

TERESINHA DE JESUS FEITOSA DE SOUSA

DESENVOLVIMENTO DE SOJA ALTO OLEICO NO BRASIL

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Maximiller Dal-Bianco
Lamas Costa

Coorientador: Cleberson Ribeiro

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus**

T	Sousa, Teresinha de Jesus Feitosa de, 1994-
S725d	Desenvolvimento de soja alto oleico no Brasil: / Teresinha de
2023	Jesus Feitosa de Sousa. - Viçosa, MG, 2023. 1 tese eletrônica (55 f.): il. (algumas color.). Orientador: Maximiller Dal-Bianco Lamas Costa Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 2023. Inclui bibliografia. DOI: https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.747 Modo de acesso: World Wide Web.
	1. Soja - Marcadores genéticos; 2. Biodiesel; 3. Nematoda; I. Costa, Maximiller Dal-Bianco Lamas II. Universidade Federal de Viçosa.. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada III. Título
	CDD 22. ed. 631.52

Bibliotecário(a) responsável: EUZEBIO LUIZ PINTO CRB-6/3317

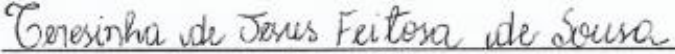
TERESINHA DE JESUS FEITOSA DE SOUSA

DESENVOLVIMENTO DE SOJA ALTO OLEICO NO BRASIL

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Aprovada: 31 de Outubro de 2023

Assentimento:


Teresinha de Jesus Feitosa de Sousa
Autora


Maximiller Dal-Bianco Lamas Costa
Orientador

Ao meu pai João Batista Sousa
À minha mãe Antonia de Sousa Feitosa
Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ser meu refúgio e fortaleza;

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica Aplicada, pela oportunidade;

Ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária – BIOAGRO, pela estrutura disponibilizada;

Ao Laboratório de Bioquímica Genética de Plantas (LBGP – BIOAGRO/UFV) e ao Programa de Melhoramento de Qualidade de Soja (BIOAGRO/DBB/UFV);

Ao Laboratório de Genética Molecular de Plantas (BIOAGRO-UFV) e ao Prof. Cléberson Ribeiro, pelo suporte.

Ao meu orientador Maximiller Dal-Bianco Lamas Costa, por ter me acolhido, pela orientação, pela paciência e todos os ensinamentos;

Ao Dr. Rafael Delmond Bueno, pelos conselhos e aprendizados.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro.

Ao secretário do Programa de Pós graduação em Bioquímica Aplicada, Eduardo Monteiro pela atenção de sempre e pela amizade;

Ao Laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro – BIOCAFÉ, pelo suporte;

Ao Dr. Newton Deniz Piovesan e aos funcionários do PMQS, José Carlos, Reginaldo e Luiz, pela importante colaboração no desenvolvimento deste trabalho;

Ao técnico Guilherme Ramos Pereira pela ajuda nas análises;

Aos meus colegas do Laboratório de Bioquímica Genética de Plantas: Rodrigo, Bruno, Bruna, Brizza, Uilton, Vitória, Jéssica, Marina e Yan, por todos os momentos compartilhados. A nossa convivência foi muito importante, tornando essa trajetória mais leve;

Ao MUR-Viçosa, pela acolhida, amizade e partilhas. Foi de muita importância para mim durante esta trajetória;

À família Martins por ter me acolhido, tenho um carinho muito especial por todos;

Aos meus pais por todo amor e dedicação

Aos meus irmãos Antoniel Sousa e João Paulo Sousa, e todos os familiares pelo carinho;

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho;

RESUMO

SOUSA, Teresinha de Jesus Feitosa de, Dsc. Universidade Federal de Viçosa, Outubro de 2023. **Desenvolvimento de soja alto oleico no Brasil**. Orientador: Maximiller Dal-Bianco Lamas Costa. Coorientador: Cleberson Ribeiro.

A soja é a principal oleaginosa cultivada no mundo e é valorizada tanto pelo seu conteúdo de proteína, quanto de óleo. O melhoramento da qualidade do óleo de soja para alto teor de ácido oleico tem sido realizado para atender a indústria alimentícia, mas com principal demanda na indústria do biodiesel. Neste sentido, a tese visa demonstrar alternativas para o desenvolvimento de soja alto oleico no Brasil, assim como investigar a expressão de genes em soja alto oleico e convencional, quando infectadas com o nematoide *Pratylenchus brachyurus*. No primeiro capítulo foram desenvolvidos e validados ensaios de genotipagem CAPS e Taqman, para identificar e discriminar alelos mutantes de GmFAD2-1A e GmFAD2-1B, onde a partir desses ensaios, foi possível identificar alto teor de ácido oleico em genótipos de soja, permitindo a melhoria da composição do óleo através da seleção assistida por marcadores e o desenvolvimento eficiente de variedades de soja com alto teor de ácido oleico. O segundo capítulo mostra o desenvolvimento de programas de retrocruzamentos assistidos por marcadores (RAM), como um método eficiente para a incorporação de novos alelos em cultivares de soja, visando a produção de soja com alto teor de ácido oleico. E no terceiro capítulo foi feita uma investigação da expressão dos genes OPR3, JAR1, ETR, ATAF1, HS1PRO1, CHS e RD20-A em cultivares TMG4182 e TMG4182AO que possui alto teor de oleico, nos tempos 1, 5 e 10 dias após inoculação com o nematoide *P. brachyurus*. Onde foi observado que de forma geral, as plantas alto oleico apresentaram maior variação na expressão dos genes analisados, em comparação com a planta convencional, e uma vez que a cultivar TMG4182 é moderadamente resistente ao nematoide *P. brachyurus*, estudos futuros seriam interessantes para investigar se a característica alto teor de oleico, pode ter influenciado nos níveis de resistência ao nematoide.

Palavras-chave: Soja; Alto oleico; Nematoides.

ABSTRACT

SOUSA, Teresinha de Jesus Feitosa de, Dsc. Federal University of Viçosa, October 2023. **Development of high oleic soybeans in Brazil.** Advisor: Maximiller Dal-Bianco Lamas Costa. Co-supervisor: Cleberson Ribeiro.

Soy is the main oilseed grown in the world and is valued both for its protein and oil content. The improvement of the quality of soybean oil to high oleic acid content has been carried out to serve the food industry, but with main demand in the biodiesel industry. In this sense, the thesis aims to demonstrate alternatives for the development of high oleic soybeans in Brazil, as well as to investigate the expression of genes in high oleic and conventional soybeans, when infected with the nematode *Pratylenchus brachyurus*. In the first chapter, CAPS and Taqman genotyping assays were developed and validated, to identify and discriminate mutant alleles of GmFAD2-1A and GmFAD2-1B, where from these assays, it was possible to identify high oleic acid content in soybean genotypes, allowing the improving oil composition through marker-assisted selection and efficient development of high-oleic soybean varieties. The second chapter shows the development of marker-assisted backcrossing (RAM) programs as an efficient method for incorporating new alleles into soybean cultivars, aiming to produce soybeans with high oleic acid content. And in the third chapter, an investigation was carried out on the expression of the genes OPR3, JAR1, ETR, ATAF1, HS1PRO1, CHS and RD20-A in cultivars TMG4182 and TMG4182AO, which have a high oleic content, at times 1, 5 and 10 days after inoculation with the nematode *P. brachyurus*. Where it was observed that in general, high oleic plants showed greater variation in the expression of the genes analyzed, compared to the conventional plant, and since the cultivar TMG4182 is moderately resistant to the nematode *P. brachyurus*, future studies would be interesting to investigate if the characteristic is high in oleic content, it may have influenced the levels of resistance to the nematode.

Keywords: Soy; High oleic; Nematode.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo 1

Figure 1. KASP genotyping assay for the SNP of the FAD2-1A gene and FAD2-1B	22
Figure 2. CAPS assay developed for the SNP present in the FAD2-1B gene.....	23
Figure 3. Taqman genotyping assay for FAD2-1A and FAD2-1B genes.....	25

Capítulo 2

Figura 1. Esquema do programa de retrocruzamento assistido para a variedade UFVS77C10, CS-AO: planta doadora de alelos para alto oleico (derivados da PL04 e CS303TNKCA)	33
--	----

Capítulo 3

Figura 1. Esquema do delineamento experimental de TMG4182 e TMG4182AO (alto oleico), com três repetições, em intervalos de 1, 5 e 10 dias após a inoculação do nematoide <i>Pratylenchus brachyurus</i>	42
Figura 2. Valores da Expressão relativa dos genes a) OPR3; b) JAR1; c) ETR; d) ATAF1; e) HS1PRO1; f) CHS e g) RD20-A.....	45

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Table 1. Fatty acid profile and genotyping of materials using KASP, CAPS and Taqman assays.....	26
---	----

Capítulo 2

Tabela 1. Genotipagem dos materiais provenientes dos programas de retrocruzamentos com UFVS77C10 e UFVS-MB, para os genes FAD2-1A e FAD2-1B.....	36
--	----

Capítulo 3

Tabela 1. Primers utilizados para a análise de expressão gênica.....	43
--	----

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	12
REFERÊNCIAS	14
CAPÍTULO 1	16
Development of new genotyping assays for high oleic acid in soybeans	16
1.1. Introduction.....	17
1.2. Material and Methods	19
1.2.1. Plant Material and DNA extraction.....	19
1.2.2. Genotyping using KASP	19
1.2.3. Genotyping using CAPS.....	20
1.2.4. Development Taqman assay	20
1.2.5. Phenotyping.....	21
1.3. Results and Discussion.....	21
Supplementary material.....	26
REFERENCES	27
CAPÍTULO 2	30
Desenvolvimento de soja alto oleico por meio de retrocruzamentos assistidos .	30
2.1. INTRODUÇÃO	30
2.2. MATERIAL E MÉTODOS	31
2.2.1. MATERIAL GENÉTICO E EXTRAÇÃO DE DNA.....	31
2.2.2. GENOTIPAGEM DOS MATERIAIS.....	32
2.2.3. PROGRAMA DE RETROCRUZAMENTOS ASSISTIDO POR MARCADORES	33
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
2.4. CONCLUSÃO.....	36
2.5. PERSPECTIVAS	36
REFERÊNCIAS	37
CAPÍTULO 3	39
Investigação da expressão de genes em raízes de soja alto oleico e convencional infectadas com o nematoide <i>Pratylenchus brachyurus</i>	39
3.1. INTRODUÇÃO	39
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	41
3.2.1. MATERIAL VEGETAL E PATÓGENO.....	41
3.2.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	41
3.2.3. EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DO cDNA	42
3.2.4. ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA	43
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44

REFERÊNCIAS	50
-------------------	----

INTRODUÇÃO GERAL

A soja (*Glycine max* L.Merril) é a mais importante leguminosa cultivada no mundo, e destaca-se como a principal *commodities* agrícola brasileira, sendo o Brasil atualmente o maior produtor e exportador mundial. O sucesso da cultura da soja é atribuído principalmente aos altos teores de óleo e proteína (PATIL et al., 2018). O óleo de soja é rico em ácidos graxos poli-insaturados, e essa composição confere ao óleo alta suscetibilidade à degradação oxidativa, o que pode levar à rancificação do óleo, fenômeno responsável por alterar seu sabor e odor, diminuindo sua aceitação e tempo de armazenamento (SANTOS et al., 2013; WANG et al., 2014; DO et al., 2019).

Por outro lado, altos níveis de ácido graxos monoinsaturados são desejáveis, principalmente para aplicações industriais, devido ao aumento da estabilidade oxidativa e prazo de validade do óleo (MAHESHWARI; KOVALCHUK 2016; WOYANN et al., 2019). Além disso, um óleo de soja com altos níveis de ácido oleico pode ajudar a minimizar vários problemas de saúde (BHARDWAJ et al., 2011; SALES-CAMPOS et al., 2013).

Os genes das dessaturases têm sido alvos no melhoramento de soja para alto teor de ácido oleico, onde FAD2-1A e FAD2-1B desempenham um papel importante no controle dos níveis deste ácido graxo (HAUN et al., 2014). A combinação das mutações presentes nestes dois genes tem permitido produzir óleo de soja com níveis de ácido oleico superiores a 80% (PHAM et al., 2010, 2011).

O melhoramento de soja alto oleico, tem sido importante para atender as diferentes demandas do mercado da soja, com destaque especial para a indústria do biodiesel, principalmente no Brasil, visto que o óleo de soja é a principal matéria-prima, e no ano de 2023 houve um aumento de 10% para 12% na adição de biodiesel no diesel, com previsão de ampliação para os próximos anos.

Plantas de soja com alto teor de ácido oleico, possui níveis reduzidos dos ácidos linoleico e linolênico. Sendo que o ácido linolênico desempenha um importante papel na síntese de ácido jasmônico, um hormônio fundamental na defesa das plantas (WEBER, 2002; BALLARÉ, 2014). Além disso, ainda não se

sabe se a presença da característica alto oleico afeta os mecanismos de defesa da planta e a resistência a nematoides.

Para a cultura da soja no Brasil, um dos nematoides mais relevantes é o *Pratylenchus brachyurus*, causadores das lesões radiculares (KAYANI et al., 2017). Os principais sintomas observados por esses invasores são a diminuição no volume do sistema radicular, acelerando a decomposição dos tecidos, e levando a uma ineficiência das funções de absorção e transporte de nutrientes e água (FERRAZ; BROWN, 2016). Diversas medidas de proteção podem ser adotadas, com o objetivo de reduzir os danos causados pelos parasitas. Entre as estratégias utilizadas estão o controle biológico, químico, rotação de culturas, variedades resistentes e a solarização (FERRAZ et al., 2010).

Diante do exposto, esse estudo teve como objetivo desenvolver variedades de soja alto oleico no Brasil. A tese foi dividida em três capítulos: o primeiro capítulo é um artigo submetido à revista *Molecular Breeding*, mostrando o desenvolvimento de novos ensaios de genotipagem para identificar alto teor de ácido oleico em soja; o segundo capítulo aborda o desenvolvimento de programas de retrocruzamentos assistidos por marcadores (RAM), visando desenvolver soja alto oleico e o terceiro capítulo consiste na investigação da expressão de genes em raízes de soja alto oleico e convencional, infectadas com o nematoide *Pratylenchus brachyurus*.

REFERÊNCIAS

BALLARÉ C.L. Light regulation of plant defense. **Annual Review of Plant Biology**, v. 65, p.335-363, 2014.

BHARDWAJ, S.; PASSI, S. J.; MISRA, A. Overview of trans fatty acids: biochemistry and health effects. **Diabetes & metabolic syndrome**, v. 5, p. 161-164, 2011.

DO, P. T.; NGUYEN, C. X.; BUI, H. T.; TRAN, L. T. N.; STACEY, G.; GILLMAN, J. D.; ZHANG, Z. J.; STACEY, M. G. Demonstration of highly efficient dual gRNA CRISPR/Cas9 editing of the homeologous GmFAD2-1A and GmFAD2-1B genes to yield a high oleic, low linoleic and α -linolenic acid phenotype in soybean. **BMC Plant Biology**, v. 15, n. 19, p. 311, 2019.

FERRAZ, L. C. C. B.; BROWN, D. J. F. **Nematologia de plantas: fundamentos e importância**. Manaus: Norma Editora, 2016. 251p.

FERRAZ, S.; FREITAS, L. G. de; LOPES, E. A.; DIAS-ARIEIRA, C. **Manejo sustentável de fitonematóides**. Viçosa, MG: UFV, 2010. 306 p.

HAUN, W.; COFFMAN, A.; CLASEN, B. M.; DEMOREST, Z. L.; LOWY, A.; RAY, E.; RETTERATH, A.; STODDARD, T.; JUILLERAT, A.; CEDRONE, F.; MATHIS, L.; VOYTAS, D. F.; ZHANG, F. Improved soybean oil quality by targeted mutagenesis of the fatty acid desaturase 2 gene family. **Plant Biotechnology Journal**, v. 12, p. 934-940, 2014.

KAYANI, M. Z.; MUKHTAR, T.; HUSSAIN, M. A. Effects of southern root knot nematode population densities and plant age on growth and yield parameters of cucumber. **Crop Protection**, v. 92, p. 207-212. 2017.

MAHESHWARI, P.; KOVALCHUK, I. Chapter 14 - Genetic Transformation of Crops for Oil Production. In: MCKEON, T. A.; HAYES, D. G.; HILDEBRAND, D. F.; WESELAKE, R. J. **Industrial Oil Crops**, p. 379-412, 2016.

PATIL, G.; VUONG, T. D.; KALE, S.; VALLIYODAN, B.; DESHMUKH, R.; ZHU, C.; WU, X.; BAI, Y.; YUNGBLUTH, D.; LU, F.; KUMPATLA, S.; SHANNON, J. G.; VARSHNEY, R. K.; NGUYEN, H. T. Dissecting genomic hotspots underlying seed protein, oil, and sucrose content in an interspecific mapping population of

soybean using high-density linkage mapping. **Plant Biotechnology Journal** v. 16, n. 11, p. 1939-1953, 2018.

PHAM, A. T.; LEE, J. D.; SHANNON, J. G.; BILYEU, K. D. Mutant alleles of FAD2-1A and FAD2-1B combine to produce soybeans with the high oleic acid seed oil trait. **BMC Plant Biology**, v. 10, n. 1, p. 195, 2010.

PHAM, A. T.; LEE, J. D.; SHANNON, J. G.; BILYEU, K. D. A novel FAD2-1 A allele in a soybean plant introduction offers an alternate means to produce soybean seed oil with 85% oleic acid content. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 123, n. 5, p. 793-802, 2011.

SALES-CAMPOS, H., SOUZA, P. R.; PEGHINI, B. C.; DA SILVA J. S.; CARDOSO, C. R. An overview of the modulatory effects of oleic acid in health and disease. **Mini-Reviews Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 201-210, 2013.

SANTOS, E. M.; PIOVESAN, N. D.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Low linolenic soybeans for biodiesel: Characteristics, performance and advantages. **Fuel**, v. 104, p. 861-864, 2013.

WANG, Y.; CHEN, P.; ZHANG, B. Quantitative trait loci analysis of soluble sugar contents in soybean. **Plant Breeding**, v. 133, n. 4, p. 493-498, 2014.

WEBER, H. Fatty acid-derived signals in plants. **Trends in Plant Science**, v.7, p.217-224, 2002.

WOYANN, L. G.; MEIRA, D.; ZDZIARSKI, A. D.; MATEI, G.; MILIOLI, A. S.; ANA CLAUDIA ROSA, A. C.; MADELLA, L. A.; BENIN, G. Multiple-trait selection of soybean for biodiesel production in Brazil. **Industrial Crops and Products**, v.140, 2019.

CAPÍTULO 1

Development of new genotyping assays for high oleic acid in soybeans

Abstract

Soybean is the primary oilseed globally, serving as a significant raw material in the production of soy-based foods and biodiesel. The quality of soybean oil hinges on its fatty acid composition, and a high oleic acid content is particularly desirable for its enhanced stability and prevention of undesirable compound formation. Mutated alleles within the GmFAD2-1A and GmFAD2-1B genes contribute to elevated oleic acid levels, and molecular markers have proven successful in enhancing soybean oil quality. However, challenges have emerged in implementing these assays, underscoring the need for the development of efficient and accessible genotyping assays for any soybean breeding program. In this study, we successfully developed and validated CAPS and Taqman genotyping assays to identify and discriminate mutant alleles of FAD2-1A (source PI603452) and FAD2-1B (source PI283327). This advancement allows for the improvement of soybean oil composition through Marker-assisted selection in any laboratory and paves the way for the efficient development of soybean varieties with high oleic acid content.

Keywords: Oleic acid; oxidative stability; Marker-assisted selection.

1.1. Introduction

Soybean (*Glycine max* L. Merrill) stands as the predominant oilseed globally, with its seeds containing approximately 20% lipids, 40% proteins, and around 30% carbohydrates. Its remarkable versatility renders it a compelling raw material in the food and feed industries. As such, soybean not only fulfills the nutritional requirements of both humans and animals but also assumes a crucial role in the chemical and health-related sectors (SONG et al., 2023).

The quality of soybean oil, including its physical-chemical properties such as melting point and oxidative stability, is determined by the composition of its fatty acids (FEHR, 2007). Typically, soybean oil exhibits a fatty acid profile comprising 13% palmitic acid (16:0), 4% stearic acid (18:0), 20% oleic acid (18:1), 55% linoleic acid (18:2), and 8% linolenic acid (18:3) (PHAM et al., 2010; GOETTEL et al., 2014; SILVA et al., 2018; ZHANG et al., 2018)

High levels of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are associated with a reduction in oxidative stability, attributed to the susceptibility of the double bonds in the carbon chains to oxidative attack. This susceptibility, in turn, influences the overall quality of the oil and the formation of compounds that can alter the taste and odor of food products derived from soybean (PHAM et al., 2012; WANG et al., 2014). Similarly, biodiesel produced from soybean oil with elevated levels of PUFAs tends to undergo oxidation, directly impacting properties such as cetane number, cold flow, viscosity, lubricity, and heat of combustion (SANTOS et al., 2013). The higher content of monounsaturated fatty acids in soybean seeds makes soybean oil more competitive compared to other oils, such as canola and olive oil (DO et al., 2019). This, coupled with its suitability as a raw material for biodiesel production, further enhances the versatility of soybean oil.

In the food industry, chemical hydrogenation has been extensively employed to reduce polyunsaturated fatty acids (PUFAs). However, this process results in the formation of trans isomers of fatty acids. The consumption of these compounds has been linked to elevated cholesterol levels, heart disease, and type 2 diabetes (SILVA et al., 2018). Nevertheless, through conventional breeding and genetic engineering, it has become possible to cultivate soybean varieties with reduced levels of PUFAs, thereby improving oxidative stability without resorting to chemical hydrogenation (FEHR, 2007; PHAM et al., 2014; WARNER; FEHR 2008).

The biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in soybean seeds involves the enzymes fatty acid desaturases (FAD). Specifically, the enzyme Δ 12-desaturase 2 (FAD2) catalyzes the conversion of oleic acid into linoleic acid (OKULEY et al., 1994; SCHLUETER et al., 2007). Within the soybean genome, there are seven FAD2 homologs that have diverged into two groups in the phylogenetic tree, comprising two FAD2-1s and five FAD2-2s (LAKHSSASSI et al., 2021). Of particular significance are two microsomal desaturases, FAD2-1A and FAD2-1B, which play a crucial role in controlling the level of oleic acid due to their high expression during seed development (DO et al., 2019). Consequently, the focus of most breeding programs has been on combining mutant alleles of FAD2-1A and FAD2-1B to yield oil with elevated levels of monounsaturated fatty acids.

Molecular markers have proven to be instrumental across various domains of plant breeding, enhancing the selection of individuals of interest and mitigating the need for intensive phenotyping efforts. A range of molecular markers, including random amplified DNA polymorphism (RAPD), simple sequence repeats (SSR), characterized sequence amplified regions (SCAR), cleaved amplified polymorphic sequences (CAPS/dCAPS), diversity array technology (DArT), and SNP genotyping assays such as Taqman and KASP (Kompetitive Allele Specific PCR), have found successful application in molecular plant breeding over recent decades (PATIL et al., 2017).

Therefore, a spectrum of technologies exists, ranging from the most robust to the simplest, each with its own set of advantages and disadvantages. The choice between them depends on the study's objectives, available infrastructure, financial resources for investment, the presence of appropriately trained human resources, and the level of knowledge regarding the molecular genetics of the studied species. In light of these considerations, the present study tested and developed genotyping assays for identifying high oleic acid content in soybean genotypes.

1.2. Material and Methods

1.2.1. Plant Material and DNA extraction

The materials used were developed by the Soybean Quality Traits Breeding Program (PMQS-UFV). The mutations in FAD2-1A and FAD2-1B genes originate from accessions PI603452 and PI283327, respectively. The mutation present in PI603452 consists of the deletion of an adenosine in position 544/545 in an exon region of the FAD2-1A gene, and the mutation in PI283327 consists of a missense mutation (C>G) in position 410 of the coding region of the FAD2-1B gene (PHAM et al., 2010; 2011). The crossing between these two accessions gave rise to PL04, which has around 80% oleic acid and was used as an allele donor. Materials resulting from crosses between PL04 and different soybean genotypes with superior agronomic characteristics (UFVS-MB1, SUPREMA, UFVS77C10, UFVS-MB2) were used to validate the markers for high oleic acid content.

Leaf samples were collected individually and stored in a -80° freezer. Genomic DNA was extracted following the methodology proposed by King et al. (2014). DNA concentration was determined using the NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) and quality was checked by 0.8% agarose gel electrophoresis.

1.2.2. Genotyping using KASP

KASP genotyping assays developed by Patil et al. (2017), for high oleic acid content, were used to detect SNPs present in FAD2-1A (Glyma10g42470) and FAD2-1B (Glyma20G24530). The assays were performed with a reaction system that included 2.5 µL of genomic DNA (20 ng/µL), 2.5µL of 2x Master Mix and 0.07µL of the primer mix. The PCR condition for the KASP assay was 1 cycle of 94°C for 15 minutes, 10 cycles of 94°C for 20 seconds, with a gradient of 61-55°C, decreasing 0.6°C every 60 seconds, 30 cycles of 94°C for 20 seconds and 55°C for 60 seconds, and a cycle of 37°C for 60 seconds. The experiment was conducted on the Real Time PCR 7500 Systems equipment (Applied Biosciences) and the genotypes were identified using Software 7500 version 2.3.

1.2.3. Genotyping using CAPS

The CAPS (cleaved amplified sequences) assay consists of a two-step method, in which DNA is first amplified by PCR and then the PCR products are digested with restriction enzymes. This assay was performed only for genotyping the SNP present in the FAD2-1B gene. The primers used for PCR were designed based on the gene sequence (Glyma20G24530), available in the SoyBase database (USDA). The set of primers were: forward GCCTCTCTCAAGGGTTCC; reverse GACCATCACATATCTGCAGC. The restriction enzyme used in the assay was defined using the IndCaps tool (<http://indcaps.kieber.cloudapps.unc.edu/results>).

PCR was conducted in a 15.0 μ L reaction system, consisting of 6.0 μ L of DEPC water, 2.0 μ L of DNA, 1.5 μ L of 10X buffer, 0.9 μ L of MgCl (50 mM), 1.5 of dNTPs (2.5 mM), 1.0 μ L of the forward and reverse primer mix at 10 Mm, and 0.1 μ L of Taq DNA polymerase. DNA amplification was performed in a thermocycler using the following conditions: DNA was denatured at 94°C for 3 minutes, followed by 40 cycles of denaturation at 94°C for 30 seconds, annealing at 60°C for 30 seconds, and elongation by 72°C for 1 minute. Finally, the products pass through a temperature gradient of 72°C for 10 minutes until reaching a final temperature of 4°C.

The PCR products were digested for 2 hours by the *BsmFI* enzyme, in a 20 μ L reaction, containing 2.0 μ L of 10x buffer, 1.5 μ L of PCR product, 0.6 μ L of 50X SAM buffer, 0.5 μ L of restriction enzyme and 15.4 μ L of DEPC water. The digestion products were separated on a 1.2% agarose gel and visualized under ultraviolet light.

1.2.4. Development Taqman assay

Taqman primers and probes were designed using Primer Express 3.0.1 software to detect mutant SNPs in the FAD2-1A and FAD2-1B genes using sequences obtained from the SoyBase (USDA) database. Each assay features a pair of primers and two probes containing SNPs labeled with VIC and FAM dyes. For the FAD2-1A gene, the following primers and probes were used: forward CAAAGTTGCATGGTTTTCCAAGTA; reverse ACCCTATTGTGACGAGAA; probe1/VIC CCTCTAGGATGGGCT; probe2/FAM

TCTAGGAAGGGCTGTTT, for the FAD2-1B gene: forward GCGGTGGGTGATTGCT; reverse GCGGCGATGGCTTATTTTC; probe1/VIC CACTTTTAGTCCGTTATT; probe2/FAM TAGTCCCTTATTTCTC.

PCRs were conducted in a reaction system containing 4.75 μ L of DNA (10ng/ μ L), 5 μ L of Taqman Genotyping Master Mix (Thermo Fisher Scientific) and 0.25 μ L of the assay mix (final concentration of 900nM for each primer and 200nM for each probe). PCR conditions for TaqMan marker assays were as follows: 95°C for 10 minutes, 60 cycles at 95°C for 20 seconds, and 63°C for 1 minute. Genotypes were identified using Software 7500 version 2.3.

1.2.5. Phenotyping

Fatty acids from the materials used to validate the assays were extracted using the following method: 1 mL of hexane was added to 15 mg of soybean seed powder, mixed with N₂ and stored at 4 °C for 16 h. The hexane solution was collected in another tube and evaporated. Then, 0.4 mL of 1M sodium methoxide was added to the tube, shaken, and incubated at 30°C for 1 h. Then 1 mL of DEPC water and 1 mL of hexane were added, shaken and incubated at room temperature for 1 h. Finally, 0.75 mL of the organic phase was collected, added to anhydrous sodium sulfate to remove moisture and transferred to a test tube. Fatty acid composition was performed by gas chromatography using Model GC-2010 Plus (Shimadzu). The results were presented as the relative percentage of each fatty acid class in the total oil fraction extracted for each sample.

1.3. Results and Discussion

The development of materials with high oleic acid content is already a reality in the American market, while in Brazil, no such varieties are yet available to producers. These materials would prove valuable across various sectors of soybean farming, with particular demand in the biodiesel industry. To address this need, our research group has been introducing these alleles into our germplasm using High Resolution Melting (HRM) markers over the years. However, the identification of individuals is not always flawless due to the

limitations of the technique, necessitating reliance on phenotyping for confirmation.

To expedite the introgression of mutated alleles into our germplasm, we initially tested KASP markers reported in the literature (Patil et al., 2017). We selected mutant, heterozygous, and wild-type individuals from our germplasm bank for the FAD2-1A and FAD2-1B alleles as a standard to assess the KASP marker developed by Patil et al. (2017). The genotyping of materials for the FAD2-1A gene resulted in the formation of three distinct groups (Figure 1a), showcasing clear discrimination of individuals for the specific SNP. However, in the KASP assay for the FAD2-1B gene, the separation of individuals proved to be imprecise, and distinguishing heterozygotes from mutated individuals was not possible (Figure 1b).

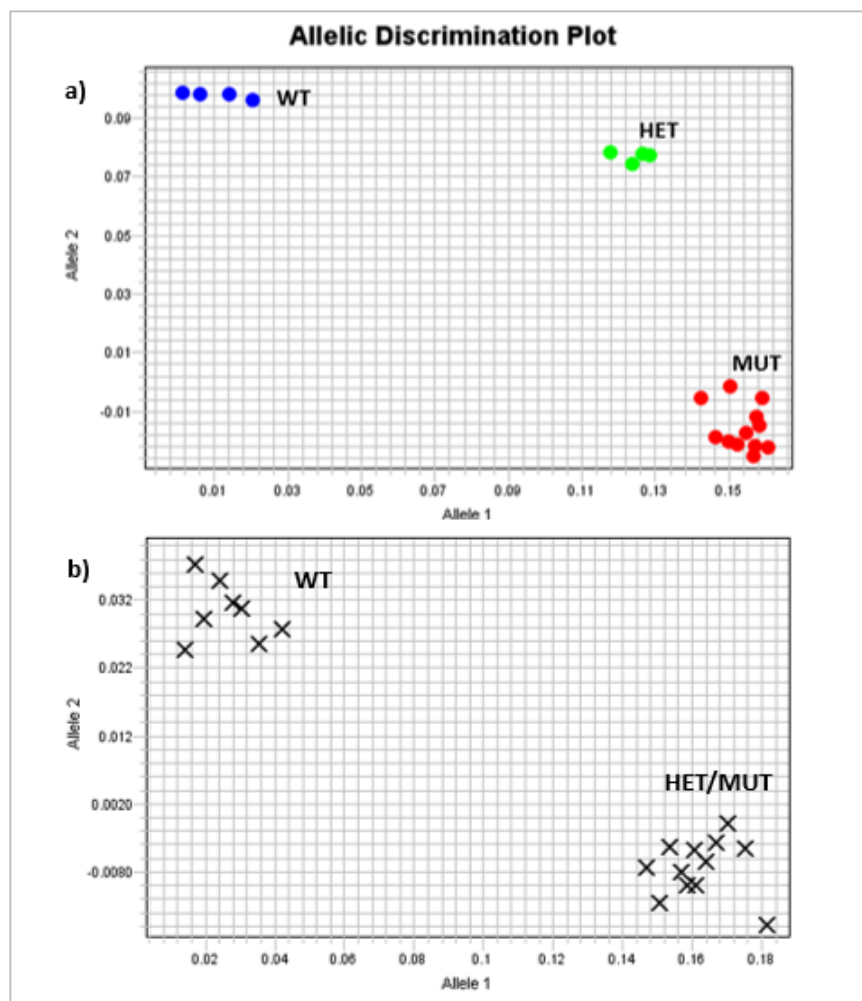


Figure 1. KASP genotyping assay for the SNP of the FAD2-1A gene (a) and FAD2-1B (b). The x-axis represents the fluorescence data for the mutant alleles, while the y-axis represents the fluorescence data for the wild-type alleles. MUT – mutant

homozygous genotypes; HET – heterozygous genotypes; WT – wild-type homozygous genotypes (in the KASP assay for the FAD2-1B gene it was not possible to distinguish the heterozygous genotypes from the mutant genotypes).

In Patil et al. (2017) certain KASP assays encountered challenges in separating heterozygous and mutated individuals, which they addressed by optimizing the reaction with additional thermal cycles. Despite our attempts to modify the number of thermal cycles, we did not achieve the same result, as a clear separation of heterozygous individuals from mutated ones could not be observed. It's noteworthy that one of the primary challenges in our HRM diagnoses was precisely the inaccuracy in differentiating alleles of the FAD2-1B gene (SILVA, 2017). Despite this obstacle, the KASP assay demonstrated efficiency in genotyping individuals for the FAD2-1A gene, with a precise separation of wild-type, heterozygous, and mutant individuals (Figure 1a).

To address the genotyping challenges associated with the SNP in the FAD2-1B gene, we developed a CAPS marker—a simple and efficient alternative based on PCR followed by restriction enzyme digestion. The designed set of primers for the FAD2-1B gene successfully amplified a 761bp fragment. In mutated genotypes, a cut site for the *BsmFI* enzyme is present, resulting in two fragments of 398bp and 363bp. Conversely, non-mutated genotypes exhibit two cut sites, yielding three fragments of 363bp, 320bp, and 78bp. The latter fragment, being very small, is not visualized in the gel. Heterozygous individuals, on the other hand, display three fragments—398bp, 363bp, and 320bp—as depicted in Figure 2.



Figure 2. CAPS assay developed for the SNP present in the FAD2-1B gene. The individuals PI283327 (mutant - GG), PI603452 (wild-type - CC) and B61-F1-45 (heterozygous - CG) were used as controls. The mutant genotypes showed fragments of 398bp and 363bp, the wild-type showed fragments of 78bp (not visible on the gel), 320bp and 363bp and the heterozygous showed fragments of 398bp, 363bp and 320bp.

CAPS markers were successfully developed for the SNP present in the FAD2-1B gene, and the electrophoretic profile in agarose gel allowed a clear differentiation between wild-type, mutant, and heterozygous materials. Several studies have also demonstrated the efficacy of the CAPS assay for marker-assisted selection in various crops (KUSHANOV et al., 2016; LESTARI; KOH, 2013; WANG et al., 2017). While many new SNP genotyping assays rely on sophisticated detection methods requiring expensive instruments, the CAPS assay stands out for its simplicity. The digestion of PCR products and subsequent separation of fragments in agarose gel is an approach that can be easily executed in any laboratory equipped with basic molecular tools, yielding accurate and clear results. Thus, CAPS emerges as an effective tool for both molecular genetic studies and plant breeding.

We also developed a Taqman assay to provide a quick and efficient method for genotyping SNPs. The test was conducted to identify mutations in both the FAD2-1A and FAD2-1B genes, using the same materials employed in the KASP and CAPS assays. The Taqman assay demonstrated robustness in discriminating individuals for the SNPs in both genes (Figure 3). We observed the formation of three distinct groups comprising mutant, heterozygous, and wild-type individuals for both genes. The results obtained through the Taqman assay showed perfect alignment with those of the KASP and CAPS assays, underscoring its efficiency.

The Taqman methodology has found application in other studies associating SNPs with fatty acid levels in soybeans (BACHLEDA et al., 2016; PHAM et al., 2014; SILVA et al., 2018), establishing itself as a robust tool for groups engaged in large-scale genotyping.

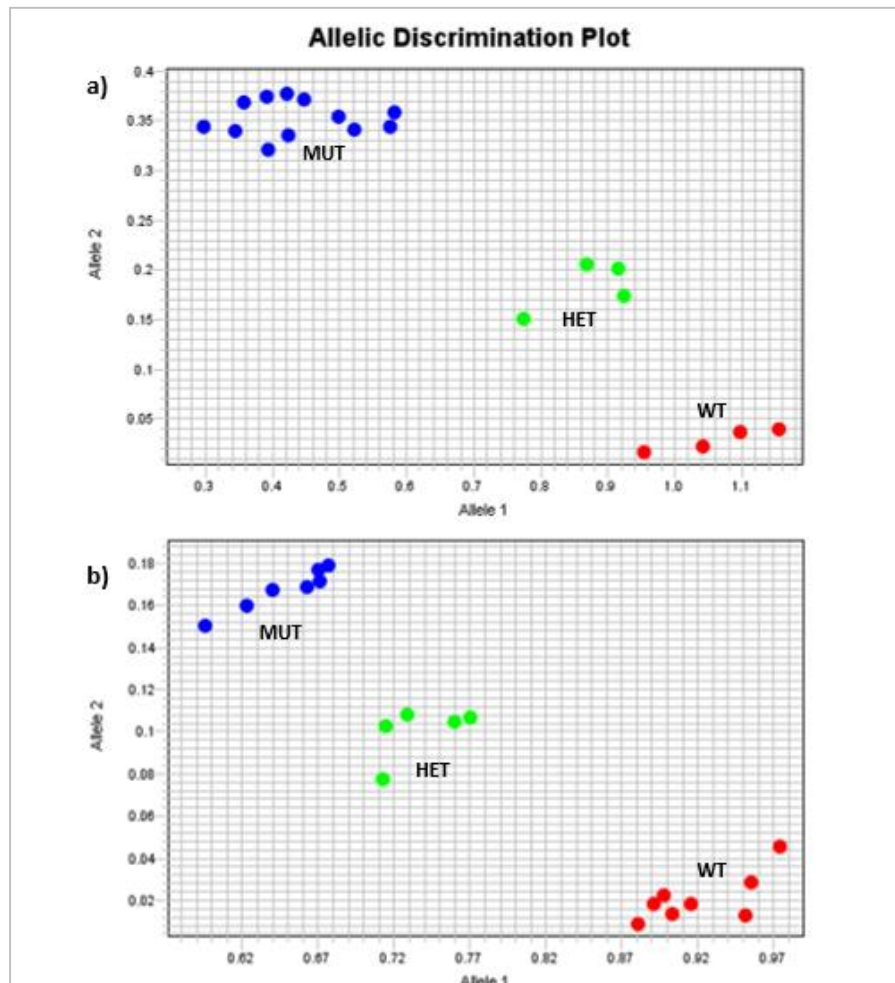


Figure 3. Taqman genotyping assay for FAD2-1A (a) and FAD2-1B (b) genes. The X-axis represents fluorescence data for wild-type alleles, while the Y-axis represents fluorescence data for mutant alleles. MUT – mutant homozygous genotypes; HET – heterozygous genotypes; WT – wild-type homozygous genotypes.

To validate these marker assays, we conducted an association analysis of oleic acid content using material genotyped for mutations in the FAD2-1A and FAD2-1B genes (Table 1). Individuals with wild-type alleles for both genes exhibited oleic acid levels ranging from 23.28% to 37.74%, values consistent with oleic acid levels in conventional soybean varieties. Those heterozygous for one of the alleles displayed intermediate oleic acid content. Notably, individuals with combined FAD2-1A and FAD2-1B mutations demonstrated high oleic acid levels, exceeding 85%. Similar oleic acid content has been reported in previous studies employing a combination of these mutations (HOSHINO et al., 2010; PHAM et al., 2010; 2012). The results presented here validate the efficiency of the

developed assays, demonstrating their utility and reliability in genotyping soybean varieties for high oleic acid content. This inclusivity ensures the efficient development of soybean varieties with elevated oleic acid content without phenotyping procedures and errors identifying FAD2-1B allele.

Table 1. Fatty acid profile and genotyping of materials using KASP, CAPS and Taqman assays.

MATERIALS	PHENOTYPING					KASP		CAPS	Taqman	
	PALMITIC ACID	STEARIC ACID	OLEIC ACID	LINOLEIC ACID	LINOLENIC ACID	FAD2-1A	FAD2-1B	FAD2-1B*	FAD2-1A	FAD2-1B
UFVS77C10	8,71%	3,27%	37,74%	46,57%	3,71%	WT	WT	WT	WT	WT
UFVS-MB	11,73%	3,9%	23,28%	55,99%	5,08%	WT	WT	WT	WT	WT
6003 7919	6,94%	2,57%	85,95%	2,31%	2,23%	M	H/M	M	M	M
6007 7461	6,72%	3,01%	85,89%	2,31%	2,05%	M	H/M	M	M	M
6007 7464	6,15%	2,81%	86,62%	2,23%	2,19%	M	H/M	M	M	M
6008 6468	6,45%	2,84%	86,07%	2,39%	2,25%	M	H/M	M	M	M
6009 62103	6,6%	2,67%	86,74%	1,96%	2,04%	M	H/M	M	M	M
UFVSMB1-1	6,76%	2,64%	86,11%	2,15%	2,35%	M	H/M	M	M	M
UFVSMB1-2	8,9%	3,32%	50,15%	32,17%	5,46%	M	H/M	H	M	H
UFVSMB1-6	6,25%	3,29%	87,13%	1,99%	1,35%	M	H/M	M	M	M
UFVSMB1-7	8,44%	3,6%	42,15%	40,17%	5,64%	M	H/M	H	M	H

WT: wild-type; M: mutant; H: heterozygous

* CAPS assay developed specifically for the SNP present in the FAD2-1B gene.

Supplementary material

<p>Primer F - GCCTCTCTCAAGGGTTCC</p> <p>Primer R - GACCATCACATATCTGCAGC</p>	<p>Sequences of primers Forward and Reverse for the FAD2-1B gene.</p>
<p>Wild-type - ACCGTTCACTCAGCACTTTTAGTCCCTTATTTCTCATGGAAAATAAGCCAT</p> <p>Mutant - ACCGTTCACTCAGCACTTTTAGTCCGTTATTTCTCATGGAAAATAAGCCAT</p>	
<p>GTCCC N₁₀↓</p> <p>CAGGG N₁₄↑ (<i>BsmFI</i> restriction site)</p>	

Sequences of forward and reverse primers for the FAD2-1B gene, and *BsmFI* enzyme restriction site.

REFERENCES

BACHLEDA, N.; PHAM, A. T.; LI, Z. Identifying FATB1a deletion that causes reduced palmitic acid content in soybean N87-2122-4 to develop a functional marker for marker-assisted selection. **Molecular Breeding**, v.4, p.36-45, 2016.

DO, P. T.; NGUYEN, C. X.; BUI, H. T.; TRAN, L. T. N.; STACEY, G.; GILLMAN, J. D.; ZHANG, Z. J.; STACEY, M. G. Demonstration of highly efficient dual gRNA CRISPR/Cas9 editing of the homeologous GmFAD2-1A and GmFAD2-1B genes to yield a high oleic, low linoleic and α -linolenic acid phenotype in soybean. **BMC Plant Biology**, v. 15, n. 19, p. 311, 2019.

FEHR, W. R. Breeding for modified fatty acid composition in soybean. **Crop Science**, v. 47, n. 3, p. 72-87, 2007.

GOETTEL, W.; XIA, E.; UPCHURCH, R.; WANG, M. L.; CHEN, P.; CHARLES AN, Y. Q. Identification and characterization of transcript polymorphisms in soybean lines varying in oil composition and content. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 299, 2014.

HOSHINO, T.; TAKAGI, Y.; ANAI, T. Novel *GmFAD2-1b* mutant alleles created by reverse genetics induce marked elevation of oleic acid content in soybean seeds in combination with *GmFAD2-1a* mutant alleles. **Breed Science**, v. 60, p.419-425, 2010.

KING, Z.; SERRANO, J.; BOERMA, H. R.; LI, Z. Non-toxic and efficient DNA extractions for soybean leaf and seed chips for high-throughput and large-scale genotyping. **Biotechnology Letters**, v. 36, n. 9, p. 1875-1879, 2014.

KUSHANOV, F. N.; PIMENTA, A. E.; YU, J. Z.; BURIEV, Z. T.; SHERMATOV, S. E.; SAHA, S.; ULLOA, M.; JENKINS, J. N.; ABDUKARIMOV, I. Y. Development, genetic mapping and QTL association of cotton *PHYA*, *PHYB*, and *HY5*-specific CAPS and dCAPS markers. **BMC Genetics**, v.17, p. 141, 2016

LAKHSSASSI, N.; LOPES-CAITAR, V. S.; KNIZIA, D.; CULLEN, M. A.; BADAD, O.; EL BAZE, A.; ZHOU, Z.; EMBABY, M. G.; MEKSEM, J.; LAKHSSASSI, A. TILLING-by-Sequencing(+) Reveals the Role of Novel Fatty Acid Desaturases (GmFAD2-2s) in Increasing Soybean Seed Oleic Acid Content. **Cells**, v.10, p. 1245, 2021.

OKULEY, J.; LIGHTNER, J.; FELDMANN, K.; YADAV, N.; LARK, E.; BROWSE, J. Arabidopsis FAD2 gene encodes the enzyme that is essential for polyunsaturated lipid synthesis. **Plant Cell**, v.6, p.147-158, 1994.

PATIL, G.; CHAUDHARY, J.; VUONG, T.D.; JENKINS, B.; QIU, D.; KADAM S.; SHANNON, G.J.; NGUYEN, H. T. Development of SNP Genotyping Assays for Seed Composition Traits in Soybean. **International Journal Plant Genomics**. p. 1-12, 2017.

PHAM, A. T.; BILYEU, K.; CHEN, P.; BOERMA, H. R.; LI, Z. Characterization of the fan1 locus in soybean line A5 and development of molecular assays for high-throughput genotyping of FAD3 genes. **Molecular breeding**, v. 33, n. 4, p. 895-907, 2014.

PHAM, A. T.; LEE, J. D.; SHANNON, J. G.; BILYEU, K. D. Mutant alleles of FAD2-1A and FAD2-1B combine to produce soybeans with the high oleic acid seed oil trait. **BMC Plant Biology**, v. 10, n. 1, p. 195, 2010.

PHAM, A. T.; LEE, J. D.; SHANNON, J. G.; BILYEU, K. D. A novel FAD2-1 A allele in a soybean plant introduction offers an alternate means to produce soybean seed oil with 85% oleic acid content. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 123, n. 5, p. 793-802, 2011.

PHAM, A. T.; SHANNON, J. G.; BILYEU, K. D. Combinations of mutant FAD2 and FAD3 genes to produce high oleic acid and low linolenic acid soybean oil. **Theoretical and Applied Genetics**, v.125, n. 3, p. 503-515, 2012.

LESTARI, P.; KOH, H. J. Development of New CAPS/dCAPS and SNAP Markers for Rice Eating Quality. **HAYATI Journal of Biosciences**, v.20, p.15-23, 2013.

SANTOS, E. M.; PIOVESAN, N. D.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Low linolenic soybeans for biodiesel: Characteristics, performance and advantages. **Fuel**, v. 104, p. 861-864, 2013.

SCHLUETER, J. A.; VASYLENKO-SANDERS, I. F.; DESHPANDE, S.; YI J.; SIEGFRIED, M.; ROE, B. A.; SHLUETER, S. D.; SHEFFLER, B. E.; SHOEMAKER, R. C. The FAD2 gene family of soybean: insights into the structural and functional divergence of a paleopolyploid genome. **Plant Genome**, v. 47, p.14-26, 2007.

SILVA, L. C. C. Caracterização molecular de alelos associados à qualidade do grão da soja. 2017. 117f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2017.

SILVA, L. C. C.; BUENO, R. D.; MATTA, L. B.; PEREIRA, P. H. S.; MAYRINK, D. B.; PIOVESAN, N. D.; SEDIYAMA, C. S.; FONTES, E. P. B., CARDEAL, A. J.; DAL-BIANCO, M. Characterization of a new GmFAD3A allele in Brazilian CS303TNKCA soybean cultivar. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 131, n. 5, p. 1099-1110, 2018.

SONG, H.; TAYLOR, D.C.; ZHANG, M. Bioengineering of Soybean Oil and Its Impact on Agronomic Traits. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 3, p. 2256, 2023.

WANG, Y.; CHEN, P.; ZHANG, B. Quantitative trait loci analysis of soluble sugar contents in soybean. **Plant Breeding**, v. 133, n. 4, p. 493-498, 2014.

WANG, Y.; LIU, W.; XU, L.; WANG, Y.; CHEN, Y.; LUO, X.; TANG, M.; LIU, L. Development of SNP markers based on transcriptome sequences and their application in germplasm identification in radish (*Raphanus sativus* L.). **Molecular Breeding**, v.37, 2017.

WARNER, K.; FEHR, W. Mid-oleic/ultra low linolenic acid soybean oil: a healthful new alternative to hydrogenated oil for frying. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 85, p. 945-951, 2008.

CAPÍTULO 2

Desenvolvimento de soja alto oleico por meio de retrocruzamentos assistidos

2.1. INTRODUÇÃO

A soja é a principal oleaginosa cultivada no mundo e é valorizada tanto pelo seu conteúdo de proteína quanto de óleo. O óleo de soja é amplamente utilizado na indústria alimentícia, assim como na produção de biodiesel. Existem cinco ácidos graxos comuns no óleo de soja, incluindo aproximadamente 13% de ácido palmítico (16:0), 4% de ácido esteárico (18:0), 20% de ácido oleico (18:1), 55% de ácido linoleico (18:2) e 8% ácido linolênico (18:3) (PHAM et al., 2010; SONG et al., 2023). A concentração relativamente alta dos ácidos linoleico e linolênico causa instabilidade oxidativa, influenciando na qualidade do óleo de soja e nos alimentos processados derivados da soja. Como forma de reduzir esses ácidos graxos poli-insaturados, o óleo de soja é parcialmente hidrogenado, porém este processo aumenta significativamente a formação de gorduras *trans* que causa sérios problemas de saúde (DO et al., 2019). Além disso, na produção do biodiesel a baixa estabilidade do óleo, afeta o número de cetano, limitando diretamente seu uso como biocombustível (MURAD et al., 2014). Portanto, o óleo de soja com alto teor de ácido oleico e baixo teor de linoleico e linolênico é desejado porque os ácidos graxos monoinsaturados não apenas proporcionam maior estabilidade oxidativa, mas também eliminam a necessidade de produção de gordura *trans*. Neste sentido, o melhoramento genético da soja para aumentar o teor de ácido oleico e reduzir os ácidos graxos poli-insaturados é uma alternativa interessante para produzir óleo de soja com maior estabilidade oxidativa e qualidade nutricional.

A enzima $\Delta 12$ -dessaturase 2 (FAD2) catalisa a conversão de ácido oleico em ácido linoleico (OKULEY et al., 1994; SCHLUETER et al., 2007). A perda da função enzimática reduz quantidades relativas de ácidos linoleico e linolênico simultaneamente com maior acúmulo de ácido oleico (DO et al., 2019). Durante o desenvolvimento da semente, dois genes que codificam FAD2-1A e FAD2-1B são os principais responsáveis pela transformação do ácido oleico em ácido linoleico e a combinação de mutações presentes nestes genes é o fator chave para aumentar o teor de ácido oleico em sementes de soja (NAN et al., 2020). Pham et al. (2010) caracterizaram uma mutação (C>G) no acesso PI283327 na

posição 410 da região codificante do gene FAD2-1B, resultando na troca de um resíduo de prolina por outro de arginina. Posteriormente, Pham et al. (2011) identificaram uma deleção de uma adenosina na posição 545/546 numa região de exón do gene FAD2-1A do acesso PI603452 levando a um stop códon prematuro, após 191 aminoácidos. A combinação destas duas mutações produziu sementes de soja com níveis de ácido oleico variando entre 83,9% e 86,4% em média, em um experimento avaliado em dois ambientes (PHAM et al., 2011).

O método de retrocruzamento é muito utilizado em programas de melhoramento com o objetivo de transferir um ou poucos alelos de interesse de um dos genitores (doador) para o genitor recorrente, que geralmente é uma cultivar elite e após sucessivas gerações de retrocruzamentos é possível desenvolver uma nova planta semelhante ao genitor recorrente na maioria das características, mas portando o fenótipo melhorado para a característica alvo (BORÉM et al. 2017). Além disso, o uso concomitante de marcadores moleculares pode abreviar o número de gerações de retrocruzamentos, acelerando o processo de introgressão dos genes de interesse (TANKSLEY et al., 1989). Portanto, o uso de retrocruzamentos assistidos por marcadores (RAM) para a introgressão de mutações que controlam os níveis de ácidos graxos em soja, é uma estratégia promissora para produzir cultivares de soja com características que atendam a diferentes demandas do mercado. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi iniciar programas de retrocruzamentos assistidos por marcadores para o desenvolvimento de cultivares de soja com alto teor de ácido oleico.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. MATERIAL GENÉTICO E EXTRAÇÃO DE DNA

Os materiais utilizados como doadores são resultantes de programas de retrocruzamentos desenvolvidos anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa para alto teor de ácido oleico. Estes materiais são provenientes do cruzamento entre PL04 que foi originada dos acessos PI603452 e PI283327 (alto teor de oleico), com diferentes variedades de soja com características de interesse (TMG4182, CS303TNKCA). Os genótipos provenientes do cruzamento entre PL04 e TMG4182, foram nomeados como UFVSTAO, e os provenientes de PL04

e CS3030TNKCA, nomeados como CS-AO. A fenotipagem destes materiais mostrou níveis superiores a 85% de ácido oleico.

Para o novo programa de retrocruzamento foram utilizados como genitores recorrentes o materiais UFVS77C10 e UFVS-MB. A variedade UFVS77C10 é uma variedade registrada resultado do melhoramento ao longo dos anos pelo programa de melhoramento da qualidade da soja – PMQS/BIOAGRO/UFV e tem como principal característica ciclo precoce, ausência de gene transgênico e alta produtividade no estado de Mato Grosso. Já a linhagem UFV-MB ainda está em desenvolvimento pelo programa, mas com alto potencial produtivo, maior teor de proteínas e resistência a nematoides.

Amostras foliares foram coletadas individualmente e armazenadas em freezer -80°. O DNA genômico foi extraído seguindo a metodologia proposta por King et al. (2014). A concentração de DNA foi determinada por meio do espectrofotômetro NanoDrop (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) e a qualidade verificada por eletroforese em gel de agarose a 0,8%.

2.2.2. GENOTIPAGEM DOS MATERIAIS

A genotipagem dos materiais foi realizada por meio do ensaio Taqman. Para o gene FAD2-1A foram utilizados os seguintes primers e sondas: forward CAAAGTTGCATGGTTTTCCAAGTA; reverse ACCCTATTGTGACGAGAA; Sonda1/VIC CCTCTAGGATGGGCT; Sonda2/FAM TCTAGGAAGGGCTGTTT, para o gene FAD2-1B: forward GGCGTGGGTGATTGCT; reverse GCGGCGATGGCTTATTTTC; Sonda1/VIC CACTTTTAGTCCGTTATT; Sonda 2/FAM TAGTCCCTTATTTCTC. As PCRs foram conduzidas num sistema de reação, contendo 4,75 µL de DNA (10ng/µL), 5 µL de Taqman Genotyping Master Mix (Thermo Fisher Scientific) e 0,25 µL do mix de ensaio (concentração final de 900nM para cada primer e 200nM para cada sonda). As condições de PCR para ensaios de marcadores TaqMan foram as seguintes: 95 °C por 10 minutos, 60 ciclos a 95°C por 20 segundos e 63°C por 1 minuto. Os genótipos foram identificados utilizando o Software 7500 versão 2.3.

2.2.3. PROGRAMA DE RETROCRUZAMENTOS ASSISTIDO POR MARCADORES

Os cruzamentos iniciais e retrocruzamentos foram realizados em casa de vegetação e as sementeiras para o genitor recorrente foram escalonadas para conseguir o máximo de coincidência de florescimento para os dois genitores. Os plantios foram realizados em vasos com solo adubado e foram plantadas três sementes para cada variedade do genitor recorrente, em um período mínimo de três semanas. Após uma semana do primeiro plantio, os genitores doadores foram plantados em vasos contendo duas sementes cada. Foram desenvolvidos dois programas de retrocruzamentos, um para cada variedade a ser melhorada, conforme mostra a figura 1.

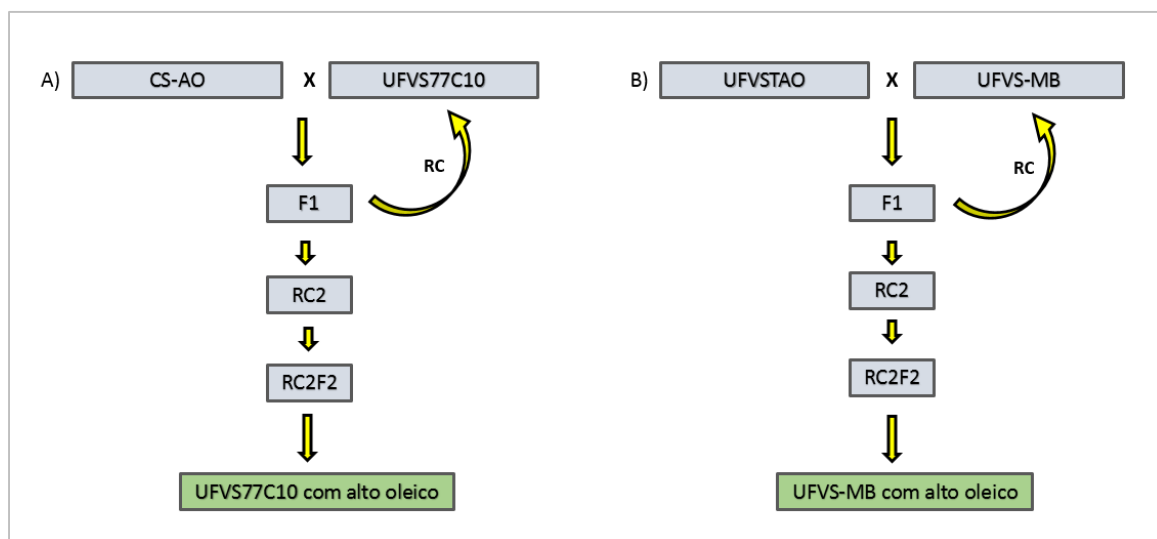


Figura 1. A) Esquema do programa de retrocruzamento assistido para a variedade UFVS77C10, CS-AO: planta doadora de alelos para alto oleico (derivados da PL04 e CS303TNKCA); B) Esquema do programa de retrocruzamento para a variedade UFVS-MB. Planta UFVSTAO: planta doadora de alelos para alto oleico (derivados da PL04 e TMG4182).

Para estimar o número de cruzamentos necessários em cada programa de retrocruzamentos, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$C = 1 - (1 - p)^n$$

onde c é a certeza de se encontrar pelo menos uma planta contendo o genótipo de interesse, considerando o número de plantas avaliadas; p é a probabilidade de uma planta conter o genótipo desejado e n é o número de plantas avaliadas.

Estabelecendo um valor de certeza (c), é possível, aplicando logaritmo, determinar o número mínimo de plantas a serem avaliadas para encontrar o valor de certeza, dada a probabilidade de se encontrar o genótipo desejado em um cruzamento (SILVA, 2017).

Os cruzamentos foram realizados conforme descrito por Borém et al. (2009) e as flores polinizadas foram etiquetadas para indicação de cada um dos cruzamentos. Posteriormente, as vagens resultantes foram colhidas separadamente daquelas geradas por autofecundação. Para a execução do primeiro ciclo de retrocruzamentos, o esquema de plantio foi realizado conforme descrito acima e plantas F1 originadas foram genotipadas por meio do ensaio Taqman, com o objetivo de confirmar os cruzamentos e a presença dos alelos de interesse. As plantas F1 que se mostraram heterozigotas para os alelos presentes nos genes FAD2-1A e FAD2-1B foram selecionadas para a realização da primeira geração de retrocruzamentos (RC1) e as demais plantas foram descartadas. Este processo foi repetido para todas as gerações de retrocruzamentos.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em programas de retrocruzamentos é importante avaliar o número de plantas geradas em cada ciclo, pois a quantidade vai afetar diretamente a eficiência e velocidade do programa. Quanto maior o número de plantas, maior será a chance de encontrar indivíduos com os genes de interesse. Neste sentido, utilizamos uma fórmula para determinar o número necessário de plantas geradas em um cruzamento, para se ter 90% ou 95% de certeza de ser encontrada ao menos uma planta contendo alelos favoráveis para todos genes envolvidos no programa de retrocruzamentos. Como os nossos programas de retrocruzamentos envolve dois genes (FAD2-1A e FAD2-1B), a cada geração são necessárias nove plantas por cruzamento para se ter 90% de certeza que pelo menos uma delas seja heterozigota, e onze plantas para se obter 95% de certeza.

Em um cruzamento, o indivíduo F1 apresenta 50% do genoma de cada genitor, e a proporção de genes do genitor doador é reduzida à metade após cada geração de retrocruzamentos (BORÉM et al. 2017). Sendo assim, após a

geração RC1, espera-se que uma planta possua 25% de genoma doador, e conseqüentemente 75% do genoma recorrente. Seguindo este raciocínio espera-se 87,5% do genoma recorrente em plantas da geração RC2, 93,75% na geração RC3 e 96,875% na geração RC4, e assim por diante. Song et al. (2014) realizaram cruzamentos entre a linha doadora RiB e a cultivar chinesa DN47 com o objetivo de desenvolver variedades de soja com ausência da subunidade α da β -conglucina, e com apenas duas gerações de retrocruzamentos foi possível obter uma média de 90,58% de recuperação do genitor recorrente. Em um estudo com o intuito de desenvolver variedades de soja sem o inibidor de tripsina Kunitz, foi observado plantas com 98,92% de recuperação do genoma do genitor recorrente, com duas gerações de retrocruzamentos, sendo um valor superior ao teoricamente esperado (87,25%) (MARANNA et al., 2016). De forma semelhante, Rawal et al. (2020) com apenas dois ciclos de retrocruzamento obtiveram genótipos de soja sem lipoxigenase 2, e exibiram conteúdo de genoma parental recorrente na faixa de 97,66 – 98,66%. À vista disso, optamos pela realização de duas gerações de retrocruzamentos para a condução de nossos programas de RAM.

Os programas de retrocruzamentos para as variedades UFVS77C10 e UFVS-MB já foram avançadas até a geração RC1. Os materiais foram genotipados (Tabela 1) e aqueles que se apresentaram heterozigotos para ambos os genes, foram selecionados para o próximo de ciclo de retrocruzamentos. Os cruzamentos para a geração RC2 foram realizados em novembro de 2023, e têm previsão de colheita para fevereiro e março de 2024.

Retrocruzamentos assistidos por marcadores tem sido uma estratégia eficiente no melhoramento de plantas, pois permite a introgressão de um ou poucos alelos de interesse em cultivares superiores e tem sido utilizado com sucesso no melhoramento de soja (MARANNA et al., 2016; RAWAL et al., 2020; SONG et al., 2014). Neste trabalho foram iniciados programas de retrocruzamentos assistidos por marcadores para introgridir a característica alto oleico em diferentes variedades de soja. O desenvolvimento de cultivares de soja alto oleico é de grande importância para produzir óleo de soja com maior estabilidade oxidativa e qualidade nutricional, possibilitando atender as diferentes demandas do mercado.

Tabela 1. Genotipagem dos materiais provenientes dos programas de retrocruzamentos com UFVS77C10 e UFVS-MB, para os genes FAD2-1A e FAD2-1B.

MATERIAIS (UFVS77C10)	GENOTIPAGEM		MATERIAIS (UFVS-MB)	GENOTIPAGEM	
	FAD2-1A	FAD2-1B		FAD2-1A	FAD2-1B
RC1-UFVS-52.12.1 35	S	S	RC1-B61-201.11	S	H
RC1-UFVS-52.12.1 36	H	S	RC1-B61-201.18	H	H
RC1-UFVS-52.12.1 37	H	S	RC1-B61-201.21	H	H
RC1-UFVS-52.12.1 38	H	S	RC1-B61-201.23	H	H
RC1-UFVS-52.12.1 39	H	S	RC1-B61-201.31	S	S
RC1-UFVS-52.12.1 40	S	S	RC1-B61-202.12	S	S
RC1-UFVS-52.12.1 41	H	S	RC1-B61-202.13	H	H
RC1-UFVS-52.12.1 42	H	S	RC1-B61-202.16	S	H
RC1-UFVS-52.12.1 43	S	S	RC1-B61-202.19	H	H
RC1-UFVS-52.12.1 44	H	S	RC1-B61-202.27	H	H
RC1-UFVS-52.12.1 45	S	S	RC1-B61-202.34	H	H
RC1-UFVS-52.12.1 46	H	S	RC1-B61-202.35	H	H
RC1-UFVS-01-147.1 26	H	H	RC1-B61-202.38	S	S
RC1-UFVS-01-147.2 29	H	S			
RC1-UFVS-01-147.2 30	H	H			
RC1-UFVS-01-147.2 31	H	S			
RC1-UFVS-01-147.2 32	H	S			

M: mutado, H: heterozigoto e S: selvagem.

2.4. CONCLUSÃO

O programa de retrocruzamentos assistidos por marcadores é um método eficiente para a incorporação de novos alelos em cultivares de soja, visando a produção de soja com alto teor de ácido oleico.

2.5. PERSPECTIVAS

- Realizar novas gerações de retrocruzamentos para as cultivares UFVS77C10 e UFVS-MB, visando alcançar a geração RC2;
- Produzir as gerações RC2F2 e identificar as linhagens homozigotas para as mutações introgrididas;
- Avaliar as linhagens em ensaios de campo para identificar aquelas mais promissoras para serem lançadas novas cultivares;

REFERÊNCIAS

BORÉM, A., MIRANDA, G. V., FRITSCHÉ-NETO, R. **Melhoramento de Plantas**. 7.ed. Viçosa: Editora UFV, 2017. 543p.

DO, P. T.; NGUYEN, C. X.; BUI, H. T.; TRAN, L. T. N.; STACEY, G.; GILLMAN, J. D.; ZHANG, Z. J.; STACEY, M. G. Demonstration of highly efficient dual gRNA CRISPR/Cas9 editing of the homeologous GmFAD2-1A and GmFAD2-1B genes to yield a high oleic, low linoleic and α -linolenic acid phenotype in soybean. **BMC Plant Biology**, v. 15, n. 19, p. 311, 2019.

MARANNA, S.; VERMA, K.; TALUKDAR, A.; LAL, S. K.; KUMAR, A.; MUKHERJEE, K. Introgression of null allele of Kunitz trypsin inhibitor through marker-assisted backcross breeding in soybean (*Glycine max* L. Merr.). **BMC Genetics**, v. 17, n. 1, p. 106, 2016.

MURAD, A.M.; VIANNA, G.R.; MACHADO, A.M.; CUNHA, N. B.; COELHO, C. M.; LACERDA, V. A. M.; COELHO, M. C.; RENCH, E. L. Mass spectrometry characterisation of fatty acids from metabolically engineered soybean seeds. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.406, p. 2873-2883, 2014.

NAN, H.; LU, S.; FANG, C.; HOU, Z.; YANG, C.; ZHANG, Q.; LIU, B.; KONG, F. Molecular breeding of a high oleic acid soybean line by integrating natural variations. **Molecular Breeding**, v.40, p. 9, 2020.

OKULEY, J.; LIGHTNER, J.; FELDMANN, K.; YADAV, N.; LARK, E.; BROWSE, J. Arabidopsis FAD2 gene encodes the enzyme that is essential for polyunsaturated lipid synthesis. **Plant Cell**, v.6, p.147-158, 1994.

PHAM, A. T.; LEE, J. D.; SHANNON, J. G.; BILYEU, K. D. Mutant alleles of FAD2-1A and FAD2-1B combine to produce soybeans with the high oleic acid seed oil trait. **BMC Plant Biology**, v. 10, n. 1, p. 195, 2010.

PHAM, A. T.; LEE, J. D.; SHANNON, J. G.; BILYEU, K. D. A novel FAD2-1 A allele in a soybean plant introduction offers an alternate means to produce soybean seed oil with 85% oleic acid content. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 123, n. 5, p. 793-802, 2011.

RAWAL, R.; KUMAR, V.; RANI, A.; GOKHALE, S. M. Genetic Elimination of Off-Flavour Generating Lipoygenase-2 Gene of Soybean through Marker Assisted

Backcrossing and Its Effect on Seed Longevity. **Plant Breeding and Biotechnology**, v. 8, p. 163-173, 2020.

SCHLUETER, J. A.; VASYLENKO-SANDERS, I. F.; DESHPANDE, S.; YI J.; SIEGFRIED, M.; ROE, B. A.; SHLUETER, S. D.; SHEFFLER, B. E.; SHOEMAKER, R. C. The FAD2 gene family of soybean: insights into the structural and functional divergence of a paleopolyploid genome. **Plant Genome**, v. 47, p.14-26, 2007.

SILVA, L. C. C. Caracterização molecular de alelos associados à qualidade do grão da soja. 2017. 117f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2017.

SONG, B.; SHEN, L.; WEI, X.; GUI, B.; TUO, Y.; TIAN, F.; HAN, Z.; WANG, X.; LI, W.; LIU, S. Marker-assisted backcrossing of a null allele of the α -subunit of Soybean (*Glycine max*) β -conglycinin with a Chinese soybean cultivar (a). The development of improved lines. **Plant Breeding**, v. 133, n. 5, p. 638-648, 2014.

SONG, H.; TAYLOR, D.C.; ZHANG, M. Bioengineering of Soybean Oil and Its Impact on Agronomic Traits. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 3, p. 2256, 2023.

TANKSLEY, S.D.; YOUNG, N. D.; PATERSON, A. H.; BONIERBALE, M. W. RFLP mapping in plant breeding: New tools for an old science. **Nature Biotechnology**, v. 7, p. 257-263, 1989.

CAPÍTULO 3

Investigação da expressão de genes em raízes de soja alto oleico e convencional infectadas com o nematoide *Pratylenchus brachyurus*

3.1. INTRODUÇÃO

O óleo de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) é um dos produtos economicamente mais importantes da soja. Composto por cinco ácidos graxos: ácido palmítico (16:0), ácido esteárico (18:0), ácido oleico (18:1), ácido linoléico (18:2) e ácido linolênico (18:3). A porcentagem desses cinco ácidos graxos no óleo de soja é em média 10%, 4%, 20%, 55% e 10%, respectivamente (SONG et al., 2023). Este perfil de ácidos graxos resulta em baixa estabilidade oxidativa que limita o uso do óleo de soja em produtos alimentícios e aplicações industriais. A degradação oxidativa do óleo de soja resulta no processo de rancificação, ocasionando sabores estranhos em produtos alimentícios e no acúmulo de materiais viscosos no biodiesel derivado de soja que obstrui os filtros de óleo (CANAKCI et al., 1999). A instabilidade oxidativa presente no óleo de soja se dá devido a níveis elevados dos ácidos graxos poli-insaturados e como forma de reduzi-los a hidrogenação parcial é frequentemente realizada (HAUN et al., 2014). Entretanto, uma consequência negativa da hidrogenação é a produção de ácidos graxos *trans*, que têm sido associados a doenças cardiovasculares (DANAELI et al., 2009; SILVA et al., 2018) e além disso, um óleo de soja parcialmente hidrogenado possui propriedades de fluxo a frio pobres, lubricidade reduzida e viscosidade aumentada, limitando assim o seu valor como biodiesel (MOSER et al., 2007).

A enzima Δ 12-dessaturase 2 (FAD2) catalisa a conversão de ácido oleico em ácido linoleico (OKULEY et al., 1994; SCHLUETER et al., 2007). Estratégias genéticas utilizando esta dessaturase tem sido empregadas para melhorar a estabilidade oxidativa do óleo de soja, sem a produção de gorduras *trans*, mantendo a funcionalidade para o uso final em diferentes aplicações (CLEMENTE; CAHOON, 2009). Existem sete homólogos de FAD2 no genoma da soja, que divergiram em dois grupos na árvore filogenética, incluindo dois FAD2-1 e cinco FAD2-2. Ambos os FAD2-1 são altamente expressos em sementes, enquanto os membros FAD2-2 exibem diferentes padrões de expressão (LAKHSSASSI et al., 2021; SONG et al., 2023).

A redução da atividade dos genes FAD2-1A e FAD2-1B tem sido o foco para criar variedades de soja com óleo com alto teor de ácido oleico (HAUN et al., 2014). Um óleo de soja com alto teor de oleico é desejável porque além de possuir maior estabilidade oxidativa e melhor qualidade nutricional, é também um bom candidato para o desenvolvimento de biocombustíveis de alto desempenho (HAUN et al., 2014; MURAD et al., 2014; PHAM et al., 2010; 2011). A redução da atividade das enzimas Δ 12-dessaturases promove o acúmulo de ácido oleico e conseqüentemente o decréscimo dos ácidos graxos linoleico e linolênico.

O ácido jasmônico (JA), uma ciclopentanona derivada do ácido linolênico, desempenha papéis reguladores no desenvolvimento das plantas e nas respostas a estresses ambientais, como ferimentos mecânicos ou ataque de patógenos (LÉON; SÁNCHEZ-SERRANO, 1999). O ácido linolênico, um precursor no processo de biossíntese de JA, é convertido em ácido 12-oxo-fitodienóico (12-oxo-PDA) por meio de oxigenação com lipoxigenase (LOX), aleno óxido sintase (AOS) e aleno óxido ciclase (AOC). O ácido jasmônico é então sintetizado a partir de 12-oxo-PDA pela atividade da redutase do ácido 12-oxo-fitodienóico (OPR) e 3 ciclos de beta-oxidação (HAN, 2017).

Portanto, a via biossintética do JA é conhecida como via octadecanóide (RUAN et al., 2019). No citosol, as vias metabólicas do JA convertem o fitohormônio em diferentes derivados ativos e inativos distintos, e entre a série de metabólitos, o jasmonato-isoleucina (Ja-Ile) é um dos principais em plantas (WASTERACK et al., 2007). A Jasmonato aminoácido sintetase 1 (JAR1) catalisa a conversão reversível entre JA e Ja-Ile, e este bioativo tem mostrado grande importância na via de transdução de sinal de JA (FONSECA et al., 2009; WASTERACK; SONG, 2017).

Uma vez que o ácido linolênico é precursor do ácido jasmônico, e que plantas de soja alto oleico possuem níveis de ácido linolênico bastante reduzidos, a investigação da performance destas plantas frente a estresses seria pertinente. Onde seriam avaliados não apenas a expressão de genes envolvidos com a biossíntese e vias de sinalização do ácido jasmônico, mas também de outros fitohormônios, visto que estes interagem intimamente entre si de forma antagônica ou sinérgica, e essa dinâmica de regulação determina o resultado das respostas a jusante ativadas pelos fitohormônios (BERENS et al., 2017).

Dentre os principais patógenos que afetam a soja, destacam-se os nematoides. O nematoide *Pratylenchus brachyurus* conhecido como nematoide das lesões radiculares, inclui-se entre as espécies de maior importância para a agricultura, e consiste em uma espécie endoparasita e migradora, cujo ataque se concentra no sistema radicular, prejudicando o desenvolvimento da planta (COSTA et al., 2012).

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi investigar a expressão de genes envolvidos com a síntese de ácido jasmônico, assim como genes relacionados com diferentes mecanismos de defesa da planta, em variedades de soja alto oleico e convencional, infectadas com o nematoide *Pratylenchus brachyurus*.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. MATERIAL VEGETAL E PATÓGENO

Para o experimento e posterior análise do perfil transcricional foram utilizadas a linhagem Ufvstao que possui alto teor de ácido oleico (~85%) e como cultivar controle a TMG4182, esta apresenta resistência moderada ao nematoide *P. brachyurus*.

3.2.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos inteiramente casualizado, avaliando quatro tratamentos – inoculada e não inoculada/convencional e alto oleico, três repetições biológicas e intervalos de 1, 5 e 10 dias após inoculação do nematoide, totalizando 36 unidades experimentais (Figura 1).

O experimento foi realizado em casa de vegetação, onde as sementes foram germinadas em bandejas, utilizando o substrato comercial Plantmax® e após 10 dias foram plantadas individualmente em copos plásticos com capacidade de 500mL. Os materiais controle foram plantados utilizando solo autoclavado e nos materiais inoculados aplicamos 18mL de suspensão concentrada do nematoide *P. brachyurus* em aberturas feitas no solo próximas à raiz, onde a calibragem do inóculo foi estimada em aproximadamente 500 nematoides por mililitro. Nos tempos 1, 5 e 10 dias após a inoculação, as raízes

dos materiais foram coletadas e armazenadas em freezer -80°C para posterior extração de RNA.



Figura 1. Esquema do delineamento experimental de TMG4182 e TMG4182AO (alto oleico), com três repetições, em intervalos de 1, 5 e 10 dias após a inoculação do nematoide *Pratylenchus brachyurus*.

3.2.3. EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DO cDNA

A extração do RNA das raízes foi realizada utilizando o reagente TRIzol® (Invitrogen) seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Após a extração, a quantificação foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EUA). A qualidade do RNA foi verificada pela integridade de bandas em gel de agarose 1,5%. Posteriormente as amostras de RNA foram submetidas a tratamento com DNase Amplification Grade (Invitrogen™) para remoção de possível DNA genômico contaminante.

Para realizar a síntese do cDNA, utilizou-se os 10 μL de RNA tratado, 1 μL de primer oligo(dT)12-18 (Sigma Aldrich, São Paulo, SP) e 1 μL de dNTP (10 μM). A solução foi aquecida a 65°C por cinco minutos, e resfriada em gelo por 1 min. Posteriormente, foram adicionados 4 μL de tampão 5x, 2 μL de DTT (0,1 M), 1 μL de RNase OUT. A solução foi homogeneizada e incubada a 37°C por 2 minutos. Em banho-maria acrescentou-se 1 μL de Transcriptase Reversa M-MLV (Moloney Murine Leukemia Vírus) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) permanecendo a 37°C por 1 hora para síntese do cDNA correspondente. Para inativar a enzima por aquecimento, os tubos permaneceram por 15 min a 70°C .

3.2.4. ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA

Para definição dos genes da soja e genes normalizadores que seriam utilizados, foram feitas buscas na literatura. Os primers marcadores foram selecionados de artigos que retratavam diferentes tipos de estresses em plantas. Os genes escolhidos estão relacionados com a biossíntese de ácido jasmônico, assim como envolvidos em diferentes mecanismos de defesa da planta (Tabela 1). Os genes de controle endógeno foram selecionados de acordo com os resultados obtidos e validados em Silva et al., (2021), onde os genes CYP e ACT11 foram escolhidos, pois se mostraram os mais estáveis.

Tabela 1: Primers utilizados para a análise de expressão gênica.

GENE	PRIMER	REFERÊNCIAS
*CYP	F: ACGACGAAGACGGAGTGG R: CGACGACGACAGGCTTGG	LI et al., 2012
*ACT11	F: ATCTTGACTGAGCGTGGTTATTCC R: GCTGGTCCTGGCTGTCTCC	HU et al., 2009
OPR3	F: AGTGAGCAAAGGAGCCAAGG R: CAGCTTGCAGGCAATATAGATGA	SELIG et al., 2016
JAR1	F: ACACCAAGATTCTCCTAGCTGC R: AGGATCCGTCCTCCCATTCA	SELIG et al., 2016
ETR	F: ATGGATGCCTTCAAGAAGTGG R: GCACATATCTTCCCACAAGAGG	ARRAES et al., 2015
ATAF1	F: GCCTGTACTTCGAGGCTTCC R: GAAAACCTCGCTGTTGCCCTG	SELIG et al., 2016
HS1PRO1	F: TCACGCCGCACCTTCTGT R: GAGTTGAGGAAGACGGAGATAGTAG	MORALES et al., 2009
CHS	F: CAGGCACAAAGGGCAGAAG R: GGTTTGGTGGGTTTGCAGTT	MORALES et al., 2009
RD20-A	F: GTGGCACATGACTGAAGGAA R: ATCTTTCCAGCAGCACCTCT	NEVES BORGES et al., 2012

*genes de controle endógeno

As amplificações foram feitas em um aparelho Real Time PCR 7500 Systems (Applied Biosystems), em reação contendo 1,0 µL de cDNA diluído 1:10, 4 µL de solução contendo os primers forward e reverse na concentração de 1,6 µM, e 5 µL de SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific). As reações de PCR em tempo real foram realizadas nas seguintes condições: 95°C por 10 min e 40 ciclos de: desnaturação 95 °C por 15 seg, seguido de anelamento e extensão a 60 °C por 1 min. A especificidade dos produtos amplificados foi analisada pelas curvas de dissociação geradas pelo equipamento. Foram utilizados controles negativos sem a adição de cDNA sintetizado e/ou primers para confirmar a ausência de qualquer tipo de contaminante no meio reacional.

Para quantificação dos genes escolhidos, utilizamos dois genes de controle endógeno (CYP e ACT11) para posterior normalização dos dados. Os resultados obtidos foram analisados seguindo modelo descrito por Hellemans e colaboradores (2007). Foi realizada uma análise de variância e Teste t de Student (p - valor < 0,05) no software GraphPad Prism 8.0.1.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise de expressão gênica podemos observar que para o gene OPR3, as cultivares TMG4182 convencionais não apresentaram diferenças estatísticas entre os níveis de expressão em todos os tratamentos (Figura 2a). Já para as plantas TMG4182AO (alto oleico), podemos observar que no tempo de cinco dias, observou-se diferenças estatísticas nos níveis de expressão, onde a planta controle exibiu maior expressão do gene OPR3, em comparação com a planta inoculada com o nematoide *P. brachyurus*.

A expressão do gene OPR3 é induzida tanto por estresses bióticos, como por abióticos e diretamente ligada a produção de ácido jasmônico, visto que catalisa a primeira etapa da síntese, a partir de OPDA (WASTERACK et al., 2017). Levando em consideração que plantas alto oleico possuem níveis reduzidos de ácido linolênico (18:3), precursor da síntese de ácido jasmônico, estes resultados sugerem que a baixa disponibilidade de 18:3 pode ter influenciado na regulação da expressão de OPR3 na planta, ao ser submetida ao nematoide.

Em um estudo desenvolvido por Block et al. (2020), plantas de sorgo mutadas para uma dessaturase MSD3, foi consideravelmente prejudicada na produção de ácido linolênico, e os níveis de ácido jasmônico foram relativamente inferiores quando comparadas com as plantas não mutadas.

Em nosso estudo também foi feita a análise de expressão do gene JAR1 (Figura 2b). JAR1 está relacionado à sinalização do ácido jasmônico e, portanto, têm sido utilizado como gene marcador para essa via em diversos estudos moleculares (LIU et al., 2016). Podemos observar que para a cultivar TMG4182, houve diferença estatística na expressão do gene JAR1, um dia após a inoculação do nematoide, em que a planta inoculada apresentou uma maior expressão do gene. Uma das principais funções do ácido jasmônico envolve

mecanismos de defesa nas plantas em resposta a lesões e ataques de pragas e patógenos, onde após desafio pelo estresse, há um rápido aumento nos níveis de JA (WEBER, 2002; BALLARÉ, 2014). Isto está de acordo com o que observamos em nossos resultados, visto que um dia após a inoculação, a planta TMG4182 inoculada apresentou maior expressão de JAR1 em comparação com a planta controle.

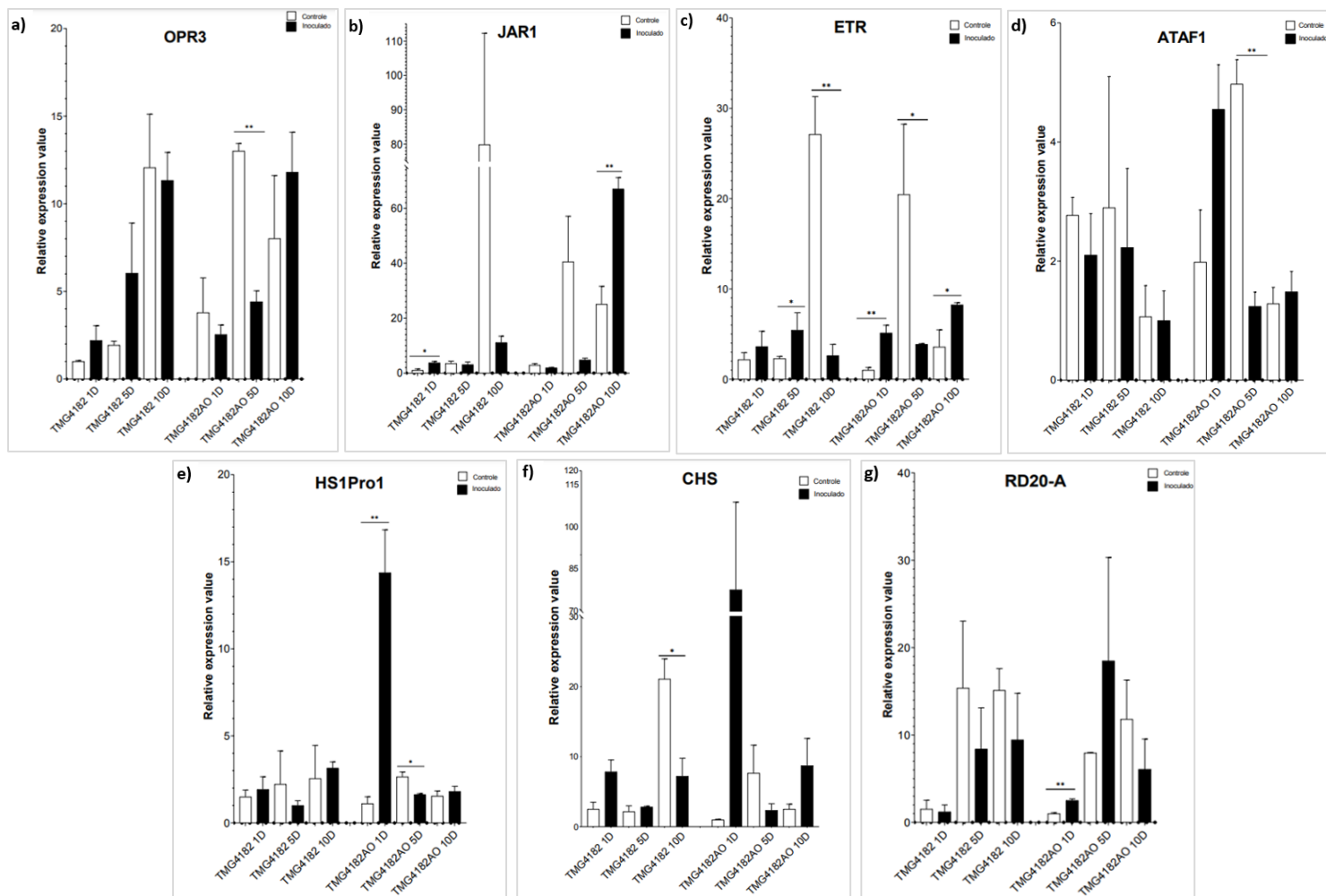


Figura 2. Valores da Expressão relativa dos genes a) OPR3; b) JAR1; c) ETR; d) ATAF1; e) HS1PRO1; f) CHS e g) RD20-A. Foram utilizadas a cultivar TMG4182 e a TMG4182AO que possui alto teor de ácido oleico. Tempos de experimento: 1, 5 e 10 dias após a inoculação com o nematoide *Pratylenchus brachyurus*. Os asteriscos significam diferenças estatísticas através do teste T de Student, em que o nível de significância se dá por: (*) $p \leq 0,05$; (**) $0,01 \leq p < 0,05$.

Em um trabalho realizado por Yang et al. (2023), em *Arabidopsis*, também foi observado que o gene JAR1 foi regulado positivamente 24 horas após a

inoculação com *Botrytis cinerea*, quando comparado com as plantas não inoculadas.

Com relação a expressão do gene JAR1 nas plantas TMG4182AO, podemos notar que no tempo de 10 dias, observou-se diferença estatística nos níveis de expressão, havendo uma maior expressão do gene na planta inoculada (Figura 2b). As plantas alto oleico apesar de possuírem níveis reduzidos de ácido linolênico, esta condição não interferiu na expressão de JAR1 dez dias após a inoculação do nematoide. Este evento sugere que após um período mais longo de interação com o patógeno, é possível o acúmulo de ácido linolênico necessário para síntese de ácido jasmônico, visto que a planta alto oleico não apresenta uma total ausência de 18:3.

Uma indução de ~ 1,6 vezes de ácido jasmônico foi observada em plantas de sorgo mutadas para a dessaturase MSD3 em resposta à herbivoria. Estes dados mostram que mesmo possuindo níveis reduzidos de linolênico, a planta produziu uma proporção de 18:3 necessária para a produção de JA induzida por herbívoros (BLOCK et al., 2020).

O gene ETR também foi avaliado neste trabalho e sua expressão relativa pode ser visualizada na figura 2c. Levando em conta os níveis de expressão que apresentaram diferenças estatísticas, observa-se que a planta TMG4182AO no tempo de cinco dias e TMG4182 no tempo de 10 dias, exibiram níveis de expressão de ETR significativamente menores quando comparadas com as plantas não inoculadas. O gene ETR via de regra, é regulado negativamente em resposta ao etileno, esta regulação na expressão é uma indicação do envolvimento do etileno como mecanismo de defesa da planta (HUANG et al., 2003). Em um estudo realizado com pepino, foi observado expressão semelhante do gene ETR ao ser inoculado com *Trichoderma asperellum* (SHORESH et al., 2005).

Por outro lado, a planta TMG4182 no tempo de cinco dias e as plantas TMG4182AO, um e dez dias após inoculação do nematoide, apresentaram diferenças estatísticas nos níveis de expressão, com uma maior expressão do gene ETR nas plantas inoculadas (Figura 2c). Resultados semelhantes foram encontrados em um estudo com plantas de kiwi submetidas a infecção por *Pseudomonas syringae*, onde foi observado uma regulação positiva de 2,2 vezes de ETR (NUNES DA SILVA et al., 2021).

Em um estudo realizado com o intuito de observar a sinalização de etileno nas respostas da soja ao estresse hídrico, verificou-se que nas raízes de ambas as cultivares avaliadas, houve redução no nível de transcritos de ETR, comparando plantas estressadas e não estressadas (ARRAES et al., 2015).

Poucos são os trabalhos encontrados desenvolvidos para esclarecer a função do etileno na defesa contra nematoides em soja. Em nosso estudo utilizamos o nematoide *P. brachyurus* como patógeno, e os dados existentes relativos ao papel do etileno na defesa e desenvolvimento de nematoides são complexos e muitas vezes contraditórios, muito provavelmente devido ao seu papel pleiotrópico na defesa, onde o etileno parece desempenhar papéis distintos em diferentes fases da infecção por nematoides (KAMMEROFER et al., 2015).

A expressão relativa do gene ATAF-1 também foi avaliada neste estudo (Figura 2d). ATAF-1 pertence à família de proteínas NAC, e sua transcrição é aumentada em resposta a ferimentos e ácido abscísico. Podemos observar na figura 2d, que as cultivares TMG4182 não apresentaram diferenças estatísticas entre os níveis de expressão para o gene ATAF-1. Já para as plantas TMG4182AO, observa-se que no tempo de cinco dias, houve diferenças estatísticas nos níveis de expressão do gene, onde a planta controle exibiu maior expressão do gene ATAF-1, em comparação com a planta inoculada pelo nematoide *P. brachyurus*.

Em estudo realizado por Kammerofer et al. (2015) durante a infecção inicial de arábida por *Heterodera schachtii*, observou-se que as concentrações de ácido abscísico foram diminuídas em raízes infectadas por nematoides em comparação com raízes de controle. Níveis reduzidos de ácido abscísico também foram observados em feijão após inoculação com o fungo da ferrugem (RYERSON et al., 1993).

Ao contrário destes resultados, Selig et al. (2016) observaram um aumento na expressão gênica de ATAF1 em soja, após 12 horas induzido por meio da infestação por pulgões. Também foi observado por Studham e Macintosh (2013), após sete dias, o aumento na expressão de genes da biossíntese de ácido abscísico e do marcador ATAF1 após infestação por pulgões em soja.

Sendo assim, o ácido abscísico parece desempenhar um papel complexo e ambivalente na resposta de defesa da planta, agindo como um regulador positivo ou negativo da resistência a doenças e pragas, interferindo em múltiplos níveis nas vias de respostas aos diferentes tipos de estresses.

A expressão gênica do gene HS1PRO1 pode ser visualizada na figura 2e. HS1PRO1 é o primeiro gene de resistência ao nematoide do cisto da beterraba, e tem sido utilizado em estudos com soja (MORALES et al., 2009). A expressão do gene nas cultivares TMG4182 não apresentou diferenças estatísticas entre os tratamentos. Já para as variedades TMG4182AO, nos tempos um e cinco dias, houve diferenças estatísticas, onde um dia após a inoculação do nematoide, as plantas exibiram elevada expressão do gene HS1PRO1 em comparação com as plantas não inoculadas.

Resultados semelhantes foram encontrados por Thureau et al. (2003) ao observarem que após infecção por nematoide, o gene HS1PRO1 foi regulado positivamente em raízes de beterraba. Morales et al. (2009) também observaram aumento significativo na expressão do gene HS1PRO1 em genótipos resistentes de soja, inoculados com *Meloidogyne javanica*, comparado aos genótipos controle.

Ao analisarmos a figura 2e, nota-se que no tempo de cinco dias, a planta alto oleico inoculada reduziu os níveis de expressão do gene HS1PRO1. Este comportamento pode estar relacionado com a dinâmica de expressão do gene HS1PRO1, visto que os maiores níveis de expressão se dão principalmente nos primeiros sinais de infecção do nematoide. Além disso, um estudo de resistência ao nematoide seria interessante, para avaliar se o aumento no teor de ácido oleico influenciou no nível de resistência, quando comparada a planta convencional.

O gene da chalcona sintase (CHS) foi avaliado no nosso estudo e a sua expressão relativa pode ser observada na figura 2f. CHS é uma enzima chave da via de biossíntese de flavonóides. Ao observamos a figura 2f, nota-se que para as cultivares TMG4182, no tempo de dez dias, houve diferença estatística no nível de expressão, demonstrando uma regulação positiva do gene CHS na planta controle, em comparação com a planta inoculada. Estes resultados diferem dos encontrados por Khanna et al. (2019) ao inocularem *Meloidogyne*

incognita em tomate, onde foram observados altos níveis de expressão do gene CHS na planta inoculada.

Em nosso estudo, as plantas alto oleico não apresentaram diferenças estatísticas entre os níveis de expressão para o gene CHS (Figura 2f). É uma vez que o ácido jasmônico está intimamente relacionado com a síntese de flavonoides (PREMATHILAKE et al., 2020), mais estudos seriam necessários para esclarecer se a redução dos níveis de ácido linolênico, e conseqüentemente ácido jasmônico, pode estar influenciando na expressão do gene da chalcona sintase.

O gene RD20-A corresponde a uma proteína da família das caleosinas e sua expressão foi avaliada neste estudo (Figura 2g). A expressão de RD20-A pode ser induzida tanto por estresses bióticos, como por abióticos. Ao observamos a figura 2g, percebe-se que a cultivar TMG4182 não apresentou níveis de expressão gênica estatisticamente diferentes entre os tratamentos. Por outro lado, a variedade TMG4182AO, um dia após a inoculação do nematoide, apresentou níveis de expressão com diferenças estatísticas, em que a planta inoculada exibiu maior expressão do gene RD20-A, em comparação com a planta controle. Resultado parecido foi encontrado por Partridge e Murphy (2009), ao analisar a expressão do gene RD20-A em arábido, onde a expressão foi regulada positivamente após a exposição a estresses abióticos, como sal e seca, e a estresse biótico, como infecção pelo fungo *Leptosphaeria maculans*.

Plantas de arábido com superexpressão do gene RD20-A exibiram alteração nos componentes da cera da cutícula foliar e aumento da resistência ao fungo *Alternaria brassicicola*. Por outro lado, o silenciamento do gene RD20-A levou a uma maior propagação do fungo, mostrando que este gene participa das respostas das plantas, tanto para estresses abióticos, como para bióticos (HANANO et al., 2015).

De forma geral, as plantas alto oleico apresentaram maior variação na expressão dos genes analisados, em comparação com a planta convencional. Uma vez que a cultivar TMG4182 é moderadamente resistente ao nematoide *P. brachyurus*, estudos futuros seriam interessantes para investigar se a característica alto teor de oleico, pode ter influenciado nos níveis de resistência ao nematoide.

REFERÊNCIAS

- ARRAES, F. B.; BENEVENTI, M. A.; LISEI DE SÁ, M. E.; PAIXÃO, J. F.; ALBUQUERQUE, E. V.; MARIN, S. R.; PURGATTO, E.; NEPOMUCENO, A. L.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Implications of ethylene biosynthesis and signaling in soybean drought stress tolerance. **BMC Plant Biology**, v. 15, n. 1, p. 1-20, 2015.
- BALLARÉ C.L. Light regulation of plant defense. **Annual Review of Plant Biology**, v. 65, p.335-363, 2014.
- BERENS, M. L.; BERRY, H. M.; MINE, A.; ARGUESO, C. T.; TSUDA, K. Evolution of Hormone Signaling Networks in Plant Defense. **Annual Review Of Phytopathology**, v. 4, p. 401-425, 2017.
- BLOCK, A. K.; XIN, Z.; CHRISTENSEN, A. S. The 13-lipoxygenase MSD2 and the ω -3 fatty acid desaturase MSD3 impact *Spodoptera frugiperda* resistance in Sorghum. **Planta**, v. 252, p. 62, 2020.
- CANAKCI, M.; MONYEM, A.; VAN GERPEN, J. Accelerated oxidation processes in biodiesel. **Transactions of the ASAE**, v.42 p. 1565-1572, 1999.
- CLEMENTE, T. E.; CAHOON, E. B. Soybean oil: genetic approaches for modification of functionality and total content. **Plant Physiology**, v.151, p.1030-1040, 2009.
- COSTA, M.J.N. **Nematoides: consorciação e rotação de culturas**. In: PATERNIANI, M.E.A.G.; DUARTE, A.P.; TSUNECHIRO, A. (Eds.). Diversidade e inovações na cadeia produtiva de milho e sorgo na era dos transgênicos. Campinas: Instituto Agrônômico, Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 367-378. 2012.
- DANAEI, G.; DING, E. L.; MOZAFFARIAN, D.; TAYLOR, B.; REHM, J.; MURRAY, C. J. L.; EZZATI, M. The preventable causes of death in the United States: comparative risk assessment of dietary, lifestyle, and metabolic risk factors. **PLoS Medicine**, v. 6, p. 1-23, 2009.
- HAN, G.Z. Evolution of jasmonate biosynthesis and signalling mechanisms. **Journal Experimental Botany**, v. 68, p. 1323-1331, 2017.

HANANO, A.; BESSOULE, J. J.; HEITZ, T.; BLÉE, E. Involvement of the caleosin/peroxygenase RD20 in the control of cell death during Arabidopsis responses to pathogens. **Plant signaling & Behavior**, v. 10, 2015.

HAUN, W.; COFFMAN, A.; CLASEN, B. M.; DEMOREST, Z. L.; LOWY, A.; RAY, E.; RETTERATH, A.; STODDARD, T.; JUILLERAT, A.; CEDRONE, F.; MATHIS, L.; VOYTAS, D. F.; ZHANG, F. Improved soybean oil quality by targeted mutagenesis of the fatty acid desaturase 2 gene family. **Plant Biotechnology Journal**, v. 12, p. 934-940, 2014.

HELLEMANS, J.; MORTIER, G., DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F.; VANDESOMPELE, J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. **Genome Biology**, v. 8, n. 2, p. 1-14, 2007.

HUANG, Y.; LI, H.; HUTCHISON, C. E.; LASKEG, J.; KIEBER, J. J. Biochemical and functional analysis of CTR1, a protein kinase that negatively regulates ethylene signaling in Arabidopsis. **Plant Journal**, v.33, p.221-233, 2003.

KAMMERHOFER, N.; RADAKOVIC, Z.; REGIS, J. M.; DOBREV, P.; VANKOVA, R.; GRUNDLER F. M.; SIDDIQUE, S.; HOFMANN, J.; WIECZOREK, K. Role of stress-related hormones in plant defence during early infection of the cyst nematode *Heterodera schachtii* in Arabidopsis. **The New phytologist**, v. 207, p. 778-789, 2015.

KHANNA, K.; JAMWAL, V. L.; SHARMA, A.; GANDHI, S. G.; OHRI, P.; BHARDWAJ,R.; AL-HUQAIL, A. A.; SIDDIQUI, M. H.; MARRAIKI, N.; AHMAD, P. Evaluation of the role of rhizobacteria in controlling root-knot nematode infection in *Lycopersicon esculentum* plants by modulation in the secondary metabolite profiles. **AoB PLANTS**, v. 11, 2019.

LAKHSSASSI, N.; LOPES-CAITAR, V. S.; KNIZIA, D.; CULLEN, M. A.; BADAD, O.; EL BAZE, A.; ZHOU, Z.; EMBABY, M. G.; MEKSEM, J.; LAKHSSASSI, A. TILLING-by-Sequencing(+) Reveals the Role of Novel Fatty Acid Desaturases (GmFAD2-2s) in Increasing Soybean Seed Oleic Acid Content. **Cells**, v.10, p. 1245, 2021.

LÉON, J.; SÁNCHEZ-SERRANO, J. J. Molecular biology of jasmonic acid biosynthesis in plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 37, p. 373-380, 1999.

LIU, H.; CARVALHAIS, L.C.; KAZAN, K.; SCHENK, P.M. Development of marker genes for jasmonic acid signaling in shoots and roots of wheat. **Plant Signaling Behavior**, v.11, 2016.

MORALES, A. M. A. P.; LEMOS, E. G. M.; FUGANTI, R.; MARIN, S. R. R.; MARCELINO, F. C.; SILVA, J. F. V.; PEREIRA A. A.; NEPOMUCENO, A. L. Expressão de genes envolvidos na resistência da soja a *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, v. 33, n. 3, p. 226-234, 2009.

MOSER, B. R.; HAAS, M. J.; JACKSON, M. A.; ERHAN S. V.; LIST, G. R. Avaliação de ésteres metílicos parcialmente hidrogenados de óleo de soja como biodiesel. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.109, p. 17-24, 2007.

MURAD, A.M.; VIANNA, G.R.; MACHADO, A.M.; CUNHA, N. B.; COELHO, C. M.; LACERDA, V. A. M.; COELHO, M. C.; RENCH, E. L. Mass spectrometry characterisation of fatty acids from metabolically engineered soybean seeds. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.406, p. 2873-2883, 2014.

NEVES BORGES, A. C.; DIAS, F. G.; CRUZ, F.; MESQUITA, R. O.; NEPOMUCENO, A. L.; ROMANO, E.; LOUREIRO, M. E.; GROSSI DE SÁ, M. F.; FERREIRA, A. M. Expression pattern of drought stress marker genes in soybean roots under two water deficit systems. **Genetic and Molecular Biology**, v. 1, 2012.

NUNES DA SILVA, M.; VASCONCELOS, M. W.; PINTO, V.; BALESTRA, G. M.; MAZZAGLIA, A.; GOMEZ-CADENAS, A.; CARVALHO, S. M. P. Role of methyl jasmonate and salicylic acid in kiwifruit plants further subjected to Psa infection: biochemical and genetic responses. **Plant Physiology Biochemistry**, 2021.

OKULEY, J.; LIGHTNER, J.; FELDMANN, K.; YADAV, N.; LARK, E.; BROWSE, J. Arabidopsis FAD2 gene encodes the enzyme that is essential for polyunsaturated lipid synthesis. **Plant Cell**, v.6, p.147-158, 1994.

PARTRIDGE, M.; MURPHY, D. J. Roles of a membrane-bound caleosin and putative peroxxygenase in biotic and abiotic stress responses in Arabidopsis. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, p. 796-806, 2009.

PHAM, A. T.; LEE, J. D.; SHANNON, J. G.; BILYEU, K. D. Mutant alleles of FAD2-1A and FAD2-1B combine to produce soybeans with the high oleic acid seed oil trait. **BMC Plant Biology**, v. 10, n. 1, p. 195, 2010.

PHAM, A. T.; LEE, J. D.; SHANNON, J. G.; BILYEU, K. D. A novel FAD2-1 A allele in a soybean plant introduction offers an alternate means to produce soybean seed oil with 85% oleic acid content. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 123, n. 5, p. 793-802, 2011.

PREMATHILAKE, A.T.; NI, J.; SHEN, J.; BAI, S.; TENG, Y. Transcriptome analysis provides new insights into the transcriptional regulation of methyl jasmonate-induced flavonoid biosynthesis in pear calli. **BMC Plant Biology**, v.20, p. 388, 2020.

RUAN, J.; ZHOU, Y.; ZHOU, M.; YAN, J.; KHURSHID, M.; WENG, W.; CHENG J.; ZHANG, K. Jasmonic acid signaling pathway in plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, p. 2079, 2019.

RYERSON, E.; LI, A.; YOUNG, J. P.; HEATH, M. C. Changes in abscisic acid levels during the initial stages of host and non-host reactions to the rust fungus **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 43, p. 265-273, 1993.

SHORESH, M.; YEDIDIA, I.; CHET, I. Involvement of Jasmonic Acid/Ethylene Signaling Pathway in the Systemic Resistance Induced in Cucumber by *Trichoderma asperellum*. **Phytopathology**, v.95, p. 76-84, 2005.

SCHLUETER, J. A.; VASYLENKO-SANDERS, I. F.; DESHPANDE, S.; YI J.; SIEGFRIED, M.; ROE, B. A.; SHLUETER, S. D.; SHEFFLER, B. E.; SHOEMAKER, R. C. The FAD2 gene family of soybean: insights into the structural and functional divergence of a paleopolyploid genome. **Crop Science**, v. 47, p.14-26, 2007.

SELIG, P.; KEOUGH, S.; NALAM, V. J.; NACHAPPA, P. Jasmonate-dependent plant defenses mediate soybean thrips and soybean aphid performance on soybean. **Arthropod-Plant Interactions**, v. 10, n. 4, p. 273-282, 2016.

SILVA, L. C. C.; BUENO, R. D.; MATTA, L. B.; PEREIRA, P. H. S.; MAYRINK, D. B.; PIOVESAN, N. D.; SEDIYAMA, C. S.; FONTES, E. P. B., CARDEAL, A. J.; DAL-BIANCO, M. Characterization of a new GmFAD3A allele in Brazilian CS303TNKCA soybean cultivar. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 131, n. 5, p. 1099-1110, 2018.

SILVA, L. C. C.; MAYRINK, D. B.; BUENO, R. F.; PIOVESAN, N. D.; RIBEIRO, C.; DAL-BIANCO, M. Reference Genes and Expression Analysis of Seed Desaturases Genes in Soybean Mutant Accessions. **Biochemical genetics** v.10, 2021.

SONG, H.; TAYLOR, D.C.; ZHANG, M. Bioengineering of Soybean Oil and Its Impact on Agronomic Traits. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 3, p. 2256, 2023.

STUDHAM, M. E.; MACINTOSH, G. C. Multiple phytohormone signals control the transcriptional response to soybean aphid infestation in susceptible and resistant soybean plants. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 26, n. 1, p. 116-129, 2012.

THURAU, T.; KIFLE, S.; JUNG, C.; CAI, D. The promoter of the nematode resistance gene Hs1pro-1 activates a nematode-responsive and feeding site-specific gene expression in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) and Arabidopsis thaliana **Plant Molecular Biology**, v. 52, n. 3, p. 643-660, 2003.

WASTERNAK, C. Jasmonates: An Update on Biosynthesis, Signal Transduction and Action in Plant Stress Response, Growth and Development. **Annals of Botany**, p. 681-697, 2007.

WASTERNAK, C.; SONG, S. Jasmonates: biosynthesis, metabolism, and signaling by proteins activating and repressing transcription. **Journal Experimental Botany**, v.68, p.1303-1321, 2017.

WEBER, H. Fatty acid-derived signals in plants. **Trends in Plant Science**, v.7, p.217-224, 2002.

YANG, P.; ZHAO, Z.; FAN, J.; LIANG, Y.; BERNIER, M. C.; GAO, Y.; ZHAO, L.; OPIYO, S. O.; XIA, Y. *Bacillus proteolyticus* OSUB18 triggers induced systemic

resistance against bacterial and fungal pathogens in Arabidopsis. **Frontiers in Plant Science**, 2023.