



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Biológicas
(Biologia Molecular)

Tese de doutorado

**ESTRATÉGIAS PARA MODULAÇÃO GENÉTICA DE MECANISMOS DE DEFESA
VEGETAL APLICADAS AO CONTROLE DE *Meloidogyne incognita***

LORENA SOUSA DE LOIOLA COSTA

Brasília-DF

2026

LORENA SOUSA DE LOIOLA COSTA

**ESTRATÉGIAS PARA MODULAÇÃO GENÉTICA DE MECANISMOS DE DEFESA
VEGETAL APLICADAS AO CONTROLE DE *Meloidogyne incognita***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do Título de doutora em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof.^a Dra. Maria Fatima Grossi-de-Sa

Coorientadoras: Dra. Nayara Sabrina de Freitas Alves e Prof.^a Dra. Clídia Eduarda Moreira Pinto

Brasília-DF

2026

Trabalho realizado junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação da Dra. Maria Fatima Grossi-de-Sa e coorientação da Dra. Nayara Sabrina de Freitas Alves e da Prof.^a Dra. Clídia Eduarda Moreira Pinto. Apoio: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Embrapa-Cenargen).

**ESTRATÉGIAS PARA MODULAÇÃO GENÉTICA DE MECANISMOS DE DEFESA
VEGETAL APLICADAS AO CONTROLE DE *Meloidogyne incognita***

LORENA SOUSA DE LOIOLA COSTA

TESE APROVADA EM: ____/____/____

Profº. Dr. Marcelo de Macedo Brígido –
Universidade de Brasília – UnB
(Membro interno)

Dra. Thuanne Pires Ribeiro
Embrapa Cenargen e Instituto Nacional de Ciência, Tecnologia e Inovação (INCT)
(Membro externo)

Dr. Fabrício Barbosa Monteiro Arraes
Sempre Sementes
(Membro externo)

Dra. Maria Fatima Grossi-de-Sa
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - Embrapa Cenargen
(Orientadora / Presidente)

Brasília-DF

2026

A minha família, cujo amor e apoio incondicionais foram meu alicerce nos momentos de cansaço e incerteza, agradeço por cada gesto, palavra e presença silenciosa que me impulsionaram até aqui.

A Maria e Safyra (*in memoriam*), pois mesmo com seu silêncio, me confortaram com a doçura da convivência, o olhar afetuoso e a lembrança eterna que carrego no coração como inspiração

AGRADECIMENTOS

O percurso desde o início da graduação em Biologia até agora, representando mais de uma década de dedicação, foi marcado por desafios e crescimento pessoal. A tese e qualquer trabalho refletem o autor, destacando a importância de cultivar um valor interior para produzir contribuições significativas.

Agradeço a Deus, por guiar sempre os meus passos e por seu apoio, força e disposição para superar as dificuldades, pois sem eles não conseguiria concluir o Doutorado e ansiar pelos próximos desafios.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por meio do Programa de Excelência Acadêmica (PROEX), pela bolsa que me proporcionou quatro anos de formação acadêmica de qualidade. A Universidade de Brasília, especialmente ao Programa de Biologia Molecular, seu corpo docente, direção e administração por contribuírem para a realização deste trabalho.

Agradeço profundamente à minha orientadora, Dra. Maria Fatima Grossi-de-Sa, pelo incentivo para ingressar no doutorado e por proporcionar a orientação e o ambiente ideal para o desenvolvimento deste trabalho.

À minha família, especialmente à minha mãe, Maria Lindalva, por todo apoio, amor, força e resiliência. Fazer o que amo só é possível graças à sua presença. Obrigada!

À Maria e Safyra (*"In memoriam"*), a presença silenciosa de vocês ainda me dá força e conforto. Obrigada!

À Nayara Sabrina e Clidia Moreira, meu profundo agradecimento e o mais sincero desejo de um dia poder retribuir toda a ajuda, conselhos, ensinamentos e orientações. Este trabalho não teria sido o mesmo sem vocês.

Aos meus amigos (Manoely Abreu, Bruno Val, Itallo Galvão, Mariana Hildebrand, Mateus Meira, Nattany Souza, Júlia Moura, Gabriela Louise, Luanna Pinheiro, André Ricarte, Gabrielle de Souza, Sara Rocha, Naiara Cordeiro, Andressa Fabiane, Thuanne Ribeiro, Michel Lopes, Victor Albuquerque, Samuel Lima), agradeço por toda a força, conselhos, apoio incondicional e incentivo. Todos os momentos compartilhados e as experiências trocadas tornaram esses quatro anos memoráveis. Amo vocês!

Agradeço a todos que, de forma direta ou indiretamente, contribuíram para a minha formação, especialmente ao grupo de pesquisa LIMPP. Sem vocês, este trabalho não teria sido possível. E por último, mas não menos importante.

Agradeço a minha própria perseverança, pois estou emergindo dessa experiência com maior resiliência.

RESUMO

Os nematoides formadores de galhas (RKNs, *Meloidogyne* spp.) são um dos principais limitantes da produção de soja (*Glycine max*), reduzindo produtividade e qualidade. Análises transcriptômicas e proteômicas em genótipos contrastantes (BRS133 - susceptível; PI595099 - altamente tolerante) identificaram genes candidatos associados à tolerância a *Meloidogyne incognita*, com destaque para os genes *GmPR10* (proteína PR 10) e *GmG4DT1* (glycinol 4-dimethylallyltransferase), implicados, respectivamente, em respostas de defesa mediadas por proteínas e biossíntese da fitoalexina gliceolina I. Este último é um metabólito diretamente associado às respostas de defesa contra patógenos e fitonematoides. Neste estudo, foram avaliadas estratégias combinadas para reforçar a defesa vegetal: (i) modulação traducional de *GmPR10* via edição de uORFs com CRISPR/Cas9 e (ii) intensificação metabólica por superexpressão de *GmG4DT1*. A região 5'-UTR do gene *GmPR10* apresenta duas uORFs, que foram modificadas (-ATG), causando um aumento de aproximadamente 3,5x na atividade de LUC/REN, sem alterar os níveis de mRNA, em ensaios repórteres de *dual-luciferase* em protoplastos de *Nicotiana benthamiana*. Nesse sentido, uma estratégia CRISPR/Cas9 foi elaborada com o intuito de depletar ambas as uORFs em plantas de soja a fim de aumentar a tradução da proteína *GmPR10*. Os vetores CRISPR foram construídos, validados em sistema *hairy roots* de soja e utilizados para transformação estável. Edições parciais demonstraram a capacidade de alterar a uORF2 *in planta* e uma nova combinação de guias (sgRNA8+3) foi proposta para depleção simultânea das duas uORFs. Na estratégia metabólica, a superexpressão heteróloga de *GmG4DT1* em *Nicotiana tabacum* reduziu significativamente o número de galhas por grama de raiz (reduções de até 62,9% em eventos transgênicos), promoveu redução no tamanho das galhas e alterações histológicas compatíveis com o estabelecimento comprometido do sítio de alimentação. Reduções no número de ovos por grama de raiz e no fator de reprodução foram observadas, mas sem significância estatística, indicando que o efeito ocorre principalmente nas fases iniciais do estabelecimento do nematoide. Dessa forma, conclui-se que a combinação de regulação traducional da proteína relacionada à patogênese (*GmPR10*) e do reforço da via de fitoalexinas (*GmG4DT1*) constitui uma estratégia complementar e promissora para limitar o parasitismo por *M. incognita*. Os próximos passos recomendados incluem: (i) obtenção e caracterização de linhagens de soja homozigotas com uORFs depletadas e quantificação proteica (*Western blot*/ELISA); (ii) quantificação temporal de gliceolinas e bioensaios extensivos em soja (condições controladas e semi-campo); (iii) avaliação de possíveis custos agrônômicos e fenotípicos; e (iv) testes de empilhamento gênico (piramidação) combinando *GmPR10* e *GmG4DT1* para avaliar sinergia e durabilidade da resistência. As abordagens empregadas configuram alternativas inovadoras e promissoras para o desenvolvimento de cultivares de soja com resistência aprimorada a fitonematoides.

Palavras-chave: RKNs, *GmPR10*, uORFs, *GmG4DT1*, gliceolina, CRISPR/Cas9, edição gênica, superexpressão de moléculas.

ABSTRACT

Root-knot nematodes (RKN, *Meloidogyne* spp.) are major limiting factors in soybean (*Glycine max*) production, reducing both yield and quality. Transcriptomic and proteomic analyses of contrasting genotypes (BRS133 - susceptible; PI595099 - highly tolerant) identified candidate genes associated with tolerance to *Meloidogyne incognita*, most notably *GmPR10* (PR-10 protein) and *GmG4DT1* (glycinol 4-dimethylallyltransferase). These genes are involved in protein-mediated defenses and in glyceollin I biosynthesis, respectively. The latter is a metabolite directly associated with defense responses against pathogens and plant-parasitic nematodes. This study evaluated combined strategies to reinforce plant defense through (i) translational modulation of *GmPR10* via CRISPR/Cas9-mediated uORF editing and (ii) metabolic intensification via *GmG4DT1* overexpression. The 5'-UTR of *GmPR10* contains two uORFs, which, when mutated at their initiation codons (-ATG), resulted in an approximately 3.5-fold increase in LUC/REN activity in *Nicotiana benthamiana* protoplasts without altering mRNA levels, as confirmed by dual-luciferase assays. Consequently, a CRISPR/Cas9 strategy was developed to deplete both uORFs in soybean, validated in hairy root systems, and utilized for stable transformation. Partial edits partial *edits* demonstrated the feasibility of modifying uORF2, leading to the proposal of a new guide combination (sgRNA8+sgRNA3) for simultaneous uORF depletion. In the metabolic strategy, heterologous overexpression of *GmG4DT1* in *Nicotiana tabacum* significantly reduced the number of galls per gram of root by up to 62.9% across transgenic events, resulting in smaller gall sizes and histological changes consistent with compromised feeding-site establishment. While reductions in egg counts and reproduction factor were observed, they were not statistically significant, indicating that the effect occurs primarily during early stages of nematode establishment. We conclude that combining translational regulation of *GmPR10* with the reinforcement of the phytoalexin pathway constitutes a promising and complementary strategy to limit *M. incognita* parasitism. Future steps include the characterization of homozygous soybean lines lacking uORFs, protein quantification (*Western blot*/ELISA), temporal glyceollin quantification, assessment of agronomic costs, and gene pyramiding to evaluate resistance synergy and durability, representing innovative alternatives for developing soybean cultivars with enhanced nematode resistance.

KEYWORDS: RKNs, *GmPR10*, uORFs, *GmG4DT1*, glyceollin, CRISPR/Cas9, Gene editing, Overexpression of molecules.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1. Mapa da produção brasileira de soja na safra 2025/2026, segundo o 1º levantamento da Conab.....	18
Figura 2. Ciclo de vida de <i>M. incognita</i> , nematoide formador de galhas.....	22
Figura 3. Estrutura tridimensional modelada da proteína <i>GmPR10</i>	31
Figura 4. Tipos de uORFs.....	34
Figura 5. Mecanismos regulatórios sobre a tradução da puORF.....	34
Figura 6. Ilustração esquemática da manipulação gênica da tradução por meio da edição de uORFs via CRISPR/Cas9.....	41

CHAPTER I

TRANSLATIONAL MODULATION OF *GmPR10* BY CRISPR/Cas9-MEDIATED uORF DEPLETION ENHANCES SOYBEAN RESISTANCE TO *Meloidogyne incognita*

Figure 1. Validation of the effects of mutated and non-mutated uORFs in <i>N. benthamiana</i> protoplasts.....	68
Figure 2. CRISPR/Cas9-induced mutations in the <i>GmPR10</i> target region in soybean hairy roots using guide RNAs 1 and 5.....	69
Figure 3. CRISPR/Cas9-induced mutations in the <i>GmPR10</i> target region in soybean hairy roots using guide RNAs 3 and 5.....	70
Figure 4. CRISPR/Cas9-induced mutations in the <i>GmPR10</i> gene in stable plants using guide RNAs 5+3.....	72
Figure S1. <i>In silico</i> prediction of uORFs in the <i>GmPR10</i> gene and schematic of dual-luciferase reporter vectors.....	84
Figure S2. Conventional PCR analysis for the validation of sgRNAs 1, 3, and 5 cloning into intermediate vectors.....	85
Figure S3. Conventional PCR analysis for the validation of sgRNA 5+1 cloning into intermediate vectors.....	85
Figure S4. Conventional PCR analysis for the validation of sgRNA 5+3 cloning into intermediate vectors.....	86
Figure S5. Agarose gel electrophoresis of enzymatic digestion products for the verification of recombinant vectors containing sgRNA 5+1.....	86
Figure S6. Agarose gel electrophoresis of enzymatic digestion products for the verification of recombinant vectors containing sgRNA 5+3.....	86

Figure S7. Conventional PCR analysis for the validation of sgRNA 5+1 cloning into the final vector.....	87
Figure S8. Conventional PCR analysis for the validation of sgRNA 5+3 cloning into the final vector.....	87
Figure S9. Conventional PCR analysis for the validation of soybean hairy roots transformed with the final vector containing sgRNAs 5+1 and 5+3.....	87
Figure S10. Conventional PCR analysis for the validation of soybean hairy roots transformed with the final vector containing sgRNAs 5+3.....	88
Figure S11. Conventional PCR analysis for the validation of soybean hairy roots transformed with the final vector containing sgRNAs 5+3.....	88
Figure S12. Editing profile in the 5' UTR region of the <i>GmPR10</i> gene, containing uORFs 1 and 2, in soybean plants transformed with the construct harboring sgRNAs 3 and 5.....	88
Figure S13. Soybean plants derived from gene editing events SF51 and SF59.....	89

CHAPTER II

MODULATION OF PLANT NEMATODE INTERACTIONS BY OVEREXPRESSION OF THE SOYBEAN GLYCINOL 4-DIMETHYLALLYLTRANSFERASE (*GmG4DT*) GENE IN *Nicotiana tabacum*

Figure 1. <i>GmG4DT1</i> overexpression in transgenic <i>N. tabacum</i>	99
Figure 2. Histological morphology of galls induced by phytonematodes on transgenic tobacco lines.....	100
Figure 3. Evaluation of the average size of galls formed after nematode infection on transgenic events and NT plants.	101
Figure S1. Molecular confirmation and in vitro selection of T0 transgenic tobacco plants overexpressing <i>GmG4DT</i>	109

LISTA DE TABELAS

CHAPTER I

TRANSLATIONAL MODULATION OF *GmPR10* BY CRISPR/Cas9-MEDIATED uORF DEPLETION ENHANCES SOYBEAN RESISTANCE TO *Meloidogyne incognita*

Tabela 1. Characteristics of the sgRNAs designed for CRISPR/Cas9-mediated editing of uORFs 1 and 2 in the <i>GmPR10</i> gene.....	65
Table S1. uORF sequences identified in the <i>GmPR10</i> gene using the online tool uORFlight..	80
Table S2. Primers used for amplification of the 5'-UTR sequences of <i>GmPR10</i> , cloning, and uORFs site-directed mutation into the dual-luciferase reporter system.....	80
Table S3 - Primers used in <i>N. benthamiana</i> protoplast assays.....	80
Table S4 - Primers used for CRISPR/Cas9 vector construction, transgene detection, and genome editing assessment.....	81
Table S5 - Characterization of mutations detected in the <i>GmPR10</i> gene in hairy root. sgRNA target region.....	82
Table S6 – Mutation profiles detected at the sgRNA target site across edited events in the <i>GmPR10</i> gene in hairy root.....	83
Table S7 - Characterization of mutations detected in the <i>GmPR10</i> gene in soybean plants. sgRNA target region.....	84

CHAPTER II

MODULATION OF PLANT NEMATODE INTERACTIONS BY OVEREXPRESSION OF THE SOYBEAN GLYCINOL 4-DIMETHYLALLYLTRANSFERASE (*GmG4DT*) GENE IN *Nicotiana tabacum*

Table S1. Primers used in <i>N. tabacum</i>	109
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACD11: *accelerated cell death 11*

CHS: Chalcone Syntase

CRISPR/Cas9: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats Associated protein 9*

DAI: Dias após a inoculação

EFR: EF-Tu Receptor

EM: *egg masses*;

ET: Etileno

ETI: imunidade desencadeada por efetores

EUA: Estados Unidos da América

FLS2: Flagellin-Sensing 2

FR: Reproduction factor

GM: Organismo geneticamente modificado

GmG4DT1: Glycinol 4-dimethylallyltransferase

GmNPR1:1/GmNPR1-2: Proteínas relacionada à patogênese de classe 1 e 2

GmPR10: Proteínas relacionada à patogênese de classe 10

HDR: Reparo direcionado por homologia

H. glycines: *Heterodera glycines*

HR: Resposta de Hipersensibilidade

HY5: *elongated hypocotyl 5*

J1: juvenil de primeiro estágio

J2: juvenil de segundo estágio

J3: juvenil de terceiro estágio

J4: juvenil de quarto estágio

JA: Ácido Jasmônico

LUC: Luciferase

M. incognita: *Meloidogyne incognita*

M. javanica: *Meloidogyne javanica*

M. arenaria: *Meloidogyne arenaria*

M. hapla: *Meloidogyne hapla*

MAMPs: Microbe-Associated Molecular Patterns

MAPKs: *Mitogen-Activated Protein Kinases*

MCP: Morte Celular Programada

miRNAs: microRNAs

mRNAs: RNA mensageiro

M-MLV: Reverse Transcriptase

n: nematode;

NAMPs: *Nematode-Associated Molecular Patterns*

NC: *neighboring cells*;

NHEJ: União de extremidade não homóloga

NLRs: *Nucleotide-binding Leucine-rich Repeat receptors*

NILR1: *Nematode-Induced LRR Receptor-like kinase 1*

NMD: *Nonsense-Mediated Decay*

NO: óxido nítrico

NPPs: Nematoides Parasitas de Plantas

NPR1: Não-expressor de Genes Relacionados à Patogênese 1

PA: Ácido fosfatídico

PAM: *Protospacer Adjacent Motif*

PAMPs: *Pathogen-Associated Molecular Patterns*

Pf: Population Finnal

Pi: Population initial

pORF: ORF principal

PR: Resistência Relacionada à Patogênese

PRRs: *Pattern Recognition Receptor*

PTI: Imunidade desencadeada por padrões

QTL: Quantitative Trait Loci

REN: Renilla luciferase

RKNs: *root-knot nematodes*

RNAs: Ribonucleic Acid

ROS: Espécies reativas de oxigênio

RT-qPCR Reação em cadeia da Polimerase em Tempo real

SA: Ácido Salicílico

SAR: Resistência Sistêmica Adquirida

siRNAs: *small interfering RNAs*

TMV: *Vírus do Mosaico do Tabaco*

uORF: *Upstream Open Reading Frame*

WT: non-transformed plant

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	17
1.1. Panorama da Cultura da Soja: Introdução, Desempenho Produtivo e Principais Desafios	17
1.2. Nematoides Fitoparasitas como Desafio à Produtividade da Soja	19
1.3. Desafios e Limitações no Controle de Nematoides das Galhas (RKN).....	21
1.4. Mecanismos Moleculares da Defesa Vegetal	24
1.5. Imunidade Desencadeada por Padrões (PTI): PAMPs/DAMPs e NAMPs	24
1.6. Imunidade Desencadeada por Efetores (ETI) Mediada por Proteínas de Resistência NLR	26
1.7. Resistência Sistêmica Adquirida como Mecanismo de Amplificação da Imunidade Vegetal	28
1.8. Proteínas Relacionadas à Patogênese como Efetores da Resposta Imune Vegetal	30
1.9. Regulação Pós-Transcricional como Moduladora da Resposta de Defesa.....	32
1.10. uORFs como Elementos Regulatórios da Tradução em Plantas	33
1.11. Metabolismo Secundário e Fitoalexina na Defesa Vegetal	35
1.12. Aspectos Emergentes da Regulação Molecular da Defesa Vegetal a Nematoides	37
1.13. Edição Gênica por CRISPR como Ferramenta para Modulação da Defesa Vegetal.....	39
2. REFERÊNCIAS	41
CHAPTER I - TRANSLATIONAL MODULATION OF <i>GMPT10</i> BY CRISPR/CAS9-MEDIATED UORF DEPLETION ENHANCES SOYBEAN RESISTANCE TO <i>Meloidogyne incognita</i>	57
1. HIPÓTESE	58
2. OBJETIVOS	58
2.1 Objetivo Geral	58
2.2 Objetivos Específicos.....	58
ABSTRACT	59
3. INTRODUCTION	60
4. MATERIALS AND METHODS	62
4.1 Target gene, <i>In silico</i> Analysis and uORF Identification	62

4.2 Construction of dual-luciferase reporter vectors	62
4.3 Isolation of <i>Nicotiana benthamiana</i> Protoplast, transfection, and dual-luciferase assays	63
4.4 RNA Extraction and RT-qPCR Analysis	63
4.5 CRISPR/Cas9 Vector Construction	64
4.6 <i>Agrobacterium rhizogenes</i> -Mediated Hairy Root Transformation in Soybean Detached Leaves	65
4.7 Genomic DNA Isolation, PCR Analysis and Gene Editing Detection.....	66
4.8 Stable Soybean Transformation	66
4.9 Analysis of Genomic Editing and Mutation Prediction	67
4.10 Statistical Analysis	67
5. RESULTS	67
5.1. <i>In Silico</i> Characterization and Prediction of uORFs in the <i>GmPR10</i> Gene	67
5.2. Functional Impact of <i>GmPR10</i> uORFs on Translational Efficiency	68
5.3 Molecular Validation of CRISPR/Cas9 Vectors and Soybean Hairy Root	69
5.4 Analysis of Editing Events in Soybean Plants.....	71
6. DISCUSSION	73
7. CONCLUSION	75
8. REFERENCES	76
SUPPLEMENTARIES TABLES AND FIGURES	80
Supplementary Tables	80
Supplementary Figures.....	84
CHAPTER II - MODULATION OF PLANT NEMATODE INTERACTIONS BY OVEREXPRESSION OF THE SOYBEAN GLYCINOL 4-DIMETHYLALLYLTRANSFERASE (<i>G4DT</i>) GENE IN <i>Nicotiana tabacum</i>	90
1. HIPÓTESE	91
2. OBJETIVOS	91
2.1 Objetivo Geral	91
2.2 Objetivos Específicos.....	91
ABSTRACT	92
3. INTRODUCTION	93
4. MATERIALS AND METHODS	95
4.1 Transformation Vector Construction	95
4.2 <i>Agrobacterium</i> -mediated Genetic Transformation of Tobacco Plants	96

4.3 Molecular Confirmation of Transgene Integration.....	96
4.4 <i>M. incognita</i> Inoculum and Infection	96
4.5 Morphological Analysis of Giant Cells and Galls in Plants.....	97
4.6 Statistical Analysis	98
5. RESULTS	98
5.1 <i>N. tabacum</i> Transformation and Genotyping	98
5.2 Impact of <i>GmG4DT</i> Overexpression on <i>M. incognita</i> Parasitism in Transgenic Tobacco	98
5.3 Morphological Evaluation of Galls Induced by <i>M. incognita</i> in Transgenic Tobacco	99
6. DISCUSSION	101
7. CONCLUSIONS	104
8. REFERENCES	105
SUPPLEMENTARY TABLE AND FIGURE	109
Supplementary table	109
Supplementary figure.....	109
3. CONCLUSÃO GERAL	110
4. PERSPECTIVAS	111

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Panorama da Cultura da Soja: Introdução, Desempenho Produtivo e Principais Desafios

A soja (*Glycine max* L. Merrill) é uma leguminosa da subfamília Papilionoideae, amplamente cultivada devido à sua elevada importância econômica e estratégica no agronegócio global. Classificada como *commodity* agrícola, destaca-se pelo alto volume de produção e de comercialização internacional (MISHRA *et al.*, 2024; CONAB, 2026). Originária do nordeste da China, com a região da Manchúria reconhecida como centro secundário de diversidade genética, a soja passou por processo de domesticação iniciado por volta do século XI a.C., resultando na transição de plantas de hábito rasteiro para cultivares de hábito ereto, mais adequados ao cultivo agrícola (MERRIL, 1931; HYMOWITZ, 1970).

Após desempenhar um papel fundamental na alimentação oriental por milênios, a soja foi introduzida no Ocidente a partir do século XVIII, inicialmente com fins experimentais e taxonômicos na Europa (BRETSCHNEIDER, 1882). Posteriormente, sua chegada aos Estados Unidos (EUA), em meados do século XVIII, marcou o início de sua expansão agrícola em larga escala, inicialmente voltada à produção de forragem e adubação verde (HYMOWITZ; HARLAN, 1983; ROCHA, 2023). A partir da primeira metade do século XX, os EUA consolidaram-se como principal produtor mundial por várias décadas. Contudo, a partir de 2019, o Brasil assumiu a liderança global, reflexo do aumento da área cultivada, da incorporação de tecnologias agrícolas e do melhoramento genético contínuo (SOYINFO CENTER, 2018; FAO, 2024; USDA, 2025).

No Brasil, a introdução da soja ocorreu no final do século XIX, consolidando-se inicialmente no Rio Grande do Sul, onde as condições edafoclimáticas favorecem seu desenvolvimento (LEAL, 1967; BONETTI, 1981). Até a década de 1960, a expansão concentrou-se na Região Sul, sendo posteriormente impulsionada por programas de incentivo agrícola e sistemas de sucessão de culturas, como soja-trigo (GAZZONI; DALL'AGNOL, 2018). A expansão para regiões de baixa latitude, especialmente o Cerrado, foi inicialmente limitada pela sensibilidade da soja ao fotoperíodo. O desenvolvimento de cultivares com período juvenil longo permitiu maior adaptação às condições tropicais, favorecendo acúmulo de biomassa e incremento da produtividade

(KIIHL; GARCIA, 1989; ALMEIDA *et al.*, 1990).

Atualmente, a cultura da soja está presente em todas regiões brasileiras (Figura 1), ocupando aproximadamente uma área de 47,6 milhões de hectares na safra 2025/2026. As regiões Centro-Oeste e Sul concentram a maior parte da produção nacional, com destaque para os estados de Mato Grosso (12,74 milhões hectares - ha; 51,31 milhões de toneladas - t), Paraná (5,34 milhões ha; 19,97 milhões t), Goiás (4,95 milhões ha; 20,72 milhões t) e Rio Grande do Sul (7,09 milhões ha; 16,62 milhões t) (CONAB, 2025).

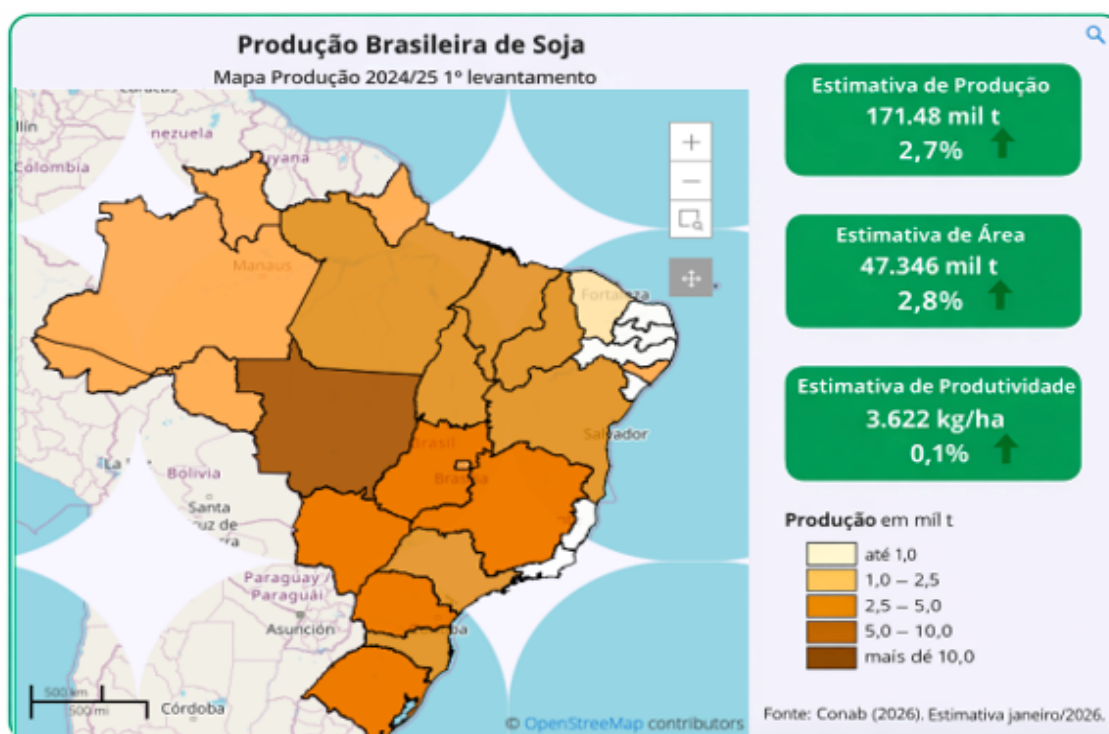


Figura 1. Mapa da produção brasileira de soja na safra 2025/2026, segundo o 1º levantamento da Conab. As diferentes tonalidades representam a produção em mil toneladas por unidade federativa, variando de menos de 1 mil toneladas (bege-claro) a mais de 10 mil toneladas (marrom-escuro). À direita, são apresentadas as estimativas nacionais de produção (171,48 milhões de toneladas), de área cultivada (47,346 milhões de hectares) e de produtividade média (3.622 kg/ha), todas com variações positivas em relação à safra anterior. Fonte: Conab, 2026.

Apesar da elevada produtividade, a cultura da soja enfrenta importantes desafios fitossanitários, incluindo patógenos fúngicos, bacterianos, virais e nematoides. Estima-se que essas doenças possam reduzir a produção entre 15% e 20%, podendo comprometer totalmente o rendimento em condições severas (HARTMAN *et al.*, 2011; ZHOU *et al.*, 2017; ARJOUNE *et al.*, 2022). Dentre esses agentes, os nematoides fitoparasitas destacam-se como um dos principais entraves à sustentabilidade da cultura no Brasil, devido ao seu impacto direto na produtividade e

na viabilidade econômica das áreas cultivadas (DIAS *et al.*, 2010). Nesse cenário, aprofundar a compreensão da biologia e dos mecanismos de interação planta-nematoide torna-se fundamental para o desenvolvimento de estratégias de manejo e resistência mais duradouras.

1.2. Nematoides Fitoparasitas como Desafio à Produtividade da Soja

Os nematoides fitoparasitas são organismos amplamente distribuídos que agem como parasitas obrigatórios de plantas. Possuem corpo filiforme, tamanho microscópico e estruturas bucais especializadas, como estiletes ocos e protrusíveis, cuja variação estrutural permite a perfuração celular durante a alimentação. Apresentam de três a cinco glândulas faríngeas responsáveis pela secreção de efetores que modulam o metabolismo da célula hospedeira (JONES *et al.*, 2013; ESPADA; VICENTE; VIEIRA, 2025). Outras estruturas sensoriais e secretoras, como fasmídeos, anfídeos, glândulas adanais e o sistema secretor/excretor, também participam da comunicação molecular com a planta, contribuindo para o sucesso do parasitismo. Essa complexa organização estrutural sustenta estratégias sofisticadas de infecção e colonização radicular (ROSSO *et al.*, 1999; HAEGEMAN *et al.*, 2012; ESPADA; VICENTE; VIEIRA, 2025).

Atualmente, há mais de 4.100 espécies de nematoides parasitas de plantas já descritos (DECRAEMER; HUNT, 2006; SHAO *et al.*, 2023). Esses organismos podem ser classificados quanto à mobilidade (sedentários e migratórios) e ao tipo de parasitismo (endoparasitas, semiendoparasitas e ectoparasitas) (ENDO, 1975; JONES *et al.*, 2013). Na cultura da soja, destacam-se os endoparasitas sedentários do gênero *Meloidogyne*, que estabelecem sítios permanentes de alimentação no interior das raízes, os endoparasitas migratórios do gênero *Pratylenchus*, que se deslocam tanto no solo quanto nos tecidos radiculares, os semiendoparasitas, como *Heterodera glycines* e *Tylenchulus semipenetrans*, e os ectoparasitas, como espécies de *Helicotylenchus*, que se alimentam externamente na superfície radicular (JONES *et al.*, 2013; GILLET *et al.*, 2017).

A infestação no campo geralmente se manifesta na formação de reboleiras, reflexo da limitada mobilidade no solo. As plantas afetadas apresentam atrofiamento, baixo vigor, clorose, necrose internerval, queda prematura das folhas, aborto de vagens, amadurecimento precoce e, em casos severos, morte (FERRAZ; BROWN,

2016). Esses sintomas decorrem de profundas alterações fisiológicas, incluindo a manipulação do ciclo celular e a extração contínua de nutrientes. Além disso, a interação com outros fitopatógenos pode potencializar os danos e comprometer os mecanismos de resistência vegetal (BACK; HAYDOCK; JENKINSON, 2002; JONES *et al.*, 2013).

Os nematoides são atraídos por exsudados radiculares, que incluem aminoácidos, nucleotídeos, açúcares e outros metabólitos (ROVIRA, 1969). Após alcançar a raiz, o juvenil de segundo estágio (J2) injeta, por meio do estilete, secreções produzidas pelas glândulas faríngeas, promovendo a reprogramação metabólica das células hospedeiras antes do estabelecimento do sítio de alimentação (MOENS; PERRY; STARR, 2009). Dependendo da espécie, podem ser induzidas diferentes estruturas especializadas, como células nutrizas, células gigantes, sincícios ou cenócitos. (JONES *et al.*, 2013).

No contexto da soja, mais de 100 espécies, distribuídas em aproximadamente 50 gêneros já foram relatadas mundialmente. No Brasil, os gêneros de maior relevância econômica incluem *Meloidogyne*, *Heterodera*, *Pratylenchus* e *Rotylenchulus* (FERNANDO; GRICOLLI, 2014; DIAS; GARCIA; SILVA, 2000; CUNHA E CASTRO *et al.*, 2024). A importância dessas espécies está associada à ampla distribuição de *Meloidogyne javanica* e *M. incognita*, à elevada variabilidade genética de *H. glycines* e à expansão da soja em áreas suscetíveis, como o Cerrado (LIMA *et al.*, 2015; KATH *et al.*, 2017). Globalmente, as perdas atribuídas aos nematoides parasitas de plantas são estimadas em valores superiores a US\$ 80 bilhões anuais, possivelmente subestimados (NICOL *et al.*, 2011; JONES *et al.*, 2013; FERRAZ; BROWN, 2016; CHAPAGAIN *et al.*, 2025).

A magnitude das perdas na soja depende da densidade populacional do nematoide, da espécie envolvida, da suscetibilidade da cultivar, das condições edafoclimáticas e do manejo adotado (BRADLEY *et al.*, 2021; LIN *et al.*, 2022). Em culturas anuais de ciclo curto, como a soja, medidas preventivas antes da semeadura são essenciais, pois a infestação estabelecida compromete de forma irreversível o desempenho produtivo da safra. Nesse contexto, as limitações das estratégias atualmente disponíveis para o controle dos nematoides das galhas tornam-se ainda mais evidentes, impondo desafios técnicos e econômicos à sustentabilidade do sistema produtivo (FERNANDO; GRICOLLI, 2014; CASTRO; MEYER; SEIXAS, 2024).

1.3. Desafios e Limitações no Controle de Nematoides das Galhas (RKN)

Os nematoides das galhas (*root-knot nematodes*, RKNs), pertencentes ao gênero *Meloidogyne*, constituem um dos principais fatores limitantes da produtividade agrícola mundial (FULLER *et al.*, 2008; RUSINQUE *et al.*, 2023). O gênero inclui mais de 90 espécies descritas, destacando-se *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* e *M. hapla* como as de maior relevância agrônômica (VAN HOENSELAAR; KARSSSEN, 1998; JONES *et al.*, 2013; RUSINQUE *et al.*, 2023). Dentre essas espécies, *M. incognita* apresenta uma ampla gama de hospedeiros, parasitando mais de 3.000 espécies vegetais (IBRAHIM *et al.*, 2011; ANWAR; MCKENRY, 2012; SOUZA *et al.*, 2025). As perdas globais atribuídas aos RKNs são estimadas em aproximadamente US\$ 100 bilhões anuais (MOENS *et al.*, 2009; YADAV; ROBERTS; LOPEZ-ARREDONDO, 2025). No Brasil, *M. incognita* e *M. javanica* predominam na cultura da soja, com distribuição associada ao histórico de cultivo e às condições edafoclimáticas (DIAS; GARCIA; SILVA, 2000).

A agressividade dessas espécies está associada à elevada capacidade reprodutiva, frequentemente por partenogênese mitótica, o que favorece a rápida multiplicação populacional e a adaptação a diferentes ambientes (GILLET *et al.*, 2017; HEWEZI, 2020; ABDUJABAR; BELAY, 2022). Essa característica, aliada à ampla gama de hospedeiros e à interação sinérgica com fungos, bactérias, vírus fitopatogênicos, intensifica os danos à cultura e dificulta o manejo eficaz. Tal cenário, contribui, assim, para a rápida fixação de genótipos adaptados, favorecendo a superação de mecanismos de resistência presentes em cultivares comerciais (JONES, 2013; GOMES *et al.*, 2022; RUTTER; FRANCO; GLEASON, 2022).

O ciclo de vida de *Meloidogyne spp.* varia de 20 a 30 dias sob condições favoráveis e compreende seis estágios de desenvolvimento: ovo, quatro estágios juvenis (J1 a J4) e adulto (Figura 2) (MOENS *et al.*, 2009). Os ovos são depositados no solo ou em tecidos radiculares, envolvidos por uma matriz gelatinosa protetora. O juvenil de primeiro estágio (J1) desenvolve-se no interior do ovo e sofre ecdise para o segundo estágio juvenil (J2), considerado o estágio infectivo. Após a eclosão, o J2 penetra a raiz, preferencialmente na região da coifa ou da zona de alongamento, utilizando o estilete e enzimas celulolíticas e pectolíticas (BIRD, 1996; CAILLAUD *et al.*, 2008; COULIBALY *et al.*, 2025). Ao alcançar o cilindro vascular, o J2 estabelece o sítio de alimentação por meio da secreção de efetores provenientes das glândulas

esofágicas, que reprogramam a expressão gênica da planta hospedeira (WILLIAMSON; GLEASON, 2003; DAVIS; HUSSEY; BAUM, 2004). Esse processo induz a formação de células gigantes multinucleadas (5 a 7), resultantes de divisões nucleares sucessivas sem citocinese, caracterizadas por hipertrofia nuclear e elevada atividade metabólica (BIRD, 1996; GHEYSEN; FENOLL, 2002; CAILLAUD *et al.*, 2008; PALOMARES-RIUS *et al.*, 2017). No estabelecimento do sítio alimentar, os juvenis J3 e J4 tornam-se sedentários e passam por sucessivas mudas. Durante esses estágios, ocorre um aumento significativo de tamanho corporal. O estilete sofre regressão funcional temporária, caracterizando J3 e J4 como estágios não alimentares. Após a quarta muda, o estilete reaparece, dando origem a adultos, machos ou fêmeas (KHAN *et al.*, 2020).

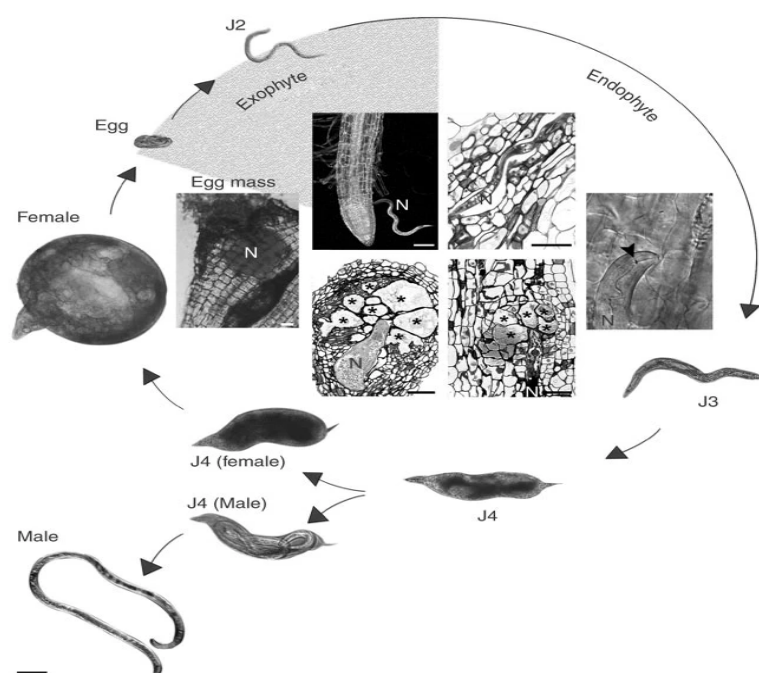


Figura 2. Ciclo de vida de *M. incognita*, nematoide formador de galhas. A eclosão inicia-se com o segundo estágio juvenil (J2), fase infectiva exófito, que penetra na raiz da planta hospedeira. Uma vez no interior da raiz (endófito), o J2 migra até o cilindro central e estabelece uma célula gigante de alimentação (N, células nutritivas modificadas). O nematoide passa por sucessivas ecdises (estágios juvenis J3 e J4), diferenciando-se em fêmeas sedentárias ou machos móveis. A fêmea adulta permanece na raiz, formando galhas características e produzindo massas de ovos na superfície externa. As micrografias mostram os principais estágios do desenvolvimento, bem como as alterações anatômicas nos tecidos radiculares (asteriscos indicam células gigantes). Abreviações: N – célula nutritiva (giant cell); J2-J4 - segundo ao quarto estágio juvenil. Barra de escala: 50 µm (machos e J4), 100 µm (raízes). Fonte: Abad *et al.* (2008).

A formação e a manutenção das células gigantes envolvem uma reprogramação intensa do ciclo celular da planta. Genes relacionados a ciclinas e quinases dependentes de ciclinas apresentam expressão diferencial, favorecendo

múltiplas divisões nucleares sem citocinese (ENGLER *et al.*, 1999; ZADEGAN *et al.*, 2025). Paralelamente, genes associados à remodelação da parede celular e ao metabolismo energético são regulados positivamente, sustentando a elevada demanda metabólica do parasita (GOELLNER *et al.*, 2001; NISHITANI, 2002; JAGDALE; RAO; GIRI, 2021). Além disso, observa-se supressão de vias de defesa vegetal, incluindo aquelas mediadas pelo ácido jasmônico (ITHAL *et al.*, 2007a, b; KLINK *et al.*, 2010; JAGDALE; RAO; GIRI, 2021).

Do ponto de vista prático, após a detecção da infestação, recomenda-se a adoção de manejo integrado, combinando estratégias químicas e não químicas (GRIGOLLI, ASMUS, 2010). A rotação com espécies não hospedeiras pode reduzir as populações, embora sua eficácia seja limitada pela sobrevivência prolongada dos ovos no solo e pela ampla gama de hospedeiros (SMITH; SCHEIKOWSKI; KAFLE 2024). Controle químico, embora eficiente em determinadas situações, enfrenta restrições regulatórias, risco de resistência e impactos ambientais (RITZINGER; FRANCELLY, 2006; ZHOU; LI; ACHAL, 2025).

O controle biológico surge como alternativa promissora, envolvendo microrganismos antagonistas como *Trichoderma harzianum*, *Pochonia chlamydosporia*, *Purpureocillium lilacinum*, espécies de *Bacillus* e *Pasteuria penetrans* (HALLMANN *et al.*, 2009; COLLANGE *et al.*, 2011; POVEDA *et al.*, 2020). Contudo, a eficácia desses agentes biológicos é variável e depende de fatores como temperatura, umidade do solo, microbiota residente e compatibilidade com as práticas agrônômicas adotadas (DAVIES, 2009; POVEDA *et al.*, 2020; PIRES *et al.*, 2022).

O uso de cultivares resistentes constitui uma estratégia central na cultura da soja. Entretanto, a elevada variabilidade genética e a capacidade adaptativa das populações de *Meloidogyne* podem comprometer a durabilidade da resistência. Assim, estratégias baseadas exclusivamente na supressão populacional mostram-se insuficientes a longo prazo (ROBERTS, 2002; WILLIAMSON; KUMAR, 2006; YÜKSEL; BOZBUĞA, 2025). Diante desse cenário, torna-se fundamental aprofundar o entendimento dos mecanismos moleculares de defesa da soja contra *Meloidogyne spp.*, incluindo vias de sinalização hormonal, regulação transcricional e traducional, bem como proteínas relacionadas à patogênese, visando ao desenvolvimento de abordagens biotecnológicas mais duráveis e eficazes (JONES; DANGL, 2006; DODDS; RATHJEN, 2010; ZADEGAN *et al.*, 2025).

1.4. Mecanismos Moleculares da Defesa Vegetal

As plantas estão constantemente expostas a uma ampla diversidade de patógenos, dos quais apenas uma fração é capaz de estabelecer uma infecção. Essa interação impõe forte pressão seletiva e leva à evolução de um sistema imune capaz de distinguir padrões próprios e não próprios, garantindo ativação precisa das respostas imunes (SAIJO; LOO, 2009; SIRISHA; MITRA; SUPRASSANNA, 2024). O modelo conceitual em “zig-zag” descreve essa dinâmica em duas camadas principais: a imunidade desencadeada por padrões (PTI), ativada pelo reconhecimento de PAMPs/MAMPs/NAMPs por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), e a imunidade desencadeada por efetores (ETI), mediada por proteínas de resistência que detectam efetores patogênicos (JONES; DANGL, 2006; SAIJO; LOO, 2019).

Embora historicamente descritas como camadas distintas, as vias PTI e ETI compartilham componentes moleculares e atuam de forma coordenada e sinérgica, promovendo amplificação da resposta defensiva. Essa interconexão confere flexibilidade adaptativa ao sistema imune vegetal, permitindo respostas proporcionais à natureza do patógeno invasor (COUTO; ZIPFEL, 2016; NOBORI, 2025).

Além da imunidade local, as plantas apresentam resistência sistêmica adquirida (SAR), um mecanismo de proteção de longo prazo e amplo espectro, associada à sinalização por ácido salicílico e à ativação de genes relacionados à patogênese (PR) (VAN LOON; VAN STRIEN, 1999; VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006). Paralelamente, a produção de fitoalexinas, como as gliceolinas na soja, constitui um importante componente químico da defesa, restringindo a colonização por patógenos. A ativação desses mecanismos defensivos é iniciada pelo reconhecimento de padrões moleculares conservados, processo que fundamenta a imunidade desencadeada por padrões (JEANDET *et al.*, 2014; YUE *et al.*, 2023).

1.5. Imunidade Desencadeada por Padrões (PTI): PAMPs/DAMPs e NAMPs

A PTI baseia-se no reconhecimento de padrões moleculares conservados associados a microrganismos (*Microbe-or Pathogen-Associated Molecular Patterns* – MAMPs/PAMPs) e de padrões associados a danos (*Damage-Associated Molecular Patterns* – DAMPs), liberados pela própria planta em resposta a injúrias. Esses sinais são percebidos por PRRs localizados na membrana plasmática, ativando respostas

imunes basais (BIANCHI, 2006; TANG *et al.*, 2012; CHOI; KLESSIG, 2016; SAIJO; LOO, 2019; SIRISHA; MITRA; SUPRASANNA, 2024).

O reconhecimento do padrão molecular desencadeia uma série de eventos celulares iniciais, incluindo influxo de Ca^{2+} , alcalinização extracelular, despolarização do potencial de membrana e fluxos iônicos, além da produção de óxido nítrico (NO), espécies reativas de oxigênio (ROS) e ácido fosfatídico (PA). Esses eventos são acompanhados pela ativação de cascatas conservadas de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), biossíntese de etileno, deposição de calose e ampla reprogramação transcricional de genes de defesa, culminando na contenção inicial da infecção (ZIPFEL *et al.*, 2006; CHINNUSAMY; JAGADISH, 2009).

A relevância funcional dos PRRs é evidenciada por estudos em *Arabidopsis thaliana*, nos quais mutações no receptor FLS2 (Flagellin-Sensing2) comprometem o reconhecimento da flagelina bacteriana, enquanto alterações no receptor EFR afetam a percepção do fator EF-Tu (EF-Tu Receptor), influenciando a interação com bactérias fitopatogênicas (ZIPFEL *et al.*, 2004; ZIPFEL *et al.*, 2006).

Além dos MAMPs, plantas também são capazes de perceber moléculas produzidas por nematoides parasitas de plantas (NPPs). Esses sinais, denominados padrões moleculares associados a nematoides (*Nematode-Associated Molecular Patterns* - NAMPs), incluem pequenas moléculas e proteínas liberadas durante diferentes estágios da interação planta-nematoide. A percepção desses compostos pode ativar respostas imunes que compartilham características com a PTI clássica (CHOI; KLESSIG, 2016; ABD-ELGAWAD, 2022).

Entre os NAMPs mais estudados destacam-se os ascarosídeos, metabólitos derivados do açúcar 3,6-didesoxi-L, que atuam como moléculas sinalizadoras no desenvolvimento e no comportamento dos nematoides (CHOE *et al.*, 2012). O ascarosídeo Ascr#18, tem sido descrito como indutor de respostas imunes em diferentes espécies vegetais, incluindo ativação de MAPKs, indução de genes de defesa e modulação das vias mediadas por ácido salicílico (SA) e ácido jasmônico (JA), associando-se ao aumento da resistência contra diferentes grupos de patógenos (MANOSALVA *et al.*, 2015; CHOI; KLESSIG, 2016). Estudos adicionais demonstraram que o tratamento radicular de *A. thaliana* com Ascr#18 promove alterações sistêmicas compatíveis com um estado de defesa ativado (MENDY *et al.*, 2017).

Além das pequenas moléculas, proteínas expressas na superfície de juvenis

pré-infecciosos de nematoides também têm sido propostas como potenciais NAMPs. A percepção dessas proteínas pode desencadear respostas típicas da imunidade basal como a produção de ROS (MANOSALVA *et al.*, 2015; CHOI; KLESSIG, 2016). Em *Arabidopsis*, a quinase NILR1, um receptor rico em leucina localizado na membrana plasmática, foi identificada como componente envolvido nesse processo de reconhecimento e ativação da imunidade basal (MENDY *et al.*, 2017).

Outras moléculas nematoides, como a quitina presente na casca de ovos e componentes da cutícula, também são consideradas candidatas a NAMPs. A quitina é ausente em células vegetais, enquanto a cutícula constitui o exoesqueleto nematoide, sendo essencial para seu crescimento e locomoção. Embora o papel dessas moléculas na ativação da imunidade basal ainda não esteja completamente elucidado, elas representam sinais potenciais passíveis de detecção pelas plantas. Ademais, exsudatos radiculares, como as eclepinas, participam de processos de eclosão de ovos e quimiotaxia, influenciando eventos iniciais da interação planta-nematoide (SATO; KADOTA; SHIRASU, 2019).

Apesar da eficiência da PTI na contenção inicial da infecção, nematoides parasitas de plantas desenvolveram estratégias para suprimir ou modular essas respostas. Para isso, secretam proteínas efetoras diretamente nas células vegetais suscetíveis, promovendo reprogramação da sinalização associada à resistência basal. Esses efetores interferem no ciclo celular vegetal, na organização do citoesqueleto, na produção de pequenos RNAs e na regulação da expressão gênica do hospedeiro, favorecendo a formação e manutenção dos sítios de alimentação necessários ao parasitismo (CAILLAUD *et al.*, 2008; HEWEZI *et al.*, 2009; HEWEZI; BAUM, 2013; HEWEZI, 2015; ABD-ELGAWAD, 2022). Além disso, os NPPs modulam múltiplas vias de sinalização do hospedeiro, incluindo as mediadas por ácido jasmônico e ácido salicílico (JA-SA), giberelinas, citocininas, mecanismos de silenciamento gênico e modificações pós-transcricionais. Nesse mesmo contexto, cabe explorar os fatores que ampliam a compreensão desse fenômeno, como a Imunidade Desencadeada por Efetores (ETI) (NONBELA; WILLIAMSON; MUÑIZ, 2003; HEWEZI, 2015; RÓŚAÑSKA; KRĘPSKI; WIŚNIEWSKA, 2023).

1.6. Imunidade Desencadeada por Efetores (ETI) Mediada por Proteínas de Resistência NLR

A ETI é mediada principalmente por moléculas de resistência, especialmente pelos receptores intracelulares da família NLRs (proteínas com domínio de ligação a nucleotídeos e repetições ricas em leucina), capazes de reconhecer efetores patogênicos direta ou indiretamente e desencadear respostas imunes robustas (DANGL; JONES 2001; ZVEREVA; POOGGIN, 2012; YAN *et al.*, 2025).

A ativação da ETI frequentemente culmina na indução da resposta de hipersensibilidade (HR), caracterizada pela morte celular programada (MCP) no local da infecção, limitando a propagação do patógeno. Esse processo é acompanhado pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que atuam tanto causando danos ao invasor, quanto como moléculas sinalizadoras que modulam respostas defensivas subsequentes. Cascatas de sinalização envolvendo proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) regulam fatores transcricionais e a biossíntese de fitohormônios, como ácido salicílico (SA), ácido jasmônico (JA) e etileno (ET), ajustando a resposta de acordo com o tipo de patógeno envolvido (DONG, 2012; SPOEL; DONG, 2012; SUN; ZHANG, 2022). A HR é particularmente eficaz contra patógenos biotróficos, que dependem da viabilidade das células hospedeiras, enquanto patógenos necrotróficos podem se beneficiar da morte celular (GLAZEBOOK, 2005; ANDERSEN *et al.*, 2018; PITSILI; PHUKAN; COLL, 2019).

A resistência a diferentes tipos de patógenos envolve a regulação coordenada do equilíbrio entre os mecanismos de defesa mediados pelo SA e pelos hormônios ET/JA (DURRANT; DONG, 2004). O SA é essencial para a indução da resposta HR/MCP após o reconhecimento de efetores, conferindo resistência principalmente contra patógenos biotróficos e hemi-biotróficos, enquanto a via ET/JA regula a propagação da morte celular programada e contribui para a defesa contra patógenos necrotróficos. Esses hormônios modulam conjuntos distintos de genes de defesa e participam do desencadeamento da resistência sistêmica adquirida (SAR), que prepara tecidos distais não infectados para respostas imunes mais rápidas e eficazes (SPOEL; DONG, 2012). A SAR pode ser induzida tanto pela ETI local, quanto por PAMP ou por infecções virais, reforçando a coordenação sistêmica das respostas defensivas da planta. Nesse contexto, a resistência sistêmica adquirida configura-se como um componente central da coordenação das respostas imunes em nível sistêmico (DURRANT; DONG, 2004; ZVEREVA; POOGGIN, 2012; FU; DONG, 2013; ZHOU; ZHANG, 2020).

1.7. Resistência Sistêmica Adquirida como Mecanismo de Amplificação da Imunidade Vegetal

A SAR foi descrita por Ross (1961), ao demonstrar que a infecção local pelo vírus do mosaico do tabaco (TMV) induzia resistência sistêmica no tabaco. Desde então, a SAR tem sido reconhecida como uma forma de imunidade induzida em plantas que, diferentemente da imunidade adaptativa de vertebrados, apresenta um amplo espectro e não depende da especificidade do agente causador da infecção inicial (DURRANT; DONG, 2004). Esse mecanismo é geralmente ativado após uma infecção local, frequentemente associada à resposta hipersensível (HR) mediada por genes de resistência, embora a ocorrência de HR não seja estritamente necessária para sua indução (STICHER; MAUCH-MANI; MÉTRAUX, 1997; HARTMANN; ZEIER, 2019).

A sinalização pelo ácido salicílico desempenha papel central no estabelecimento da SAR, promovendo a ativação de genes relacionados à patogênese (PR), como PR-1, PR-2 e PR-5, que codificam proteínas antimicrobianas, incluindo quitinases e β -1,3-glucanases, capazes de limitar a colonização de patógenos (GAFFNEY *et al.*, 1993; FU; DONG, 2013; SANTOS; FRANCO, 2023). Paralelamente, essa via também desencadeia a biossíntese de fitoalexinas, metabólitos secundários de baixo peso molecular com reconhecida atividade antimicrobiana. Embora o AS não atue como o sinalizador móvel de longa distância, ele é considerado essencial para a indução de genes PR e para a manutenção da resposta defensiva (STICHER *et al.*, 1997). Além disso, a eficácia da SAR está mais relacionada à resistência contra patógenos biotróficos e hemibiotróficos, devido à predominância da via do AS, sendo menos efetiva contra necrotróficos (OLIVER; IPCHO, 2004; GLAZEBROOK, 2005; VIDHYASEKARAN, 2015).

O desenvolvimento da SAR ocorre em escala sistêmica ao longo de vários dias e envolve a produção de sinais móveis de longa distância, o acúmulo de SA e a subsequente ativação de proteínas PR, estabelecendo uma condição protetora em tecidos não infectados que pode persistir por semanas ou meses (VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006; FU; DONG, 2013). Nesse processo, a proteína NPR1 (Não-expressor de genes relacionados à patogênese 1) atua como regulador chave a jusante do SA. Alterações no estado redox celular promovem a redução de NPR1, que é translocado ao núcleo e interage com fatores de transcrição TGA, ativando a

expressão de genes PR e preparando a planta para respostas rápidas e reforçadas a novas infecções (PIETERSE; VAN LOON, 2004, PIETERSE, *et al.*, 2007). Além de sua caracterização molecular, a SAR já foi comprovada funcionalmente em diversos sistemas, aumentando a resistência de plantas a diferentes patógenos e pragas, como *Ascochyta fabae* e *Uromyces viciae-fabae* em favas, e *M. incognita* e *Ralstonia solanacearum* em tomates (PRADHANANG *et al.*, 2003; MOLINARI; BASER, 2010; SILLERO *et al.*, 2012).

No contexto da soja, evidências moleculares confirmam que os componentes centrais da SAR são funcionalmente conservados. Sandhu *et al.*, (2009) identificaram e caracterizaram homólogos da proteína NPR1(*GmNPR1-1* e *GmNPR1-2*), demonstrando que esses genes são induzidos por AS e capazes de ativar a expressão de genes relacionados à patogênese, como GmPR1 (PANT *et al.*, 2016). Além disso, a expressão desses homólogos restaurou a resposta de SAR em mutantes *npr1-1* de *A. thaliana*, confirmando sua atuação como reguladores-chave da via dependente de AS. Esses resultados indicam que a via clássica de SAR mediada por NPR1 e proteínas PR está presente e operacional em soja, fornecendo base molecular para sua participação em respostas defensivas sistêmicas, inclusive em interações com patógenos radiculares, como nematoides fitoparasitas (LINDERMAYR *et al.*, 2010; ISLAM *et al.*, 2023).

A SAR pode ser desencadeada não apenas por patógenos avirulentos, mas também por padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), como o epítipo *flg22* da flagelina (NABI *et al.*, 2024). Evidências recentes ainda apontam para a influência da sinalização luminosa mediada pelos fitocromos PhyA e PhyB na indução da SAR, reforçando o papel integrador do SA nas respostas sistêmicas de defesa (GRIEBEL; ZEIER, 2008). Apesar de conferir uma proteção ampliada, a SAR geralmente não resulta em imunidade completa, o que indica a necessidade de sua integração com outras estratégias de manejo da resistência. Entre os principais componentes moleculares induzidos durante a SAR, sobressaem-se as proteínas relacionadas à patogênese, cuja diversidade estrutural e funcional sustenta a resposta defensiva (PRADHANANG *et al.*, 2003; MOLINARI; BASER, 2010; SILLERO *et al.*, 2012).

1.8. Proteínas Relacionadas à Patogênese como Efetores da Resposta Imune Vegetal

As proteínas PR (*Pathogenesis-related*) apresentam ampla diversidade bioquímica e funcional, geralmente com baixo peso molecular (6-43 kDa), termoestáveis, resistentes a proteases e solúveis em pH ácido (<3) (ALI *et al.*, 2018). Essas proteínas podem ser classificadas em subgrupos ácidos, secretados no espaço extracelular, e subgrupos básicos, transportados para o vacúolo por sequências-sinal na extremidade C-terminal. Distribuídas em todos os órgãos vegetais, as proteínas PR são particularmente abundantes nas folhas, representando de 5% a 10% do total proteico foliar, e foram isoladas em diversas espécies vegetais (SANTOS; FRANCO, 2023; KUMAR; PANDEY; PATI, 2025).

Atualmente, reconhecem-se 17 famílias distintas de proteínas PR, associadas a funções bioquímicas específicas, como glucanase, peroxidase e quitinase, ou atividades biológicas, como ação antibacteriana, antifúngica e antinematodal (STINTZI *et al.*, 1993; LIU; EKRAMODDOULLAH, 2006; ZHU; GAO, 2025). Entre essas, a família PR10 é particularmente notável, compreendendo mais de 100 membros. As proteínas PR10 são ácidas, de pequeno peso molecular (16-19 kDa), e possuem uma estrutura tridimensional conservada (Figura 3), formada por uma folha beta central coberta por alfa-hélices, estabilizada por interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. As proteínas PR10 apresentam funções multifuncionais, incluindo atividades de nucleases e participação no metabolismo secundário das plantas frente a estresses abióticos. Alguns membros também regulam o crescimento e o desenvolvimento vegetal, modulando níveis de citocinina endógena (ZVEREVA; POOGGIN, 2012; ARRAES *et al.*, 2022).

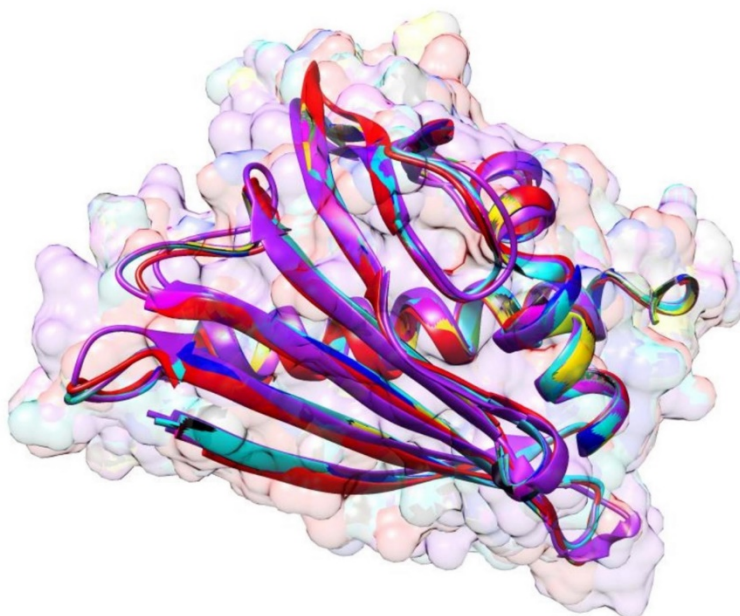


Figure 3. Estrutura tridimensional modelada da proteína *GmPR10* (Glyma.17G030400.1). Sobreposição da estrutura da proteína *GmPR10* com 11 parálogos. Color Legend: Glyma.07G243500.2 - hot pink; Glyma.07G243600.2 - yellow; Glyma.07G243651.1 - green; Glyma.09G040400.1 - cyan; Glyma.09G040500.1 - blue; Glyma.09G040600.1 - medium blue; Glyma.15G145600.1 - purple; Glyma.15G145700.1 - red; Glyma.15G145800.1 - light green; Glyma.17G030200.1 - dark gray; Glyma.17G030300.1 - magenta; Glyma.17G030400.1 - black. Fonte: Freitas-Alves, 2024.

O estudo de Arraes *et al.*, (2022) destacou a proteína *GmPR10*, pertencente à família PR10, como diferencialmente expressa em genótipos de soja tolerantes à infecção por *M. incognita*. A expressão elevada de *GmPR10* está associada à capacidade da planta de restringir a reprodução do nematoide, interferindo em enzimas digestivas do parasita e na integridade do tegumento, além de atuar em sinergia com mecanismos de defesa mediados pelo ácido salicílico, como a produção de fitoalexinas, incluindo a gliceolina I. A indução coordenada de proteínas PR e da gliceolina I reflete uma estratégia integrada de defesa, na qual barreiras enzimáticas e químicas atuam sinergicamente para reduzir o avanço de patógenos em tecidos vegetais. Na soja, destaca-se a gliceolina I, pertencente à classe dos isoflavonoides, que se acumula rapidamente após a infecção por patógenos e desempenha papel crucial na contenção da colonização, principalmente de fungos e nematoides (Bl *et al.*, 2022; KUMAR *et al.*, 2025). Dessa forma, o gene *GmPR10* representa um componente-chave na resposta imune da soja e um alvo promissor para estratégias biotecnológicas, como a edição genômica, visando o melhoramento de resistência a fitonematoides. Nesse contexto, além do controle transcricional, mecanismos

regulatórios pós-transcricionais emergem como importantes moduladores da intensidade e da especificidade das respostas de defesa.

1.9. Regulação Pós-Transcricional como Moduladora da Resposta de Defesa

A expressão gênica em plantas é regulada em múltiplos níveis, incluindo o controle transcricional, pós-transcricional, traducional e pós-traducional. Enquanto a regulação transcricional determina a síntese de novos mRNAs em resposta a estímulos bióticos, a regulação pós-transcricional atua sobre transcritos já produzidos, modulando sua estabilidade, processamento, localização e eficiência de tradução. Essa camada adicional de controle permite respostas mais rápidas e dinâmicas, sendo particularmente relevante durante a ativação da imunidade vegetal, na qual a velocidade e a precisão da resposta podem determinar o sucesso da defesa (NGOU; DING; JONES, 2021).

No contexto da interação planta-patógeno, mecanismos pós-transcricionais como microRNAs (miRNAs), pequenos RNA de interferência (siRNAs) e elementos regulatórios, presentes na região 5'-UTR, exercem papel central na modulação de genes envolvidos em sinalização hormonal, fatores de transcrição e proteínas de defesa (LUO *et al.*, 2024). Os miRNAs regulam negativamente a expressão gênica por meio da clivagem direcionada de mRNAs ou da repressão traducional, ajustando a intensidade da resposta imune e contribuindo para o equilíbrio entre crescimento e defesa. Esse ajuste fino é essencial para evitar respostas exacerbadas que comprometam o desenvolvimento vegetal (DING *et al.*, 2024).

A ativação constitutiva de vias de defesa frequentemente está associada a penalidades de crescimento e à redução de produtividade, fenômeno descrito como *trade-off* entre crescimento e imunidade (HEIL; BALDWIN, 2002; KARASOV, *et al.*, 2017). Assim, mecanismos regulatórios e a indução controlada e contextualmente dependente da resposta imune são favorecidos do ponto de vista adaptativo e agrônomico. Evidências experimentais demonstram que o controle traducional mediado por elementos regulatórios na 5'-UTR pode conferir resistência ampla a patógenos sem custos significativos de desempenho, reforçando o potencial dessa estratégia para o melhoramento genético (XU *et al.*, 2017; AI *et al.*, 2022).

Entre esses mecanismos, destacam-se os *upstream open reading frames* (uORFs), pequenas fases abertas de leitura localizadas na região 5'-UTR que

modulam a eficiência de tradução do ORF principal (pORF) por meio do controle da iniciação ribossomal. Diferentemente de mecanismos baseados na degradação de mRNA, os uORFs atuam predominantemente no nível da eficiência traducional, permitindo ajuste fino da produção proteica sem alterações substanciais na abundância do transcrito. Essa característica torna os uORFs alvo estratégico para engenharia genética voltada ao aumento de resistência, com menor impacto fisiológico, atuando em plantas como o principal elemento regulatório da tradução (VON ARNIM; JIANG; VAUGHN, 2014; AI *et al.*, 2022).

1.10. uORFs como Elementos Regulatórios da Tradução em Plantas

A expressão gênica e seus mecanismos regulatórios desempenham um papel central na determinação da diversidade fenotípica dos organismos. Entre esses mecanismos, destacam-se os quadros de leitura abertos *upstream* (uORFs), regiões codificadoras localizadas na extremidade 5' não traduzida (5'-UTR) dos mRNAs, a montante da região principal de leitura aberta (pORF). Essas estruturas podem iniciar tanto por códons AUG canônicos quanto por códons alternativos, sendo amplamente distribuídas em eucariotos. Estudos de genômica comparativa indicam que uORFs estão presentes em aproximadamente 49% dos genes humanos, 44% dos genes de camundongos, 65% dos genes de peixes-zebra e em mais de 30% das transcrições de 11 espécies de plantas, abrangendo monocotiledôneas (*Zea*, *Oryza*, *Hordeum*, *Panicum*, *Saccharum*) e dicotiledôneas (*Arabidopsis*, *Brassica*, *Citrus*, *Gossypium*, *Nicotiana*, *Glycine*) (WETHMAR, 2010; VON ARNIM, JIA; VAUGHN, 2014).

De acordo com sua posição em relação ao pORF, os uORFs podem ser classificados como totalmente a montante, quando o códon precede o início do pORF, ou em uORFs sobrepostos, quando se estendem parcialmente sobre a sequência codificante principal, em quadro de leitura alternativo (Figura 4). Essa organização estrutural influencia diretamente a eficiência da tradução do gene principal, podendo atuar como barreiras à iniciação ribossômica ou como elementos moduladores da expressão gênica (ZHANG *et al.*, 2020; XIANG; DONG, 2025). Além disso, os uORFs apresentam grande variabilidade estrutural, com diferenças no comprimento, no número e na localização dentro da 5'-UTR. Estudos em genomas eucarióticos mostraram que esses elementos podem variar de zero a mais de dez por transcrito, apresentando em média, cerca de 48 nucleotídeos em humanos. Essa diversidade

estrutural sugere que as uORFs não desempenham funções uniformes, mas sim um papel contextual, ajustando a tradução do pORF a jusante de acordo com características específicas de cada transcrito (CALVO; PAGLIARINI; MOOTHA, 2009).

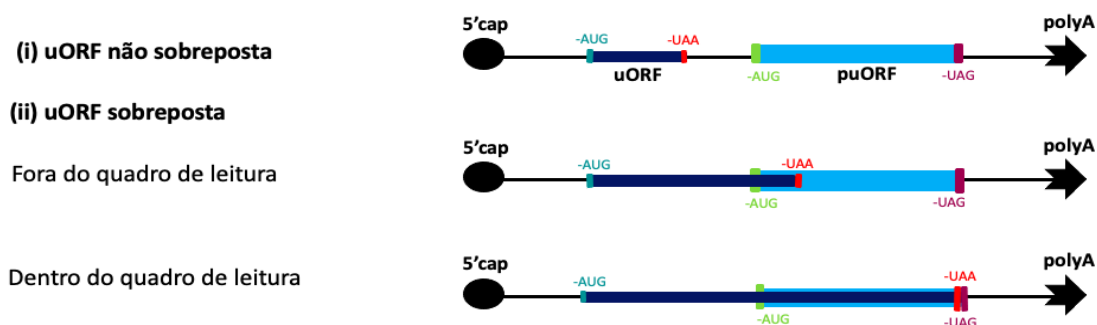


Figura 4. Tipos de uORFs. Classificação dos uORFs com base nas posições relativas entre o uORF (*open reading frame* a montante) e o puORF (*open reading frame* principal). Fonte: Zhang *et al.*, 2020, com modificações feitas pela própria autora.

Embora a região 5'-UTR seja tradicionalmente chamada de "não traduzida", pode ser parcialmente traduzida, conforme o modelo de varredura de Kozak para o início da tradução. Nesse processo, o ribossomo se associa à extremidade 5' do mRNA e percorre a sequência até encontrar o primeiro códon AUG. Quando este códon corresponde a um uORF, geralmente ocorre redução da eficiência de tradução da puORF, seja por dissociação prematura das subunidades ribossômicas (NMD), seja pela paralisação do ribossomo (Figura 5). Apesar disso, ainda não está totalmente elucidado se todas as uORFs atuam de forma inibitória ou se essa função é restrita a casos específicos (WETHMAR, 2014; ZANG *et al.*, 2020).

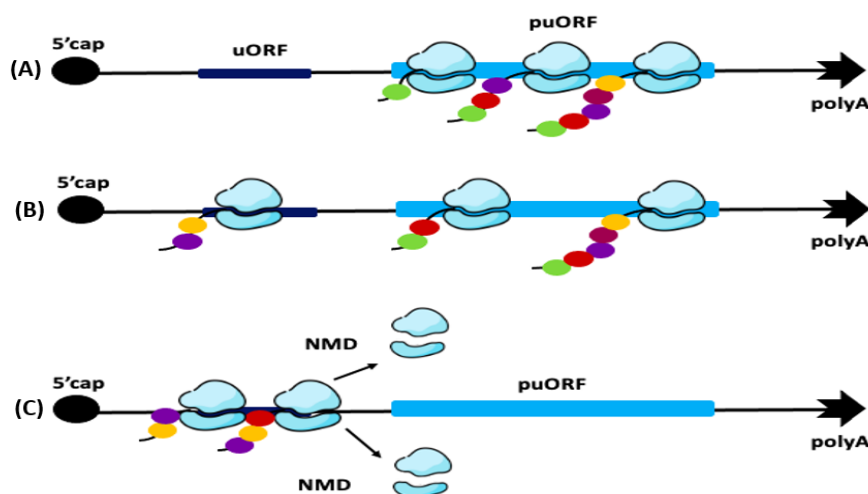


Figura 5. Mecanismos regulatórios da tradução do puORF. (a) Quando os uORFs não são reconhecidos pelos ribossomos, a tradução do puORF não é afetada; (b) Quando os uORFs são efetivamente traduzidos, a tradução do puORF é geralmente reduzida, devido à interferência causada

pela tradução do uORF; (c) Se os ribossomos se dissociam do mRNA ou desencadeiam o processo de degradação mediada por códon sem sentido (NMD, *nonsense-mediated mRNA decay*) ao estagnar no final do uORF, a tradução do puORF não ocorre. Fonte: Zhang *et al.*, 2020, com modificações feitas pela própria autora.

Diversos estudos têm demonstrado que as uORFs exercem papel crucial na repressão da tradução das regiões codificadoras principais, embora a função da maioria delas, revelada por análises computacionais, permaneça pouco conhecida. Estratégias experimentais, como o uso de oligonucleotídeos antisense dirigidos a uORFs, já mostraram potencial para aumentar a tradução das pORFs correspondentes (VON ARNIM; JIA; VAUGHN, 2014). Além disso, as uORFs podem atuar na regulação da tradução de genes de imunidade vegetal, ajustando o equilíbrio entre o crescimento celular e a resistência a patógenos (CAUSIER *et al.*, 2022).

Em plantas, evidências indicam que uORFs participam da regulação de genes envolvidos em respostas ao estresse e à defesa, permitindo ajustes rápidos na síntese proteica sem alteração substancial dos níveis de mRNA. Essa modulação é particularmente relevante para genes associados à biossíntese de metabólitos secundários, como as fitoalexinas, cuja produção é tipicamente induzida após o reconhecimento do patógeno. A regulação traducional via uORFs pode contribuir para o controle temporal e quantitativo da síntese de enzimas-chave dessas vias metabólicas, favorecendo respostas eficientes e evitando a ativação constitutiva desnecessária. Assim, os uORFs configuram um mecanismo de ajuste fino capaz de integrar crescimento, metabolismo secundário e defesa. Nesse cenário, a regulação traducional integra-se diretamente ao metabolismo secundário, cuja ativação é determinante para a biossíntese de compostos defensivos (ZHANG *et al.*, 2020; CAUSIER *et al.*, 2022).

1.11. Metabolismo Secundário e Fitoalexina na Defesa Vegetal

As fitoalexinas são metabólitos antimicrobianos de baixo peso molecular derivados do metabolismo secundário vegetal, sintetizados de forma induzida em resposta a estresses bióticos. Desde sua descrição inicial por Müller e Börger na década de 1940, esses compostos têm sido reconhecidos como componentes centrais na contenção inicial da infecção (MÜLLER; BÖRGER, 1940; CRUICKSHANK; PERRIN, 1960). Sua produção é espaço-temporalmente regulada e

integrada a redes de sinalização hormonal, envolvendo principalmente ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno, que coordenam a ativação de vias defensivas e de genes relacionados à patogênese. As fitoalexinas são biossintetizadas por diferentes vias metabólicas, refletindo sua diversidade química: a via do chiquimato (fenilpropanoide) origina estilbenos e isoflavonoides; a via dos isoprenoides gera diterpenos e sesquiterpenos; enquanto outras vias específicas formam alcaloides como a camalexina (IRITI; FAORO, 2009; CHU; WEGEL; OSBOURN, 2011; GROßKINSKY; GRAAFF; ROITSCH, 2012; KIM *et al.*, 2022).

A indução dos genes envolvidos na biossíntese de fitoalexinas é uma estratégia eficiente para preparar a planta, permitindo respostas defensivas mais rápidas sem comprometer significativamente a fisiologia do organismo, efeito similar ao observado em plantas colonizadas por microrganismos benéficos, como *Pseudomonas putida*, que promovem resistência sistêmica frente a *Pythium aphanidermatum* (ONGENA *et al.*, 2000; FERRARI *et al.*, 2007; MONSALTO; LIN; KOVINICH, 2024).

Na soja, um exemplo notável de fitoalexinas são as gliceolinas, um grupo de pterocarpanos prenilados com potente atividade antimicrobiana, capazes de inibir o crescimento de fungos e outros organismos invasores (BARZ; WELLE, 1992; MOLINARI; BASER, 2010; NWACHUKWU; LUCIANO; UDENIGWE, 2013). A síntese da gliceolina I depende da enzima glicinol 4-dimetilaliltransferase (G4DT), que catalisa a prenilação do glicinol, um passo crucial na formação da fitoalexina. A G4DT atua como elo entre a sinalização imune e a produção de gliceolinas, integrando-se a mecanismos de resistência como MTI (MAMP- *Triggered Immunity*), ETI (*Effector-Triggered Immunity*) e proteínas relacionadas à patogênese (PR), de modo que sua superexpressão representa uma estratégia promissora para intensificar a resposta defensiva da planta. Dessa forma, as gliceolinas não apenas conferem resistência direta a patógenos, mas também participam de uma rede coordenada de defesa sistêmica, atuando em conjunto com proteínas PR e outros metabólitos secundários para limitar a colonização e o desenvolvimento de agentes infecciosos na soja (MOHR; CAHILL, 2002; MOLINARI; BASER, 2010; AHUJA; KISSEN; BONES, 2012; LYGIN *et al.*, 2013).

Considerando a especificidade das interações hospedeiro-patógeno e a capacidade de muitos patógenos de desintoxicar fitoalexinas, estratégias de engenharia genética têm sido propostas para introduzir novos tipos de fitoalexinas em plantas hospedeiras ou modular a produção natural dessas moléculas, visando

aumentar a resistência a doenças de forma mais eficiente (ROWE; KLIEBENSTEIN, 2010; GROßKINSKY; GRAAFF; ROITSCH, 2012). Esses avanços em biotecnologia, somados ao conhecimento sobre a função, a biossíntese e a regulação das fitoalexinas, reforçam seu potencial como alvo promissor para o aprimoramento da proteção de culturas agrícolas, reduzindo o uso de pesticidas e aumentando a resistência integrada das plantas frente a múltiplos estresses. Nesse contexto, a compreensão dos mecanismos moleculares que regulam a interação planta-nematoide torna-se fundamental para o desenvolvimento de estratégias de resistência mais eficazes (GROßKINSKY; GRAAFF; ROITSCH, 2012).

1.12. Aspectos Emergentes da Regulação Molecular da Defesa Vegetal a Nematoides

A infecção por nematoides fitoparasitas, como *M. incognita* e *H. glycines*, envolve a secreção de efetores capazes de reprogramar profundamente o metabolismo celular da planta, culminando na formação de células gigantes ou de sincícios metabolicamente ativos que sustentam o desenvolvimento do parasita. Esse processo demanda não apenas alterações transcricionais extensas, mas também uma reorganização coordenada de múltiplas camadas regulatórias que integram o crescimento, o metabolismo e a defesa (ZHENG; PUTKER; GOVERNSE, 2021; MATUSZKIEWICZ; SOBCZAK, 2023).

Evidências recentes indicam que a plasticidade do hospedeiro durante a formação do sítio de alimentação envolve o remodelamento de cromatina, alterações na metilação de DNA e modulação da organização nuclear, sugerindo que mecanismos epigenéticos contribuem para estabilizar programas celulares favoráveis ao parasitismo. Assim, a resistência vegetal aos nematoides deve ser compreendida como um processo dinâmico, dependente do equilíbrio entre a ativação imune, a manutenção da viabilidade celular e o controle do custo metabólico associado à defesa (MATUSZKIEWICZ; SOBCZAK, 2023).

Além da regulação transcricional clássica, mecanismos pós-transcricionais emergem como componentes centrais no ajuste fino da resposta vegetal. A estabilidade de mRNAs, a ação de miRNAs e o controle da eficiência traducional modulam a intensidade e a duração da resposta imune, permitindo respostas rápidas e reversíveis diante da infecção (LI *et al.*, 2012). Durante condições de estresse

biótico, observa-se repressão global da tradução acompanhada da tradução seletiva de mRNAs associados à defesa, indicando que a regulação traducional atua como ponto estratégico de controle da imunidade vegetal. As uORFs participam desse processo ao modular a iniciação da tradução, sem necessariamente alterar os níveis de transcrição, conferindo plasticidade à expressão gênica e minimizando penalidades metabólicas prolongadas. Esse controle é particularmente relevante na biossíntese de fenilpropanoides e fitoalexinas, cuja produção é transitória e energeticamente dispendiosa, exigindo regulação temporal e espacial precisa (VON ARNIM; JIA; VAUGHN, 2014).

Paralelamente, a interação planta-nematoide é fortemente modulada por redes hormonais interconectadas. Auxinas e citocininas desempenham papel central na formação e manutenção das células alimentares, enquanto vias associadas ao ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno modulam respostas imunes e influenciam o sucesso do parasitismo (GLAZEBOOK, 2005). A integração dessas rotas hormonais estabelece um equilíbrio competitivo entre crescimento e defesa, no qual a ativação imune excessiva pode comprometer o desenvolvimento vegetal, enquanto sua supressão favorece a colonização pelo patógeno. Nesse contexto, o estado redox celular emerge como ponto de integração central, uma vez que espécies reativas de oxigênio (ROS) participam tanto da sinalização de defesa quanto da modulação da proliferação celular no sítio alimentar, exigindo controle antioxidante rigoroso para evitar danos teciduais irreversíveis (HUOT *et al.*, 2014).

Por fim, a robustez da resistência vegetal depende também da capacidade de ativar o metabolismo secundário, especialmente a via dos fenilpropanoides. Fitoalexinas, como as gliceolinas em soja, apresentam atividade antimicrobiana e nematicida, contribuindo para restringir o estabelecimento e a manutenção do parasita (LOZOVAYA *et al.*, 2004; AHUJA; KISSEN; BONES, 2012). A ativação dessas vias ocorre de forma altamente regulada e compartimentalizada, evitando autotoxicidade e custos metabólicos excessivos. Assim, a defesa contra nematoides resulta da integração dinâmica entre camadas epigenéticas, transcricionais, pós-transcricionais, traducionais, hormonais e metabólicas. A compreensão dessa arquitetura regulatória complexa fornece base conceitual para o desenvolvimento de estratégias biotecnológicas que visem o ajuste fino da imunidade vegetal, explorando tanto a modulação de elementos regulatórios quanto o reforço do metabolismo secundário como abordagens complementares no controle de nematoides. Diante dessa

complexidade regulatória, torna-se evidente o potencial de ferramentas de edição gênica para intervir de forma precisa em componentes-chave da imunidade vegetal, gerando plantas com respostas de defesa mais eficientes e melhor ajustadas do ponto de vista fisiológico.

1.13. Edição Gênica por CRISPR como Ferramenta para Modulação da Defesa Vegetal

A edição genômica baseada em nucleases sítio-dirigidas representa um dos avanços transformadores da biotecnologia moderna, ao possibilitar modificações precisas em *loci* específicos do genoma. Entre as diferentes plataformas disponíveis, o sistema CRISPR/Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats Associated protein 9*), destaca-se pela simplicidade de desenho, versatilidade e elevada eficiência. Derivado do sistema imunológico adaptativo de procariontes, o CRISPR/Cas9 utiliza uma endonuclease programável guiada por RNA para induzir quebras de dupla fita (*double-strand breaks*, DSBs) no DNA-alvo. Essas quebras ativam mecanismos celulares de reparo, predominantemente por união de extremidade não homóloga (NHEJ) ou, em menor frequência, por reparo direcionado por homologia (HDR). Como consequência, podem ser geradas inserções, deleções ou substituições, permitindo a modificação direcionada de genes codificantes e elementos regulatórios envolvidos em diferentes processos biológicos, incluindo respostas de defesa vegetal (PUCHTA; DUJON; HOHN, 1996; PUCHTA, 2004; SYMINGTON; GAUTIER, 2011; SATHEESH *et al.*, 2019).

Na agricultura, a tecnologia CRISPR/Cas9 tem sido amplamente empregada para o aprimoramento de características agrônômica, como produtividade, qualidade nutricional e tolerância a estresses abióticos. Entretanto, sua aplicação na modulação da defesa vegetal constitui um dos avanços mais estratégicos da biotecnologia moderna (YIN; QIU, 2019; JIANIG *et al.*, 2022; VERMA *et al.*, 2022; RENGASAMY *et al.*, 2024). A edição direcionada permite tanto a inativação de genes de susceptibilidade quanto a modulação de genes associados à imunidade, incluindo receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), genes de resistência (genes R), componentes das vias de sinalização mediadas por ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno, além de proteínas relacionadas à patogênese (PR). Essas intervenções têm resultado no aumento da resistência a fungos, bactérias, vírus e nematoides em

diversas espécies cultivadas (CHEN *et al.*, 2019; GAO *et al.*, 2020).

Em soja, a viabilidade do sistema CRISPR/Cas9 foi inicialmente demonstrada por Cai *et al.*, (2015), que utilizaram o sistema de raízes transformadas (*hairy roots*) para induzir mutações em genes endógenos e exógenos, estabelecendo uma plataforma funcional para validação gênica. Posteriormente, estudos de edição genômica direcionada evidenciaram que o sistema CRISPR/Cas9 é capaz de promover mutações simultâneas em múltiplos loci endógenos, incluindo genes duplicados, com alta eficiência e especificidade em soja (JACOBS *et al.*, 2015). A aplicabilidade agrônômica dessa abordagem foi reforçada pela edição simultânea dos genes homólogos *GmFAD2-1A* e *GmFAD2-1B* por meio de *dual gRNA*, resultando em alterações no perfil de ácidos graxos e demonstrando o potencial da ferramenta para o melhoramento de características de interesse econômico (DO *et al.*, 2019).

Além da modificação de regiões codificantes, um avanço conceitual relevante reside na possibilidade de editar não apenas essas regiões, mas também elementos regulatórios críticos, como promotores, *enhancers* e uORFs. Esses elementos desempenham papel central no controle fino da expressão gênica, especialmente em genes envolvidos em respostas de defesa, nos quais a intensidade e o tempo de ativação são determinantes para o equilíbrio entre crescimento e imunidade. A modulação de uORFs, em particular, permite ajustar a eficiência traducional de genes endógenos sem alterar seus padrões espaciais e temporais de transcrição, representando uma alternativa mais precisa à superexpressão constitutiva (SI *et al.*, 2020). A edição dirigida de uORFs por meio do sistema CRISPR/Cas9 pode resultar na interrupção de códons de iniciação ou na introdução de mutações que eliminam seus efeitos inibitórios sobre o pORF. Em geral, as quebras induzidas são predominantemente reparadas pela via NHEJ, que origina mutações estáveis e herdáveis (Figura 6).

Quando o sistema de edição é segregado nas gerações subsequentes, obtêm-se plantas editadas livres do cassete transgênico, ampliando o potencial regulatório e comercial da estratégia. Assim, a manipulação de uORFs emerge como uma ferramenta promissora para a modulação quantitativa da expressão proteica de genes envolvidos na defesa, permitindo um aumento direcionado da tradução sem alterar o nível de transcritos (WETHMAR, 2014; VON ARNIM; JIA; VAUGHN, 2014; SI *et al.*, 2020).

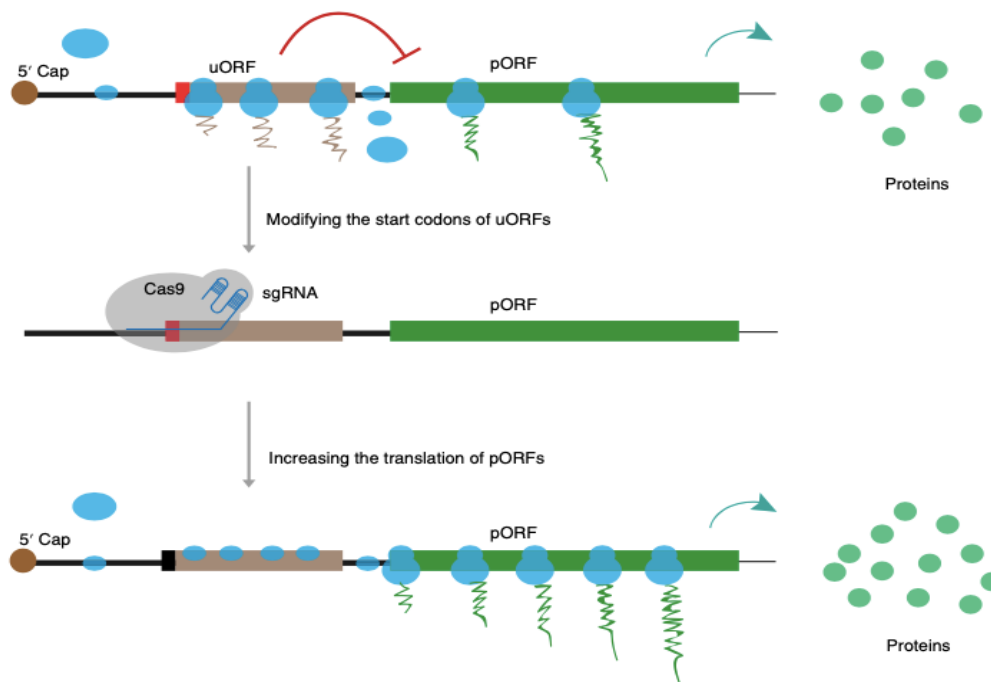


Figura 6. Ilustração esquemática da manipulação gênica da tradução por meio da edição de uORFs via CRISPR/Cas9. A tradução do mRNA inicia-se com o recrutamento do ribossomo (azul), que reconhece a estrutura 5' cap (marrom escuro) e percorre a região líder no sentido 5'–3'. Ao encontrar um códon de iniciação (vermelho) pertencente a uma uORF (marrom-escuro), essa região é traduzida, o que geralmente resulta na inibição da tradução do ORF principal (pORF) localizado a jusante (verde). A interrupção ou modificação das uORFs por meio do sistema CRISPR/Cas9 pode abolir esses efeitos inibitórios, permitindo o aumento da tradução dos pORFs a jusante. Fonte: Si *et al.*, (2020).

Nesse cenário, estratégias de edição gênica que permitam modular com precisão a tradução de genes associados à defesa representam uma abordagem inovadora e potencialmente mais sustentável para o enfrentamento de *Meloidogyne* spp. A exploração do potencial regulatório de elementos, como uORFs, pode contribuir para o fortalecimento da resposta imune sem comprometer o desenvolvimento vegetal, estabelecendo uma base conceitual para o desenvolvimento de cultivares com resistência aprimorada.

2. REFERÊNCIAS

ABAD, P; GOUZY, J; AURY, J.; CASTAGNONE-SERENO, P.; DANCHIN, E. G. J.; DELEURY, E.; PERFUS-BARBEOCH, L.; ANTHOUARD, V.; ARTIGUENAVE, F.; BLOK, V. C. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 8, p. 909-915, 2008.

ABD-ELGAWAD, M. M. M. Exploiting Plant–Phytonematode Interactions to Upgrade Safe and Effective Nematode Control. **Life**, v. 12, n. 11, p. 1916, 2022.

ABDUJABAR, A.; BELAY, Dr. G. A Review on Molecular and Cellular Basis of Plant-Parasitic Root Knot Nematode-Host Interactions: host resistance. **International Journal of Recent Research in Life Sciences**, v.9, n. 2 p. 46-63, 2022.

AHUJA, I.; KISSEN, R.; BONES, A. M. Phytoalexins in defense against pathogens. **Trends In Plant Science**, v. 17, n. 2, p. 73-90, 2012.

AI, G.; LIU, J.; FU, X.; LI, T.; ZHU, H.; ZHAI, Y.; XIA, C.; PAN, W.; LI, J.; JING, M. Making Use of Plant uORFs to Control Transgene Translation in Response to Pathogen Attack. **BioDesign Research**, v. 2022, p. 1-14, 2022.

ALI, S.; GANAI, B. A.; KAMILI, A. N.; BHAT, A. A.; MIR, Z. A.; BHAT, J. A.; TYAGI, A.; ISLAM, S. T.; MUSHTAQ, M.; YADAV, P. Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. **Microbiological Research**, v. 212-213, p. 29–37, 2018.

ALMEIDA, L. A. de; KIIHL, R. A. de S; MIRANDA, M. A. C.; CAMPELO, G. J. de A. Melhoramento da soja para regiões de baixa latitude. Londrina, PA: Embrapa Soja, 1990. Disponível em: <<http://www.cpatsoa.embrapa.br/catalogo/livrorg/sojamelhoramento.pdf>>. Acesso em: 08 ago. 2025.

ANDERSEN, E. J.; ALI, S.; BYAMUKAMA, E.; YEN, Y.; NEPAL, M. P. J. Disease Resistance Mechanisms in Plants. **Genes**, v. 9, n. 7, p. 339-369, 2018.

ANWAR, S. A.; MCKENRY, M. V. Incidence and Population Density of Plant-Parasitic Nematodes Infecting Vegetable Crops and Associated Yield Losses in Punjab, Pakistan. **Pakistan J. Zool**, v. 44, n. 2, p. 327–333, 2012.

ARJOUNE, Y.; SUGUNARAJ, N.; PERI, S.; NAIR, S. V.; SKURDAL, A.; RANGANATHAN, P.; JOHNSON, B. Soybean cyst nematode detection and management: a review. **Plant Methods**, v. 18, n. 1, p. 1-39, 2022.

ARRAES, F. B. M.; VASQUEZ, D. D. N.; TAHIR, M.; PINHEIRO, D. H.; FAHEEM, M.; FREITAS-ALVES, N.S.; MOREIRA-PINTO, C.E.; MOREIRA, V. J. V.; PAES-DE-MELO, B.; LISEI-DE-SA, M. E. Integrated Omic Approaches Reveal Molecular Mechanisms of Tolerance during Soybean and *Meloidogyne incognita* Interactions. **Plants**, v. 11, n. 20, p. 2744, 2022.

BACK, M. A.; HAYDOCK, P. P. J.; JENKINSON, P. Disease complexes involving plant parasitic nematodes and soilborne pathogens. **Plant Pathology**, Oxford, v. 51, p. 683–697, 2002.

BARZ, W.; WELLE, R. Biosynthesis and Metabolism of Isoflavones and Pterocarpan Phytoalexins in Chickpea, Soybean and Phytopathogenic Fungi. **Phenolic Metabolism In Plants**, v. 26, p. 139-164, 1992.

BENNETT, D. Root-knot nematodes in soybeans. Delta Farm Press, 2010. Disponível em: <http://deltafarmpress.com/soybeans/root-knot-nematodes-soybeans>. Acesso em: 12 jan. 2026.

BI, X.; ZHANG, Z.; DU, X.; LIU, H.; AN, T.; ZHAO, Y.; CHEN, Y.; WEN, J. Isoflavone phytoalexins in root exudates participate in mediating the resistance of common bean *Phaseolus vulgaris* to *Phytophthora sojae*. **Plant Pathology**, v. 72, n. 1, p. 120–129, 2022.

BIANCHI, M. E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 81, p. 1-5, 2006.

BIRD, D. M. Manipulation of host gene expression by root-knot nematodes. **Journal of Parasitology**, v. 82, n. 6, p. 881–888, 1996.

BONETTI, L. P. Histórico e perspectivas da cultura da soja no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 16, n. 5, p. 711-718, 1981.

BRADLEY, C. A.; ALLEN, T. W.; SISSON, A. J.; BERGSTROM, G. C.; BISSONNETTE, K. M.; BOND, J.; BYAMUKAMA, E.; CHILVERS, M. I.; COLLINS, A. A.; DAMICONE, J. P. Soybean Yield Loss Estimates Due to Diseases in the United States and Ontario, Canada, from 2015 to 2019. **Plant Health Progress**, v. 22, n. 4, p. 483- 495, 2021.

BRETSCHNEIDER, E. **History of European botanical discoveries in China**. London: Sampson Low, Marston, Searle & Rivington, 1882.

CAI, Y.; CHEN, L.; LIU, X.; SUN, S.; WU, C.; JIANG, B.; HAN, T.; HOU, W. CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing in Soybean Hairy Roots. **Public Library of Science**, v. 10, n. 8, p. 1-13, 2015.

CAILLAUD, M.; DUBREUIL, G.; QUENTIN, M.; PERFUS-BARBEOCH, L.; LECOMTE, P.; ENGLER, J. A.; ABAD, P.; ROSSO, M.; FAVERY, B. Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, p. 104–113, 2008.

CALVO, S. E.; PAGLIARINI, D. J.; MOOTHA, V. K. Upstream open reading frames cause widespread reduction of protein expression and are polymorphic among humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 18, p. 7507–7512, 2009.

CASTRO, J. M. da C.; MEYER, M. C.; SEIXAS, C. D. S. Principais nematoides em áreas produtoras de soja no Brasil. Londrina: Embrapa Soja, 2024. Disponível em: [Infoteca-e](#).

CAUSIER, B.; HOPES, T.; MCKAY, M.; PALING, Z.; DAVIES, B. Plants utilise ancient conserved peptide upstream open reading frames in stress-responsive translational regulation. **Plant, Cell & Environment**, v. 45, n. 4, p. 1229–1241, 2022.

CHAPAGAIN, B. C.; LAMICHHANE, S.; SAPKOTA, S.; KOIRALA, D.; POKHAREL, S. Biology, damage, and integrated control strategies for major plant-parasitic nematodes. **Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology**, v. 13, n. 9, p. 2845–2857, 2025.

CHEN, K.; WANG, Y.; ZHANG, R.; ZHANG, H.; GAO, C. CRISPR/Cas Genome Editing and Precision Plant Breeding in Agriculture. **Annual Review of Plant Biology**, v. 70, n. 1, p. 667-697, 2019.

CHOE, A.; VON REUSS, S. H.; KOGAN, D.; GASSER, R. B.; PLATZER, E. G.; SCHROEDER, F. C.; STERNBERG, P. W. Ascaroside signaling is widely conserved among nematodes. **Current Biology**, v. 22, n. 9, p. 772-780, 2012.

CHOI, J.; KLESSIG, D. F. DAMPs, MAMPs, NAMPs, and effectors: what they mean for plant immunity. **Annual Review of Phytopathology**, v. 16, p. 1-23, 2016.

CHU, H. Y.; WEGEL, E.; OSBOURN, A. From hormones to secondary metabolism: the emergence of metabolic gene clusters in plants. **The Plant Journal**, v. 66, n. 1, p. 66-79, 2011.

COLLANGE, B.; NAVARRETE, M.; PEYRE, G.; MATEILLE, T.; TCHAMITCHIAN, M. Root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) management in vegetable crop production: the challenge of an agronomic system analysis. **Crop Protection**, Oxford, v. 30, n. 10, p. 1251-1262, 2011.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. *Acompanhamento da Safra Brasileira: Grãos, Safra 2024/2025* Quinto levantamento. Brasília: CONAB, 2025.

COULIBALY, K. R. L.; THIO, B.; COLLIN, M.; KOITA, K.; SANOU, J.; FERNANDEZ, D. Life cycle of the Root-Knot Nematode *Meloidogyne javanica* in papaya and histological analyses of root infection and gall development. **Tropical Plant Pathology**, v. 50, n. 1, p. 1-12, 2025.

COUTO, D.; ZIPFEL, C. Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n.9, p. 537-552, 2016.

CRUICKSHANK, I. A. M.; PERRIN, D. R. Isolation of a Phytoalexin from *Pisum sativum* L. **Nature**, v. 187, n. 4739, p. 799-800, 1960.

CUNHA E CASTRO, J. M.; MEYER, M. C.; SEIXAS, C. D. S. **Circular Técnica Principais nematoides em áreas produtoras de soja no Brasil**. [Londrina, PR]: Embrapa, 2024. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1164703/1/Circ-Tec-202.pdf>>. Acesso em: 02 jan. 2026.

DANGL, J. L.; JONES, J. D. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. **Nature**, v. 411, n. 6839, p. 826-833, 2001.

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.

DAVIES, K. G. Understanding the Interaction Between an Obligate Hyperparasitic Bacterium, *Pasteuria penetrans* and its Obligate Plant-Parasitic Nematode Host, *Meloidogyne* spp. **Advances In Parasitology**, p. 211-245, 2009.

DECRAEMER, W.; HUNT, D. J. Structure and classification. **Plant Nematology**, p. 3-32, 2006.

DIAS, A.; GARCIA, A.; SILVA, J. F. V.; CARNEIRO, G. E. de S. **Circular Técnica Nematóides em Soja: Identificação e Controle**. Brasília, DF: Embrapa, 2010. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/854178/1/CT76eletronica.pdf> <>. Acesso em: 10 dez. 2025.

DIAS, W. P.; GARCIA, A.; SILVA, J. F. V. **Nematoides associados à cultura da soja no Brasil**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 22., 2000, Uberlândia. *Anais...* Uberlândia: UFU/ICIAG, p. 59-65. 2000.

DING, T.; LI, W.; LI, F.; REN, M.; WANG, W. MicroRNAs: Key Regulators in Plant Responses to Abiotic and Biotic Stresses via Endogenous and cross-kingdom mechanisms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 2, p. 1–24, 2024.

DO, P. T.; NGUYEN, C. X.; BUI, H. T.; TRAN, L. T. N.; STACEY, G.; GILLMAN, J. D.; ZHANG, Z. J.; STACEY, M. G. Demonstration of highly efficient dual gRNA CRISPR/Cas9 editing of the homeologous GmFAD2–1A and GmFAD2–1B genes to yield a high oleic, low linoleic and α -linolenic acid phenotype in soybean. **BMC Plant Biology**, v. 19, n. 1, p. 1-14, 2019.

DURRANT, W.E.; DONG, X. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 42, n. 1, p. 185-209, 2004.

ENDO, B. Y. Pathogenesis of Nematode-Infected Plants. *Annual Review of Phytopathology*, v. 13, n. 1, p. 213-238, 1975.

ENGLER J. A.; VLEESSCHAUWER, V.; BURSSSENS, S.; CELENZA, J. L.; INZÉ, D.; VAN MONTAGU, M.; ENGLER, G.; GHEYSEN, G. 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.

ESPADA, M.; VICENTE, C. S.L.; VIEIRA, P. Molecular Insights into Migratory Plant-Parasitic Nematodes. **Annual Review of Phytopathology**, v. 63, n. 1, p. 403-430, 2025.

FERRARI, S.; GALLETTI, R.; DENOUX, C.; LORENZO, G.; AUSUBEL, F. M.; DEWDNEY, J. Resistance to *Botrytis cinerea* Induced in *Arabidopsis* by Elicitors Is Independent of Salicylic Acid, Ethylene, or Jasmonate Signaling but Requires PHYTOALEXIN DEFICIENT3. **Plant Physiology**, v. 144, n. 1, p. 367–379, 2007.

FERRAZ, L.; BROWN, D. J. F. **Nematologia de plantas: fundamentos e importância**. 1. ed. Manaus: Norma Editora, 2016.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). *FAOSTAT Statistical Database*. Rome: FAO, 2024. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat>.

FREITAS-ALVES, N. S. **Functional validation of novel molecules and CRISPR approaches for soybean tolerance to root-knot nematodes**. 2024. Tese. (Doutorado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2024.

FU, Z. Q.; DONG, X. Systemic Acquired Resistance: turning local infection into global defense. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, n. 1, p. 839-863, 2013.

GAFFNEY, T.; FRIEDRICH, L.; VERNOOIJ, B.; NEGROTTO, D.; NYE, G.; UKNES, S.; WARD, E.; KESSMANN, H.; RYALS, J. Requirement of Salicylic Acid for the Induction of Systemic Acquired Resistance. **Science**, v. 261, n. 5122, p. 754-756, 1993.

GAO, C. Genome engineering for crop improvement and future agriculture. **Cell**, v. 184, n. 6, p. 1621-1635, 2021.

GAZZONI, D. L.; DALL'AGNOL, A. A história da soja no Brasil. **Embrapa Soja Documentos**, Londrina: Embrapa, 2018.

GHEYSEN, G.; FENOLL, C. Gene expression in nematode feeding sites. **Annual Review of Phytopathology**, v. 40, n. 1, p. 191-219, 2002.

GLAZEBROOK, J. Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, n. 1, p. 205-227, 2005.

GILLET, F.; BOURNAUD, C.; SOUZA JÚNIOR, J. D. A.; GROSSI-DE-SA, M. F. Plant-parasitic nematodes: towards understanding molecular players in stress responses. **Annals of Botany**, p. 775-789, 2017.

GRIEBEL, T.; ZEIER, J. Light Regulation and Daytime Dependency of Inducible Plant Defenses in Arabidopsis: Phytochrome Signaling Controls Systemic Acquired Resistance Rather Than Local Defense. **Plant Physiology**, v. 147, n. 2, p. 790–801, 2008.

GRIGOLLI, J. F. J.; ASMUS, G. L. **Manejo de Nematoides na Cultura da Soja**. Brasília, DF: Embrapa, 2014. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/985986/1/cap.9.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2025

GROßKINSKY, D. K.; VAN DER GRAAFF, E.; ROITSCH, T. Phytoalexin transgenics in crop protection-Fairy tale with a happy end? **Plant Science**, v. 195, p. 54–70, 2012.

GOELLNER, M.; WANG, X.; DAVIS, E. L. Endo-1,4-glucanase expression in compatible plant- nematode interactions. **The Plant Cell**, v. 13, p. 2241–2255, 2001.

GOMES, C. B.; CARNEIRO, R. M. D. G.; SILVA, W. R.; VIEIRA FILHO, J. A. *Nematoides fitoparasitas e métodos de controle*. Pelotas, RS: Embrapa, 2022. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1149975/1/2248>>

4.pdf> Acesso em: 26 nov. 2025

HAEGEMAN, A.; MANTELIN, S.; JONES, J. T.; GHEYSEN, G. Functional roles of effectors of plant-parasitic nematodes. **Gene**, v. 492, n. 1, p. 19-31, 2012.

HALLMAN, J.; DAVIES, K. G.; SIKORA, R. Biological control using microbial pathogens, endophytes and antagonists. **Root-knot nematodes**, p. 380–411, 2009.

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, n. 1, p. 5-17, 2011.

HARTMANN, M.; ZEIER, J. N-hydroxypipecolic acid and salicylic acid: a metabolic duo for systemic acquired resistance. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 50, p. 44-57, 2019.

HEIL, M.; BALDWIN, I. T. Fitness costs of induced resistance: emerging experimental support for a slippery concept. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 2, p. 61–67, 2002.

HEWEZI, T.; HOWE, P. J.; MAIER, T. R.; HUSSEY, R. S.; MITCHUM, M. G.; DAVIS, E. L.; BAUM, T. J. Arabidopsis Spermidine Synthase Is Targeted by an Effector Protein of the Cyst Nematode *Heterodera schachtii*. **Plant Physiology**, v. 152, n. 2, p. 968-984, 2009.

HEWEZI, T. Cellular Signaling Pathways and Posttranslational Modifications Mediated by Nematode Effector Proteins. **Plant Physiology**, v. 169, n. 2, p. 1018-1026, 2015.

HEWEZI, T. Epigenetic Mechanisms in Nematode–Plant Interactions. **Annual Review Of Phytopathology**, v. 58, n. 1, p. 119-138, 2020.

HEWEZI, T.; BAUM, T. J. Manipulation of Plant Cells by Cyst and Root-Knot Nematode Effectors. **Molecular Plant-Microbe Interactions®**, v. 26, n. 1, p. 9-16, 2013.

HUOT, B.; YAO, J.; MONTGOMERY, B. L.; HE, S. Y. Growth–Defense Tradeoffs in Plants: a balancing act to optimize fitness. **Molecular Plant**, v. 7, n. 8, p. 1267-1287, ago. 2014.

HYMOWITZ, T. On the domestication of the soybean. **Economic Botany**, v. 24, n. 4, p. 408– 421, 1970.

HYMOWITZ, T.; HARLAN, J. R. Introduction of soybean to North America by Samuel Bowen in 1765. **Economic Botany**, v. 37, n. 4, p. 371–379, 1983.

IBRAHIM, H. M.; HOSSEINI, P.; ALKHAROUF, N. W; HUSSEIN, E. H.; EL-DIN, A. E. K. G.; AMALY, M.; MATTHEWS, B. F. Analysis of gene expression in soybean (*Glycine max*) roots in response to the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* using microarrays and KEGG pathways. **BMC Genomics**, v. 12, n. 1, p. 1-16, 2011.

IRITI, M.; FAORO, F. Chemical Diversity and Defence Metabolism: How Plants Cope

with Pathogens and Ozone Pollution. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 8, p. 3371–3399, 2009.

ISLAM, Md. M.; EL-SAPPAH, A. H.; ALI, H. M.; ZANDI, P.; HUANG, Q.; SOAUD, S. A.; ALAZIZI, E. M.y.; WAFA, H. A.; HOSSAIN, Md. A.; LIANG, Y. Pathogenesis-related proteins (PRs) countering environmental stress in plants: A review. **South African Journal of Botany**, v. 160, p. 414–427, 2023.

ITHAL, N.; RECKNOR, J.; NETTLETON, D.; MAIER, T.; BAUM, T. J.; MITCHUM, M. G. Developmental transcript profiling of cyst nematode feeding cells in soybean roots. **Molecular Plant-Microbe Interactions®**, v. 20, n. 5, p. 510–525, 2007b.

ITHAL, N.; RECKNOR, J.; NETTLETON, D.; HEARNE, L.; MAIER, T.; BAUM, T. J.; MITCHUM, M. G. Parallel genome-wide expression profiling of host and pathogen during soybean cyst nematode infection of soybean. **Molecular Plant-Microbe Interactions®**, v. 20, n. 3, p. 293–305, 2007a.

JACOBS, T. B; LAFAYETTE, P. R; SCHMITZ, R. J; A PARROTT, Wayne. Targeted genome modifications in soybean with CRISPR/Cas9. **Bmc Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 1-10, 2015.

JAGDALE, G. B.; RAO, S. R.; GIRI, A. P. Metabolic reprogramming and cell wall remodeling in plants during nematode infection. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 40, p. 2145–2160, 2021.

JEANDET, P.; HÉBRARD, C.; DEVILLE, M.; CORDELIER, S.; DOREY, S.; AZIZ, A.; CROUZET, J. Deciphering the Role of Phytoalexins in Plant-Microorganism Interactions and Human Health. **Molecules**, v. 19, n. 11, p. 18033-18056, 2014.

JIANING, G.; ZHIMING, X.; RASHEED, A.; TIANCONG, W.; QIAN, Z.; ZHUO, Z.; ZHUO, Z.; GARDINER, J. J.; AHMAD, I.; XIAOXUE, W. CRISPR/Cas9 applications for improvement of soybeans, current scenarios, and future perspectives. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 50, n. 2, p. 12678, 2022.

JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, p. 323-329, 2006.

JONES, J. T.; HAEGEMAN, A.; DANCHIN, E. G. J.; GAUR, H. S.; HELDER, J.; JONES, M. G. K.; KIKUCHI, T.; MANZANILLA-LÓPEZ, R.; PALOMARES-RIUS, J. E.; WESEMAEL, W. M. L. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 14, n. 9, p. 946-961, 2013.

KARASOV, T. L.; CHAE, E.; HERMAN, J. J.; BERGELSON, J. Mechanisms to Mitigate the Trade-Off between Growth and Defense. **The Plant Cell**, v. 29, n. 4, p. 666–680, 2017.

KHAN, R.; NAZ, I.; HUSSAIN, S.; KHAN, R. A. A.; ULLAH, S.; RASHID, M. U.; SIDDIQUE, I. Phytochemical management of root knot nematode (*Meloidogyne incognita*) kofoid and white chitwood by *Artemisia* spp. in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). **Brazilian Journal of Biology**, v. 80, n. 4, p. 829-838, 2020.

KIIHL, R. A. S.; GARCIA, A. Desenvolvimento de cultivares de soja para baixas latitudes: o caso do Brasil Central. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 24, n. 1, p. 59-68, 1989.

KIM, T.; LEE, B.; ISLAM, Md T.; AVICE, J. Editorial: Hormonal crosstalk on the regulation of stress responses. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 1-2, 2022.

KLINK, V. P.; HOSSEINI, P.; MATSYE, P. D.; ALKHAROUF, N. W.; MATTHEWS, B. F. Syncytium gene expression in *Glycine max* [PI 88788] roots undergoing a resistant reaction to the parasitic nematode *Heterodera glycines*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 176–193, 2010.

KUMAR, P.; KUMAR, D.; PAL, S.; SINGH, S. Plant secondary metabolites in defense against phytopathogens: Mechanisms, biosynthesis, and applications. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 138, p. 102639, 2025.

KUMAR, P.; PANDEY, S.; PATI, P. K. Interaction between pathogenesis-related (PR) proteins and phytohormone signaling pathways in conferring disease tolerance in plants. **Physiologia Plantarum**, v. 177, n. 2, 2025.

LEAL, J. C. A soja no Brasil: histórico e perspectivas. Campinas: Instituto Agronômico de Campinas, 1967.

LIMA, F. S. de O; SANTOS, G. R.; NOGUEIRA, S. R.; RESPALNDES, P. Population dynamics of *P. brachyurus* in Tocantins soybean fields and its effect on yield. **Nematropica**, v. 45, n. 2, p. 170–177, 2015.

LI, F.; PIGNATTA, D.; BENDIX, C.; BRUNKARD, J. O.; COHN, M. M.; TUNG, J.; SUN, H.; KUMAR, P.; BAKER, B. MicroRNA regulation of plant innate immune receptors. **Proceedings Of The National Academy of Sciences**, v. 109, n. 5, p. 1790-1795, 2012.

LINDERMAYR, C.; SELL, S.; MÜLLER, B.; LEISTER, D.; DURNER, J. Redox Regulation of the NPR1-TGA1 System of *Arabidopsis thaliana* by Nitric Oxide. **The Plant Cell**, v. 22, n. 8, p. 2894-2907, 2010.

LIU, J.-J.; EKRAMODDOULLAH, A. K. M. The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: Their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 68, n. 1-3, p. 3–13, 2006.

LOZOVAYA, V. V.; LYGIN, A. V.; ZERNOVA, O. V.; LI, S.; HARTMAN, G. L.; WIDHOLM, J.M. Isoflavonoid accumulation in soybean hairy roots upon treatment with *Fusarium solani*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 7-8, p. 671-679, 2004.

LUO, C.; BASHIR, N. H.; LI, Z.; LIU, C.; SHI, Y.; CHU, H. Plant microRNAs regulate the defense response against pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, P. 1-12, 2024.

LYGIN, A.V.; ZERNOVA, O. V.; HILL, C. B.; KHOLINA, N. A.; WIDHOLM, J. M.; HARTMAN, G. L.; LOZOVAYA, V. V. Glyceollin is an Important Component of Soybean Plant Defense Against *Phytophthora sojae* and *Macrophomina phaseolina*. **Phytopathology**, v. 103, n. 10, p. 984-994, 2013.

MANOSALVA, P.; MANOHAR, M.; VON REUSS, S. H.; CHEN, S.; KOCH, A.; KAPLAN, F.; CHOE, A.; MICIKAS, R. J.; WANG, X.; KOGEL, K. Conserved nematode signalling molecules elicit plant defenses and pathogen resistance. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 1-8, 2015.

MENDY, B.; WANG'OMBE, M. W.; RADAKOVIC, Z. S.; HOLBEIN, J.; ILYAS, M.; CHOPRA, D.; HOLTON, N.; ZIPFEL, C.; GRUNDLER, F. M. W.; SIDDIQUE, S. The Arabidopsis leucine-rich repeat receptor-like kinase NILR1 is required for recognition of nematode proteins. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 4, p. 1-9, 2017.

MATUSZKIEWICZ, M.; SOBCZAK, M. Syncytium Induced by Plant-Parasitic Nematodes. **Results And Problems In Cell Differentiation**, p. 371-403, 2023.

MERRILL, E. D. Notes on the history of the soybean. **Journal of the American Oriental Society**, v. 51, n. 1, p. 1-12, 1931.

MITCHUM, M. G.; HUSSEY, R. S.; BAUM, T. J.; WANG, X.; ELLING, A. A.; WUBBEN, M.; DAVIS, E. L. Nematode effector proteins: an emerging paradigm of parasitism. **New Phytologist**, v. 199, n. 4, p. 879-894, 2013.

MISHRA, R.; TRIPATHI, M. K.; SIKARWAR, R. S.; SINGH, Y.; TRIPATHI, N. Soybean (*Glycine max* L. Merrill): a multipurpose legume shaping our world. **Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology**, v. 25, n. 3-4, p. 17-37, 2024.

MOENS, M.; PERRY, R. N.; STARR, J. L.; *Meloidogyne species* - a diverse group of novel and important plant parasites. **Root-Knot Nematodes**, p. 1-17, 2009.

MOHR, P. G.; CAHILL, D. M. Relative roles of glyceollin, lignin and the hypersensitive response and the influence of ABA in compatible and incompatible interactions of soybeans with *Phytophthora sojae*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 58, n. 1, p. 31-41, 2002.

MOLINARI, S.; BASER, N. Induction of resistance to root-knot nematodes by SAR elicitors in tomato. **Crop Protection**, v. 29, n. 11, p. 1354-1362, 2010.

MONSALVO, I.; LIN, J.; KOVINICH, N. Phytoalexin gene regulation in *Arabidopsis thaliana* – On the verge of a paradigm shift? **Current Plant Biology**, v. 39, p. 100367, 2024.

MOURA, R. M. Desempenho de cultivares de soja sob diferentes níveis populacionais de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, v. 20, n. 1, p. 1-8, 1996.

MÜLLER, K. O.; BÖRGER, H. Experimentelle Untersuchungen über die *Phytophthora*-Resistenz der Kartoffel. **Arbeiten der Biologischen Reichsanstalt für Land- und Forstwirtschaft**, v. 23, p. 189-231, 1940.

NABI, Z.; MANZOOR, S.; NABI, S. Un; WANI, T. A.; GULZAR, H.; FAROOQ, M.; ARYA, V. M.; BALOCH, F. S.; VLĂDULESCU, C.; POPESCU, S. M. Pattern-Triggered Immunity and Effector-Triggered Immunity: crosstalk and cooperation of PRR and NLR-mediated plant defense pathways during host–pathogen interactions. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 30, n. 4, p. 587–604, 2024.

NGOU, B. P. M.; JONES, J. D. G.; DING, P. Plant immune networks. **Trends in Plant Science**, v. 27, n. 3, p. 255-273, 2021.

NICOL, J. M. TURNER, S. J.; COYNE, D. L.; NIJS, L. D.; HOCKLAND, S.; MAAFI, Z. T. Current Nematode Threats to World Agriculture. **Genomics And Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions**, p. 21-43, 2011.

NISHITANI, K. A genome-based approach to study the mechanisms by which cell-wall type is defined and constructed by the collaborative actions of cell-wall-related enzymes. **Journal of Plant Research**, v. 115, n. 4, p. 303–307, 2002.

NOBORI, T. Immune cell states: critical building blocks of the plant immune system. **Cell Host & Microbe**, v. 33, n. 8, p. 1227-1232, 2025.

NOMBELA, G.; WILLIAMSON, V. M.; MUÑIZ, M. The Root-Knot Nematode Resistance Gene Mi-1.2 of Tomato Is Responsible for Resistance Against the Whitefly *Bemisia tabaci*. **Molecular Plant-Microbe Interactions®**, v. 16, n. 7, p. 645-649, 2003.

NWACHUKWU, I. D.; LUCIANO, F. B.; UDENIGWE, C. C. The inducible soybean glyceollin phytoalexins with multifunctional health-promoting properties. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 1208-1216, 2013.

OLIVER, R. P.; IPCHO, S. V. S. Arabidopsis pathology breathes new life into the necrotrophs-vs.-biotrophs classification of fungal pathogens. **Molecular Plant Pathology**, v. 5, n. 4, p. 347-352, 2004.

ONGENA, M.; DAAYF, F.; JACQUES, P.; THONART, P.; BENHAMOU, N.; PAULITZ, T. C.; BÉLANGER, R. R. Systemic induction of phytoalexins in cucumber in response to treatments with fluorescent pseudomonads. **Plant Pathology**, v. 49, n. 4, p. 523–530, 2000.

PANT, S. R.; MCNEECE, B.T.; SHARMA, K.; NIRUALA, P.; BURSON, H. E.; LAWRENCE, G.W.; KLINK, V. P. The heterologous expression of a *Glycine max* homolog of NONEXPRESSOR OF PR1 (NPR1) and α -hydroxynitrile glucosidase suppresses parasitism by the root pathogen *Meloidogyne incognita* in *Gossypium hirsutum*. **Journal Of Plant Interactions**, v. 11, n. 1, p. 41-52, 2016.

PIETERSE, C. M. J.; VAN DER ENT, S.; VAN PELT, J. A.; VAN LOON, L. C. The role of ethylene in rhizobacteria-induced systemic resistance (ISR). **Advances In Plant Ethylene Research**, p. 325-331, 2007.

PIETERSE, C. M.; VAN LOON, Lc. NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, n. 4, p. 456-464, 2004.

PIRES, R. R.; SILVA, J. R.; SOUZA, L. P. Factors influencing the efficacy of biological control agents against nematodes: environmental and formulation considerations. **Biological Control**, v. 165, p. 104819, 2022.

POVEDA, J.; ABRIL-URIAS, P.; ESCOBAR, C. Biological control of nematodes: soil microorganisms and their metabolites. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1302-1312, 2020.

PITSILI, E.; PHUKAN, U. J.; COLL, N. S. Cell Death in Plant Immunity. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, [S.L.], v. 12, n. 6, p. 1-12, 2019.

PRADHANANG, P. M.; MOMOL, M. T.; OLSON, S. M.; JONES, J. B. Effects of Plant Essential Oils on *Ralstonia solanacearum* Population Density and Bacterial Wilt Incidence in Tomato. **Plant Disease**, v. 87, n. 4, p. 423-427, 2003.

PUCHTA, H. The repair of double-strand breaks in plants: Mechanisms and consequences for genome evolution. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 409, 2004.

PUCHTA, H.; DUJON, B.; HOHN, B. Two different but related mechanisms are used in plants for the repair of genomic double-strand breaks by homologous recombination. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 10, p. 5055–5060, 1996.

RITZINGER, C. H. S. P.; FRANCELLI, M. Manejo integrado de nematoides em fruteiras tropicais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 2, p. 331–340, 2006.

ROBERTS, P. A. Concepts and consequences of resistance. In: STARR, J. L.; COOK, R.; BRIDGE, J. (Eds.). **Plant resistance to parasitic nematodes**. Wallingford: CAB International, p. 23-41, 2002.

ROCHA, M. C. A soja como forrageira no Brasil: perspectivas históricas e agronômicas. **Revista de Agricultura Brasileira**, v. 98, n. 1, p. 45–60, 2023.

RÓŚAÑSKA, E.; KRĘPSKI, T.; WIŚNIEWSKA, A. Mutations in Selected ABA-Related Genes Reduce Level of *Arabidopsis thaliana* Susceptibility to the Beet Cyst Nematode *Heterodera schachtii*. **Plants**, v. 12, n. 12, p. 2299, 2023.

ROVIRA, A. D. Plant root exudates. **The Botanical Review**, v. 35, n. 1, p. 35-57, jan. 1969.

ROWE, H. C.; KLIEBENSTEIN, D. J. All Mold Is Not Alike: the importance of intraspecific diversity in necrotrophic plant pathogens. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 3, p. 1-3, 2010.

RUSINQUE, L.; CAMACHO, M. J.; SERRA, C.; NÓBREGA, F.; INÁCIO, M. L. Root-knot nematode assessment: species identification, distribution, and new host records

in Portugal. **Frontiers In Plant Science**, v. 14, p. 1-11, 2023.

RUTTER, W. B.; FRANCO, J.; GLEASON, C. Rooting Out the Mechanisms of Root-Knot Nematode–Plant Interactions. **Annual Review of Phytopathology**, v. 60, n. 1, p. 43-76, 2022.

SAIJO, Y.; LOO, E. P. Plant immunity in signal integration between biotic and abiotic stress responses. **New Phytologist**, v. 225, n. 1, p. 87-104, 2019.

SANDHU, D.; TASMA, I. M.; FRASCH, R.; BHATTACHARYYA, M. K. Systemic acquired resistance in soybean is regulated by two proteins, Orthologous to Arabidopsis NPR1. **BMC Plant Biology**, v. 9, n. 1, p. 1-14, 2009.

SANTOS, C.; FRANCO, O. L. Pathogenesis-Related Proteins (PRs) with Enzyme Activity Activating Plant Defense Responses. **Plants**, v. 12, n. 11, p. 2226-2239, 2023.

SATHEESH, V.; ZHANG, H.; WANG, X.; LEI, M. Precise editing of plant genomes – Prospects and challenges. **Seminars In Cell & Developmental Biology**, v. 96, p. 115-123, 2019.

SI, X.; ZHANG, H.; WANG, Y.; CHEN, K.; GAO, C. Manipulating gene translation in plants by CRISPR–Cas9-mediated genome editing of upstream open reading frames. **Nature Protocols**, v. 15, n. 2, p. 338-363, 2020.

SILLERO, J.C.; ROJAS-MOLINA, M.M.; AVILA, C.M.; RUBIALES, D. Induction of systemic acquired resistance against rust, ascochyta blight and broomrape in faba bean by exogenous application of salicylic acid and benzothiadiazole. **Crop Protection**, v. 34, p. 65-69, 2012.

SIRISHA, V.L.; MITRA, S.; SUPRASANNA, P. Plant immune system: mechanisms and resilience. **Stress: Immunology and Inflammation**, p. 9-21, 2024.

SMITH, L. J.; SCHEIKOWSKI, L.; KAFLE, D. The Distribution of Reniform Nematode (*Rotylenchulus reniformis*) in Cotton Fields in Central Queensland and Population Dynamics in Response to Cropping Regime. **Pathogens**, v. 13, n. 10, p. 888, 2024.

STINTZI, A.; HEITZ, T.; PRASAD, V.; WIEDEMANN-MERDINOGLU, S.; KAUFFMANN, S.; GEOFFROY, P.; LEGRAND, M.; FRITIG, B. Plant “pathogenesis-related” proteins and their role in defense against pathogens. **Biochimie**, v. 75, n. 8, p. 687–706, 1993.

SOUZA, V. H. M.; PELLEGRIN, C.; HANLON, V. C. T.; XIA, C.; KRANSE, O. P.; SONAWALA, U.; DESIKAN, P.; SENATORI, B.; DANCHIN, E. G.J.; DEREVNINA, L. The host range paradox of *Meloidogyne incognita*: a physiological and transcriptomic analysis of nine susceptible interactions across six plant orders. **Biorxiv**, p. 1-30, 2025.

SOYINFO CENTER. *History of soybeans and soyfoods in South America*. Lafayette, CA: Soyinfo Center, 2018.

SPOEL, S. H.; DONG, X. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 2, p. 89-100, 2012.

SUN, T.; ZHANG, Y. MAP kinase cascades in plant development and immune signaling. **Embo Reports**, v. 23, n. 2, p. 1-17, 2022.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J. P. SYSTEMIC ACQUIRED RESISTANCE. **Annual Review of Phytopathology**, v. 35, n. 1, p. 235-270, 1997.

SYMINGTON, L. S.; GAUTIER, J. Double-Strand Break End Resection and Repair Pathway Choice. **Annual Review of Genetics**, v. 45, n. 1, p. 247–271, 2011.

THAKUR, S.; SUR, S.; BOSE, D.; GOYAL, A. K.; RITU, R. A. I.; BHATTACHARYA, M.; BOTHRA, A. K.; SEN, A. Molecular modelling of a pathogenesis related protein from *Solanum tuberosum*. **NBU Journal of Plant Sciences**: University of North Bengal, India, v. 3, p. 15-20, 2009.

TANG, D.; KANG, R.; BERGHE, T. V.; VANDENABEELE, P.; KROEMER, G. The molecular machinery of regulated cell death. **Cell Research**, v. 29, n. 5, p. 347-364, 2019.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). *World Agricultural Production Report*. Washington, DC: USDA, 2025.

VAN HOENSELAAR, T.; KARSSSEN, G. Revision of the Genus *Meloidogyne* Göldi, 1892 (Nematoda: heteroderidae) in Europe. **Nematologica**, v. 44, n. 6, p. 713-788, 1998.

VON ARNIM, A. G.; JIA, Q.; VAUGHN, J. N. Regulation of plant translation by upstream open reading frames. **Plant Science**, v. 214, p. 1–12, 2014.

VAN LOON, L. C.; VAN STRIEN, E. A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 55, p. 85- 97, 1999.

VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, p. 135-162, 2006.

VERMA, A. K.; MANDAL, S.; SERIN, Y.; ALI, M. H.; TIWARI, A.; LIONETTI, E.; CATASSI, C. CRISPR/Cas9 as a promising genome-editing technology for generating low-immunogenic wheat variety: recent legislation and global implementation of genetically engineered crops. **CAB reviews**, 2022.

VIDHYASEKARAN, P. Plant Hormone Signaling Systems in Plant Innate Immunity. **Signaling and Communication in Plants**, p. 1-26, 2015.

XU, G.; GREENE, G. H.; YOO, H.; LIU, L.; MARQUÉS, J.; MOTLEY, J.; DONG, X. Global translational reprogramming is a fundamental layer of immune regulation in plants. **Nature**, v. 545, n. 7655, p. 487–490, 2017.

XIANG, Y.; DONG, X. Translational Regulation of Plant Stress Responses:

Mechanisms, Pathways, and Applications in Bioengineering. **Annual Review of Phytopathology**, 2025.

WETHMAR, K. The regulatory potential of upstream open reading frames in eukaryotic gene expression. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, v. 5, n. 6, p. 765–768, 2014.

WILLIAMSON, V. M.; GLEASON, C. Plant–nematode interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, n. 4, p. 327–333, 2003.

WILLIAMSON, V. M.; KUMAR, A. Nematode resistance in plants: the battle underground. **Trends in Genetics**, v. 22, n. 7, p. 396–403, 2006.

YAN, Y.; LIU, G.; SHEN, Q.; HE, P.; SHAN, L. Orchestration of plant PRR- and NLR-mediated immunity: protein kinases and beyond. **Molecular Cell**, v. 85, n. 20, p. 3840–3852, 2025.

YADAV, H.; ROBERTS, P. A.; LOPEZ-ARREDONDO, D. Combating Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne* spp.): from molecular mechanisms to resistant crops. **Plants**, v. 14, n. 9, p. 1321–1356, 2025.

YIN, K.; QIU, J. Genome editing for plant disease resistance: applications and perspectives. **Philosophical Transactions of The Royal Society B: Biological Sciences**, v. 374, n. 1767, p. 20180322, 2019.

YUE, Z.; HE, S.; WANG, J.; JIANG, Q.; WANG, H.; WU, J.; LI, C.; WANG, Z.; HE, X.; JIA, N. Glyceollins from soybean: their pharmacological effects and biosynthetic pathways. **Heliyon**, v. 9, n. 11, p. 1–18, 2023.

YÜKSEL, E.; BOZBUĞA, R. Plant resistance genes against nematodes: mechanisms and genetic resources in crop protection. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 140, n. 1, p. 1–12, 2025.

ZADEGAN, S. B.; LI, P.; SULTANA, M. S.; ABBAS, H. M. K.; COFFEY, N.; ÖZTÜRK, C.; ELWASIF, M.; RICE, J. H.; KRISHNAN, H. B.; HEWEZI, T. Single-nucleus RNA-sequencing reveals the cellular programs driving nematode-induced giant cell formation in tomato. **Horticulture Research**, v. 12, n. 11, p. 1–13, 2025.

ZOU, J.; KYNDT, T.; YU, J.; ZHOU, J. Plant–nematode battle: engagement of complex signaling network. **Trends in Parasitology**, v. 40, n. 9, p. 846–857, 2024.

ZHOU, Y.; WANG, Y.; ZHU, X.; LIU, R.; XIANG, P.; CHEN, J.; LIU, X.; DUAN, Y.; CHEN, L. Management of the soybean cyst nematode *Heterodera glycines* with combinations of different rhizobacterial strains on soybean. **Plos One**, v. 12, n. 8, p. 0182654, 2017.

ZHANG, T.; WU, A.; YUE, Y.; ZHAO, Y. UORFs: important cis-regulatory elements in plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 17, p. 6238, 2020.

ZIPFEL, C.; ROBATZEK, S.; NAVARRO, L.; OAKELEY, E. J.; JONES, J. D. G.; FELIX,

G.; BOLLER, T. Bacterial disease resistance in Arabidopsis through flagellin perception. **Nature**, v. 428, p. 764-767, 2004.

ZHANG, T.; WU, A.; YUE, Y.; ZHAO, Y. uORFs: Important Cis-Regulatory Elements in Plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 17, p. 6238, 2020.
ZHENG, Q.; PUTKER, V.; GOVERSE, A. Molecular and Cellular Mechanisms Involved in Host-Specific Resistance to Cyst Nematodes in Crops. **Frontiers In Plant Science**, v. 12, p. 1-12, 2021.

ZHU, Y.; GAO, F. Involvement of Pathogenesis-Related Proteins and Their Roles in Abiotic Stress Responses in Plants. **Biomolecules**, v. 15, n. 8, p. 1103, 2025.

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

ZHOU, W.; LI, M.; ACHAL, V. A comprehensive review on environmental and human health impacts of chemical pesticide usage. **Emerging Contaminants**, v. 11, n. 1, p. 100410, 2025.

ZIPFEL, C.; KUNZE, G.; CHINCHILLA, D.; CANIARD, A.; JONES, J. D.G.; BOLLER, T.; FELIX, G. Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. **Cell**, v. 125, p. 749-760, 2006.

ZVEREVA, A. S.; POOGGIN, M.M. Silencing and Innate Immunity in Plant Defense Against Viral and Non-Viral Pathogens. **Viruses**, v. 4, n. 11, p. 2578-2597, 2012.

CHAPTER I
TRANSLATIONAL MODULATION OF *GmPR10* BY CRISPR/CAS9-MEDIATED
uORF DEPLETION ENHANCES SOYBEAN RESISTANCE TO *Meloidogyne*
incognita

1. HIPÓTESE

A depleção das uORFs do gene *GmPR10* via CRISPR/Cas9 aumentará a tradução da proteína codificante em soja, promovendo a tolerância à *M. incognita*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Modular a tradução do gene *GmPR10* por meio da edição de uORFs via CRISPR/Cas9, visando à promoção da tolerância da soja a *M. incognita*.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Predizer as uORFs presentes na região 5'-UTR do gene *GmPR10*, utilizando a ferramenta de análise *in silico* uORflight.
- ✓ Validar as uORFs do gene *GmPR10* utilizando vetores *dual-luciferase* por meio de ensaios transientes em protoplastos de *N. benthamiana* transformados com as construções contendo as uORFs não-mutadas e mutadas (-ATG).
- ✓ Desenhar sgRNAs para a depleção das uORFs validadas utilizando o software CRISPR-P 2.0.
- ✓ Construir os vetores CRISPR/Cas9 com os sgRNAs selecionados.
- ✓ Validar os vetores CRISPR/Cas9 em sistema *hairy roots* de soja induzidos via *A. rhizogenes* cepa K599.
- ✓ Transformar plantas de soja por meio de organogênese somática, com a construção mais eficiente para a depleção de uORFs.
- ✓ Confirmar a edição genômica nas raízes transformadas e nos eventos de soja por meio de PCR seguida de sequenciamento de Sanger.
- ✓ Avaliar a expressão da proteína GmPR10 por *Western blot* nas plantas editadas.
- ✓ Realizar bioensaios com *M. incognita* utilizando eventos contendo edições específicas em homozigose para determinar os efeitos da modulação traducional na tolerância ao nematoide *M. incognita*.

Translational modulation of *GmPR10* by CRISPR/Cas9-mediated uORF depletion enhances soybean resistance to *Meloidogyne incognita*

Lorena S. L. Costa^{1,3}, Nayara S. de Freitas-Alves^{2,3}, Clidia E. Moreira-Pinto^{2,3}, Lilian H. Florentino², Fabrício B. M. Arraes⁴, Yiping Qi⁵, Carolina V. Morgante^{2,3}, Maria Fátima Grossi-de-Sá^{2,3}

¹ University of Brasília, Institute of Biological Sciences, Department of Molecular Biology, Brasília, Brazil.

² Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, Brasília, DF, Brazil.

³ National Institute of Science and Technology in PlantStress Biotech (INCT), Embrapa, Brasília, DF, Brazil.

⁴ Sempre AgTech (SEMPRE), Brasília, DF, Brazil.

⁵ University of Maryland, Maryland, College Park, USA.

ABSTRACT

Root-knot nematodes (RKN, *Meloidogyne* spp.) are among the most damaging pathogens of soybean (*Glycine max*), directly impacting grain yield and quality. Elucidating the molecular mechanisms underlying resistance is essential for developing effective management strategies and breeding programs. Previously, transcriptomic and proteomic analyses of contrasting soybean genotypes (BRS133 - susceptible and PI595099 - highly tolerant) identified candidate genes associated with RKN tolerance. Among them, the *GmPR10* gene, which encodes a pathogenesis-related class 10 (PR-10) protein, was identified and is well-known for its inhibitory activity against phytonematode digestive enzymes and cuticles. Recently, the editing of upstream open reading frames (uORFs) via CRISPR/Cas9 has emerged as a powerful strategy to enhance the translation of primary ORFs (pORFs). We identified two uORFs within the 5'-UTR of the *GmPR10* gene. To validate their regulatory role, the entire 5'-UTR region of the gene was cloned into a dual-luciferase reporter system, and the start codons of these uORFs (-ATG) were deleted using site-directed mutagenesis. The simultaneous depletion of uORF1 and uORF2 resulted in approximately a 3.5-fold increase in LUC/REN activity in *Nicotiana benthamiana* protoplasts, confirming their role in modulating translation. Based on these findings, CRISPR-based knockout strategies were designed to deplete both uORFs and boost *GmPR10* protein levels in soybean. The depletion of uORFs represents an innovative approach for modulating the translation of defense-related genes. Beyond enhancing soybean tolerance to RKN, this method enables the development of transgene-free plants, offering a sustainable and promising alternative for managing these high-impact agricultural pathogens.

Keywords: *Glycine max*, Root-Knot Nematodes, Genome editing, uORF, 5'-UTR, Translational regulation, PR-10, Transgene-free.

3. INTRODUCTION

Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) is one of the most significant crops globally, playing a fundamental role in food security, vegetable protein production, and the oil and biofuel industries. Currently, Brazil is the world's leading soybean producer, with its national output projected to reach a record 180 million tons in the 2025/2026 crop year (USDA, 2026). Although soybean productivity has increased significantly due to genetic and management advancements, production remains constrained by susceptibility to biotic stresses, including plant-parasitic nematodes (PPNs) (MIRANSARI, 2016; SHELKE *et al.*, 2023). These pathogens exhibit broad geographic distribution, high adaptability, and soil persistence, significantly compromising crop performance, particularly in intensive cropping systems and successive monocultures (ROSSO *et al.*, 1999; HAEGEMAN *et al.*, 2012; BRADLEY *et al.*, 2021; ARJOUNE *et al.*, 2022)

In this context, among the main phytosanitary challenges for soybeans are root-knot nematodes (RKN), particularly the endoparasite *Meloidogyne incognita*. Although chemical nematicides are effective, their toxicity to humans and the environment has led to their progressive withdrawal from the market, making the development of cultivars with enhanced genetic resistance an urgent priority (ROBERTS, 2002; WILLIAMSON; KUMAR, 2006). However, despite the use of resistant cultivars being a preferred management strategy due to their low environmental impact and large-scale viability (CAMARGO, 2011; LIN *et al.*, 2022), their effectiveness is frequently hampered by the high genetic variability of plant-parasitic nematodes, which can overcome resistance barriers over time (ROBERTS, 2002; WILLIAMSON; KUMAR, 2006). Therefore, elucidating plant immunity is essential for developing more durable control strategies.

Plant immunity against these pathogens is orchestrated by complex responses involving phytohormones and pathogenesis-related (PR) genes, which regulate the delicate balance between growth and resistance (SMAKOWSKA *et al.*, 2016; BRIDA; CORREIA; WILCKEN, 2017). In this context, the *GmPR10* (*G. max* pathogenesis-related class 10 protein) gene has emerged as a key component of the soybean immune response to *M. incognita*. Studies have demonstrated that this gene is differentially expressed in tolerant genotypes and that its overexpression in transgenic tobacco significantly reduced the number of galls, egg counts, and the reproduction

factor compared to non-transformed plants (ARRAES *et al.*, 2022). Consistent results were also observed in transformed roots of detached soybean leaves, which showed an approximately 40% reduction in gall formation, confirming the gene's potential as a target for biotechnological resistance strategies (FREITAS-ALVES *et al.*, 2023). Beyond limiting parasite reproduction, *GmPR10* targets nematode digestive enzymes and cuticle integrity, while also interacting with salicylic acid-mediated mechanisms, such as phytoalexin production (ROCHA *et al.*, 2015; YANG; WANG, 2024).

Recently, the fine-tuning of gene translation via upstream open reading frames (uORFs) has emerged as an innovative strategy to enhance plant resistance to biotic stresses (SI *et al.*, 2020; TIAN *et al.*, 2024). These short sequences, located in the 5' untranslated region (5' UTR) of mRNAs, typically attenuate the translation of primary open reading frames (pORFs) by sequestering ribosomes or inhibiting their progression (KOZAK, 1987; KURIHARA, 2020). Consequently, manipulating uORFs by deleting start codons or disrupting the Kozak consensus via CRISPR/Cas9 allows for the precise upregulation of target proteins without altering mRNA levels. In several species, the depletion of uORFs via CRISPR/Cas9 technology has been successfully used to increase the protein levels of target genes without altering mRNA transcription levels, providing tolerance to stresses such as salinity, drought, and pathogens (ZHANG *et al.*, 2018; SI *et al.*, 2020; TIAN *et al.*, 2024). This approach offers a promising alternative to conventional transgenesis, potentially generating non-genetically modified (non-GMO) cultivars with enhanced stress tolerance (KOCISOVA; CONEVA, 2023).

In this study, uORF sequences were identified in the 5'-UTR of the *GmPR10* gene, a gene associated with tolerance to *M. incognita* (ARRAES *et al.*, 2022; FREITAS-ALVES *et al.*, 2024). To validate their regulatory function, the entire 5'-UTR region of the gene was cloned into a dual-luciferase reporter system, and the start codons of these uORFs (-ATG) were deleted using site-directed mutagenesis. The simultaneous depletion of *uORF1* and *uORF2* resulted in an increase in LUC/REN activity in protoplasts of *N. benthamiana*, confirming their role in modulating translation. Based on these findings, CRISPR-based strategies were designed to deplete these uORFs, aiming to boost *GmPR10* protein levels in soybean. Our hypothesis is that this translational modulation will lead to the development of plants that can be classified as non-GMO, with more robust and durable resistance against RNKs, in addition to simplifying regulatory and market approval processes for the developed soybean lines.

4. MATERIALS AND METHODS

4.1 Target gene, *In silico* Analysis and uORF Identification

The *GmPR10* gene (*G. max* pathogenesis-related class 10 protein, Glyma.17G030400) was selected as the target for translational modulation based on its previously reported role in soybean resistance to *M. incognita*. This selection was supported by the positive correlation observed among proteomic, transcriptomic, and RT-qPCR datasets (ARRAES *et al.*, 2022), as well as its functional validation in transgenic tobacco and soybean hairy roots (ARRAES *et al.*, 2022; FREITAS-ALVES *et al.*, 2024).

The 5'-UTR sequence of *GmPR10* was retrieved from the Phytozome v14.1 database (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>). To identify potential regulatory elements, upstream open reading frames (uORFs) were screened for evolutionary conservation and the presence of conserved peptide uORFs (CPuORFs). This analysis was conducted using the uORFLight online tool (NIU *et al.*, 2020; Table S1 and Figure S1a), which facilitates comparative analysis of nucleotide or peptide sequences within the 5'-UTR against orthologous genes across diverse phylogenetic groups. The sequences were predicted based on their start and stop codons, length, location, and frequency (SI *et al.*, 2020).

4.2 Construction of dual-luciferase reporter vectors

The *pGreenII0800-LUC* vector (SI *et al.*, 2020) was employed for uORF validation, featuring two reporter genes: firefly luciferase (LUC) and *Renilla* luciferase (REN) (Figures 1A, S1b and S1c). Since the original vector contained a single *CaMV35S* promoter driving REN expression, an additional *CaMV35S* promoter was amplified and subsequently cloned between the *HindIII* and *BamHI* restriction sites to drive LUC expression. The entire 5' leader region of the target gene was amplified and inserted into the *BamHI* and *NcoI* sites, positioned upstream of the LUC reporter. To evaluate the regulatory role of the identified uORFs, their initiation codons (-ATG) were deleted via site-directed mutagenesis using the Transformer Site-Directed Mutagenesis Kit (Clontech®, Takara™, CA, USA), following the manufacturer's instructions (Table S2). All cloning steps and mutagenesis events were rigorously

confirmed through Sanger sequencing of the resulting plasmids. In the wild-type (WT) constructs, the 5' leader sequence remained intact, whereas in the mutant (MT) variants, the initiation codons (-ATG) were specifically disrupted to assess their inhibitory effects.

4.3 Isolation of *Nicotiana benthamiana* Protoplast, transfection, and dual-luciferase assays

The *N. benthamiana* protoplasts were isolated from the leaves of 21-day-old seedlings grown under controlled environmental conditions (25 ± 2 °C, 12 h photoperiod, and a light intensity of $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Transfection was performed using dual-luciferase constructs harboring either the wild-type (WT) or mutated versions of the 5' leader sequence. For each transfection assay, 20 μg of plasmid DNA and approximately 5×10^5 protoplasts were utilized. Following a 48 h incubation period, protoplasts were harvested by centrifugation at $100 \times g$ for 2 min and stored at -80 °C until analysis. Luciferase and Renilla luciferase (LUC/REN) activities were quantified using the Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega, Madison, WI, USA; Cat# E1910) according to the manufacturer's protocol. Corresponding LUC/REN mRNA levels were determined as detailed in Section 4.4.

4.4 RNA Extraction and RT-qPCR Analysis

Total RNA was isolated from *N. benthamiana* protoplasts using PureLink™ Plant RNA Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) following the manufacturer's protocol. RNA concentration and purity were assessed using a NanoDrop™ 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). For cDNA synthesis, 1 μg of total RNA was treated with DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) to eliminate genomic DNA contamination. Subsequently, first-strand cDNA was synthesized using oligo-(dT)30 primers and M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA). The resulting cDNA was diluted (1:10, v/v) and used as a template for RT-qPCR assays. Reactions were performed on an Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Foster City, CA, USA) using SYBR™ Green Master Mix and gene-specific primers (0.2 μM) (Table S3) in a final volume of 10 μL . Relative gene expression levels were calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method

(SCHMITTGEN; LIVAK, 2008). The *N. benthamiana* genes *NbTCTP* (Translationally controlled tumour protein), *NbELF1 α* (elongation factor 1-alpha), and *NbPP2A* (Protein Phosphatase 2A) were utilized as internal reference controls for normalization (Table S3). Each treatment consisted of 4 biological replicates, each analyzed in technical triplicates. Amplification specificity was verified by melting curve analysis. Ct values and PCR efficiencies were determined using the Miner software (ZHAO; FERNALD, 2005), and final expression data were processed through the SATqPCR platform (RANCUREL *et al.*, 2019).

4.5 CRISPR/Cas9 Vector Construction

The CRISPR/Cas9 binary vectors were constructed to target the specific uORFs previously validated in the dual-luciferase reporter system. Single guide RNA (sgRNA) sequences targeting the 5' leader region of the *GmPR10* gene were designed using the CRISPR-P 2.0 online tool (LEI *et al.*, 2014). Candidate sgRNAs were selected based on high on-target scores, optimal GC content, and the absence of predicted off-target sites (Table 1). The assembly followed a modular cloning strategy: initially, sgRNA pairs 1+5 and 3+5 were cloned into the entry vectors *pYPQ131B* (carrying the *AtU3* promoter for the first sgRNA) and *pYPQ132B* (carrying the *AtU3* promoter for the second sgRNA), respectively. Subsequently, both sgRNA expression cassettes were assembled into the *pYPQ142* intermediate vector through Golden Gate cloning using the *BsaI* restriction enzyme. The final binary constructs, *pYPQ142+sgRNA1/5* and *pYPQ142+sgRNA3/5*, were generated by recombining the intermediate modules with *pYPQ160* (containing the *AtUBI10* promoter driving a plant-codon-optimized *zCas9*) and the destination vector *pYPQ202* using the LR Clonase™ II Gateway™ cloning system (Invitrogen). All final constructs were verified by restriction analysis and Sanger sequencing. Intermediate and final vectors were previously validated by PCR for the presence of sgRNA sequences and the Cas9 module prior to transformation (Figures S2-S8). After hairy root induction, PCR-positive samples were subjected to Sanger sequencing to confirm the presence of the constructs and to detect potential editing events (Figures S9-S11). The final binary constructs were mobilized into *Agrobacterium rhizogenes* strain K599 for soybean hairy root induction (Section 4.6) and subsequent sgRNA validation. Based on the highest editing efficiency, the most effective constructs were further introduced into *A. tumefaciens* strain GV3101 for the

generation of stable soybean lines (Section 4.8).

Table 1. Characteristics of the sgRNAs designed for CRISPR/Cas9-mediated editing of uORFs 1 and 2 in the *GmPR10* gene. The table displays the sgRNA identification number, on-score, sgRNA sequence (black), and its corresponding PAM (green), GC content (%), and number of potential off-target sites. These sequences were selected based on their proximity to uORFs 1 and 2, as well as their high on-score values and low number of predicted off-targets.

sgRNA	On-score	Sequence	(%) GC	N° de off-target
1	0.6537	ATTCAGATGCTCTTTAGC AGAGG	40%	29
3	0.4100	AAGTGACATTAACGGTAC TACGG	35%	19
5	0.1754	GGCATGCAAAGTGACAT TAACGG	45%	64
8	*	GCAGCTTCATTCACTA TGGG	45%	*

Obs: *This sgRNA was manually designed to specifically target *uORF1*.

4.6 *Agrobacterium rhizogenes*-Mediated Hairy Root Transformation in Soybean Detached Leaves

The *A. rhizogenes* strains were transformed via electroporation according to the protocol described by Nagel *et al.* (1990) with the empty *pPZP* vector (control) and the CRISPR/Cas9 vectors. For inoculum preparation, a single colony of *A. rhizogenes* strain K599 harboring each construct was cultured on solid LB medium supplemented with appropriate antibiotics at 28 °C for 48 h. Subsequently, 1 mL of sterile liquid LB medium containing 15% (v/v) glycerol was added to the colony for homogenization. For experimental use, 500 µL of this suspension was spread onto fresh LB plates containing the same antibiotics and incubated at 28 °C for 16 h to produce the bacterial paste used for inoculation. Hairy root induction was performed using the detached leaf method as described by Freitas-Alves *et al.* (2024), with minor modifications. Seeds of *G. max* (cv. BRS 537) were sown in tubes containing commercial substrate (Bioplant Agrícola Ltda®, Nova Ponte, MG, Brazil) and maintained in a greenhouse under manual irrigation, a 12 h photoperiod, and ambient temperatures of 25 °C. After 20 days, unifoliate leaves were harvested by cutting at the petiole-stem junction. Each petiole was inoculated with the bacterial paste of *A. rhizogenes* strain K599 containing either the empty vector (*pPZP*) or the CRISPR/Cas9 constructs, using a sterile 23³/₄

gauge needle. The inoculated leaves were placed in Petri dishes (150 x 15 mm) containing a layer of sterile cotton covered with sterile filter paper. The inoculated region of the petiole was wrapped in moist sterile cotton, which was rehydrated every 48 h with tap water. Plates were maintained in a growth chamber at 25 ± 2 °C under a 12 h photoperiod and a light intensity of $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ for 20 days. Following root emergence, hairy roots were individually harvested for subsequent genome editing evaluations (Section 4.7).

4.7 Genomic DNA Isolation, PCR Analysis and Gene Editing Detection

Genomic DNA (gDNA) was isolated from soybean hairy roots and soybean leaves of stably transformed plants using the CTAB method (MURRAY; THOMPSON, 1980). DNA concentration and purity were assessed using a NanoDrop™ 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). PCR assays were performed in a final volume of 20 μL , consisting of 0.2 mM of dNTP, 1.5 mM of MgCl_2 , 0.2 μM of each primer (forward and reverse), 1 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), and 100 ng of DNA. Amplifications were conducted using GoTaq® DNA Polymerase (Promega, Madison, WI, USA) in a Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The thermal cycling profile consisted of an initial denaturation at 95 °C for 3 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 30 s, primer annealing at 55 °C for 30 s, and extension at 72 °C for 45 s, with a final extension at 72 °C for 5 min. The specific primer sequences utilized in this study are detailed in Table S4. The amplified sequences were submitted to Sanger sequencing for genome editing detection.

4.8 Stable Soybean Transformation

Seeds of the commercial soybean cultivar BRS 537 were provided by Embrapa (Brasília, Brazil). Following surface sterilization, the seeds were soaked in sterile distilled water for 24 h. Embryonic axes were subsequently isolated and subjected to genetic transformation using a somatic organogenesis-based protocol that combines biolistics and *A. tumefaciens*-mediated transformation, as described by Melo *et al.* (2020).

4.9 Analysis of Genomic Editing and Mutation Prediction

Genomic DNA isolated from both hairy roots and stable plant leaves was amplified by PCR (Section 4.7), followed by Sanger sequencing. The resulting sequencing chromatograms were analyzed using the Inference of CRISPR Edits (ICE) software (Synthego, Redwood City, CA, USA). Sequences from non-transformed wild-type (WT) plants served as reference controls for comparative analysis. Target editing was confirmed by identifying the specific depletion or disruption of the uORF initiation codons (-ATG) in the edited samples.

4.10 Statistical Analysis

Statistical differences were assessed using one-way Analysis of Variance (ANOVA), followed by Tukey's post-hoc test for multiple comparisons. The analyzed parameters included: (i) LUC/REN enzymatic activity, (ii) LUC/REN mRNA levels, and (iii) endogenous target gene expression. Data for enzymatic activity (i) were processed using GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). In contrast, RT-qPCR results (ii and iii) were statistically evaluated through the SATqPCR platform (RANCUREL *et al.*, 2019). For all analyses, differences were considered statistically significant at $P < 0.05$. All data are presented as the mean $\pm$ standard error (SE) of at least three independent biological replicates.

5. RESULTS

5.1. *In Silico* Characterization and Prediction of uORFs in the *GmPR10* Gene

In silico analysis of the 5'-UTR of the soybean *GmPR10* gene (Glyma.17G030400) using the *uORFLight* tool identified two distinct upstream open reading frames, designated as *uORF1* and *uORF2* (Figure S1a), and their sequences are available in table S1. These regulatory elements are located in close proximity within the 5' leader sequence, suggesting a potential role in the translational control of the primary ORF (pORF).

5.2. Functional Impact of *GmPR10* uORFs on Translational Efficiency

The functional analysis of the identified uORFs in *N. benthamiana* protoplasts revealed a synergistic repressive effect on the translation of the *GmPR10* gene. While individual mutations in either *uORF1* or *uORF2* did not significantly increase the LUC/REN ratio compared to the wild-type (WT) 5' leader sequence, the simultaneous disruption of both initiation codons (*uORF1/2*) resulted in a significant elevation of luciferase enzymatic activity (Figure 1B). These findings indicate that *uORF1* and *uORF2* act redundantly to suppress protein synthesis under their native genomic context. To determine whether this regulation occurred at the transcriptional or translational level, LUC/REN mRNA abundance was quantified. In agreement with the dual-luciferase assays, no significant variations in transcript levels were detected among the tested constructs (Figure 1C). This stability in mRNA levels confirms that the observed increase in reporter activity is independent of transcript accumulation, establishing that the uORF1-uORF2 (*uORF1/2*) pair modulates *GmPR10* expression through a translational regulatory mechanism.

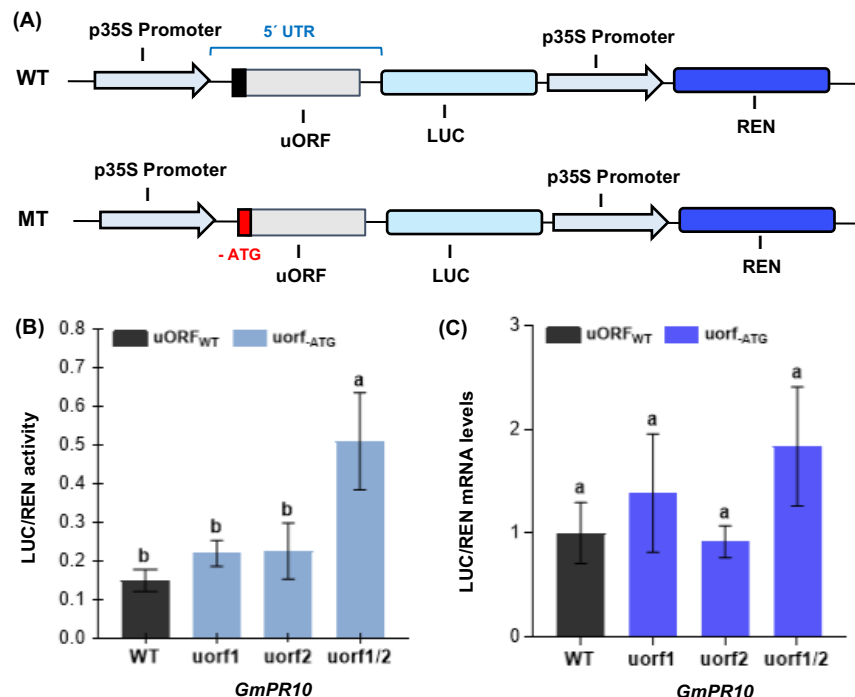


Figure 1. Validation of the effects of mutated and non-mutated uORFs in *N. benthamiana* protoplasts. (A) Schematic representation of the pGreenII 0800-LUC vector under the control of the CaMV 35S promoter containing either wild-type (WT) or mutated (MT) uORFs. (B) Relative LUC/REN activity and (C) LUC/REN mRNA levels in WT and mutant samples (*uORF1*, *uORF2*, and *uORF1/2*). Different letters indicate statistically significant differences according to one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test ($p < 0.05$).

5.3 Molecular Validation of CRISPR/Cas9 Vectors and Soybean Hairy Root

The two CRISPR/Cas9 constructs (1+5 and 3+5) successfully induced site-specific mutations (indels) at the *GmPR10* target loci in soybean hairy roots (Figure 2 and Table S5, and Figure 3 and Table S6), although the editing profiles differed significantly between the two sgRNA combinations. While the sgRNA 1+5 construct was active, the induced modifications were consistently located distal to the uORF1 and uORF2 initiation codons, and due to this spatial offset, the construct was deemed suboptimal for the effective disruption of these regulatory elements (Figure 2 and Table S5).

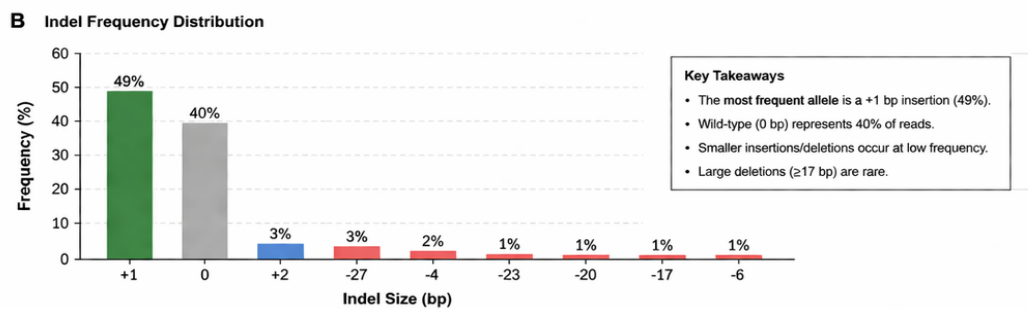


Figure 2. CRISPR/Cas9-induced mutations in the *GmPR10* target region in soybean hairy roots using guide RNAs 1 and 5. (A) Alignment of representative sequences showing insertions and deletions (indels) across different edited events. Dashes indicate deleted nucleotides, while inserted bases are shown explicitly. The reference (wild-type) sequence is shown on top. (B) Frequency distribution of detected indels, highlighting the predominance of +1 insertion (49%) and reference sequence (40%) in Event 2. Minor alleles include larger deletions ranging from -4 to -27 bp. Colors represent different

Figure 3. CRISPR/Cas9-induced mutations in the *GmPR10* target region in soybean hairy roots using

guide RNAs 3 and 5. (A) Alignment of representative sequences from independent edited events, showing insertions and deletions (indels) at the target site. The wild-type reference (reference) sequence is displayed at the top. Deleted nucleotides are indicated by dashes, whereas inserted bases are shown explicitly. (B) Frequency distribution of detected indels across edited events. Colors represent different mutation types: green indicates reference (0 bp), blue indicates insertions, red indicates deletions, and gray represents low-frequency minor alleles. A predominance of +1 bp insertions was observed in Event 1 (6%), along with additional +1 and +4 insertion alleles at lower frequencies. Minor alleles included small deletions (-2 bp) and larger deletions ranging from -22 to -47 bp, all occurring at low frequencies. Editing efficiencies (%) were estimated using the ICE online tool based on Sanger sequencing electropherograms. Figure prepared based on original data. ChatGPT (OpenAI) was used as a support tool for graphical construction and data visualization. All content was reviewed and validated by the author.

5.4 Analysis of Editing Events in Soybean Plants

Initially, 40 regenerated events were screened for the presence of the transgene by PCR. Among these, 20 events were confirmed as PCR-positive and were therefore considered valid transgenic events for subsequent analyses. These 20 events were further evaluated for the presence of edits in the sgRNA target regions. Among them, two events (SF51 and SF59) exhibited sequence modifications within the sgRNA target sites. In these events, most mutations were associated with the activity of sgRNA3, followed by a lower number of modifications induced by sgRNA5. (Figure 4, Figure S12 and Table S7). However, deletions encompassing uORF1 and uORF2 were not observed. Currently, the SF51 and SF59 events are being maintained in greenhouse conditions in the T0 and T1 generations (Figure S13), where they are undergoing generational advancement to further characterize the editing patterns and evaluate their stability in subsequent generations. Simultaneously, other events are being investigated for genomic modifications for generational advancement, following the same advancement process as SF51 and SF59. Based on these results, a new construct is currently being assembled using sgRNA8, designed to target the initiation codon of *uORF1*, in combination with sgRNA3, with the aim of promoting the deletion of both regulatory sequences through larger fragment excisions.

A CRISPR Target and Editing Overview



B Indel Frequency Distribution

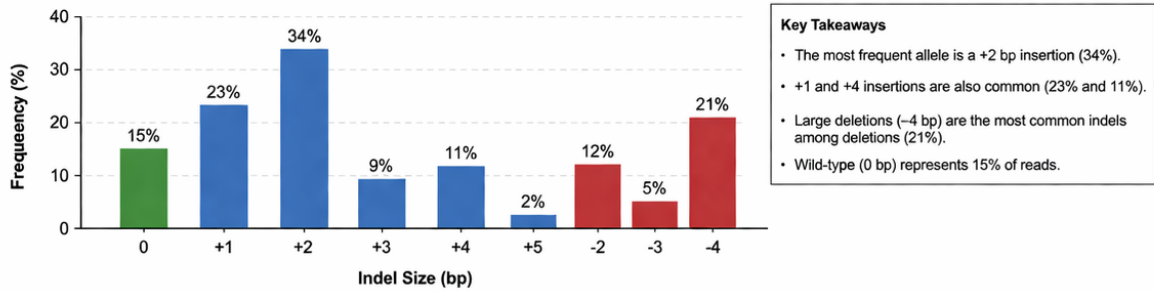


Figure 4. CRISPR/Cas9-induced mutations in the *GmPR10* gene in stable plants using guide RNAs 5+3. (A) Alignment of representative sequences showing insertions and deletions (indels) across different edited events (D5+H1 and D5+G1). Dashes indicate deleted nucleotides, while inserted bases are shown explicitly. The reference wild-type (WT, D5) sequence is shown on top. (B) Frequency distribution of detected indels, highlighting the predominance of insertion alleles, particularly +3 bp (31%) in D5+H1 and +2 bp (34%) in D5+G1. Additional frequent alleles include +1 bp insertions (~23%) in both events. Deletions are less frequent, with -4 bp (21%) and -2 bp (12%) being the most representative in D5+G1. Wild-type sequences (0 bp) are present at low frequency in both edited events. D5+H1 - legenda; D5+G1 – legenda. Editing efficiencies (%) were estimated using the ICE online tool based on Sanger sequencing electropherograms. Figure prepared based on original data. ChatGPT (OpenAI) was used as a support tool for graphical construction and data visualization. All content was reviewed and validated by the author.

6. DISCUSSION

In the integrated omics study that underpins this work, the *GmPR10* gene emerged as highly expressed in a soybean genotype tolerant to *M. incognita*, suggesting a relevant role in the plant immune response. Proteins belonging to the PR-10 family are associated with systemic acquired resistance (SAR) and the modulation of metabolic pathways involved in the biosynthesis of phytoalexins and phenolic compounds. In addition, PR-10 proteins display ribonuclease activity, which may contribute both to restricting pathogen proliferation and to amplifying defense signaling pathways (XU *et al.*, 2014). The overexpression of *GmPR10* in *Nicotiana tabacum* has previously been shown to significantly reduce the establishment and reproduction of *M. incognita*, further supporting its functional relevance in plant defense (ARRAES *et al.*, 2022).

However, rather than employing the conventional strategy of constitutive gene overexpression, the present study explored an alternative regulatory mechanism based on translational control mediated by uORFs located in the 5'-UTR of *GmPR10* (XU *et al.*, 2017). These elements function as translational negative regulators of translation, enabling rapid and energetically efficient responses to environmental stimuli (MERCHANTE *et al.*, 2017). Consequently, the targeted deletion of these uORFs may promote translational derepression, potentially increasing protein synthesis only when the gene is transcriptionally activated. This strategy preserves endogenous transcriptional regulation while avoiding the fitness costs and pleiotropic effects often associated with constitutive or ectopic gene expression (MIKI *et al.*, 2017; ALI *et al.*, 2022).

Our dual-luciferase assays in protoplasts provided critical evidence for this mechanism, showing that the simultaneous disruption of *uORF1* and *uORF2* resulted in a significant increase in the LUC/REN ratio, whereas transcript levels remained unchanged (Figures 1B and 1C). This observation confirms that these uORFs act redundantly or synergistically to repress *GmPR10* translation. Similar mechanisms have been reported for other stress responsive genes, such as *HY5* and *ACD11*, where the removal of uORFs led to increased protein accumulation without altering mRNA abundance (ZHANG *et al.*, 2020; GAO *et al.*, 2021). While direct quantification of PR10 protein levels in the edited soybean plants (for example, via Western blotting) remains a necessary next step, the robust increase in reporter activity established a

clear proof of concept for translational modulation.

The CRISPR/Cas9-mediated editing of these uORFs was initially validated in soybean hairy roots. Although both the 1+5 and 3+5 sgRNA pairs induced site-specific mutations, only the 3+5 combination yielded deletions in close proximity to the *uORF2* initiation codon (Figure 3). The spatial offset observed in the 1+5 strategy likely limited its potential for functional disruption. In the stable T0 events (SF51 and SF59), editing was confirmed but characterized by a lack of biallelic or large-scale deletions encompassing both regulatory elements. The initiation codons of *uORF1* and *uORF2* remained intact in these lines, with most mutations clustered around the sgRNA3 cleavage site (Figure 4).

The relatively low editing efficiency and the absence of dual-uORF deletions in the stable lines may be attributed to several factors. Nucleosome positioning or epigenetic marks (such as DNA methylation or repressive histone modifications) within the 5'-UTR can restrict Cas9 accessibility to the target DNA. Furthermore, the high regulatory density and potential formation of secondary RNA structures in the 5'-leader region may hinder efficient sgRNA pairing (JENSEN *et al.*, 2017). Considering the potential for chimerism in T0 plants and the continued activity of the CRISPR/Cas9 system in meristematic tissues, it is plausible that more uniform and extensive edits-including the desired fragment excisions-may emerge in the T1 or T2 generations (FENG *et al.*, 2013).

To overcome the limitations observed in the initial events, the development of the sgRNA 8+3 combination represents a strategic refinement. By pairing the highly active sgRNA3 with the newly designed sgRNA8, which specifically targets the *uORF1* start codon, the probability of generating larger fragment deletions that span both uORFs is significantly increased. This paired-sgRNA approach is a recognized method for ensuring the complete removal of regulatory elements (PATHAK *et al.*, 2019).

While translational modulation of *GmPR10* is a promising approach to enhance plant immunity, the potential metabolic costs of sustained protein synthesis must be considered. Although no phenotypic penalties were observed in the initial regenerated events, detailed agronomic evaluations, including biomass accumulation, root architecture and yield, under both stressed and non-stressed conditions will be essential to ensure no long-term pleiotropic effects exist. Furthermore, given that PR-10 proteins are central to basal immunity, this strategy may confer broad-spectrum resistance against various biotrophic and hemibiotrophic pathogens beyond *M.*

incognita (GLAZEBOOK, 2005).

In summary, this work demonstrates that uORF editing is a viable strategy for fine-tuning plant immunity while maintaining native gene architecture (VON ARNIM *et al.*, 2014). Finally, acknowledging that the plant immune response is multifaceted, Chapter 2 explores the integration of this translational control with metabolic reinforcement. By modulating phytoalexin biosynthesis through the *GmG4DT1* gene, we aim to establish a complementary layer of resistance, combining regulatory precision with enhanced chemical defense against *M. incognita*.

7. CONCLUSION

Editing the uORFs of the *GmPR10* gene establishes translational regulation as a strategic layer for modulating the soybean immune response. Although complete edits were not obtained in the T0 plants, the results presented here demonstrate that *GmPR10* expression is sensitive to the presence of uORFs, providing functional evidence that these elements act as negative modulators of translation.

The new combination of sgRNAs (8+3), in which sgRNA8 is positioned over the initiation codon of *uORF1*, represents a methodological improvement by increasing the probability of generating simultaneous deletions within the regulatory sequences, thereby enhancing the potential efficiency of the strategy. More than the immediate generation of fully edited events, this study establishes conceptual foundations for the use of non-coding regulatory element editing as a genetic improvement strategy. In contrast to constitutive overexpression, modulation of uORFs preserves the spatial and temporal regulation of the endogenous gene, enabling increased protein production only in contexts where the native promoter is naturally activated. This feature provides greater biological precision and may reduce potential pleiotropic effects associated with constitutive defense activation.

Overall, this chapter demonstrates that the manipulation of post-transcriptional regulatory elements represents a viable and innovative strategy to enhance soybean immune responses, opening new perspectives for the development of genotypes with more efficient and potentially more durable resistance to plant-parasitic nematodes.

8. REFERENCES

- AI, G.; LIU, J.; FU, X.; LI, T.; ZHU, H.; ZHAI, Y.; XIA, C.; PAN, W.; LI, J.; JING, M. Making Use of Plant uORFs to Control Transgene Translation in Response to Pathogen Attack. **BioDesign Research**, v. 2022, p. 1-14, 2022.
- ARJOUNE, Y.; SUGUNARAJ, N.; PERI, S.; NAIR, S. V.; SKURDAL, A.; RANGANATHAN, P.; JOHNSON, B. Soybean cyst nematode detection and management: a review. **Plant Methods**, v. 18, n. 1, p. 1-39, 2022.
- ARRAES, F. B. M.; VASQUEZ, D. D. N.; TAHIR, M.; PINHEIRO, D. H.; FAHEEM, M.; FREITAS-ALVES, N.S.; MOREIRA-PINTO, C.E.; MOREIRA, V. J. V.; PAES-DE-MELO, B.; LISEI-DE-SA, M. E. Integrated Omic Approaches Reveal Molecular Mechanisms of Tolerance during Soybean and *Meloidogyne incognita* Interactions. **Plants (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 20, p. 2744, 2022.
- BRADLEY, C. A.; ALLEN, T. W.; SISSON, A. J.; BERGSTROM, G. C.; BISSONNETTE, K. M.; BOND, J.; BYAMUKAMA, E.; CHILVERS, M. I.; COLLINS, A. A.; DAMICONE, J. P. Soybean Yield Loss Estimates Due to Diseases in the United States and Ontario, Canada, from 2015 to 2019. **Plant Health Progress**, v. 22, n. 4, p. 483- 495, 2021.
- BRIDA, A. L.; CORREIA, E. C. S. da S.; WILCKEN, S. R. S. Suscetibilidade de cultivares de soja ao nematoide das lesões radiculares. **Summa Phytopathologica**, v. 43, n. 3, p. 248-249, 2017.
- CAUSIER, B.; HOPES, T.; MCKAY, M.; PALING, Z.; DAVIES, B. Plants utilise ancient conserved peptide upstream open reading frames in stress-responsive translational regulation. **Plant, Cell & Environment**, v. 45, n. 4, p. 1229–1241, 2022.
- CHEN, K.; WANG, Y.; ZHANG, R.; ZHANG, H.; GAO, C. CRISPR/Cas Genome Editing and Precision Plant Breeding in Agriculture. **Annual Review of Plant Biology**, v. 70, n. 1, p. 667-697, 2019.
- CONG L.; RAN, F. A.; COX, D.; LIN, S.; BARRETTO, R.; HABIB, N.; HSU, P. D.; WU, X.; JIANG, W.; MARRAFFINI, L. A. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. **Science**, [S.L.], v. 339, n. 6121, p. 819-823, 2013.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue. **Phytochemical Bulletin**, n.19, p.11-15, 1987.
- FENG, Z.; ZHANG, B.; DING, W.; LIU, X.; YANG, D.; WEI, P.; CAO, F.; ZHU, S.; ZHANG, F.; MAO, Y. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. **Cell Research**, v. 23, n. 10, p. 1229-1232, 2013.
- FREITAS-ALVES, N. S. **Functional validation of novel molecules and CRISPR approaches for soybean tolerance to root-knot nematodes**. 2024. Tese. (Doutorado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2024.

FREITAS-ALVES, N. S.; MOREIRA-PINTO, C. E.; ARRAES, F. B. M.; COSTA, L. S. de L.; ABREU, R. A. de; MOREIRA, V. J. V.; LOURENÇO-TESSUTTI, I. T.; PINHEIRO, D. H.; LISEI-DE-SA, M. E.; PAES-DE-MELO, B. An ex vitro hairy root system from petioles of detached soybean leaves for in planta screening of target genes and CRISPR strategies associated with nematode bioassays. **Planta**, v. 259, n. 1, p. 1-17, 2023.

GAO, C. Genome engineering for crop improvement and future agriculture. **Cell**, v. 184, n. 6, p. 1621-1635, mar. 2021.

HAEGEMAN, A.; MANTELIN, S.; JONES, J. T.; GHEYSEN, G. Functional roles of effectors of plant-parasitic nematodes. **Gene**, v. 492, n. 1, p. 19-31, 2012.

HELLENS, R. P.; ALLAN, A. C.; FRIEL, E. N.; BOLITHO, K.; GRAFTON, K.; TEMPLETON, M. D.; KARUNAIRETNAM, S.; GLEAVE, A. P.; A LAING, W. Transient expression vectors for functional genomics, quantification of promoter activity and RNA silencing in plants. **Plant Methods**, v. 1, n. 1, p. 1-10, 2005.

HUOT, B.; YAO, J.; MONTGOMERY, B. L.; HE, S. Y. Growth–Defense Tradeoffs in Plants: a balancing act to optimize fitness. **Molecular Plant**, v. 7, n. 8, p. 1267-1287, ago. 2014.

JENSEN, K. T.; FLØE, L.; PETERSEN, T. S.; HUANG, J.; XU, F.; BOLUND, L.; LUO, Y.; LIN, L. Chromatin accessibility and guide sequence secondary structure affect CRISPR-Cas9 gene editing efficiency. **Febs Letters**, v. 591, n. 13, p. 1892-1901, 28, 2017.

LIN, F.; CHHAPEKAR, S. S.; VIEIRA, C. C.; SILVA, M. P. da; ROJAS, A.; LEE, D.; LIU, N.; PARDO, E. M.; LEE, Y.; DONG, Z. Breeding for disease resistance in soybean: a global perspective. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 135, n. 11, p. 3773-3872, 2022.

MALI, P.; YANG, L.; ESVELT, K. M.; AACH, J.; GUELL, M.; DICARLO, J. E.; NORVILLE, J. E.; CHURCH, G. M. RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. **Science**, v. 339, n. 6121, p. 823-826, 2013.

MELO, B. P. de; LOURENÇO-TESSUTTI, I. T.; MORGANTE, C. V.; SANTOS, N. C.; PINHEIRO, L. B.; LINS, C. B. de J.; SILVA, M. C. M.; MACEDO, L. L. P.; FONTES, E. P. B.; GROSSI-DE-SA, M. F. 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. 1-14, 12 ago. 2020.

MERCHANTE, C.; STEPANOVA, A. N.; ALONSO, J. M. Translation regulation in plants: an interesting past, an exciting present and a promising future. **The Plant Journal**, v. 90, n. 4, p. 628-653, 2017.

MIKI, D.; ZHANG, W.; ZENG, W.; FENG, Z.; ZHU, J. CRISPR/Cas9-mediated gene targeting in Arabidopsis using sequential transformation. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2018.

NAGEL, M.; ANDREESEN, J. R. Purification and characterization of the molybdoenzymes nicotinate dehydrogenase and 6-hydroxynicotinate dehydrogenase from *Bacillus niacini*. **Archives of Microbiology**, v. 154, n. 6, p. 1-10, 1990.

NIU, R.; ZHOU, Y.; ZHANG, Y.; MOU, R.; TANG, Z.; WANG, Z.; ZHOU, G.; GUO, S.; YUAN, M.; XU, G. UORFlight: a vehicle toward uorf-mediated translational regulation mechanisms in eukaryotes. **Database**, v. 2020, p. 1-12, 2020.

PATHAK, B.; ZHAO, S.; MANOHARAN, M.; SRIVASTAVA, V. Dual-targeting by CRISPR/Cas9 leads to efficient point mutagenesis but only rare targeted deletions in the rice genome. **3 Biotech**, v. 9, n. 4, p. 1-8, 2019.

RANCUREL, C.; VAN TRAN, T.; ELIE, C.; HILLIOU, F. SATQPCR: website for statistical analysis of real-time quantitative pcr data. **Molecular And Cellular Probes**, v. 46, p. 101418, 2019.

ROBERTS, P. A. Concepts and consequences of resistance. In: STARR, J. L.; COOK, R.; BRIDGE, J. (Eds.). **Plant resistance to parasitic nematodes**. Wallingford: CAB International, p. 23-41, 2002.

ROCHA, R. O.; MORAIS, J. K. S.; OLIVEIRA, J. T. A.; OLIVEIRA, H. D.; SOUSA, D. O. B.; SOUZA, C. E. A.; MORENO, F. B.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; SOUZA JÚNIOR, J. D. A. de; SÁ, M. F. G. de. Proteome of Soybean Seed Exudates Contains Plant Defense-Related Proteins Active against the Root-Knot Nematode *Meloidogyne incognita*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 22, p. 5335-5343, 2015.

SI, X.; ZHANG, H.; WANG, Y.; CHEN, K.; GAO, C. Manipulating gene translation in plants by CRISPR-Cas9-mediated genome editing of upstream open reading frames. **Nature Protocols**, v. 15, n. 2, p. 338-363, 2020.

SCHMITTGEN, T. D; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101-1108, 2008.

SMAKOWSKA, E.; KONG, J.; BUSCH, W.; BELKHADIR, Y. Organ-specific regulation of growth-defense tradeoffs by plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 29, p. 129-137, 2016.

WETHMAR, K. The regulatory potential of upstream open reading frames in eukaryotic gene expression. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, v. 5, n. 6, p. 765–768, 2014.

WILLIAMSON, V. M.; KUMAR, A. Nematode resistance in plants: the battle underground. **Trends in Genetics**, v. 22, n. 7, p. 396-403, 2006.

XING, H.; DONG, L.; WANG, Z.; ZHANG, H.; HAN, C.; LIU, B.; WANG, Xu.; CHEN, Q. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. **BMC Plant Biology**, v. 14, n. 1, p. 1-9, 2014

XU, G.; GREENE, G. H.; YOO, H.; LIU, L.; MARQUÉS, J.; MOTLEY, J.; DONG, X.

Global translational reprogramming is a fundamental layer of immune regulation in plants. **Nature**, v. 545, n. 7655, p. 487-490, 2017.

XU, G.; YUAN, M.; AI, C.; LIU, L.; ZHUANG, E.; KARAPETYAN, S.; WANG, S.; DONG, X. UORF-mediated translation allows engineered plant disease resistance without fitness costs. **Nature**, v. 545, n. 7655, p. 491-494, 2017.

YANG, Q.; WANG, G. Isoflavonoid metabolism in leguminous plants: an update and perspectives. **Frontiers in Plant Science**, v. 15, p. 1-10, 2024.

ZHANG, H.; HE, H.; WANG, X.; WANG, X.; YANG, X.; LI, L.; DENG, X. W. Genome-wide mapping of the HY5-mediated genenetworks in Arabidopsis that involve both transcriptional and post-transcriptional regulation. **The Plant Journal**, v. 65, n. 3, p. 346-358, 2010.

ZHANG, S.; ZHANG, R.; GAO, J.; SONG, G.; LI, J.; LI, W.; QI, Y.; LI, Y.; LI, G. CRISPR/Cas9-mediated genome editing for wheat grain quality improvement. **Plant Biotechnology Journal**, v. 19, n. 9, p. 1684-1686, 2021.

ZHANG, T.; WU, A.i; YUE, Y.; ZHAO, Y. uORFs: Important Cis-Regulatory Elements in Plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 17, p. 6238, 2020.

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.

SUPPLEMENTARIES TABLES AND FIGURES

Supplementary Tables

Table S1 - uORF sequences identified in the *GmPR10* gene using the online tool *uORFlight*

Gene ID	uORF name	5' space	uORF length	3' space	uORF sequence
<i>GmPR10</i>	<i>uORF1</i>	9	18	134	ATGGGGCATGCAAAGTGA
<i>GmPR10</i>	<i>uORF2</i>	16	51	94	ATGCAAAGTGACATTAACGGTA CTACGGTAGTGCTTGCTTATAA GTTATAA

Table S2 - Primers used for amplification of the 5'-UTR sequences of *GmPR10*, cloning, and uORFs site-directed mutation into the dual-luciferase reporter system.

Name	Sequence (5' - 3')	Purpose
35S-F	AtcgaagcttTGAGACTTTTCAAC AAAGGGTAAT	PCR and cloning of the <i>pCaMV35S</i> from the pGreenII0800-LUC vector into the same vector between HindIII and BamHI
35S-R	atcgggatccTGTCCTCTCCAAA TGAAATGAAC	
<i>GmPR10</i> -WT-F	GGGGGGATCCATTACACTA TGGGGCAT	PCR of the <i>GmPR10</i> 5'-UTR sequence and cloning into the pGreenII0800-LUC vector between BamHI and NcoI
<i>GmPR10</i> -WT-R	ATCGCCATGGTTATGATATT TCTTTTAAATGGAAATGG	
<i>GmPR10</i> -MT1 - F	CCATTACACTGGGCATGCA AAGTGAC	Primer to mutate the <i>uORF1</i> (-ATG) of the <i>GmPR10</i>
<i>GmPR10</i> -MT2 - F	GGATCCATTACACTATGGG GCCAAAGTGACATTAACGG	Primer to mutate the <i>uORF2</i> (-ATG) of the <i>GmPR10</i>
<i>GmPR10</i> -MT1+2 - F	GGACAGGATCCATTACACT CAAAGTGACATTAACGG	Primer to mutate the <i>uORF1</i> (-ATG) and <i>uORF2</i> (-ATG) of the <i>GmPR10</i>
KpnI-MT-F	GGCGAATTGGATACCGGGC CC	Primer to mutate the KpnI restriction site
XhoI-MT-F	GGCCCCCCTAGAGGTCTGA C	Primer to mutate the XhoI restriction site

Note: Mutated primers were designed according to the instructions found in the Transformer Site-Directed Mutagenesis Kit (Clontech, CA, USA).

Table S3 - Primers used in *Nicotiana benthamiana* protoplast assays.

Name	Sequence (5' - 3')	Purpose
NbTCTP-F	TACAAGGATGGTGCAACTGATCC	RT-qPCR of the endogenous <i>N. benthamiana</i> NbTCTP gene
NbTCTP-R	CTAGCACTTGACCTCCTTCAAGC	
NbEF1-A-F	GCTGTCCTGATTATTGACTCC	RT-qPCR of the endogenous <i>N. benthamiana</i> NbEF1 gene
NbEF1-A-R	CACGATTTTCATCGTACCTAGC	
NbPP2A-F	TGCCTGTGGTTATTACTGC	RT-qPCR of the endogenous <i>N. benthamiana</i> NbPP2A gene
NbPP2A-R	AGACTGAAGTGCTTGATTGG	

Table S3 - Continuation - Primers used in *N. benthamiana* protoplast assays.

Name	Sequence (5' - 3')	Purpose
qPCR - REN1 - F	CATGGGATGAATGGCCTGATAT	RT-qPCR of the renilla reporter gene
qPCR - REN1 - R	GATAATGTTGGACGACGAACTTC	
Luc – qPCR - F	CTGGTGCCAACCCTATTC	RT-qPCR of the luciferase reporter gene
Luc – qPCR - R	CCCATATCCTTGCCTGATAC	

Table S4 - Primers used for CRISPR/Cas9 vector construction, transgene detection, and genome editing assessment.

Name	Sequence (5' - 3')	Purpose
CRISPR-35S-HygR-F	CATTTCATTTGGAGAGGACACG	PCR of the hygromycin gene for transgene detection
CRISPR-35S-HygR-R	GAAAGCACGAGATTCTTCGC	
GmPR10-PCR-3-F	TCAAAATTCGAACGTGAGAGAGA	PCR of the <i>GmPR-10</i> gene for genome editing assessment
GmPR10-PCR-3-R	GGCTGAGCATCTCCTTTGGT	
CRISPR-pcoCas9-2-F	GCTTCTGCTCAGTCTTTCATCG	For the amplification of the Cas9 module in the final vector
CRISPR-pcoCas9-1-R	TCCTCCTTCAACTGCTTAACG	
Cas9-sgRNA01-GmPR10-F	GATTGATTGAGATGCTCTTTAGCA G	For amplification/ cloning of guide 1 in uORF editing
Cas9-sgRNA01-GmPR10-R	AAACCTGCTAAAGAGCATCTGAAT C	
Cas9-sgRNA03-GmPR10-F	GATTGAAGTGACATTAACGGTACT A	For amplification/ cloning of guide 3 in uORF editing
Cas9-sgRNA03-GmPR10-R	AACTAGTAGCGTTAATGTCACTTC	
Cas9-sgRNA05-GmPR10-F	GATTGGCATGCAAAGTGACATTAA	For amplification/ cloning of guide 5 in uORF editing
Cas9-sgRNA05-GmPR10-R	AACTTAATGTCACTTTGCATGCC	
CRISPR-sgRNA-Cas9-F	GAGTGTGAGTGAGACTTGC	For the amplification of CRISPR/Cas9 vectors
CRISPR-sgRNA-Cas9-R	TCAAGTTGATAACGGACTAGC	
CRISPR-pCo390_eGFP-1-F	GACCCTGAAGTTCATCTGC	For amplification of the GFP cassette in the final construct
CRISPR-pCo390_eGFP-1-R	GCCATGATATAGACGTTGTGG	
CRISPR-pCoCas9-1-F	GAGAAGATCGAGAAGATCCTTACC	For the amplification of the Cas9 module in the final vector
CRISPR-pCoCas9-1-R	TCCTCCTTCAACTGCTTAACG	
PR10-sgRNA8-F	GGTCAGCAGCTTCATTCACTAT G	For amplification/ cloning of guide 8 in uORF editing
PR10-sgRNA8-R	AAACCATAGTGTGAATGAAGCTGC T	

Table S5 - Characterization of mutations detected in the *GmPR10* gene in hairy root. sgRNA target region. Sequence variants identified in each event are shown relative to the reference sequence. The guide region is indicated, and insertions/deletions (indels) are represented by dashes (–) and ambiguous nucleotides (N). Indel size (bp) and mutation frequency (%) are presented for each variant. The reference sequence corresponds to the wild-type allele.

Sample	Target Sequence – Guide Region 5	Guide Region 1	Indel	Freq. (%)
Reference	CACTATGGGG- CATGCAAAGTGACATTAAACGGTACTACGGTAGT GCTTGCTTATAAGTTATAAATAGAGGGCACTCC	TCTGCTAAAGAGCATCT GAATTATTCACA	0	0
Event 1	CACTATGGGG- CATGCAAAGTGACATTAAACGGTACTACGGTAGT GCTTGCTTATAAGTTATAAATAGAGGGCACTCC	TCTGCTAAAGAGCA--T-- NNNA--A--AT	-6	1
Event 2	CACTATGGGG- CATGCAAAGTGACATTAAACGGTACTACGGTAGT GCTTGCTTATAAGTTATAAATAGAGGGCACTCC	TCTGNCTAAAGAGCATC TGAATTATTCACA	+1	49
	CACTATGGGG- CATGCAAAGTGACATTAAACGGTACTACGGTAGT GCTTGCTTATAAGTTATAAATAGAGGGCACTCC	TCTGCTAAAGAGCATCT GAATTATTCACA-	0	40
	CACTATGGGG- CATGCAAAGTGACATTAAACGGTACTACGGTAGT GCTTGCTTATAAGTTATAAATAGAGGGCACTCC	TCTGNNCTAAAGAGCAT CTGAATTATTCACA	+2	3
	CACTATGGGG- CATGCAAAGTGACATTAAACGGTACTACGGTAGT GCTTGCTTATAAGTTATAAATAGAGGGCAC---	-----TCACA	-27	3
	CACTATGGGG- CATGCAAAGTGACATTAAACGGTACTACGGTAGT GCTTGCTTATAAGTTATAAATAGAGGGCACTCC	TCTG---- AGAGCATCTGAATTATT CACA	-4	2
	CACTATGGGG- CATGCAAAGTGACATTAAACGGTACTACGGTAGT GCTTGCTTATAAGTTATAAATAGAGGGCACTCC	T-----TCACA	-23	1
	CACTATGGGG- CATGCAAAGTGACATTAAACGGTACTACGGTAGT GCTTGCTTATAAGTTATAAATAGAGGGCACTCC	TCTG----- TCACA	-20	1
	CACTATGGGG- CATGCAAAGTGACATTAAACGGTACTACGGTAGT GCTTGCTTATAAGTTATAAATAGAGGGCACTCC	TCTG----- TATTCACA	-17	1
Event 3	CACTATGGGG- CATGCAAAGTGACATTAAACGGTACTACGGTAGT GCTTGCTTATAAGTTATAAATAGAGGGCACTCC	TCTGCTAAAGAGCATCT GAATTATTCACA	-3	1
Event 4	CACTATGGGG- CATGCAAAGTGACATTAAACGGTACTACGGTAGT GCTTGCTTATAAGTTATAAATAGAGGGCACTCC	TCTGCTAAAGAGCATCT GAATTATTCACA	-3	1
	CACTATGGGG- CATGCAAAGTGACATTAAACGGTACTACGGTAGT GCTTGCTTATAAGTTATAAATAGAGGGCACTCC	TCTGCTAAAGAGCATCT GAATTATTCACA	-6	1

Table S6 – Mutation profiles detected at the sgRNA target site across edited hairy root events (Events 1-4) in the *GmPR10* gene. Target sequences from each event are shown in comparison to the reference sequence (WT). Insertions and deletions (indels) are indicated by dashes (–), while ambiguous nucleotides are represented by “N”. The size of each indel (in base pairs) and its corresponding frequency (%) are provided. Multiple sequence variants within the same sample reflect allelic variation generated by genome editing.

Sample	Target Sequence – Guide Region 5	Guide Region 3	Indel	Freq. (%)
WT	CAC T ATGGGGCATGCAAAGT GAC TTAACGG	TACTACGGTAGTGC TTGCTT ATAAGTTATAAATAGAGGGC ACTC	0	0
Event 1	CAC T ATGGGGCATGCAAAGT GAC TTAACGG	TAN CT ACGGTAGTGC TTGCTT ATAAGTTATAAATAGAGGGC ACTC	+1	6
	CAC T ATGGGGCATGCAAAGT GAC -TTAACGG	T--T-- GNGNNTAGTGC TTGCTT ATAAGTTATAAATAGAGGGC ACTC	-2	4
	CAC T ATGGGGCATGCAAAGT GAC ATNTAACGG	GTACTACGGTAGTGC TTGCTT ATAAGTTATAAATAGAGGGC ACTC	+1	2
	CAC T ATGGG-----	----- AAGTTATAAATAGAGGGC ACTC	-44	1
	CAC T ATGGGGCATGCAAAGT GAC TTAACGG	TANNN CT ACGGTAGTGC TTGCTT ATAAGTTATAAATAGAGGGC ACTC	+4	1
	CAC T ATGGGGCATGCAAAGT GAC AT-----	----- GCTTATAAGTTATAAATAGAGGGC ACTC	-22	1
	CAC T ATGGGGCATGCAAAGT GAC ATNNNNTA	ACGGTAN CT ACGGTAGTGC TTGCTT ATAAGTTATAAATAGAGGGC ACTC	+4	1
Event 2	CAC T ATGGGGCATGCAAAGT GAC TTAACGG	TACTACGGTAGTGC TTGCTT ATAAGTTATAA-----	-47	1
Event 3	CAC T ATGGGGCATGCAAAGT GAC TTAACGG	TACTACGGTAGTGC TTGCTT ATAAGTTAT----- NNNNAGGGC ACTC	-2	1
Event 4	CAC T ATGGGGCATGCAAAGT GAC TTAACGG	TACTACGGTAGTGC TTGCTT ATAAGTTATAA----- AGAGGGC ACTC	-2	1

Table S7 - Characterization of mutations detected at the sgRNA target region of in the *GmPR10* gene in soybean plants at sgRNA target region. Sequence variants identified in each event are shown relative to the reference sequence (WT). The guide region is indicated, and insertions/deletions (indels) are represented by dashes (–) and ambiguous nucleotides (N). Indel size (bp) and mutation frequency (%) are presented for each variant. The reference sequence (WT) corresponds to the wild-type allele.

Sample	Target Sequence – Guide Region 5	Guide Region 3	Indel	Freq. (%)
WT	CACATATGGGGCATGCAAACTGACATTAAACGG	TACTACGGTAGTGCTTGCTTATAAGTTATAAATAGAGGGCACTC	0	0
Event 1	CACATATGGGGCATGCAAACTGACATTAAACGG	TANNNTACGGTAGTGCTTGCTTATAAGTTATAAATAGAGGGCACTC	+3	31
	CACATATGGGGCATGCAAACTGACATTAAACGG	TANCTACGGTAGTGCTTGCTTATAAGTTATAAATAGAGGGCACTC	+1	23
	CACATATGGGGCATGCAAACTGACATTAAACGG	TANNCTACGGTAGTGCTTGCTTATAAGTTATAAATAGAGGGCACTC	+2	13
	CACATATGGGGCATGCAAACTGACATTAAACGG	TANNNNCTACGGTAGTGCTTGCTTATAAGTTATAAATAGAGGGCACTC	+4	11
	CACATATGGGGCATGCAAACTGACATTAAACGG	TACTACGGTAGTGCTTGCTTATAAGTTATAAATAGAGGGCACTC	0	10
	CACATATGGGGCATGCAAACTGACATTAAACGG	TA---CGGTAGTGCTTGCTTATAAGTTATAAATAGAGGGCACTC	-3	5
	CACATATGGGGCATGCAAACTGACATNNNTAA	CGGTACTACGGTAGTGCTTGCTTATAAGTTATAAATAGAGGGCACTC	+3	5
	CACATATGGGGCATGCAAACTGACATTAAACGG	TANNNNNNCTACGGTAGTGCTTGCTTATAAGTTATAAATAGAGGGCACTC	+5	2
Event 2	CACATATGGGGCATGCAAACTGACATTAAACGG	TANNCTACGGTAGTGCTTGCTTATAAGTTATAAATAGAGGGCACTC	+2	34
	CACATATGGGGCATGCAAACTGACATTAAACGG	TANCTACGGTAGTGCTTGCTTATAAGTTATAAATAGAGGGCACTC	+1	23
	CACATATGGGGCATGCAAACTGACATTAAACGG	TACTACGGTAGTGCTTGCTTATAA-----NNNNA--TA-AGGGCACTC	-4	21
	CACATATGGGGCATGCAAACTGACATTAAACGG	TACTACGGTAGTGCTTGCTTATAA-----NNNNA--TANAGGGCACTC	-2	12
	CACATATGGGGCATGCAAACTGACATTAAACGG	TACTACGGTAGTGCTTGCTTATAAGTTATAAATAGAGGGCACTC	0	5
	CACATATGGGGCATGCAAACTGACATNNNTAA	CGGTACTACGGTAGTGCTTGCTTATAAGTTATAAATAGAGGGCACTC	+3	4
	CACATATGGGGCATGCAAACTGACATNTAACG	GTACTACGGTAGTGCTTGCTTATAAGTTATAAATAGAGGGCACTC	+1	1

Supplementary Figures

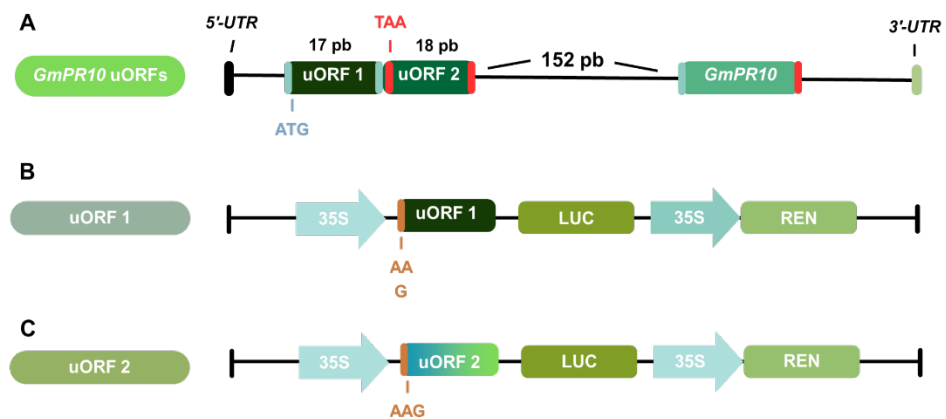


Figure S1. *In silico* prediction of uORFs in the *GmPR10* gene and schematic of dual-luciferase reporter vectors. (a) Positions of the identified uORFs within the 5'-UTR of *GmPR10*. Based on *uORFLight* analysis, the gene contains two uORFs, which were functionally validated in *N. benthamiana* protoplasts through site-directed mutagenesis of their initiation codons (-ATG). (b) Schematic of the *pGreenII0800*-

LUC dual-luciferase reporter construct used to assess the regulatory role of *uORF1*, and (c) the corresponding construct used for *uORF2* validation.

SgRNAs 1, 3 e 5

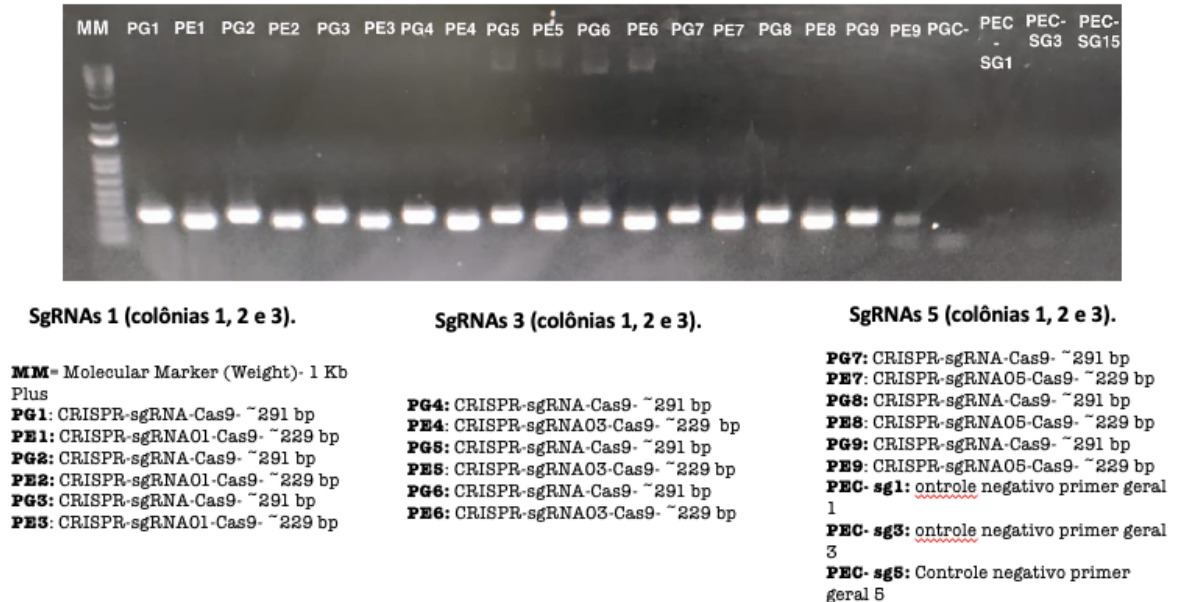


Figure S2. Conventional PCR analysis for the validation of sgRNAs 1, 3, and 5 cloning into intermediate vectors. MM: 1 kb DNA ladder; PGC-: negative control; PEC-: negative control. Three independent colonies (colonies 1, 2, and 3) were analyzed for each sgRNA. Amplicons exhibited the expected sizes using a CRISPR/Cas9 module-specific primer (~291 bp) and sgRNA-specific primers (~229 bp), confirming the correct insertion of the guides.

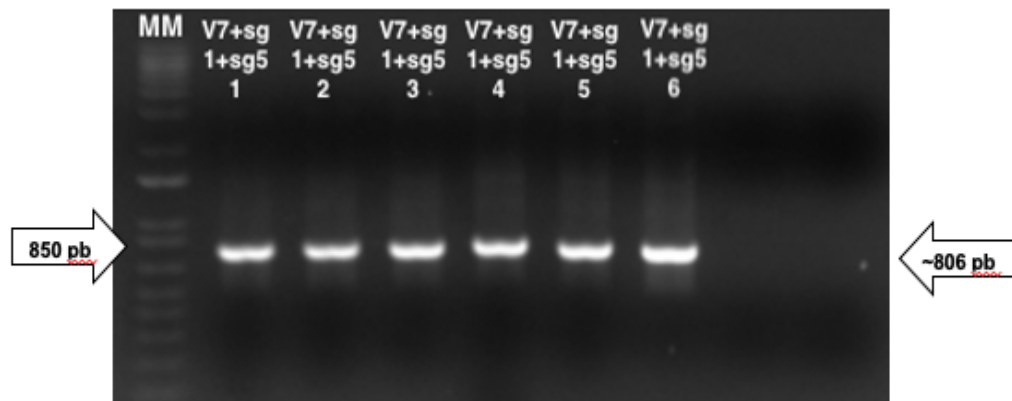


Figure S3. Conventional PCR analysis for the validation of sgRNA 5+1 cloning into intermediate vectors. MM: 1 kb DNA ladder. Amplicons exhibited the expected sizes using the CRISPR/Cas9 module-specific primer and primers specific to each guide combination (~806 bp), confirming the correct insertion of the sgRNAs.

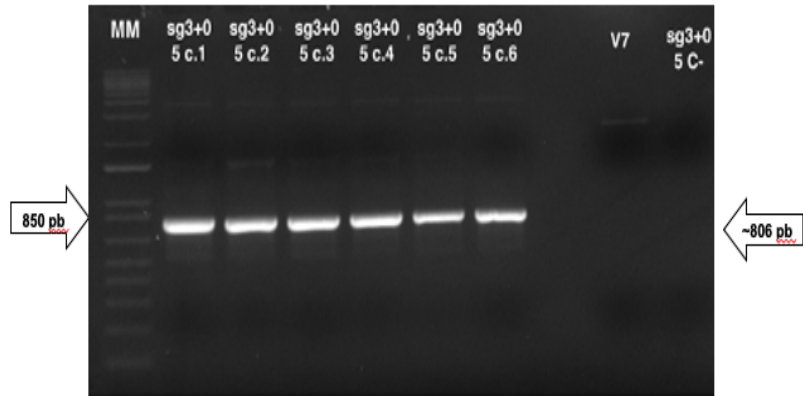


Figure S4. Conventional PCR analysis for the validation of sgRNA 5+3 cloning into intermediate vectors. MM: 1 kb DNA ladder; V7: empty vector and sg3+05; C-: negative control. Amplicons exhibited the expected sizes using the CRISPR/Cas9 module-specific primer and primers specific to each guide combination (~806 bp), confirming the correct insertion of the sgRNAs.

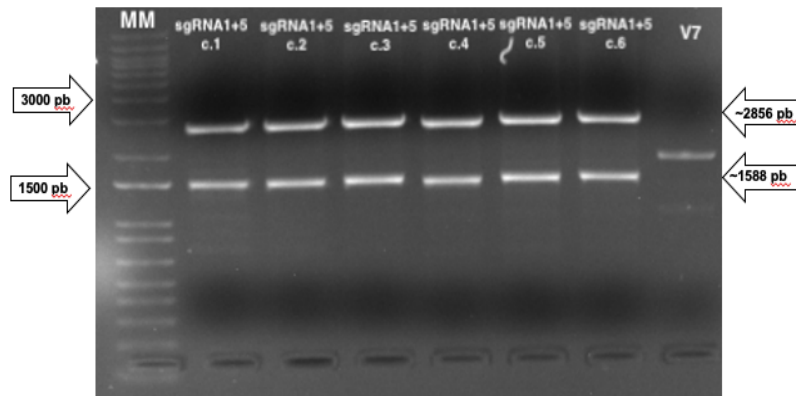


Figure S5. Agarose gel electrophoresis of enzymatic digestion products for the verification of recombinant vectors containing sgRNA 5+1. MM: DNA ladder; c.1–c.6: selected colonies for guide 5+1; V7: control vector. The observed fragments (~2856 bp and ~1588 bp) correspond to the expected sizes after digestion, confirming the correct insertion of the fragment into the vector.

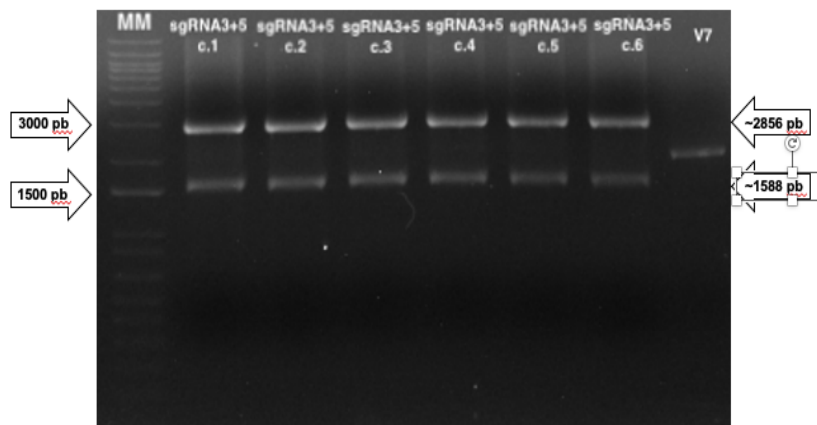


Figure S6. Agarose gel electrophoresis of enzymatic digestion products for the verification of recombinant vectors containing sgRNA 5+3. MM: DNA ladder; c.1–c.6: selected colonies for guide 5+3; V7: control vector. The observed fragments (~2856 bp and ~1588 bp) correspond to the expected sizes after digestion, confirming the correct insertion of the fragment into the vector.

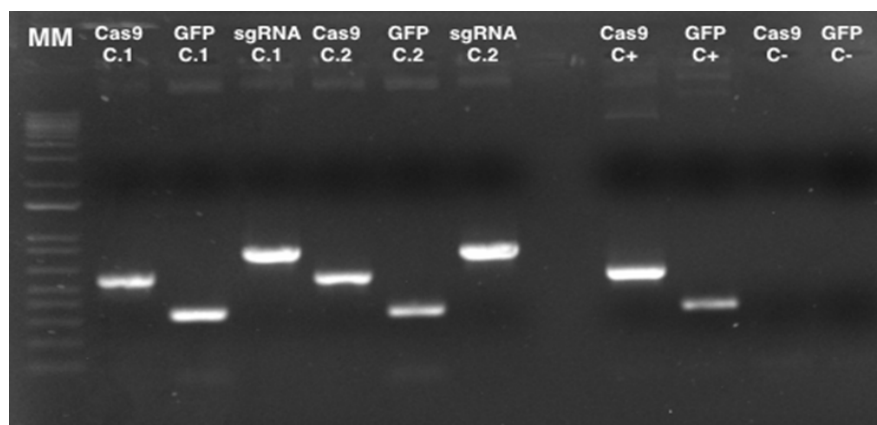


Figure S7. Conventional PCR analysis for the validation of sgRNA 5+1 cloning into the final vector. MM: DNA ladder; Cas9 C.1 and Cas9 C.2: amplification of the Cas9 module in colonies 1 and 2; GFP: amplification of the GFP module; sgRNA 5+1 C.1 and sgRNA 5+1 C.2: amplification of the module containing guides 5+1 in colonies 1 and 2. Cas9 C+: positive control for the Cas9 module; GFP C+: positive control for the GFP module; Cas9 C-: negative control for Cas9; GFP C-: negative control for GFP. The observed bands correspond to the expected sizes, confirming the correct insertion of the modules into the final vector.

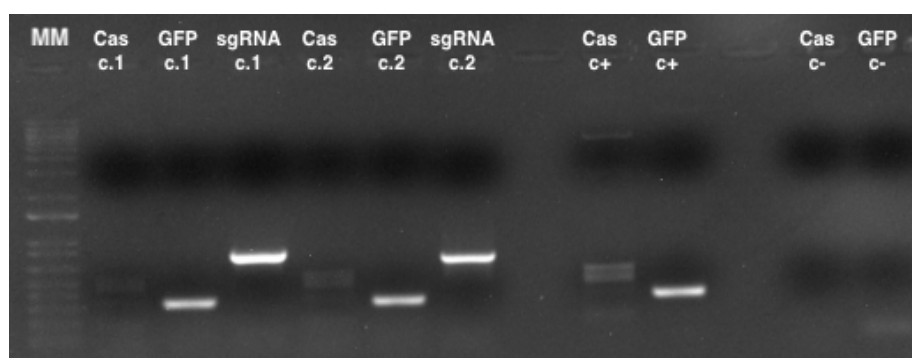


Figure S8. Conventional PCR analysis for the validation of sgRNA 5+3 cloning into the final vector. MM: DNA ladder; Cas9 C.1 and Cas9 C.2: amplification of the Cas9 module in colonies 1 and 2; GFP: amplification of the GFP module; sgRNA 5+3 C.1 and sgRNA 5+3 C.2: amplification of the module containing guides 5+3 in colonies 1 and 2. Cas9 C+: positive control for the Cas9 module; GFP C+: positive control for the GFP module; Cas9 C-: negative control for Cas9; GFP C-: negative control for GFP. The observed bands correspond to the expected sizes, confirming the correct insertion of the modules into the final vector.

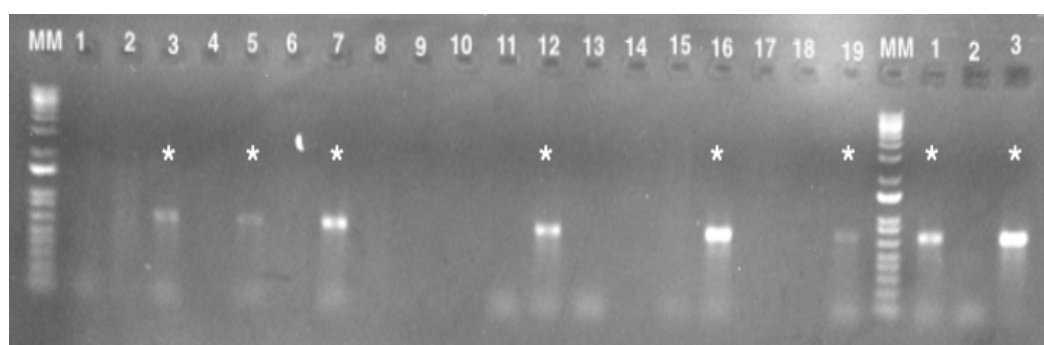


Figure S9. Conventional PCR analysis for the validation of soybean hairy roots transformed with the final vector containing sgRNAs 5+1 and 5+3. MM: DNA ladder; 1–19: roots transformed with sgRNAs 5+1; 1–3: roots transformed with sgRNAs 5+3. The observed bands exhibit the expected size (~820 bp), confirming the presence of the construct in the transformed roots.

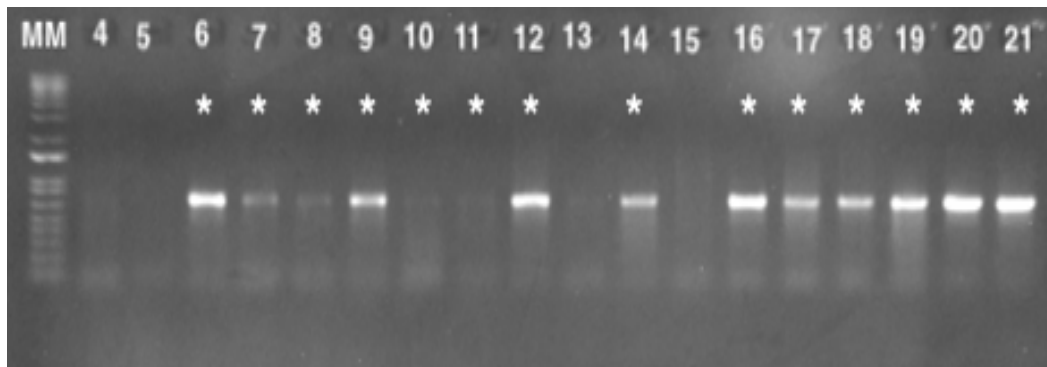


Figure S10. Conventional PCR analysis for the validation of soybean hairy roots transformed with the final vector containing sgRNAs 5+3. MM: DNA ladder; 4–21: roots transformed with sgRNAs 5+3. The observed bands exhibit the expected size (~820 bp), confirming the presence of the construct in the transformed roots.

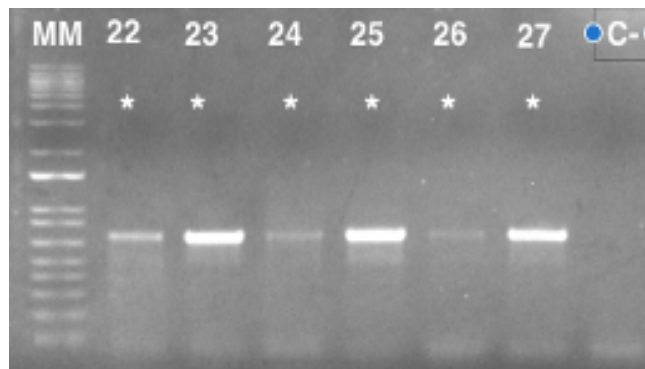


Figure S11. Conventional PCR analysis for the validation of soybean hairy roots transformed with the final vector containing sgRNAs 5+3. MM: DNA ladder; 22–27: roots transformed with sgRNAs 5+3; C-: negative control. The observed bands exhibit the expected size (~820 bp), confirming the presence of the construct.

		Sequência guia 5																																										
		uORF 1						uORF 2						Sequência guia 3										PAM-guia 5						PAM-guia3														
WT (D5)		C	A	C	T	A	T	G	G	G	C	A	T	G	C	A	A	A	G	T	G	A	C	A	T	T	A	A	C	G	G	T	A	C	T	A	C	G	G	T	A	G	T	
D5+H1		C	A	C	T	A	T	G	G	G	C	A	T	G	C	A	A	A	G	T	G	A	C	A	T	T	A	A	C	G	G	T	A	N	N	N	C	T	A	C	G	G	T	
		C	A	C	T	A	T	G	G	G	C	A	T	G	C	A	A	A	G	T	G	A	C	A	T	T	A	A	C	G	G	T	A	N	C	T	A	C	G	G	T	A	G	
		C	A	C	T	A	T	G	G	G	C	A	T	G	C	A	A	A	G	T	G	A	C	A	T	T	A	A	C	G	G	T	A	N	N	C	T	A	C	G	G	T	A	
		C	A	C	T	A	T	G	G	G	C	A	T	G	C	A	A	A	G	T	G	A	C	A	T	T	A	A	C	G	G	T	A	N	N	N	C	T	A	C	G	G	T	
		C	A	C	T	A	T	G	G	G	C	A	T	G	C	A	A	A	G	T	G	A	C	A	T	T	A	A	C	G	G	T	A	C	T	A	C	G	G	T	A	G	T	
		C	A	C	T	A	T	G	G	G	C	A	T	G	C	A	A	A	G	T	G	A	C	A	T	T	A	A	C	G	G	T	A	-	-	-	C	G	G	T	A	G	T	
		C	A	C	T	A	T	G	G	G	C	A	T	G	C	A	A	A	G	T	G	A	C	A	T	T	A	A	C	G	G	T	A	N	N	N	T	A	A	C	G	G	T	
		C	A	C	T	A	T	G	G	G	C	A	T	G	C	A	A	A	G	T	G	A	C	A	T	T	A	A	C	G	G	T	A	N	N	N	N	N	C	T	A	C	G	
D5+G1		C	A	C	T	A	T	G	G	G	C	A	T	G	C	A	A	A	G	T	G	A	C	A	T	T	A	A	C	G	G	T	A	N	N	C	T	A	C	G	G	T	A	
		C	A	C	T	A	T	G	G	G	C	A	T	G	C	A	A	A	G	T	G	A	C	A	T	T	A	A	C	G	G	T	A	N	C	T	A	C	G	G	T	A	G	
		C	A	C	T	A	T	G	G	G	C	A	T	G	C	A	A	A	G	T	G	A	C	A	T	T	A	A	C	G	G	T	A	C	T	A	C	G	G	T	A	G	T	
		C	A	C	T	A	T	G	G	G	C	A	T	G	C	A	A	A	G	T	G	A	C	A	T	T	A	A	C	G	G	T	A	C	T	A	C	G	G	T	A	G	T	
		C	A	C	T	A	T	G	G	G	C	A	T	G	C	A	A	A	G	T	G	A	C	A	T	T	A	A	C	G	G	T	A	C	T	A	C	G	G	T	A	G	T	
		C	A	C	T	A	T	G	G	G	C	A	T	G	C	A	A	A	G	T	G	A	C	A	T	T	A	A	C	G	G	T	A	N	N	N	T	A	A	C	G	G	T	
		C	A	C	T	A	T	G	G	G	C	A	T	G	C	A	A	A	G	T	G	A	C	A	T	T	A	A	C	G	G	T	A	N	T	A	A	C	G	G	T	A	G	T
		C	A	C	T	A	T	G	G	G	C	A	T	G	C	A	A	A	G	T	G	A	C	A	T	T	A	A	C	G	G	T	A	C	T	A	C	G	G	T	A	G	T	

Figure S12. Editing profile in the 5' UTR region of the GmPR10 gene, containing uORFs 1 and 2, in soybean plants transformed with the construct harboring sgRNAs 3 and 5. The alignment shows edited events (A1 and A2) compared with the wild-type sequence (WT). The edited events exhibit mutations predominantly concentrated in the sgRNA3 target region, followed by a smaller number of mutations in the sgRNA5 region. This strategy was not able to deplete uORF1 and uORF2 in soybean plants as originally expected.

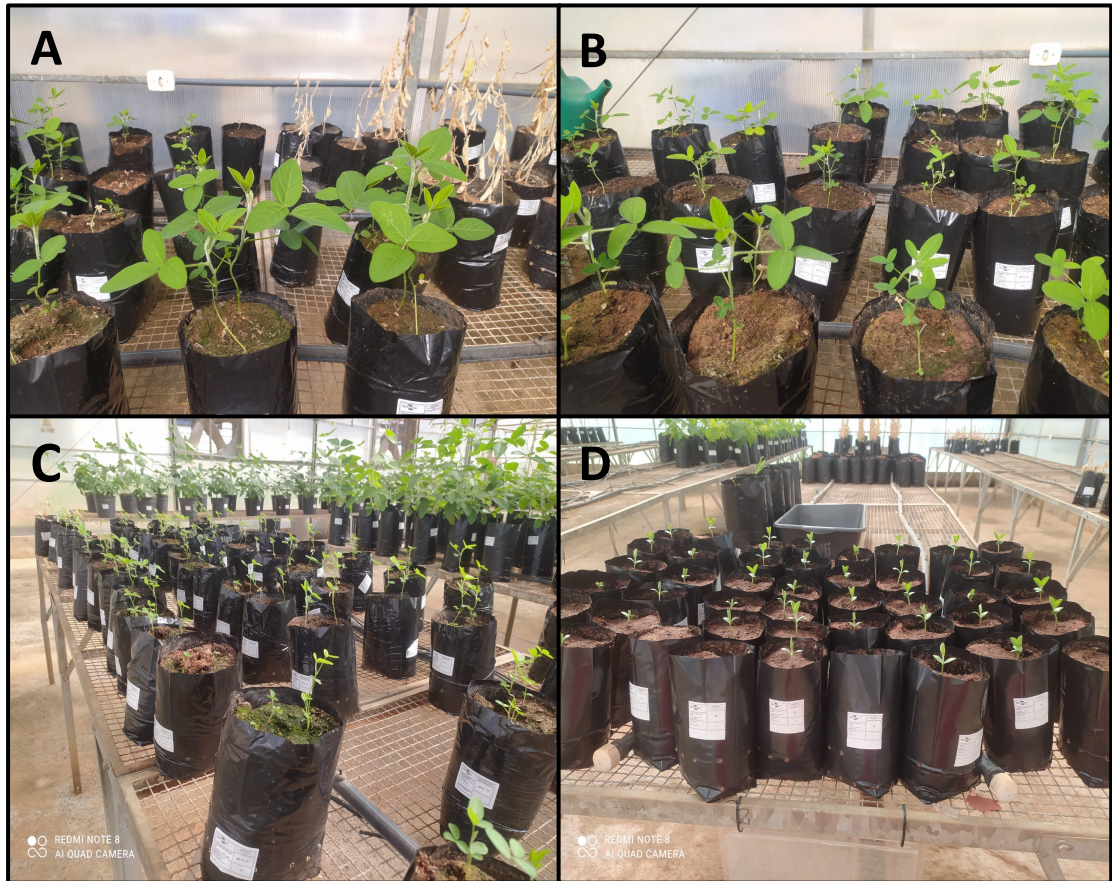


Figure S13. Soybean plants derived from gene editing events SF51 and SF59. The first three panels (A, B, and C) show T0 generation plants, while the last panel (D) shows T1 generation plants. These events are being advanced under greenhouse conditions to assess editing stability across generations.

CHAPTER II
MODULATION OF PLANT NEMATODE INTERACTIONS BY OVEREXPRESSION
OF THE SOYBEAN GLYCINOL 4-DIMETHYLALLYLTRANSFERASE (*G4DT*)
GENE IN *Nicotiana tabacum*

1. HIPÓTESE

A superexpressão do gene corresponde à enzima glicinol 4-dimetilaliltransferase de *G. max* (*GmG4DT1*) em *Nicotiana tabacum* reduzirá a suscetibilidade a *Meloidogyne incognita*, resultando em menor número de galhas por grama de raiz e/ou menor fator de reprodução ($FR = Pf/Pi$).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar o potencial do gene *GmG4DT1* na indução de tolerância ao fitonematoide *M. incognita* por meio da superexpressão em *N. tabacum*, visando à sua futura utilização no desenvolvimento de genótipos de soja tolerantes a esse fitopatógeno.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Obter plantas transgênicas de *N. tabacum* superexpressando o gene *GmG4DT1*, garantindo a obtenção de pelo menos três eventos independentes.
- ✓ Caracterizar molecularmente os eventos contendo o gene *GmG4DT1*.
- ✓ Conduzir bioensaios de resistência em plantas da geração T2 para avaliar o impacto da superexpressão gênica de *GmG4DT1* sobre a taxa de multiplicação e o sucesso reprodutivo de *M. incognita*.

Modulation of plant nematode interaction by overexpression of the soybean Glycinol 4-Dimethylallyltransferase (*GmG4DT1*) gene in *Nicotiana tabacum*

Lorena Sousa de Loiola Costa^{1,2*§}, Clidia Eduarda Moreira-Pinto^{2,3*}, Nayara Sabrina Freitas Alves^{2,3}, Rayanne Alexandre de Abreu², Thuanne Pires Ribeiro^{2,3}, Fabrício Barbosa Monteiro Arraes^{3,4}, Maria Eugênia Lisei de Sá³, Carolina Vianna Morgante^{2,3}, Maria Fatima Grossi-de-Sa^{1,2,3, §}

¹ University of Brasília, Institute of Biological Sciences, Department of Molecular Biology, Brasília, Brazil.

² Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, Brasília, DF, Brazil.

³ National Institute of Science and Technology in PlantStress Biotech (INCT), Embrapa, Brasília, DF, Brazil.

⁴ Sempre AgTech (SEMPRE), Brasília, DF, Brazil.

* These authors contributed equally to this work.

§ Correspondence: loiola.lorena@gmail.com; fatima.grossi@embrapa.br

ABSTRACT

Soybean (*Glycine max* L.) plays a strategic role in global protein and oil production; however, its productivity is severely constrained by biotic stresses, particularly root-knot nematodes such as *Meloidogyne incognita*. Soybean defense relies on both constitutive barriers and inducible molecular responses, including the synthesis of phytoalexins such as glyceollins. The biosynthesis of these compounds depends on glycinol 4-dimethylallyltransferase (*G4DT*), a key enzyme that catalyzes a rate-limiting step in this metabolic pathway. In this study, we investigated the role of *GmG4DT1* in modulating plant defense against *M. incognita* using *Nicotiana tabacum* as a heterologous model system. Transgenic plants overexpressing *GmG4DT1* exhibited a pronounced reduction in gall formation, with decreases of up to 62.9% in the number of galls per gram of root compared to non-transgenic controls, demonstrating a strong impact during the early stages of infection. Although nematode reproductive parameters, including eggs per gram of root and reproduction factor, showed only modest and statistically non-significant reductions, histological analyses revealed marked structural alterations in the galls. These included reduced giant cell size and flattened nuclei, indicating impaired or delayed establishment of functional feeding sites. Collectively, these findings demonstrate that *GmG4DT1* overexpression primarily disrupts early infection processes, conferring partial resistance through modulation of host defense responses. The results highlight glyceollin biosynthesis as a promising biotechnological target for integrated strategies aimed at enhancing nematode tolerance in soybean.

Keywords: *Glycine max*, *Meloidogyne incognita*, glyceollins, gene overexpression, tolerance.

3. INTRODUCTION

Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) is a legume of major economic and nutritional importance, cultivated worldwide. This crop plays a fundamental role in food security, being essential to meet the growing demand for sources of protein and vegetable oils. However, yields and quality can be significantly reduced by abiotic and biotic stresses (Savary *et al.*, 2019), among which root-knot nematodes (RKN) represent one of these threats. RKN are sedentary plant endoparasites comprising approximately 100 described species belonging to the genus *Meloidogyne* (BRIDGE, 1981; RALMI *et al.*, 2016; GOODE and MITCHUM, 2022). *M. incognita*, for example, is a phytonematode that causes significant damage to a wide range of agronomically important crops worldwide, including soybean. Global agricultural losses attributed to plant-parasitic nematodes are estimated to exceed USD 170 billion annually (ELLING, 2013; KANTOR; EISENBACK; KANTOR, 2024), with *M. incognita* causing yield reductions of up to 30-50% in severely infested soybean fields. While traditional management relies on chemical nematicides and crop rotation, the increasing withdrawal of synthetic active ingredients due to environmental concerns underscores the urgent need for developing resistant genotypes through metabolic engineering and molecular breeding.

Plant defense against sedentary endoparasites, such as RKN, is a process that goes beyond basic structural barriers. Upon the perception of nematode-associated molecular patterns (NAMPs) or effectors by cell-surface and intracellular receptors, plants initiate a sophisticated immune response characterized by the synergy between Pattern-Triggered Immunity (PTI) and Effector-Triggered Immunity (ETI) (YUAN *et al.*, 2021; GOODE and MITCHUM, 2022). In the root cortex, this defense manifests through the rapid reinforcement of cell walls via lignification and the localized synthesis of secondary metabolites (BERNARD, EGNIN and BONSI, 2017). In this context, the phenylpropanoid pathway, which branches into the production of isoflavonoid-derived phytoalexins, such as glycerolins, is fundamental to this chemical arsenal in legumes (ARUJA *et al.*, 2012; XIE *et al.*, 2025). These compounds act as potent inhibitors of nematode development, disrupting the establishment and maintenance of the specialized feeding sites (giant cells) essential for the *Meloidogyne* life cycle (HUANG

and BARKER, 1991; WUYTS *et al.*, 2006; ARRAES *et al.*, 2022).

A cornerstone of the soybean immune response is the *de novo* synthesis of isoflavonoid-derived phytoalexins, specifically glyceollins. These pterocarpan compounds exhibit potent antimicrobial and nematocidal activities, primarily governed by their structural modifications (KAPLAN *et al.*, 1980; SUN *et al.*, 2025). The enzyme glycinol 4-dimethylallyltransferase (G4DT) catalyzes the pivotal prenylation step in the glyceollin biosynthetic pathway, a modification that significantly enhances the lipophilicity and biological efficacy of these molecules (AKASHI *et al.*, 2029). Although recent omics studies, such as the proteomic and transcriptomic profiling by Arraes *et al.* (2022), have identified the phenylpropanoid and flavonoid pathways as key determinants of tolerance in *G. max* genotypes (e.g., PI 595099), the functional validation of specific candidate genes like *G. max* *G4DT* gene (*GmG4DT*) remains unknown in the context of nematodes. Heterologous expression in model systems such as *Nicotiana tabacum* offers a robust platform for gene validation (SUN *et al.*, 2025). Therefore, modulating the flux of this pathway through the overexpression of key biosynthetic enzymes, such as *GmG4DT*, represents a strategic approach to enhancing endogenous resistance.

The use of resistant genotypes for nematode control has been the most widely employed method in soybean cultivation, due to its low environmental impact and applicability over large areas (COOK and STARR, 2006; MOENS *et al.*, 2018). Resistant plants can suppress nematode reproduction and reduce their population density in the soil, favoring crop rotation, decreasing the need for nematicides, and presenting a cost similar to that of susceptible materials, without requiring specific equipment (McCARVILLE *et al.*, 2017; ROBBINS *et al.*, 2019). Genetic resistance is particularly effective against RKN (*Meloidogyne* spp.) and soybean cyst nematodes (*Heterodera glycines*), resulting in lower yield losses and contributing to more sustainable management systems (NYCZEPIR and THOMAS, 2009; SILVA *et al.*, 2023). Therefore, the study of methodologies that enable the identification of resistant materials is of great importance for their use in breeding programs (MOENS *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2023).

The recent study by Arraes *et al.* (2022), which analyzed proteome and transcriptome profiles of susceptible (BRS133) and highly tolerant (PI 595099) *G. max* genotypes infested with *M. incognita*, identified the phenylpropanoid pathway as one of the main molecular mechanisms activated in tolerant genotypes. A total of 29

differentially expressed genes were detected, corresponding to 11 distinct enzymes associated with this pathway, with emphasis on the flavonoid subgroups and their derivatives. Activation of this pathway is characterized as an early, robust, and systemic defense response capable of limiting nematode reproduction. Here, we investigated the soybean glycinol 4-dimethylallyltransferase gene, *GmG4DT1*), identified as differentially expressed in tolerant genotypes by Arraes *et al.* (2022). To assess its functional role, *GmG4DT1* was overexpressed in *N. tabacum*, and its contribution to resistance against *M. incognita* was evaluated. This approach provides a proof of concept for exploiting *GmG4DT1* in breeding programs aimed at developing soybean cultivars with enhanced and durable resistance to RKN.

Here, we investigated the soybean glycinol 4-dimethylallyltransferase gene, *GmG4DT1*, identified as differentially expressed in tolerant genotypes by Arraes *et al.* (2022). To assess its functional role, *GmG4DT1* was overexpressed in *N. tabacum*, and its contribution to resistance against *M. incognita* was evaluated. This approach provides a proof of concept for exploiting *GmG4DT1* in breeding programs aimed at developing soybean cultivars with enhanced and durable resistance to RKN.

4. MATERIALS AND METHODS

4.1 Transformation Vector Construction

The binary vector pPZP-*GmG4DT1*-eGFP-HygR (hereafter referred to as pPZP-*GmG4DT1*) was synthesized and assembled by Epoch Life Science Inc. (Sugar Land, TX, USA). The construct contains the coding sequence (CDS) of the soybean glycinol 4-dimethylallyltransferase gene (*GmG4DT1*; Phytozome ID: Glyma. x), driven by the constitutive cauliflower mosaic virus (CaMV 35S) promoter. For selection and reporting, the vector includes the hygromycin phosphotransferase II (hptII) gene, which confers resistance to the antibiotic hygromycin, under the control of the Arabidopsis ubiquitin 3 (AtUbi3) promoter. Additionally, the enhanced green fluorescent protein (eGFP) gene, directed by the CaMV 35S promoter, was used as a visual reporter. The control construct, pPZP-eGFP-HygR (pPZP empty), containing only the selection and reporter cassettes without the *GmG4DT1* sequence, was employed for comparative analyses. The *GmG4DT1* sequence was retrieved from the Phytozome v.13 database, version Wm82.a4.v1 (GOODSTEIN *et al.*, 2012).

4.2 *Agrobacterium*-mediated Genetic Transformation of Tobacco Plants

The binary vector pPZP-*GmG4DT1* was introduced into *A. tumefaciens* strain GV3101. Bacterial cultures were grown in Luria-Bertani (LB) medium supplemented with rifampicin (100 µg mL⁻¹), gentamicin (50 µg mL⁻¹), and kanamycin (100 µg mL⁻¹) for 16 hours at 28 °C, until reaching an optical density (OD₆₀₀) of 0.6 (DIAS *et al.*, 2010). Stable transgenic lines of *N. tabacum* (var. Petit Havana) were generated using the leaf disc method as described by Horsch *et al.* (1985). Leaf explants were co-cultivated with the *Agrobacterium* suspension, and subsequent in vitro regeneration was performed under selection pressure using 50 mg L⁻¹ hygromycin B. To confirm transgene integration and expression, putative transgenic plants (T₀ generation) were analyzed via PCR for the detection of the *GmG4DT1* sequence. Furthermore, the relative transcript levels were assessed by quantitative real-time PCR (RT-qPCR), using specific primers (listed in Table S1). Homozygous transgenic lines were progressed to the T2 generation, which were then utilized in bioassays to evaluate resistance against *M. incognita* race 3.

4.3 Molecular Confirmation of Transgene Integration

Genomic DNA (gDNA) was extracted from young leaf tissues of *N. tabacum* using the cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) method (Murray and Thompson, 1980). The presence of the transgene was confirmed via PCR using specific oligonucleotide primers designed to amplify a 150-bp internal fragment of the *GmG4DT1* sequence (Table S1). PCR was performed in a 20 µL reaction volume containing 100 ng of template gDNA, 0.25 mM of each dNTP, 1.5 mM of MgCl₂, 0.2 µg of each primer, and 1 U of Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The thermal cycling conditions consisted of an initial denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 35 cycles of denaturation (95 °C for 20 s), annealing (60 °C for 20 s), and extension (72 °C for 20 s), with a final extension at 72 °C for 5 min. PCR products were visualized by electrophoresis on a 1.5% (w/v) agarose gel stained with ethidium bromide and photographed under UV light to confirm the expected fragment size.

4.4 *M. incognita* Inoculum and Infection

M. incognita race 3 was maintained and multiplied on tomato plants (*Solanum lycopersicum* cv. Santa Clara) under greenhouse conditions (25-30 °C) for approximately twelve weeks. Nematode eggs were extracted from infected roots using the sodium hypochlorite (NaOCl) method described by Hussey and Barker (1973). Briefly, roots were washed, cut into 5 cm segments, and processed in a blender with 0.5% (v/v) NaOCl for 30 s to release the eggs. The resulting suspension was passed through a series of nested stainless-steel sieves (500, 200, and 100 µm) to remove plant debris, and the eggs were finally collected on a 45 µm mesh sieve. The collected eggs were transferred to a hatching chamber and incubated at 28 °C to obtain second-stage juveniles (J2), following the protocol of Soliman *et al.* (2019). Freshly hatched J2 were harvested every 48 h and counted in a Peter's chamber using a light microscope. For the bioassays, each *N. tabacum* plant was inoculated with approximately 1,000 J2 (MENDES *ET al.*, 2021). To evaluate the progression of the infection and the impact of *GmG4DT1* overexpression, root systems were harvested at 30, 45, and 60 days post-inoculation (DPI). Roots collected at all three time points were processed for histological analysis to evaluate gall development and giant cell morphology. Furthermore, at 45 DPI, the number of galls, egg masses, and total eggs per root system were recorded to estimate the *M. incognita* reproduction factor, calculated by dividing the final population (Pf) by the initial inoculum (Pi = 1,000).

4.5 Morphological Analysis of Giant Cells and Galls in Plants

The galls collected from the roots were immediately placed in 2% glutaraldehyde and subjected to 20 min of vacuum to facilitate the penetration of the fixative into the tissue. The galls were fixed for 15 days at 4 °C under constant agitation. The fixative was changed every two days. The fixed material was then gradually dehydrated in ethanol (30%, 50%, 70%, 80%, and 100%) and embedded in Technovit® 7100 (Kulzer GmbH, Wehrheim, Germany) according to the manufacturer's protocol. The polymerized Technovit® blocks were cut with a microtome to a thickness of 3 µm and the sections distributed on glass slides treated with polylysine as a sealant. The slides were kept at 45 °C for 16 hours so that the sections adhered perfectly to the slide. After drying, the slides were stained with toluidine blue for 3 minutes and observed under an optical microscope (AxioCam, Zeiss) for morphological analysis of the galls.

4.6 Statistical Analysis

Statistical analysis was conducted using a completely randomized design, comprising four independent *GmG4DT1* transgenic events and one non-transgenic (NT) control group. Data for the number of galls, total eggs, and the reproduction factor (RF) were subjected to a one-way analysis of variance (ANOVA), and mean comparisons were performed using Tukey's multiple comparison test with ten biological replicates per line ($n = 10$). All statistical analyses and graphical representations of the data were carried out using GraphPad Prism software version 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Differences were considered statistically significant when $P < 0.05$.

5. RESULTS

5.1 *N. tabacum* Transformation and Genotyping

The stable transformation of *N. tabacum* var. Petit Havana was successfully achieved via *Agrobacterium*-mediated co-cultivation. Putative transformants were initially identified by their ability to regenerate under selective pressure on medium supplemented with 50 mg L⁻¹ hygromycin B (Figure S1). The genomic integration of the *GmG4DT1* expression cassette was subsequently confirmed by PCR analysis using gene-specific primers, which yielded the expected 150 bp fragment in all validated lines. Based on the molecular confirmation of transgene insertion, four independent transgenic events (Ev1, Ev2, Ev3, and Ev4) were selected for further characterization. Representative images of the analyzed plants are provided in the supplementary data (Figure S1). To complement the genotyping data, RT-qPCR analyses using specific primers (Table S1) to determine the relative transcript levels of *GmG4DT1* across the selected events are currently in progress and will be incorporated into the final submission of this manuscript.

5.2 Impact of *GmG4DT* Overexpression on *M. incognita* Parasitism in Transgenic Tobacco

To evaluate the defensive role of *GmG4DT1* against *M. incognita*, bioassays

were performed using T2 generation transgenic tobacco lines. As illustrated in Figure 1b, the overexpression of *GmG4DT1* significantly impaired the early stages of nematode parasitism. All evaluated transgenic events (Ev1-Ev4) exhibited a significant reduction ($P < 0.05$) in the number of galls per gram of root compared to non-transgenic (NT) plants. The most pronounced inhibitory effect was observed in line Ev2, which showed a 61.8% reduction in galling, followed by Ev3 (56.1%), Ev1 (46.0%), and Ev4 (40.8%). In contrast to the impact on gall induction, the overexpression of *GmG4DT1* did not result in a significant suppression of nematode fecundity or overall population increase. Although reduction in the eggs per gram of roots (9%-45%) (Figure 1C) and reproduction factor (up to 10.1%) (Figure 1D) were observed, these differences were not statistically significant ($P > 0.05$), likely due to biological variability and limited sample size.

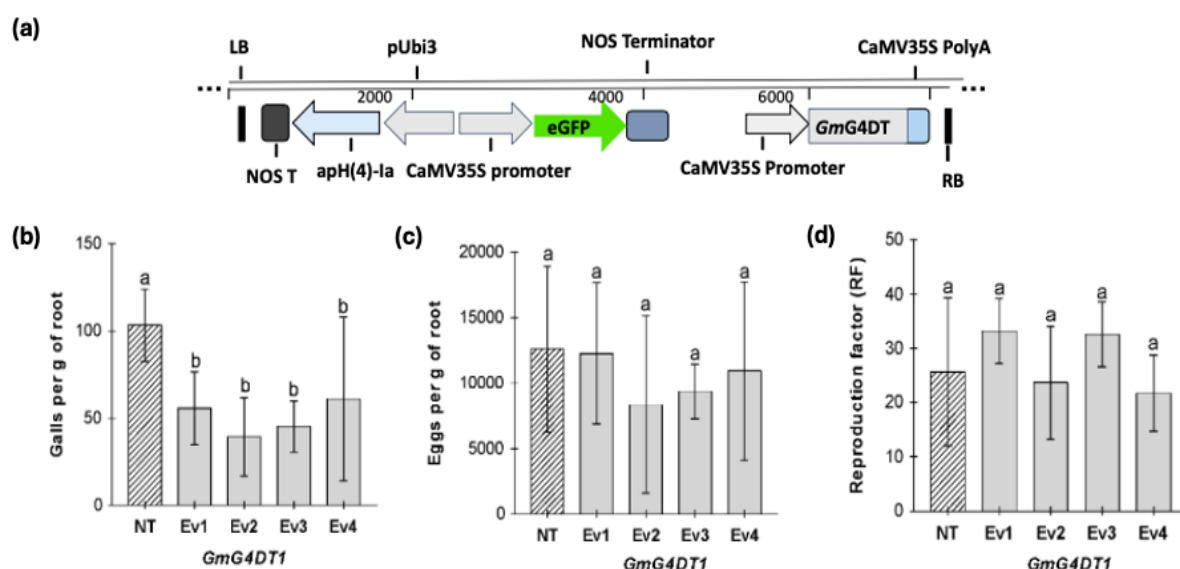


Figure 1 - *GmG4DT1* overexpression in transgenic *N. tabacum*. (a) Schematic representation of the transformation cassette cloned into the pPZP vector. The *GmG4DT1* and *eGFP* (a selectable marker) genes are both driven by the *CaMV* 35S promoter and terminated by the NOS terminator and *CaMV* 35S polyadenylation signal, respectively. Four independent transformation events (EV1-EV4) were selected based on hygromycin resistance and compared to non-transformed plants (NT). At 45 days after inoculation (DAI), the following parameters were analyzed in soybean *M. incognita* bioassays: (b) number of galls per gram of root, (c) eggs per gram of root, and (d) nematode reproduction factor. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism (version 7.0), and differences were determined by Tukey's test ($p < 0.05$).

5.3 Morphological Evaluation of Galls Induced by *M. incognita* in Transgenic Tobacco

Morphological analysis of galls showed that NT plants had well-developed

feeding sites containing mature nematodes at 60 DAI. In contrast, all transgenic lines exhibited delayed gall formation during the early stages of infection (30 DAI). Additionally, transgenic tobacco lines displayed an increased number of xylem elements and flatter nuclei in the developing galls at 30 DAI, a feature that was not maintained throughout nematode development. Furthermore, no observable reduction in the cytoplasmic content of the giant cells was detected when comparing transgenic events to NT plants at 30 and 60 DAI. By the end of the evaluation period (60 DAI), no significant differences were observed in gall size or egg-mass formation between transgenic and NT plants, indicating a comparable level of susceptibility to nematode infection (Figure 2).

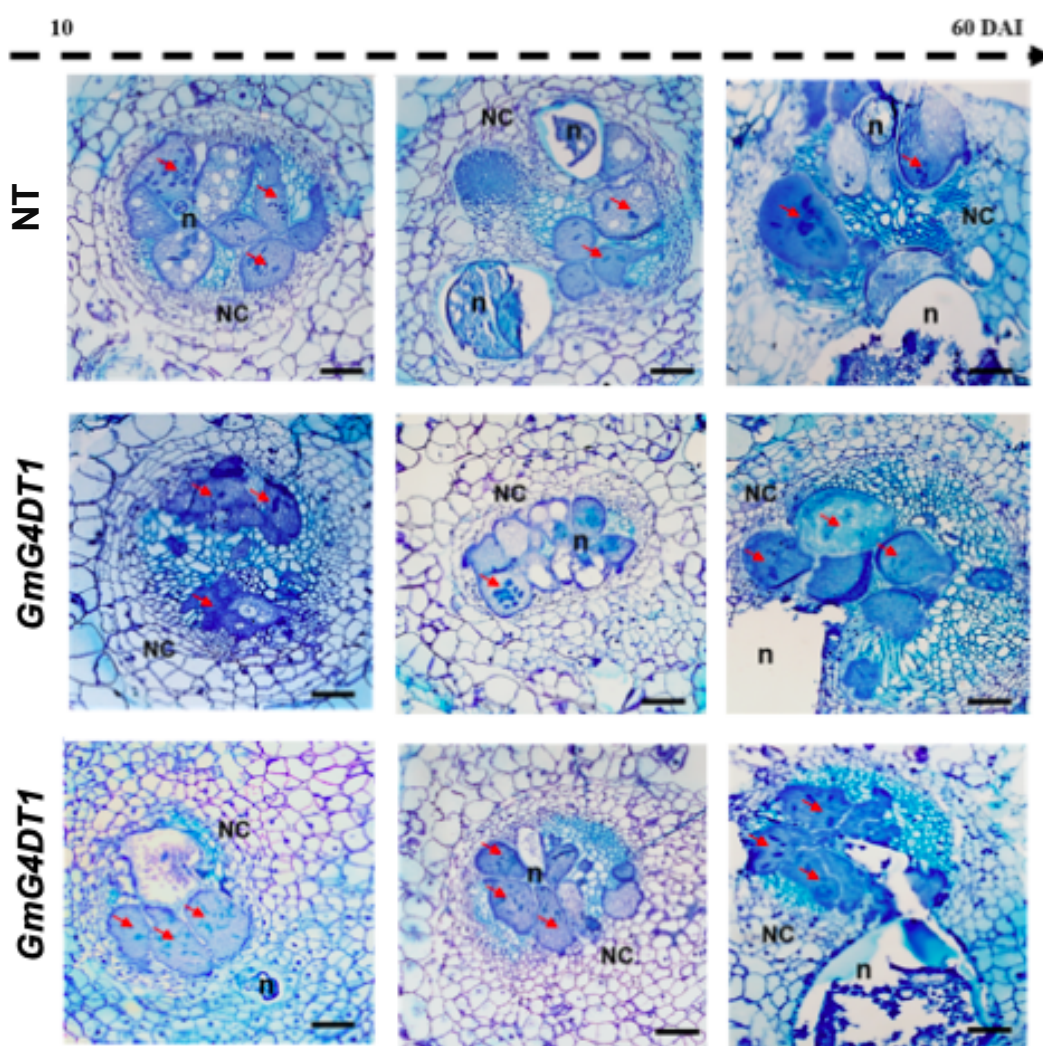


Figure 2 - Histological morphology of galls induced by phytonematodes on transgenic tobacco lines. The giant cells in the galls of *GmG4DT1* roots during 30, 45, and 60 days. A reduction in cell size is observed in the initial phase of infestation. Legend: DAI: days after inoculation; Asterisk (*): giant cell; NC: neighboring cells; n: nematode; EM: egg masses; red arrows highlight the nuclei of giant cells.

By evaluating the size of the galls on the transgenic events, they had an average

diameter of 140.30 μm at 30 DAI, while on the WT plants this value was 455.12 μm , which corresponds to a 69.17% reduction in the size of the galls. At 45 DAI this average was 414.98 μm for the transgenic events and 545.68 μm for the plants, corresponding to a reduction of 23.95%. At the end of the nematode cycle, the average gall size was 521.76 μm for the transgenic events and 580.80 μm for the NT plants, corresponding to a 10.16% reduction in gall size at 60 DAI (Figure 3). These results confirm that the *GmGD4T1* gene had a mitigating effect in the initial phase of phytonematodes establishment, but over time this effect was no longer observed, showing a certain susceptibility level of transgenic events plants to nematodes attack.

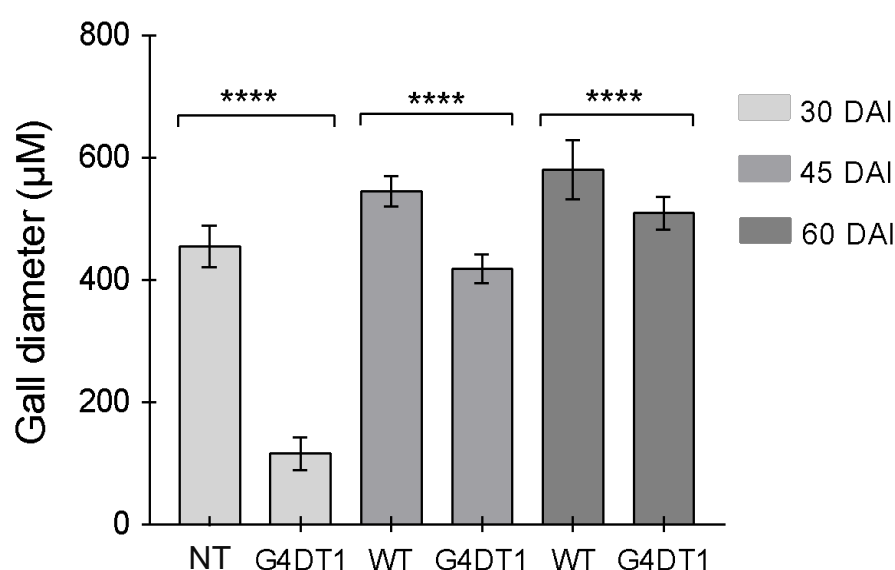


Figure 3 - Evaluation of the average size of galls formed after nematode infection on transgenic events and NT plants. Average diameter of galls (μm), 30, 45, and 60 DAI with *M. incognita* GM plants in relation to untransformed plants. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software. Legend: G4DT1 - Transformation events; NT: non-transformed plant.

6. DISCUSSION

Root-knot nematodes are among the most economically damaging pathogens affecting soybean crops worldwide, causing significant yield losses and reductions in grain quality. Under favorable environmental conditions and high inoculum pressure, yield losses caused by *M. incognita* may reach up to 63%. These nematodes disrupt root system integrity, impair water and nutrient uptake, and predispose plants to secondary infections, thereby amplifying their negative impact on crop performance (JONES *et al.*, 2013; FERRAZ; BROWN, 2016).

Plants counteract nematode infection through constitutive and inducible

defense mechanisms, including cell wall reinforcement, hypersensitive responses (HR), reactive oxygen species (ROS) production, pathogenesis-related (PR) proteins, and the synthesis of antimicrobial secondary metabolites (SANABRIA *et al.*, 2008; DODDS; RATHJEN, 2010; DESMEDT *et al.*, 2020; MERESA; MATTHYS; KYNDT, 2024). Among these, pterocarpan-type phytoalexins, particularly glyceollin I play a central role in soybean defense. GlyceollinI accumulates rapidly upon infection and acts as a localized chemical barrier restricting pathogen development (DIXON, 2001; AHUJA *et al.*, 2012).

Previous studies have demonstrated a strong association between glyceollinI accumulation and resistance to phytonematodes. Huang and Barker (1991) showed that glyceollinI accumulates near the head region of *H. glycines* in resistant soybean cultivars within hours of penetration, reaching peak concentrations between 4 and 6 DAI. Similar patterns have been reported for *M. incognita*, where resistant cultivars accumulated significantly higher glyceollin I level compared to susceptible ones, coinciding with HR activation and vascular tissue localization (KAPLAN *et al.*, 1980; DESMEDT *et al.*, 2020). Importantly, glyceollin accumulation is transient, reflecting tight metabolic regulation of phytoalexin biosynthesis to avoid excessive metabolic cost or self-toxicity (EBEL; GRISEBACH, 1988; LIN *et al.*, 2024).

Prenyltransferases such as glycinol 4-dimethylallyltransferase (G4DT) represent key metabolic control points in glyceollin biosynthesis, where changes in expression can substantially redirect metabolic flux toward defense-related pterocarpans (AKASHI *et al.*, 2009; LIN *et al.*, 2024). G4DT catalyzes the prenylation of glycinol, a crucial step in the formation of glyceollins, which are prenylated isoflavonoids abundant in soybean. These compounds exhibit antibacterial, antifungal, antinematode, anticancer, anti-inflammatory, antiestrogenic, and antioxidant properties. Therefore, modulation of *GmG4DT1* expression may influence the intensity and timing of glyceollin-mediated defense responses (DIXON *et al.*, 1983; AKASHI *et al.*, 2009; SASAKI *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2025).

In this study, *N. tabacum* was used as a heterologous expression system to evaluate the functional impact of *GmG4DT1* overexpression. Tobacco has been widely adapted for metabolic engineering and gene function validation due to its high transformation efficiency, conserved phenylpropanoid pathway, and capacity to sustain heterologous isoflavonoid biosynthesis when key enzymes are introduced. Although glyceollin biosynthesis is legume-specific, tobacco provides a functional

cellular environment to assess enzymatic activity and preliminary metabolic redirection before validation in *G. max* (DIXON; PAIVA, 1995; YU *et al.*, 2000; DONG; LIN, 2021; BUYEL, 2023).

Overexpression of *GmG4DT1* resulted in a significant reduction (up to 63%) in gall number per gram of root. In contrast, reductions in egg number and nematode reproduction factor (FR) were modest and not statistically significant (Figures 1C and 1D). Because FR represents the ratio between final (Pf) and initial (Pi) nematode populations, it is influenced by experimental variability and total root biomass (OOSTENBRINK, 1996). Partial reductions in establishment or fecundity may not necessarily reduce FR below 1, characterizing a quantitative resistance phenotype rather than complete resistance (WILLIAMSON; GLEASON, 2003; JONES *et al.*, 2013). Thus, *GmG4DT1* overexpression appears to primarily interfere with early stages of nematode establishment rather than completely suppressing reproduction. Histological analyses further supported this interpretation, revealing notable morphological alterations in galls formed on roots overexpressing *GmG4DT1*, particularly at 30 DAI. These changes included reduced giant cells size and the presence of flattened nuclei (Figure 2), suggesting impaired cell expansion and endoreduplication. Defense-associated metabolic responses have been shown to interfere with cell cycle regulation and cellular differentiation processes essential for giant cell functionality (GOVERSE; BIRD, 2011). Since gall architecture and giant cell integrity are critical determinants of nematode success, these morphological alterations likely contribute to delayed or suboptimal feeding site establishment (TOMAR *et al.*, 2026).

Although glyceollinI was not directly quantified in this study, the phenotypic and histological outcomes are consistent with previously reported effects of prenylated phytoalexins on nematode development. In vitro assays have demonstrated that glyceollinI inhibits respiration in *M. incognita* second-stage juveniles at biologically relevant concentrations (KAPLAN *et al.*, 1980; DESMEDT *et al.*, 2020). However, causality cannot be conclusively established without direct metabolite quantification or functional inhibition assays. Future studies including glyceollin quantification, juvenile penetration assays, developmental stage progression analyses, and in vitro bioassays will be necessary to strengthen causal inference.

The absence of detectable growth or developmental penalties in transgenic plants suggests that *GmG4DT1* overexpression did not impose severe metabolic

burden under the tested conditions (Supplementary data). Since infection parameters were normalized per gram of root, potential biomass differences were minimized. Moreover, the infection-specific nature of the phenotype reduces the likelihood of nonspecific stress-induced resistance.

Collectively, these findings suggest that *GmG4DT1* overexpression modulates plant defense by inhibiting or delaying the formation of nematode-induced feeding structures, thereby conferring partial resistance. However, such resistance does not necessarily equate to complete suppression of pathogen reproduction, as nematodes may deploy effector proteins to suppress host immunity or manipulate hormone signaling pathways to facilitate infection (HEWEZI; BAUM, 2013; LU *et al.*, 2024; ZOU *et al.*, 2024). Additionally, nematodes may adapt by modifying feeding site formation or relocating to less defended tissues (MITCHUM *et al.*, 2013).

To achieve more durable resistance, strategies combining genes acting through distinct defense pathways are likely required. Gene pyramiding, which introduces multiple resistance genes into a single genetic background, enhances resistance robustness and limits pathogen adaptation (THUROW; CASTRO; PEREIRA, 2018; THORAT; GANGWAR; SISODIYA, 2024). In this context, *GmPR10* represents a strong candidate for pyramiding with *GmG4DT1*. Arraes *et al.*, (2022) demonstrated that *GmPR10* significantly reduced feeding site formation and nematode reproduction at later infection stages. The complementary temporal action of *GmG4DT1* (early metabolic reinforcement) and *GmPR10* (sustained systemic defense) suggests that their combination could provide a layered defense strategy against phytonematodes. Together with the findings presented in Chapter1, these results indicate that effective resistance against *M. incognita* may require integration of regulatory and metabolic defense layers. The pyramiding of genes acting at distinct biological levels may represent a promising strategy for achieving more durable nematode resistance.

7. CONCLUSIONS

This study demonstrates that *GmG4DT1* overexpression reduces gall formation induced by *M. incognita*, conferring partial resistance likely associated with interference in the establishment and development of nematode feeding site. Although nematode reproduction was not completely suppressed, the morphological alteration observed in galls indicate a modulation of host defenses responses. Collectively, these

findings support *GmG4DT1* as a promising biotechnological target for enhancing soybean tolerance to root-knot nematodes, particularly when integrated with additional resistance genes in pyramiding strategies.

8. REFERENCES

AHUJA, I.; KISSEN, R.; BONES, A. M. Phytoalexins in defense against pathogens. **Trends In Plant Science**, v. 17, n. 2, p. 73-90, 2012.

AKASHI, T.; SASAKI, K.; AOKI, T.; AYABE, S.; YAZAKI, K. Molecular cloning and characterization of a cDNA for pterocarpan 4-dimethylallyltransferase catalyzing the key prenylation step in the biosynthesis of glyceollin, a soybean phytoalexin. **Plant Physiology**, v. 149, n. 2, p. 683-693, 2009.

ARRAES, F. B. M.; VASQUEZ, D. D. N.; TAHIR, M.; PINHEIRO, D. H.; FAHEEM, M.; FREITAS-ALVES, N.S.; MOREIRA-PINTO, C.E.; MOREIRA, V. J. V.; PAES-DE-MELO, B.; LISEI-DE-SA, M. E. Integrated omic approaches reveal molecular mechanisms of tolerance during soybean and *Meloidogyne incognita* interactions. **Plants**, v. 11, 2022.

BAČIĆ, J.; LALIĆEVIĆ, I.; SIRCA, S.; THEUERSCHUH, M.; SUSIČ, N.; STARE, B. G. Occurrence and Distribution of Root-Knot Nematodes *Meloidogyne* spp. in Serbia. **Agronomy**, v. 15, n. 2, p. 372-389, 2025.

BOUÉ, S. M.; CARTER, C. H.; EHRLICH, K. C.; CLEVELAND, T. E. Induction of the soybean phytoalexins coumestrol and glyceollin by *Aspergillus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 2167–2172, 2000.

BUYEL, J. F. Product safety aspects of plant molecular farming. **Frontiers In Bioengineering and Biotechnology**, v. 11, p. 1-18, 2023.

DESMEDT, W.; MANGELINCKX, S.; KYNDT, T.; VANHOLME, B. A Phytochemical Perspective on Plant Defense Against Nematodes. **Frontiers In Plant Science**, v. 11, p. 1-12, 2020.

DIXON, R. A.; DEY, P. M.; LAMB, C. J. Phytoalexins: enzymology and molecular biology. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, New York, v. 55, p. 1–136, 1983.

DODDS, P. N.; RATHJEN, J. P. Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, p. 539-548, 2010.

DONG, N.; LIN, H. L. Contribution of phenylpropanoid metabolism to plant development and plant-environment interactions. **Journal Of Integrative Plant Biology**, v. 63, n. 1, p. 180-209, 2021.

EBEL, J.; GRISEBACH, H. Defense strategies of soybean against the fungus *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*: induction of phytoalexin synthesis

and cell wall reinforcement. **Planta**, Berlin, v. 175, n. 3, p. 406-412, 1988.

FERRAZ, S.; BROWN, D. J. F. Manejo de nematoides em culturas agrícolas. Viçosa: Editora UFV, p. 246, 2016.

FERRAZ, L. C. C. B.; MONTEIRO, A. R.; ABRANTES, I. M. O. Manual de nematologia. Campinas: **Editora Millennium**, p. 336, 2010.

GOVERSE, A.; BIRD, D. The role of plant hormones in nematode feeding site formation. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 49, p. 485–506, 2011.

HEWEZI, T.; BAUM, T. J. Manipulation of plant cells by cyst and root-knot nematode effectors. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 25, p. 9-16, 2012.

HUANG, J. S.; BARKER, K. R. Glyceollin I in soybean–cyst nematode interactions. **Plant Physiology**, v. 96, n. 4, p. 1302–1308, 1991.

HUSSEY, R. S.; BARKER, K. R. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne spp.*, including a new technique. **Plant Disease Reporter**, v. 57, n. 12, p.1025–1028, 1973.

JONES, J. T.; HAEGEMAN, A.; DANCHIN, E. G. J.; GAUR, H. S.; HELDER, J.; JONES, M. G. K.; KIKUCHI, T.; MANZANILLA-LÓPEZ, R.; PALOMARES-RIUS, J. E.; WESEMAEL, W. M. L. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 14, n. 9, p. 946-961, 2013.

KAPLAN, D. T.; KEEN, N. T.; THOMASON, I. J. Association of glyceollin with the incompatible response of soybean roots to *Meloidogyne incognita*. **Physiological Plant Pathology**, v. 16, p. 309–318, 1980.

KOU, Y.; WANG, S. Broad-spectrum and durability: understanding of quantitative disease resistance. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 13, n. 2, p. 181-185, 2010.

LIN, J.; MONSALVO, I.; KWON, H.; PULLANO, S.; KOVINICH, N. The WRKY Family Transcription Factor GmWRKY72 Represses Glyceollin Phytoalexin Biosynthesis in Soybean. **Plants**, v. 13, n. 21, p. 3036, 2024.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOZOVAYA, V. V.; LYGIN, A. V.; ZERNOVA, O. V.; LI, S.; HARTMAN, G. L.; WIDHOLM, J. M. Isoflavonoid accumulation in soybean hairy roots upon treatment with *Fusarium solani*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 7-8, p. 671-679, 2004.

LOZOVAYA, V. V.; LYGIN, A. V.; ZERNOVA, O. V.; ULANOV, A. V.; LI, S.; HARTMAN, G. L.; WIDHOLM, J. M. Modification of phenolic metabolism in soybean hairy roots through down regulation of chalcone synthase or isoflavone synthase. **Planta**, v. 225, n. 3, p. 665-679, 2006.

LU, Y.; YANG, S.; CHEN, W.; XIE, H.; XU, C. Advances in Migratory Plant Endoparasitic Nematode Effectors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 12, p. 6435, 2024.

LYGIN, A. V.; HILL, C. B.; ZERNOVA, O. V.; CRULL, L.; WIDHOLM, J. M.; HARTMAN, G. L.; LOZOVAYA, V. V. Response of Soybean Pathogens to Glyceollin. **Phytopathology**, v. 100, n. 9, p. 897-903, 2010.

LYGIN, A. V.; ZERNOVA, O. V.; HILL, C. B.; KHOLINA, N. A.; WIDHOLM, J. M.; HARTMAN, G. L.; LOZOVAYA, V. V. Glyceollin is an Important Component of Soybean Plant Defense Against *Phytophthora sojae* and *Macrophomina phaseolina*. **Phytopathology**, v. 103, n. 10, p. 984-994, 2013.

MCCARVILLE, M. T.; MARETT, C. C.; MULLANEY, M. P.; GEBHART, G. D.; TYLKA, G. L. Increase in Soybean Cyst Nematode Virulence and Reproduction on Resistant Soybean Varieties in Iowa from 2001 to 2015 and the Effects on Soybean Yields. **Plant Health Progress**, v. 18, n. 3, p. 146-155, 2017.

MERESA, B. K.; MATTHYS, J.; KYNDT, T. Biochemical Defence of Plants against Parasitic Nematodes. **Plants**, v. 13, n. 19, p. 2813-2843, 2024.

MITCHUM, M. G.; HUSSEY, R. S.; BAUM, T. J.; WANG, X.; ELLING, A. A.; WUBBEN, M.; DAVIS, E. L. Nematode effector proteins: an emerging paradigm of parasitism. **New Phytologist**, Oxford, v. 199, n. 4, p. 879–894, 2013.

MOENS, M.; PERRY, R. N.; STARR, J. L. *Meloidogyne* species – a diverse group of novel and important plant parasites. In: PERRY, R. N.; MOENS, M.; STARR, J. L. (ed.). Root-Knot Nematodes. **Wallingford: CABI**, p. 1–17, 2018.

OOSTENBRINK, M. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. *Mededelingen van de Landbouwhogeschule*, v. 66, p. 1-46, 1966.

SANABRIA, N.; GORING, D.; NÜRNBERGER, T.; DUBERY, I. Self/nonself perception and recognition mechanisms in plants: a comparison of self: incompatibility and innate immunity. **New Phytologist**, v. 178, n. 3, p. 503-514, 2008.

SASAKI, K.; TSURUMARU, Y.; YAMAMOTO, H.; YAZAKI, K. Molecular characterization of prenyltransferases involved in plant secondary metabolism. **Phytochemistry**, Oxford, v. 72, n. 16, p. 2107–2114, 2011.

SOLIMAN, G. M.; AMEEN, H. H.; ABDEL-AZIZ, S. M.; EL-SAYED, G. M. In vitro evaluation of some isolated bacteria against the plant parasite nematode *Meloidogyne incognita*. **Bulletin of National Research Centre**, v. 43, n. 1, p. 1-7, 2019.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101-1108, 2008.

TOMAR, P.; THAKUR, D.; KAMTA, S.; SHARMA, S.; NEGI, Y.; KAUR, N.; YADAV, N.; YADAV, A.; NEGI, R.; YADAV, A. N. Integrating plant defense responses in managing nematode threats for agricultural sustainability: a review. **Journal of Natural**

Pesticide Research, v. 15, p. 100174, 2026.

THORAT, S.; GANGWAR, R. K.; SISODIYA, D. Gene pyramiding an advanced approach for disease management in rice: a review. **Innovations in Agriculture**, v. 7, p. 1-12, 2024.

THUROW, C.; CASTRO, M. S.; PEREIRA, A. Melhoramento de plantas visando à resistência a patógenos. In: PEREIRA, A. S.; CARVALHO, F. I. F. (org.). *Resistência genética: de plantas a patógenos*. Pelotas: UFPel, p. 65–102, 2018.

VARGAS-ALMENDRA, A.; RUIZ-MEDRANO, R.; NÚÑEZ-MUÑOZ, L. A.; RAMÍREZ-POOL, J. A.; CALDERÓN-PÉREZ, B.; XOCONOSTLE-CÁZARES, B. Advances in Soybean Genetic Improvement. **Plants**, v. 13, n. 21, p. 3073, 2024.

WILLIAMSON, V. M.; GLEASON, C. A. Plant-nematode interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, p. 327-333, 2003.

WILLIAMSON, V. M.; KUMAR, A. Nematode resistance in plants: the battle underground. **Trends in Genetics**, v. 22, n. 7, p. 396-403, 2006.

YANG, Q.; WANG, Y.; XU, X.; YUAN, J.; ZHANG, F.; QIN, H.; LI, S.; LI, J.; LIN, H.; LI, L.; TIAN, Z.; WANG, G. A balance between glycitein and glyceollins governed by isoflavone 6-hydroxylase confers soybean resistance to *Phytophthora sojae*. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, v. 122, n. 50, p. 1-11, 2025.

YONEYAMA, K.; AKASHI, T.; AOKI, T. Molecular Characterization of Soybean Pterocarpan 2-Dimethylallyltransferase in Glyceollin Biosynthesis: local gene and whole-genome duplications of prenyltransferase genes led to the structural diversity of soybean prenylated isoflavonoids. **Plant and Cell Physiology**, v. 57, n. 12, p. 2497-2509, 2016.

YU, O.; JUNG, W.; CROES, R. A.; FADER, G. M.; McGONIGLE, B.; ODELL, J. T. Production of the Isoflavones Genistein and Daidzein in Non-Legume Dicot and Monocot Tissues. **Plant Physiology**, v. 124, n. 2, p. 781-794, 2000.

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.

ZOU, J.; KYNDT, T.; YU, J.; ZHOU, J. Plant–nematode battle: engagement of complex signaling network. **Trends in Parasitology**, v. 40, n. 9, p. 846-857, 2024.

SUPPLEMENTARY TABLE AND FIGURE

Supplementary table

Table S1. Primers used in *N. tabacum* experiments.

Name	Sequence (5'-3')	Purpose
<i>Nt</i> -ACT-F	AGCAAGGAAATTACCGCATTAGC	RT-qPCR of the endogenous tobacco <i>NtActin1</i> gene
<i>Nt</i> -ACT-R	ACCTGCTGGAATGTGCTGAGA	
<i>Nt</i> -ACT2-qPCR-F	GGTCGTACCACCGGTATTGT'	RT-qPCR of the endogenous tobacco <i>NtActin2</i> gene
<i>Nt</i> -ACT2-qPCR-R	ATTTCTCGCTCAGCTGTGGT	
<i>G4DT</i> -Glycine max-F1-	ATTGGCGTGTTACAGGGTGT	PCR and RT-qPCR of the <i>GmG4DT1</i> transgene
<i>G4DT</i> -Glycine max-R1-	ATGCCATTGGAAGATGTGGT	
<i>eGFP</i> Fw	GACGTAAACGGCCACAAGTT	RT-qPCR analysis of <i>eGFP</i> (selectable marker) expression derived from the transformation vector
<i>eGFP</i> Rv	GATGCCGTTCTTCTGCTTGT	
RA. <i>NtL25</i> .F	GCTAAGGTTGCCAAGGCTGTCAAG	RT-qPCR of the endogenous tobacco <i>NtL25</i> gene
RA. <i>NtL25</i> .R	GCACTAATACGAGGGTACTTGGGGTTTC	

Supplementary figure

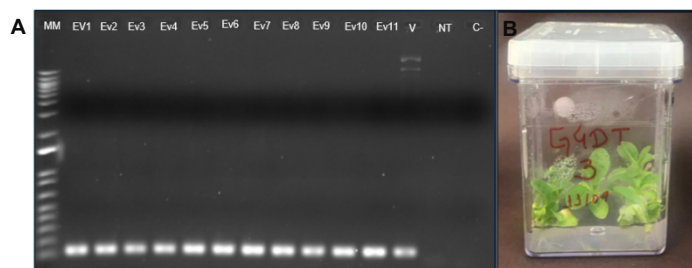


Figure S1. Molecular confirmation and in vitro selection of T0 transgenic tobacco plants overexpressing *GmG4DT*. (A) PCR-based screening of genomic DNA from putative transgenic *N. tabacum* events. Amplification of the expected fragment was observed in independent events (Ev1-Ev11), confirming transgene integration. MM: molecular marker; V: positive control (vector); NT: non-transformed plant; C-: negative control. (B) In vitro selection of T0 transgenic plants on hygromycin-containing medium. Resistant shoots exhibited normal growth and green phenotype, indicating successful selection of transformed events.

3. CONCLUSÃO GERAL

Os resultados apresentados nesta tese demonstram que a manipulação das uORFs do gene *GmPR10* e a superexpressão do gene *GmG4DT1* constituem estratégias complementares e conceitualmente integráveis para aumentar a tolerância da soja ao nematoide das galhas *M. incognita*. Embora ambas as abordagens tenham como objetivo final o fortalecimento da resistência vegetal, estas atuam em níveis distintos da rede de defesa da planta, revelando dois eixos estratégicos de engenharia genética aplicados ao manejo de fitonematoides.

No Capítulo 1, a edição das uORFs do gene *GmPR10* evidenciou o potencial da regulação traducional como ferramenta para intensificar a resposta imune sem alterar o padrão espacial e temporal de expressão do gene endógeno. Essa estratégia atua predominantemente no nível regulatório, promovendo aumento da eficiência traducional e potencializando a via de resistência sistêmica adquirida (SAR). Ao preservar os mecanismos naturais de controle transcricional, essa abordagem reduz o risco de efeitos pleiotrópicos associados à superexpressão constitutiva, além de abrir perspectivas para a obtenção de plantas potencialmente não transgênicas, com maior aceitabilidade regulatória e comercial.

Por sua vez, o Capítulo 2 demonstrou que a superexpressão de *GmG4DT1*, enzima chave da via biossintética das gliceolinas, intensifica o fluxo metabólico para a produção de fitoalexinas com atividade nematicida. Diferentemente da modulação regulatória observada para *GmPR10*, essa estratégia atua no nível metabólico, promovendo um efeito precoce e localizado durante os estágios iniciais da infecção. A redução na formação de galhas indica que o aumento da produção de compostos químicos defensivos interfere diretamente no estabelecimento do nematoide e na formação do sítio de alimentação, afetando etapas críticas do ciclo biológico do patógeno.

A análise conjunta dos capítulos revela uma distinção funcional clara entre as abordagens: enquanto a modulação de *GmPR10* representa um ajuste fino da ativação da resposta imune sistêmica, a superexpressão de *GmG4DT1* reforça barreiras químicas locais por meio do redirecionamento do metabolismo secundário. Essa complementaridade sugere que a combinação dessas estratégias pode resultar em uma defesa multicamada, envolvendo tanto respostas regulatórias sistêmicas quanto mecanismos químicos de ação direta, aumentando a robustez, a eficiência e

a potencial durabilidade da resistência.

Do ponto de vista aplicado, os resultados reforçam o valor da integração entre regulação traducional e engenharia metabólica como ferramentas inovadoras no desenvolvimento de cultivares de soja com maior tolerância a fitonematoides. Mais amplamente, esta tese contribui para a consolidação de uma abordagem estratégica baseada na manipulação de diferentes camadas da imunidade vegetal, tanto regulatória quanto metabólica, como caminho promissor para o manejo sustentável de nematoides e para o avanço de programas modernos de melhoramento genético.

4. PERSPECTIVAS

Os resultados desta tese indicam que a integração entre modulação traducional de genes reguladores da imunidade e redirecionamento metabólico para a biossíntese de fitoalexinas constitui uma estratégia promissora para o desenvolvimento de resistência mais robusta da soja a *M. incognita*. Ao atuar em níveis distintos da resposta vegetal, tanto regulatória quanto metabólica, as abordagens exploradas sugerem potencial complementaridade e maior estabilidade frente à adaptabilidade dos fitonematoides.

Para *GmPR10*, a depleção de uORFs demonstrou que a regulação traducional é um ponto estratégico de intervenção, permitindo aumento da produção proteica sem alteração dos níveis transcricionais. Como próximos passos, será essencial validar essa estratégia em plantas estáveis obtidas por meio da nova combinação de guias CRISPR/Cas9 (sgRNA8+3), com foco em: (i) confirmação molecular das edições e avaliação de estabilidade genética; (ii) quantificação do acúmulo proteico em linhagens homozigotas; (iii) bioensaios com *M. incognita* em condições controladas e semi-campo; (iv) análise de possíveis efeitos sistêmicos na rede de defesa. Esses experimentos permitirão determinar a consistência funcional da modulação traducional no contexto agronômico.

Para *GmG4DT1*, a superexpressão resultou em redução significativa na formação de galhas, indicando que o aumento da biossíntese de gliceolinas interfere principalmente nos estágios iniciais da infecção. As etapas futuras incluem: (i) quantificação temporal de gliceolinas durante a infecção; (ii) análises histológicas da formação de células gigantes; (iii) avaliação de possíveis custos fisiológicos; (iv) testes de desempenho em ambientes contrastantes.

Em perspectiva integrativa, a combinação da modulação traducional de *GmPR10* com o reforço metabólico via *GmG4DT1* representa o desdobramento mais promissor deste trabalho. A obtenção de linhagens com empilhamento gênico permitirá testar a hipótese de que a atuação simultânea em fases distintas da interação planta-nematoide resulta em resistência mais consistente e, potencialmente, mais durável. Assim, esta tese estabelece bases experimentais para estratégias de engenharia genética baseadas na integração de camadas regulatórias e metabólicas da imunidade vegetal, com potencial aplicação no desenvolvimento de cultivares de soja mais resilientes e alinhados a sistemas agrícolas sustentáveis.