228, 2020.

PAPOLU, P. K. *et al.* Utility of host delivered RNAi of two FMRF amide like peptides, *flp 14* and *flp-18*, for the management of root knot nematode, *Meloidogyne incognita*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. 1–16, 2013.

PAZ, M. M. *et al.* Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation. **Plant Cell Reports**, v. 25, p. 206–213, 2006.

QUENTIN, M.; ABAD, P.; FAVERY, B. Plant parasitic nematode effectors target host defense and nuclear functions to establish feeding cells. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 53, 2013.

RAJPUT, R. *et al.* Gene pyramiding in transgenic plant development: approaches and challenges. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 42, n. 10, p. 6038-6056, 2023.

RANCUREL, C. *et al.* SATQPCR: Website for statistical analysis of real-time quantitative PCR data. **Molecular and Cellular Probes**, v. 46, p. 1–2, 2019.

RIBEIRO, T. P. *et al.* Improved cotton transformation protocol mediated by *Agrobacterium* and biolistic combined-methods. **Planta**, v. 254, p. 1-14, 2021.

RIBEIRO, T. P. *et al.* Transgenic cotton expressing Cry10Aa toxin confers high resistance to the cotton boll weevil. **Plant Biotechnology Journal**, v. 15, n. 8, p. 997-1009, 2017.

RIVERA, A. L. *et al.* Physical methods for genetic plant transformation. **Physics of Life Reviews**, v. 9, n. 3, p. 308-345, 2012.

ROCAFORT, M; FUDAL, I; MESARICH, C. H. Apoplastic effector proteins of plant-associated fungi and oomycetes. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 56, p. 9-19, 2020.

ROLLA, A. A. P. *et al.* Phenotyping soybean plants transformed with rd29A: *AtDREB1A* for drought tolerance in the greenhouse and field. **Transgenic Research**, v. 23, p. 75-87, 2014.

SANFORD, J. C. The biolistic process. **Trends in Biotechnology**, v. 6, n. 12, p. 299-302, 1988.

SCHAFER, W. Nematode nervous systems. **Current Biology**, v. 26, n. 20, p. 955-959, 2016.

SCHOCH, C. L. *et al.* *NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database (Oxford)*. baaa062. PubMed: 32761142 PMC: PMC7408187, 2020.

SEN, G. L.; BLAU, H. M. A brief history of RNAi: the silence of the genes. **The FASEB Journal**, v. 20, n. 9, p. 1293–1299, 2006.

SHAH, M. M.; MAHAMOOD, M. (Eds.). **Nematology - Concepts, Diagnosis and Control**. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5772/66851>. Acesso em: 02 dez. 2025.

SHEHRYAR, K. *et al.* Transgene stacking as effective tool for enhanced disease resistance in plants. **Molecular Biotechnology**, v. 62, p. 1-7, 2020.

SHINGLES, J. *et al.* *Meloidogyne incognita*: Molecular and biochemical characterisation of a cathepsin L cysteine proteinase and the effect on parasitism following RNAi. **Experimental Parasitology**, v. 115, n. 2, p. 114–120, 2007.

SIDDIQUE, S. *et al.* Recognition and response in plant–nematode interactions. **Annual Review of Phytopathology**, v. 60, p. 143-162, 2022.

SILVA, E. H. *et al.* Genetic variability and virulence of *Meloidogyne incognita* populations from Brazil to resistant cotton genotypes. **European Journal of Plant Pathology**, v. 139, p. 195-204, 2014.

- SILVA, Paolo L. R. **Validação in planta de potenciais genes no controle de fitonematoides, via tecnologia de RNA interferente**. 2020. 131f. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) – Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2020.
- SMITH, N. A. *et al.* Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. **Nature**, v.407, p. 319-320, 2000.
- SONG, Z. Y. *et al.* Screening Chinese soybean genotypes for *Agrobacterium*-mediated genetic transformation suitability. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, v. 14, n. 4, p. 289-298, 2013.
- SOUZA-JÚNIOR, J. D. A. *et al.* Knocking-down *Meloidogyne incognita* proteases by plant-delivered dsRNA has negative pleiotropic effect on nematode vigor. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. 1–17, 2013.
- STORER, N. P.; THOMPSON, G. D.; HEAD, G. P. Application of pyramided traits against Lepidoptera in insect resistance management for Bt crops. **GM Crops & Food**, v. 3, n. 3, p. 154-162, 2012.
- SUBEDI, S; THAPA, B; SHRESTHA, J. Root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) and its management: a review. **Journal of Agriculture and Natural Resources**, v.3, p.21-31, 2020.
- TESTROET, A. *et al.* Comparison of transformation frequency using the bar gene regulated by the CaMV 35S or NOS promoter in *Agrobacterium*-mediated soybean (*Glycine max L.*) transformation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 53, p. 188-199, 2017.
- TRUDGILL, D. L.; BLOK, V. C. Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 39, n. 1, p. 53-77, 2001.
- TURNBULL, C.; LILLEMO, M.; HVOSLEF-EIDE, T. A. K. Global regulation of genetically modified crops amid the gene edited crop boom - a review. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 630396, 2021.
- VAN DEN HOOGEN, J. *et al.* Soil nematode abundance and functional group composition at a global scale. **Nature**, v. 572, p.194-198, 2019.
- VIANA, A. A. B. *et al.* Isolation and functional characterization of a cotton ubiquitination-related promoter and 5'UTR that drives high levels of expression in root and flower tissues. **BMC Biotechnology**, v. 11, p. 1-11, 2011.
- VIEIRA, P.; ENGLER, G.; ALMEIDA-ENGLER, J. Enhanced levels of plant cell cycle inhibitors hamper root-knot nematode-induced feeding site development. **Plant Signaling & Behavior**, v. 8, n. 12, p. e26409, 2013.
- VIEIRA-FILHO, J. E. R. A produção de soja e sua importância na economia brasileira. **Revista de Política Agrícola**, v. 33, p. e01962, 2024.
- VOINNET, O. RNA silencing as a plant immune system against viruses. **Trends in Genetics**, v. 17, n. 8, p. 449–459, 2001.

- VRAIN, T. C. A technique for the collection of larvae of *Meloidogyne spp.* and a comparison of eggs and larvae as inocula. **Journal of Nematology**, v. 9, n. 3, p. 249-250, 1977.
- WADSWORTH, W. G.; RIDDLE, D. L. Developmental regulation of energy metabolism in *Caenorhabditis elegans*. **Developmental Biology**, v. 132, p. 167–173, 1989.
- WAN, J. *et al.* Cell wall associated immunity in plants. **Stress Biology**, v. 1, n. 1, p. 3, 2021.
- WANG, C.; MASLER, E.; ROGERS, S. Responses of *Heterodera glycines* and *Meloidogyne incognita* infective juveniles to root tissues, root exudates, and root extracts from three plant species. **Plant Disease**, v. 102, n. 9, p. 1-31, 2018.
- WHARTON, D. A. A functional biology of nematodes. **Springer Science & Business Media**, p. 1-8, 2012.
- WHEELER, T. A. *et al.* Management of *Meloidogyne incognita* with chemicals and cultivars in cotton in a semi-arid environment. **Journal of nematology**, v. 46, n. 2, p. 101, 2014.
- WIECZOREK, K. Cell wall alterations in nematode-infected roots. **Advances in botanical research**, v. 73, p. 61-90, 2015.
- WILSCHUT, R. A.; GEISEN, S. Nematodes as drivers of plant performance in natural systems. **Trends in Plant Science**, v. 26, n. 3, p. 237-247, 2021.
- WILSON, R. C.; DOUDNA, J. A. Molecular mechanisms of RNA interference. **Annual Review of Biophysics**, v. 42, n. 1, p. 217-239, 2013.
- WUBBEN, M. J. *et al.* A novel variant of Gh_D02G0276 is required for root-knot nematode resistance on chromosome 14 (D02) in Upland cotton. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 132, p. 1425-1434, 2019.
- XIE, J. *et al.* A novel *Meloidogyne incognita* effector *Misp12* suppresses plant defense response at latter stages of nematode parasitism. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1–12, 2016.
- XIN, X. F; KVITKO, B; HE, S. Y. *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 5, p. 316-328, 2018.
- XU, H. *et al.* Progress in soybean genetic transformation over the last decade. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 900318, 2022.
- XUE, B. *et al.* The *8D05* parasitism gene of *Meloidogyne incognita* is required for successful infection of host roots. **Phytopathology**, v. 103, n. 2, p. 175–181, 2013.
- YADAV, B. C; VELUTHAMBI, K; SUBRAMANIAM, K. Host-generated double stranded RNA induces RNAi in plant-parasitic nematodes and protects the host from infection. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 148, n. 2, p. 219-222, 2006.

YANG, J. *et al.* The crosstalks between jasmonic acid and other plant hormone signaling highlight the involvement of jasmonic acid as a core component in plant response to biotic and abiotic stresses. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p.1349, 2019.

YANG, Y. *et al.* Applications of multi-omics technologies for crop improvement. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 563953, 2021.

YANG, Y. *et al.* Molecular characteristics and efficacy of *16D10* siRNAs in inhibiting root knot nematode infection in transgenic grape hairy roots. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. 1 13, 2013.

YIN, J. *et al.* Recent advances in plant immunity with cell death: A review. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 21, n. 3, p. 610-620, 2022.

YOO, S. Y. *et al.* The 35S promoter used in a selectable marker gene of a plant transformation vector affects the expression of the transgene. **Planta**, v. 221, n. 4, p. 523–530, 2005.

YUAN, M. *et al.* PTI-ETI crosstalk: an integrative view of plant immunity. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 62, p. 102030, 2021.

ZHAO, S; FERNALD, R. D. Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. **Journal of Computational Biology**, v. 12, n. 8, p. 1047-1064, 2005.

ZHANG, H. *et al.* Abiotic stress responses in plants. **Nature Reviews Genetics**, v. 23, n. 2, p. 104-119, 2022.

ZHOU, J. M; ZHANG, Y. Plant immunity: danger perception and signaling. **Cell**, v. 181, n. 5, p. 978-989, 2020.

ZIPFEL, C. *et al.* Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. **Nature**, v. 428, n. 6984, p. 764-767, 2004.

9 MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1 – Genes alvo de NFG estudados pelo uso da tecnologia de silenciamento gênico via RNAi.

Gene Alvo	Espécie	Método de ingestão	Planta hospedeira	Fenótipo observado	Referência
<i>pMiDuoX1</i>	<i>M. incognita</i>	Imersão	<i>Phaseolus angularis</i>	Redução de 70% no n° de nematoides	Bakhetia <i>et al.</i> (2005)
<i>Quitina sintase</i> (AW871671)	<i>M. artiellia</i>	Imersão	<i>Triticum aestivum</i>	Atraso no surgimento de J2	Fanelli <i>et al.</i> (2005)
<i>16D10</i>	<i>M. incognita</i>	Imersão	<i>A. thaliana</i>	Redução de 74-81% no n° de nematoides	Huang <i>et al.</i> (2006)
<i>16D10</i>	<i>M. incognita/ M. arenaria/ M. javanica/ M. hapla</i>	<i>In planta</i>	<i>A. thaliana</i>	Redução de 63-90% no n° de galhas e Redução de 69-93% no n° de ovos	Huang <i>et al.</i> (2006)
<i>Integrase</i> (AW871671)	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	<i>N. tabacum</i>	Redução de 93,9% no n° de galhas	Yadav, Veluthambi e Subramaniam (2006)
<i>Mi-fs</i>	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	<i>N. tabacum</i>	Redução de 98,71% no n° de galhas	Yadav, Veluthambi e Subramaniam (2006)
<i>Mi-gsts-1</i>	<i>M. incognita</i>	Imersão	<i>Solanum lycopersicum</i>	Redução no número de massa de ovos	Dubreuil <i>et al.</i> (2007)
<i>MjTIS-11</i>	<i>M. javanica</i>	<i>In planta</i>	<i>N. tabacum</i>	Não foram observados efeitos no fenótipo	Fairbairn <i>et al.</i> (2007)
<i>Mi-cpl-1</i>	<i>M. incognita</i>	Imersão	<i>P. angularis</i>	Redução de 60% no n° de nematoides	Shingles <i>et al.</i> (2007)

<i>Mispc3</i>	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	<i>A. thaliana</i>	Redução de 52-61% no nº de nematoides Redução no tamanho de fêmeas	Charlton <i>et al.</i> (2010)
<i>Tp (tirosina fosfatase)</i>	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	<i>G. max</i>	Redução de 92% no nº de galhas Redução de 5,4 vezes no diâmetro de fêmeas	Ibrahim <i>et al.</i> (2011)
<i>MSP</i>	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	<i>G. max</i>	Redução de 94,7% no nº de galhas Redução de 6,5 vezes no diâmetro de fêmeas	Ibrahim <i>et al.</i> (2011)
<i>Mi-Rpn7</i>	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	<i>S. lycopersicum</i>	Redução de 34% no nº de massa de ovos Redução de até 50,8% de ovos	Niu <i>et al.</i> (2012)
<i>Minc03866</i>	<i>M. incognita</i>	Imersão	<i>S. lycopersicum</i>	Redução de 41,2% no nº de galhas Redução de 50,3% no nº de ovos	Danchin <i>et al.</i> (2013)
<i>Minc03313</i>	<i>M. incognita</i>	Imersão	<i>S. lycopersicum</i>	Redução de 57,8% no nº de galhas Redução de 53,2% no nº de ovos	Danchin <i>et al.</i> (2013)
<i>Minc01632</i>	<i>M. incognita</i>	Imersão	<i>S. lycopersicum</i>	Redução de 57,7% no nº de galhas Redução de 70,1% no nº de ovos	Danchin <i>et al.</i> (2013)
<i>Minc05001</i>	<i>M. incognita</i>	Imersão	<i>S. lycopersicum</i>	Redução de 51,5% no nº de galhas Redução de 71,1% no nº de ovos	Danchin <i>et al.</i> (2013)
<i>Minc08013</i>	<i>M. incognita</i>	Imersão	<i>S. lycopersicum</i>	Redução de 44,5% no nº de galhas Redução de 54% no nº de ovos	Danchin <i>et al.</i> (2013)
<i>Minc0248</i>	<i>M. incognita</i>	Imersão	<i>S. lycopersicum</i>	Redução de 54,4% no nº de galhas Redução de 60,9% no nº de ovos	Danchin <i>et al.</i> (2013)
<i>Minc08335</i>	<i>M. incognita</i>	Imersão	<i>S. lycopersicum</i>	Redução de 60,8% no nº de galhas Redução de 56% no nº de ovos	Danchin <i>et al.</i> (2013)

<i>Minc17713</i>	<i>M. incognita</i>	Imersão	<i>S. lycopersicum</i>	Redução de 53,5% no nº de galhas Redução de 64,2% no nº de ovos	Danchin <i>et al.</i> (2013)
<i>Mj-far-1</i>	<i>M. javanica</i>	<i>In planta</i>	<i>S. lycopersicum</i>	Redução do desenvolvimento de nematoides Redução no número de células gigantes	Iberkleid <i>et al.</i> (2013)
<i>Mi-CRT</i> (<i>Minc06693</i>)	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	<i>A. thaliana</i>	Redução de 80% no nº de galhas	Jaouannet <i>et al.</i> (2013)
<i>Mj-NULG1a</i>	<i>M. javanica</i>	<i>In planta</i>	<i>A. thaliana</i>	Redução de 72,7 88,8% no nº de nematoides	Lin <i>et al.</i> (2013)
<i>flp-14</i>	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	<i>N. tabacum</i>	Redução de 50-103% no nº de fêmeas Redução de 28-57% no nº de massa de ovos	Papolu <i>et al.</i> (2013)
<i>flp-18</i>	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	<i>N. tabacum</i>	Redução de 43-59% no nº de fêmeas Redução de 15-50% no nº de massa de ovos	Papolu <i>et al.</i> (2013)
<i>Mi-ser-1</i>	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	<i>N. tabacum</i>	Redução de 30% no nº de ovos Redução de 48% no nº de J2 eclodidos	Souza Júnior <i>et al.</i> (2013)
<i>Mi-cpl-1</i>	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	<i>N. tabacum</i>	Redução de 42% no nº de ovos	Souza-Júnior <i>et al.</i> (2013)
<i>Mi8D05</i>	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	<i>A. thaliana</i>	Redução de 90% no nº de galhas	Xue <i>et al.</i> (2013)
<i>16D10</i>	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	<i>Vitis vinifera</i>	Redução na suscetibilidade à infecção do nematoide	Yang <i>et al.</i> (2013)

<i>Mc16D10L</i>	<i>M. chitwoodi</i>	<i>In planta</i>	<i>S. tuberosum</i>	Redução de 68% no nº de massa de ovos Redução de 65% no nº de ovos	Dinh <i>et al.</i> (2014a)
<i>Mc16D10L</i>	<i>M. chitwoodi</i>	<i>In planta</i>	<i>A. thaliana</i>	Redução de 63% no nº de massa de ovos Redução de 65% no nº de ovos	Dinh <i>et al.</i> (2014b)
<i>Mi-icl</i>	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	<i>N. tabacum</i>	Redução de 52-77% no nº de ovos	Lourenço-Tessutti <i>et al.</i> (2015)
<i>HSP90</i>	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	<i>N. tabacum</i>	Redução de até 46% no nº de ovos	Lourenço-Tessutti <i>et al.</i> (2015)
<i>MjTTL5</i>	<i>M. javanica</i>	<i>In planta</i>	<i>S. tuberosum</i>	Redução de 34–37,5% no nº de fêmeas	Lin <i>et al.</i> (2016)
<i>MiMsp40</i>	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	<i>A. thaliana</i>	Redução de 35,4 50,9% no nº de galhas e redução de 13,8 18,3% no nº de massa de ovos	Niu <i>et al.</i> (2016)
<i>Misp12</i>	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	<i>N. benthamiana</i>	Redução de 68% no nº de fêmeas e redução de 63% dos ovos de nematoides	Xie <i>et al.</i> (2016)
<i>MgGPP</i>	<i>M. graminicola</i>	<i>In planta</i>	<i>O. sativa</i>	Redução de 50% 72,2% no nº de fêmeas	Chen <i>et al.</i> (2017)
<i>At1g74770</i>	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	<i>A. thaliana</i>	Redução de 32% no nº de galhas	Kakrana <i>et al.</i> (2017)
<i>Minc18876</i>	<i>M. incognita</i>	Imersão	<i>N. benthamiana</i>	Redução de 60% no nº de galhas	Nguyen <i>et al.</i> (2018)
<i>Mi-msp-1</i>	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	<i>S. melongena</i>	Redução de 33,8 46,9% no nº de galhas e redução de 41–51,2% no nº de massa de ovos	Chaudhary <i>et al.</i> (2019)

<i>MiDaf16-like1</i>	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	<i>A. thaliana</i>	Reduções significativas de 20-80% no nº de ovos, J2, galhas e no FR do nematoide	Basso <i>et al.</i> (2020b)
<i>MiSkn1-like1</i>	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	<i>A. thaliana</i>	Reduções significativas de 20-80% no nº de ovos, J2, galhas e no FR do nematoide	Basso <i>et al.</i> (2020b)
<i>MiDaf16-like1</i>	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	<i>N. tabacum</i>	Reduções significativas no nº de ovos, J2, galhas e no FR do nematoide	Basso <i>et al.</i> (2020b)
<i>MiSkn1-like1</i>	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	<i>N. tabacum</i>	Reduções significativas no nº de ovos, J2, galhas e no FR do nematoide	Basso <i>et al.</i> (2020b)
<i>Mi-msp3</i>	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	<i>A. thaliana</i>	Redução de 89% no nº de galhas	Joshi <i>et al.</i> (2020)
<i>Mi-msp5</i>	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	<i>A. thaliana</i>	Redução de 78% no nº de galhas	Joshi <i>et al.</i> (2020)
<i>Mi-msp18</i>	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	<i>A. thaliana</i>	Redução de 86% no nº de galhas	Joshi <i>et al.</i> (2020)
<i>Mi-msp24</i>	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	<i>A. thaliana</i>	Redução de 89% no nº de galhas	Joshi <i>et al.</i> (2020)
<i>Flp14, Flp18, Msp1, Msp16, Msp20</i>	<i>M. incognita</i>	Imersão	<i>P. angularis</i>	Redução média de até 53% no nº de galhas e redução média de até 43% no nº de massas de ovos entre os 5 genes alvos analisados	Hada <i>et al.</i> (2021)
<i>Minc01696, Minc00344, Minc00801</i>	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	<i>G. max</i>	Redução de até 83% no nº de galhas e de aproximadamente 80% no nº de massas de ovos entre os três genes alvos analisados	Mendes <i>et al.</i> (2022)

<i>Minc00801</i>	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	<i>N. tabacum</i>	Redução de até 80% no nº de galhas e de massas de ovos	Mendes <i>et al.</i> (2022)
<i>Mi-msp10</i>	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	<i>A. thaliana</i>	Redução de 61% no nº de galhas, de 59% no nº de fêmeas, de 76% no nº de massas de ovos e de 92% no FR do nematoide	Kumar <i>et al.</i> (2022)
<i>Mi-msp23</i>	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	<i>A. thaliana</i>	Redução de 51% no nº de galhas, de 49% no nº de fêmeas, de 60% no nº de massas de ovos e de 75% no FR do nematoide	Kumar <i>et al.</i> (2022)
<i>Mi-msp2</i>	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	<i>A. thaliana</i>	Redução de 63% no nº de galhas, de 68% no nº de fêmeas e de 100% no nº de massas de ovos	Joshi <i>et al.</i> (2022)
<i>Minc03328</i>	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	<i>A. thaliana</i>	Redução de até 85% no nº de galhas e redução de até 90% no nº de massas de ovos	Moreira <i>et al.</i> (2022)
<i>Minc16803</i>	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	<i>A. thaliana</i>	Redução de até 84% no nº de galhas e redução de até 93,3% no nº de massas de ovos	Moreira <i>et al.</i> (2024)
<i>Mi-flp14</i>	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	<i>S. melongena</i>	Redução de 40-48% no nº de galhas, de 40-50% no nº de fêmeas e de 35-40% no nº de massas de ovos	Kamaraju <i>et al.</i> (2024)