



Universidade de Brasília

Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

Mestrado

**Expressão de gene sintético em soja (*Glycine max*) visando maior tolerância a
*Sclerotinia sclerotiorum***

Renan Miguel dos Anjos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular como requisito para obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular.

Brasília

2026

Renan Miguel dos Anjos
Bacharel em Biotecnologia e em Ciências Biológicas

***Expressão de gene sintético em soja (*Glycine max*) visando maior tolerância a
*Sclerotinia sclerotiorum****

Orientador
Prof. Dr. **Francisco José Lima Aragão**

Coorientador
Prof. Dr. **Giovanni Rodrigues Vianna**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular como requisito para obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular

Brasília

2026

Renan Miguel dos Anjos

**Expressão de gene sintético em soja (*Glycine max*) visando maior tolerância a
*Sclerotinia sclerotiorum***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular como requisito para obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular

Aprovado em: 27 de março de 2026

Banca Examinadora

Prof. Dr. Francisco José Lima Aragão

Instituição: Universidade de Brasília / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Julgamento: APROVADO

Prof. Dr. Tatsuya Nagata

Instituição: Universidade de Brasília

Julgamento: APROVADO

Prof. Dr. Nicolau Brito da Cunha

Instituição: Universidade de Brasília

Julgamento: APROVADO

Prof. Dra. Natália Lima de Sousa

Instituição: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Docente externo)

Julgamento: APROVADO

Brasília-DF

2026

Dedico com todo amor aos meus pais
Maria Abadia e Rafael, minha família e
meus amigos sem vocês esse trabalho
não seria possível.

Agradecimentos

O processo de desenvolvimento deste trabalho e a minha jornada na área acadêmica não foram solitários. Muitas pessoas estiveram presentes e contribuíram de diversas maneiras ao longo de todo o trajeto, e a elas tenho muito a agradecer.

Começo agradecendo à minha mãe, Maria Abadia, que sempre batalhou por mim e nunca me deixou desistir, sendo minha base para que eu pudesse alcançar meus objetivos e por me mostrar o que é ser amado. Ao meu pai, Rafael, que, apesar de muito calado, sempre esteve torcendo por mim.

À minha família como um todo, que esteve comigo nos momentos difíceis e também nos alegres, sempre disposta a me dar uma palavra de afeto e a me motivar durante a minha caminhada até aqui.

Às minhas amigas de graduação — Adriana, Ana, Anna, Isabela e Sophia — sou grato pela companhia e por me mostrarem que posso pertencer a uma comunidade. A companhia de vocês é essencial, e os momentos de incerteza são muito melhores quando estou com vocês. Obrigado por tanto!

Aos meus companheiros de laboratório, agradeço pelo apoio no desenvolvimento desta pesquisa, por tornarem meus dias de trabalho mais leves e pela companhia nos cafés da tarde. Todas as suas sugestões e ensinamentos ajudaram a refinar o meu trabalho e a alcançar melhores resultados.

Ao Júlio, que, apesar de bagunçar minhas pipetas, foi essencial no desenvolvimento deste projeto. À Kenny, por todo o ensinamento e suporte nas minhas análises. À Jessica, por toda sabedoria e auxílio nos experimentos. Ao João, pelo auxílio nas análises estatísticas.

Agradeço a todos os amigos que fiz na Embrapa. As conversas aleatórias durante o almoço e nas pausas para o café alegravam os meus dias. Em especial: ao Pedro Berbert, por me mostrar a beleza da ciência e me fazer sentir parte dela; à Andressa, por toda paciência e dedicação que teve comigo; ao Hugo, por sempre me chamar para almoçar e me escutar reclamar; e à Andreza, por todos os pequenos gestos que me fizeram sentir bem acolhido.

Agradeço aos meus orientadores, Dr. Francisco Aragão e Dr. Giovanni Vianna, por sua visão científica e experiência, que foram fundamentais para moldar e executar este projeto.

Agradeço em especial ao Dr. Giovanni pela oportunidade de realizar este projeto, por todo o suporte nessa jornada e pela confiança no meu trabalho.

Agradeço também aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade em avaliar este trabalho e pelas valiosas contribuições, críticas e sugestões, que certamente enriqueceram esta pesquisa.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. A todos os professores da Universidade de Brasília, pelos ensinamentos fundamentais à minha formação e por me fazerem acreditar que a educação muda vidas.

Agradeço à CAPES pela concessão da minha bolsa.

“Se o ar não se movimenta, não tem vento;
se a gente não se movimenta, não tem
vida.”

- Itamar Vieira Júnior

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	12
RESUMO	14
ABSTRACT	15
1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	19
2.1 <i>Objetivo geral</i>	19
2.2 <i>Objetivos específicos</i>	19
3. REFERENCIAL TEÓRICO	20
3.1 <i>Soja (Glycine max (L.) Merr.)</i>	20
3.2 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	22
3.3 <i>Sistema Imune das plantas</i>	26
3.4 <i>Oligogalacturonídeos (OGs)</i>	28
3.5 <i>Vias de defesa hormonais de ácido salicílico (AS) e ácido jasmônico (AJ)</i>	30
4. METODOLOGIA	36
4.1 <i>Construção de vetores para expressão constitutiva e induzível do gene quimérico PG-PGIP.</i>	36
4.2 <i>Transformação genética de Escherichia coli via eletroporação.</i>	37
4.3 <i>Amplificação do plasmídeo por meio de Maxipreparação de DNA plasmidial (Maxiprep)</i>	37
4.4 <i>Transformação genética de Glycine max</i>	38
4.5 <i>Confirmação da transgenia por análises de PCR</i>	39
4.6 <i>Deteção dos fragmentos e do número de cópias por Southern blot</i>	39
4.7 <i>Deteção das vias de defesa ativadas por meio de análises de RT-qPCR</i>	41
4.8 <i>Bioensaio de infecção contra S. sclerotiorum ex vivo</i>	42
4.9 <i>Bioensaio de infecção contra S. sclerotiorum in vivo</i>	42
4.10 <i>Sequenciamento pelo método Sanger</i>	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1 <i>Caracterização molecular das plantas transgênicas obtidas</i>	44
5.2 <i>PG-PGIP aumenta a resistência à infecção por S. sclerotiorum</i>	56
5.3 <i>Análise da expressão de genes relacionados à defesa.</i>	60
6. CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Representação esquemática do ciclo de vida do fungo <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em soja-----	24
Figura 2 Representação esquemática dos mecanismos de virulência de <i>S. sclerotiorum</i> e as respostas de defesa em soja.-----	25
Figura 3 Modelo integrado da imunidade vegetal baseado nas interações entre PTI e ETI -----	27
Figura 4 Esquema simplificado da via de sinalização dos oligogalacturonídeos (OGs). --	29
Figura 5 Representação esquemática das duas possíveis rotas de biossíntese do ácido salicílico em plantas. -----	31
Figura 6 Representação da via 13-LOX do metabolismo do ácido linolênico.-----	34
Figura 7 Representação dos vetores plasmidiais e estrutura tridimensional da proteína quimérica PG-PGIP.-----	36
Figura 8 Representação esquemática do vetor p35S PG-PGIP com as indicações dos sítios de restrição para as enzimas ClaI e HindIII -----	41
Figura 9 Southern blot para avaliação do número de cópias e confirmação da presença do transgene em plantas transgênicas PG-PGIP B e C (T ₂) e em plantas controle não transformadas (NT). -----	45
Figura 10 Southern blot para avaliação do número de cópias das plantas utilizadas no bioensaio. -----	46
Figura 11 Southern blot para confirmação de integração do gene quimérico PG-PGIP no genoma de plantas de soja. -----	47
Figura 12 RT-PCR semi-quantitativa para avaliação da expressão do gene sintético PG-PGIP em plantas transgênicas 2.23 e plantas não transformadas (NT).-----	49
Figura 13 RT-PCR semi-quantitativa para avaliação da expressão do gene sintético PG-PGIP em plantas transgênicas 1.45 e planta não transformadas (NT). -----	50

Figura 14 Representação esquemática do vetor p35S PG-PGIP com as indicações dos locais de anelamento dos primers utilizados para o mapeamento do plasmídeo integrado nos genomas das plantas PG-PGIP 2.23 e PG-PGIP 1.45. -----	51
Figura 15 Mapeamento do vetor integrado no genoma das plantas PG-PGIP 2.23. -----	52
Figura 16 Mapeamento do vetor integrado no genoma das plantas PG-PGIP 1.45. -----	53
Figura 17 Alinhamento múltiplo das sequências nucleotídicas obtidas por sequenciamento Sanger dos eventos transgênicos PG-PGIP 1.45 A a D e PG-PGIP 2.23 C comparadas com sequência referência, o vetor PG-PGIP. -----	55
Figura 18 Fotografias para análise do experimento ex vivo do estresse biótico de plantas de soja transgênicas PG-PGIP 2.23 em resposta a <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> . -----	57
Figura 19 Progressão da área foliar lesionada em plantas transgênicas PG-PGIP 2.23 e não transformadas NT após inoculação com o fungo hemibiotrófico <i>S. sclerotiorum</i> . ----	57
Figura 20 Fotografias para análise do experimento in vivo do estresse biótico de plantas de soja transgênicas PG-PGIP 2.23 em resposta a <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> . -----	58
Figura 21 Progressão da área foliar lesionada em plantas transgênicas (PG-PGIP 2.23) e não transformadas (NT) após inoculação com o fungo hemibiotrófico <i>S. sclerotiorum</i> . ---	59
Figura 22 Fotografias para análise do experimento ex vivo do estresse biótico de plantas de soja transgênicas PG-PGIP 1.45 em resposta a <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> . -----	60
Figura 23 Progressão da área foliar lesionada em plantas transgênicas (PG-PGIP 1.45) e não transformada (NT) após inoculação com o fungo hemibiotrófico <i>S. sclerotiorum</i> . ----	60
Figura 24 Expressão relativa de genes da via do ácido salicílico (AS) e da via do ácido jasmônico (AJ) em plantas NT e plantas transgênicas PG-PGIP 2.23 (A1, B1 e C1) nos tempos 0 h e 72 h, determinada por RT-qPCR. -----	61
Figura 25 Expressão relativa de genes da via do ácido salicílico (AS) e da via do ácido jasmônico (AJ) em plantas NT e plantas transgênicas PG-PGIP 1.45 (A1, B2 e C2) nos tempos 0 h e 72 h, determinada por RT-qPCR. -----	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

12,13-EOT – 12,13-Epoxy-octadecatrienoic acid – Ácido 12,13-epóxi-octadecatrienoico

12-OPDA – 12-Oxophytodienoic Acid – Ácido 12-oxofitodienoico

13-HPOT – 13-Hydroperoxy-octadecatrienoic acid – Ácido 13-hidroperóxi-octadecatrienoico

13-LOX – 13-Lipoxygenase – 13-Lipoxigenase

ABA – Ácido abscísico

AIM1 – Abnormal Inflorescence Meristem 1 – Meristema de inflorescência anormal 1

AJ – Ácido jasmônico

ANOVA – Analysis of Variance – Análise de variância

AOC – Allene Oxide Cyclase – Aleno óxido ciclase

AOS – Allene Oxide Synthase – Aleno óxido sintase

AS – Ácido salicílico

BA2H – Benzoic Acid 2-Hydroxylase – Ácido benzoico 2-hidroxilase

CH – Chitinase – Quitinase

CM – Chorismate Mutase – Corismato mutase

DAMPs– Damage-Associated Molecular Patterns – Padrões moleculares associados a danos

DNA – Deoxyribonucleic Acid – Ácido desoxirribonucleico

EDS5 – Enhanced Disease Susceptibility 5 – Suscetibilidade aumentada à doença 5

ELF1A – Elongation Factor 1-Alpha – Fator de elongação 1-alfa

EPS1 – Enhanced Pseudomonas Susceptibility 1 – Suscetibilidade aumentada a Pseudomonas 1

ET – Etileno

ETI – Effector-Triggered Immunity – Imunidade desencadeada por efetores

ETS – Effector-Triggered Susceptibility – Suscetibilidade desencadeada por efetores

EUA – Estados Unidos da América

HAI – Horas após a inoculação

HPL – Hydroperoxide Lyase – Hidroperóxido liase

IC – Isocorismato

ICS – Isocorismato sintase

JMT – Jasmonic Acid Carboxyl Methyltransferase – Metiltransferase do ácido jasmônico

MAPK – Mitogen-Activated Protein Kinase – Proteína quinase ativada por mitógeno

MeJA – Methyl Jasmonate – Metil jasmonato

NB-LRR – Nucleotide-Binding Leucine-Rich Repeat – Proteína com domínio de ligação a nucleotídeo e repetições ricas em leucina

NLR – Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor – Receptor semelhante ao domínio de oligomerização de ligação a nucleotídeos

NT – Não transformada

OCSt – Octopine Synthase Terminator – Terminador da octopina sintase

OGs – Oligogalacturonídeos

OPC-8:0 – 3-Oxo-2-(2'-pentenyl)-cyclopentane-1-octanoic acid – Ácido 3-oxo-2-(2'-pentenil)-ciclopentano-1-octanoico

OPR – 12-Oxophytodienoate Reductase – 12-oxofitodienoato redutase

PAL – Phenylalanine Ammonia-Lyase – Fenilalanina amônia-liase

PAMPs – Pathogen-Associated Molecular Patterns – Padrões moleculares associados a patógenos

PBS3 – AvrPphB Susceptible 3 – Suscetível a AvrPphB 3

pb – Pares de bases

PCR – Polymerase Chain Reaction – Reação em cadeia da polimerase

PG – Polygalacturonase – Poligalacturonase

PGIPs – Polygalacturonase-Inhibiting Proteins – Proteínas inibidoras de poligalacturonases

PRRs – Pattern Recognition Receptors – Receptores de reconhecimento de padrões

PTI – Pattern-Triggered Immunity – Imunidade desencadeada por padrões

RNA – Ribonucleic Acid – Ácido ribonucleico

ROS – Reactive Oxygen Species – Espécies reativas de oxigênio

RT-qPCR – Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction – Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real com transcrição reversa

RESUMO

A soja (*Glycine max*) uma commodity de extrema relevância econômica para o Brasil, que é constantemente afetada por patógenos, principalmente os fúngicos, comprometendo de forma expressiva a produtividade e a qualidade dos grãos. Entre as doenças fúngicas destaca-se a popularmente conhecida como mofo branco, causada pela *Sclerotinia sclerotiorum*, um patógeno hemibiotrófico, capaz de induzir a necrose tecidual causando perdas consideráveis no campo. Diante desse cenário, uma das estratégias utilizadas para contornar esse problema e gerar plantas mais produtivas e resistentes é por meio do uso de ferramentas biotecnológicas como a transformação genética. Neste trabalho, foi avaliado o efeito da expressão de uma construção quimérica, PG-PGIP, que une um fragmento de uma poligalacturonase fúngica de *Fusarium phyllophilum* (PG), fundido com um gene que codifica para uma proteína inibidora de poligalacturonase de *Phaseolus vulgaris* (PGIP). Essa estratégia baseia-se na interação entre a PG fúngica e PGIP vegetal, que favorece a geração de oligogalacturonídeos (OGs), fragmentos de pectina presente na parede celular das plantas, capazes de atuar como DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns) amplificando respostas de defesa e possivelmente tornando as plantas mais resistentes. Foram caracterizados dois eventos transgênicos independentes, PG-PGIP 2.23 e PG-PGIP 1.45, quanto à inserção genômica do transgene, a progressão de lesão de *S. sclerotiorum* e o perfil de expressão de genes marcadores de vias hormonais de defesa, incluindo ácido salicílico (AS) e o ácido jasmônico (AJ). O evento PG-PGIP 2.23 apresentou uma redução significativa do desenvolvimento das lesões necróticas causadas pelo fungo, tanto nos bioensaios *ex vivo* quanto *in vivo*. Esses resultados associados com as modulações observadas das vias do AS e AJ, sugerem um ajuste fino no balanço hormonal, resultando em plantas mais robustas imunologicamente. Em contrapartida, o evento PG-PGIP 1.45 apresentou um comportamento heterogêneo entre as progênies, com maior suscetibilidade nos bioensaios contra o fungo, além de diferenças marcantes nos perfis de expressão gênica das vias de defesa. Esses resultados demonstraram que a estratégia PG-PGIP possui potencial para fortalecer a imunidade de plantas, mas que a eficácia é dependente da integração adequada do transgene no genoma para que ocorra o desenvolvimento de eventos transgênicos com desempenho agrônomo adequado e benéfico para o produtor e o meio ambiente.

Palavras-chave: *Glycine max*, *Sclerotinia sclerotiorum*, gene quimérico, PG-PGIP, Resistência a doenças.

ABSTRACT

Soybean (*Glycine max*) is a commodity of extreme economic relevance for Brazil and is constantly affected by pathogens, specially fungal ones, which significantly compromise productivity and grain quality. Among fungal diseases, one of the most notable is the popularly known white mold, caused by *Sclerotinia sclerotiorum*, a hemibiotrophic pathogen capable of inducing tissue necrosis and causing considerable losses in the field. Given this scenario, one of the strategies used to overcome this problem and generate more productive and resistant plants is the use of biotechnological tools such as genetic transformation. In this work, the effect of expressing a chimeric construct, PG-PGIP, was evaluated. This construct combines a fragment of a fungal polygalacturonase from *Fusarium phyllophilum* (PG) fused with a gene encoding a polygalacturonase-inhibiting protein from *Phaseolus vulgaris* (PGIP). This strategy is based on the interaction between the fungal PG and the plant PGIP, which favors the generation of oligogalacturonides (OGs)—pectin fragments present in plant cell walls that can act as DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns) thereby amplifying defense responses and potentially making plants more resistant. Two independent transgenic events, PG-PGIP 2.23 and PG-PGIP 1.45, were characterized regarding genomic insertion of the transgene, the progression of *S. sclerotiorum* lesions, and the expression profile of marker genes from hormonal defense pathways, including salicylic acid (SA) and jasmonic acid (JA). The PG-PGIP 2.23 event showed a significant reduction in the development of necrotic lesions caused by the fungus in both *ex vivo* and *in vivo* bioassays. These results, together with the observed modulation of the SA and JA pathways, suggest a fine-tuning of the hormonal balance, resulting in plants with stronger immune responses. In contrast, the PG-PGIP 1.45 event exhibited highly heterogeneous behavior among progenies, with greater susceptibility in bioassays against the fungus, as well as marked differences in gene expression profiles of defense pathways. Overall, these results demonstrate that the PG-PGIP strategy has potential to strengthen plant immunity. However, its effectiveness depends on proper transgene integration into the genome to enable the development of transgenic events with adequate agronomic performance, benefiting both producers and the environment.

Keywords: *Glycine max*, *Sclerotinia sclerotiorum*, Chimeric gene, PG-PGIP, Disease resistance.

1. INTRODUÇÃO

A economia brasileira é fortemente vinculada ao comércio exterior, exportando uma variedade de bens para todo o mundo. Atualmente, o Brasil é o terceiro maior exportador de produtos agropecuários (Conferência da Agricultura e Pecuária do Brasil, 2020; Trade Map ITC, 2024). Em 2025, as exportações do agronegócio brasileiro atingiram US\$ 169,2 bilhões, o que corresponde a um aumento de 3,0% em relação aos US\$ 164,3 bilhões registrados em 2024 (Ministério da Agricultura e Pecuária, 2026). Entre os produtos comercializados a soja é a mais expressiva. Em 2025, mais de 108 milhões de toneladas foram exportadas, representando um crescimento superior a 11% em comparação com 2024, refletindo em um ganho de US\$ 43,5 bilhões (Comex Stat, 2025; Roberto Samora, 2026).

No entanto, as condições climáticas adversas e as cada vez mais complexas adaptações de pragas prejudicam consideravelmente a produção de alimentos e causam consideráveis prejuízos financeiros. Nesse contexto, o melhoramento genético de plantas é uma ferramenta necessária para garantir tanto o aumento da produtividade quanto reduzir os danos causados por diversos patógenos nas lavouras (Lin et al., 2022). Pois além de oferecer avanços importantes nos estudos sobre os mecanismos de defesa das plantas, o cultivo de culturas transgênicas reduziu os custos de produção e aumentou sensivelmente a produtividade agrícola mundial nas últimas duas décadas (Raman, 2017).

A soja (*Glycine max*) é uma planta de grande importância para o Brasil e uma das principais culturas industriais do mundo, devido a quantidade de proteínas e óleo presentes nos grãos (Baianu et al., 2012). Além da sua importância nutricional, o impacto econômico da soja é expressivo, sendo o principal produto de exportação brasileiro (Frente Parlamentar da Agropecuária, 2021). No entanto, a produtividade da soja é afetada por diversos estresses bióticos, por ser susceptível a diversos microrganismos patogênicos, ocasionando uma perda econômica significativa, que em grande parte está associada a danos, causados principalmente por fungos fitopatogênicos (Bandara et al., 2020).

Dentre as doenças fúngicas, conhecidas popularmente como podridão branca da haste ou mofo branco, ocasionada pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, responsável por produzir um micélio branco de aspecto semelhante a algodão, frequentemente em hastes e ramos, de difícil erradicação (Godoy, 2014). *S. sclerotiorum* é um fungo de vida majoritariamente necrotrófico que se espalha por todo o caule principal, causando branqueamento e

fragmentação do tecido e murchamento severo (Bolton et al., 2006), é um dos fitopatógenos com alta relevância fitossanitária, além de ser economicamente prejudicial ao cultivo da soja (Moellers et al., 2017).

As interações entre microrganismos, fitopatogênicos e as plantas são capazes de modular o sistema imune inato das plantas por meio dos mecanismos induzidos pelos próprios organismos (Pieterse et al., 2014). As interações entre as moléculas efetoras do patógeno com os receptores das plantas hospedeiras acionam respostas que incluem a morte celular programada e a imunidade sistêmica (Ádám et al., 2018). Há também o reconhecimento do patógeno de forma indireta pela interrupção da homeostase celular, causada por fatores de virulência codificados por patógenos (Jones & Dangl, 2006a).

A imunidade inata das plantas depende de uma ampla gama de estratégias de defesa, baseadas nas características estruturais da planta, como a degradação da parede celular e na capacidade da planta de detectar o dano e ativar respostas de defesa (Bent & Mackey, 2007). Muitos patógenos, para acessarem os tecidos vegetais, secretam enzimas que degradam a parede celular da planta, entre elas a poligalacturonase (PG), que são capazes de hidrolisar a homogalacturonase, principal componente da pectina, um dos constituintes da parede celular, degradando-a completamente em ácido galacturônico, um monômero que não ativa resposta imune (Lionetti et al., 2010). Essas PGs são fatores de virulência conhecidas de fungos fitopatogênicos e algumas isoformas demonstraram ser necessárias para a patogenicidade de algumas espécies de fungos, como a *Sclerotinia sclerotiorum* (Kars et al., 2005).

As plantas desenvolveram mecanismos de proteção que neutralizam a ação das poligalacturonases, como algumas famílias de genes que codificam proteínas inibidoras de PGs (PGIPs - do inglês “polygalacturonase-inhibiting proteins”) (Federici et al., 2006). Os PGIPs inibem a atividade das PGs e favorecem o acúmulo de fragmentos de homogalacturonano, chamados oligogalacturonídeos (OGs), que atuam como padrões moleculares associados a danos (DAMPs – do inglês “Damage-associated molecular pattern”) (De Lorenzo et al., 2001).

Os OGs são moléculas sinalizadoras reconhecidas por proteínas receptoras pertencentes à família das quinases associadas à parede celular e desencadeiam um amplo sistema de defesa transcricional (Brutus et al., 2010), além de estarem relacionados ao aumento da expressão de genes relacionados à defesa como PAD4 EDS1 e NPR1, reguladores-chave

da resistência a patógenos e CYP83B1, CYP79B2, PAD3 e PAL1, que codificam enzimas para a biossíntese de metabólitos secundários (Denoux et al., 2008a).

Estudos anteriores, demonstraram que OGs aplicado topicamente ou inserido exogenamente conseguiu inibir o crescimento de patógenos (Cervone et al., 1989; Galletti et al., 2008a). Baseado nesses resultados, Benedetti e colaboradores (2015), testaram a hipótese de que OGs são gerados em plantas transgênicas por inibição parcial de PGs do patógeno pela enzima PGIP produzida pelo hospedeiro. Na qual um gene quimérico que codifica uma PG fúngica (de *Fusarium phyllophilum*) foi fundido com um gene que codifica uma PGIP vegetal (de *Phaseolus vulgaris* L.), e expresso em plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana*. Neste trabalho foi demonstrado que a expressão da construção quimérica PG-PGIP resultou na produção *in vivo* de OGs que puderam ser detectados por análise de espectrometria de massa. As plantas transgênicas que expressaram o gene quimérico sob controle de um promotor induzível por β -estradiol foram mais resistentes aos fitopatógenos fúngicos e bacterianos como *Botrytis cinerea*, *Pectobacterium carotovorum* e *Pseudomonas syringae* (Benedetti et al., 2015). Esses dados forneceram fortes evidências para a hipótese de que OGs liberados *in vivo* atuam como um sinal DAMP para desencadear a imunidade da planta e sugerem que a liberação controlada dessas moléculas após a infecção pode ser uma ferramenta valiosa para proteger as plantas contra doenças infecciosas, seja causada por fungos ou por bactérias.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi a obtenção de plantas de soja geneticamente modificadas que expressam o gene quimérico PG-PGIP, sob controle de dois promotores, um constitutivo (35SCaMV), e outro, induzível, da própria soja (Quitinase - CH), e avaliar quanto à maior tolerância ao fungo *S. sclerotiorum*, além de analisar as prováveis modulações na expressão das vias hormonais relacionadas a defesa (via do ácido salicílico e via do ácido jasmônico).

2.2 Objetivos específicos

- 1 – Construir 2 vetores plasmidiais para expressar o gene sintético e quimérico PG-PGIP em plantas de soja, sob controle de 2 promotores (35SCaMV e Quitinase), juntamente com o gene marcador de seleção *ahas* mutado de *Arabidopsis thaliana*, que confere tolerância ao herbicida imazapyr.
- 2 – Gerar plantas transgênicas de soja (T₀) expressando cada uma das construções obtidas, pelo sistema biobalístico, utilizando o herbicida imazapyr como agente seletivo.
- 3 – Realizar a caracterização molecular das plantas transgênicas obtidas (T₀), bem como de sua progênie (T₁) por Southern blot e por PCR.
- 4 – Analisar a tolerância das plantas transgênicas obtidas via bioensaios, *in vivo* e *ex vivo*, contra o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*.
- 5 – Avaliar se há uma expressão diferencial dos genes relacionados à via de defesa da planta, como a via do ácido salicílico e a via do ácido jasmônico.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Soja (*Glycine max* (L.) Merr.)

A soja (*G. max*) ($2n = 40$) é classificada taxonomicamente como pertencente à ordem Fabales, família Fabaceae, subfamília Papilionoideae, gênero *Glycine* W. e espécie *Glycine max* (Hildebrandt et al., n.d.).

É uma planta leguminosa, na qual as principais variedades comerciais apresentam caule piloso, raiz com um eixo principal e muitas ramificações, suas folhas são trifolioladas pinadas, possuem flores de fecundação autônoma, papilionácea típica (brancas, roxas ou intermediárias) com um cálice tubular de cinco sépalas desiguais e uma corola composta por cinco partes, os estames estão agrupados ao redor do estigma que garante a autopolinização, desenvolvem vagens constituídas por duas metades que se desenvolvem a partir de um único carpelo que envolve o lóculo onde as sementes, de uma a cinco sementes por vagem, são formadas (Nepomuceno et al., 2021; Hildebrandt et al., n.d.; Zhang et al., 2018).

O crescimento das variedades de soja pode ser do tipo indeterminado (sem racemo terminal), determinado (com racemo terminal) ou semideterminado (intermediário), já a sua estatura varia, dependendo das condições do ambiente e da variedade, ficando entre 60 e 110 cm. A floração da soja responde ao nictoperíodo, ou seja, de acordo com a duração da noite (Nepomuceno et al., 2021).

Segundo algumas pesquisas, acredita-se que a soja cultivada moderna foi domesticada na Ásia, mais especificamente no Leste Asiático a partir da soja selvagem (*Glycine soja* Sieb. & Zucc.), entre 6.000 e 9.000 anos atrás (Burton, 1997; Carter et al., 2004). Documentações de natureza literária relatam que o cultivo da soja era praticado durante a dinastia Shang, na China, de 1700 a 1100 a.C., o que coincide com a origem da agricultura chinesa (Hymowitz, 2008). No continente americano a primeira referência sobre a introdução da soja data de 1765 no Estado da Georgia, EUA (Hartman et al., 2011), enquanto no Brasil a primeira referência acadêmica da soja ocorreu em 1882 por Gustavo D'utra no Estado da Bahia, onde foram realizados os primeiros estudos com essa espécie no País (Bonato & Bonato, 1987).

Ao longo do século XX, a soja tornou-se uma commodity agrícola estratégica devido ao aumento da demanda global por óleo vegetal e farelo proteico (Hartman et al., 2011; Hymowitz & Shurtleff, 2005). O Brasil emergiu como um dos maiores produtores mundiais, respondendo por uma parcela substancial da produção global, impulsionado pela expansão das áreas de cultivo e pelo aumento da produtividade (FAOSTAT, 2023; Hiroshi et al., 2014).

Essa elevada capacidade produtiva brasileira é sustentada por uma combinação de fatores, incluindo condições climáticas favoráveis em regiões tropicais e subtropicais, o desenvolvimento de cultivares adaptadas ao fotoperíodo, a capacidade intrínseca da soja de estabelecer simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio, o que reduz significativamente a necessidade de fertilização nitrogenada e favorece a produção em larga escala, além do aquecimento do mercado internacional ocorrido na década de 1970, que, posteriormente, avançou para o mercado interno, o estabelecimento de parque industrial de processamento de soja, máquinas agrícolas e insumos e os baixos valores da terra, devido à ampliação da fronteira agrícola (Bezerra et al., 2015; Santos et al., 1999).

Por conta disso, o Brasil investe massivamente em tecnologias e inovação desde o século passado, para fortalecer a produção nacional da soja, tornando-se possível a produção da cultura em todas as regiões do país. Isso vem refletindo na produtividade alcançadas nos últimos tempos, como a safra de 2025/2026 que está estimada a ter uma área cultivada de 48.672,6 mil hectares, o que corresponde a 2,8% superior ao da última safra, além disso, a produção estimada é de 176.124,4 mil toneladas, 2,7% superior à da safra 2024/25. Tais números indicam uma possibilidade de conquistar um recorde nesta safra (Companhia Nacional de Abastecimento, 2026).

Mesmo em constante expansão, o cultivo de soja enfrenta obstáculos que atingem diretamente a produtividade e causam expressivos prejuízos financeiros. Um dos fatores que mais causam impactos negativos a plantação de soja são os micro-organismos fitopatogênicos, principalmente os fúngicos, como *Septoria glycines* (Mancha parda), *Cercospora kikuchi* (Mancha púrpura), *Colletotrichum truncatum* (Antracnose), *Phakopsora pachyrhizi* (Ferrugem asiática) e *Sclerotinia sclerotiorum* (Mofo branco) (Hosseini et al., 2023).

Considerando a necessidade de uma grande produção de alimentos devido ao aumento da população, e os crescentes desafios advindos das adaptações das pragas e o alto custo de

fungicidas, urge a necessidade de unir esforços para encontrar novas estratégias para realizar um manejo agrícola eficaz e mais sustentável.

3.2 *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.)

S. sclerotiorum é um fungo fitopatogênico causador da doença popularmente conhecida como Mofo branco. Esse fungo é capaz de infectar mais de 400 espécies de plantas em todo o mundo, incluindo culturas importantes como a soja e inúmeras ervas daninhas, provocando destruição rápida do tecido do hospedeiro de forma não discriminatória (Boland & Hall, 1994; Liang & Rollins, 2018). O fungo é classificado como pertencente ao filo Ascomycota, saccharomyceta, subfilo Pezizomycotina, leotiomyceta, sordariomyceta, classe Leotiomycetes, ordem Helotiales, família Sclerotiniaceae, gênero *Sclerotinia* e espécie *Sclerotinia sclerotiorum* (NCBI Taxonomy Browser, n.d.).

O alto potencial reprodutivo, o número extenso de hospedeiros aliado à capacidade de sobrevivência a longos períodos tornou esse fungo uma das pragas mais ameaçadoras da agricultura. Estima-se que mais de 10 milhões de hectares de área produtiva de soja no Brasil estejam infestados por *S. sclerotiorum* (Embrapa, n.d.), caso medidas de manejo não sejam adotadas corretamente a redução de produtividade pode chegar a 70% (Embrapa, 2022). Em 2024, os produtores de soja dos EUA sofreram uma perda estimada em mais de 26,1 milhões de bushels (Unidade de medida de volume para produtos agrícolas secos, equivalente a 35,24 litros) devido à doença. (AgriBusiness Global, 2025). Já no Brasil, a safra de 2024/25 da Região Sul do país o mofo branco foi uma das doenças fúngicas de maior incidência (Companhia Nacional de Abastecimento, 2024).

Visto que, tal fungo possui uma ampla gama de hospedeiros, não existem sintomas únicos que sejam comuns a todas as plantas infectadas por esse fungo. As folhas geralmente apresentam lesões de aspecto úmido que se expandem rapidamente e se propagam pelo pecíolo até o caule. Os caules de algumas plantas infectadas podem desenvolver inicialmente lesões escuras, enquanto em outros hospedeiros ocorre o aparecimento de lesões encharcadas. As lesões geralmente evoluem para tecidos necróticos que, posteriormente, desenvolvem um micélio branco e fofo, que são o sinal mais evidente de plantas infectadas com esse fungo fitopatogênico (Bolton et al., 2006).

Quando infectadas, hortaliças tornam-se completamente invendáveis, grãos e oleaginosas infectadas sofrem com a redução do peso, número e/ou qualidade das sementes, resultando em perdas econômicas substanciais (“Disease Management,” 2008). Uma vez iniciada a doença no hospedeiro, a infecção pode se espalhar para plantas adjacentes por meio do contato planta a planta (Bolton et al., 2006).

O ciclo de vida de *S. sclerotiorum* é ancorado principalmente pela formação do escleródio, a principal estrutura de sobrevivência a longo prazo, podendo chegar a 8 anos, mesmo em condições ambientais adversas (Abawi & Grogan, 1979). O escleródio pode germinar direta (miceliógena, a partir do micélio) ou indiretamente (carpogênica, com a produção de apotécios) (Figura 1), a primeira pode ser desencadeada por exsudatos radiculares e o micélio proveniente de escleródios presentes no solo pode iniciar diretamente a infecção nas raízes e na base do caule (Ekins et al., 2002). Já a germinação carpogênica os escleródios produzem ascas que liberam ascósporos, transportados pelo vento, infectam as partes aéreas, como caules, folhas, flores e frutos (Bolton et al., 2006). Estudos anteriores demonstraram que *S. sclerotiorum* esquiva-se, inibe e/ou suprime as respostas de defesa basal do hospedeiro antes de matar e destruir as células hospedeiras (Hossain et al., 2023).

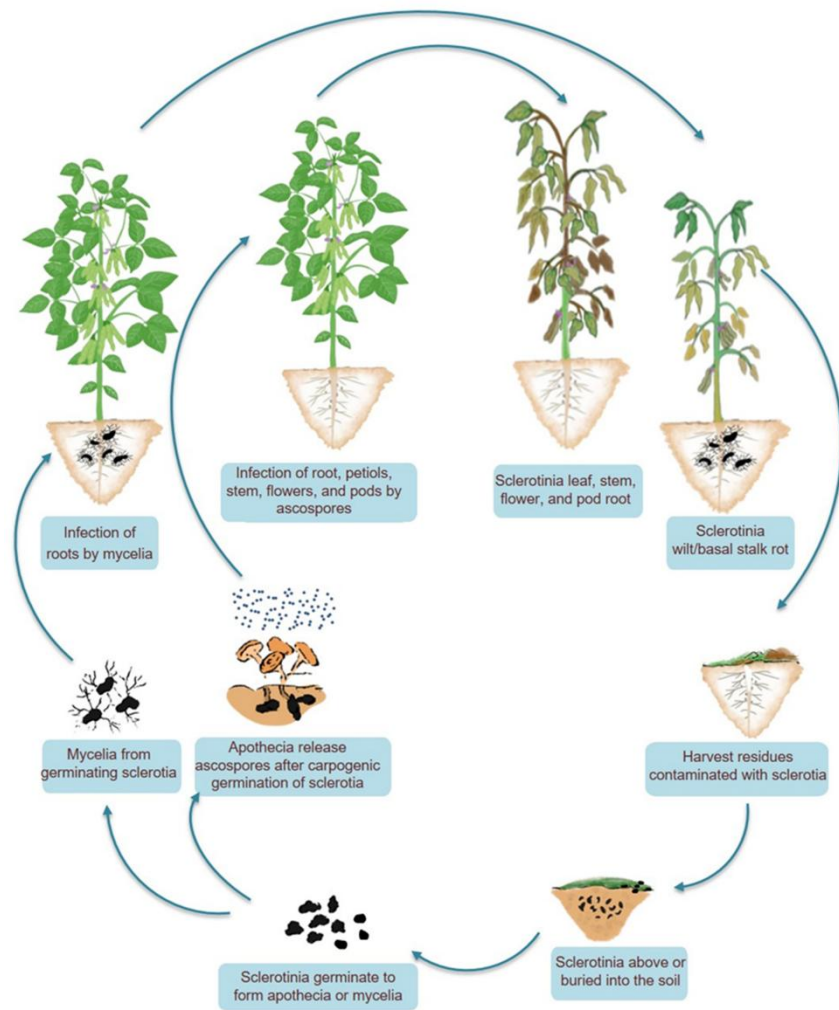


Figura 1 Representação esquemática do ciclo de vida do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* em soja (Hossain et al., 2023). O ciclo da doença inicia-se com os escleródios, estruturas de sobrevivência do fungo que permanecem no solo ou nos restos das culturas após a colheita. Esses escleródios podem germinar de duas formas: formando micélio, que infecta diretamente as raízes, ou formando apotécios, que liberam ascósporos capazes de infectar raízes, pecíolos, caule, flores e vagens. A infecção provoca sintomas como podridão de folhas, caule, flores e vagens, além de murcha e podridão basal do caule. Durante o desenvolvimento da doença, novos escleródios são produzidos nos tecidos infectados e retornam ao solo com os resíduos da cultura, garantindo a sobrevivência do fungo e reiniciando o ciclo da doença.

S. sclerotiorum foi um patógeno aceito amplamente como um fungo necrotrófico, pois a doença envolve a morte das células hospedeiras e a subsequente absorção de nutrientes por meio da liberação de toxinas como o ácido oxálico e enzimas degradadoras de parede celular (Bolton et al., 2006), além de numerosas enzimas líticas, incluindo endo e exopectinases, celulasas, hemicelulasas e proteases (Hossain et al., 2023). No entanto, evidências recentes determinaram que o fungo se classifica como hemibiotrófico, pois no início da infecção, assim que o *S. sclerotiorum* penetra na cutícula, a disseminação não causa necrose das células hospedeiras, há um breve período de desenvolvimento biotrófico

nas lacunas apoplásticas, a qual ocorre a supressão das reações de defesa da planta, e posteriormente o início da necrose das células hospedeiras (Liang & Rollins, 2018).

O mecanismo de virulência de *S. sclerotiorum* (Figura 2) começa após a penetração na célula hospedeira pelo fungo com a produção de enzimas degradadoras de parede celular, como as poligalacturonases, responsáveis pela degradação da pectina, que acabam liberando DAMPs (Talmo & Ranjan, 2025). Posteriormente, os DAMPs são reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs – do inglês “pathogenesis-related proteins”), que iniciam as cascatas de sinalização, ativando fatores de transcrição resultando na síntese de genes relacionados à defesa, como as proteínas inibidoras de poligalacturanases (De Lorenzo et al., 2001), e na sinalização hormonal, como a via do ácido salicílico (Jones & Dangl, 2006b).

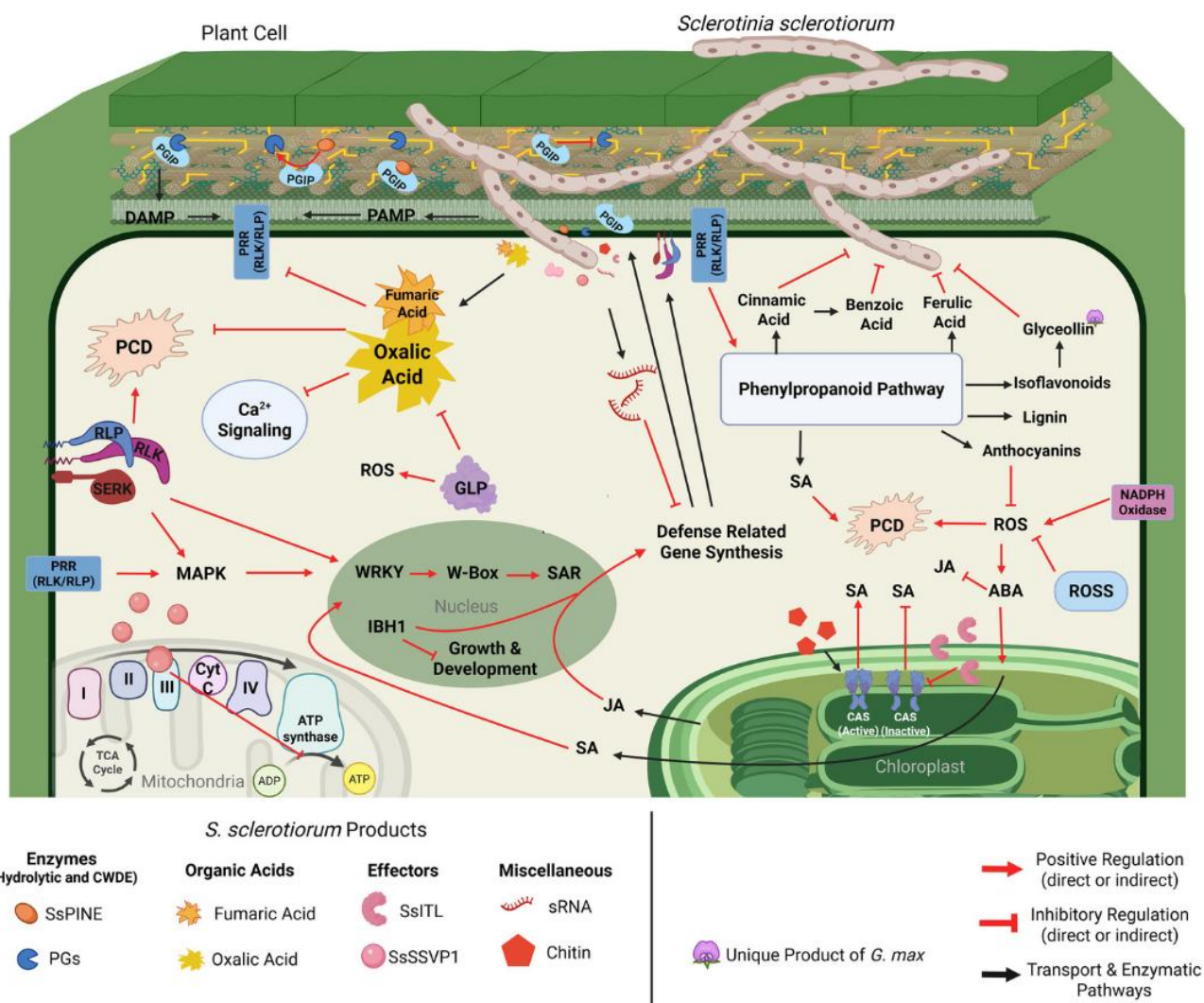


Figura 2 Representação esquemática dos mecanismos de virulência de *S. sclerotiorum* e as respostas de defesa em soja, adaptado de (Talmo & Ranjan, 2025). Após a penetração no tecido vegetal, *S. sclerotiorum* inicia o processo de infecção com a produção de enzimas degradadoras da parede celular, como as

poligalacturonases (PGs), resultando em uma diminuição da estabilidade celular e produzindo DAMPs que são reconhecidos por PRRs da célula hospedeira, processo que dá início a uma cascata de sinalização. A ativação dos fatores de transcrição resulta na síntese de genes relacionados à defesa e na sinalização hormonal. Genes que codificam proteínas relacionados à defesa, como as proteínas inibidoras da poligalacturonase (PGIPs), são sintetizados e transportados para a parede celular, onde se ligam as poligalacturonases (PGs) inibindo parcialmente sua função. Por outro lado, *S. sclerotiorum* são capazes de produzir efetores que inativam PGIP (SsPNE1), agravando a degradação celular. Outros produtos importantes na infecção de *Sclerotinia* incluem a produção de pequenos RNAs (sRNAs), responsáveis por inibir genes de defesa dos hospedeiros, ácido oxálico, ácido fumárico, que inibem diversos mecanismos de defesa do hospedeiro. Outra estratégia de defesa do hospedeiro é a produção de proteínas GLPs, que facilitam a produção ROS, além da ativação da via do fenilpropanoide responsável por produzir vários compostos relacionados à defesa, incluindo ácido cinâmico, ácido benzoico e ácido ferúlico, que têm atividade inibitória sobre o crescimento e desenvolvimento de *S. sclerotiorum*. A lignina produzida pela via do fenilpropanoide fornece defesa estrutural na parede celular, retardando a entrada do patógeno. As antocianinas, também provenientes da via do fenilpropanoide, possuem propriedades antioxidantes, degradando espécies reativas de oxigênio e diminuindo a taxa de morte celular programada (PCD – do inglês “Programmed Cell Death”). As glicerolinas, um isoflavonóide específico da glicina (presente na flor da soja), são produtos da via do fenilpropanoide e demonstraram desempenhar um papel vital na defesa contra *S. sclerotiorum*, embora o mecanismo ainda seja desconhecido. Por fim, via do fenilpropanoide é também uma das vias metabólicas em plantas que produzem ácido salicílico, que reforçam a parede celular, exercem atividade antifúngica e regulam a resposta imune; a produção de AS também ocorre nos cloroplastos, mediada por receptores sensíveis ao cálcio (CAS) ativados por alterações de Ca^{2+} ou pela percepção de PAMPs como quitina, embora o efector SsITL fúngico interfira nesse processo ao se associar às proteínas CAS. A sinalização hormonal é adicionalmente modulada pelo ácido abscísico (ABA), induzido por ROS, que redireciona a dinâmica hormonal, promovendo AS que é antagonizando AJ.

3.3 Sistema Imune das plantas

Diante do ataque de patógenos, como *S. sclerotiorum*, as plantas são capazes de detectar com precisão e enviar sinais em tempo hábil, para responder adequadamente às mais diferentes estratégias patogênicas, implementando diversos mecanismos de resposta de defesa multidimensional (Wang et al., 2019). As respostas normalmente começam pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e Padrões Moleculares Associados a Danos (DAMPs) por meio de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) situados na superfície das células vegetais resultando em dois tipos de respostas, a primeira uma imunidade desencadeada por PAMPs denominada PTI (do inglês “Pattern-Triggered Immunity”), considerada uma resposta mais basal (Wang et al., 2019). Por sua vez, os patógenos bem-sucedidos utilizam efetores que interferem na PTI e contribuem para a virulência desses organismos, resultando em uma suscetibilidade desencadeada por efetores (ETS – do inglês “Effector-Triggered Susceptibility”). As plantas por sua vez podem reconhecer os efetores pelas proteínas de defesa da família NB-LRR (do inglês “Nucleotide-Binding Site - Leucine-Rich Repeat”), proteínas cruciais para a primeira linha de defesa das plantas que atuam na detecção de efetores de patógenos e no

início de respostas de defesa, como a resposta de hipersensibilidade, resultando em uma imunidade desencadeada por efetores (ETI – do inglês “Effector-Triggered Immunity”), caracterizada por resposta mais robustas e duradouras (Jones & Dangl, 2006a; Ngou et al., 2022).

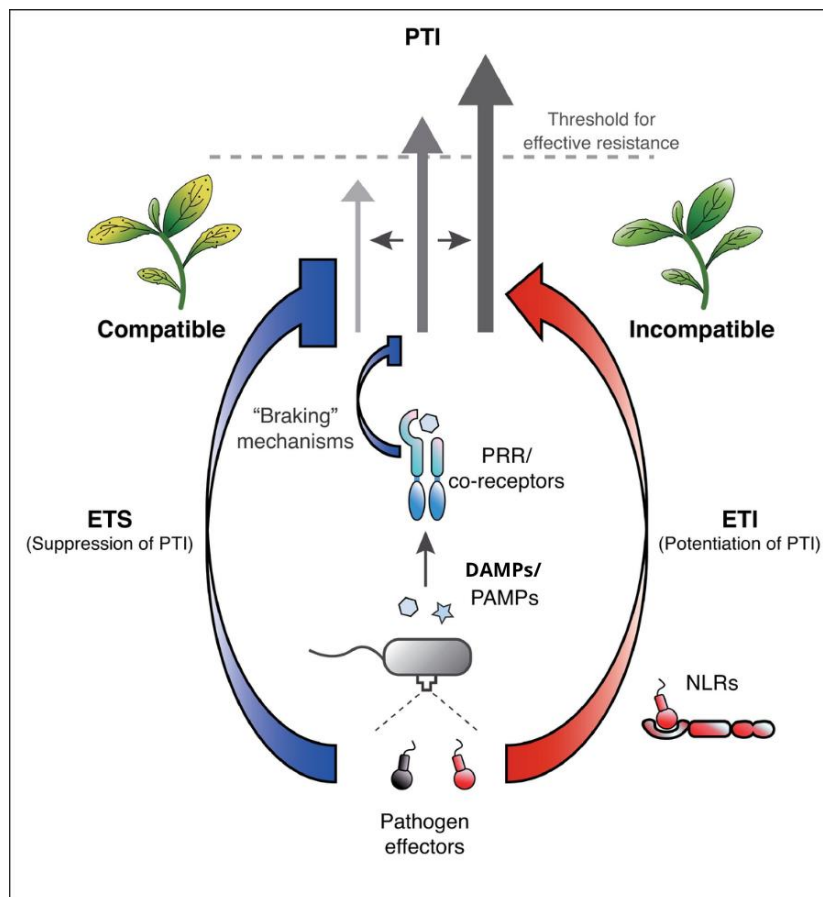


Figura 3 Modelo integrado da imunidade vegetal baseado nas interações entre PTI e ETI, adaptado de (Yuan et al., 2021). A imunidade desencadeada por padrões (PTI) é ativada pelo reconhecimento de PAMPs e/ou DAMPs por receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), constitui a primeira linha de defesa contra patógenos. A intensidade da PTI é regulada negativamente por mecanismos endógenos de controle (“Braking mechanisms”), que evitam a hiperativação da resposta imune. Durante a infecção, patógenos secretam efetores capazes de suprimir a PTI, caracterizando a suscetibilidade desencadeada por efetores (ETS) e resultando em interações compatíveis, ou seja, a planta não consegue se defender adequadamente. Por outro lado, esses efetores podem ser reconhecidos por receptores intracelulares do tipo NLR (do inglês – “Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor”), ativando a imunidade desencadeada por efetores (ETI). Diferentemente de modelos clássicos, a ETI não atua como uma via independente, mas promove a amplificação e restauração da PTI por meio da regulação positiva de seus componentes, elevando a resposta imune acima do limiar necessário para resistência efetiva. Dessa forma, o resultado da interação planta-patógeno é determinado pelo balanço entre a supressão da PTI mediada por ETS e sua potencialização via ETI, sendo que interações compatíveis estão associadas à predominância de ETS, enquanto interações incompatíveis resultam da ação combinada de PTI e ETI.

Após a infecção por *S. sclerotiorum*, alguns elicitores desse fungo podem induzir a planta hospedeira a produzir uma resposta imune contra esse patógeno invasor, como o SCFE1 (elicitador 1 do filtrado de cultura de *Sclerotinia*), um elicitador em *S. sclerotiorum* que evoca respostas imunes desencadeadas por PAMPs e detectado por RLP30 (proteína semelhante a receptor 30) (Zhang et al., 2013). Há também certas proteínas como as da família de proteínas cerato-platanina (CP), que são exclusivas de fungos (Yang et al., 2018), que atuam também como PAMPs induzindo a expressão de genes de defesa, a síntese de ROS e a morte celular local semelhante à resposta de hipersensibilidade (RH) (Frías et al., 2011).

No entanto, durante a infecção, certos patógenos, como *S. sclerotiorum*, produzem proteínas conhecidas como poligalacturonases (PGs), responsáveis por hidrolisar as ligações α -(1–4) da homogalacturonana da rede de pectina na parede celular da planta, expondo a celulose e a hemicelulose para posterior degradação por hemicelulases e celulasas, mecanismo ativado para dar o início da infecção (De Lorenzo et al., 2001; Kalunke et al., 2015). As plantas por sua vez, produzem certas proteínas que inibem a atividade despolimerizante da pectina pelas PGs, chamadas de proteínas inibidoras de poligalacturanases (PGIPs), que são altamente específicas, tendo como alvo tipos particulares de PGs, direcionam o processo de degradação completa da pectina da parede celular vegetal para a formação de OGs (D'Ovidio et al., 2004; Kalunke et al., 2015). Tais moléculas atuam como padrões moleculares associados a danos (DAMPs) acionando uma ampla gama de respostas de defesa (Ferrari et al., 2013) como o acúmulo de fitoalexinas (Davis et al., 1986), produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Galletti et al., 2008b) e modulações das vias de sinalização envolvendo etileno, ácido salicílico (AS) e ácido jasmônico (AJ) (Denoux et al., 2008b).

3.4 Oligogalacturonídeos (OGs)

Os oligogalacturonídeos (OGs) são um dos DAMPs de plantas mais bem caracterizados, responsáveis por desencadear, em diversas espécies vegetais, uma ampla gama de respostas de defesa. Sabe-se que os OGs são liberados das paredes celulares vegetais após a degradação parcial da Homogalacturonana (HG) por poligalacturonases (PGs) microbianos durante infecções (Davis et al., 1986). A atividade de sinalização dos OGs é uma clara indicação de que as plantas desenvolveram mecanismos para monitorar a

degradação do HG para a detecção precoce de lesões teciduais (Ferrari et al., 2013), já que a pectina é um dos componentes mais externo da célula vegetal e, portanto, está entre as primeiras estruturas a serem alteradas durante uma tentativa de invasão por patógenos ou quando a parede celular sofre uma ruptura por estresse (Ridley et al., 2001).

De forma geral os OGs bioativos, são fragmentos de ácido d-galacturônico ligados por α -(1,4) com um grau de polimerização (DP) de 10 a 15 resíduos, que surgem após a ruptura da parede celular onde a homogalacturonana é clivada pela PG, cuja ação é modulada pela PGIP para produzir e acumular OGs, sendo possível desencadear respostas imunes após o devido reconhecimento por células vegetais (Figura 4) (Benedetti et al., 2015; Degli Esposti et al., 2025). As PGIPs atuam reduzindo significativamente a eficiência dos PGs fúngicos limitando a degradação de HG e prolongando a meia-vida dos OGs, de modo a protelar a progressão fúngica (Kalunke et al., 2015).

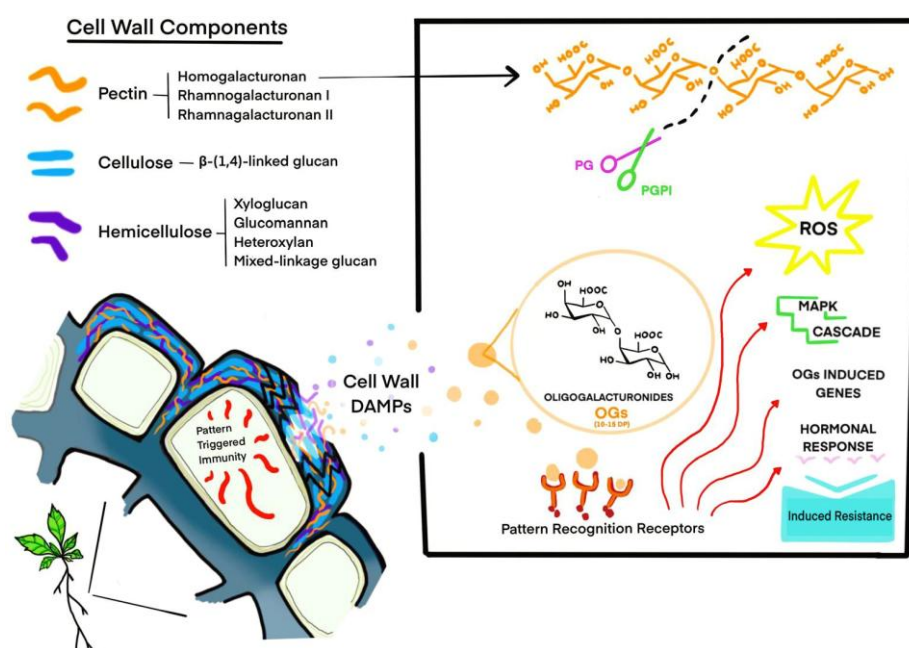


Figura 4 Esquema simplificado da via de sinalização dos oligogalacturonídeos (OGs) (Degli Esposti et al., 2025). A ilustração representa a liberação de DAMPs da parede celular vegetal (OGs) por meio da ação do complexo PG-PGIP, que cliva o homogalacturonana. Os OGs são reconhecidos pelas PRRs presente na superfície celular vegetal que desencadeiam cascatas de sinalização, como MAPK, e resultam em produção de ROS, ativação/repressão transcricional e produção de fitormônios, implicando em um aumento na resistência a patógenos.

Um exemplo muito estudado durante vários anos é a interação entre a PG de *Fusarium phyllophilum*, fungo ascomiceto, e a PGIP de *Phaseolus vulgaris*, feijão comum (Benedetti

et al., 2013, 2015; Casasoli et al., 2009). A recente análise estrutural do complexo PG-PGIP confirmou que as PGIPs vegetais além de alterar a afinidade da PG fúngica a pectina, convertem esse fator de patogenicidade em uma enzima que desencadeia respostas de defesa, promovendo a produção e o acúmulo de OGs com um grau de polimerização (DP) entre 10 e 15 (Xiao et al., 2024).

Os OGs ativam múltiplas vias hormonais em plantas, sendo o AJ (ácido jasmônico) e o AS (ácido salicílico) fundamentais para sua função. Na literatura os OGs regulam positivamente genes envolvidos tanto na via do ácido jasmônico quanto na via do ácido salicílico, demonstrando sua capacidade de orquestrar um amplo espectro de respostas de defesa (Denoux et al., 2008b; Gravino et al., 2015; C. Liu et al., 2023).

Em estudos anteriores, tratamentos com OGs em *Arabidopsis thaliana* detectaram uma regulação positiva de genes essenciais para a biossíntese e sinalização do AJ (Davidsson et al., 2017). No entanto, os OGs são mais associados como reguladores das respostas imunes mediadas pelo AS em plantas de soja, incluindo tanto a ativação das vias de biossíntese quanto a sinalização do AS. Essa ativação imunológica frequentemente envolve a regulação positiva de genes como *pr1*, marcador de defesa mediada por AS (Gravino et al., 2015).

3.5 Vias de defesa hormonais de ácido salicílico (AS) e ácido jasmônico (AJ)

Os hormônios vegetais são reguladores centrais da imunidade das plantas. Os principais hormônios envolvidos nessa regulação são o ácido salicílico (AS), o ácido jasmônico (AJ), o etileno (ET) e o ácido abscísico (ABA). Cada hormônio regula sua própria via, mas também interagem umas com as outras em uma complexa combinação de interações cooperativas, antagônicas e/ou amplificadoras (Aerts et al., 2021). As duas vias de defesa mais estudadas são as reguladas pelo ácido jasmônico e pelo ácido salicílico, consideradas a base da parte do sistema imunológico regulada por hormônios (Wasternack & Song, 2017; Y. Zhang & Li, 2019).

Sabe-se que a percepção local dos sinais de perigos como DAMPs ou PAMPs inicia com respostas imunes sistêmicas, mediadas por hormônios relacionados à defesa, como o ácido

salicílico ou o ácido jasmônico, que apesar de desempenharem papéis distintos são complementares (Kim & Lim, 2023; Vega-Muñoz et al., 2020).

O ácido salicílico (AS, ácido 2-hidroxibenzoico) foi relatado pela primeira vez como indutor de resistência a doenças em plantas em 1979 (White, 1979). Posteriormente o papel essencial do AS na resistência sistêmica adquirida (RSA) foi demonstrado utilizando plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) que expressavam a enzima degradadora de AS, salicilato hidroxilase (NahG) (Gaffney et al., 1993). Atualmente é amplamente aceito que o AS seja sintetizado a partir de duas possíveis vias, a via ICS, isocorismato sintase, e a via PAL, fenilalanina amônia-liase, ambas partindo do corismato (Figura 5) (Lefevere et al., 2020).

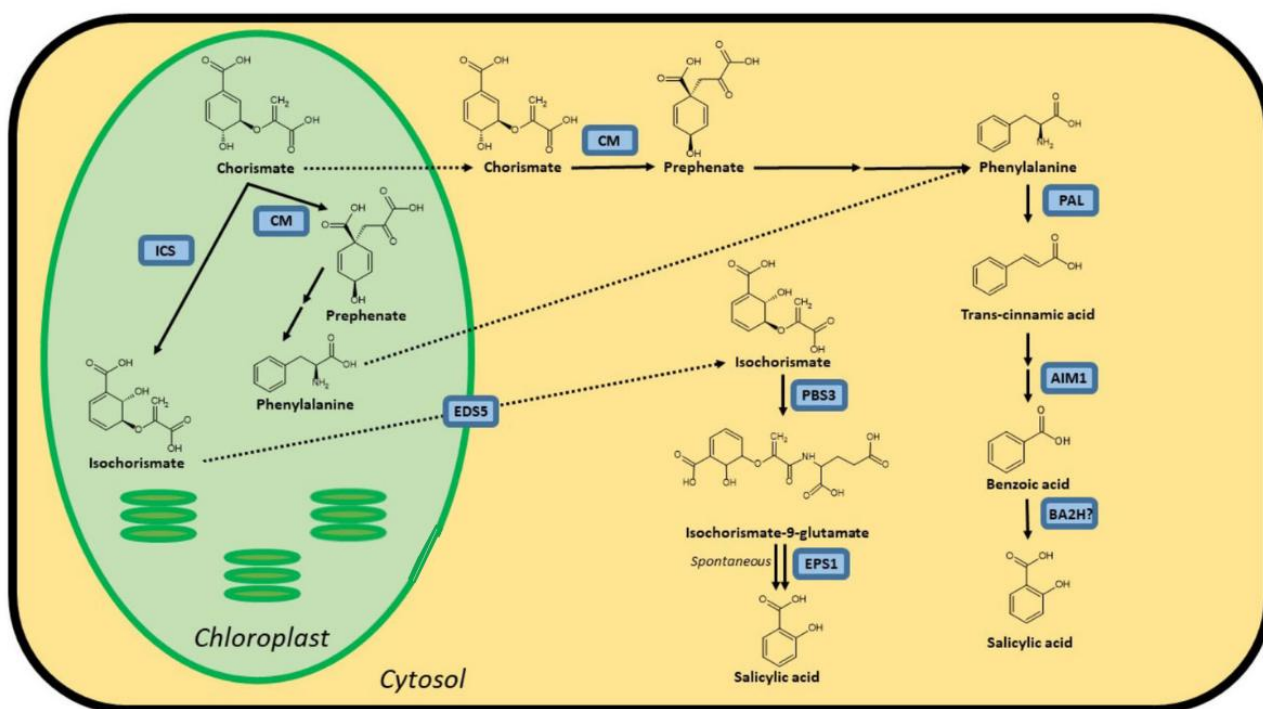


Figura 5 Representação esquemática das duas possíveis rotas de biossíntese do ácido salicílico em plantas, adaptado de (Lefevere et al., 2020). Ambas as vias partem do corismato, a primeira, a via do isocorismato sintase (ICS), onde o corismato é convertido em isocorismato (IC) nos plastídeos, posteriormente é transportado para o citosol pelo transportador EDS5 (do inglês “Enhanced Disease Susceptibility 5”), depois a proteína PBS3 (do inglês “AvrPphB Susceptible 3”) catalisa a conjugação do IC ao glutamato produzindo isocorismato-9-glutamato, que espontaneamente se converte em AS, porém a proteína EPS1 (do inglês “Enhanced Pseudomonas Susceptibility 1”) aumenta a conversão do isocorismato-9-glutamato em AS. A segunda via, da fenilalanina amônia-liase (PAL), o corismato é convertido prephenato pela enzima corismato mutase (CM), que existe tanto no cloroplasto quanto no citosol, posteriormente é transformado em fenilalanina, essa por sua vez é convertida em ácido trans-cinâmico pela proteína PAL, depois a enzima AIM1 (do inglês “Abnormal Inflorescence Meristem 1”) oxida o ácido trans-cinâmico formando o ácido benzoico e por fim o ácido salicílico é formado pela hidrólização por meio de uma enzima hipotética, BA2H? (BA-2-hidroxilase).

Recentemente foi constatado que em soja o AS ativa predominantemente genes ligados à resistência sistêmica adquirida e à sinalização de defesa. De forma geral os genes responsivos ao AS foram ativados após o ataque de patógenos biotróficos, sendo representantes desses genes responsivos genes como de proteínas relacionadas à patogênese (*pr*), sintetases de acil-ácido amido Gretchen Hagen 3 (*gh3*) e algumas isoformas de *pal1* (que codifica a fenilalanina amônia-liase) (Beyer et al., 2021).

O ataque de patógenos, regula positivamente a produção do AS, controlada em parte pela transcrição do gene da enzima biossintética do AS, a isocorissato sintase 1 (ICS1), que medeia a expressão induzida ou a não expressão dos genes relacionados à patogênese 1 (*npr1*) e genes relacionados à patogênese (PR), como *pr1* e *pr2*, resultando em um estado de defesa aprimorado conhecido como resistência sistêmica adquirida (RSA) (Cameron et al., 1999; Glazebrook, 2005).

Por outro lado, alguns estudos relacionaram a expressão de outros genes em resposta aos hormônios vegetais como os membros da família de genes *gh3* que originalmente eram referidos como uma família de genes responsivos à auxina, no entanto, foi observado que nem todos os membros respondem a esse hormônio (Hagen & Guilfoyle, 1985). Há evidências que os genes *gh3* são componentes-chave da maquinaria hormonal que regulam o crescimento e o desenvolvimento em resposta a estresses bióticos e abióticos (Fu et al., 2011). Recentemente foi demonstrado que a expressão do gene *gh3* foi altamente ativada pelo AS em plantas de soja sendo inclusive considerado um gene marcador confiável de AS (Beyer et al., 2021). Alguns estudos sugerem que GH3 possa também mediar a comunicação metabólica entre as vias de respostas à auxina e ao AS (Westfall et al., 2016). Plantas transgênicas superexpressando *gh3* acumularam altos níveis de AS e aumentaram a expressão de *pr1* em tecidos locais e sistêmicos em resposta a *Pseudomonas syringae* (Z. Zhang et al., 2007). Tais estudos corroboram com a afirmação que GH3 regula positivamente a resistência a doenças dependente de AS (Jagadeeswaran et al., 2007; Nobuta et al., 2007).

Investigações anteriores observaram que após a infecção por patógenos, as atividades da L-fenilalanina amônia-liase (PAL) em plantas de soja selvagens resistentes foram reguladas positivamente em comparação com as plantas susceptíveis (K. Zhang et al., 2020). Em *Arabidopsis*, a via da ICS é a mais importante, enquanto a via da PAL parece ser mais

importante para o acúmulo de AS em arroz (Wang et al., 2024). A contribuição igual de ambas as vias é uma possibilidade também para algumas plantas, como ocorre em soja (Lefevere et al., 2020).

Por outro lado, o ácido jasmônico apesar de ser um sinalizador de diversos processos do desenvolvimento, como crescimento de raízes e parte aérea, germinação de sementes e senescência (Wasternack & Song, 2017) também é muito associado à resposta ao estresse biótico e abiótico (Sun et al., 2011). Porém, em plantas de soja, a via do AJ ao contrário da via do AS não foi observada uma ativação durante a infecção por patógenos biotróficos mas sim durante a herbívoros (Beyer et al., 2021).

O AJ é originalmente sintetizado a partir de um ácido graxo ω -3 chamado ácido linoleico (ALA). A reação se inicia quando as fosfolipases separam fosfolipídios como o ácido linolênico (18:2; número de carbonos: número de ligações duplas na cadeia acil) e o ácido α -linolênico (18:3) das membranas dos cloroplastos (Bargmann et al., 2009). O metabolismo oxidativo dos ácidos graxos poli-insaturados dá origem a um grupo de compostos, conhecidos por oxilipinas, que desempenham diversas funções em plantas, sendo o mais conhecido e estudado o ácido jasmônico (Howe & Schilmiller, 2002). A biossíntese da maioria dos oxilipinas vegetais é iniciada pela família de enzimas lipoxigenase (LOX), que adiciona uma molécula de oxigênio na posição 9 ou 13 da cadeia C18 dos ácidos linoleico e linolênico (Rowley et al., 2016). Análises bioquímicas detalhadas já mostraram que os produtos hidroperóxidos, compostos orgânicos contendo o grupo funcional peróxido (-OOH), da reação catalizada pela LOX podem ser metabolizados em uma variedade de oxilipinas por diversas enzimas, incluindo aleno óxido sintase (AOS) e hidroperóxido liase (HPL) (Feussner et al., 2001; Grechkin, 1998).

A via AOS direciona o ácido 13-hidroperoxi-linolênico (13-HPOT), produto da oxidação do ácido α -linolênico (um ácido graxo ω -3) pela ação de enzimas lipoxigenases, para a formação de jasmonatos (Figura 6) (Howe & Schilmiller, 2002). Já a via HPL da via 13-LOX leva à formação de aldeídos C6 e ácidos graxos ω -ceto C12. O produto C12 derivado do ácido linolênico é o precursor da traumatina, um composto associado com a cicatrização de feridas (Zimmerman & Coudron, 1979). Há também evidências indicando que os produtos aldeídicos de cadeia curta da via 13-HPL desempenham papéis importantes nas defesas contra patógenos microbianos e insetos (Bate & Rothstein, 1998; Vancanneyt et al., 2001). Estudos recentes evidenciaram que existe competição entre os ramos HPL e

AOS na via 13-LOX do metabolismo de oxilipinas em soja (Figura 6), revelando que a regulação positiva de HPL resulta em uma diminuição de ácido jasmônico (Y. Wang et al., 2020).

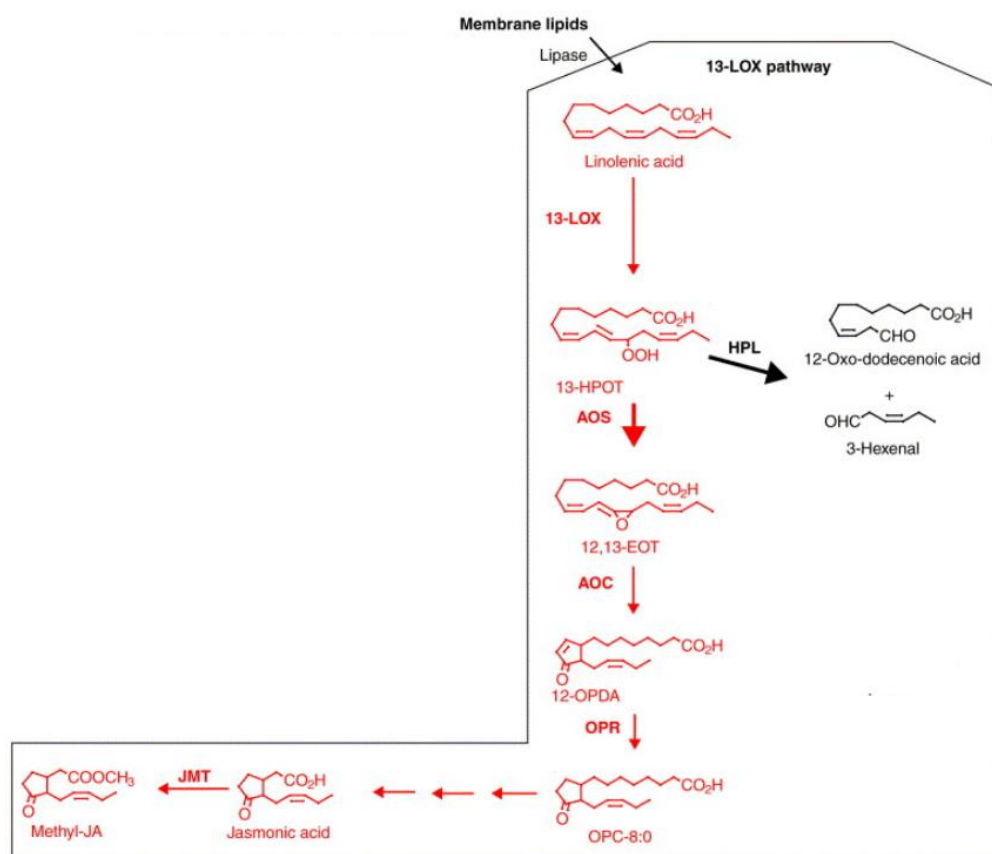


Figura 6 Representação da via 13-LOX do metabolismo do ácido linolênico, adaptado de (Howe & Schilmiller, 2002). O ácido 13-hidroperóxi-linolênico (13-HPOT) gerado pela 13-LOX é metabolizado em aldeídos C6 e ácidos graxos ω -ceto C12 pela HPL (em preto). Alternativamente, a via AOS direciona o 13-HPOT para a formação de jasmonatos (em vermelho), um intermediário 12,13-EOT (ácido 12,13-epóxi-octadecatrienoico) gerado pela AOS é convertido pela AOC (aleno óxido ciclase) em 12-OPDA. Posteriormente 12-OPDA é reduzido pela OPR (12-OPDA redutase) produzindo OPC-8:0 (ácido 3-oxo-2-[2'-pentenil]-ciclopentano-1-octanoico), que é subsequentemente transformado em AJ por três ciclos de β -oxidação. Por fim a JMT (do inglês "JA carboxil metiltransferase") catalisa a formação de MeJA (metil jasmonato).

Além disso, a regulação precisa entre as vias de sinalização de defesa das plantas é uma característica importante na modulação da defesa contra diversos estresses bióticos e abióticos resultando em uma resposta mais assertiva (Pieterse et al., 2012), por exemplo, a indução da via AJ pode reprimir a resposta ao AS (Uppalapati et al., 2007) e, inversamente, o ácido salicílico suprimir a sinalização do ácido jasmônico (Van der Does et al., 2013). Nesse contexto, a análise da modulação das vias de AS e AJ em plantas

transgênicas que expressam PG–PGIP é uma ferramenta para compreender se a liberação aumentada de OGs é capaz de reprogramar o balanço hormonal e potencializar respostas de defesa, contribuindo assim para o aumento da resistência a patógenos.

4. METODOLOGIA

4.1 Construção de vetores para expressão constitutiva e induzível do gene quimérico PG-PGIP.

As sequências dos genes PGIP de *Phaseolus vulgaris* e PG de *Fusarium phyllophilum*, cedidas pelo pesquisador Felice Cervone da Universidade de Roma "La Sapienza", foram inseridas *in silico* em vetores distintos, ambos partindo de um mesmo vetor N° GS65676-2-PZF351-RNAi do banco de dados da empresa EPOCH Inc (USA). Um sob controle do promotor 35SCaMV (*Cauliflower Mosaic Virus*) e outro sob controle do promotor induzível por patógenos, quitinase, da própria soja. Ambos possuem o gene *ahas* mutado de *Arabidopsis thaliana*, sob controle do promotor e do terminador do próprio gene *ahas*. Este gene confere resistência aos herbicidas da classe das imidazolinonas, entre eles o imazapyr, o qual foi utilizado como marcador de seleção. Os vetores foram sintetizados pela empresa Epoch Inc (USA).

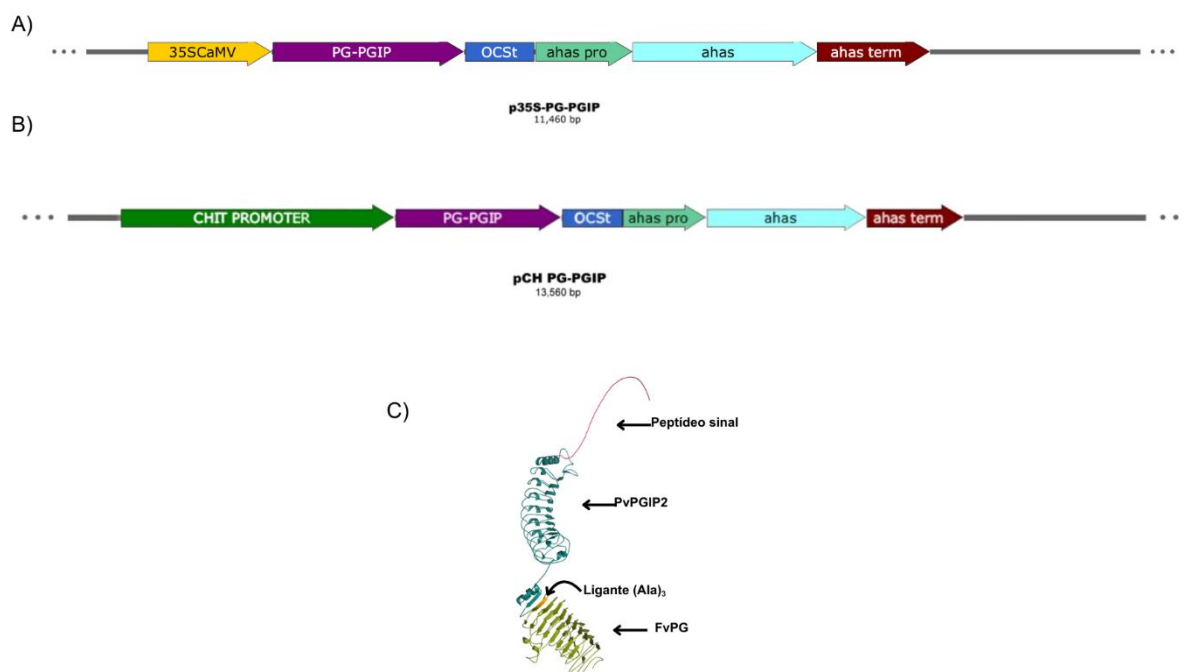


Figura 7 Representação dos vetores plasmidiais e estrutura tridimensional da proteína quimérica PG-PGIP. (A) vetor p35S PG-PGIP, contendo a região promotora 35SCaMV, o gene sintético PG-PGIP, região terminadora OCS e o gene *ahas* mutado de *Arabidopsis thaliana*; (B) pCH PG-PGIP, contendo a região promotora Quitinase (CH- Sigla em inglês "Chitinase") de (*Glycine max*), o gene sintético PG-PGIP, região terminadora OCS e o gene *ahas* mutado de *Arabidopsis thaliana*; (C) Estrutura da proteína quimérica PG-

PGIP mostrando o peptídeo sinal de secreção para o apoplasto (em rosa), o fragmento do inibidor de PGs de *Phaseolus vulgaris* (PvPIGP2) (em verde escuro), o ligante composto por três resíduos de alanina (em amarelo) e o fragmento de PG de *Fusarium phyllophilum* (FvPG) (em verde claro).

4.2 Transformação genética de *Escherichia coli* via eletroporação.

Os vetores sintetizados foram utilizados para a transformação bacteriana de *E. coli*. Linhagem DH10-B eletrocompetentes preparadas conforme protocolos estabelecidos na literatura (Aragão & Rech, 2015). A eletroporação foi realizada com um pulso elétrico de alta voltagem usando um eletroporador do modelo MicroPulser (Bio-Rad), conforme especificado pelo fabricante. Imediatamente após o pulso elétrico, meio LB pré-aquecido foi adicionado às cubetas para permitir a recuperação das células. As suspensões foram incubadas a 37 °C por 1 h sob agitação. As células transformadas foram selecionadas em meio Luria-Bertani (LB) gelificado com os antibióticos apropriados, streptomicina e ampicilina, e posteriormente cultivadas em meio LB líquido contendo os agentes seletivos, sob agitação, durante 18 horas à 37°C para posterior extração do DNA plasmidial.

4.3 Amplificação do plasmídeo por meio de Maxipreparação de DNA plasmidial (Maxiprep)

O DNA plasmidial contendo a sequência de interesse foi posteriormente extraído e purificado das culturas de *E. coli* via Maxiprep, conforme descrito pelo protocolo (William & Sambrook, 2001), onde as células bacterianas transformadas com o plasmídeo de interesse cresceram em 500mL de meio LB líquido contendo os antibióticos apropriados. Após o crescimento, as culturas foram submetidas à centrifugação para obtenção do pellet, seguida pela ressusensão das células bacterianas com a solução I (Tris-HCl 25mM, EDTA 10mM, Glucose 50mM) posteriormente outras duas etapas foram realizada, a primeira para a lise celular Solução II (NaOH 200mM, SDS 1%) e a última para neutralização com a Solução III (KC₂H₃O₂ 5 M, CH₃COOH 2M). Após essas etapas, as amostras foram centrifugadas para remoção de detritos celulares e os sobrenadantes contendo o DNA plasmidial foram recuperados. As amostras resultantes foram diluídas em água MilliQ, quantificadas

utilizando o NanoDrop e ajustadas para a concentração final de 1µg/µL para serem usadas na transformação genética de soja.

4.4 Transformação genética de *Glycine max*

Para a transformação genética de soja (cultivar BRS7980) os embriões de sementes maduras desinfestadas foram extraídos com auxílio de bisturi e lupa para a exposição da região meristemática. Posteriormente, os embriões foram acomodados em placas de Petri contendo meio de bombardeamento (saís MS, 30 g/L de sacarose, 8 g/L de Phytigel, pH 5,7) para em seguida realizar os experimentos de biobalística, onde os vetores construídos foram bombardeados, utilizando um acelerador de partículas, sobre o meristema apical de hastes somáticas embrionárias, conforme descrito anteriormente (Rech et al., 2008). Nesse processo micropartículas de tungstênio foram adicionadas em 6µg de DNA juntamente com 50µL de CaCl₂ 2,5 M e 20 µL de espermidina 0,1 M sendo homogeneizado suavemente. A mistura foi incubada a temperatura ambiente sob a agitação lenta durante aproximadamente 20 minutos. Após esse período a solução foi centrifugada à velocidade máxima por 15 segundos e o sobrenadante descartado, posteriormente, foi adicionado ao pellet 150 µL de etanol absoluto, sendo vigorosamente agitado e centrifugado em velocidade máxima por 15 segundos e novamente descartando o sobrenadante. Por fim, adicionou-se 25 µL de etanol absoluto e homogeneizou-se vigorosamente, sendo sonificado com a frequência de 40 kHz e potência de 100 W durante 3 segundos. Alíquotas foram distribuídas na região central de cada membrana carreadora, previamente posicionada no suporte de membrana. Os discos contendo as micropartículas cobertas com DNA foram colocados em uma placa de Petri com sílica e alocadas dentro de um dessecador por 15 minutos. Em seguida, foi realizado o bombardeamento através de um acelerador de partículas com pressão de gás hélio de aproximadamente 1200 psi. Após o bombardeamento os embriões permaneceram durante a noite em meio de indução de germinação contendo BAP (6-benzilaminopurina) no escuro, em seguida passaram para o meio de seleção com o agente seletivo imazapyr, para regeneração dos embriões, o qual permaneceram durante 30 dias em sala de crescimento com temperatura controlada de 26°C, iluminação com fotofase de 16 horas/luz. Após o desenvolvimento da parte aérea das plantas, elas foram transferidas para meio de enraizamento contendo o hormônio IBA (do

inglês “Indole-3-butyric acid”), por fim, depois do enraizamento as plantas foram aclimatadas e levadas para casa de vegetação, onde permaneceram até a produção das sementes.

4.5 Confirmação da transgenia por análises de PCR

O método de reação em cadeia da polimerase (PCR) foi adotado para a confirmação da transgenia das plantas possivelmente transformadas. Os DNAs genômicos foram extraídos, segundo o protocolo adaptado de Doyle & Doyle (1987), das folhas das plantas controle (NT) e das plantas crescidas em meio seletivo com o objetivo de detectar a presença gene quimérico PG-PGIP. Dois pares de primers foram utilizados para detectar diferentes fragmentos do gene, o primeiro detecta um fragmento da parte de *Phaseolus vulgaris*, para um produto alvo de 653 pb, foram F: 5'-TGGTGGCATCAATAACCTCG-3', R: 5'-TGTTGGCATAAGCAGAAACG -3'. O segundo par de primers amplifica um fragmento pertencente a parte de *Fusarium phyllophilum*, para um produto alvo de 541 pb, foram F: 5'-CTGGGATGGCAAAGGTTCTA -3', R: 5'-GCTGATGTTGGTGAGAGCAA -3'. As reações de PCR foram realizadas utilizando um termociclador (Veriti, Applied Biosystems), com a mistura de reação consistindo em tampão Taq 1X, dNTPs 0,2 mM , MgCl₂ 2 mM, primer 0,4 µM, 100 ng de DNA (1 µL), Taq (1,5 U), ddH₂O em um volume final de 25 µL. As condições da primeira PCR foram as seguintes: desnaturação inicial (3 min, 94 °C) seguida por 35 ciclos de desnaturação (30 s, 94 °C), anelamento (30 s, 60 °C) e extensão (1 min, 72 °C), e uma extensão adicional a 72 °C por 5 min. Os produtos da PCR foram separados em gel de agarose a 1,0% e visualizados por coloração com (Sybr Safe DNA Gel Stain, Invitrogen) em um sistema de documentação de gel SmartView Pro 1100 Imager System, UVCI-1100 (MajorScience).

4.6 Detecção dos fragmentos e do número de cópias por Southern blot

Após a confirmação da transgenia por PCR, as plantas transgênicas crescidas em casa de vegetação tiveram DNA genômico extraído. Posteriormente, as análises de Southern foram realizadas conforme descrito anteriormente por (Vianna & Romano, 2015). Onde vinte

microgramas do DNA extraído de cada planta foram digeridos durante 12 horas com enzimas de restrição *ClaI*, que cliva o plasmídeo p35S PG-PGIP em um único sítio, e *HindIII*, que cliva em 9 sítios distintos, resultando em um fragmento grande de 4197 pb. O controle positivo consistiu em 100 pg do plasmídeo p35S PG-PGIP, digerido com a enzima *ClaI*. Os DNAs digeridos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 0,8% (p/v) e, em seguida, transferidos para membranas de nytran (Whatman Nytran SuperCharge TurboBlotter Kit, Cytiva), conforme descrito pelo fabricante. A sonda utilizada foi um amplicon de 541 pb de um fragmento do gene PG-PGIP, gerado por PCR a partir do vetor p35S PG-PGIP. A sonda purificada foi marcada com radioisótopo [³²P]. O procedimento de hibridização, começou com as membranas sendo incubadas durante a noite a 60 °C em um forno de hibridização com uma solução de pré-hibridização (SSc 5X, solução Denhardt 5X, DNA de esperma de salmão 10mg/ml), após esse período a sonda marcada radioativamente foi desnaturada por aquecimento e incubada junto com solução de pré-hibridização e posteriormente as membranas foram lavadas com três soluções diferentes: Solução de lavagem I (SSC 2X, SDS 0,1%); Solução de lavagem II (SSC 1X, SDS 0,1%) e Solução de lavagem III (SSC 0,1X, SDS 0,1%). As membranas hibridizadas foram expostas em um cassete com telas intensificadoras. Após 3 dias as autorradiografias foram visualizadas com um sistema FUJIFILM FLA 3000.

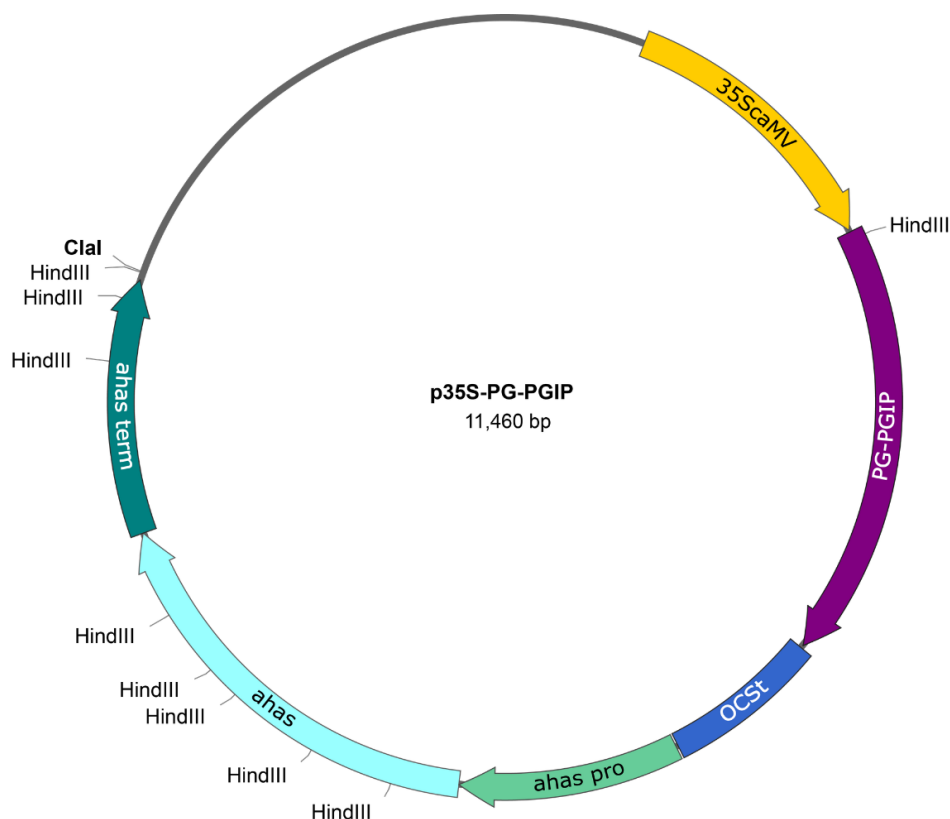


Figura 8 Representação esquemática do vetor p35S PG-PGIP com as indicações dos sítios de restrição para as enzimas *Clal* e *HindIII*

4.7 Detecção das vias de defesa ativadas por meio de análises de RT-qPCR

Amostras foliares de três plantas transgênicas e não transformadas infectadas por *Sclerotinia sclerotiorum* (72 horas pós infecção) e não infectadas foram moídas até virarem um pó fino em nitrogênio líquido. O RNA total foi extraído utilizando um kit RNeasy Mini (QIAGEN). Posteriormente, o RNA extraído, foi quantificado em Nanodrop e verificado em gel de agarose 1,5% (p/v) a fim de confirmar a integridade. A transcrição reversa foi realizada utilizando SuperScript IV reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific), segundo manual do fabricante empregando primers oligo(dT) para ancoragem na cauda poli(A) dos mRNAs. A RT-PCR quantitativa (RT-qPCR) foi realizada em um sistema QuantStudio 1 (Applied Biosystems), utilizando o mix SYBR Green dye-based master mixes for real-time PCR (Applied Biosystems), com ciclos de 95 °C por 30 s, 59 °C por 30 s e 72 °C por 30 s. O gene da ubiquitina (Glyma.20G141600, listada no banco de dados do genoma da soja Phytozome <https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) foi utilizada como padrão

interno para normalizar as concentrações de cDNA. Os níveis de transcritos normalizados pelo gene de referência ubiquitina foram avaliados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, conforme descrito por (Livak & Schmittgen, 2001). Os padrões de expressão de três genes marcadores da via do ácido salicílico da soja (*pr1* [Glyma13g32510], *gh3* [Glyma.17G165300] e *pal1* [Glyma03g33880]) e um gene marcador da via do ácido jasmônico (*hpl* [Glyma.12G191400]), Os primers de RT-qPCR utilizados foram: *pr1* F 3' ATGCTAATCAACGTAAAGGT 5' e *pr1* R 3' TTTCATCTGCATCTGTGCCAC 5'; *gh3* F 3' AGCTCGTGTACTCCACCACGCT 5' e *gh3* R 3' GTTCCACAACCTCCACCCCGCAG 5'; *pal1* F 3' GTGCAAGGGCGGCTTATG 5' e *pal1* R 3' CCCAGTCCCTAATTCCTCTC 5'; *hpl* F 3' TCGGATCGGCTTGACTAC 5' e *hpl* R 3' GAAGGAGGGAGGAACATTGG 5'.

4.8 Bioensaio de infecção contra *S. sclerotiorum* ex vivo

Para o bioensaio com folha destacada o fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (CMES 1795) foi cultivado em meio BDA (batata dextrose ágar) a 25°C até obter o crescimento micelial apropriado. Posteriormente, discos de 5mm de diâmetro do micélio desse fungo foram utilizados para inocular folhas destacadas de plantas transgênicas (PG-PGIP) e não transformadas (NT). Três folhas de soja (9 folíolos) de 5 plantas de cada genótipo foram inoculadas e mantidas sobre papel filtro umedecido a 25°C, o avanço do halo de infecção foi fotografado em três períodos distintos (24, 48 e 72 horas após a inoculação [hai]) e a áreas afetadas pelo fungo foram medidas com auxílio do software ImageJ, por fim as análises estatística foi feita pelo método ART ANOVA descrito por (Wobbrock et al., 2011), usada quando não há uma distribuição normal, seguida pelo teste post-hoc de Dunn ($p < 0,05$), que foi empregada para detectar as diferenças significativas entre as médias.

4.9 Bioensaio de infecção contra *S. sclerotiorum* in vivo

Para o bioensaio com a planta inteira, baseado no protocolo descrito por (Chen & Wang, 2005), 5 sementes de cada genótipo (PG-PGIP e NT) foram plantadas em uma mistura de substrato, terra vermelha e vermiculita (v/v/v 2:2:1) em vasos plásticos com volume de 5 litros. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação com temperaturas médias de 20 a

27°C com iluminação natural. O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (CMES 1795) foi cultivado em meio BDA (ágar batata dextrose) a 25°C até obter o crescimento micelial apropriado. Posteriormente, quando as plantas atingiram um tamanho médio de 40 cm após 5 semanas pós germinação das sementes, discos de 5mm de diâmetro do micélio do fungo foram utilizados para inocular 2 folíolos centrais de plantas transgênicas (PG-PGIP) e não transformadas (NT). O avanço do halo de infecção foi fotografado a cada 24 horas durante 14 dias e a medição das áreas afetadas pelo fungo foram medidas com auxílio do software ImageJ.

4.10 Sequenciamento pelo método Sanger

Os produtos amplificados por PCR, utilizando os primers F: 5'CCACTATCCTTCGCAAGAC 3' e R: 5' GTAGAGCGGACGGCCAATACTCAAC, que origina um amplicon esperado de 2.668 pb, abrangendo toda sequência do gene quimérico. As amostras geradas foram purificadas utilizando o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), seguindo as instruções do fabricante. Posteriormente, as amostras purificadas foram preparadas conforme as recomendações da empresa Macrogen, responsável pela realização do sequenciamento do tipo Sanger. As sequências finais foram comparadas com sequências controle (Sequência do PG-PGIP) por meio da ferramenta de alinhamento Cluster Omega, visando confirmar a identidade do fragmento amplificado.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização molecular das plantas transgênicas obtidas

Foram realizadas algumas análises para a confirmação da presença do gene quimérico nas plantas de soja. Primeiramente, as plantas obtidas por meio do sistema biobalístico foram selecionadas *in vitro* por análises de PCR com primers específicos para o transgene, tais plantas foram transferidas para casa de vegetação para a obtenção das sementes (T₁). As progênes do evento PG-PGIP 2.23 (T₂), PCR positivas, passaram por processo de hibridização conhecido como Southern blot na qual o DNA genômico obtido das folhas das plantas de soja foi digerido por duas enzimas de restrição *Cla*I e *Hind*III, de maneira separada, como resultado confirmou-se que as plantas (T₂) nomeadas de PG-PGIP 2.23 B e PG-PGIP 2.23 C são transgênicas, como é possível observar nas bandas que apareceram com a digestão com a enzima *Hind*III (Figura 9). Nota-se duas bandas quando digeridas com *Cla*I, isso nos mostra a presença de pelo menos duas cópias inseridas no genoma das plantas e em ambas as plantas na mesma altura, indicando que geneticamente são iguais (Figura 9).

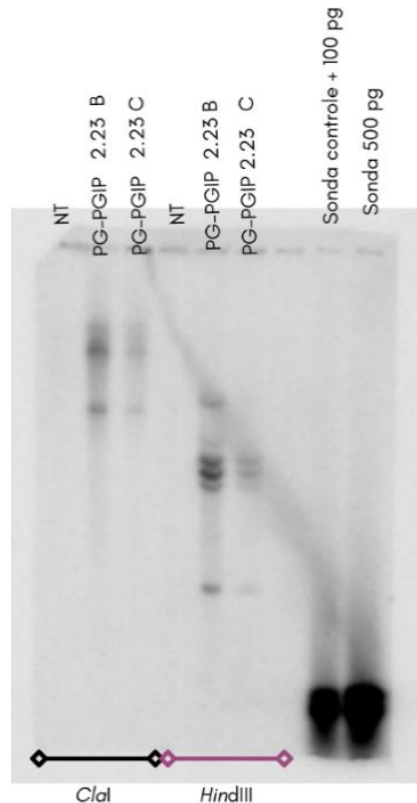


Figura 9 Southern blot para avaliação do número de cópias e confirmação da presença do transgene em plantas transgênicas PG-PGIP B e C (T₂) e em plantas controle não transformadas (NT). O DNA genômico foi digerido com as enzimas de restrição *Clal*, que possui apenas um sítio de restrição, usado com o intuito de determinar o número de cópias do transgene, e *HindIII* que possui nove sítios de restrição, utilizada como uma segunda abordagem para confirmar a integração do transgene no genoma da planta.

Para a realização de um bioensaio, 5 plantas T₃, PG-PGIP 2.23C (1 a 5), positivas por PCR também passaram pelo processo de hibridização, onde o DNA genômico extraído foi digerido pela enzima *Clal*, para verificar se houve uma segregação das cópias verificadas no Southern anterior (Figura 9). Podemos analisar que as 2 cópias observadas no primeiro Southern também estão igualmente presentes no segundo Southern (Figura 10), apesar de que no controle apareceu um rastro forte, provavelmente referente resquício de DNA que não foi removido corretamente nas lavagens, resultando em sondas ligadas de forma inespecífica ainda presente na membrana originando no rastro apresentado (Brown, 2001). Apesar disso, o Southern ainda revela que ambas as cópias estão co-segregando (Figura 10).

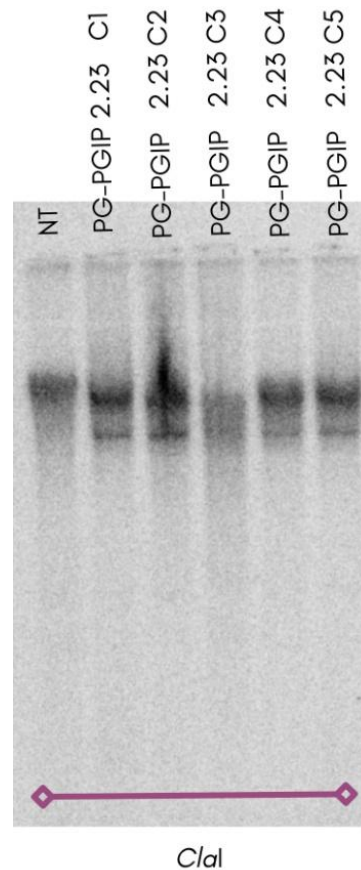


Figura 10 Southern blot para avaliação do número de cópias das plantas utilizadas no bioensaio. Plantas transgênicas PG-PGIP C1 a C5 (T₂) e planta controle não transformadas (NT) tiveram seus DNA genômicos digeridos com as enzimas de restrição *Clal*, que possui apenas um sítio de restrição, usado com o intuito de determinar o número de cópias do transgene.

Outros experimentos de biobalística foram realizadas a fim de obter mais plantas de soja transgênicas resultando em mais 5 eventos positivos tanto por PCR quanto por Southern blot (Figura 11). Ainda que 5 plantas tenham tido a confirmação de transgenia pelo Southern, para ambos os vetores sintetizados p35S PG-PGIP (identificados apenas como PG-PGIP) e pCH PG-PGIP, apenas um evento p35S PG-PGIP, o PG-PGIP 1.45, obteve sementes viáveis e que geraram plantas (T₂) positivas por PCR. Isso pode estar relacionado com as etapas de regeneração, principalmente as etapas rigorosas de seleção e exposição aos reguladores de crescimento vegetal, que geram grande estresse e podem induzir modulações genéticas e epigenéticas inesperadas causando um crescimento anômalo quando comparadas a plantas não transformadas, uma redução na fertilidade e/ou uma baixa produção de sementes (Krishna et al., 2016). Ou também, essa infertilidade possa estar relacionada com a integração de múltiplas copias no genoma e/ou o local de integração no genoma que podem ter acabado gerando tais alterações observadas no

desenvolvimento e na fertilidade das plantas transformadas (Schnell et al., 2014; Zalewski et al., 2012).

Ademais, ressalta-se que não foi possível dar continuidade às análises com as plantas transformadas contendo o vetor sob controle do promotor CH. A mortalidade das plantas obtidas, aliada à ausência de geração de progênes positivas para o transgene, comprometeu a manutenção das linhagens. As limitações de tempo inviabilizaram a realização de novas tentativas de experimentos de biobalística para a geração de novos eventos, restringindo, assim, a continuidade dos estudos com esse vetor.

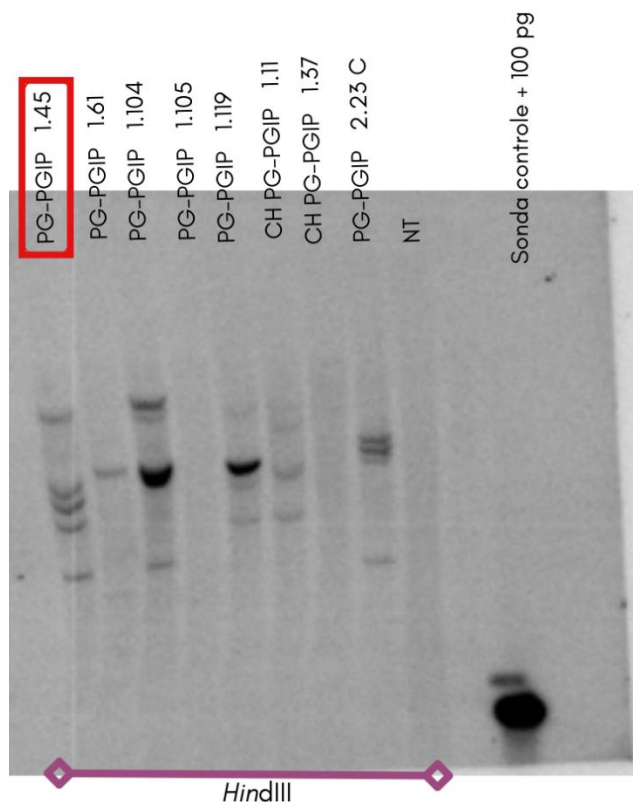


Figura 11 Southern blot para confirmação de integração do gene quimérico PG-PGIP no genoma de plantas de soja (*Glycine max*). Plantas PG-PGIP foram transformadas com o vetor plasmidial p35S PG-PGIP, já as plantas CH – PG-PGIP foram transformadas com o vetor plasmidial pCH PG-PGIP, a amostra em destaque, vermelho, indica a única planta que obteve sementes viáveis e que geraram plantas (T₂) positivas para o transgene.

Com o intuito de averiguar se havia uma expressão do transgene nas plantas transgênicas, o cDNA foi produzido, utilizando o RNA total extraído das plantas PG-PGIP, e análises de RT-PCR semi-quantitativa foi realizada. É possível observar que nas primeiras plantas

obtidas (Figura 12) a planta PG-PGIP 2.23 C apresentou uma maior expressão quando comparada a PG-PGIP 2.23 B, um padrão não esperado visto que ambas apresentaram duas bandas na mesma altura indicando que geneticamente elas seriam iguais.

Embora as plantas PG-PGIP 2.23 B e PG-PGIP 2.23 C tenham apresentado padrões de bandas idênticos no Southern blot (Figura 9), com duas bandas na mesma altura, indicando a presença de duas cópias na mesma região do genoma, a diferença significativa nos níveis de expressão do gene, indicam que apesar das similaridades não há garantia da equivalência funcional dessas inserções.

Estudos prévios já demonstraram que alguns eventos podem conter fragmentações internas, pequenas deleções ou inserções adicionais que não são detectáveis por Southern blot, e tais diferenças podem afetar diretamente na atividade transcricional do gene introduzido (Siddique et al., 2019). Complementarmente, já foi relatado previamente que plantas transgênicas derivadas de um mesmo evento T₁ podem apresentar variações nos níveis de expressão gênica, mesmo quando compartilham o mesmo número de cópias do transgene, em função de efeitos epigenéticos, segregação e variações na regulação do locus de inserção, além das questões ambientais, que apesar de serem similares, mínimas alterações podem influenciar os níveis de expressão do transgene na planta (Day et al., 2000; Nocarova & Fischer, 2009; Yin & Malepszy, 2003).

Por outro lado, as plantas PG-PGIP 1.45 (T₂) demonstraram que a expressão do gene é diferente em cada uma das irmãs (Figura 13), a planta A expressa apenas a parte de *Phaseolus* gene quimérico, as plantas B e D expressão ambas as partes do gene quimérico e a planta C expressa apenas a região de *Fusarium*. Uma possível explicação para esse padrão é a ocorrência de segregação do transgene, considerando que a planta 1.45 possa conter mais de uma cópia inserida no genoma. Nesse contexto, essas cópias podem não estar co-segregando, resultando em diferentes combinações nos descendentes e, conseqüentemente, em variações nos perfis de expressão gênica (Prohens et al., 2022; Tizaoui & Kchouk, 2012).

A detecção da expressão do transgene ocorreu mesmo sem antes ter a inoculação do patógeno e sem nenhum outro estímulo. Isso se deve ao promotor utilizado na construção genética. O promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (35SCaMV), amplamente reconhecido por ser um promotor constitutivo forte, capaz de induzir a expressão contínua de transgenes em diversos tecidos e estágios de desenvolvimento das plantas,

independentemente de estímulos externos ou estresses bióticos (Amack & Antunes, 2020; Benfey & Chua, 1990; Odell et al., 1985). Dessa forma, a presença de transcritos detectados pelo RT-PCR semiquantitativo nas plantas analisadas antes da infecção é compatível com o padrão esperado para construções reguladas por esse promotor. Em contrapartida, se o transgene estivesse sob o controle de um promotor induzível associado a genes de defesa, como os promotores de quitinases (CH) da própria soja, a expressão tenderia a ser ativada apenas após a percepção do patógeno ou de sinais associados à resposta de defesa da planta. Promotores desse tipo são frequentemente ativados por interações planta-patógeno e participam da regulação de genes relacionados à resposta de defesa, apresentando baixa ou nenhuma expressão basal na ausência do estímulo (Grover, 2012; Kasprzewska, 2003; Vaghela et al., 2022). Assim, o padrão de expressão observado neste estudo é consistente com o uso de um promotor constitutivo, reforçando que a atividade transcricional do transgene é independente do processo de infecção e ocorre de maneira basal nas plantas transformadas.

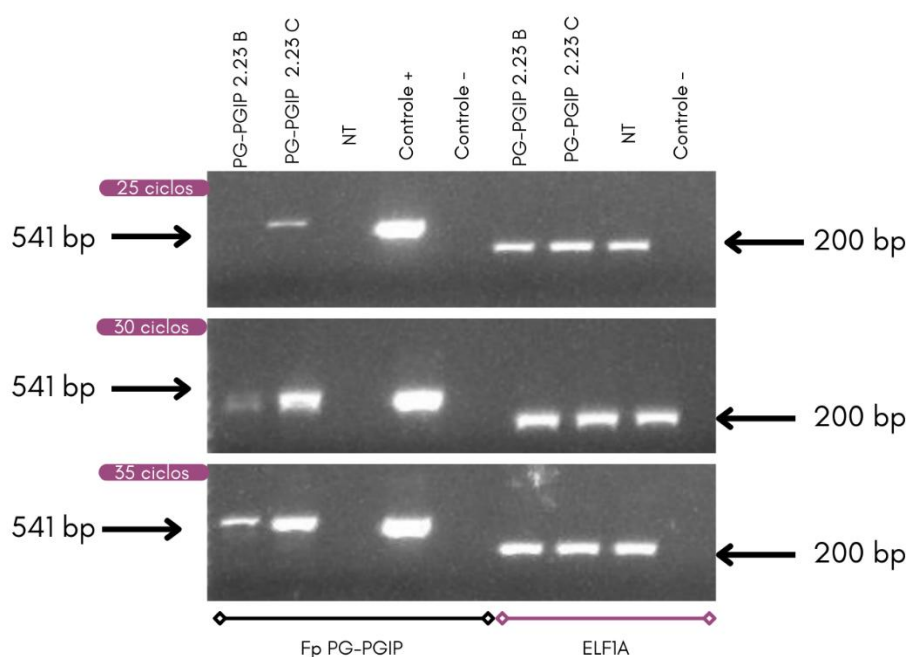


Figura 12 RT-PCR semi-quantitativa para avaliação da expressão do gene sintético PG-PGIP em plantas transgênicas 2.23 e plantas não transformadas (NT). A amplificação foi realizada utilizando primers desenhados especificamente para a região alvo de *Fusarium phyllophilum*, enquanto o gene constitutivo *elf1a* foi empregado como controle interno para normalização e comparação dos níveis relativos de expressão gênica. É possível observar que a planta PG-PGIP C apresentou o maior nível de expressão quando comparada a PG-PGIP B.

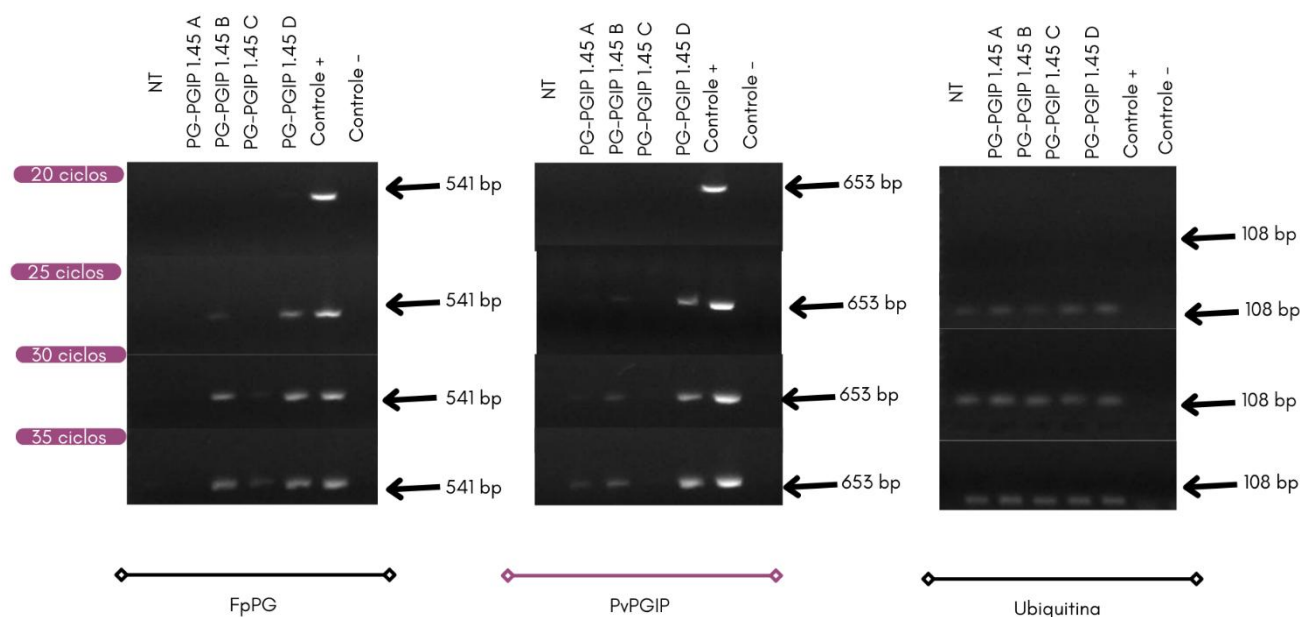


Figura 13 RT-PCR semi-quantitativa para avaliação da expressão do gene sintético PG-PGIP em plantas transgênicas 1.45 e planta não transformada (NT). A amplificação foi realizada utilizando primers desenhados especificamente para as regiões alvo tanto de *Fusarium phylophilum* quanto de *Phaseolus vulgaris*, enquanto o gene constitutivo ubiquitina foi empregado como controle interno para normalização e comparação dos níveis relativos de expressão gênica. É possível observar que todas as quatro plantas analisadas PG-PGIP 1.45 A à D apresentaram níveis de expressão diferentes para ambas as regiões alvo.

O padrão irregular de expressão do transgene nas plantas 1.45 nos incentivou a fazer um mapeamento do vetor presente em cada planta para verificar se o plasmídeo durante a transformação foi inserido de forma completa no genoma da planta (Figuras 15 e 16). O mapeamento feito por PCR nas plantas PG-PGIP 2.23 B e C (Figura 15), onde em todas as análises de PCR apresentaram bandas nos tamanhos esperados, ressaltando a inserção completa do plasmídeo no genoma dessas plantas. Porém, as plantas PG-PGIP 1.45 (A, B, C e D) (Figura 16) demonstrou que possivelmente há uma parte do vetor faltando, isso fica evidente quando se observa a região amplificada pelos primers 35S F1 e OCSt R (Figura 16A), que amplifica uma região que abrange desde a região do promotor (35SCaMV) até a região do terminador (OCSt - terminador da octopina sintase), mostrando uma diferença de altura na banda de certa forma inesperada pois ao invés de apresentar um amplicon de 2668 pb, como era previsto, apareceu um amplicon de aproximadamente 2000 pb, indicando que possivelmente a integração do plasmídeo no genoma não ocorreu de forma integra sugerindo um possível truncamento da sequência inserida ou rearranjos estruturais no sítio de integração, apesar de todas as outras regiões analisadas tenham exibido bandas nos tamanhos aguardados.

Alguns estudos que realizaram o sequenciamento de plantas transgênicas demonstraram que certos métodos de transformação genética de plantas podem resultar em inserções truncadas, fragmentos parciais ou apresentar pequenas porções do transgene integradas isoladamente no genoma da planta, como é o caso de integrações de T-DNA mediadas por *Agrobacterium tumefaciens*, mostrando que nem sempre o DNA exógeno preserva a estrutura original do vetor (Schouten et al., 2017). Esse não foi um fato isolado, de uma forma semelhante, outros artigos científicos analisaram o sequenciamento do genoma completo de plantas transgênicas e foram revelados rearranjos e inserções inesperadas nas extremidades do T-DNA, indicando que processos integrações ocorrem reorganizações estruturais (Wang et al., 2020). No entanto, tal comportamento não é exclusivo de T-DNA, transformações por biobalística já foram associadas com fragmentação do DNA introduzido e até rearranjos e deleções próximos ao sítio de inserção (J. Liu et al., 2019).

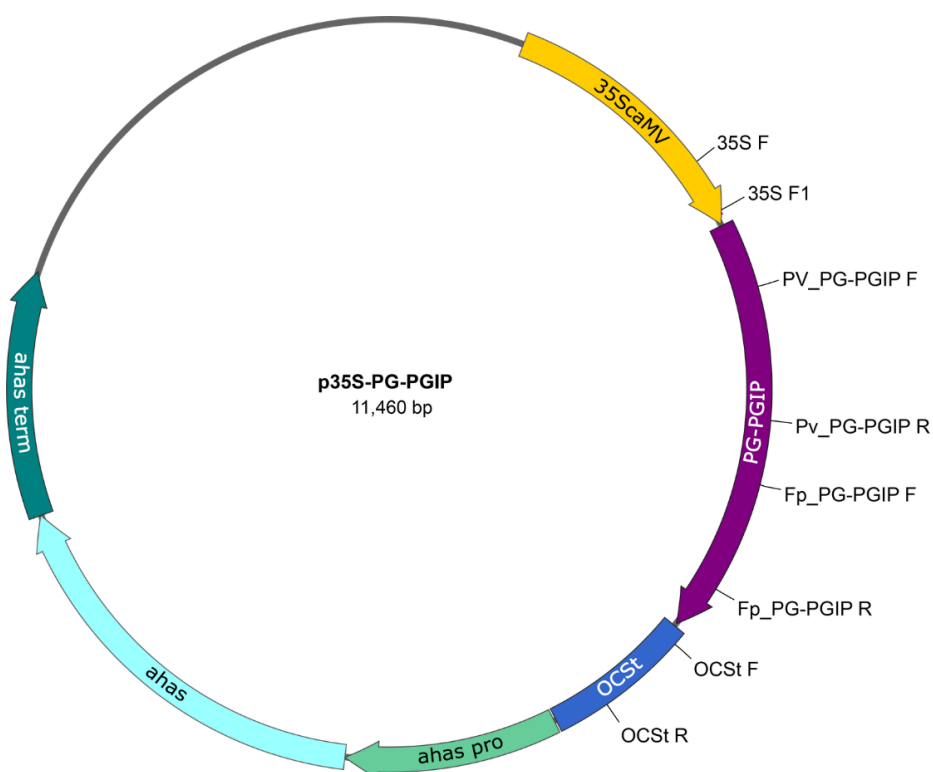


Figura 14 Representação esquemática do vetor p35S PG-PGIP com as indicações dos locais de anelamento dos primers utilizados para o mapeamento do plasmídeo integrado nos genomas das plantas PG-PGIP 2.23 e PG-PGIP 1.45.

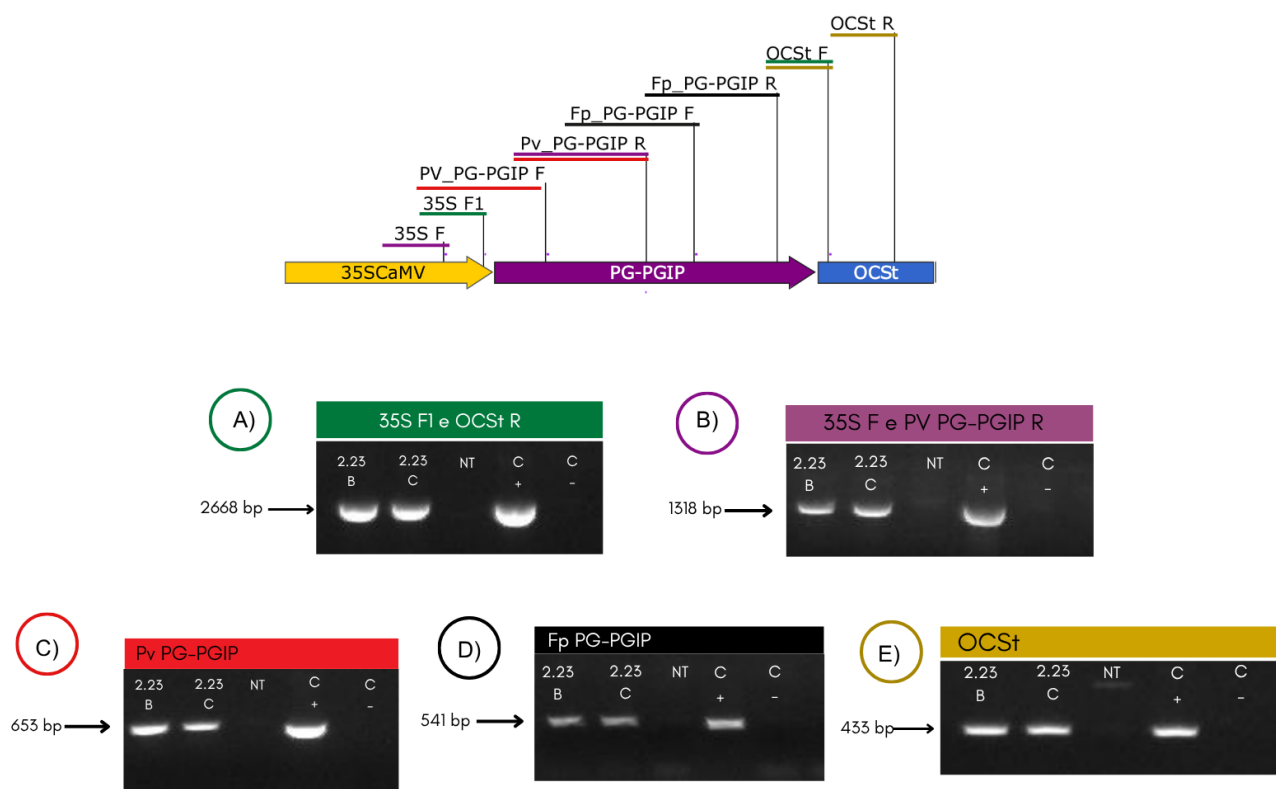


Figura 15 Mapeamento do vetor integrado no genoma das plantas PG-PGIP 2.23. Na parte superior a representação esquemática ilustrando a construção do vetor PG-PGIP, destacando o promotor 35SCaMV, o gene quimérico PG-PGIP e o terminador OCSt, bem como as regiões de anelamento dos diferentes pares de primers utilizados para amplificação das regiões específicas analisadas. (A) Amplicon da região que abrange a região final do promotor 35SCaMV até o início do terminador OCSt; (B) Amplicon da região inicial do fragmento da PGIP de *Phaseolus vulgaris*; (C) Amplicon da região central do fragmento da PGIP de *Phaseolus vulgaris*; (D) Amplicon da região central do fragmento da PG de *Fusarium phyllophilum*; (E) Amplicon da região inicial do terminador OCSt.

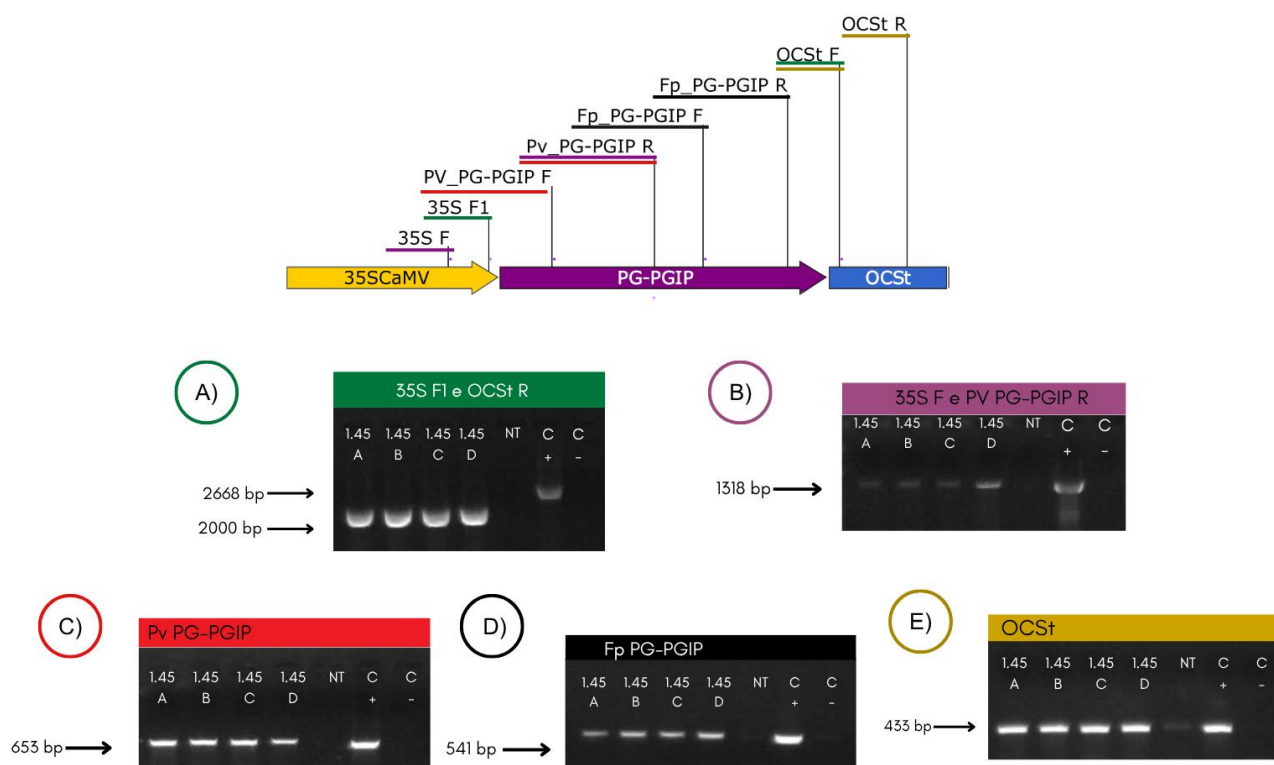


Figura 16 Mapeamento do vetor integrado no genoma das plantas PG-PGIP 1.45. Na parte superior a representação esquemática ilustrando a construção do vetor PG-PGIP, destacando o promotor 35SCaMV, o gene quimérico PG-PGIP e o terminador OCSt, bem como as regiões de anelamento dos diferentes pares de primers utilizados para amplificação das regiões específicas analisadas. (A) Amplicon da região que abrange a região final do promotor 35SCaMV até o início do terminador OCSt, amplicons com divergências de tamanho de bandas, as plantas PG-PGIP 1.45 apresentaram bandas menores, em torno de 2000 pb, em relação ao tamanho esperado de 2668 pb; (B) Amplicon da região inicial do fragmento da PGIP de *Phaseolus vulgaris*; (C) Amplicon da região central do fragmento da PGIP de *Phaseolus vulgaris*; (D) Amplicon da região central do fragmento da PG de *Fusarium phyllophilum*; (E) Amplicon da região inicial do terminador OCSt.

Com o intuito de detectar possíveis alterações no processo de integração do transgene no genoma das plantas transgênicas foi realizado o sequenciamento do amplicon que abrange desde a sequência do promotor até o terminador. O sequenciamento, pelo método de Sanger, feito pela empresa MacroGen, resultou em cromatogramas com picos bem definidos e baixo nível de ruído na maior parte da região analisada. Embora o fragmento amplificado apresentasse um tamanho superior ao trecho efetivamente sequenciado, foi possível uma leitura confiável de aproximadamente 1000 pb. O alinhamento das sequências obtidas no sequenciamento comparado com a sequência referência revelou a presença de deleções e alterações de base em uma quantidade considerável em todas as plantas PG-PGIP 1.45 (A a D) (Figura 20).

B)

Posição PLANTA	1 - 520 bp	520 - 615 bp	615 - 641bp	641 - 788bp	788 - 814 bp	814 - 967bp
Vetor plasmidial	PGIP	PGIP	—	PGIP	—	PGIP
PG-PGIP 2.23 C	✓	✓	—	✓	—	✓
PG-PGIP 1.45 A	✓	✗	✗	✗	✗	✗
PG-PGIP 1.45 B	✓	✗	✗	✗	✗	✗
PG-PGIP 1.45 C	✓	✗	✗	✗	✗	✗
PG-PGIP 1.45 D	✓	✗	✗	✗	✗	✗

 Regiões de anelamento dos primers Pv PG-PGIP

 Legenda:
 ✓ Regiões compatíveis com o vetor construído
 ✗ Regiões incompatíveis com o vetor construído

Figura 17 Alinhamento múltiplo das sequências nucleotídicas obtidas por sequenciamento Sanger dos eventos transgênicos PG-PGIP 1.45 A a D e PG-PGIP 2.23 C comparadas com sequência referência, o vetor PG-PGIP. (A) Regiões coloridas indicam divergências de nucleotídeos entre as sequências e as lacunas indicam deleções ou inserções. Observa-se deleções e variações em diversas regiões nas plantas PG-PGIP 1.45, evidenciando modificações estruturais significativas nessas plantas. (B) Quadro-resumo das regiões do fragmento de PGIP derivado de *Phaseolus vulgaris*, indicando segmentos compatíveis e incompatíveis com a sequência do vetor construído. As regiões incompatíveis correspondem a inserções, deleções e substituições de bases nitrogenadas.

Mesmo com a limitação de cobertura do fragmento amplificado, as detecções de alterações nas plantas transformadas são relevantes, pois sustenta as suspeitas de que o gene integrou de forma incompleta no genoma dessas plantas, podendo gerar uma proteína defeituosa que as deixou mais susceptíveis ao fungo *S. sclerotiorum*. Na literatura há relatos que o processo de transformação genética, incluindo a biobalística pode gerar eventos com inserções de gene exóticos não planejados, incluindo inserções, deleções e mutações de porções do DNA (Anderson et al., 2016; Latham et al., 2006; Schouten et al., 2017). Muitos autores enfatizam que a integração do DNA exógeno envolve mecanismo de reparo de quebra de fita dupla, processo que pode ocasionar recombinação ilegítima, além disso processos físicos como de bombardeamento podem fragmentar o DNA, favorecendo integrações incompletas ou reorganizadas, resultando em alterações na sequência originalmente planejadas (Latham et al., 2006; Svitashhev et al., 2002).

5.2 PG-PGIP aumenta a resistência à infecção por *S. sclerotiorum*

A funcionalidade do gene quimérico contra o fungo hemibiotrófico *S. sclerotiorum* foi avaliado primordialmente em um ensaio de patogenicidade *ex vivo*, com folhas destacadas. Para isso três trifólios de cinco plantas de soja transgênicas (PG-PGIP 2.23 C1 à C5) e de cinco plantas não transformadas (NT) foram inoculadas com plugues do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* por um período total de 72 horas após a infecção (hai). Durante o tratamento de infecção, fotografias foram tiradas a cada 24 horas após a inoculação (hai) e as áreas relativas à infecção das folhas infectadas foram analisadas com o auxílio do software ImageJ (Figura 18). Diferenças no desenvolvimento da doença entre os genótipos foram observadas a partir de 24 hai, onde as plantas transgênicas apresentaram lesões menores que as NT nos pontos de tempo analisados (Figura 19). A partir das 48 hai o desenvolvimento das manchas necróticas estavam bem desenvolvidas nas plantas selvagens enquanto um desenvolvimento similar apareceu nas plantas PG-PGIP 2.23 apenas em 72 hai. Em todos os 3 tempos analisados (24, 48 e 72 hai) as plantas PG-PGIP 2.23 apresentaram uma menor progressão da área de lesão (Figura 19), enquanto o NT mostrou um aumento mais acentuado e uma maior variabilidade da lesão. Verificou-se que as áreas de lesão nas folhas transgênicas foram significativamente menores em comparação com as folhas NT usando ART ANOVA seguida pelo teste de Dunn ($p \leq 0,05$). Esses resultados revelam um aumento progressivo da lesão ao longo do tempo, especialmente no grupo NT, que apresenta maiores medianas e maior variabilidade em comparação ao grupo PG-PGIP 2.23, aproximadamente 50% de redução. Esses resultados apontam que a expressão de PG-PGIP tem um efeito significativo na redução das lesões de *S. sclerotiorum*.

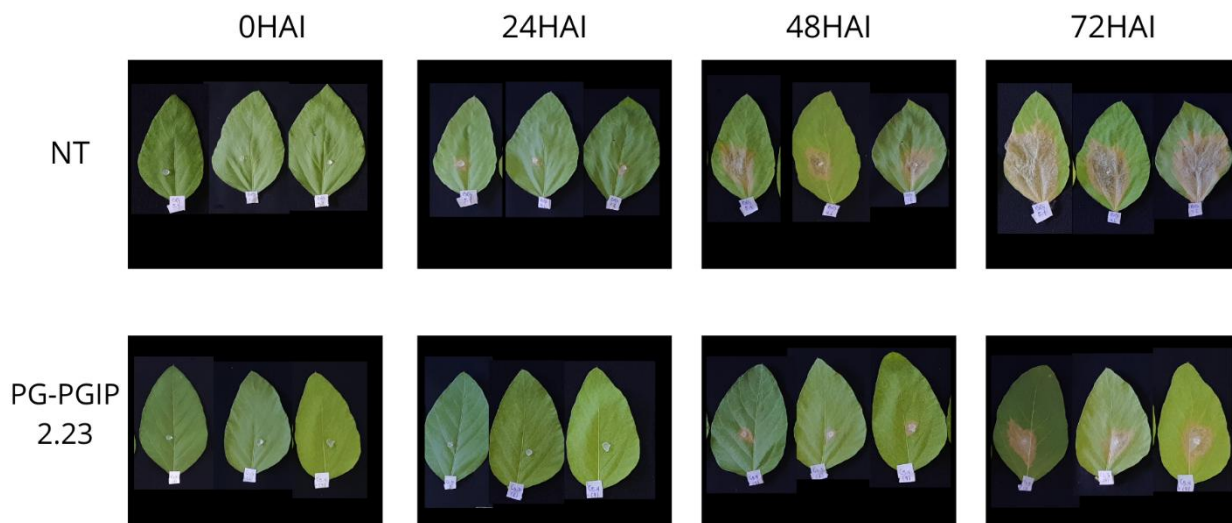


Figura 18 Fotografias para análise do experimento *ex vivo* do estresse biótico de plantas de soja transgênicas PG-PGIP 2.23 em resposta a *Sclerotinia sclerotiorum*. Observação do fenótipo das folhas transgênicas (PG-PGIP 2.23) e não transgênicas (NT) infectadas; 0HAI momento de primeiro contato do micélio fúngico com as folhas; 72HAI marcando o fim do experimento.

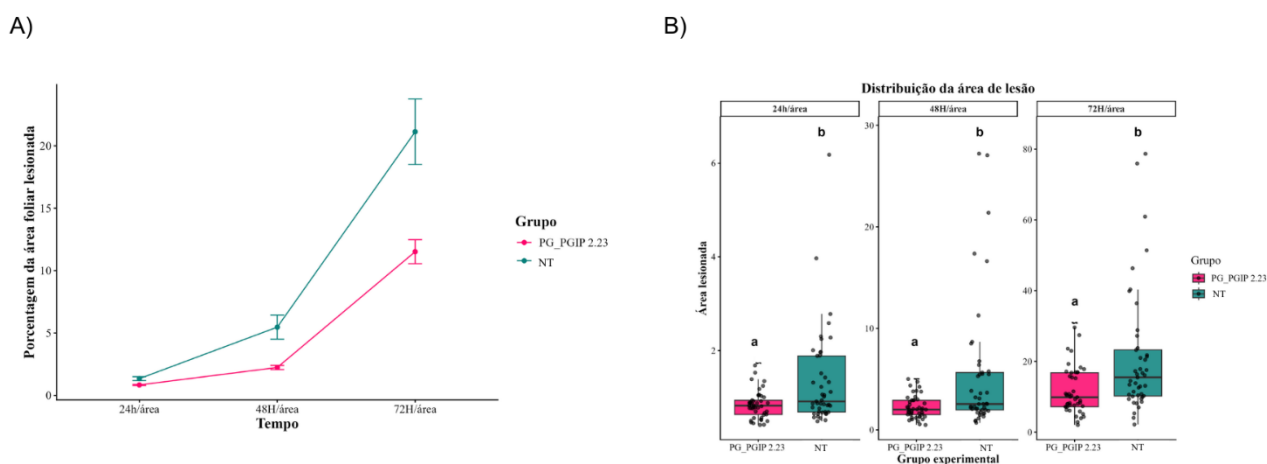


Figura 19 Progressão da área foliar lesionada em plantas transgênicas PG-PGIP 2.23 e não transformadas NT após inoculação com o fungo hemibiotrófico *S. sclerotiorum*. (A) Gráfico de linhas mostrando a porcentagem média da área foliar lesionada ao longo do tempo (24, 48 e 72 horas após a infecção), com barras de erro representando o erro padrão; (B) Distribuição da área lesionada ao longo do tempo, apresentada na forma de boxplot (mediana, interquartil e valores individuais). Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os grupos no mesmo tempo experimental ($p < 0,05$).

Com o intuito de reforçar a hipótese de que o gene sintético pode ter um efeito positivo na indução da resistência contra patógenos fúngicos, um segundo experimento com plantas transgênicas PG-PGIP 2.23 foi realizado. Dessa vez, a finalidade era avaliar o efeito do transgene na planta como um todo, para isso, foi realizado um bioensaio *in vivo* (Figura 20)

na qual plugues de meio BDA com micélio de *S. sclerotiorum* foram inoculados em dois folíolos centrais de nove plantas transgênicas (PG-PGIP 2.23 C5) e nove plantas controle (NT). A progressão da infecção foi fotografada a cada vinte e quatro horas durante 14 dias consecutivos e o halo de infecção foi medido com auxílio do software ImageJ. O resultado preliminar mostra que nos primeiros dias após a infecção (Dia 1-3), ambos os grupos, controle (NT) e alvo (PG-PGIP 2.23), apresentaram lesões semelhantes, a partir do dia 4 começa a surgir uma diferença maior entre os grupos, porém, nos dias finais (Dia 10-14) que a diferença ficou mais clara, nesses dias o grupo controle apresentou um aumento da área lesionada e mostrou maior variabilidade, já o grupo modificado geneticamente manteve valores mais baixos. Observa-se que, embora os grupos sejam semelhantes nos estágios iniciais, o NT apresentou um aumento progressivo e maior variabilidade da lesão nos dias finais, enquanto o PG-PGIP 2.23 manteve valores consistentemente menores (Figura 21), sendo mais um indicativo que o gene sintético PG-PGIP pode aumentar a resistência a infecção fúngica.

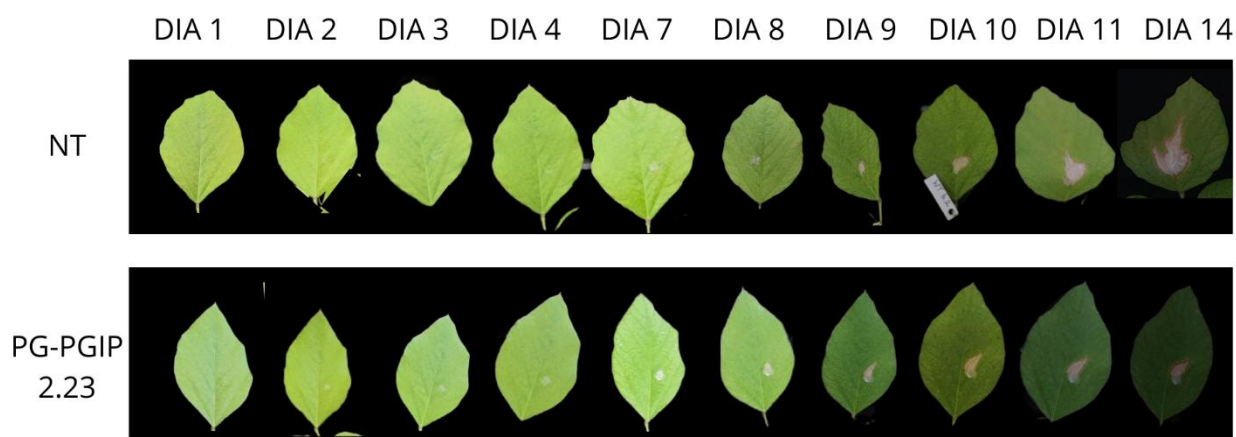
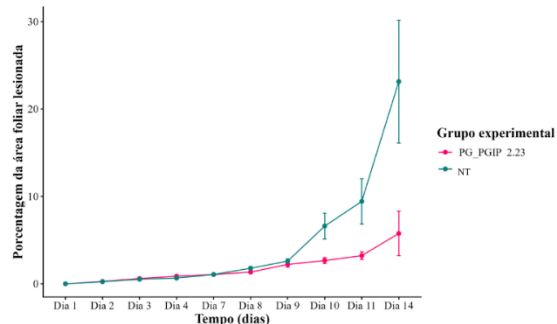


Figura 20 Fotografias para análise do experimento *in vivo* do estresse biótico de plantas de soja transgênicas PG-PGIP 2.23 em resposta a *Sclerotinia sclerotiorum*. Observação do fenótipo das folhas transgênicas (PG-PGIP 2.23) e não transformadas (NT) infectadas; Dia 1 indicando o momento do primeiro contato do micélio fúngico com as folhas de soja; Dia 14 marcando o fim do experimento.

A)



B)

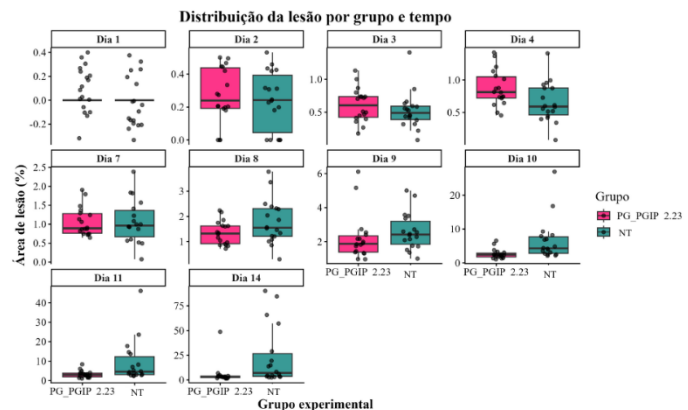


Figura 21 Progressão da área foliar lesionada em plantas transgênicas (PG-PGIP 2.23) e não transformadas (NT) após inoculação com o fungo hemibiotrófico *S. sclerotiorum*. (A) Gráfico de linhas mostrando a porcentagem média da área foliar lesionada ao longo do tempo, dia 1 ao dia 14, com barras de erro representando o erro padrão; (B) Distribuição da área lesionada ao longo do tempo, apresentada na forma de boxplot (mediana, interquartil e valores individuais).

Em um segundo ensaio de patogenicidade *ex vivo*, com o intuito de avaliar o efeito do gene quimérico em um segundo evento transgênico, PG-PGIP 1.45 (Figura 22). O ensaio foi realizado nos mesmos moldes do bioensaio *ex vivo* anterior (Figura 18 e 19), onde três trifólios de quatro plantas de soja transgênicas (PG-PGIP 1.45) e de quatro plantas não transformada (NT) foram inoculadas com *S. sclerotiorum*. No entanto, de forma inesperada o resultado obtido (Figura 23) foi o contrário do experimento com PG-PGIP 2.23 (Figura 19 e 21), pois as diferenças observadas entre os genótipos mostraram que as plantas NT apresentaram lesões menores que as transgênicas (Figura 23A). A diferença entre o grupo transgênico e o controle já foram discrepantes a partir das 24 h pois PG-PGIP 1.45 apresentava lesões maiores que as NT, essa diferença nos tamanhos das lesões se manteve em todos os outros pontos averiguados. Os dados nos mostram que a maior progressão da doença nas folhas transgênicas em comparação ao controle foi significativa (Figura 23B). Além disso, esses resultados ainda reforçam a hipótese que esse evento possa ter integrado de forma incompleta no genoma da planta resultando em uma proteína defeituosa ocasionando nessa piora na resposta de defesa.

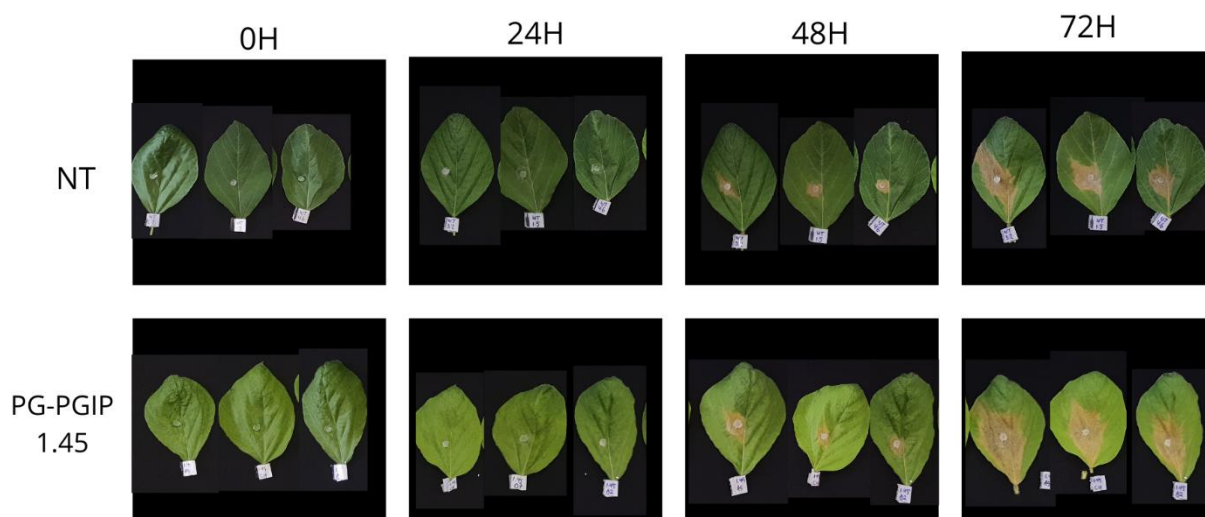


Figura 22 Fotografias para análise do experimento *ex vivo* do estresse biótico de plantas de soja transgênicas PG-PGIP 1.45 em resposta a *Sclerotinia sclerotiorum*. Observação do fenótipo das folhas transgênicas (PG-PGIP 1.45) e não transformadas (NT) infectadas; 0H= momento de primeiro contato do micélio fúngico com as folhas; 72H= marcando o fim do experimento.

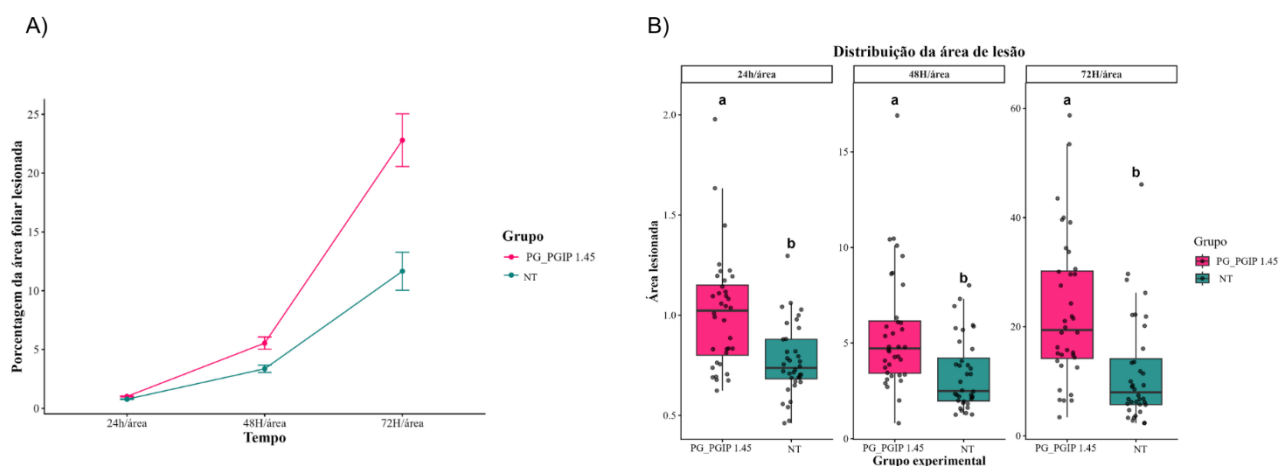


Figura 23 Progressão da área foliar lesionada em plantas transgênicas (PG-PGIP 1.45) e não transformada (NT) após inoculação com o fungo hemibiotrófico *S. sclerotiorum*. (A) Gráfico de linhas mostrando a porcentagem média da área foliar lesionada ao longo do tempo (24, 48 e 72 horas após a infecção), com barras de erro representando o erro padrão; (B) Distribuição da área lesionada ao longo do tempo, apresentada na forma de boxplot (mediana, interquartil e valores individuais). Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os grupos no mesmo tempo experimental ($p < 0,05$).

5.3 Análise da expressão de genes relacionados à defesa.

Para investigar se a expressão do gene PG-PGIP alterou a dinâmica transcricional das vias hormonais de sinalização de defesa a ataque de patógenos, via do ácido salicílico (AS) e

via do ácido jasmônico (AJ), foram analisados os níveis de expressão de genes marcadores por meio de RT-qPCR. As análises foram feitas em três plantas de duas linhagens diferentes (PG-PGIP 2.23 e PG-PGIP 1.45) comparando-as com a não transformada (NT) em dois momentos diferentes (0H e 72H após a infecção por *S. sclerotiorum*). Para isso, foram selecionados quatro genes marcadores que são modulados em resposta ao estresse, são eles: o gene codificador da fenilalanina amônia-liase 1 (*pal1*), sintetase de acil-ácido amido Gretchen Hagen 3 (*gh3*) e proteína relacionada a patogênese 1 (*pr1*) referentes a via do ácido salicílico e o gene hidróperóxido liase (*hpl*) relacionado a via do ácido jasmônico. A análise preliminar dos RT-qPCRs mostrou que as plantas PG-PGIP 2.23 obtiveram uma diminuição da via do ácido jasmônico e um maior ativação de ambas as vias do ácido salicílico, a via ICS e a via PAL (Figura 24). Já as plantas PG-PGIP 1.45 mostraram uma ligeira ativação das vias do AS, no entanto, similar a resposta da NT e não foi observado uma diminuição da via do AJ como era esperado (Figura 25).

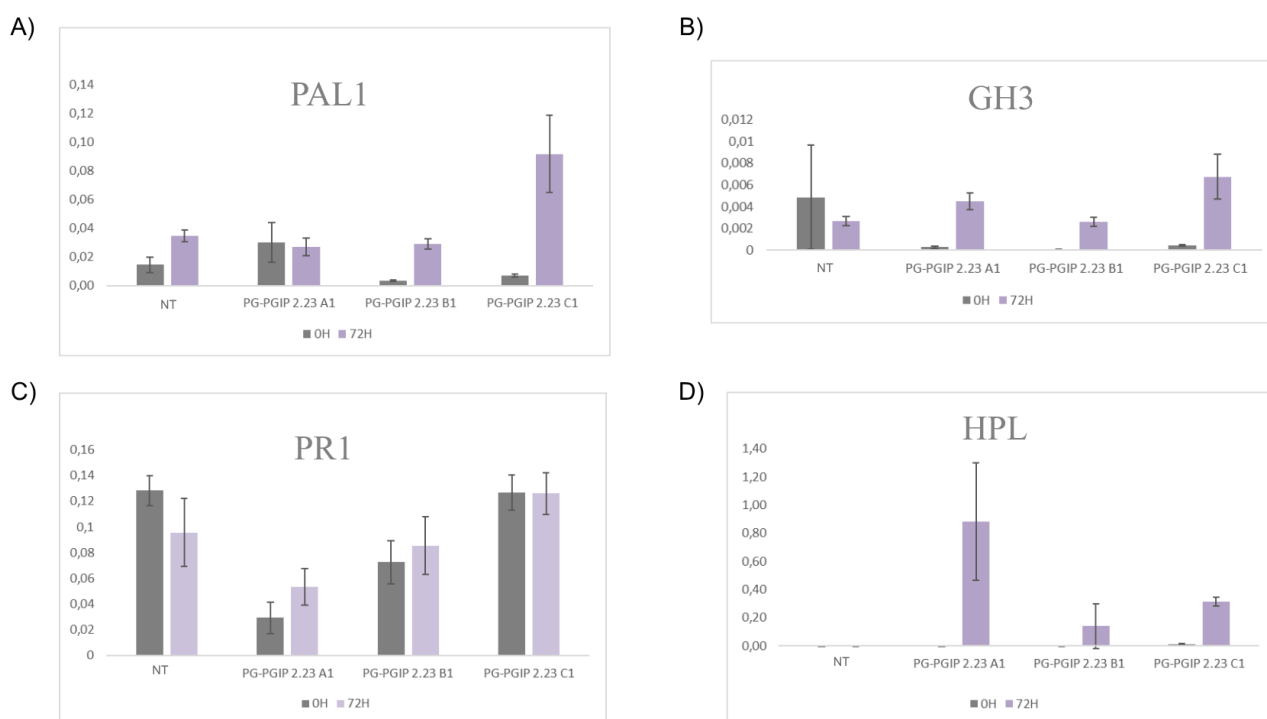


Figura 24 Expressão relativa de genes da via do ácido salicílico (AS) e da via do ácido jasmônico (AJ) em plantas NT e plantas transgênicas PG-PGIP 2.23 (A1, B1 e C1) nos tempos 0 h e 72 h, determinada por RT-qPCR. Os níveis de transcritos foram normalizados pelo gene de referência ubiquitina e calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Os valores representam média $\pm$ desvio padrão. (A) Expressão relativa de *pal1*, gene associado a biossíntese de ácido salicílico (AS) pela via da PAL; (B) Expressão relativa de *gh3*, gene responsivo e induzido por AS; (C) Expressão relativa de *pr1*, marcador da sinalização de AS, associado à via de biossíntese dependente de ICS; (D) Expressão relativa de *hpl*, gene envolvido na via do ácido jasmônico (AJ), competidor por substrato comum da via das oxilipinas.

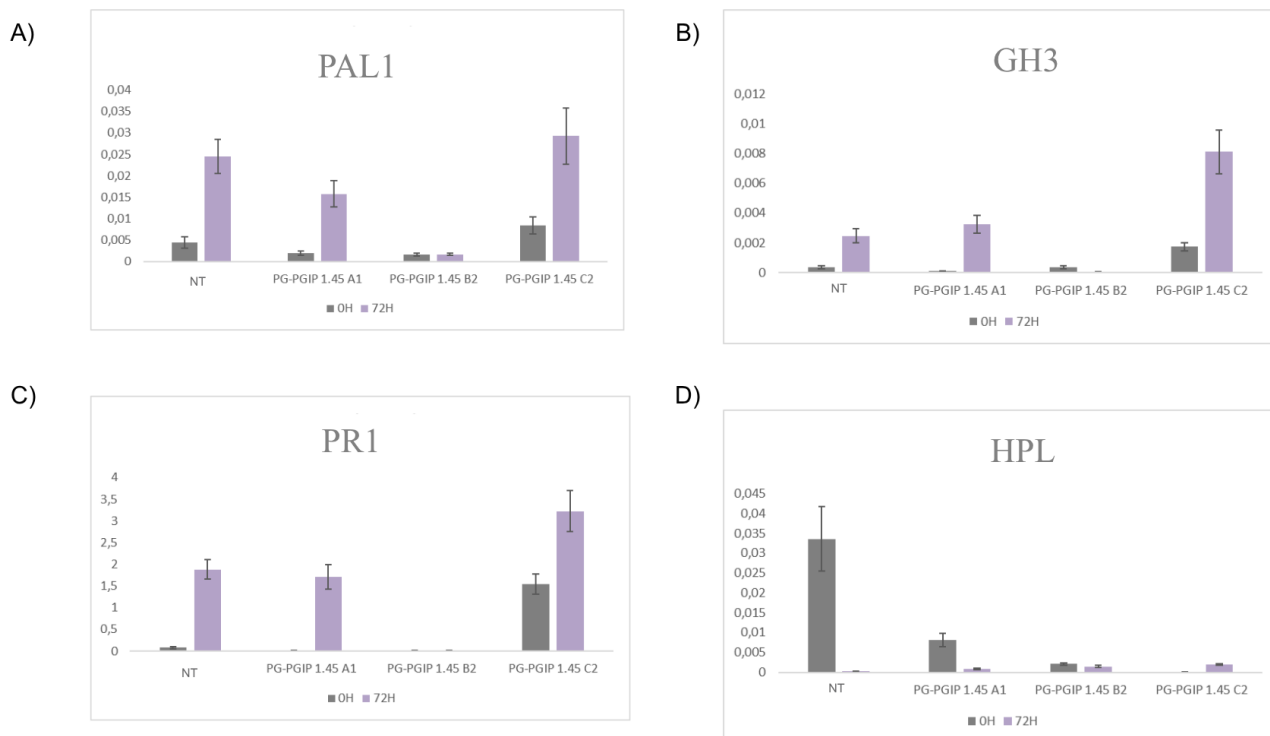


Figura 25 Expressão relativa de genes da via do ácido salicílico (AS) e da via do ácido jasmônico (AJ) em plantas NT e plantas transgênicas PG-PGIP 1.45 (A1, B2 e C2) nos tempos 0 h e 72 h, determinada por RT-qPCR. Os níveis de transcritos foram normalizados pelo gene de referência ubiquitina e calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Os valores representam média $\pm$ desvio padrão. (A) Expressão relativa de *pal1*, gene associado a biossíntese de ácido salicílico (AS) pela via da PAL; (B) Expressão relativa de *gh3*, gene responsivo e induzido por AS; (C) Expressão relativa de *pr1*, marcador da sinalização de AS, associado à via de biossíntese dependente de ICS; (D) Expressão relativa de *hpl*, gene envolvido na via do ácido jasmônico (AJ), competidor por substrato comum da via das oxilipinas.

Para o evento transgênico PG-PGIP 2.23, duas plantas geneticamente modificadas, PG-PGIP 2.23 B1 e PG-PGIP 2.23 C1, mostraram que a gene *pal1* (Figura 24A) antes da infecção por *S. sclerotiorum* não estava ativada, porém 72 horas após a infecção houve uma expressão considerável do marcador da via PAL, já as plantas NT e a PG-PGIP 2.23 A1 já apresentavam uma certa expressão do gene *pal1* não mostraram uma variação de expressão após 72 hai. Ao observarmos o marcador da via do ICS o *gh3* (Figura 24B), as três plantas transgênicas (PG-PGIP 2.23 A1 à C1) quando não infectadas não apresentaram uma expressão significativa desse marcador, porém após 72 hai mostrou um aumento considerável da expressão, ao contrário da NT que antes da infecção já mostrava uma ativação dessa via, porém após 72 hai não houve um aumento relevante. Já a expressão do *hpl*, um competidor direto de substrato da via do AJ mostrou que após a infecção por *S. sclerotiorum* teve um aumento da expressão 72 hai indicando que a via do

AJ está sendo suprimida, ao contrário da NT que não foi detectável a expressão desse marcador. A grande questão refere-se à expressão do gene *pr1*, uma vez que todas as plantas já apresentavam níveis consideráveis de expressão em 0 hai, não sendo observada alteração significativa entre 0 e 72 hai.

Estudos anteriores já demonstraram que genes *pal*, são induzidos sob estresse biótico e contribuem para a resistência, relacionada ao aumento de metabólitos da via da fenilpropanoide, associada a respostas como lignificação, produção de compostos fenólicos e biossíntese de fitoalexinas (Ranjan et al., 2019; X. Yang et al., 2024). Além de ser apontada como contribuinte da produção de AS, envolvendo a conversão de fenilalanina em ácido cinâmico, seguido por β -oxidação e formação de benzoil-CoA, um precursor de AS (Dempsey et al., 2011; Ma et al., 2025). Com base nisso, infere-se que o aumento da expressão de *pal1* nas plantas PG-PGIP 2.23 B1 e PG-PGIP 2.23 C1 possa ser um indicativo de uma ativação da via fenilpropanoide e/ou uma amplificação da sinalização do ácido salicílico. Já as plantas PGIP 2.23 A1 apresentaram uma expressão basal desse gene que pode ser um indicativo de priming fisiológicos, pré condicionamento para resposta mais rápida, ou até mesmo uma resposta basal mais elevada, possivelmente decorrente das diferenças no estado imune pré-infecção dessas plantas (Conrath et al., 2015; Mauch-Mani et al., 2017). A planta 2.23 A1 por já ter uma expressão pré-infecção, pode acarretar em uma margem menor para o aumento de expressão pós-infecção tornando mais difícil observar um aumento significativo na transcrição desse gene (Vergne et al., 2010)

Ao analisar o marcador *gh3*, associado a via de biossíntese de AS pela rota ICS (Lefevre et al., 2020), nas plantas transgênicas PG-PGIP 2.23 (A1 a C1), percebe-se uma indução após 72 hai, mostrando que essas plantas transgênicas tiveram uma resposta ao estresse maior que a NT, mesmo que essa tenha apresentado uma resposta basal anterior podendo também ser uma diferença no estado imune pré-infecção dessa planta (Mauch-Mani et al., 2017). Por outro lado, o gene *pr1*, não obteve uma variação significativa na expressão tanto em 0 hai quanto em 72 hai, em todas as plantas analisadas, mesmo com as mudanças observadas no marcador *gh3*. Esse resultado é compatível com observações feitas em estudos prévios, que nem todas as respostas de AS resultam em aumento expressivo de PR1, especialmente sob infecções por organismos necrotróficos na qual a resposta pode acontecer tardiamente (Ibanez et al., 2022; Nováková et al., 2014). Por fim, a expressão do gene *hpl*, que compete pelo mesmo substrato que a enzima AOS, da via do AJ (Feussner & Wasternack, 2002), mostrou um aumento considerável após 72 hai nas plantas

transgênicas PG-PGIP 2.23 A1 a C1, e não obteve uma expressão detectável em NT, salientando que a via do AJ possivelmente está reprimida nas plantas geneticamente modificadas e consequentemente a via do AS está ativada.

De modo surpreendente, ao analisar o evento transgênico PG-PGIP 1.45, cada uma das três plantas transgênicas examinada obteve um resultado diferente e constante nos três marcadores da via do AS. A planta PG-PGIP 1.45 A1 não infectada não teve indício de uma ativação pré-existente da via AS, tanto por PAL (Figura 25A) quanto por ICS (Figura 25B), porém após 72 hai teve uma expressão considerável dos genes marcadores dessas vias, porém de forma similar a NT. Quando olhamos *hpl* (Figura 25D), a planta PG-PGIP 1.45 A1, já podia observar uma expressão basal desse marcador antes da infecção pelo fungo, indicando uma não ativação da via do AJ, porém 72 hai ocorreu uma repressão desse gene indicando que essa via possa ter sido ativada. De forma distinta, a planta PG-PGIP 1.45 C2 apresentou uma expressão, mesmo que singela, de todos os três marcadores (Figura 25A, B e C) antes da infecção por *S. sclerotiorum*, com um destaque para os marcadores *gh3* e *pr1* (Figura 25B e D), que mostraram uma expressão superior a NT tanto em 0 horas quanto 72 hai, já o marcador da via do AJ indicou que a planta provavelmente estava com essa via ativada antes da infecção de *S. sclerotiorum*, porém após a infecção com *S. sclerotiorum* não houve uma alteração. Por fim, a planta PG-PGIP 1.45 B2 apresentou o resultado mais inusitado, onde não houve detecção de uma expressão considerável de nenhum dos três marcadores da via do AS, mostrando uma não ativação dessa via, além de uma não expressão do gene *hpl* indicando que a via do AJ está ativada.

Esses resultados nos mostram que o evento transgênico PG-PGIP 1.45 apresentou um comportamento heterogêneo entre as três progênies analisada, sugerindo a ocorrência de uma segregação das cópias inseridas na planta mãe, resultando em diferentes estados fisiológicos basais e diferentes equilíbrios hormonais (Prohens et al., 2022; Roca Paixao & Délérís, 2024; X. Yang et al., 2020). Enquanto PG-PGIP 1.45 A1 apresenta uma resposta responsiva ao patógeno característica da soja, na qual a via do AS é induzida a patógenos necrotróficos enquanto a via do AJ é reprimida (Beyer et al., 2021). A planta PG-PGIP 1.45 C2 apresenta um estado de alerta imunológico prévio, demonstrado nos genes *pal1*, *gh3* e *pr1* sendo expresso pré-infecção com o fungo *S. sclerotiorum*. Já a planta PG-PGIP 1.45 B2 mostrou uma ausência de ativação de AS possivelmente relacionada com a ativação de AJ, devido ao padrão de expressão apresentado do marcador *hpl* (Figura 25D) indicando que a via do AOS possa estar ativada (Feussner & Wasternack, 2002).

6. CONCLUSÃO

A resistência a estresses bióticos, principalmente contra patógenos necrotróficos e hemibiotróficos, como é o caso de *S. sclerotiorum* é um papel complexo e não depende apenas da presença de genes de defesa, mas sim do orquestramento de uma ampla ativação transcricional, modulações hormonais e produção de metabólitos secundários. Nesse contexto, a inserção do gene quimérico PG-PGIP no genoma de plantas de soja mostrou que esse sistema não atua de forma isolada, mas sim ativando uma rede complexa de sinalização que é modulada de forma distinta conforme a arquitetura do evento transgênico.

A expressão do gene quimérico PG-PGIP mostrou um potencial biotecnológico no evento PG-PGIP 2.23, o qual foi observado uma redução no avanço das lesões causadas por *Sclerotinia sclerotiorum*. Tal resultado é compatível com o modelo que sugere que a interação entre poligalacturonases fúngicas e inibidores vegetais favorece a formação de oligogalacturonídeos (OGs), moléculas sinalizadoras capazes de amplificar respostas de defesa. Ao analisar a ativação de marcadores das vias do ácido salicílico de forma coordenada e o ajuste observado na expressão do marcador da via do ácido jasmônico, sugere que o evento PG-PGIP 2.23 foi capaz de orquestrar uma calibração entre as vias de AS e AJ, fundamentais na resposta contra patógenos principalmente os que utilizam estratégias necrotróficas como *S. sclerotiorum*, ficando perceptível com a redução da área lesionada dessas plantas transgênicas.

Em contrapartida, o evento PG-PGIP 1.45 apontou que a simples presença da construção gênica integrada no genoma não garante um desempenho fisiológico esperado e uniforme. A heterogeneidade observada na expressão do transgene foi refletida em diferentes perfis de expressão dos marcadores das vias hormonais AS e AJ: *pal1*, *gh3*, *pr1* e *hpl*. Esses resultados indicam que a inserção do transgene do genoma foi resultante em múltiplas cópias em loci independentes, possivelmente estruturalmente distintas e sujeitas a segregação nas gerações subsequentes. Ao analisar comparativamente as progênies do evento PG-PGIP 1.45 a hipótese da variação estrutural ganha força com os resultados do PCR e sequenciamento, e explica os estados basais distintos observados, resultando em uma regulação hormonal disforme, mudando o equilíbrio entre AS e AJ antes mesmo da

infecção e resultando em susceptibilidade maior desse evento em relação ao fungo hemibiotrófico.

Considerando que *Sclerotinia sclerotiorum* apresenta fase inicial biotrófica antes de uma fase necrotrófica agressiva, o sucesso da resposta de defesa do hospedeiro depende de um ajuste preciso entre as respostas mediadas de AS e AJ, além de outras vias de sinalização e produção de metabolitos secundários. Os resultados obtidos nesse trabalho corroboram com essa afirmação, mostrando que alterações nesse balanço podem resultar tanto em uma contenção quanto em uma maior suscetibilidade à patógenos.

Tais achados reforçam a necessidade de eventos transgênicos serem analisados não apenas quanto a presença e ausência do transgene, mas também quanto a sua integração ao genoma, se ocorreu de forma íntegra, o número de cópias, o padrão de expressão, possíveis rearranjos e possíveis efeitos epigenéticos pois essas condições podem influenciar no estado fisiológico da planta e modular sua competência imunológica.

Nesse contexto, apesar da utilização de promotores constitutivos, como o 35SCaMV, favoreça a expressão contínua do transgene e seja amplamente empregada em diversos estudos, esse promotor pode em alguns casos resultar em altos custos metabólicos devido à ativação permanente de mecanismos de defesa, resultando em alterações características agronômicas desejáveis. No presente trabalho, mesmo que tais características não tenham sido avaliadas, não foram observadas diferenças fenotípicas evidentes entre os eventos transgênicos, PG-PGIP, e as plantas controle nas condições avaliadas. Ainda assim, considerando possíveis impactos fisiológicos em condições de campo ou ao longo de ciclos produtivos, a utilização paralela de construções reguladas por promotores induzíveis, como a quitinase, representa uma estratégia mais refinada para aplicações biotecnológicas futuras, permitindo que a expressão do transgene ocorra preferencialmente em resposta ao ataque do patógeno, sendo uma estratégia de resistência mais aprimorada e com menor impacto sobre o desempenho agronômico da cultura.

De maneira geral, esse estudo evidencia que a integração do gene quimérico PG-PGIP estabelece uma estratégia promissora para o fortalecimento da imunidade de plantas, especialmente em soja (*Glycine max*), como já havia sido observado em plantas de *Arabidopsis* transgênicas (Benedetti et al., 2015), apesar do sucesso dessa abordagem ser dependente da integração íntegra do transgene no genoma da planta alvo. Reforçando a premissa que a geração *in vivo* de OGs como amplificadores de sinalização pode gerar

uma ativação da resposta imune desencadeada por DAMPs, oferecendo uma alternativa para o desenvolvimento de cultivares mais resistentes.

Dessa forma, constata-se que além de contribuir para a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na resistência ao mofo branco, é de extrema importância o entendimento de uma forma mais integralizada da fisiologia vegetal, interação moleculares e da caracterização estrutural de eventos transgênicos para o desenvolvimento de soluções biotecnológicas na agricultura. A resistência efetiva surge não apenas da introdução de um gene, mas da harmonização entre a construção inserida e a rede regulatória da planta hospedeira.

Os resultados aqui obtidos abrem caminhos para aprofundar a compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes à modulação da resistência mediada pelo sistema PG–PGIP em *Glycine max*. Futuramente além da geração de mais eventos transgênicos, tanto com os promotores induzíveis quanto os constitutivos, estáveis e com produção de sementes viáveis e positivas urge a necessidade de quantificar e caracterizar a produção de OGs e paralelamente realizar análises do transcriptoma a fim de analisar de forma mais profunda como a inserção do transgene na planta impacta a rede complexa de interações moleculares durante a infecção por patógenos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abawi, G. S., & Grogan, R. G. (1979). Epidemiology of diseases caused by *Sclerotinia* species. *Phytopathology*, 69(8), 899–904.
- Ádám, A., Nagy, Z., Kátay, G., Mergenthaler, E., & Viczián, O. (2018). Signals of Systemic Immunity in Plants: Progress and Open Questions. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4), 1146. <https://doi.org/10.3390/ijms19041146>
- Aerts, N., Pereira Mendes, M., & Van Wees, S. C. M. (2021). Multiple levels of crosstalk in hormone networks regulating plant defense. *Plant Journal*, 105(2), 489–504. <https://doi.org/10.1111/tpj.15124>
- AgriBusiness Global. (2025). *BASF's Zorina Fungicide Receives U.S. EPA Approval - AgriBusiness Global*. https://www.agribusinessglobal.com/pt/agrochemicals/fungicides/basfs-zorina-fungicide-receives-u-s-epa-approval/?utm_source
- Alexandre Lima Nepomuceno, José Renato Bouças Farias, & Norman Neumaier. (2021). *Características da soja*. <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/soja/pre-producao/caracteristicas-da-especie-e-relacoes-com-o-ambiente/caracteristicas-da-soja>.
- Amack, S. C., & Antunes, M. S. (2020). CaMV35S promoter – A plant biology and biotechnology workhorse in the era of synthetic biology. *Current Plant Biology*, 24(15), 100179. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2020.100179>
- Anderson, J. E., Michno, J. M., Kono, T. J. Y., Stec, A. O., Campbell, B. W., Curtin, S. J., & Stupar, R. M. (2016). Genomic variation and DNA repair associated with soybean transgenesis: a comparison to cultivars and mutagenized plants. *BMC Biotechnology* 2016 16:1, 16(1), 41-. <https://doi.org/10.1186/s12896-016-0271-z>
- Baianu, I., You, T., Costescu, D., Lozano, P., Prisecaru, V., & Nelson, R. (2012). Determination of Soybean Oil, Protein and Amino Acid Residues in Soybean Seeds by High Resolution Nuclear Magnetic Resonance (NMRS) and Near Infrared (NIRS). *Nature Precedings*. <https://doi.org/10.1038/npre.2012.7053.1>
- Bandara, A. Y., Weerasooriya, D. K., Bradley, C. A., Allen, T. W., & Esker, P. D. (2020). Dissecting the economic impact of soybean diseases in the United States over two decades. *PLOS ONE*, 15(4), e0231141. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231141>
- Bargmann, B. O. R., Laxalt, A. M., Riet, B. Ter, Testerink, C., Merquiol, E., Mosblech, A., Leon-Reyes, A., Pieterse, C. M. J., Haring, M. A., Heilmann, I., Bartels, D., & Munnik, T. (2009). Reassessing the role of phospholipase D in the Arabidopsis wounding response. *Plant, Cell and Environment*, 32(7), 837–850. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01962.x>
- Bate, N. J., & Rothstein, S. J. (1998). C6-volatiles derived from the lipoxygenase pathway induce a subset of defense-related genes. *Plant Journal*, 16(5), 561–569. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1998.00324.x>

- Benedetti, M., Andreani, F., Leggio, C., Galantini, L., Di Matteo, A., Pavel, N. V., De Lorenzo, G., Cervone, F., Federici, L., & Sicilia, F. (2013). A Single Amino-Acid Substitution Allows Endo-Polygalacturonase of *Fusarium verticillioides* to Acquire Recognition by PGIP2 from *Phaseolus vulgaris*. *PLOS ONE*, 8(11), e80610. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080610>
- Benedetti, M., Pontiggia, D., Raggi, S., Cheng, Z., Scaloni, F., Ferrari, S., Ausubel, F. M., Cervone, F., & De Lorenzo, G. (2015). Plant immunity triggered by engineered in vivo release of oligogalacturonides, damage-associated molecular patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(17), 5533–5538. <https://doi.org/10.1073/pnas.1504154112>
- Benfey, P. N., & Chua, N.-H. (1990). The Cauliflower Mosaic Virus 35 S Promoter: Combinatorial Regulation of Transcription in Plants. *Science*, 250(4983), 959–966. <https://doi.org/10.1126/science.250.4983.959>
- Bent, A. F., & Mackey, D. (2007). Elicitors, Effectors, and *R* Genes: The New Paradigm and a Lifetime Supply of Questions. *Annual Review of Phytopathology*, 45(1), 399–436. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.45.062806.094427>
- Beyer, S. F., Bel, P. S., Flors, V., Schultheiss, H., Conrath, U., & Langenbach, C. J. G. (2021). Disclosure of salicylic acid and jasmonic acid-responsive genes provides a molecular tool for deciphering stress responses in soybean. *Scientific Reports* 2021 11:1, 11(1), 20600-. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00209-6>
- Bezerra, A. R. G., Sediya, T., Borém, A., & Soares, M. M. (2015). Importância econômica. *Soja: Do Plantio à Colheita*, 9–26.
- Boland, G. J., & Hall, R. (1994). Index of plant hosts of *sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 16(2), 93–108. <https://doi.org/10.1080/07060669409500766>
- Bolton, M. D., Thomma, B. P. H. J., & Nelson, B. D. (2006). *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Molecular Plant Pathology*, 7(1), 1–16. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2005.00316.x>
- Brown, T. A. (2001). *Southern Blotting and Related DNA Detection Techniques-Source*. <https://doi.org/10.1038/NPG.ELS.0000996>
- Brutus, A., Sicilia, F., Macone, A., Cervone, F., & De Lorenzo, G. (2010). A domain swap approach reveals a role of the plant wall-associated kinase 1 (WAK1) as a receptor of oligogalacturonides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(20), 9452–9457. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000675107>
- Burton, J. W. (1997). Soyabean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Field Crops Research*, 53(1–3), 171–186. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(97\)00030-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(97)00030-0)
- Cameron, R. K., Paiva, N. L., Lamb, C. J., & Dixon, R. A. (1999). Accumulation of salicylic acid and PR-1 gene transcripts in relation to the systemic acquired resistance (SAR) response induced by *Pseudomonas syringae* pv. tomato in *Arabidopsis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55(2), 121–130. <https://doi.org/10.1006/pmpp.1999.0214>

- Carter, T. E., Hymowitz, T., & Nelson, R. L. (2004). Biogeography, Local Adaptation, Vavilov, and Genetic Diversity in Soybean. In *Biological Resources and Migration* (pp. 47–59). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-06083-4_5
- Casasoli, M., Federici, L., Spinelli, F., Di Matteo, A., Vella, N., Scaloni, F., Fernandez-Recio, J., Cervone, F., & De Lorenzo, G. (2009). Integration of evolutionary and desolvation energy analysis identifies functional sites in a plant immunity protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(18), 7666–7671. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812625106>
- Cervone, F., Hahn, M. G., de Lorenzo, G., Darvill, A., & Albersheim, P. (1989). Host-Pathogen Interactions : XXXIII. A Plant Protein Converts a Fungal Pathogenesis Factor into an Elicitor of Plant Defense Responses. *Plant Physiology*, 90(2), 542–548. <https://doi.org/10.1104/pp.90.2.542>
- Chen, Y., & Wang, D. (2005). Two convenient methods to evaluate soybean for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease*, 89(12), 1268–1272. <https://doi.org/10.1094/PD-89-1268>
- Comex Stat. (2025). *Sistema oficial para extração das estatísticas do comércio exterior brasileiro de bens*. <https://Comexstat.Mdic.Gov.Br/Pt/Home>.
- Companhia Nacional de Abastecimento. (2024). Acompanhamento da Safra Brasileira - Grãos Safra 2024/25 2º Levantamento. In <https://www.gov.br/conab/pt-br/atuacao/informacoes-agropecuarias/safras/safra-de-graos/boletim-da-safra-de-graos/2o-levantamento-safra-2024-25/boletim-da-safra-de-graos>.
- Companhia Nacional de Abastecimento. (2026). 4º Levantamento - Safra 2025/26. <https://www.gov.br/conab/pt-br/atuacao/informacoes-agropecuarias/safras/safra-de-graos/boletim-da-safra-de-graos/4o-levantamento-safra-2025-26/4o-levantamento-safra-2025-26>.
- Conferência da Agricultura e Pecuária do Brasil. (2020). *PIB DO AGRONEGÓCIO CRESCE 3,81% EM 2019*. [https://www.cepea.org.br/upload/Kceditor/Files/Cepea_PIB_CNA_2019\(1\).Pdf](https://www.cepea.org.br/upload/Kceditor/Files/Cepea_PIB_CNA_2019(1).Pdf).
- Conrath, U., Beckers, G. J. M., Langenbach, C. J. G., & Jaskiewicz, M. R. (2015). Priming for enhanced defense. *Annual Review of Phytopathology*, 53, 97–119. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120132>
- Davidsson, P., Broberg, M., Kariola, T., Sipari, N., Pirhonen, M., & Palva, E. T. (2017). Short oligogalacturonides induce pathogen resistance-associated gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology* 2017 17:1, 17(1), 19-. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0959-1>
- Davis, K. R., Darvill, A. G., Albersheim, P., & Dell, A. (1986). Host-Pathogen Interactions : XXIX. Oligogalacturonides Released from Sodium Polypectate by Endopolygalacturonic Acid Lyase Are Elicitors of Phytoalexins in Soybean. *Plant Physiology*, 80(2), 568–577. <https://doi.org/10.1104/pp.80.2.568>
- Day, C. D., Lee, E., Kobayashi, J., Holappa, L. D., Albert, H., & Ow, D. W. (2000). Transgene integration into the same chromosome location can produce alleles that

express at a predictable level, or alleles that are differentially silenced. *Genes & Development*, 14(22), 2869. <https://doi.org/10.1101/gad.849600>

De Lorenzo, G., D'Ovidio, R., & Cervone, F. (2001). The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPS) in defense against pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 39(Volume 39, 2001), 313–335. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.39.1.313>

Degli Esposti, C., Guerrisi, L., Peruzzi, G., Giulietti, S., & Pontiggia, D. (2025). Cell wall bricks of defence: the case study of oligogalacturonides. *Frontiers in Plant Science*, 16, 1552926. <https://doi.org/10.3389/fpls.2025.1552926>

Dempsey, D. A., Vlot, A. C., Wildermuth, M. C., & Klessig, D. F. (2011). Salicylic Acid Biosynthesis and Metabolism. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*, 9, e0156. <https://doi.org/10.1199/tab.0156>

Denoux, C., Galletti, R., Mammarella, N., Gopalan, S., Werck, D., De Lorenzo, G., Ferrari, S., Ausubel, F. M., & Dewdney, J. (2008a). Activation of Defense Response Pathways by OGs and Flg22 Elicitors in Arabidopsis Seedlings. *Molecular Plant*, 1(3), 423–445. <https://doi.org/10.1093/mp/ssn019>

Denoux, C., Galletti, R., Mammarella, N., Gopalan, S., Werck, D., De Lorenzo, G., Ferrari, S., Ausubel, F. M., & Dewdney, J. (2008b). Activation of Defense Response Pathways by OGs and Flg22 Elicitors in Arabidopsis Seedlings. *Molecular Plant*, 1(3), 423–445. <https://doi.org/10.1093/mp/ssn019>

Disease Management. (2008). *Sclerotinia Diseases of Crop Plants: Biology, Ecology and Disease Management*, 301–376. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8408-9_19

D'Ovidio, R., Raiola, A., Capodicasa, C., Devoto, A., Pontiggia, D., Roberti, S., Galletti, R., Conti, E., O'Sullivan, D., & De Lorenzo, G. (2004). Characterization of the Complex Locus of Bean Encoding Polygalacturonase-Inhibiting Proteins Reveals Subfunctionalization for Defense against Fungi and Insects. *Plant Physiology*, 135(4), 2424–2435. <https://doi.org/10.1104/pp.104.044644>

Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *PHYTOCHEMICAL BULLETIN*. <https://worldveg.tind.io/record/33886>

Ekins, M. G., Aitken, E. A. B., & Goulter, K. C. (2002). Carpogenic germination of *Sclerotinia minor* and potential distribution in Australia. *Australasian Plant Pathology* 2002 31:3, 31(3), 259–265. <https://doi.org/10.1071/AP02022>

Embrapa. (n.d.). *Eficiência de fungicidas para controle de mofo-branco (Sclerotinia sclerotiorum) em soja, na safra 2021/2022: resultados sumarizados dos experimentos cooperativos*. - Portal Embrapa. Retrieved February 4, 2026, from <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1147086/eficiencia-de-fungicidas-para-controle-de-mofo-branco-sclerotinia-sclerotiorum-em-soja-na-safra-20212022-resultados-sumarizados-dos-experimentos-cooperativos>

Embrapa. (2022). *Experimentos cooperativos de controle biológico de Sclerotinia sclerotiorum na cultura da soja: resultados sumarizados da safra 2021/2022*.

https://Www.Infoteca.Cnptia.Embrapa.Br/Infoteca/Bitstream/Doc/1145774/1/Circ-Tec-186.Pdf?Utm_source.

Emídio Rizzo Bonato, & Ana Lídia Variani Bonato. (1987). A SOJA NO BRASIL: HISTÓRIA E ESTATÍSTICA. In https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/446431?utm_source.

FAOSTAT. (2023). *Soybean production*. <https://archive.ourworldindata.org/20250714-155445/grapher/soybean-production.html?utm>

Federici, L., Di Matteo, A., Fernandez-Recio, J., Tsernoglou, D., & Cervone, F. (2006). Polygalacturonase inhibiting proteins: players in plant innate immunity? *Trends in Plant Science*, 11(2), 65–70. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.12.005>

Ferrari, S., Savatin, D. V., Sicilia, F., Gramegna, G., Cervone, F., & De Lorenzo, G. (2013). Oligogalacturonides: Plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development. *Frontiers in Plant Science*, 4(MAR), 41591. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00049>

Feussner, I., Kühn, H., & Wasternack, C. (2001). Lipoxygenase-dependent degradation of storage lipids. *Trends in Plant Science*, 6(6), 268–273. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(01\)01950-1](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(01)01950-1)

Feussner, I., & Wasternack, C. (2002). The lipoxygenase pathway. *Annual Review of Plant Biology*, 53(Volume 53, 2002), 275–297. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.100301.135248>

Francisco José Lima Aragão, & Elíbio Leopoldo Rech. (2015). Isolamento de vetores para transformação direta. In *Manual de transformação genética de plantas* (2ª edição).

Frente Parlamentar da Agropecuária. (2021). *Importância da Soja para o Brasil*. <https://fpagropecuaria.org.br/2021/10/18/importancia-da-soja-para-o-brasil/?pdf=34558>

Frías, M., González, C., & Brito, N. (2011). BcSpl1, a cerato-platanin family protein, contributes to Botrytis cinerea virulence and elicits the hypersensitive response in the host. *New Phytologist*, 192(2), 483–495. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03802.x>

Fu, J., Yu, H., Li, X., Xiao, J., & Wang, S. (2011). Rice GH3 gene family: Regulators of growth and development. *Plant Signaling and Behavior*, 6(4), 570–574. <https://doi.org/10.4161/psb.6.4.14947>

Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H., & Ryals, J. (1993). Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science*, 261(5122), 754–756. <https://doi.org/10.1126/science.261.5122.754>

Galletti, R., Denoux, C., Gambetta, S., Dewdney, J., Ausubel, F. M., De Lorenzo, G., & Ferrari, S. (2008a). The AtrbohD-Mediated Oxidative Burst Elicited by Oligogalacturonides in Arabidopsis Is Dispensable for the Activation of Defense

- Responses Effective against *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology*, 148(3), 1695–1706. <https://doi.org/10.1104/pp.108.127845>
- Galletti, R., Denoux, C., Gambetta, S., Dewdney, J., Ausubel, F. M., De Lorenzo, G., & Ferrari, S. (2008b). The AtrbohD-Mediated Oxidative Burst Elicited by Oligogalacturonides in *Arabidopsis* Is Dispensable for the Activation of Defense Responses Effective against *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology*, 148(3), 1695–1706. <https://doi.org/10.1104/pp.108.127845>
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43(Volume 43, 2005), 205–227. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923>
- Godoy, C. (2014). *Manual de identificação de doenças de soja*. (5º edição).
- Gravino, M., Savatin, D. V., MacOne, A., & De Lorenzo, G. (2015). Ethylene production in *Botrytis cinerea*- and oligogalacturonide-induced immunity requires calcium-dependent protein kinases. *Plant Journal*, 84(6), 1073–1086. <https://doi.org/10.1111/tpj.13057>
- Grechkin, A. (1998). Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway. *Progress in Lipid Research*, 37(5), 317–352. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(98\)00014-9](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(98)00014-9)
- Grover, A. (2012). Plant Chitinases: Genetic Diversity and Physiological Roles. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 31(1), 57–73. <https://doi.org/10.1080/07352689.2011.616043>
- Hagen, G., & Guilfoyle, T. J. (1985). Rapid Induction of Selective Transcription by Auxins. *Molecular and Cellular Biology*, 5(6), 1197–1203. <https://doi.org/10.1128/mcb.5.6.1197-1203.1985>
- Hartman, G. L., West, E. D., & Herman, T. K. (2011). Crops that feed the World 2. Soybean—worldwide production, use, and constraints caused by pathogens and pests. *Food Security* 2011 3:1, 3(1), 5–17. <https://doi.org/10.1007/s12571-010-0108-x>
- Hildebrandt, D. F., Phillips², G. C., & Collins, G. B. (n.d.). 1.1 Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.].
- Hiroshi, M., Joelsio, H., & Lazzarotto, J. (2014). *O agronegócio da soja nos contextos mundial e brasileiro*. www.embrapa.br/soja
- Hossain, M. M., Sultana, F., Li, W., Tran, L. S. P., & Mostofa, M. G. (2023). *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: Insights into the Pathogenomic Features of a Global Pathogen. *Cells* 2023, Vol. 12, Page 1063, 12(7), 1063. <https://doi.org/10.3390/cells12071063>
- Hosseini, B., Voegelé, R. T., & Link, T. I. (2023). Diagnosis of Soybean Diseases Caused by Fungal and Oomycete Pathogens: Existing Methods and New Developments. *Journal of Fungi*, 9(5), 587. <https://doi.org/10.3390/jof9050587>

- Howe, G. A., & Schillmiller, A. L. (2002). Oxylin metabolism in response to stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(3), 230–236. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(02\)00250-9](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(02)00250-9)
- Hymowitz, T. (2008). The History of the Soybean. In *Soybeans* (pp. 1–31). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-893997-64-6.50004-4>
- Hymowitz, T., & Shurtleff, W. R. (2005). Debunking soybean myths and legends in the historical and popular literature. *Crop Science*, 45(2), 473–476. <https://doi.org/10.2135/cropsci2005.0473>
- Ibanez, F., Suh, J. H., Wang, Y., Rivera, M., Setamou, M., & Stelinski, L. L. (2022). Salicylic acid mediated immune response of *Citrus sinensis* to varying frequencies of herbivory and pathogen inoculation. *BMC Plant Biology* 22:1, 22(1), 7-. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-03389-5>
- Jagadeeswaran, G., Raina, S., Acharya, B. R., Maqbool, S. B., Mosher, S. L., Appel, H. M., Schultz, J. C., Klessig, D. F., & Raina, R. (2007). Arabidopsis GH3-LIKE DEFENSE GENE 1 is required for accumulation of salicylic acid, activation of defense responses and resistance to *Pseudomonas syringae*. *Plant Journal*, 51(2), 234–246. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03130.x>
- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006a). The plant immune system. *Nature* 2006 444:7117, 444(7117), 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006b). The plant immune system. *Nature* 2006 444:7117, 444(7117), 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Kalunke, R. M., Tundo, S., Benedetti, M., Cervone, F., De Lorenzo, G., & D'Ovidio, R. (2015). An update on polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP), aleucine-rich repeat protein that protects crop plants against pathogens. *Frontiers in Plant Science*, 6(MAR), 127053. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00146>
- Kars, I., Krooshof, G. H., Wagemakers, L., Joosten, R., Benen, J. A. E., & Van Kan, J. A. L. (2005). Necrotizing activity of five *Botrytis cinerea* endopolygalacturonases produced in *Pichia pastoris*. *The Plant Journal*, 43(2), 213–225. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02436.x>
- Kasprzewska, A. (2003). Plant chitinases--regulation and function. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 8(3), 809–824. <https://europepmc.org/article/med/12949620>
- Kim, T. J., & Lim, G. H. (2023). Salicylic Acid and Mobile Regulators of Systemic Immunity in Plants: Transport and Metabolism. *Plants* 2023, Vol. 12, Page 1013, 12(5), 1013. <https://doi.org/10.3390/plants12051013>
- Krishna, H., Alizadeh, M., Singh, D., Singh, U., Chauhan, N., Eftekhari, M., & Sadh, R. K. (2016). Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. *3 Biotech*, 6(1), 54. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0389-7>
- Latham, J. R., Wilson, A. K., & Steinbrecher, R. A. (2006). The Mutational Consequences of Plant Transformation. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2006, 25376. <https://doi.org/10.1155/JBB/2006/25376>

- Lefevre, H., Bauters, L., & Gheysen, G. (2020). Salicylic Acid Biosynthesis in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 11, 521987. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00338>
- Liang, X., & Rollins, J. A. (2018). Mechanisms of Broad Host Range Necrotrophic Pathogenesis in *Sclerotinia sclerotiorum*. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-18-0197-RVW>, 108(10), 1128–1140. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-18-0197-RVW>
- Lin, F., Chhapekar, S. S., Vieira, C. C., Da Silva, M. P., Rojas, A., Lee, D., Liu, N., Pardo, E. M., Lee, Y.-C., Dong, Z., Pinheiro, J. B., Ploper, L. D., Rupe, J., Chen, P., Wang, D., & Nguyen, H. T. (2022). Breeding for disease resistance in soybean: a global perspective. *Theoretical and Applied Genetics*, 135(11), 3773–3872. <https://doi.org/10.1007/s00122-022-04101-3>
- Lionetti, V., Francocci, F., Ferrari, S., Volpi, C., Bellincampi, D., Galletti, R., D'Ovidio, R., De Lorenzo, G., & Cervone, F. (2010). Engineering the cell wall by reducing demethyl-esterified homogalacturonan improves saccharification of plant tissues for bioconversion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(2), 616–621. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907549107>
- Liu, C., Yu, H., Voxeur, A., Rao, X., & Dixon, R. A. (2023). FERONIA and wall-associated kinases coordinate defense induced by lignin modification in plant cell walls. *Science Advances*, 9(10). <https://doi.org/10.1126/sciadv.adf7714>
- Liu, J., Nannas, N. J., Fu, F. F., Shi, J., Aspinwall, B., Parrott, W. A., & Dawe, R. K. (2019). Genome-Scale Sequence Disruption Following Biolistic Transformation in Rice and Maize. *The Plant Cell*, 31(2), 368–383. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00613>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Ma, D., Gordon, H., Nazir, R., Wulff, J. E., & Constabel, C. P. (2025). Salicylic acid biosynthesis via the PAL pathway requires benzaldehyde synthase and a benzyl salicylate-specific esterase. *The Plant Cell*, 37(10). <https://doi.org/10.1093/plcell/koaf241>
- Mauch-Mani, B., Baccelli, I., Luna, E., & Flors, V. (2017). Defense Priming: An Adaptive Part of Induced Resistance. *Annual Review of Plant Biology*, 68, 485–512. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042916-041132>
- Ministério da Agricultura e Pecuária. (2026). *Agronegócio brasileiro fecha 2025 com recorde em exportações de US\$ 169 bilhões e superávit de US\$ 149,07 bilhões*. <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/agronegocio-brasileiro-fecha-2025-com-recorde-em-exportacoes-de-us-169-bilhoes-e-superavit-de-us-149-07-bilhoes>
- Moellers, T. C., Singh, A., Zhang, J., Brungardt, J., Kabbage, M., Mueller, D. S., Grau, C. R., Ranjan, A., Smith, D. L., Chowda-Reddy, R. V., & Singh, A. K. (2017). Main and epistatic loci studies in soybean for *Sclerotinia sclerotiorum* resistance reveal multiple modes of resistance in multi-environments. *Scientific Reports*, 7(1), 3554. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03695-9>

- NCBI Taxonomy Browser. (n.d.). *Taxonomy browser Taxonomy Browser ()*. Retrieved February 4, 2026, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=5180>
- Ngou, B. P. M., Ding, P., & Jones, J. D. G. (2022). Thirty years of resistance: Zig-zag through the plant immune system. *The Plant Cell*, 34(5), 1447–1478. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac041>
- Nobuta, K., Okrent, R. A., Stoutemyer, M., Rodibaugh, N., Kempema, L., Wildermuth, M. C., & Innes, R. W. (2007). The GH3 Acyl Adenylase Family Member PBS3 Regulates Salicylic Acid-Dependent Defense Responses in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 144(2), 1144–1156. <https://doi.org/10.1104/pp.107.097691>
- Nocarova, E., & Fischer, L. (2009). Cloning of transgenic tobacco BY-2 cells; an efficient method to analyse and reduce high natural heterogeneity of transgene expression. *BMC Plant Biology* 2009 9:1, 9(1), 44-. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-9-44>
- Nováková, M., Šašek, V., Dobrev, P. I., Valentová, O., & Burketová, L. (2014). Plant hormones in defense response of Brassica napus to Sclerotinia sclerotiorum – Reassessing the role of salicylic acid in the interaction with a necrotroph. *Plant Physiology and Biochemistry*, 80(8), 308–317. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.04.019>
- Odell, J. T., Nagy, F., & Chua, N. H. (1985). Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 1985 313:6005, 313(6005), 810–812. <https://doi.org/10.1038/313810a0>
- Pieterse, C. M. J., Van Der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., & Van Wees, S. C. M. (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28(Volume 28, 2012), 489–521. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154055>
- Pieterse, C. M. J., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C. M., & Bakker, P. A. H. M. (2014). Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 52(1), 347–375. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>
- Prohens, J., Sestras, A. F., Plazas, M., & Lebedev, V. (2022). Stability of Transgene Inheritance in Progeny of Field-Grown Pear Trees over a 7-Year Period. *Plants* 2022, Vol. 11, Page 151, 11(2), 151. <https://doi.org/10.3390/plants11020151>
- Raman, R. (2017). The impact of Genetically Modified (GM) crops in modern agriculture: A review. *GM Crops & Food*, 8(4), 195–208. <https://doi.org/10.1080/21645698.2017.1413522>
- Ranjan, A., Westrick, N. M., Jain, S., Piotrowski, J. S., Ranjan, M., Kessens, R., Stiegman, L., Grau, C. R., Conley, S. P., Smith, D. L., & Kabbage, M. (2019). Resistance against Sclerotinia sclerotiorum in soybean involves a reprogramming of the phenylpropanoid pathway and up-regulation of antifungal activity targeting ergosterol biosynthesis. *Plant Biotechnology Journal*, 17(8), 1567–1581. <https://doi.org/10.1111/pbi.13082>

- Rech, E. L., Vianna, G. R., & Aragão, F. J. L. (2008). High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants. *Nature Protocols* 2008 3:3, 3(3), 410–418. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.9>
- Ridley, B. L., O'Neill, M. A., & Mohnen, D. (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, 57(6), 929–967. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00113-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00113-3)
- Roberto Samora. (2026). Exportação de soja do Brasil fechou 2025 em recorde, diz Cargonave. https://www.Cnnbrasil.Com.Br/Economia/Macroeconomia/Exportacao-de-Soja-Do-Brasil-Fechou-2025-Em-Recorde-Diz-Cargonave/#goog_rewarded.
- Roca Paixao, J. F., & Déléris, A. (2024). Epigenetic control of T-DNA during transgenesis and pathogenesis. *Plant Physiology*, 197(1). <https://doi.org/10.1093/plphys/kiae583>
- Rowley, A. F. ., Kuhn, Hartmut., & Schewe, T. . (2016). *Eicosanoids and Related Compounds in Plants and Animals*. Princeton University Press. https://books.google.com/books/about/Eicosanoids_and_Related_Compounds_in_Pla.html?hl=pt-BR&id=7r59BgAAQBAJ
- Santos, M. A., Vargas, M. A. T., & Hungria, M. (1999). Characterization of soybean Bradyrhizobium strains adapted to the Brazilian savannas. *FEMS Microbiology Ecology*, 30(3), 261–272. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1999.tb00654.x>
- Schnell, J., Steele, M., Bean, J., Neuspiel, M., Girard, C., Dormann, N., Pearson, C., Savoie, A., Bourbonnière, L., & Macdonald, P. (2014). A comparative analysis of insertional effects in genetically engineered plants: considerations for pre-market assessments. *Transgenic Research*, 24(1), 1. <https://doi.org/10.1007/s11248-014-9843-7>
- Schouten, H. J., vande Geest, H., Papadimitriou, S., Bemer, M., Schaart, J. G., Smulders, M. J. M., Perez, G. S., & Schijlen, E. (2017). Re-sequencing transgenic plants revealed rearrangements at T-DNA inserts, and integration of a short T-DNA fragment, but no increase of small mutations elsewhere. *Plant Cell Reports* 2017 36:3, 36(3), 493–504. <https://doi.org/10.1007/s00299-017-2098-z>
- Siddique, K., Wei, J., Li, R., Zhang, D., & Shi, J. (2019). Identification of T-DNA Insertion Site and Flanking Sequence of a Genetically Modified Maize Event IE09S034 Using Next-Generation Sequencing Technology. *Molecular Biotechnology* 2019 61:9, 61(9), 694–702. <https://doi.org/10.1007/s12033-019-00196-0>
- Sun, J. Q., Jiang, H. L., & Li, C. Y. (2011). Systemin/Jasmonate-Mediated Systemic Defense Signaling in Tomato. *Molecular Plant*, 4(4), 607–615. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr008>
- Svitashev, S. K., Pawlowski, W. P., Makarevitch, I., Plank, D. W., & Somers, D. A. (2002). Complex transgene locus structures implicate multiple mechanisms for plant transgene rearrangement. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 32(4), 433–445. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01433.x>

- Talmo, N., & Ranjan, A. (2025). Comparative insights into soybean and other oilseed crops' defense mechanisms against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Frontiers in Plant Science*, 16, 1616824. <https://doi.org/10.3389/fpls.2025.1616824>
- Tizaoui, K., & Kchouk, M. E. (2012). Genetic approaches for studying transgene inheritance and genetic recombination in three successive generations of transformed tobacco. *Genetics and Molecular Biology*, 35(3), 640. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572012000400015>
- Trade Map ITC. (2024). *Trade statistics for international business development*. <https://www.Trademap.Org/Index.AspX>.
- Uppalapati, S. R., Ishiga, Y., Wangdi, T., Kunkel, B. N., Anand, A., Mysore, K. S., & Bender, C. L. (2007). The Phytotoxin Coronatine Contributes to Pathogen Fitness and Is Required for Suppression of Salicylic Acid Accumulation in Tomato Inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-8-0955>, 20(8), 955–965. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-8-0955>
- Vaghela, B., Vashi, R., Rajput, K., & Joshi, R. (2022). Plant chitinases and their role in plant defense: A comprehensive review. *Enzyme and Microbial Technology*, 159. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2022.110055>
- Van der Does, D., Leon-Reyes, A., Koornneef, A., Van Verk, M. C., Rodenburg, N., Pauwels, L., Goossens, A., Körbes, A. P., Memelink, J., Ritsema, T., Van Wees, S. C. M., & Pieterse, C. M. J. (2013). Salicylic Acid Suppresses Jasmonic Acid Signaling Downstream of SCFCOI1-JAZ by Targeting GCC Promoter Motifs via Transcription Factor ORA59. *The Plant Cell*, 25(2), 744–761. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.108548>
- Vancanneyt, G., Sanz, C., Farmaki, T., Paneque, M., Ortego, F., Castañera, P., & Sánchez-Serrano, J. J. (2001). Hydroperoxide lyase depletion in transgenic potato plants leads to an increase in aphid performance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(14), 8139–8144. <https://doi.org/10.1073/pnas.141079498>
- Vega-Muñoz, I., Duran-Flores, D., Fernández-Fernández, Á. D., Heyman, J., Ritter, A., & Stael, S. (2020). Breaking Bad News: Dynamic Molecular Mechanisms of Wound Response in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 11, 610445. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.610445>
- Vergne, E., Grand, X., Ballini, E., Chalvon, V., Saindrenan, P., Tharreau, D., Nottéghem, J. L., & Morel, J. B. (2010). Preformed expression of defense is a hallmark of partial resistance to rice blast fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*. *BMC Plant Biology*, 10, 206. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-206>
- Vianna, G., & Romano, E. (2015). Análise da integração de transgenes pela técnica de Southern blot. In *Manual de transformação genética de plantas*. (2º edição).
- Wang, X. J., Jiao, Y., Ma, S., Yang, J. T., & Wang, Z. X. (2020). Whole-Genome Sequencing: An Effective Strategy for Insertion Information Analysis of Foreign Genes

in Transgenic Plants. *Frontiers in Plant Science*, 11, 573871.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2020.573871>

- Wang, Y., Liu, M., Ge, D., Akhter Bhat, J., Li, Y., Kong, J., Liu, K., & Zhao, T. (2020). Hydroperoxide lyase modulates defense response and confers lesion-mimic leaf phenotype in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Plant Journal*, 104(5), 1315–1333. <https://doi.org/10.1111/tpj.15002>
- Wang, Z., Ma, L. Y., Cao, J., Li, Y. L., Ding, L. N., Zhu, K. M., Yang, Y. H., & Tan, X. L. (2019). Recent Advances in Mechanisms of Plant Defense to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Frontiers in Plant Science*, 10, 472930. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01314>
- Wang, Z., Yang, G., Zhang, D., Li, G., Qiu, J. L., & Wu, J. (2024). Isochorismate synthase is required for phyloquinone, but not salicylic acid biosynthesis in rice. *ABIOTECH*, 5(4), 488–496. <https://doi.org/10.1007/s42994-024-00166-4>
- Wasternack, C., & Song, S. (2017). Jasmonates: biosynthesis, metabolism, and signaling by proteins activating and repressing transcription. *Journal of Experimental Botany*, 68(6), 1303–1321. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw443>
- Westfall, C. S., Sherr, A. M., Zubieta, C., Alvarez, S., Schraft, E., Marcellin, R., Ramirez, L., & Jez, J. M. (2016). *Arabidopsis thaliana* GH3.5 acyl acid amido synthetase mediates metabolic crosstalk in auxin and salicylic acid homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(48), 13917–13922. <https://doi.org/10.1073/pnas.1612635113>
- White, R. F. (1979). Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. *Virology*, 99(2), 410–412. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(79\)90019-9](https://doi.org/10.1016/0042-6822(79)90019-9)
- William, R., & Sambrook, J. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual. : Volume 1*.
- Wobbrock, J. O., Findlater, L., Gergle, D., & Higgins, J. J. (2011). The Aligned Rank Transform for nonparametric factorial analyses using only ANOVA procedures. *Conference on Human Factors in Computing Systems - Proceedings*, 143–146. <https://doi.org/10.1145/1978942.1978963>
- Xiao, Y., Sun, G., Yu, Q., Gao, T., Zhu, Q., Wang, R., Huang, S., Han, Z., Cervone, F., Yin, H., Qi, T., Wang, Y., & Chai, J. (2024). A plant mechanism of hijacking pathogen virulence factors to trigger innate immunity. *Science*, 383(6684), 732–739. <https://doi.org/10.1126/science.adj9529>
- Yang, G., Tang, L., Gong, Y., Xie, J., Fu, Y., Jiang, D., Li, G., Collinge, D. B., Chen, W., & Cheng, J. (2018). A cerato-platanin protein SsCP1 targets plant PR1 and contributes to virulence of *Sclerotinia sclerotiorum*. *New Phytologist*, 217(2), 739–755. <https://doi.org/10.1111/nph.14842>
- Yang, X., Liu, T., Yang, R., Fan, H., Liu, X., Xuan, Y., Wang, Y., Chen, L., Duan, Y., & Zhu, X. (2024). Overexpression of GmPAL Genes Enhances Soybean Resistance Against *Heterodera glycines*. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-23-0151-R>, 37(4), 416–423. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-23-0151-R>

- Yang, X., Sanchez, R., Kundariya, H., Maher, T., Dopp, I., Schwegel, R., Viridi, K., Axtell, M. J., & Mackenzie, S. A. (2020). Segregation of an MSH1 RNAi transgene produces heritable non-genetic memory in association with methylome reprogramming. *Nature Communications* 2020 11:1, 11(1), 2214-. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16036-8>
- Yin, Z., & Malepszy, S. (2003). *The transgenes are expressed with different level in plants*.
- Yuan, M., Ngou, B. P. M., Ding, P., & Xin, X. F. (2021). PTI-ETI crosstalk: an integrative view of plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, 62, 102030. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2021.102030>
- Zalewski, W., Orczyk, W., Gasparis, S., & Nadolska-Orczyk, A. (2012). HvCKX2 gene silencing by biolistic or Agrobacterium-mediated transformation in barley leads to different phenotypes. *BMC Plant Biology* 2012 12:1, 12(1), 206-. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-206>
- Zhang, K., Wang, Y., Sun, W., Han, K., Yang, M., Si, Z., Li, G., & Qiao, Y. (2020). Effects of exogenous salicylic acid on the resistance response of wild soybean plants (Glycine soja) infected with Soybean mosaic virus. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 42(1), 84–93. <https://doi.org/10.1080/07060661.2019.1641750>
- Zhang, Q., Tu, B., Liu, C., & Liu, X. (2018). Pod anatomy, morphology and dehiscing forces in pod dehiscence of soybean (Glycine max (L.) Merrill). *Flora*, 248, 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2018.08.014>
- Zhang, W., Fraiture, M., Kolb, D., Löffelhardt, B., Desaki, Y., Boutrot, F. F. G., Tör, M., Zipfel, C., Gust, A. A., & Brunner, F. (2013). Arabidopsis RECEPTOR-LIKE PROTEIN30 and Receptor-Like Kinase SUPPRESSOR OF BIR1-1/EVERSHED Mediate Innate Immunity to Necrotrophic Fungi. *The Plant Cell*, 25(10), 4227–4241. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.117010>
- Zhang, Y., & Li, X. (2019). Salicylic acid: biosynthesis, perception, and contributions to plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, 50(4983), 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2019.02.004>
- Zhang, Z., Li, Q., Li, Z., Staswick, P. E., Wang, M., Zhu, Y., & He, Z. (2007). Dual Regulation Role of GH3.5 in Salicylic Acid and Auxin Signaling during Arabidopsis-Pseudomonas syringae Interaction. *Plant Physiology*, 145(2), 450–464. <https://doi.org/10.1104/pp.107.106021>
- Zimmerman, D. C., & Coudron, C. A. (1979). Identification of Traumatol, a Wound Hormone, as 12-Oxo-trans-10-dodecenoic Acid. *Plant Physiology*, 63(3), 536–541. <https://doi.org/10.1104/pp.63.3.536>