

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
FITOPATOLOGIA

**AVALIAÇÃO *in planta* DE GENES ORIUNDOS DE ESPÉCIES
SILVESTRES DE *Arachis* POTENCIALMENTE ENVOLVIDOS NA
RESISTÊNCIA A *Sclerotinia sclerotiorum***

DEZIANY DA SILVA FERREIRA

Orientador: Prof. Dr. Robert Neil Gerard Miller

Brasília-DF

2024



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
FITOPATOLOGIA

**AVALIAÇÃO *in planta* DE GENES ORIUNDOS DE ESPÉCIES
SILVESTRES DE *Arachis* POTENCIALMENTE ENVOLVIDOS NA
RESISTÊNCIA A *Sclerotinia sclerotiorum***

DEZIANY DA SILVA FERREIRA

Tese apresentada à Universidade de Brasília como requisito para obtenção do título de Doutora em Fitopatologia pelo Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia.

Orientador: Prof. Dr. Robert Neil Gerard Miller

Brasília-DF

2024

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do Prof. **Robert Neil Gerard Miller**, com apoio institucional e financeiro da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Avaliação in planta de genes oriundos de espécies silvestres de Arachis potencialmente envolvidos na resistência a Sclerotinia sclerotiorum

DEZIANY DA SILVA FERREIRA

TESE APROVADA EM: 05/04/2024

Dr. Robert Neil Gerard Miller

Orientador (Presidente da Banca – UnB)

Dr. Silvino Intra Moreira (Universidade de Brasília)

Examinador (Membro Interno)

Dr.^a Lucilia Helena Marcelino (Embrapa Cenargen)

Examinador (Membro Externo)

Dr.^a Maria Eugênia Lisei de Sá (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais - EPAMIG)

Examinador (Membro Externo)

Brasília-DF

2024

Aos meus pais, Zilton e Divaina, dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Zilton e Divaina, por tudo que são para mim, por todos os ensinamentos, apoio, carinho e cuidado que sempre tiveram comigo. Quero expressar minha profunda gratidão a vocês, meus queridos pais, por serem os arquitetos do alicerce sobre o qual construí meus sonhos e conquistas. Vocês, sempre foram minha maior motivação e serei eternamente grata. A minha irmã, Lorrainy, sempre presente em minha vida, obrigada por todas as vezes em que me apoiou e me incentivou a continuar, por todas as conversas e conselhos. À minha avó Maria, pelas lições de vida, simplicidade e amor, à Tia Keila e às minhas madrinhas, Divina, Sonilda, Cida e Letícia, por sempre se fazerem presentes. Ao Marcos, meu querido marido (meu Coração), que vem participando e me apoiando desde que nos conhecemos e mais ainda nesta reta final, me dando força e sempre me incentivando a acreditar na minha capacidade, agradeço-lhe por todo carinho, amor, paciência e compreensão.

Agradeço aos colegas e amigos pela amizade e convívio diário: Bruna, Matheus, Renan, Pedro, Natália, Júlia, Thaís, Andreza, Thiago, Hugo e Eliza, obrigada pelas risadas, cafés e almoços juntos. Ao Mário, pela amizade e por sempre me ajudar em tudo que precisei no laboratório. A Ana Gomes, por sua paciência e ensinamentos. A Ana Zotta e sua família, por todo ensinamento, paciência e convivência durante a pandemia. Nunca me esquecerei do quanto vocês foram e são importantes para mim. Agradeço a Andressa, por todo o apoio, amizade, ensinamentos, paciência e dedicação a mim depositados nesse tempo. Não tenho palavras para expressar o que a sua amizade e da Fefê, significam para mim.

Às melhores amigas que eu poderia ter, Érica (Galega) e em especial Amanda, por sempre estar comigo, me ouvindo e aconselhando (com puxões de orelha) da melhor maneira possível. Por sempre segurar a barra em todos os momentos em que pensei em desistir e por ser uma ótima companheira de casa e de vida. Ao meu querido amigo Diogo (Migs) pelo suporte, brincadeiras e conversas divertidas.

Ao meu orientador, Prof. Robert Neil Gerard Miller por ter me aceitado como aluna de doutorado, por todo apoio em momentos que muito precisei e por todos os ensinamentos que colaboraram muito para meu crescimento profissional. As minhas queridas orientadoras na Embrapa, Dra. Ana Cristina Miranda Brasileiro e Dra. Patrícia Messenberg Guimaraes, gostaria de expressar minha profunda admiração e gratidão por

terem me acolhido em seu laboratório e por toda paciência e ensinamentos dedicados a mim. Agradeço imensamente pela orientação e acompanhamento ao longo dessa jornada, pois sem isso, não teria conseguido concluir esta etapa com sucesso.

A Universidade de Brasília (UnB) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo durante todo período de doutorado. A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen) pelo espaço, infraestrutura e recursos disponibilizados para execução de todo meu projeto.

A todos que ajudaram e acreditaram em mim, e inclusive aos que não acreditaram, pois vocês me deram força e foco para continuar e chegar ao término deste doutorado. Meu muito obrigada a todos!

SUMÁRIO

GENERAL ABSTRACT	16
INTRODUÇÃO	18
OBJETIVO GERAL	21
Objetivos específicos	21
REVISÃO DE LITERATURA	22
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> - Etiologia, Epidemiologia e ciclo de vida	22
Sintomatologia	23
Controle.....	23
Conceitos de Imunidade vegetal inata (PTI e ETI)	25
Genômica funcional de espécies silvestres de <i>Arachis</i> e a identificação de genes candidatos para resistência a estresses bióticos e abióticos.....	27
Uso de plantas modelo na avaliação de genes candidatos de resistência	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
Capítulo 1. A superexpressão do gene <i>ADEXLB8</i> aumenta a tolerância à infecção pelo fungo <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	37
RESUMO	38
ABSTRACT	39
INTRODUÇÃO	39
MATERIAL E MÉTODOS.....	41
RESULTADOS.....	42
DISCUSSÃO.....	43
CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
Capítulo 2. A superexpressão do gene <i>AsTIR19</i> e <i>AdEXLB:AsTIR19</i> aumenta a tolerância à infecção pelo fungo <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	49
RESUMO	50
ABSTRACT	51
INTRODUÇÃO	52
MATERIAL E MÉTODOS.....	55
RESULTADOS.....	57
DISCUSSÃO.....	61
CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
Capítulo 3. A wild <i>Arachis</i> endochitinase enhances <i>Sclerotinia</i> resistance in transgenic plants	67
ABSTRACT	68

INTRODUCTION	69
MATERIAL AND METHODS	72
RESULTS	76
DISCUSSION	89
REFERENCES	96
Capítulo 4. Validação funcional de genes candidatos envolvidos na resistência a <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em plantas transgênicas de tabaco.....	105
RESUMO	106
ABSTRACT	106
INTRODUÇÃO	108
MATERIAL E MÉTODOS	112
RESULTADOS E DISCUSSÃO	116
CONCLUSÕES	126
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	126
CONCLUSÕES GERAIS	133

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1 - Infecção por *Sclerotinia sclerotiorum* em folhas de tabaco destacadas. (a) Áreas de lesão em folhas de plantas WT e linhagens OE-1 e OE-5 em 0, 12, 24, 36 e 48 h após a inoculação (HAI). (b) Progresso da doença em 48 h, estimado com base na média da área de lesões fúngicas necróticas. (c) Porcentagem de redução média de infecção em 48 HAI em folhas de linhagens OE em comparação com plantas WT. Os valores são médias e erros padrão de 10 indivíduos. * $P < 0,05$ em comparação com plantas WT (teste t) 44

Capítulo 2

Figura 1. Infecção por *Sclerotinia sclerotiorum* em folhas destacadas de *Arabidopsis*. (A) Áreas de lesão em folhas de plantas WT, *AsTIR19* (OE-1, OE-2, OE-6, OE-8, OE-9 e OE-11) em 0, 20, 24 e 28 h após a inoculação (HAI); (B) Progresso da doença até 28 h, estimado com base na média da área de lesões fúngicas necróticas em pixels; (C) Porcentagem de redução (%) da infecção em 28 HAI das linhagens transgênicas.60

Figura 2. Infecção por *Sclerotinia sclerotiorum* em folhas destacadas de tabaco. (A) Áreas de lesão em folhas de plantas WT, EXLB-OE-10, EXLB:TIR19-OE-1, EXLB:TIR19-OE-2, TIR19-OE-1, TIR19-OE-2 em 12, 24, 36, 48 e 60 h após a inoculação (HAI); (B) Progresso da doença em 60 h, estimado com base na média das lesões fúngicas necróticas; (C) Área média de lesão em 60 HAI em folhas de linhagens OE e plantas WT. Os valores são médias e erros padrão de dez indivíduos, com letras diferentes indicando diferenças significativas com base na ANOVA seguida pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).62

Figura 3. Folhas de *Arabidopsis thaliana* com 4 semanas de idade, do controle não-transgênico (WT) e de uma linhagem transgênica superexpressando *AsTIR19*. A1–2 Folhas não inoculadas submetidas às mesmas condições que as inoculadas, coradas com DAB. Barra: 5mm. B1–2 Folhas inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum* quatro horas após inoculação (4HAI) coradas com DAB. C1-2 Acúmulo de ROS revelado por coloração DAB, mostra produção aumentada de ROS em folhas de *A. thaliana* superexpressando *AsTIR19* comparada ao WT. Barra 2 mm.63

Capítulo 3

Fig. 1 Phylogenetic gene tree of *AsECH11* orthologous genes in legume species. A) Gene tree containing the *AsECH11* gene orthologues. Colors of terminal nodes indicate species. Gene names are prefixed with five-letter strings that indicate the species, with the first three letters indicating the genus and the last two indicating the species epithet.....81

Fig. 2 *AsECH11* orthologous proteins and their domain structure in legume species. A) Colored boxes indicate conserved domains and gray lines represent non-conserved sequences. The length of motifs in each protein is showed proportionally.....83

Fig. 3 Heatmap of relative RNASeq expression of *AsECH11* orthologous genes. (A) *A. duranensis* and (B) *A. stenosperma* plants subjected to biotic stress treatments. Plants submitted to *M. arenaria* infection for three, six, seven and nine days (3, 6, 7, 9 DAI) and UV exposure (UV). (FDR < 0.05; log₂FC)84

Fig. 4 *AsECH11* gene structure and predicted protein organization. (A) Gene structure; (B) *AsECH11* protein domains; (C) *AsECH11* amino acid sequence.86

Fig. 5 Symptoms in detached tobacco leaves following *Sclerotinia sclerotiorum* inoculation, with lesion areas observed in WT, EXLB-OE-10, ECHI-OE-3, ECHI-OE-10, ECHI-OE-20, EXLB:ECHI-OE-3 and EXLB:ECHI-OE-6 at 0, 12, 24, 36, 48 h after inoculation (HAI).88

Fig. 6 Analysis of the necrotic areas caused by *Sclerotinia sclerotiorum* and the progress of the disease in the different transgenic lines and in the non-transformed control (WT) tested. A) Disease progress up to 48 HAI based on the area of necrotic fungal lesions (pixels). B) Relative reduction (%) of infection in leaves of OE lines compared to WT at 48 HAI. C) Lesion sizes (pixel numbers) of *S. sclerotiorum* in transgenic lines (OE) in relation to WT. Asterisks indicate a significant difference in infection reduction levels between untransformed tobacco and transgenic tobacco if $P \leq 0.01$ (**) and $P \leq 0.001$

(***). Letters indicate a significant difference in lesion sizes between the transgenic tobacco lines.89

Fig. 7 DAB staining analysis on ECHI1 OE-3 and control (WT) tobacco leaves. A) Non-inoculated WT tobacco leaf stained with DAB; B) Non-inoculated ECHI-OE3 tobacco leaf stained with DAB; C) WT tobacco leaf inoculated with *Sclerotinia sclerotiorum* eight hours after inoculation (8HAI) and stained with DAB; D) ECHI-OE3 leaf inoculated with *S. sclerotiorum* eight hours after inoculation (8HAI) and stained with DAB, showing ROS accumulation. Bar 5 μm90

Fig. 8 Expression analysis of defense-related genes in WT, EXLB-OE-10, ECHI-OE-3, ECHI-OE-10, EXLB-ECHI-OE-3 and EXLB-OE-6 by qRT-PCR. The results represent the mean \pm SE of three independent experiments. Asterisks indicate a significant difference in gene expression levels between untransformed tobacco and transgenic tobacco at $P \leq 0.05$ (*).92

Suppl. Table 1- Gene model of legume species used in the phylogenetic tree and their putative protein sequences.105

Suppl. Table 2- *AsECH11* orthologues in *A. duranensis* and *A. stenosperma*.106

Suppl. Table 3- *Sclerotinia sclerotiorum* lesion sizes (based on pixel numbers) in OE transgenic lines in relation to WT.106

Suppl. Table 4- Primers used for PCR and qRT-PCR in this study.106

Suppl. Figure 1- Single Nucleotide polymorphisms (SNPs) and amino acid substitutions in three *Arachis* species. (A) Boxes indicate conserved domains in the nucleotide sequences. (B) Boxes indicate conserved chitinase domains (GH19) represented in Class II. Arrows indicate SNPs or aa's substitutions.107

Capítulo 4

Figura 1. Estúdio confeccionado pelo grupo para registro das placas. A) Placa contendo folhas inoculadas posicionada no estúdio. B) Luz circular utilizada para manter um padrão de iluminação das fotos. C) Sala escura utilizada para realização dos bioensaios.....118

Figura 2. Análise das áreas necróticas causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* e do progresso da doença nas linhagens transgênicas de *AsAOC3* e no controle não-transgênico (WT) testado. A) Progresso da doença até 48 HAI com base na área de lesões fúngicas necróticas (pixels). B) Tamanhos das lesões (números de pixels) de *S. sclerotiorum* em linhagens transgênicas (OE) em relação ao WT. As letras iguais indicam que não há diferença significativa nos tamanhos das lesões entre as linhagens de tabaco transgênico.119

Figura 3. Análise das áreas necróticas causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* e do progresso da doença nas linhagens transgênicas de *AsTIL* e no controle não-transgênico (WT) testado. A) Progresso da doença até 48 HAI com base na área de lesões fúngicas necróticas (pixels). B) Tamanhos das lesões (números de pixels) de *S. sclerotiorum* em linhagens transgênicas (OE) em relação ao WT. As letras diferentes indicam diferença significativa nos tamanhos das lesões entre as linhagens de tabaco transgênico.120

Figura 4. Análise das áreas necróticas causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* e do progresso da doença nas linhagens transgênicas de *AsSTS4* e no controle não-transgênico (WT) testado. A) Progresso da doença até 48 HAI com base na área de lesões fúngicas necróticas (pixels). B) Tamanhos das lesões (números de pixels) de *S. sclerotiorum* em linhagens transgênicas (OE) em relação ao WT. As letras iguais indicam que não há diferença significativa nos tamanhos das lesões entre as linhagens de tabaco transgênico.120

Figura 5. Progresso da infecção por *Sclerotinia sclerotiorum* em folhas destacadas de cinco linhagens de tabaco superexpressando o transgene *AsAOC3* (AOC-OE-5, OE-6, OE-7, OE-10 e OE-11) e folhas de plantas não-transgênicas (WT), analisadas em 0, 12, 24, 36, 48 e 60 horas após inoculação (HAI).122

Figura 6. Progresso da infecção por *Sclerotinia sclerotiorum* em folhas destacadas de cinco linhagens de tabaco superexpressando o transgene *AsTIL* (TIL-OE-1, OE-3, OE-4, OE-5 e OE-7) e folhas de plantas não-transgênicas (WT), analisadas em 0, 12, 24, 36, 48 e 60 horas após inoculação (HAI).123

Figura 7. Progresso da infecção por *Sclerotinia sclerotiorum* em folhas destacadas de quatro linhagens de tabaco superexpressando o transgene *AsSTS4* (STS-OE-1, OE-5, OE-6 e OE-10) e folhas de plantas não-transgênicas (WT), analisadas em 0, 12, 24, 36, 48 e 60 horas após inoculação (HAI).124

Figura 8. Valores médios das lesões em pixels dos controles de tabaco não-transgênicos (WT) dos dois bioensaios (repetições biológicas) realizados para cada um dos genótipos transgênicos: *AsAOC3* (WT-AOC), *AsTIL* (WT-TIL) e *AsSTS4* (WT-STTS). A) Tamanho médio das lesões em pixels até 48 HAI. B) Comparação das médias em pixels dos controles WT (WT-AOC, WT-TIL e WT-STTS) realizados em duas repetições biológicas em 48 HAI, indicando que não há diferença significativa entre os WT dos três experimentos, com base na análise de variância (ANOVA). As letras iguais indicam que não há diferença significativa nos tamanhos das lesões.125

RESUMO GERAL

FERREIRA, Dezianny da Silva. Avaliação *in planta* de genes oriundos de espécies silvestres de *Arachis* potencialmente envolvidos na resistência a *Sclerotinia sclerotiorum*. 2024. 134p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília-DF.

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, causador do mofo branco e de doenças de podridão do caule em diversas culturas, é um organismo necrotrófico que utiliza proteínas e metabólitos secretados para matar as células do hospedeiro. Estudos indicam que atualmente existem 425 espécies documentadas como hospedeiras desse fungo altamente destrutivo. *S. sclerotiorum* é conhecido por causar danos significativos às culturas, resultando em perdas econômicas substanciais, especialmente em condições ambientais favoráveis. A total falta de resistência do hospedeiro e a vasta gama de plantas suscetíveis contribuem para os impactos prejudiciais dessa patologia no campo. A presença de micélio branco nos tecidos afetados é um sinal identificável, mas não há sintomas exclusivos comuns em todos os hospedeiros. A resistência a *S. sclerotiorum* torna-se crucial, e os parentes silvestres do amendoim surgem como fontes valiosas de genes de resistência a doenças. As espécies silvestres, como *A. duranensis* e *A. stenosperma*, apresentam altos níveis de resistência a doenças. Estudos usando abordagem transcriptômica têm sido realizados para entender suas respostas a estresses bióticos e/ou abióticos. O presente estudo examinou os efeitos da superexpressão de genes candidatos de espécies selvagens de *Arachis*, potencialmente envolvidos em respostas de defesa a estresses bióticos. Utilizando *Arabidopsis thaliana* e *Nicotiana tabacum* como plantas modelo, o objetivo foi compreender como esses genes influenciam a interação com *S. sclerotiorum* por meio de avaliações fenotípicas e subsequentes avaliações moleculares. Uma metodologia de inoculação foi inicialmente estabelecida para folhas destacadas, com bioensaios conduzidos utilizando seis genes Expansina (*AdEXLB8*), Gene NLR truncado (TNx.) (*AsTIR19*), Endoquitinase (*AsECH11*), Alene oxidase ciclase (*AsAOC3*), Lipocalina (*AsTIL*) e Estilbeno sintase (*AsSTS4*) de ambas as espécies, *A. duranensis* e *A. stenosperma*. A superexpressão de *AdEXLB8* mostrou aumento na tolerância, sugerindo seu potencial como gene candidato para fortalecer a resistência. A análise de *AsTIR19* destacou a complexidade da interação planta-patógeno, revelando *insights* sobre a indução de espécies reativas de oxigênio, e ressaltando a engenharia genética como uma ferramenta promissora para melhorar a resistência. No que diz respeito ao gene *AsECH11*, que codifica uma enzima endoquitinase, tanto isolado quanto em combinação com

AdEXLB8, também levou a uma redução significativa nas lesões fúngicas, indicando a eficácia das estratégias de piramidação de genes na expansão do espectro de resistência. Por outro lado, a superexpressão dos transgenes *AsAOC3*, *AsTIL* e *AsSTS4*, de *A. stenosperma*, não apresentou impacto significativo na progressão da doença evidenciando a complexidade das interações gene-patógeno e a necessidade de abordagens mais abrangentes. A superexpressão desses genes pode oferecer uma abordagem eficaz no desenvolvimento de variedades resistentes para mitigar as perdas causadas por *S. sclerotiorum*, destacando a importância da investigação genética e da utilização de parentes silvestres no melhoramento de culturas.

Palavras-chave: *Arachis duranensis*, *Arachis stenosperma*, mofo branco, genes de defesa, plantas transgênicas.

GENERAL ABSTRACT

FERREIRA, Deziany da Silva. *In planta* evaluation of genes from wild species of *Arachis* potentially involved in resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. 2024. 134p. Thesis (Doctorate degree in Phytopathology) - University of Brasília, Brasília-DF.

The fungus *Sclerotinia sclerotiorum*, which causes white mold and stem rot diseases in various crops, is a necrotrophic organism that employs secreted proteins and metabolites to kill host cells. Studies indicate that there are currently 425 species documented as hosts of this highly destructive fungus. *S. sclerotiorum* is known to inflict significant damage to crops, resulting in substantial economic losses, especially under favorable environmental conditions. The complete absence of host resistance and the wide range of susceptible plants contribute to the detrimental impacts of this pathology in the field. The presence of white mycelium in affected tissues is an identifiable sign, but there are no unique symptoms common to all hosts. Resistance to *S. sclerotiorum* is crucial, and wild peanut relatives represent a valuable source of disease resistance genes. Wild species, such as *Arachis duranensis* and *A. stenosperma*, exhibit high levels of resistance to certain diseases. A number of studies have been conducted utilizing a transcriptomic approach to comprehend their responses to biotic and/or abiotic stresses. The present study investigated the effects of overexpression of candidate genes identified from wild *Arachis* species that are potentially involved in defense responses to biotic stresses. Using *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana tabacum* as model plants, the objective was to understand how these genes influence the interaction with *S. sclerotiorum* through phenotypic assessments and subsequent molecular evaluations. An inoculation methodology was initially established for detached leaves, with bioassays conducted using six genes: Expansin (*AdEXLB8*), Truncated NLR gene (TNx.) (*AsTIR19*), Endochitinase (*AsECH11*), Allene oxide cyclase (*AsAOC3*), Lipocalin (*AsTIL*) e Stilbene synthase (*AsSTS4*) from both *A. duranensis* and *A. stenosperma*. Overexpression of *AdEXLB8* resulted in increased tolerance, suggesting its potential as a candidate gene to bolster resistance. Analysis of *AsTIR19* highlighted the complexity of the plant-pathogen interaction following introgression of this gene, providing insights into the molecular mechanisms activated, such as the induction of reactive oxygen species, and underscoring genetic engineering as a promising tool for enhancing resistance. Overexpression of the *AsECH11* gene, which encodes an endochitinase enzyme, both alone and in combination

with *AdEXLB8*, also resulted in a significant reduction in fungal lesions, indicating the effectiveness of gene pyramiding strategies in broadening the resistance spectrum. Conversely, overexpression of the *AsAOC3*, *AsTIL*, and *AsSTS4* transgenes from *A. stenosperma* did not significantly impact disease progression, emphasizing the complexity of gene-pathogen interactions and the necessity for more comprehensive approaches. In conclusion, the overexpression of certain candidate genes may offer an effective approach in developing resistant varieties to mitigate losses caused by *S. sclerotiorum*, highlighting the importance of genetic investigation and the utilization of wild relatives in crop improvement.

Keywords: *Arachis duranensis*, *Arachis stenosperma*, white mold, defense genes, transgenic plants.

INTRODUÇÃO

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary (1884) pertence ao reino Fungi, filo Ascomycota, e é conhecido por ser o agente causador do mofo branco e de doenças de podridão do caule. Caracterizado como um necrotrófico típico, o fungo secreta proteínas e metabólitos para matar rapidamente as células do hospedeiro e completar seu ciclo de infecção (BOLAND; HALL, 1994; BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006). A partir desses estudos iniciais associados a uma pesquisa aprofundada, incluindo apenas publicações revisadas por pares e certificando-se que os isolados foram identificados utilizando marcadores moleculares, estimaram que atualmente 425 espécies em 74 famílias são hospedeiras documentadas de *S. sclerotiorum* (DERBYSHIRE et al., 2022).

A maior parte da vida do fungo se passa em agregados de hifas melanizadas chamados escleródios, que sobrevivem por muito tempo no solo. Dependendo das condições ambientais, os escleródios podem germinar miceliogenicamente, que envolve o crescimento de hifas que podem penetrar diretamente no tecido vegetal ou carpogenicamente, considerado o modo dominante de infecção e envolve a germinação do escleródio para formar estruturas denominadas apotécios, a qual requer solo úmido com temperaturas moderadas (10–20°C). Os apotécios liberam ascósporos que são transportados pelo vento e depositados na superfície da planta. Sob condições úmidas, os ascósporos germinam para formar hifas que podem infectar a planta diretamente através da epiderme. O fungo coloniza tecidos internos da planta e os sintomas se desenvolvem em ambientes frios e úmidos prolongados. *Sclerotinia sclerotiorum*, à medida que esgota a base de nutrientes do hospedeiro, passa a produzir micélios brancos e de aspecto cottonoso que, conseqüentemente, formam novos escleródios que cairão no solo para sobreviver até a próxima estação (REICH; CHATTERTON, 2023).

Sclerotinia sclerotiorum é um patógeno altamente destrutivo e sua infecção frequentemente causa danos significativos às culturas resultando em perda de rendimento. As culturas infectadas tornam-se inviáveis ao mercado, uma vez que apresentam diminuição do peso, número e/ou qualidade das sementes, resultando em perdas econômicas substanciais (DERBYSHIRE; DENTON-GILES, 2016). As perdas ocasionadas por esse patógeno podem apresentar variações expressivas, dependendo da localização geográfica e das culturas afetadas (ALKOORANEE et al., 2017). A falta de resistência eficaz do hospedeiro, a vasta gama de hospedeiros e as dificuldades gerais em

lidar com esta doença são as principais razões para os danos às plantas causados por *S. sclerotiorum* (HOSSAIN et al., 2023).

Por apresentar uma ampla variedade de hospedeiros, *S. sclerotiorum* não apresenta nenhum sintoma exclusivo comum em seus hospedeiros (AMSELEM et al., 2011; HOSSAIN et al., 2023), embora um sinal que facilmente pode ser identificado é a presença de micélio branco nos tecidos afetados. Caules, folhas, pecíolos e órgãos reprodutivos podem inicialmente apresentar lesões encharcadas com uma margem distinta, seguidas de murcha, branqueamento e fragmentação. Os escleródios são tipicamente formados dentro do tecido infectado, mas podem se formar na superfície dos tecidos durante condições de alta umidade (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006; HOSSAIN et al., 2023). A susceptibilidade a *S. sclerotiorum* nas populações hospedeiras geralmente apresenta variações significativas. Até o momento, não há evidências de resistência total a *S. sclerotiorum* em qualquer espécie hospedeira (DERBYSHIRE et al., 2022), sendo utilizados atualmente como controle, estratégias como manejo integrado, uso de fungicidas e controle biológico, o que faz com que este patógeno seja foco de muitos programas de pesquisa (AMSELEM et al., 2011).

Desta forma, o desenvolvimento de variedades resistentes emerge como uma estratégia mais eficiente para mitigar as perdas de produtividade ocasionadas por essa doença (LIANG et al., 2021). Os parentes silvestres do amendoim têm representado uma fonte valiosa de genes de resistência a doenças, graças à sua extensa diversidade genética, originada por adaptações ao longo da evolução em variados ambientes e exposição a diversas pressões bióticas (STALKER; SIMPSON, 1995). A utilização de espécies silvestres da seção *Arachis* como doadoras de alelos de interesse agrônomico em programas de melhoramento do amendoim cultivado tem aumentado nos últimos anos, em sua maioria voltados para o incremento da resistência a doenças (DWIVEDI et al., 2003, 2008). Sabendo-se do grande interesse pela prospecção, resgate e caracterização do germoplasma dessas espécies silvestres, estudos visando a identificação e isolamento de novos genes possuem grande relevância (SIMPSON; KRAPOVICKAS; VALLS, 2001; STALKER; MOSS, 1987; STALKER, 1992). Nossa equipe de pesquisa tem se dedicado à investigação da diversidade genética de espécies silvestres de *Arachis*, com o intuito de identificar e caracterizar genes dessas espécies (BRASILEIRO et al., 2021; CARMO et al., 2019; MARTINS et al., 2020; MOTA et al., 2018, 2021; VINSON et al., 2018). A abordagem principal adotada pelo grupo para prospecção e identificação de genes

envolve a transcriptômica, visando compreender as respostas a diversos estresses bióticos e/ou abióticos em termos de expressão gênica (BRASILEIRO et al., 2014; GUIMARAES et al., 2015; VINSON et al., 2018).

As espécies silvestres *A. duranensis* Krapov & W. C. Greg e *A. stenosperma* Krapov & W. C. Greg possuem níveis elevados de resistência a algumas doenças (PROITE et al., 2007) e são naturalmente encontradas em diversos habitats (VEIGA et al., 2001). Em estudos realizados pela equipe nos últimos anos explorando o pool genético dos parentes silvestres do amendoim, como uma fonte valiosa para melhoramento da cultura (GUIMARAES et al., 2017), foram identificados diversos genes e proteínas associados às respostas à escassez hídrica em *A. duranensis*, por meio de análises dos dados de transcriptoma submetidas a tratamentos de déficit hídrico (GUIMARAES et al., 2012; BRASILEIRO et al., 2015; VINSON et al., 2018; MOTA et al., 2019). Em *A. stenosperma*, plantas submetidas à inoculação com *Meloidogyne arenaria* (Neal, 1889) Chitwood, 1949 e plantas controles tiveram o transcriptoma analisado em diferentes tempos de coleta, para estudo da ação de genes do nematoide e na resposta da planta. Com o objetivo de identificar genes e reguladores envolvidos na ativação dessa resposta de defesa, foi realizada uma abrangente análise *in silico* do transcriptoma e proteoma das raízes durante os estágios iniciais da interação. Posteriormente, uma validação da expressão *in vitro* desses genes foi conduzida por meio de análise por RT-qPCR, com vários genes candidatos identificados (GUIMARAES et al., 2010; GUIMARAES et al., 2015; MARTINS et al., 2020; MORGANTE et al., 2013; MOTA et al., 2018, 2021; PROITE et al., 2007).

OBJETIVO GERAL

Estudar os efeitos da expressão heteróloga de genes de espécies silvestres de *Arachis*, potencialmente envolvidos em respostas de defesa aos estresses bióticos, em *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh e *Nicotiana tabacum* L. (plantas-modelo) durante a interação com *Sclerotinia sclerotiorum*, fungo necrotrófico, causador da doença do mofo branco em diversas culturas.

Objetivos específicos

Realizar bioensaios de infecção através do método de folhas destacadas de plantas transgênicas de *A. thaliana* superexpressando o gene *AsTIR19* e tabaco superexpressando os genes *AdEXLB8*, *AsTIR19*, *AsECH11*, *AsAOC3*, *AsTIL* e *AsSTS4* com o fungo necrotrófico *S. sclerotiorum*.

Identificar, a partir dos resultados dos ensaios, quais os genes candidatos que apresentam melhores desempenhos quanto à resposta de resistência à infecção por *S. sclerotiorum*.

Analisar a expressão de genes marcadores de vias de defesa (SA, JA, ET, ABA) em plantas transgênicas, por meio da técnica de RT-qPCR, para mapear as vias metabólicas sinalizadas pela superexpressão dos genes candidatos.

REVISÃO DE LITERATURA

Sclerotinia sclerotiorum - Etiologia, Epidemiologia e ciclo de vida

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary (1884) pertence ao reino Fungi, filo Ascomycota, agente causador do mofo branco e das doenças de podridão do caule que infecta mais de 400 espécies de plantas, muitas de grande interesse econômico, como alface, algodão, amendoim, batata, canola, cenoura, ervilha, feijão, girassol, lentilha, morango, mostarda, soja, tomate, entre outras (BOLAND e HALL, 1994). É considerado um patógeno necrotrófico típico, que utiliza proteínas e metabólitos secretados para matar rapidamente as células do hospedeiro e completar seu ciclo de infecção (BADET et al., 2017; GUYON et al., 2014).

Sclerotinia sclerotiorum causa uma doença conhecida como mofo branco, podendo também ser chamada de podridão-de-esclerotinia ou murcha-de-esclerotinia. Infectando folhas, flores, frutos e caules, as epidemias são desencadeadas por temperaturas amenas, entre 10 e 20°C, alta umidade e excesso de molhamento foliar (AGRIOS, 2005). À medida que a doença progride, micélios densos de coloração branca se desenvolvem ao redor do caule formando escleródios, que são massas compactas de hifas, que permitem ao patógeno sobreviver aos meses de inverno e infectar plantas quando em condições favoráveis (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006; KOHN, 1979).

Os escleródios possuem forma arredondada, alongada ou irregular, e seu tamanho varia de aproximadamente 2 a 20 por 2 a 30 mm, compostos por três camadas distintas: casca, córtex e medula, sendo cada uma constituída por uma espessa camada de hifas. A parte interna é composta por carboidratos e proteínas, enquanto a casca é formada por células cujas paredes contêm melanina (BUTLER; GARDINER; DAY, 2009; TOURNEAU, 1979). A melanina, um pigmento de coloração escura, desempenha um importante papel na proteção do fungo contra condições ambientais adversas, como radiação solar, altas temperaturas, metais tóxicos, enzimas líticas e microrganismos antagônicos, possibilitando sua viabilidade no solo por um período de até 10 anos (BRUSTOLIN; REIS; PEDRON, 2016; VENTUROSU et al., 2014).

Sclerotinia sclerotiorum possui enorme potencial reprodutivo e capacidade de sobrevivência a longo prazo, o que faz dos escleródios componentes centrais na epidemiologia da doença. Podem germinar carpogenicamente ou miceliogenicamente e

sofrem influência das condições ambientais. Os escleródios que germinam miceliogenicamente produzem hifas que podem atacar diretamente os tecidos das plantas (BARDIN; HUANG, 2001). Os escleródios que germinam carpogenicamente produzem apotécios e, subsequentemente, ascósporos que infectam porções acima do solo das plantas hospedeiras. Centenas de ascos, com oito ascósporos, de forma cilíndrica, são formados em cada apotécio. O apotécio libera ascósporos continuamente por cerca de duas semanas, sendo sua produção máxima, em um intervalo de dois a três dias entre o quarto e nono dia de vida ativa do apotécio, podendo chegar a uma produção total entorno de dois milhões de esporos (SCHWARTZ; STEADMAN, 1978). As hifas resultantes de qualquer tipo de germinação são hialinas, septadas, ramificadas e multinucleadas (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006).

Sintomatologia

Por possuir uma grande diversidade de hospedeiros, não existem sintomas exclusivos que sejam comuns a todas as plantas infectadas por esse fungo. Geralmente se formam lesões encharcadas nas folhas que se expandem rapidamente pelo pecíolo, chegando ao caule. As lesões geralmente se desenvolvem em tecidos necróticos que subsequentemente formam um micélio branco de aspecto cotonoso, que são um sinal característico da doença, podendo levar ao murchamento da planta. Conforme as lesões vão envelhecendo, pode ocorrer a formação de escleródios dentro dos caules, nas porções de floração e produção de sementes da planta. Após o início da doença no hospedeiro, a infecção pode se propagar para plantas vizinhas através do contato direto planta a planta (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006).

Controle

Tem sido difícil o controle de doenças causadas por *S. sclerotiorum* devido à falta de níveis mais altos de resistência nas principais culturas afetadas por este patógeno (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006). O manejo integrado tem sido bastante utilizado, por meio do monitoramento e anotações precisas de onde e quando o mofo branco ocorre a cada ano nos campos. Práticas culturais como rotação de culturas,

gerenciamento de copa, espaçamento entre fileiras, data de plantio, manejo da irrigação e características das plantas (porte, forma e hábito de crescimento) tem sido adotadas, embora impacto direto desses fatores na incidência da doença varia, pois seu desenvolvimento é altamente dependente de condições climáticas durante os estágios de crescimento reprodutivo (FARUK, 2022; HOSSAIN et al., 2023; PELTIER et al., 2012).

Os fungicidas foram por muitos anos o principal método de controle para doenças causadas por *S. sclerotiorum* (BARDIN; HUANG, 2001; BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006). Grupos de fungicidas como piridina-carboxamida (inibidores de succinato desidrogenase), triazol (inibidores de desmetilação) e estrobilurina (inibidores externos de quinona) foram extensivamente usados para controlar a doença na última década, embora apresentem risco de desenvolvimento de resistência (OTUN; ACHILONU; NTUSHELO, 2023; ZAMANI-NOOR, 2021). As aplicações químicas, por meio de fungicidas, podem ser um componente de um sistema de manejo integrado para a podridão do caule causada por *Sclerotinia*, embora nenhum ofereça controle completo (PELTIER et al., 2012).

Como estratégia alternativa, o controle biológico vem sendo utilizado em condições de campo (WILLBUR et al., 2019). O fungo *Paraphaeosphaeria minitans* W. A. Campb foi identificado como um patógeno de *S. sclerotiorum* em 1947 (CAMPBELL, 1947) e tem sido o organismo de controle biológico mais amplamente disponível e testado para controlar a podridão do caule de *Sclerotinia* (PELTIER et al., 2012). Atualmente, agentes de controle biológico adicionais, como *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp. têm sido estudados, demonstrando ser promissores no controle de *S. sclerotiorum* (CASTILLO et al., 2011; HU et al., 2023; MONTALVÃO et al., 2023).

O controle da doença é limitado pela falta de resistência completa, o que faz com que a seleção de cultivares seja de extrema importância no controle de *S. sclerotiorum*. O uso de fontes de resistência, principalmente em campos com histórico da doença, é uma estratégia poderosa para reduzir a incidência e a severidade. A adoção de estratégias de manejo integrado, que combinam resistência genética com práticas de controle visando reduzir o inóculo do fungo e evitar condições favoráveis ao seu desenvolvimento, desempenha um papel crucial na redução das infecções e na sustentação da resistência ao longo do tempo (WILLBUR et al., 2019).

Diversos estudos foram conduzidos com o objetivo de identificar fontes de resistência a *S. sclerotiorum* (CHAUHAN et al., 2020; MEI et al., 2020; MWAPE et al., 2021; ZHANG et al., 2018). Avanços significativos foram alcançados tanto no âmbito do melhoramento convencional quanto molecular para conferir resistência ao mofo branco na cultura da soja, embora tenham sido desenvolvidas apenas algumas cultivares com resistência parcial até o momento. As informações sobre genes associados à resistência oferecem perspectivas promissoras para fortalecer a resistência a *S. sclerotiorum* nos programas de melhoramento (ANTWI-BOASIAKO et al., 2021). O melhoramento genético emerge como uma estratégia importante em diversas culturas para melhorar a resistência do hospedeiro como meio de controle de doenças. Até o presente momento, não foi identificada nenhuma fonte genética que confira resistência completa contra esse patógeno de ampla gama de hospedeiros; contudo, resistência parcial foi documentada em culturas economicamente relevantes, como canola e soja (MBENGUE et al., 2016; MCCAGHEY et al., 2019), sublinhando a urgência e importância contínua de abordagens em programas de melhoramento para a busca por resistência a este fungo necrotrófico (O'SULLIVAN; BELT; THATCHER, 2021).

Conceitos de Imunidade vegetal inata (PTI e ETI)

Diferentes estratégias foram desenvolvidas pelos patógenos para invadir, se alimentar e se reproduzir nas plantas hospedeiras (AGARWAL et al., 2018). A fim de assegurar sua sobrevivência no complexo meio em que se encontram, as plantas desenvolveram sofisticados mecanismos de defesa contra patógenos ao longo da evolução. São capazes de reconhecer moléculas do patógeno, ativando respostas específicas de defesa (PIETERSE et al., 2009).

A imunidade das plantas pode ser descrita em dois níveis (JONES; DANGL, 2006). As plantas possuem um sistema imunológico inato que percebe a presença do patógeno pelo reconhecimento de moléculas conhecidas como padrões moleculares associados a patógenos ou PAMPs. O reconhecimento de PAMPs por PRRs (receptores de reconhecimento de patógenos) ativa uma cascata de sinalização induzindo a expressão de genes de defesa da planta hospedeira e impedindo a colonização do patógeno. Esse processo é conhecido como imunidade disparada por PAMPs ou PTI (NGOU; DING;

JONES, 2022). PRRs são receptores transmembrana que podem apresentar dois tipos básicos de estrutura, receptor-like proteins (RLPs) e receptor-like kinases (RLKs) que dispõem um domínio quinase intracelular na região C-terminal. São codificados por centenas de genes e possuem um domínio funcional modular na região extracelular N-terminal (MONAGHAN; ZIPFEL, 2012). Os principais exemplos de PAMPs incluem a flagelina, o fator de alongação Tu, os lipopolissacarídeos (LPS), os peptidoglicanos (PGN) e os fatores de *quorum sensing* de origem bacteriana. Além disso, o β -glucano, o ergosterol e a quitina, provenientes de fontes fúngicas, também são considerados PAMPs (BOLLER; FELIX, 2009; NÜRNBERGER et al., 2004; ZIPFEL, 2014).

O reconhecimento da presença de micro-organismos é a etapa mais importante para a ativação da resposta de defesa. A identificação dos elicitores (moléculas que, em concentrações muito baixas, induzem a resposta de defesa da planta) faz com que se inicie o processo de resistência basal nas plantas (THAKUR; SOHAL, 2013). Uma das primeiras respostas celulares de PTI geralmente envolve a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS - *Reactive Oxygen Species*), que podem atuar como moléculas de sinalização ou de modo a impedir o crescimento dos micro-organismos (KIMURA et al., 2017). O estabelecimento da defesa é desencadeado por várias vias que podem envolver a síntese de fitohormônios, como ácido jasmônico (JA), ácido salicílico (SA) e etileno (ET), que atuam como moléculas sinalizadoras (AGARWAL et al., 2018; PIETERSE et al., 2009). A defesa desencadeada por PTI inclui outras respostas como o acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese (PR - *Pathogenesis-Related*), como quitinases e glucanases, fortificação de paredes celulares e a síntese de compostos secundários antimicrobianos (PIETERSE et al., 2009).

Os patógenos desenvolveram meios para suprimir PTI através da secreção de proteínas efetoras no citosol da célula vegetal que, presumivelmente, alteram a sinalização de resistência ou a manifestação de respostas de resistência. Dessa forma, as doenças são consequência da suscetibilidade desencadeada por efetores (ETS). Uma vez que os patógenos adquiriram a capacidade de suprimir as defesas primárias, as plantas desenvolveram um mecanismo mais especializado de detecção, que envolve proteínas de resistência (R) do tipo NBS-LRR (NLR), capazes de detectar efetores do patógeno e elicitar uma potente resposta imunológica, denominada como imunidade desencadeada por efector (ETI) (CHISHOLM et al., 2006; JONES; DANGL, 2006).

Proteínas R são classificadas de acordo com a organização de motivos de aminoácidos conservados e seus domínios de membrana. A maioria desses receptores possuem ao menos três domínios principais: na região C-terminal encontra-se um domínio de repetições ricas em leucina (LRR), um domínio central conservado com sítios de ligação a nucleotídeos (NBS - *Nucleotide-Binding Site*), e um domínio variável na região N-terminal (DUBEY; SINGH, 2018; MCHALE et al., 2006). O domínio NBS atua, principalmente, na sinalização (DUBEY; SINGH, 2018) e os LRRs são domínios envolvidos em interações proteína-proteína (JONES; JONES, 1997). Grande parte dos genes de resistência a doenças (genes R) em plantas clonadas codificam proteínas de repetição rica em leucina no local de ligação de nucleotídeo (NBS-LRR). Essas proteínas grandes e abundantes estão envolvidas na detecção de diversos patógenos, incluindo bactérias, vírus, fungos, nematoides, insetos e oomicetos (MCHALE et al., 2006).

A resposta do tipo ETI é mais rápida, e mais robusta que a de PTI e geralmente leva a uma morte celular local, conhecida como resposta de hipersensibilidade (HR), que detém a disseminação do patógeno. Em alguns casos, a morte celular após HR, leva à ativação de uma resistência duradoura e de amplo espectro denominada resistência sistêmica adquirida (SAR) (JONES; DANGL, 2006).

Genômica funcional de espécies silvestres de *Arachis* e a identificação de genes candidatos para resistência a estresses bióticos e abióticos

Ao longo dos últimos anos, nosso grupo de pesquisa explorou a diversidade genética de espécies silvestres de *Arachis* com o objetivo de identificar genes associados à adaptação destas espécies a um amplo espectro de ambientes adversos encontrados em seu habitat natural (BRASILEIRO et al., 2021; CARMO et al., 2019; MARTINS et al., 2020; MOTA et al., 2018, 2021; VINSON et al., 2018). A prospecção e identificação de genes 'silvestres' envolvidos na adaptação a condições adversas, permite a melhor compreensão dos sistemas moleculares envolvidos na resposta a estresses. Plantas silvestres são importantes fontes de genes para plantas cultivadas, visto que diversos táxons selvagens são localmente adaptados a habitats específicos, além de abranger uma diversidade genética significativa, que podem ser utilizados para o melhoramento genético de espécies cultivadas, criando uma agricultura mais sustentável (VON WETTBERG; DAVIS; SMÝKAL, 2020).

A principal estratégia utilizada pelo grupo para a prospecção de genes é a transcriptômica, onde plantas submetidas a diferentes estresses bióticos e/ou abióticos tem o seu RNA mensageiro sequenciado a fim de se conhecer sua resposta transcricional a esses estresses (BRASILEIRO et al., 2014; GUIMARAES et al., 2015; VINSON et al., 2018). Os genes expressos quando as plantas são submetidas a um determinado estresse são, então, comparados àqueles expressos nas plantas controle, ou seja, não submetidas a estresse, e a análise *in silico* entre esses dois dados possibilita a identificação de genes diferencialmente expressos. Dentre os genes diferencialmente expressos identificados em uma análise transcriptômica, alguns são selecionados ou por sua função biológica, baseada no estudo da literatura, ou por sua alta expressão em relação ao dado controle (GUIMARAES et al., 2012).

Arachis stenoperma Krapov. & W. C. Greg., um diploide selvagem, demonstra alta resistência a diversos patógenos, incluindo o nematoide das galhas, *Meloidogyne arenaria*. Estudos recentes investigaram a resposta dessa planta à inoculação com *M. arenaria*, analisando a expressão gênica ao longo do tempo (GUIMARAES et al., 2010; GUIMARAES et al., 2015; MARTINS et al., 2020; MORGANTE et al., 2013; MOTA et al., 2018, 2021; PROITE et al., 2007). Uma análise *in silico* do transcriptoma e proteoma da raiz durante os primeiros estágios da interação foi realizada para identificar genes e reguladores envolvidos na resposta de defesa, com a identificação de genes relacionados às vias de ácido jasmônico, ácido salicílico, equilíbrio hormonal, plasticidade e sinalização celular como potencialmente envolvidos na resistência de *A. stenoperma*.

O ácido jasmônico (JA) desempenha um importante papel na indução de resistência a doenças, atuando na ativação de genes de resistência induzida envolvidos na defesa das plantas em resposta a ferimentos e ataque de patógenos (ISAYENKOV et al., 2005). Alene oxidase ciclase (*AsAOC3*) é uma enzima funcional envolvida na biossíntese de JA e compostos relacionados (GUIMARAES et al., 2015; RIEMANN et al., 2013).

Altos níveis de SA, que muitas vezes levam à HR, são regulados por outras proteínas, como as Lipocalinas, envolvidas na modulação da tolerância ao estresse oxidativo, as quais já mostraram atuar como sequestradores de moléculas potencialmente nocivas, conhecidas por serem induzidas por estresse de temperatura extrema e luz excessiva (CHARRON et al., 2008; ZINOVIEVA et al., 2011). Estudos utilizando uma proteína Lipocalina (*AsTIL*) de *A. stenoperma*, superexpressa em uma cultivar de amendoim suscetível a *M. arenaria*, indicaram que *AsTIL* tem grande utilidade como um

gene candidato que favorece a resistência ao nematoide das galhas (PEREIRA et al., 2019).

Expansinas são proteínas de parede celular que participam nas respostas das plantas a diferentes tipos de estresses bióticos e abióticos. GUIMARAES et al. (2017) realizaram a primeira identificação e análise da superfamília da expansina no gênero *Arachis*, além da caracterização molecular e funcional de Expansina-like B, membro da família que é menos estudada. MOTA et al. (2021) demonstraram que a superexpressão de um gene candidato codificador de Endoquitinase (*AsECH1*) de *A. stenosperma*, reduziu em até 30% a infecção por *M. incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949. Os genes R são essenciais para interações planta-patógeno, pois permitem o reconhecimento dos patógenos e posterior ativação de defesas induzíveis que frequentemente culminam em uma resposta rápida de HR (KOURELIS; VAN DER HOOM, 2018). A grande maioria dos genes R de plantas são NBS-LRR, pois codificam proteínas com um domínio variável amino-terminal, um Sítio de Ligação de Nucleotídeo central (NBS) e um domínio de Repetições Ricas em Leucina (LRR) carboxi-terminal (MEYERS et al., 1999).

Uso de plantas modelo na avaliação de genes candidatos de resistência

Apesar de espécies silvestres de *Arachis* já terem sido identificadas como fontes de resistência a várias pragas e doenças (STALKER; MOSS, 1987), a transferência de características desejáveis dessas espécies silvestres para variedades cultivadas de amendoim tem sido limitada devido a barreiras reprodutivas e falhas frequentes nos cruzamentos interespecíficos (KARTHIK et al., 2018; KISHOR et al., 2018; SHARMA; ANJIAH, 2000).

Arabidopsis thaliana, pioneira como planta modelo globalmente reconhecida (WIENKOOP; BAGINSKY; WECKWERTH, 2010), emergiu como um organismo foco para integrar as disciplinas tradicionais da ciência das plantas com os avanços da genética e biologia molecular. A escolha deste modelo foi baseada em características fundamentais, tais como: ciclo curto, tamanho reduzido, minimizando as demandas por instalações de crescimento, e a capacidade prolífica de produção de sementes por meio da autopolinização (SOMERVILLE; KOORNEEF, 2002; KOORNEEF; MEINKE, 2010). Essa convergência estratégica permite a abordagem holística de investigações

científicas, promovendo avanços significativos na compreensão dos processos biológicos fundamentais em plantas.

Atualmente, uma das plantas mais utilizadas como modelo para estudos de validação funcional de genes é o tabaco (*Nicotiana tabacum*). Dentre as principais características que a tornam um excelente sistema-modelo estão um ciclo de vida curto, em torno de seis meses, facilidade de cultivo *in vitro* e facilidade de transformação e regeneração das plantas transformadas (HORSCH et al., 1985), além de ser uma espécie suscetível a diferentes patógenos, possibilitando inúmeros estudos. Adicionalmente, a planta de tabaco produz em média 1.000 sementes por lóculo (HUANG; RUSSELL, 1992), tem órgãos florais grandes e de fácil manuseio, além de estar bem adaptada a climas tropicais.

O estudo dos efeitos da expressão heteróloga de transgenes em sistemas-modelos, como o tabaco, é uma estratégia eficiente e rápida para avaliar o potencial biotecnológico de genes candidatos antes de sua introdução nas culturas-alvo. O uso do sistemas-modelo permite o estudo dos efeitos pleiotrópicos e das respostas fenotípicas à exposição a diferentes tipos de estresse. Permite ainda avaliar, de maneira robusta, o potencial biotecnológico associado à superexpressão ou ao silenciamento de genes candidatos (BATTEY; SIERRA; IVANOV, 2020). Por essas razões, plantas de tabaco têm sido amplamente utilizadas como planta-modelo para a validação funcional genes candidatos pelo grupo (BRASILEIRO et al., 2021) e em todo mundo (ANDRADE et al., 2016; LIU et al., 2020; ZHANG et al., 2017, 2018).

A utilização de plantas modelo é uma ferramenta valiosa na avaliação funcional de genes candidatos, uma vez que permite não apenas uma compreensão mais abrangente de sua função, mas também oferece uma estratégia eficaz para investigar respostas fenotípicas a diferentes tipos de estresse. Dessa forma, ao identificar genes isolados de *Arachis silvestres* que demonstrem ser promissores na resistência/tolerância em plantas transgênicas de *Arabidopsis* ou tabaco, abre-se a perspectiva de sua futura inserção, por meio da transgenia, não apenas em cultivares-élite de amendoim, mas também em outras culturas agrícolas, visando mitigar as perdas causadas por estresses bióticos agrícolas (FERRO; PAIXÃO; SILVA, 2021). Essa abordagem representa um passo significativo na busca por soluções eficazes para o controle de doenças que impactam a produção agrícola globalmente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, G. et al. High-density genetic map using whole-genome resequencing for fine mapping and candidate gene discovery for disease resistance in peanut. **Plant Biotechnology Journal**, v. 16, n. 11, p. 1954–1967, 2018.
- AGRIOS, G. **Plant Pathology**. New York: Academic Press, 2005.
- ALKOORANEE, J. T. et al. Detecting the hormonal pathways in oilseed rape behind induced systemic resistance by *Trichoderma harzianum* TH 12 to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plos One**, v. 12, p. 1-21, 2017.
- AMSELEM, J. et al. Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. **PLoS Genetics**, v. 7, n. 8, p. e1002230, 2011.
- ANDRADE, C. M. et al. Host-induced gene silencing in the necrotrophic fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Pathology**, v. 65, n. 4, p. 626–632, 2016.
- ANTWI-BOASIAKO, A. et al. Progress towards germplasm evaluation and genetic improvement for resistance to *Sclerotinia* white mold in soybean. **Euphytica**, v. 217, n. 9, p. 178, 2021.
- BADET, T. et al. Parallel evolution of the POQR prolyl oligo peptidase gene conferring plant quantitative disease resistance. **PLoS Genetics**, v. 13, n. 12, p. 1–24, 2017.
- BARDIN, S. D.; HUANG, H. C. Research on biology and control of *Sclerotinia* diseases in Canada1. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 23, n. 1, p. 88–98, 2001.
- BATTEY, J. N. D.; SIERRA, N.; IVANOV, N. V. Characterizing the Genome of *Nicotiana tabacum*. Em: **Springer**. [s.l.: s.n.]. p. 51–58, 2020.
- BOLAND, G.J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, 16, 93-108, 1994.
- BOLLER, T.; FELIX, G. A Renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. **Annual Review of Plant Biology**, v. 60, n. 1, p. 379–406, 2009.
- BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J.; NELSON, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: Biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, v. 7, n. 1, p. 1–16, 2006.
- BRASILEIRO, A. C. M. et al. Ectopic expression of an expansin-like B gene from wild *Arachis* enhances tolerance to both abiotic and biotic stresses. **The Plant Journal**, v. 107, n. 6, p. 1681–1696, 2021.
- BRASILEIRO, A. C. M. et al. Transcriptome profiling of wild *Arachis* from water-limited environments uncovers drought tolerance candidate genes. **Plant Molecular Biology**, v. 33, p. 1876-1892, 2015.
- BRASILEIRO, M. et al. genomics and genetic transformation in *Arachis*. **International Journal of Plant Biology**, v. 2, n. 3, p. 1017, 2014.
- BRUSTOLIN, R.; REIS, E. M.; PEDRON, L. Longevidade de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* na superfície do solo no campo. **Summa Phytopathologica**, v. 42, n. 2, p. 172–174, 2016.

- BUTLER, M. J.; GARDINER, R. B.; DAY, A. W. Melanin synthesis by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Mycologia**, v. 101, n. 3, p. 296–304, 2009.
- CAMPBELL, W. A. A new species of *Coniothyrium* parasitic on sclerotia. **Mycologia**, v. 39, n. 2, p. 190, 1947.
- CARMO, L. S. T. et al. Comparative proteomics and gene expression analysis in *Arachis duranensis* reveal stress response proteins associated to drought tolerance. **Journal of Proteomics**, v. 192, p. 299–310, 2019.
- CASTILLO, F. D. H. et al. In vitro antagonist action of *Trichoderma* Strains against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotium cepivorum*. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, v. 6, n. 3, p. 410–417, 2011.
- CHARRON, J. B. F. et al. The plant apolipoprotein D ortholog protects *Arabidopsis* against oxidative stress. **BMC Plant Biology**, v. 8, p. 1–12, 2008.
- CHAUHAN, S. et al. Screening and identification of resistant sources against *Sclerotinia sclerotiorum* causing white mold disease in common bean. **Crop Science**, v. 60, n. 4, p. 1986–1996, 2020.
- CHISHOLM, S. T. et al. Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 803–814, 2006.
- DERBYSHIRE, M. C. et al. The evolutionary and molecular features of the broad-host range plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. **Molecular Plant Pathology**, v. 23, p. 1075–1090, 2022.
- DERBYSHIRE, M. C.; DENTON-GILES, M. The control of *Sclerotinia* stem rot on oilseed rape (*Brassica napus*): current practices and future opportunities. **Plant Pathology**, v. 65, p. 859–877, 2016.
- DUBEY, N.; SINGH, K. Role of NBS-LRR proteins in plant defense. In: **Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction**. [s.l: s.n.]. p. 115–138, 2018.
- DWIVEDI, S. L. et al. Enhancing crop gene pools with beneficial traits using wild relatives. **Plant Breeding Reviews**, v. 30, p. 179–230, 2008.
- DWIVEDI, S. L. et al. Molecular breeding of groundnut for enhanced productivity and food security in the semi- arid tropics: opportunities and challenges. **Advances in Agronomy**, v. 80, p. 153–221, 2003.
- FARUK, MD. I. Integrated management of *Sclerotinia Sclerotiorum*, an emerging fungal pathogen causing white mold disease. **Journal of Plant Cell Development**, v. 1, n. 2, p. 1–14, 2022.
- FERRO, A. C.; PAIXÃO, A. K. L.; SILVA, J. A. DA. Agricultura transgênica como ferramenta para o desenvolvimento sustentável e econômico. **Diversitas Journal**, v. 6, n. 2, p. 2827–2838, 2021.
- GUIMARAES P.M. et al. (2017) Functional genomics in peanut wild relatives. In: Varshney, R., Pandey, M., Puppala N (ed) The peanut genome. Compendium of Plant Genome. pp 149–164.
- GUIMARAES, L. A. et al. Genome-wide analysis of expansin superfamily in wild *Arachis* discloses a stress-responsive expansin-like B gene. **Plant Molecular Biology**, v. 94, n. 1–2, p. 79–96, 2017.

- GUIMARAES, P. M. et al. A study of gene expression in the nematode resistant wild peanut relative, *Arachis stenosperma*, in Response to Challenge with *Meloidogyne arenaria*. **Tropical Plant Biology**, v. 3, n. 4, p. 183–192, 1. 2010.
- GUIMARAES, P. M. et al. Global transcriptome analysis of two wild relatives of peanut under drought and fungi infection. **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, 2012.
- GUIMARAES, P. M. et al. Root transcriptome analysis of wild peanut reveals candidate genes for nematode resistance. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, p. 1–22, 2015.
- GUYON, K. et al. Secretome analysis reveals effector candidates associated with broad host range necrotrophy in the fungal plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 1–18, 2014.
- HORSCH, R. B. et al. A simple and general method for hybridization revealed the expected. **Biological Science**, v. 227, p. 1229–1231, 1985.
- HOSSAIN, MD. M. et al. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: insights into the pathogenomic features of a global pathogen. **Cells**, v. 12, n. 7, p. 1063, 31 mar. 2023.
- HU, J. et al. Genomic and metabolic features of *Bacillus cereus*, inhibiting the growth of *Sclerotinia sclerotiorum* by synthesizing secondary metabolites. **Archives of Microbiology**, v. 205, n. 1, p. 8, 1 jan. 2023.
- HUANG, B. Q.; RUSSELL, S. D. Synergid degeneration in *Nicotiana*: a quantitative, fluorochromatic and chlorotetracycline study. **Sexual Plant Reproduction**, v. 5, n. 2, p. 151–155, 1992.
- ISAYENKOV, S. et al. Suppression of allene oxide cyclase in hairy roots of *Medicago truncatula* reduces jasmonate levels and the degree of mycorrhization with *Glomus intraradices*. **Plant Physiology**, v. 139, n. 3, p. 1401–1410, 2005.
- JONES, D. A.; JONES, J. D. G. The Role of Leucine-Rich Repeat Proteins in Plant Defences. **Advances in Botanical Research**, v. 24, 1997.
- JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 323–329, 2006.
- KARTHIK, S. et al. Genotype-independent and enhanced in planta *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of peanut [*Arachis hypogaea* (L.)]. **3 Biotech**, v. 8, n. 4, p. 1–15, 2018.
- KIMURA, S. et al. Bound by fate: The role of reactive oxygen species in receptor-like kinase signaling. **The Plant Cell**, v. 29, n. 4, p. 638–654, 2017.
- KISHOR, P. B. K. et al. Genetic engineering for salt and drought stress tolerance in peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Indian Journal of Plant Physiology**, v. 23, n. 4, p. 647–652, 2018.
- KOHN, L. M. Delimitation of the economically important plant pathogenic *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, v. 69, p. 881–886, 1979.
- KOURELIS, J.; VAN DER HOOM, R. A. L. Defended to the nines: 25 years of resistance gene cloning identifies nine mechanisms for R protein function. **The Plant Cell**, v. 30, p. 285–299, 2018.
- LIANG, Y. et al. Identification of QTLs associated with *Sclerotinia* blight resistance in peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 68, n. 2, p. 629–637, 2021.

LIU, X. et al. A *Na2CO3* responsive chitinase gene from *Leymus chinensis* improve pathogen resistance and saline-alkali stress tolerance in transgenic tobacco and maize. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 1–12, 2020.

MARTINS, A. C. Q. et al. Proteomics unravels new candidate genes for *Meloidogyne* resistance in wild *Arachis*. **Journal of Proteomics**, v. 217, p. 103690, 2020.

MBENGUE, M. et al. Emerging trends in molecular interactions between plants and the broad host range fungal pathogens *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum*. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, 2016.

MCCAGHEY, M. et al. The complexity of the *Sclerotinia sclerotiorum* pathosystem in soybean: virulence factors, resistance mechanisms, and their exploitation to control *Sclerotinia* stem rot. **Tropical Plant Pathology**, v. 44, n. 1, p. 12–22, 2019.

MCHALE, L. et al. Plant NBS-LRR proteins: Adaptable guards. **Genome Biology**, v. 7, n. 4, 2006.

MEI, J. et al. Introgression and pyramiding of genetic loci from wild *Brassica oleracea* into *B. napus* for improving *Sclerotinia* resistance of rapeseed. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 133, n. 4, p. 1313–1319, 2020.

MEYERS, B. C. et al. Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. **The Plant Journal**, v. 20, n. 3, p. 317–332, 1999.

MONAGHAN, J.; ZIPFEL, C. Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 15, n. 4, p. 349–357, 2012.

MONTALVÃO, S. C. L. et al. Suppression of the phytopathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma* spp. **Biologia**, 2023.

MORGANTE, C. V. et al. A survey of genes involved in *Arachis stenosperma* resistance to *Meloidogyne arenaria* race 1. **Functional Plant Biology**, v. 40, n. 12, p. 1298–1309, 2013.

MOTA, A. P. Z. et al. Comparative root transcriptome of wild *Arachis* reveals NBS-LRR genes related to nematode resistance. **BMC Plant Biology**, v. 18, n. 1, p. 1–16, 2018.

MOTA, A. P. Z. et al. Contrasting effects of wild *Arachis* dehydrin under abiotic and biotic stresses. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1–16, 2019.

MOTA, A. P. Z. et al. Defining the combined stress response in wild *Arachis*. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–12, 2021.

MOTA, A. P. Z. et al. Evolutionarily conserved plant genes responsive to root-knot nematodes identified by comparative genomics. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 295, n. 4, p. 1063–1078, 2020.

MWAPE, V. W. et al. Identification of sources of *Sclerotinia sclerotiorum* resistance in a collection of wild *Cicer* germplasm. **Plant Disease**, v. 105, n. 9, p. 2314–2324, 2021.

NGOU, B. P. M.; DING, P.; JONES, J. D. G. Thirty years of resistance: Zig-zag through the plant immune system. **The Plant Cell**, v. 34, n. 5, p. 1447–1478, 2022.

NÜRNBERGER, T. et al. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. **Immunological Reviews**, v. 198, n. 1, p. 249–266, 5 abr. 2004.

- O'SULLIVAN, C. A.; BELT, K.; THATCHER, L. F. Tackling control of a cosmopolitan phytopathogen: *Sclerotinia*. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, 2021.
- OTUN, S.; ACHILONU, I.; NTUSHELO, K. The secondary metabolites profiling of the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Plant Science and Phytopathology**, v. 7, n. 2, p. 027–038, 2023.
- PELTIER, A. J. et al. Biology, Yield loss and control of *Sclerotinia* stem rot of soybean. **Journal of Integrated Pest Management**, v. 3, n. 2, p. 1–7, 2012.
- PEREIRA, B. M. et al. Overexpression of wild *Arachis* Lipocalin enhances root-knot nematode resistance in peanut hairy roots. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 37, n. 1–2, p. 74–86, 2019.
- PIETERSE, C. M. J. et al. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. **Nature Chemical Biology**, v. 5, n. 5, p. 308–316, 2009.
- PROITE, K. et al. ESTs from a wild *Arachis* species for gene discovery and marker development. **BMC Plant Biology**, v. 7, p. 1–10, 2007.
- REICH, J.; CHATTERTON, S. Predicting field disease caused by *Sclerotinia sclerotiorum*: A review. **Plant Pathology**, v. 72, p. 3-18, 2023.
- RIEMANN, M. et al. Identification of rice Allene Oxide Cyclase mutants and the function of jasmonate. **The Plant Journal**, v. 74, p. 226–238, 2013.
- SCHWARTZ, H. F.; STEADMAN, J. R. Ecology and epidemiology factors affecting sclerotium populations of, and apothecium production by, *Sclerotinia sclerotiorum*. **The American Phytopathological Society**, 1978.
- SHARMA, K. K.; ANJIAH, V. An efficient method for the production of transgenic plants of peanut (*Arachis hypogaea* L.) through *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation. **Plant Science**, v. 159, n. 1, p. 7–19, 2000.
- SIMPSON, C. E.; KRAPOVICKAS, A.; VALLS, J. F. M. History of *Arachis* Including Evidence of *A. hypogaea* L. Progenitors. **Peanut Science**, v. 28, n. 2, p. 78–80, 2001.
- STALKER, H. T.; MOSS, J. P. Speciation, cytogenetics, and utilization of *Arachis* species. In: BRADY, N. C. B. T.-A. IN A. (Ed.). [s.l.] Academic Press, 1987. v. 41p. 1–40.
- STALKER, H. T.; SIMPSON, C. E. Genetic resources in *Arachis*. **Advances in peanut Science**, p. 14–53, 1995.
- STALKER, T. H. Utilizing *Arachis* germoplasm resources. In: GROUNDNUT-A GLOBAL PERSPECTIVE: PROCEEDINGS OF AN INTERNATIONAL WORKSHOP. ICRISAT Center. India: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, 1992. p. 281–295.
- THAKUR, M.; SOHAL, B. S. Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: a review. **ISRN Biochemistry**, v. 2013, p. 1–10, 2013.
- TOURNEAU, D. LE. Morphology, Cytology, and Physiology of *Sclerotinia* Species in Culture. **Phytopathology**, v. 69, n. 8, p. 887, 1979.
- VEIGA, R. F. A. et al. Caracterização morfológica de acessos de germoplasma de quatro espécies brasileiras de amendoim-silvestre. **Bragantia**, v. 60, n. 3, p. 167–176, 2001.

- VENTUROSOS, L. DOS R. et al. Relação de massa e localização do escleródio no solo com germinação carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Summa Phytopathologica**, v. 40, n. 1, p. 29–33, 2014.
- VINSON, C. C. et al. Early responses to dehydration in contrasting wild *Arachis* species. **PLoS one**, v. 13, n. 5, p. 1–28, 2018.
- VON WETTBERG, E.; DAVIS, T. M.; SMÝKAL, P. Editorial: wild plants as source of new crops. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 10–12, 2020.
- WILLBUR, J. et al. An overview of the *Sclerotinia sclerotiorum* pathosystem in soybean: impact, fungal biology, and current management strategies. **Tropical Plant Pathology**. Springer International Publishing, 2019.
- ZAMANI-NOOR, N. baseline sensitivity and control efficacy of various groups of fungicides against *Sclerotinia sclerotiorum* in oilseed rape cultivation. **Agronomy**, v. 11, n. 9, p. 1758, 2021.
- ZHANG, C. et al. Overexpression of a novel peanut NBS-LRR gene *AhRRS5* enhances disease resistance to *Ralstonia solanacearum* in tobacco. **Plant Biotechnology Journal**, v. 15, n. 1, p. 39–55, 2017.
- ZHANG, Y. et al. Overexpression of germin-like protein *GmGLP10* enhances resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in transgenic tobacco. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 497, n. 1, p. 160–166, 2018.
- ZINOVIEVA, S. V. et al. Involvement of salicylic acid in induction of nematode resistance in plants. **Biology Bulletin**, v. 38, n. 5, p. 453–458, 2011.
- ZIPFEL, C. Plant pattern-recognition receptors. **Trends in Immunology**, v. 35, n. 7, p. 345–351, 2014.

Capítulo 1. A superexpressão do gene *ADEXLB8* aumenta a tolerância à infecção pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*

(Os dados deste capítulo fazem parte do manuscrito publicado no periódico *The Plant Journal* - 2021)

BRASILEIRO, A. C. M. et al. Ectopic expression of an expansin-like B gene from wild *Arachis* enhances tolerance to both abiotic and biotic stresses. **The Plant Journal**, v. 107, n. 6, p. 1681–1696, 2021.

RESUMO

Expansinas são proteínas de parede celular que participam nas respostas das plantas a diferentes tipos de estresses bióticos e abióticos. A superfamília das expansinas é dividida em quatro subfamílias: α -expansina (EXPA), β -expansina (EXPB), expansina-like A (EXLA) e expansina-like B (EXLB). A função biológica dos membros da subfamília EXLB, uma das menores e menos estudadas, ainda não foi determinada. Estudos realizados pela equipe demonstraram que a superexpressão de gene codante de *EXLB8* isolado da espécie silvestre *Arachis duranensis* (*AdEXLB8*) confere resistência aos nematoides formadores de galhas, *Meloidogyne javanica* e *M. arenaria*, em raízes transgênicas de soja (*Glycine max*) e amendoim (*A. hypogaea*), respectivamente, onde foi observada uma diminuição significativa do número de galhas. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da superexpressão de *AdEXLB8* em plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), durante sua interação com o patógeno necrotrófico *Sclerotinia sclerotiorum*. Para o ensaio, o isolado de *S. sclerotiorum* (BRM 29673) foi cultivado em meio batata dextrose ágar (BDA) a 25 °C por 72 horas. O bioensaio de folha destacada foi realizado usando dois discos de micélio (5 mm de diâmetro) cortados da borda da colônia em crescimento e aplicados à superfície adaxial da folha totalmente expandida destacada de seis linhagens de tabaco superexpressando *AdEXLB8* (OEs) e do controle não-transgênico (WT). Duas folhas destacadas por planta foram inoculadas e mantidas em placas contendo papel de filtro úmido, a 22 °C por 72 horas no escuro. O progresso da lesão fúngica nas folhas foi fotografado a cada 12 horas após a inoculação (HAI) (0HAI a 72HAI) e as imagens, utilizadas para contagem do número de pixels no software Photoshop (versão CC; sistemas Adobe). A média da área da lesão foi calculada e testada estatisticamente pelo teste t. Os resultados demonstraram que a 48 HAI, a área lesionada nas folhas transgênicas foi significativamente ($p < 0,05$) reduzida entre 28 e 62% em relação às folhas WT, indicando que a superexpressão de *AdEXLB8* aumenta a tolerância ao fungo causador do mofo branco, *S. sclerotiorum*.

Palavras-chave: Expansina, mofo branco, patógeno necrotrófico, tolerância.

OVEREXPRESSION OF THE *ADEXLB8* GENE ENHANCES TOLERANCE TO INFECTION BY THE FUNGUS *Sclerotinia sclerotiorum*

ABSTRACT

Expansins are cell wall proteins that participate in plant responses to various biotic and abiotic stresses. The expansin superfamily is divided into four subfamilies: α -expansin (EXPA), β -expansin (EXPB), expansin-like A (EXLA), and expansin-like B (EXLB). The biological function of members of the EXLB subfamily, one of the smallest and least studied, has not yet been determined. Studies conducted by the team demonstrated that overexpression of the gene coding for *EXLB8*, isolated from the wild species *Arachis duranensis* (*AdEXLB8*), confers resistance to root-knot nematodes, *Meloidogyne javanica* and *M. arenaria*, in transgenic roots of soybean (*Glycine max*) and peanut (*Arachis hypogaea*), respectively, resulting in a significant decrease in the number of galls observed. The objective of the present study was to evaluate the effects of *AdEXLB8* overexpression in tobacco plants (*Nicotiana tabacum*) during its interaction with the necrotrophic pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. For the assay, the *S. sclerotiorum* isolate (BRM 29673) was cultivated on potato dextrose agar (PDA) at 25°C for 72 hours. The detached leaf bioassay was performed using two discs of mycelium (5 mm in diameter) cut from the edge of the growing colony and applied to the adaxial surface of fully expanded detached leaves from six *AdEXLB8*-overexpressing tobacco lines (OEs) and non-transgenic (WT) plants. Two detached leaves per plant were inoculated and kept on plates containing moist filter paper at 22°C for 72 hours in the dark. The progress of fungal lesions on the leaves was photographed every 12 hours after inoculation (HAI) (0HAI to 72HAI), and the images were used to count the number of pixels in Photoshop software (CC version; Adobe Systems). The mean lesion area was calculated and statistically analyzed using the t-test. The results demonstrated that at 48 HAI, the lesion area in transgenic leaves was significantly ($p < 0.05$) reduced by 28 to 62% compared to WT leaves, indicating that overexpression of *AdEXLB8* increases tolerance to the fungus that causes white mold, *S. sclerotiorum*.

Keywords: *Expansin*, white mold, necrotrophic pathogen, tolerance.

INTRODUÇÃO

As expansinas estão envolvidas em vários processos de desenvolvimento da planta por meio de sua atividade de afrouxamento da parede, participando de quase todos os estágios de crescimento em que ocorrem modificações, relaxamento e expansão da parede celular (COSGROVE, 2015). As expansinas de plantas também constituem um componente regular nas respostas a muitos estresses bióticos e abióticos, como seca, salinidade, temperaturas extremas, deficiência de nutrientes, ataque de herbívoros e infecção de fitopatógenos (MAROWA; DING; KONG, 2016).

As expansinas estão onipresentes no reino vegetal. Elas são normalmente compostas por 250-300 resíduos de aminoácidos com um padrão altamente conservado de dois domínios (DPBB e CBM63) e um peptídeo de sinal N-terminal (COSGROVE, 2015). A superfamília da expansina é dividida em quatro subfamílias: α -expansina (EXPA), β -expansina (EXPB), tipo expansina A (EXLA) e tipo expansina B (EXLB) (KENDE et al., 2004). EXPA é a maior e mais diversa subfamília em angiospermas, seguida por EXPB, e seu modo de ação foi amplamente estudado (MAROWA; DING; KONG, 2016). Em contraste, pouca ênfase foi dada às subfamílias EXLA e EXLB, que podem constituir um único grupo monofilético semelhante à expansina (EXL) (GUIMARAES et al., 2017a).

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary é considerado um dos fitopatógenos mais destrutivos e amplamente distribuídos. Esse fungo necrotrófico é responsável pela infecção de mais de 400 espécies de plantas em diferentes regiões do mundo, incluindo culturas de grande importância econômica e diversas ervas daninhas (BOLAND; HALL, 1994). A ocorrência de danos extensivos nas lavouras, a falta de altos níveis de resistência dos hospedeiros e a dificuldade geral em controlar as doenças causadas por *S. sclerotiorum* têm impulsionado pesquisas contínuas sobre esse patógeno (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006).

Ao longo dos anos, nosso grupo de pesquisa desenvolveu e explorou recursos transcriptômicos e proteômicos de espécies selvagens de *Arachis*, nativas do Brasil e países vizinhos, a fim de descobrir genes envolvidos em sua adaptação a um amplo espectro de ambientes adversos (CARMO et al., 2019; GUIMARAES et al., 2017; MARTINS et al., 2020; MOTA et al., 2018, 2021; VINSON et al., 2018). Recentemente, nosso grupo identificou um gene EXLB de *A. stenosperma* como um dos 14 genes diferencialmente expressos (de 259) que apresentou a maior expressão em resposta a três

tratamentos de estresse (seca, nematoide e estresse cruzado) (MOTA et al., 2021). O comportamento de expressão de genes EXLB de *Arachis* silvestre em resposta a vários estresses, em diferentes espécies e órgãos, e em diversas inferências de expressão gênica *in silico* e *in vitro*, reforça seus papéis como genes responsivos ao estresse de amplo espectro.

Esse papel foi ainda corroborado pela superexpressão de um gene EXLB isolado de *A. duranensis* Krapov. & W. C. Gregory (*AdEXLB8*), que levou a uma diminuição significativa no número de galhas produzidas em raízes de soja (*Glycine max*) L. Merr. e amendoim (*Arachis hypogaea*) L. pelos nematoides *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949 e *M. arenaria*, respectivamente (GUIMARAES et al., 2017). Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da superexpressão do gene *AdEXLB8* em plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) L. quanto à resistência ao fungo necrotrófico *Sclerotinia sclerotiorum*.

MATERIAL E MÉTODOS

Transformação de plantas

Agrobacterium ‘GV3101’ abrigando o vetor binário pPZPA*AdEXLB8* (GUIMARAES et al., 2017) foi usada para gerar plantas de fumo transgênico (*Nicotiana tabacum* var. ‘Xanthi’) (HORSCH et al., 1985). A presença de *AdEXLB8* nas mudas resistentes à Higromicina na geração T1 (primeira geração da planta transformada) foi confirmada por análise de PCR (GUIMARAES et al., 2017), e cinco linhagens OE independentes na geração T2 (segunda geração da planta transformada) foram selecionadas para análises posteriores. A expressão do transgene *AdEXLB8* foi determinada em linhagens OE por RT-qPCR.

Bioensaio com *Sclerotinia sclerotiorum*

Plantas de tabaco com um mês de idade foram mantidas a 60% em uma câmara de crescimento (25 °C; fotoperíodo de 12h) e 10 indivíduos por linha OE foram avaliados em cada ensaio de estresse, usando plantas WT como controle. As plantas foram transferidas para vasos de 250 ml cheios com mistura de solo:substrato (1:1).

Para o bioensaio fúngico, *S. sclerotiorum* (BRM 29673) foi cultivado em meio de batata dextrose ágar (BDA) a 25 °C para o crescimento micelial. O ensaio de folha destacada foi realizado de acordo com Andrade et al. (2016) utilizando dois discos de micélio (5 mm de diâmetro), cada um representando um inóculo padronizado em termos de quantidade e agressividade (PERCHEPIED et al., 2010). Duas folhas de tabaco foram inoculadas por indivíduo e mantidas em papéis de filtro úmidos a 22 °C no escuro por 48 HAI. As lesões fúngicas nas folhas foram fotografadas a cada 12 horas, e as imagens foram utilizadas para contagem do número de pixels por meio do software Photoshop (versão CC; sistemas Adobe). A área da lesão necrótica foi calculada e avaliada estatisticamente pelo teste t ($P < 0,05$).

RESULTADOS

A superexpressão de *AdEXLB8* aumenta a tolerância contra *S. sclerotiorum*

Folhas destacadas de WT e plantas transgênicas foram inoculadas com *S. sclerotiorum* e a área de lesão das folhas inoculadas foi registrada a cada 12 h. Um claro atraso no desenvolvimento da doença nas folhas transgênicas em comparação com WT foi observado a partir de 24 h após a inoculação (HAI) (Figura 1a, b). Os pontos de lesão da doença atingiram a borda das folhas WT em 48 HAI, enquanto as linhagens OE exibiram tamanhos de lesão reduzidos, que não se espalharam tão extensivamente (Figura 1a, b). Em 48 HAI, as áreas de lesão nas folhas transgênicas foram significativamente menores em 26,2% a 48,1% em quatro das seis linhagens OE em comparação com WT (Figura 1b, c), demonstrando maior resistência ao desenvolvimento de doença por *S. sclerotiorum*.

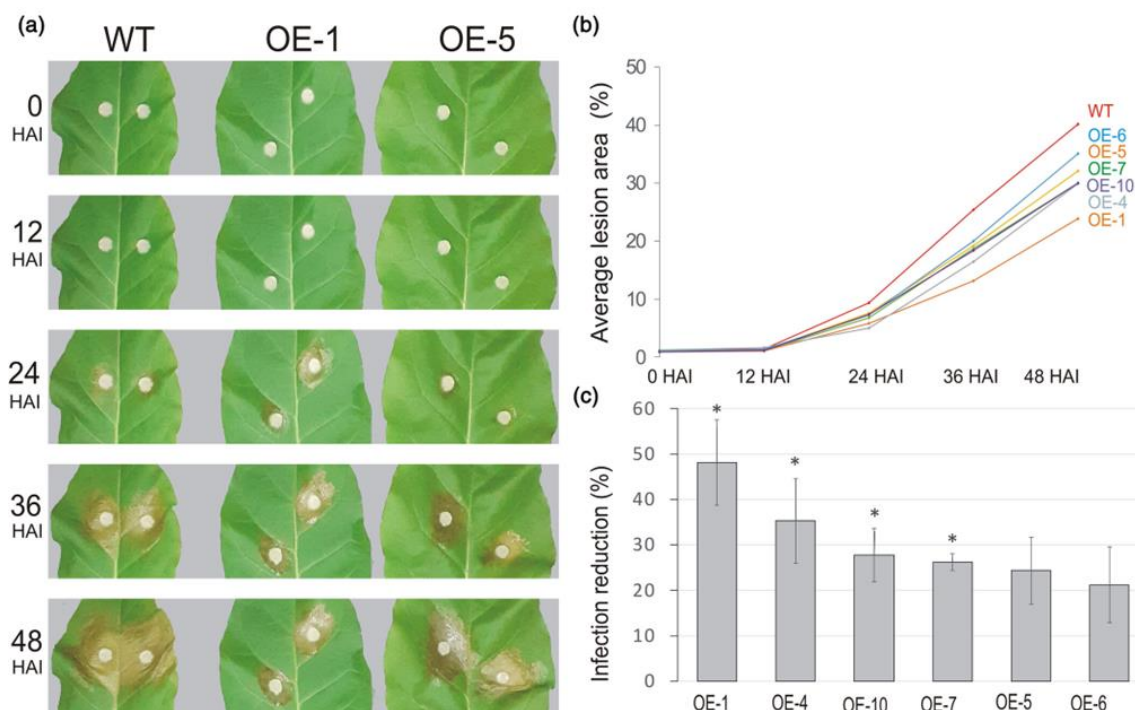


Figura 1 - Infecção por *Sclerotinia sclerotiorum* em folhas de tabaco destacadas. (a) Áreas de lesão em folhas de plantas WT e linhagens OE-1 e OE-5 em 0, 12, 24, 36 e 48 h após a inoculação (HAI). (b) Progresso da doença em 48 h, estimado com base na média da área de lesões fúngicas necróticas. (c) Percentagem de redução média de infecção em 48 HAI em folhas de linhagens OE em comparação com plantas WT. Os valores são médias e erros padrão de 10 indivíduos. * $P < 0,05$ em comparação com plantas WT (teste t).

DISCUSSÃO

Embora a superfamília expansina seja amplamente estudada em plantas, as semelhanças e diferenças dos papéis biológicos dos membros pertencentes às quatro subfamílias ainda não foram divulgadas. Está bem estabelecido que as subfamílias EXPA e EXPB estão associadas a processos de desenvolvimento de plantas e respostas ao estresse (CHOE; COSGROVE, 2010; MAROWA; DING; KONG, 2016). No entanto, os papéis das expansinas pertencentes às subfamílias EXLA e EXLB menos abundantes ainda não estão totalmente caracterizados, e falta evidência funcional de que EXLs, como as contrapartes EXP, estão envolvidos em atividades relacionadas à parede celular. No entanto, ao longo da evolução, as escalas de tamanho conservadas da subfamília EXLB e seu padrão de expansão em angiospermas sugerem que esta subfamília desempenha um papel importante na adaptabilidade das plantas às mudanças ambientais e pode ter

contribuído para a formação da parede celular em espécies lenhosas (CHEN et al., 2019; DAL SANTO et al., 2013; LIU et al., 2020; SEADER; THORNSBERRY; CAREY, 2016). Estudos recentes indicam que, embora presente na maioria das plantas terrestres, toda a subfamília EXLB foi perdida durante a adaptação da planta a ambientes aquosos e é dispensável para o crescimento aquático (HEPLER et al., 2020). Além disso, pesquisas abrangentes de genes de expansina em diferentes origens de genoma de plantas mostram que o perfil de expressão de transcritos EXLB muitas vezes diverge daqueles de outras expansinas (CHEN et al., 2019; GUIMARAES et al., 2017; LIU et al., 2020; MAROWA; DING; KONG, 2016). No geral, esses achados sugerem que a subfamília EXLB pode estar envolvida na adaptabilidade a determinados ambientes e cumprir uma função específica em plantas terrestres que difere daquela da atividade expansina convencional já estabelecida. No presente estudo, fornecemos informações sobre o gene *AdEXLB8*, previamente identificado por nosso grupo como envolvido na resistência/tolerância de amplo espectro de *Arachis* selvagem contra estresses bióticos e abióticos.

Sendo organismos sésseis, as plantas têm de enfrentar exposição contínua a várias restrições ambientais que muitas vezes são cumulativas. No contexto das mudanças climáticas globais, prevê-se que os efeitos deletérios desses estresses múltiplos e simultâneos sejam mais prevalentes e afetem negativamente o crescimento e a produtividade das culturas, causando grandes impactos na agricultura e na segurança alimentar (KISSOUDIS et al., 2016). Ao longo da evolução, as plantas desenvolveram uma série de estratégias para reagir e se adaptar a essas pressões externas adversas, conduzindo uma série coordenada de ajustes moleculares, fisiológicos, morfológicos e de desenvolvimento que culminam na plasticidade fenotípica. Como proteínas de remodelação da parede celular, as expansinas são determinantes-chave nesse sistema orquestrado desenvolvido pelas plantas para proteger contra estresses ambientais (COSGROVE, 2015; SASIDHARAN; VOESENEK; PIERIK, 2011).

As expansinas vegetais também podem influenciar as interações planta-patógeno, o que provavelmente é mediado por mudanças nos níveis de auxina após a infecção (DING et al., 2008; MOHANTY et al., 2018; SASIDHARAN; VOESENEK; PIERIK, 2011). Relatos anteriores sugerem que a expressão diminuída de alguns genes expansina e semelhantes a expansina reduz a atividade de afrouxamento da parede celular, resultando em paredes mais rígidas que impedem a penetração direta e proliferação de simbiontes benéficos ou patógenos prejudiciais (ABUQAMAR et al., 2013;

DERMATSEV et al., 2010; GAL et al., 2006; MOHANTY et al., 2018). Por outro lado, a superexpressão de genes EXPA pode induzir alta sensibilidade a feridas, facilitando o estabelecimento de infecção por patógenos virais e bacterianos (CHEN et al., 2018; PARK et al., 2017).

Aqui, demonstramos que a superexpressão de *AdEXLB8* reduziu as habilidades de *S. sclerotiorum* de infectar plantas de tabaco. Além do fungo necrotrófico *S. sclerotiorum*, nossos estudos genômicos comparativos mostraram que os ortólogos *AdEXLB8* também estão envolvidos nas interações incompatíveis de *Meloidogyne graminicola* Golden & Birchfield, 1965/*Oryza glaberrima* Steud e *M. incognita*/*Coffea arábica* L. (MOTA et al., 2020).

A resistência aumentada a *S. sclerotiorum* em linhagens de superexpressão de *AdEXLB8* pode estar correlacionada a mudanças na organização da parede celular que dificultam a penetração fúngica eficiente. De acordo, plantas de *Arabidopsis* que superexpressam o domínio CBM de um gene EXPA de morango (*Fragaria x ananassa*) (Duchesne ex Weston) Duchesne ex Rozier mostraram maior resistência a *Botrytis cinerea* Persoon, outro patógeno fúngico necrotrófico (NARDI et al., 2015). Assim, sugerimos que a superexpressão de *AdEXLB8*, outro gene que codifica uma proteína contendo domínio CBM, pode interferir nas propriedades mecânicas da parede celular, resultando em uma diminuição da eficiência de penetração do fungo. Nesse sentido, Dermatev et al. (2010) sugeriram que proteínas semelhantes a expansina são componentes comuns em processos de parasitismo e simbiose, desempenhando um papel fundamental durante as interações hospedeiro-patógeno.

CONCLUSÕES

Como proteínas modificadoras da parede celular, as expansinas participam da adaptação da planta ao ataque de patógenos e estresses ambientais. Aqui, a superexpressão de *AdEXLB8* demonstrou aumento na tolerância a *S. sclerotiorum* em tabaco transgênico. Essa tolerância ao estresse pode ser mediada por modificações físicas na estrutura da parede celular e pela ativação de vias de sinalização de fitohormônios relacionadas à defesa. No geral, este estudo indica que *AdEXLB8* é um gene candidato promissor para a melhoria da tolerância a *S. sclerotiorum*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUQAMAR, S. et al. A mutation in the *expansin-like A2* gene enhances resistance to necrotrophic fungi and hypersensitivity to abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Plant Pathology**, v. 14, n. 8, p. 813–827, 2013.
- ANDRADE, C. M. et al. Host-induced gene silencing in the necrotrophic fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Pathology**, v. 65, n. 4, p. 626–632, 2016.
- BOLAND, G. J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 16, n. 2, p. 93–108, 1994.
- BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J.; NELSON, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: Biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, v. 7, n. 1, p. 1–16, 2006.
- CARMO, L. S. T. et al. Comparative proteomics and gene expression analysis in *Arachis duranensis* reveal stress response proteins associated to drought tolerance. **Journal of Proteomics**, v. 192, p. 299–310, 2019.
- CARVALHO, P. A. S. V. et al. Coupled transcript and metabolite identification: Insights on induction and synthesis of resveratrol in peanut, wild relatives and synthetic allotetraploid. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 3, 2017.
- CHEN, L. et al. α -Expansin EXPA4 positively regulates abiotic stress tolerance but negatively regulates pathogen resistance in *Nicotiana tabacum*. **Plant and Cell Physiology**, v. 14, 2018.
- CHEN, Y. et al. A comprehensive expression analysis of the expansin gene family in potato (*Solanum tuberosum*) discloses stress-responsive expansin-like B genes for drought and heat tolerances. **Plos one**, v. 14, n. 7, p. e0219837, 2019.
- CHOE, H.-T.; COSGROVE, D. J. Expansins as agents in hormone action. In: **Plant Hormones**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2010. p. 262–281.
- COSGROVE, D. J. Plant expansins: diversity and interactions with plant cell walls. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 25, p. 162–172, 2015.
- DAL SANTO, S. et al. Genome-wide analysis of the expansin gene superfamily reveals grapevine-specific structural and functional characteristics. **Plos one**, v. 8, n. 4, p. e62206, 2013.
- DERMATSEV, V. et al. Microarray analysis and functional tests suggest the involvement of expansins in the early stages of symbiosis of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* on tomato (*Solanum lycopersicum*). **Molecular Plant Pathology**, v. 11, n. 1, p. 121–135, 2010.
- DING, X. et al. Activation of the indole-3-acetic acid-amido synthetase gh3-8 suppresses expansin expression and promotes salicylate- and jasmonate-independent basal immunity in rice. **The Plant Cell**, v. 20, n. 1, p. 228–240, 2008.
- GAL, T. Z. et al. Expression of a plant expansin is involved in the establishment of root knot nematode parasitism in tomato. **Planta**, v. 224, n. 1, p. 155–162, 2006.
- GUIMARAES, L. A. et al. Genome-wide analysis of expansin superfamily in wild *Arachis* discloses a stress-responsive expansin-like B gene. **Plant Molecular Biology**, v. 94, n. 1–2, p. 79–96, 2017.

- HEPLER, N. K. et al. Expansin gene loss is a common occurrence during adaptation to an aquatic environment. **The Plant Journal**, v. 101, n. 3, p. 666–680, 2020.
- HORSCH, R. B. et al. A simple and general method for hybridization revealed the expected. **Biological Science**, v. 227, p. 1229–1231, 1985.
- KENDE, H. et al. Nomenclature for members of the expansion superfamily of genes and proteins. **Plant Molecular Biology**, v. 55, p. 311–314, 2004.
- KISSOUDIS, C. et al. Responses to combined abiotic and biotic stress in tomato are governed by stress intensity and resistance mechanism. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 17, p. 5119–5132, 2016.
- LIU, W. et al. Complex molecular evolution and expression of expansin gene families in three basic diploid species of *Brassica*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 10, p. 3424, 2020.
- MAROWA, P.; DING, A.; KONG, Y. Expansins: roles in plant growth and potential applications in crop improvement. **Plant Cell Reports**, v. 35, n. 5, p. 949–965, 2016.
- MARTINS, A. C. Q. et al. Proteomics unravels new candidate genes for *Meloidogyne* resistance in wild *Arachis*. **Journal of Proteomics**, v. 217, p. 103690, 2020.
- MOHANTY, S. K. et al. Plant-symbiont interactions: the functional role of expansins. **Symbiosis**, v. 74, n. 1, p. 1–10, 2018.
- MOTA, A. P. Z. et al. Comparative root transcriptome of wild *Arachis* reveals NBS-LRR genes related to nematode resistance. **BMC Plant Biology**, v. 18, n. 1, p. 1–16, 2018.
- MOTA, A. P. Z. et al. Contrasting effects of wild *Arachis* dehydrin under abiotic and biotic stresses. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1–16, 2019.
- MOTA, A. P. Z. et al. Defining the combined stress response in wild *Arachis*. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–12, 2021.
- MOTA, A. P. Z. et al. Evolutionarily conserved plant genes responsive to root-knot nematodes identified by comparative genomics. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 295, n. 4, p. 1063–1078, 2020.
- NARDI, C. F. et al. Overexpression of the carbohydrate binding module of strawberry expansin2 in *Arabidopsis thaliana* modifies plant growth and cell wall metabolism. **Plant Molecular Biology**, v. 88, p. 101–117, 2015.
- PARK, S.-H. et al. NbEXPA1, an α -expansin, is plasmodesmata-specific and a novel host factor for potyviral infection. **The Plant Journal**, v. 92, n. 5, p. 846–861, 2017.
- PERCHEPIED, L. et al. Nitric oxide participates in the complex interplay of defense-related signaling pathways controlling disease resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in *Arabidopsis thaliana*. **MPMI**, v. 23, n. 7, p. 1–15, 2010.
- SASIDHARAN, R.; VOESENEK, L. A.; PIERIK, R. Cell wall modifying proteins mediate plant acclimatization to biotic and abiotic stresses. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 30, n. 6, p. 548–562, 2011.
- SEADER, V. H.; THORNSBERRY, J. M.; CAREY, R. E. Utility of the *Amborella trichopoda* expansin superfamily in elucidating the history of angiosperm expansins. **Journal of Plant Research**, v. 129, n. 2, p. 199–207, 2016.

VINSON, C. C. et al. Early responses to dehydration in contrasting wild *Arachis* species. **Plos one**, v. 13, n. 5, p. 1–28, 2018.

Capítulo 2. A superexpressão do gene *AsTIR19* e *AdEXLB:AsTIR19* aumenta a tolerância à infecção pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*

(Os dados deste capítulo fazem parte do manuscrito publicado no periódico *Plants* - 2022)

GUIMARAES, P. M. et al. Engineering resistance against *Sclerotinia sclerotiorum* using a truncated NLR (TNx) and a defense-priming gene. **Plants**, v. 11, 2022.

RESUMO

As plantas desenvolveram um conjunto de receptores imunes intracelulares chamados NLRs (domínios LRR de repetição rica em nucleotídeos e leucina) para reconhecer efetores de patógenos e desencadear resposta imune chamada ETI (Effector-Triggered Immunity). Esses NLRs são responsáveis pelo reconhecimento específico dos efetores de patógenos e pela ativação do mecanismo de defesa. Aqui, descrevemos a análise fenotípica de um novo gene truncado NLR (TNx) da espécie selvagem *Arachis stenosperma* (*AsTIR19*), com uma estrutura de proteína sem o domínio C-terminal LRR (Leucine Rich Repeat) envolvido na percepção do patógeno. Para o ensaio, o isolado de *S. sclerotiorum* (BRM 29673) foi cultivado em meio batata dextrose ágar (BDA) a 25 °C por 72 horas. Foram realizados bioensaios em plantas de *Arabidopsis thaliana* (*AsTIR19*) e Tabaco (*AsTIR19* e *AdEXLB8:AsTIR19*) e plantas não transformadas WT como controle. Os bioensaios de folha destacada foram realizados utilizando um tampão de ágar micelial (2 mm) para *A. thaliana*, (10 plantas por genótipo/cinco folhas por planta) e dois discos (5 mm) para tabaco (10 plantas por genótipo e duas folhas por planta), cortados da borda da colônia em crescimento e aplicados à superfície adaxial da folha totalmente expandida destacada. Foram mantidas em placas contendo papel de filtro úmido a 22 °C no escuro. O progresso da lesão fúngica nas folhas foi fotografado: para *Arabidopsis* (0HAI a 28 HAI) e para tabaco a cada 12 horas após a inoculação (HAI) (0HAI a 60HAI) e as imagens, utilizadas para contagem do número de pixels no software Photoshop (versão CC; sistemas Adobe). A média da área da lesão foi calculada e avaliada estatisticamente pelo teste t. Os resultados demonstraram que a 28 HAI (*Arabidopsis*) e a 48 HAI (tabaco), a área lesionada nas folhas transgênicas foi significativamente ($p < 0.05$) reduzida. A superexpressão de *AsTIR19* levou a uma redução significativa na infecção causada por *Sclerotinia sclerotiorum*, tanto em *Arabidopsis* quanto em tabaco, com uma redução adicional nas linhagens transgênicas piramidadas contendo um gene B semelhante à expansina (*AdEXLB8*) potencialmente envolvido no *priming* de defesa. Folhas de plantas transgênicas de *A. thaliana* superexpressando o gene *AsTIR19* apresentaram acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), revelado por coloração DAB, quando comparadas as folhas do controle não transformado. Aqui, demonstramos que a associação de potenciais elicitores de *priming* e NLRs truncados pode produzir um

efeito sinérgico na resistência fúngica, constituindo uma estratégia promissora para melhorar a resistência não específica a patógenos de plantas.

Palavras-chave: *Arachis* selvagem; mofo branco; piramidação genética; expansinas; imunidade; TIR-NLR

**OVEREXPRESSION OF THE *AsTIR19* and *AdEXLB:AsTIR19* GENE
ENHANCES TOLERANCE TO INFECTION BY THE FUNGUS *Sclerotinia*
*sclerotiorum***

ABSTRACT

Plants have developed a set of intracellular immune receptors called NLRs (nucleotide-binding leucine-rich repeat receptors) to recognize pathogen effectors and trigger an immune response known as ETI (Effector-Triggered Immunity). These NLRs are responsible for the specific recognition of pathogen effectors and the activation of defense mechanisms. Here, we describe the phenotypic analysis of a novel truncated NLR gene (TNx) from the wild species *Arachis stenosperma* (*AsTIR19*), with a protein structure lacking the C-terminal LRR (Leucine Rich Repeat) domain involved in pathogen perception. For the assay, the *S. sclerotiorum* isolate (BRM 29673) was cultivated on potato dextrose agar (PDA) at 25°C for 72 hours. Bioassays were performed on *Arabidopsis thaliana* (*AsTIR19*) and tobacco (*AsTIR19* and *AdEXLB8:AsTIR19*) plants, with non-transformed WT plants as controls. Detached leaf bioassays were conducted using a mycelial agar plug (2 mm) for *A. thaliana* (10 plants per genotype/five leaves per plant) and two discs (5 mm) for tobacco (10 plants per genotype and two leaves per plant), cut from the edge of the growing colony and applied to the adaxial surface of the detached, fully expanded leaf. They were kept on plates containing moist filter paper at 22°C in the dark. The progress of fungal lesions on the leaves was photographed for *Arabidopsis* (0HAI to 28 HAI) and for tobacco every 12 hours after inoculation (HAI) (0HAI to 60HAI), and the images were used to count the number of pixels in Adobe Photoshop CC software. The mean lesion area was calculated and statistically evaluated using the t-test. The results demonstrated that at 28 HAI (*Arabidopsis*) and 48 HAI (tobacco), the injured

area in transgenic leaves was significantly ($p < 0.05$) reduced. Overexpression of *AsTIR19* led to a significant reduction in infection caused by *Sclerotinia sclerotiorum* in both *Arabidopsis* and tobacco, with a further reduction in pyramided transgenic lines containing an expansin-like B gene (*AdEXLB8*), potentially involved in defense priming. Leaves of transgenic *Arabidopsis* plants overexpressing the *AsTIR19* gene showed an accumulation of reactive oxygen species (ROS) revealed by DAB staining compared to leaves of the non-transformed control. Here, we demonstrate that the association of potential priming elicitors and truncated NLRs can produce a synergistic effect on fungal resistance, constituting a promising strategy to improve nonspecific resistance to plant pathogens.

Keywords: wild *Arachis*; white mold; gene pyramid; expansins; immunity; TIR-NLR

INTRODUÇÃO

A fim de evitar doenças, as plantas desenvolveram uma imunidade inata elaborada que envolve um sistema de defesa em duas barreiras que consiste em PTI (imunidade desencadeada por padrões) e ETI (imunidade desencadeada por efetor) (HAN, 2019; JONES; DANGL, 2006). PTI requer receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) que estão localizados na superfície da célula hospedeira para reconhecer padrões moleculares associados a patógenos/micróbios (PAMPs ou MAMPs) e desencadear as respostas imunes basais. No entanto, patógenos adaptados ao hospedeiro podem interferir com PTI por meio de pequenas proteínas secretadas, conhecidas como efetores, e superar essa resistência. Portanto, para reconhecer efetores de patógenos, as plantas desenvolveram um repertório de receptores imunes intracelulares, os NLRs (domínios LRR de repetição rica em nucleotídeos e leucina) que medeiam o reconhecimento específico de efetores de patógenos e iniciam ETI (JONES; DANGL, 2006). A resistência associada à ETI muitas vezes pode levar a uma resposta de hipersensibilidade (HR) da planta, um mecanismo tipicamente acompanhado de morte celular programada (KARRER; BEACHY; HOLT, 1998).

Embora existam vários exemplos de genes NLR conferindo altos níveis de resistência contra diferentes patógenos biotróficos (BORRELLI et al., 2018; SHAO et al., 2019), poucos estudos demonstram sua regulação positiva na resistência de plantas contra

patógenos necrotróficos, com alguns relatos até mesmo mostrando proteínas NLR implicadas na suscetibilidade do hospedeiro a patógenos fúngicos necrotróficos (BARBACCI et al., 2020; LORANG; SWEAT; WOLPERT, 2007). Até o momento, o gene NLR mais conhecido envolvido na resistência contra fungos necrotróficos é o gene *Leptosphaeria maculans* 3 (Desmaz) Ces. & de Not. da classe TIR de *Arabidopsis* (*RLM3*), que, além do fungo hemibiotrófico *L. maculans* (STAAL et al., 2008), fornece resistência contra três fungos necrotróficos: *Botrytis cinerea*, *Alternaria brassicicola* (Schwein.)Wiltshire e *A. brassicae* (Berk.) Sacc. Mais recentemente, descobriu-se que a superexpressão de um NLR do gene *Triticum aestivum* L. (*TaRCRI*) aumenta a resistência contra o fungo necrotrófico *Rhizoctonia cerealis* Van der Hoeven (ZHU et al., 2017), enquanto os genes NLR do grão-de-bico estão potencialmente envolvidos na resistência contra *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. (SAGI; DEOKAR; TAR'AN, 2017).

Entre os fungos necrotróficos, *S. sclerotiorum* é notável por sua variedade ampla de hospedeiros e sua colonização agressiva do tecido hospedeiro, desencadeando rapidamente a morte celular e causando perdas devastadoras de rendimento em uma ampla variedade de plantas cultivadas (LIANG; ROLLINS, 2018). Até o momento, genes vegetais que conferem resistência completa contra *S. sclerotiorum* não foram relatados, com populações naturais de plantas exibindo um *continuum* de resistência parcial (BARBACCI et al., 2020). Até o momento, a engenharia genética para o controle de *S. sclerotiorum* concentrou-se no uso de proteínas antifúngicas relacionadas à defesa induzíveis (quitinases, glucanases e poligalacturonases) (SUN et al., 2020; WANG et al., 2018), fatores de transcrição (TFs) que ativam genes de proteínas relacionadas à patogênese (PR) e reguladores de ácido salicílico (SA), como *NPRI* (WANG et al., 2020), todos com sucesso variável. Com relação aos alvos no patógeno, a superexpressão de enzimas do hospedeiro capazes de degradar o ácido oxálico (OA), que está envolvido na patogênese fúngica, ou o silenciamento de genes fúngicos envolvidos na virulência, também demonstraram aumentar a resistência de *S. sclerotiorum* em plantas transgênicas (MAXIMIANO et al., 2022; VERMA; KAUR, 2021).

Estudos recentes revelaram novos papéis para os NLRs além da função clássica do gene R, incluindo o condicionamento da resistência de amplo espectro, papéis reguladores em respostas de tolerância a estresses abióticos ou papéis como “auxiliar” para outros NLRs (ARAÚJO et al., 2019; SUN et al., 2020; TAMBORSKI; KRASILEVA, 2020). Além disso, a aplicação de NLRs truncados no aumento da

imunidade contra diferentes patógenos foi explorada em várias espécies (SON et al., 2021; STAAL et al., 2008; ZHAO et al., 2015).

A recente descoberta fase biotrófica curta no estilo de vida de *S. sclerotiorum* (KABBAGE; YARDEN; DICKMAN, 2015; MCCAGHEY et al., 2019), a secreção de efetores de virulência por este fungo necrotrófico (*SsPINE1*) que suprime as defesas basais do hospedeiro (WEI et al., 2022), e o papel dos fitohormônios SA, JA/ET (ácido jasmônico/etileno) na infecção por patógenos (XU et al., 2018), reforçam a funcionalidade potencial dos genes R, incluindo NLRs truncados, no controle de *S. sclerotiorum*. Tais descobertas oferecem novas alternativas para a engenharia genética de hospedeiros para o manejo de *S. sclerotiorum*, incluindo o uso de uma estratégia mediada pelo gene R dominante ou semidominante para o controle da doença na fase inicial (WANG et al., 2019).

Espécies silvestres constituem importantes repertórios genéticos de genes que conferem tolerância a estresses bióticos e abióticos, tendo evoluído para se adaptar ao longo da evolução (WARBURTON et al., 2017), sendo os genes NLR um componente essencial dos mecanismos de resistência nessas espécies (FUNK; GALEWSKI; MCGRATH, 2018). Espécies silvestres de *Arachis* apresentam altos níveis de resistência contra fungos foliares (GUIMARAES et al., 2012), nematoide das galhas *Meloidogyne arenaria* (GUIMARAES et al., 2015; GUIMARAES et al., 2017; MOTA et al., 2018), radiação ultravioleta (UV) (MARTINS et al., 2022), e são mais tolerantes à seca (BRASILEIRO et al., 2021; VINSON et al., 2018). Em nossos estudos anteriores (BRASILEIRO et al., 2021; VINSON et al., 2018), isolamos e caracterizamos um gene B tipo expansina de *A. duranensis* Krapov. & W. C. Gregory (*AdEXLB8*), com vias de sinalização de fitohormônios ativadas por superexpressão e o sistema antioxidante, levando as plantas transgênicas a um estado de defesa que melhorou as respostas de defesa contra estresses bióticos e abióticos.

Neste estudo, mostramos o potencial da manipulação genética de genes NLR truncados para alcançar resistência mais ampla contra patógenos, incluindo fungos necrotróficos. Aqui, a superexpressão de um gene NLR truncado (TNx) de *A. stenosperma* silvestre (*AsTIR19*), tanto isoladamente quanto em uma pirâmide genética com o gene *AdEXLB8* relacionado ao *priming*, levou ao aumento da resistência contra *S. sclerotiorum* em plantas transgênicas. Este estudo revela o potencial da manipulação

genética dos genes TNx para alcançar maior resistência contra patógenos, no contexto do desenvolvimento de culturas mais produtivas e sustentáveis.

MATERIAL E MÉTODOS

Superexpressão de *AsTIR19* em plantas de *Arabidopsis thaliana*

Para a transformação de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (ecotipo Columbia; Col.0), botões florais ainda fechados, cultivadas em câmara de crescimento, foram submersos em frascos contendo suspensão bacteriana de *A. tumefaciens* (Smith and Townsend) Conn abrigando o vetor binário pPZP-AsTIR19 e pPZP-GFP foram transformadas. Todas as plantas foram mantidas em câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 horas a 21°C até a secagem completa das sílicas. As sementes (T0) foram coletadas, semeadas em substrato e selecionadas a partir da aplicação de glufosinato de amônio. As plantas que sobreviveram a seleção e que apresentavam emissão de fluorescência verde de eGFP foram transplantadas, individualmente, mantidas em câmara de crescimento sob as mesmas condições acima descritas, até secagem das sílicas. Sementes da geração T1 foram coletadas, semeadas e selecionadas pela aplicação do glufosinato de amônio novamente. Cada planta T1 selecionada representava uma linhagem diferente, dando origem a sementes da geração T2. No total, seis linhagens (OE-1, OE-2, OE-6, OE-8, OE-9 e OE-11) foram selecionadas para o bioensaio.

Superexpressão de *AsTIR19* e *AdEXLB:AsTIR19* em plantas de tabaco

Plantas de *N. tabacum* cv. "Xanthi" foram transformados com *A. tumefaciens* abrigando o vetor binário pPZP-AsTIR19 e pPZP-GFP usando o método do disco de folha (HORSCH et al., 1985). Plantas transgênicas de tabaco *AdEXLB8* (T2) previamente produzidas por nosso grupo (BRASILEIRO et al., 2021), também foram retransformadas com pPZP-AsTIR19 usando o método acima para produzir linhagens piramidais. Mudanças resistentes à Higromicina transformadas na geração T1 foram confirmadas por análise de PCR (GUIMARAES et al., 2017) e duas linhagens OE independentes (T2) de pPZP-AsTIR19 e pPZP-AdEXLB:AsTIR19 (T2) foram selecionadas para análise de bioensaio

adicional. A expressão dos transgenes *AsTIR19* e *AdEXLB8* foi determinada nas linhagens OE por RT-qPCR (Figura S1).

Bioensaios de *S. sclerotiorum* em plantas de *A. thaliana* superexpressando *AsTIR19*

Plantas de *A. thaliana* (10 indivíduos por linha OE) com oito semanas de idade, mantidas a 60% FC em uma câmara de crescimento (25 °C; fotoperíodo de 12h), foram avaliados em cada ensaio de estresse, usando plantas WT como controle. Plantas foram mantidas em vasos de 250 ml cheios com substrato.

Para o bioensaio fúngico, *S. sclerotiorum* (BRM 29673) foi cultivado em meio de batata dextrose ágar a 25 °C para o crescimento micelial. O ensaio de folha destacada foi realizado de acordo com Andrade et al. (2016) com modificações, utilizando um tampão de ágar micelial (2 mm de diâmetro), cada um representando um inóculo padronizado em termos de quantidade e agressividade (PERCHEPIED et al., 2010). Cinco folhas por planta foram inoculadas e mantidas em papéis de filtro úmidos a 22 °C no escuro por 28 HAI. As lesões fúngicas nas folhas foram fotografadas com 0, 20, 24 e 28 horas, e as imagens foram utilizadas para contagem do número de pixels por meio do software Photoshop (versão CC; sistemas Adobe). A área da lesão necrótica foi calculada e avaliada estatisticamente pelo teste t ($P < 0,05$).

Bioensaios de *S. sclerotiorum* em plantas de tabaco *AsTIR19* e *AdEXLB:AsTIR19* OE

Os bioensaios de folhas destacadas de tabaco superexpressando o gene *AsTIR19* submetidos a infecção por *S. sclerotiorum*, crescimento e inoculação de fungos e avaliação de sintomas foram conduzidos essencialmente como descrito em Brasileiro et al. (2021). Em suma, para cada um dos dez indivíduos de *AsTIR19.1*; *AsTIR19.2*; *AdEXLB:AsTIR19.1*; *AdEXLB:AsTIR19.2* OE, e os controles *AdEXLB* e o tipo silvestre (WT) “Xanthi”, duas folhas destacadas de tabaco com quatro semanas de idade foram colocadas em placas de Petri sobre papel filtro umedecido em uma câmara de crescimento (22° C, no escuro) e inoculados com discos de micélio (5 mm) de acordo com Perchepied et al. (2010). As folhas foram mantidas em placas de Petri em câmara de crescimento controlada (21 °C, fotoperíodo de 12 h) para registro das lesões fúngicas.

Fotos de folhas de tabaco mostrando lesões fúngicas foram registradas em 0, 12, 24, 36 e 48 após a inoculação (HAI), e usadas para calcular a área da lesão necrótica. A percentagem de redução do crescimento do fungo devido a *AsTIR19* e *AdEXLB:AsTIR19* foi calculada entre as linhagens OE e o WT correspondente (“Xanthi”) e avaliada estatisticamente pelo teste t ($P < 0,05$).

Ensaio de detecção de ROS

Para a detecção *in situ* de espécies reativas de oxigênio (ROS) em folhas de *Arabidopsis AsTIR19*, a coloração com 3,3'-diaminobenzidina (DAB) foi realizada de acordo com Daudi; O'brien, (2012), com pequenas modificações. Uma linhagem de *AsTIR19* OE (OE-11) e o controle WT, foram inoculados com discos de micélio de *S. sclerotiorum* como descrito acima, e com discos BDA (simulados) como controle negativo. Quatro horas após a inoculação fúngica (HAI), as folhas foram imersas em solução DAB 0,1% (p/v) recém-preparada (pH 3,8), submersas em aproximadamente 2 ml de solução corante DAB depositada em cada poço das placas de cultura celular. As placas foram então cobertas com folha de alumínio e colocadas em agitador de laboratório padrão a 80-100 rpm durante a noite.

Após a incubação, a solução DAB foi substituída por uma solução de branqueamento quente (etanol, ácido acético e glicerol = 3:1:1) aproximadamente 70°C, envolvida em papel alumínio e incubada em estufa a 65°C por mais 15+/- 5 min. A solução DAB foi substituída por solução clareadora nova. O material corado foi fotografado sobre fundo branco sob iluminação uniforme, com a oxidação DAB aparecendo como um precipitado marrom escuro.

RESULTADOS

A superexpressão de *AsTIR19* reduz a infecção por *S. sclerotiorum* em *A. thaliana*

Com o objetivo de avaliar o efeito da superexpressão do gene *AsTIR19* contra o fungo necrotrófico *S. sclerotiorum*, plantas de *A. thaliana* (Col. 0) foram transformadas. No total, seis linhagens OE foram usadas com o método de folha destacada. A área de

lesão das folhas inoculadas foi registrada entre 0 e 28 horas após inoculação (HAI). Um atraso no desenvolvimento da doença nas folhas transgênicas em comparação com WT foi observado 20 horas após a inoculação (HAI) (Figura 1). Em 28 HAI, a área da lesão nas folhas transgênicas foram significativamente menores entre 10% e 40% em cinco das seis linhagens OE em comparação com WT (Figura 1), demonstrando maior resistência ao desenvolvimento de doença por *S. sclerotiorum*.

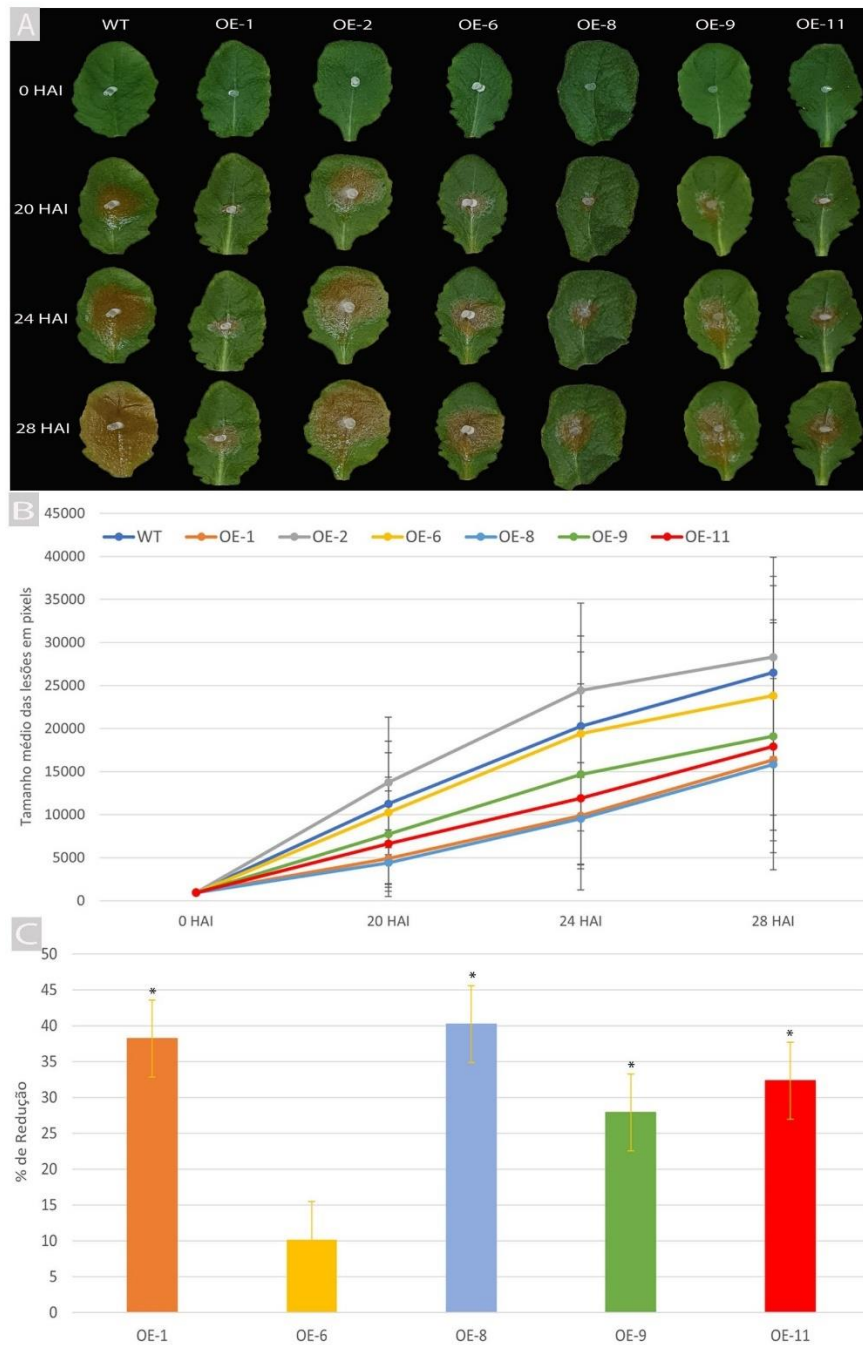


Figura 1. Infecção por *Sclerotinia sclerotiorum* em folhas destacadas de *Arabidopsis*. (A) Áreas de lesão em folhas de plantas WT, *AsTIR19* (OE-1, OE-2, OE-6, OE-8, OE-9 e OE-11) em 0, 20,

24 e 28 h após a inoculação (HAI); (B) Progresso da doença até 28 h, estimado com base na média da área de lesões fúngicas necróticas em pixels; (C) Percentagem de redução (%) da infecção em 28 HAI das linhagens transgênicas.

A superexpressão de *AsTIR19* e *AdEXLB:AsTIR19* reduzem a infecção por *S. sclerotiorum* em tabaco transgênico

A funcionalidade do gene *AsTIR19* contra o fungo necrotrófico *S. sclerotiorum* foi avaliada em linhagens isoladas OE de tabaco e em linhagens piramidadas contendo *AsTIR19* e outro gene responsivo ao estresse, *AdEXLB8*, um potencial indutor de estado de *priming* (BRASILEIRO et al., 2021). No total, duas linhagens OE de tabaco (*AsTIR19.1*; *AsTIR19.2*) e duas construções com genes piramidados (*AdEXLB:AsTIR19.1*; *AdEXLB:AsTIR19.2*) foram avaliadas usando o método de ensaio de folha destacada.

A expressão de transgenes em linhagens independentes de tabaco *AsTIR19* e *AdEXLB:AsTIR19* OE foi determinada por RT-qPCR. As áreas de lesão nas folhas inoculadas com fungos foram registradas a cada 12 horas após a inoculação (HAI) até 60 HAI (Fig. 2a). Diferenças no desenvolvimento da doença entre os genótipos foram observadas a partir de 24 HAI, com genótipos piramidados (*AdEXLB:AsTIR19.1*; *AdEXLB:AsTIR19.2*) e *AsTIR19.1* apresentando as menores lesões em todos os momentos analisados (Figura 2a, b).

As lesões nas folhas WT e *AdEXLB8* foram bem desenvolvidas por 48-60 HAI, enquanto nas linhagens OE foram observadas apenas lesões reduzidas, que não se espalharam tão extensivamente (Figura 2^a). Às 60 HAI, as áreas de lesão nas folhas transgênicas foram significativamente menores em ambas as pirâmides EXLB:TIR19-OE-1 (57%), EXLB:TIR19-OE-2 (53%) e em TIR19-OE-2 (50%) em comparação com folhas WT usando ANOVA seguida pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) (Figura 2c). Esses resultados mostram que a superexpressão de *AsTIR19* tem um efeito significativo na redução de lesões de *S. sclerotiorum*, enquanto esse efeito pode ser aumentado em quase 30% quando este NLR é empilhado com o gene *AdEXLB8*.

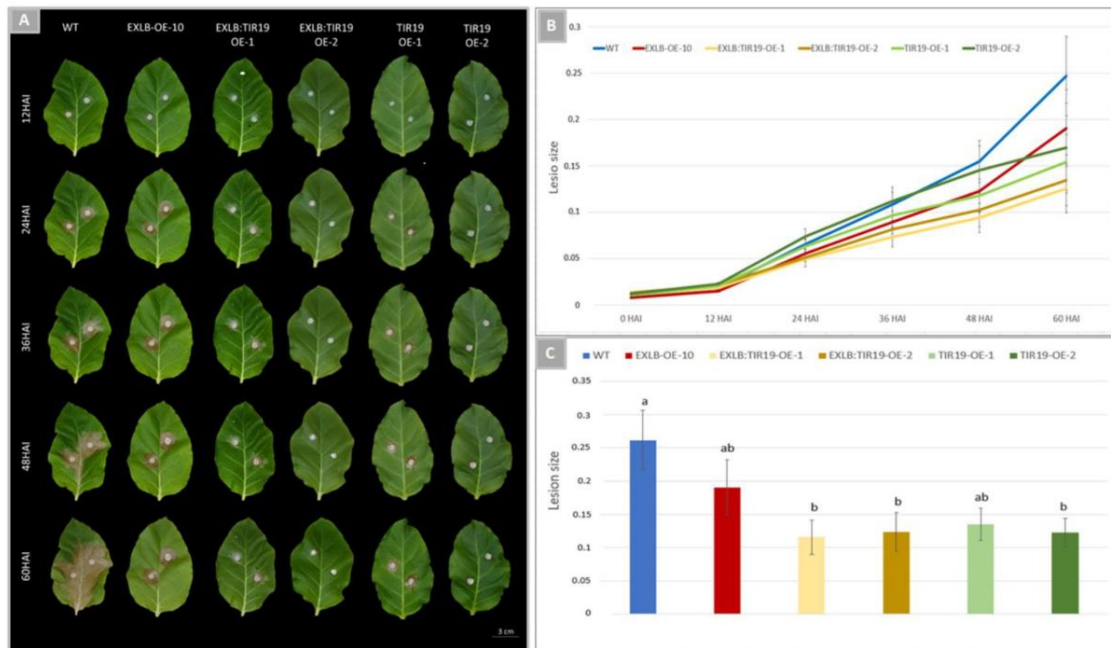


Figura 2. Infecção por *Sclerotinia sclerotiorum* em folhas destacadas de tabaco. (A) Áreas de lesão em folhas de plantas WT, EXLB-OE-10, EXLB:TIR19-OE-1, EXLB:TIR19-OE-2, TIR19-OE-1, TIR19-OE-2 em 12, 24, 36, 48 e 60 h após a inoculação (HAI); (B) Progresso da doença em 60 h, estimado com base na média das lesões fúngicas necróticas; (C) Área média de lesão em 60 HAI em folhas de linhagens OE e plantas WT. Os valores são médias e erros padrão de dez indivíduos, com letras diferentes indicando diferenças significativas com base na ANOVA seguida pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

A infecção por *S. sclerotiorum* induz acúmulo de ROS em linhagem transgênica de *A. thaliana AsTIR19*

Folhas não inoculadas de *Arabidopsis AsTIR19* e plantas controle não transformadas (WT), que foram submetidas ao mesmo tratamento que as folhas inoculadas, não apresentaram coloração, evidenciando a ausência de acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Figura 3 A1-2). Em contraste, as folhas inoculadas de *Arabidopsis AsTIR19* com *S. sclerotiorum* (4HAI) exibiram uma coloração amarronzada, indicativa do acúmulo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na região de penetração do patógeno e em áreas adjacentes (Figura 3 B-2 e C-2). Esse fenômeno também foi observado no controle WT inoculado (Figuras 3 B-1 e C-1), embora com uma taxa significativamente menor. Os resultados indicam que a infecção fúngica em plantas que superexpressam *AsTIR19* provocou uma forte indução de espécies reativas de oxigênio

(ROS), promovendo assim a sinalização de respostas na planta e contribuindo para o aumento da resistência contra *S. sclerotiorum*.

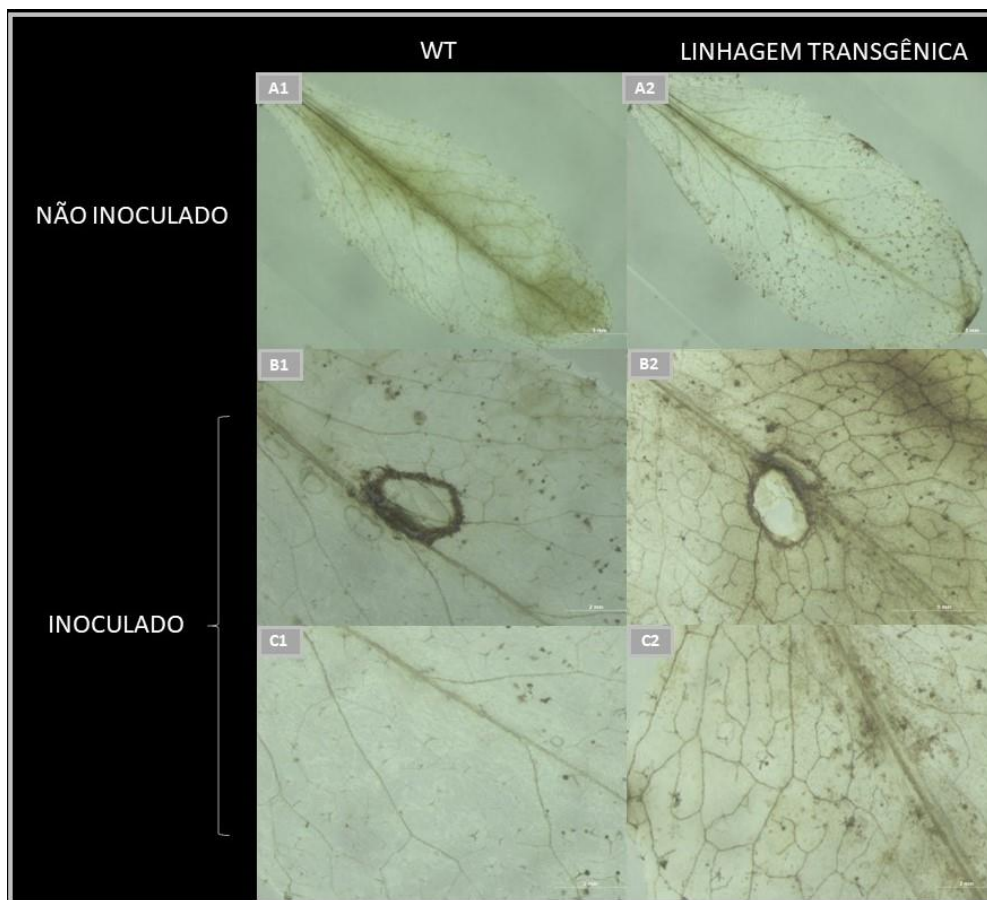


Figura 3. Folhas de *Arabidopsis thaliana* com 4 semanas de idade, do controle não-transgênico (WT) e de uma linhagem transgênica superexpressando *AsTIR19*. A1–2 Folhas não inoculadas submetidas às mesmas condições que as inoculadas, coradas com DAB. Barra: 5mm. B1–2 Folhas inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum* quatro horas após inoculação (4HAI) coradas com DAB. C1-2 Acúmulo de ROS revelado por coloração DAB, mostra produção aumentada de ROS em folhas de *A. thaliana* superexpressando *AsTIR19* comparada ao WT. Barra 2 mm.

DISCUSSÃO

Diferenças de transcrição e níveis de expressão em comparações bem definidas levaram à identificação de novos genes de função precisa em várias espécies de plantas (WANG et al., 2019). Nesse estudo, a caracterização e análise transcricional de NLRs truncados (TNx) em *A. stenosperma* sob diferentes estresses bióticos levou à identificação e isolamento de um novo gene candidato contra o fungo necrotrófico *S. sclerotiorum*. A

superexpressão deste TNx (*AsTIR19*) isoladamente e pirimidado com *AdEXLB*, outro gene de *Arachis* silvestre potencialmente envolvido na indução de *priming* de defesa (BRASILEIRO et al., 2021), aumentou a resistência contra *S. sclerotiorum* em até 57% em plantas transgênicas de tabaco. Até onde sabemos, este é o primeiro relato de um NLR truncado manipulado em plantas transgênicas conferindo resistência a *S. sclerotiorum*.

Embora existam vários exemplos de genes NLR conferindo altos níveis de resistência contra patógenos biotróficos de diferentes classes (BORRELLI et al., 2018; SHAO et al., 2019), poucos foram descritos como conferindo resistência a patógenos necrotróficos, como *RLM3* de *Arabidopsis* (STAAL et al., 2008) e *Rml2* e *LepR3* em *Brassica napus* L. que confere resistência a *L. maculans* (LARKAN et al., 2013, 2014), sendo os exemplos mais conhecidos. No presente estudo, mostramos que a superexpressão única de *AsTIR19* levou a uma redução média de quase 50% nos tamanhos de lesão de *S. sclerotiorum* em linhagens OE de tabaco em comparação com plantas WT, revelando que a ativação dessa variante não convencional de NLR pode de fato induzir sinalização *downstream* que leva a ETI e outras respostas de defesa.

A combinação adicional da superexpressão de *AsTIR19* e *AdEXLB8* nas linhagens OE pirimidadas de tabaco aumentou a redução das lesões de *S. sclerotiorum* em até 57%, mostrando um efeito aditivo do empilhamento de transgenes na resistência ao patógeno. Além disso, em nossos estudos anteriores mostramos que *AdEXLB8* aumentou a resistência das plantas a *S. sclerotiorum* apenas até 48 horas após a inoculação do fungo (BRASILEIRO et al., 2021), esse efeito foi melhorado nas linhagens pirimidadas (60H).

Essa redução significativa nos tamanhos das lesões de *S. sclerotiorum* nas linhagens pirimidadas em comparação com WT e os pais monogênicos é esperada, pois a pirimidação de genes já foi investigada experimentalmente para uma diversidade de patógenos, com muitos reduzindo os níveis de doença abaixo do único melhor gene (MUNDT, 2018). Aqui, o gene expansina da parede celular (*AdEXLB8*), previamente identificado como um indutor de estado de *priming* (BRASILEIRO et al., 2021), e o gene TNx *AsTIR19* induziram mecanismos de resistência diferentes, mas complementares na planta hospedeira, levando a uma redução significativa na infecção causada por um fungo necrotrófico. Embora aqui tenhamos demonstrado o papel do *AsTIR19* no aumento da resistência contra *S. sclerotiorum*, os mecanismos que sublinham sua função na resistência, como ser um potencial regulador de respostas de resistência (STAAL;

DIXELIUS, 2008), ou atuar em conjunto com outros sensores NLRs exibindo diferentes sensibilidades a elicitores bióticos e abióticos (WU; DEREVNINA; KAMOUN, 2018), ainda não foi elucidado.

Os NLRs têm sido amplamente utilizados em abordagens biotecnológicas para aumentar a resistência contra vários patógenos, incluindo alguns fungos necrotróficos e hemibiotróficos. No entanto, algumas desvantagens associadas ao seu uso foram descritas, como a evolução mais rápida dos genes de avirulência do patógeno em comparação com os genes R da planta, os genes NLR heterólogos sendo afetados pelo sistema imunológico da planta hospedeira ou não sendo capazes de corresponder adequadamente à imunidade local via de sinalização (GOGGIN et al., 2006). Portanto, novas estratégias para o emprego de NLR são necessárias, incluindo o uso de piramidação gênica compostas por genes com diferentes modos de ação e alvos no patógeno (MUNDT, 2018; ZHU et al., 2012). Nossos resultados sugerem que o uso de uma combinação de transgenes com função biológica complementar, que potencialmente incitem diferentes respostas imunes (PTI e ETI), representa uma estratégia promissora para aumentar amplamente a eficácia de NLRs contra inúmeras doenças em plantas cultivadas, levando a resultados mais sustentáveis, cultivares com melhor resistência a patógenos necrotróficos.

CONCLUSÕES

O estudo fenotípico das plantas que superexpressando o gene *AsTIR19* em resposta à infecção por *Sclerotinia sclerotiorum* revelou uma interação planta-patógeno complexa. A combinação dos genes *AdEXLB8* e *AsTIR19* resultou em uma notável redução das lesões fúngicas em plantas de tabaco transgênico. A utilização de sistemas de piramidação gênica, como esse, se mostra como potencial para aumentar a resistência contra diversos patógenos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, C. M. et al. Host-induced gene silencing in the necrotrophic fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Pathology**, v. 65, n. 4, p. 626–632, 2016.
- ARAÚJO, A. C. et al. Plant NLR receptor proteins and their potential in the development of durable genetic resistance to biotic stresses. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 3, p. 80–94, 2019.
- BARBACCI, A. et al. Rapid identification of an *Arabidopsis* NLR gene as a candidate conferring susceptibility to *Sclerotinia sclerotiorum* using time-resolved automated phenotyping. **The Plant Journal**, v. 103, n. 2, p. 903–917, 2020.
- BORRELLI, G. M. et al. Regulation and evolution of nlr genes: a close interconnection for plant immunity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, p. 1662, 2018.
- BRASILEIRO, A. C. M. et al. Ectopic expression of an expansin-like B gene from wild *Arachis* enhances tolerance to both abiotic and biotic stresses. **The Plant Journal**, v. 107, n. 6, p. 1681–1696, 2021.
- DAUDI, A.; O'BRIEN, J. A. Detection of hydrogen peroxide by DAB staining in *Arabidopsis* leaves. **Bio Protocol Journal**, v. 2, 2012.
- FUNK, A.; GALEWSKI, P.; MCGRATH, J. M. Nucleotide-binding resistance gene signatures in sugar beet, insights from a new reference genome. **The Plant Journal**, v. 95, n. 4, p. 659–671, 2018.
- GOGGIN, F. L. et al. Heterologous expression of the *Mi-1.2* gene from tomato confers resistance against nematodes but not aphids in eggplant. **Molecular Plant-Microbe Interactions®**, v. 19, n. 4, p. 383–388, 2006.
- GUIMARAES, L. A. et al. Genome-wide analysis of expansin superfamily in wild *Arachis* discloses a stress-responsive expansin-like B gene. **Plant Molecular Biology**, v. 94, n. 1–2, p. 79–96, 2017.
- GUIMARAES, P. M. et al. Global transcriptome analysis of two wild relatives of peanut under drought and fungi infection. **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, 2012.
- GUIMARAES, P. M. et al. Root transcriptome analysis of wild peanut reveals candidate genes for nematode resistance. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, p. 1–22, 2015.
- HAN, G. Origin and evolution of the plant immune system. **New Phytologist**, v. 222, n. 1, p. 70–83, 2019.
- HORSCH, R. B. et al. A simple and general method for hybridization revealed the expected. **Biological Science**, v. 227, p. 1229–1231, 1985.
- JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 323–329, 2006.
- KABBAGE, M.; YARDEN, O.; DICKMAN, M. B. Pathogenic attributes of *Sclerotinia sclerotiorum*: Switching from a biotrophic to necrotrophic lifestyle. **Plant Science**, v. 233, p. 53–60, 2015.
- KARRER, E. E.; BEACHY, R. N.; HOLT, C. A. Cloning of tobacco genes that elicit the hypersensitive response. **Plant Molecular Biology**, v. 36, n. 5, p. 681–690, 1998.

- LAMB, C.; DIXON, R. A. The oxidative burst in plant disease resistance. **Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v.48, p. 251-275, 1997.
- LARKAN, N. J. et al. Co-localisation of the blackleg resistance genes Rlm2 and LepR3 on Brassica napus chromosome A10. **BMC Plant Biology**, v. 14, n. 1, p. 387, 2014.
- LARKAN, N. J. et al. The *Brassica napus* blackleg resistance gene LepR3 encodes a receptor-like protein triggered by the *Leptosphaeria maculans* effector AVR_{LM1}. **New Phytologist**, v. 197, n. 2, p. 595–605, 2013.
- LIANG, X.; ROLLINS, J. A. Mechanisms of broad host range necrotrophic pathogenesis in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology**®, v. 108, n. 10, p. 1128–1140, 2018.
- LORANG, J. M.; SWEAT, T. A.; WOLPERT, T. J. Plant disease susceptibility conferred by a “resistance” gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 37, p. 14861–14866, 2007.
- MARTINS, A. C. Q. et al. Transcriptome responses of wild *Arachis* to UV-C exposure reveal genes involved in general plant defense and priming. **Plants**, v. 11, n. 3, p. 408, 2022.
- MAXIMIANO, M. R. et al. Host induced gene silencing of *Sclerotinia sclerotiorum* effector genes for the control of white mold. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 40, p. 102302, 2022.
- MCCAGHEY, M. et al. The complexity of the *Sclerotinia sclerotiorum* pathosystem in soybean: virulence factors, resistance mechanisms, and their exploitation to control Sclerotinia stem rot. **Tropical Plant Pathology**, v. 44, n. 1, p. 12–22, 2019.
- MOTA, A. P. Z. et al. Comparative root transcriptome of wild *Arachis* reveals NBS-LRR genes related to nematode resistance. **BMC Plant Biology**, v. 18, n. 1, p. 1–16, 2018.
- MUNDT, C. C. Pyramiding for resistance durability: theory and practice. **Phytopathology**®, v. 108, n. 7, p. 792–802, 2018.
- PERCHEPIED, L. et al. Nitric oxide participates in the complex interplay of defense-related signaling pathways controlling disease resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in *Arabidopsis thaliana*. **MPMI**, v. 23, n. 7, p. 1–15, 2010.
- SAGI, M. S.; DEOKAR, A. A.; TAR’AN, B. Genetic analysis of NBS-LRR gene family in chickpea and their expression profiles in response to *Ascochyta* blight infection. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, 2017.
- SHAO, Z.-Q. et al. Revisiting the origin of plant NBS-LRR genes. **Trends in Plant Science**, v. 24, n. 1, p. 9–12, 2019.
- SON, S. et al. The *Capsicum baccatum* specific truncated NLR Protein CbCN enhances the innate immunity against *Colletotrichum acutatum*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 14, p. 7672, 2021.
- STAAL, J. et al. RLM3, a TIR domain encoding gene involved in broad-range immunity of *Arabidopsis* to necrotrophic fungal pathogens. **The Plant Journal**, v. 55, n. 2, p. 188–200, 2008.
- STAAL, J.; DIXELIUS, C. RLM3, a potential adaptor between specific TIR-NB-LRR receptors and DZC proteins. **Communicative & Integrative Biology**, v. 1, n. 1, p. 59–61, 2008.
- SUN, Y. et al. Fine tuning immunity: players and regulators for plant NLRs. **Trends in Plant Science**, v. 25, n. 7, p. 695–713, 2020.

- TAMBORSKI, J.; KRASILEVA, K. V. Evolution of plant NLRs: from natural history to precise modifications. **Annual Review of Plant Biology**, v. 71, n. 1, p. 355–378, 2020.
- THORDAL-CHRISTENSEN, H. et al. Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley powdery mildew interaction. **The Plant Journal**, v. 11, p. 1187–1194, 1997.
- VERMA, R.; KAUR, J. Expression of barley oxalate oxidase confers resistance against *Sclerotinia sclerotiorum* in transgenic *Brassica juncea* cv Varuna. **Transgenic Research**, v. 30, n. 2, p. 143–154, 2021.
- VINSON, C. C. et al. Early responses to dehydration in contrasting wild *Arachis* species. **Plos one**, v. 13, n. 5, p. 1–28, 2018.
- WANG, B. et al. Reviving the transcriptome studies: an insight into the emergence of single-molecule transcriptome sequencing. **Frontiers in Genetics**, v. 10, 2019.
- WANG, Z. et al. Overexpression of *Brassica napus* NPR1 enhances resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in oilseed rape. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 110, p. 101460, 2020.
- WANG, Z. et al. Overexpression of *OsPGIP2* confers *Sclerotinia sclerotiorum* resistance in *Brassica napus* through increased activation of defense mechanisms. **Journal of Experimental Botany**, v. 69, n. 12, p. 3141–3155, 2018.
- WARBURTON, M. L. et al. The use of crop wild relatives in maize and sunflower breeding. **Crop Science**, v. 57, n. 3, p. 1227–1240, 2017.
- WEI, W. et al. A fungal extracellular effector inactivates plant polygalacturonase-inhibiting protein. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 2213, 2022.
- WU, C.-H.; DEREVNINA, L.; KAMOUN, S. Receptor networks underpin plant immunity. **Science**, v. 360, n. 6395, p. 1300–1301, 2018.
- XU, Y.-P. et al. Leaf stage-associated resistance is correlated with phytohormones in a pathosystem-dependent manner. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 60, n. 8, p. 703–722, 2018.
- ZHAO, T. et al. A truncated NLR protein, TIR-NBS2, is required for activated defense responses in the *exo70b1* mutant. **Plos Genetics**, v. 11, n. 1, p. e1004945, 2015.
- ZHU, S. et al. Functional stacking of three resistance genes against *Phytophthora infestans* in potato. **Transgenic Research**, v. 21, n. 1, p. 89–99, 2012.
- ZHU, X. et al. The wheat NB-LRR gene *TaRCR1* is required for host defence response to the necrotrophic fungal pathogen *Rhizoctonia cerealis*. **Plant Biotechnology Journal**, v. 15, n. 6, p. 674–687, 2017.

Capítulo 3. A wild *Arachis* endochitinase enhances *Sclerotinia* resistance in transgenic plants

(Este capítulo foi publicado no periódico *Tropical Plant Biology* - 2024)

FERREIRA, D. F. et al. A wild *Arachis* endochitinase enhances *Sclerotinia* resistance in transgenic plants. **Tropical Plant Biology**, 2024.

ABSTRACT

Plant endochitinases promote the cleavage of chitin, a polymer naturally found in the cell walls of fungi and insects. Although such enzymes are widely employed in plant genetic engineering to increase tolerance to pathogenic fungi, endochitinases from wild germplasm are poorly exploited for biotechnological purposes. Wild peanut species (*Arachis* spp.) have evolved under a range of environmental conditions and display distinct defensive adaptations, harboring high levels of genetic diversity and constituting an attractive source of resistance genes against pathogens. *Arachis stenosperma* shows broad resistance against various biotic stresses such as nematodes, fungi, and viruses. Previous transcriptome and proteomic studies on *A. stenosperma* challenged with fungi and nematodes identified differentially expressed genes (DEGs) involved in plant defense responses, including an upregulated endochitinase (*AsECHII*). Here, we characterized endochitinases from 12 different legumes, including wild *Arachis* species, and evaluated the effects of overexpression of *AsECHII* for control of *Sclerotinia sclerotiorum* in tobacco, singly and in association with an expansin-like B defense-priming gene (*AdEXLB8*). Both singly and pyramided transgenic tobacco lines overexpressing *AsECHII* exhibited a delay in disease progression, and up to a 46% reduction in fungal lesions. Further analysis of transgenic plants showed that the overexpression of *AsECHII* led to an increased expression of defense-related genes in the jasmonic acid, auxin, and ethylene biosynthesis pathways, as well as a substantial accumulation of H₂O₂. These results suggest that the *AsECHII* gene isolated from wild *Arachis* has the potential to enhance resistance against this highly damaging necrotrophic fungal pathogen, reducing environmental damage related to the use of fungicides and increasing crop sustainability.

Keywords: stem-rot, white-mold, necrotrophs, defense genes, *A. stenosperma*, *S. sclerotiorum*

Abbreviations

DEGs- Differentially Expressed Genes

ECHI- endochitinase

H₂O₂- hydrogen peroxide

GH19- 19 glycosyl hydrolase family 19

CBD- Chitin-Binding Domain

PAMPs- Pathogen-Associated Molecular Patterns

PTI - Pattern-triggered immunity

PRs- Pathogenesis –Related Proteins

DAPs- Differentially Abundant Proteins

NLR- Nucleotide-binding and leucine-rich repeat genes

DAI- Days after inoculation

qRT-PCR- Real -Time Quantitative Reverse Transcription PCR

WT- Wild Type

OE- Overexpressing Line

HAI- Hours After Inoculation

DAB- 3,3'-Diaminobenzidine

UV- Ultra-Violet

ROS- Reactive Oxygen Species

JA- Jasmonic Acid

ET- Ethylene

AUX-IAA- indole-3-acetic acid

AOS- allene oxide synthase

AOC- allene oxydase cyclase

APX -peroxidase

CAT- catalase gene

CA - carbonic anhydrase gene

RbohD -NADPH/respiratory burst oxidase protein D

ACS6- 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase

INTRODUCTION

Plant chitinases are a class of antifungal enzymes that catalyze the hydrolysis of chitin, an N-acetyl D-glucosamine polymer present as a major component of the cell wall of most phytopathogenic fungi, where it provides structural rigidity (VAGHELA et al., 2022). Depending on their mode of action, chitinases can be divided into exochitinases and endochitinases (SAHAI and MANOCHA, 1993), with plant chitinases generally

classified as endochitinases (ECHIs) from the 19 glycosyl hydrolase family 19 (GH19), cleaving chitin randomly to generate different chitoooligosaccharides. In the hydrolytic process, plant chitinases play a dual role, both inhibiting pathogen growth as a result of fungal cell wall digestion, as well as resulting in the release of Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs) or other elicitors that induce Pattern-triggered immunity (PTI) in the host (ZHANG et al., 2016).

Endochitinases are among the most abundant pathogenesis-related (PR) proteins in plants. Usually exhibiting low-level, constitutive enzymatic activity, these enzymes can be promptly induced by abiotic stimuli such as wounding or following fungal or bacterial pathogen invasion (THIBAUD et al., 2004). Due to their role in plant defense, over recent years, endochitinases isolated from different organisms have been extensively applied in biotechnology and agriculture to increase plant resistance against diverse fungal pathogens and insect pests (VAGHELA et al., 2022; CHOUHAN et al., 2023). Endochitinase genes from the filamentous fungi *Trichoderma* spp., for example, which is widely used as a biological control agent, have been cloned and heterologous expressed in numerous plant species to promote tolerance to various pathogenic fungi (EMANI et al., 2003; KUMAR et al., 2009; SHARMA et al., 2023). Likewise, the overexpression of chitinase genes from plants, such as the PR-3 chitinase gene from rice (*Oryza sativa*), resulted in increased resistance to rice sheath disease caused by *Rhizoctonia solani* (DATTA et al., 2001), and fungal wilts caused by *Verticillium dahliae* and *Fusarium oxysporum* in eggplant (*Solanum melongena*) (SINGH et al., 2015). The overexpression of an ECHI gene from common bean (*Phaseolus vulgaris*) also led to high levels of resistance to gray mold disease caused by *Botrytis cinerea* in strawberry (*Fragaria x ananassa*) (VELLICCE et al., 2006).

Sclerotinia sclerotiorum, the causative agent of white mold and stem rot diseases, is considered the second most important cause of yield loss due to diseases in soybean (*Glycine max*) (ZHANG et al., 2016) and the most important pathogenic fungi of canola (*Brassica napus*) (ZARINPANJEH et al., 2016). The control of this pathogen includes mainly fungicide application and biological control (WILLBUR et al., 2019). However, the use of resistant cultivars, which has been typically hampered by the lack of available resistance against *S. sclerotiorum* in most crops, constitutes the most efficient approach to mitigating losses caused by the pathogen (LIANG et al., 2021). Regarding biotechnological approaches, it was also demonstrated that the overexpression of

chitinase genes from mycoparasitic fungi such as *Trichoderma* spp. and *Coniothyrium minitans* increased the resistance against *S. sclerotiorum* in soybean (ZHANG et al., 2016; YANG et al., 2020; GOUGERDCHI et al., 2022), while the overexpression of an endochitinase from tobacco (*Nicotiana tabacum*) enhanced the fungi resistance in canola (GRISON et al., 1996).

Despite the development of some fungal-resistant crop varieties, including those containing endochitinase genes, the continuous employment of only limited numbers of sources of resistance is not an appropriate long-term strategy for stable disease control, as pathogens and insects are rapidly evolving (ZHANG et al., 2016). In this context, further studies to explore the potential of novel endochitinases from different biological sources are highly advisable (CHOUHAN et al., 2023). In order to mitigate this evolutionary arms race, a broader range of genetic resources, including wild germplasm, should be exploited for the development of novel disease-resistant cultivars (HAJJAR and HODGKIN 2007). The exploitation of endochitinases and other PR proteins from wild germplasm is appealing, as these species have evolved to adapt during the course of evolution and constitute important genetic repertoires of alleles conferring tolerance against biotic and abiotic stresses (WARBURTON et al., 2017). In addition, the transference of genes from wild relatives to cultivated species in a cisgenic approach, offers a more socially acceptable and sustainable option towards the development of biotechnologically improved crops (TELEM et al., 2013; SRINIVAS, 2023).

In this regard, wild peanut species (*Arachis* spp.), which are unique to South America (VALLS et al., 1994) and highly resistant to biotic and abiotic stresses, constitute an important gene pool from which resistance and tolerance genes can be seized and transferred to cultivated peanut (*A. hypogaea*) by marker-assisted breeding or cisgenesis or to other crops by transgenesis (LEAL-BERTIOLI et al., 2016; GUIMARAES et al., 2017). Over the last decade, *Arachis* wild species have been the subject of different transcriptomic and proteomic investigations by our group, with the aim to identify and characterize genes and regulators with potential to increase the resistance/tolerance to biotic and abiotic stresses in cultivated peanut and other legumes (MORGANTE et al., 2013; GUIMARAES et al., 2015; MOTA et al., 2018; MARTINS et al., 2020; GUIMARAES et al., 2022). From these studies, a number of promising differentially expressed genes (DEGs) and differentially abundant proteins (DAPs) were identified, including an endochitinase gene from *A. stenosperma* (*AsECHII*), that led to

an increased tolerance to *Meloidogyne* infection and water deficit when overexpressed in *Arabidopsis thaliana* (MOTA et al., 2021). Nonetheless, the employment of wild *Arachis* endochitinase genes for pathogen control in peanut or other legume species, such as soybean and beans, has not yet been reported.

The association of different defense gene combinations in a single transgenic plant offers considerable promise as a strategy to increase disease resistance and durability (ABDEEN et al., 2005; CHRISTOU et al., 2006; KUMAR et al., 2009). Our previous studies demonstrated that the association of two genes isolated from wild *Arachis*, a resistance gene from the NLR (Nucleotide-binding and leucine-rich repeat) gene family (*AsTIR19*), and an expansin-like B (*AdEXLB8*) involved in cell wall loosening and a potential inductor of priming defense responses, caused a significant reduction in *S. sclerotiorum* growth in overexpressing tobacco lines (GUIMARAES et al., 2022). Reduction in infection by *S. sclerotiorum* has also been observed in the combined overexpression of a *Trichoderma* chitinase gene with a defensin (ZARINPANJEH et al., 2016), a thaumatin-like protein (AGHAZADEH et al., 2016), and a polygalacturonase (ZIAEI et al., 2016). Similarly, a wheat endochitinase overexpressed in combination with a wheat β 1,3-glucanase or a rice peroxidase led to significant disease reduction against two necrotrophic fungi (*S. sclerotiorum* and *B. cinerea*) in transgenic carrot plants (WALLY et al., 2009).

In the current study, the characterization of endochitinases from 12 legume species, including three wild *Arachis* species, revealed that *AsECHII* from *A. stenosperma* belongs to a cluster of orthologous genes previously identified as involved in resistance to *S. sclerotiorum* (LV et al., 2022; OLADZAD et al., 2023). Based on this and its expression behavior in response to nematode infection and UV exposure, we selected *AsECHII* for further gene structure and protein domain characterization and evaluated the effects of its overexpression, singly and in combination with *AdEXLB*, against *S. sclerotiorum* infection. Our findings contribute to the characterization of defense-related genes from wild *Arachis* species and demonstrate the potential in this germplasm source for enhanced resistance to a wide range of fungal pathogens, including necrotrophs.

MATERIAL AND METHODS

Phylogenetic analysis and motif distribution patterns of *AsECHII* orthologues in legumes

We employed the Legume Information System (LIS) (<https://legumeinfo.org/annot>) and the nucleotide sequence of the endochitinase gene from *A. duranensis* (gene model Aradu.4196P) as input in the Genomic Context Viewer tool at LIS (<https://www.legumeinfo.org/>) to identify syntenic regions of Endochitinase gene family across 12 different legume species (Suppl. Table 1). Due to the lack of an annotated genome, *A. stenosperma* sequences were not included in this phylogenetic analysis. This system allows comparative genomic analyzes using genetic information and genomic data stored and integrated into various online tools, making it possible to study and identify similar genomic contexts (BERENDZEN et al., 2021). Therefore, the Aradu.4196P nucleotide sequence (www.peanutbase.org/) was translated and subsequently used to search against selected legume proteome datasets enabling an InterProScan analysis for domain homology (JONES et al., 2014), the assignment of sequences to LIS gene families using HMMER (FINN et al., 2011), sequences alignments, and the generation of an unrooted neighbor-joining phylogenetic tree.

The online tool MEME Suite (<https://meme-suite.org/meme/>) was used to predict conserved motifs in 67 protein sequences deduced from *AsECHI* orthologues, with the motif length ranging from six to 100 residues and maximum number of motifs to 10. A phylogenetic tree was constructed using MEGA 11 software (TAMURA et al., 2021) and then visualized with protein motifs via TBtools software (CHEN et al., 2020).

Structure of the *AsECHII* gene

The intron/exon organization of *AsECHII* gene was deduced based on information extracted from the NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) using the in terms of genomic regions, coding sequences, and deduced protein and represented graphically (BYRON et al., 2022).

Multiple sequence alignment of the nucleotide and amino acid sequences of *AsECHII* orthologues from the four different *Arachis* species (*A. stenosperma*, *A. duranensis*, *A. ipaensis* and *A. hypogaea*) was conducted using the MultAlin software (CORPET, 1988).

Expression profile of *AsECHII* orthologues in response to stress

The expression profiles of six *A. duranensis* and five *A. stenosperma* ECHI orthologues (Suppl. Table 2) were subjected to heatmap construction by TBtools software (CHEN et al., 2020) using our previously produced transcriptome RNA-Seq data from plants submitted to two types of stress: *M. arenaria* infection (at 3, 6, 7 and 9 DAI) and UV exposure (UV) (GUIMARAES et al., 2015; MOTA et al., 2021; MARTINS et al., 2022).

AsECHI1 overexpression in *Nicotiana tabacum*

The coding sequence (CDS) of the *AsECHI1* gene (795 bp) was cloned by Epoch Life Science Inc. (Sugar Land, TX, USA) under the control of the *Arabidopsis thaliana* actin 2 promoter in the binary vector pPZP_BAR that contains the bar gene from *Streptomyces hygroscopicus* for glufosinate ammonium herbicide selection (MOTA et al., 2021). For the generation of transgenic tobacco plants, seeds of tobacco (*Nicotiana tabacum*) cv. Xanthi were sown in plates containing MS culture medium (MURASHIGE AND SKOOG, 1962) and after six weeks, leaf disc explants were co-cultured for 48 hours with the disarmed *Agrobacterium tumefaciens* 'GV3101' containing the pPZP-*AsECHI1* binary vector according to (HORSCH et al., 1985). For the production of stacked transgenic plants, the leaf discs of the hygromycin-resistant tobacco *AdEXLB8* overexpressing line OE-10 (at T3 generation) (BRASILEIRO et al. 2021) were also transformed with the pPZP-*AsECHI1* vector. Primary transgenic plantlets (T0) were selected in the presence of both selective agents (glufosinate ammonium and hygromycin) and later transferred to a greenhouse conditions for growth until obtaining transgenic lines at T2 generation. The phenotypes of transgenic tobacco plants overexpressing the *AsECHI1* gene, singly or in association with *AdEXLB8*, were observed during plant growth and development in the greenhouse for the monitoring of putative pleiotropic effects that could be triggered due to the insertion and/or overexpression of the transgenes. -Seeds of transgenic *AsECHI1*-OE lines, singly and stacked, at T2 generation and untransformed wild-type (WT) control plants were sown and maintained in a growth chamber ($25 \pm 2^\circ\text{C}$ with 12 h photoperiod; light intensity $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; at 60% FC) for subsequent bioassays and *AsECHI1* transgene expression analysis by qRT-PCR analysis. To confirm the transgenic status of the OE lines, the expression levels of *AsECHI1* and *AdEXLB8* transgenes were analyzed by qRT-PCR using specific primers (Suppl. Table 4) as described below.

Bioassays with *Sclerotinia sclerotiorum* and statistical analysis

S. sclerotiorum (BRM 29673), kindly provided by Embrapa Rice and Bean (Santo Antônio de Goiás, Brazil) culture collection, was cultured for a 3-day period on potato dextrose agar (PDA) medium at 25 °C for mycelial growth. The detached leaf bioassay was performed according to (ANDRADE et al., 2016) using two mycelial agar plugs (5 mm in diameter), each representing a standardized inoculum in terms of quantity and aggressiveness (PERCHEPIED et al., 2010). For each biological replicate, two tobacco leaves were inoculated per individual and five individuals were analyzed per AsECHI1-OE lines and WT plants. Inoculated leaves were then maintained in the dark on moist filter paper at 22 °C for 60 HAI. Fungal lesions on leaves were photographed every 12 hours, and pixel counts for images determined using Photoshop software (CC version; Adobe systems). Necrotic lesion areas were then calculated for each detached leaf and statistically tested by the Student's t-test. The statistical software Sisvar (FERREIRA, 2019) was employed to compare multiple groups by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's test, where significant differences between samples do not share letters ($p < 0.05$). The statistical analyses between WT and OE-lines were performed using the Student's t-test, and differences were considered statistically significant if $p < 0.01$ (**), or $p < 0.001$ (***)).

RNA extraction and qRT-PCR analysis

Expression analysis of the *AsECHI1* and *AdEXLB* transgenes and five marker genes for plant defense pathways (1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase (ACS), Allene oxide cyclase (AOC), Ascorbate peroxidase (APX), Respiratory burst oxidase homologue D (RbohD) and Auxin-responsive protein (AUX-IAA)) (Suppl. Table 4), was conducted via Reverse transcription-quantitative PCR (qRT-PCR). Total RNA from leaves of tobacco AsECHI1-OE- lines (ECHI-OE-3 and ECHI-OE-10), stacked OE-lines (EXLB:ECHI-OE-3 and ECHI-OE-6), AdEXLB-OE-10 and WT plants was extracted according to the RNeasy® Mini Kit (QIAGEN) protocol. Total RNA concentrations (ng/μL) and purity were estimated based on absorbance readings using a spectrophotometer (Thermo Scientific™ NanoDrop Lite Plus Spectrophotometers), following treatment with DNase. Reverse transcription (RT) for the synthesis of single-stranded cDNA was conducted as previously described (Morgante et al. 2013). qRT-PCR

reactions were performed on three biological replicates using the StepOne Plus Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using specific primers (Suppl. Table 4). The online real-time PCR Miner tool (ZHAO and FERNALD, 2005) was used to estimate the primer efficiency. Relative quantification (RQ) of target gene mRNA levels was normalized with three reference genes (NtL25, NtActin and NtGAPDH; Suppl. Table 4), followed by Tukey's test ($p \leq 0.05$) using the SATqPCR web tool (<http://satqpcr.sophia.inra.fr/cgi/home.cgi/>) (RANCUREL et al., 2019).

ROS detection assays

For the *in situ* detection of reactive oxygen species (ROS) in AsECHI1-OE tobacco leaves, 3,3'-diaminobenzidine (DAB) staining was performed according to (DAUDI et al., 2012), with minor modifications. Leaves of tobacco AsECHI1 OE-3 line and WT- controls were inoculated with *S. sclerotiorum* agar plugs as described above, and with PDA plugs (mock). Tobacco leaves were immersed in freshly prepared 0.1% (w/v) DAB solution (pH 3.8). Eight hours after fungal inoculation (HAI), approximately 4 x 4 cm area of leaf tissue surrounding the inoculation area was cut with a sterile scalpel and submerged in approximately 2 ml of DAB staining solution deposited in each well of cell culture plates. Plates were then covered with aluminum foil and kept under agitation (80 to 100 rpm) at room temperature overnight. After incubation, the DAB solution was replaced by a warm bleaching solution (ethanol, acetic acid and glycerol; 3:1:1) at 70°C, wrapped in aluminum foil and incubated at 65 °C for additional 15 minutes. The DAB solution was replaced by fresh bleaching solution. Stained material was photographed on a white background under uniform lighting, with DAB oxidation appearing as a dark brown precipitate.

RESULTS

Characterization of AsECHI1 orthologues in legumes

For phylogenetic analysis, we used the nucleotide sequence of *A. duranensis* Aradu.4196P (www.peanutbase.org/), an *AsECHI1* orthologue, as input in the Genomic Context Viewer tool at LIS (<https://www.legumeinfo.org/>), since *A. stenosperma* genome is not yet available in the LIS database. Syntenic regions flanking ECHI genes across 12 legume species were identified, and orthologous and paralogous sequences were used to

produce a phylogenetic gene tree (DASH et al., 2016; BERENDZEN et al., 2021) (Fig. 1).

Overall, 62 *AsECHI1* orthologous genes were identified in 12 legume species which included *Medicago truncatula*, *Cicer arietinum*, *Trifolium pratense*, *Lotus japonicus*, *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris*, *Vigna unguiculata*, *Vigna angularis*, *Vigna radiata*, and three *Arachis* species (*Arachis hypogaea*, *Arachis ipaënsis* and *Arachis duranensis*) for which the complete annotated genome is available (Fig. 1; Suppl. Table 1). The phylogenetic analysis showed that all Aradu.4196P (hereafter *AdECHI1*) orthologous genes separated in two main clusters (Fig. 1): the first cluster (pink) containing solely ECHI Class I genes from all legume species except *Arachis*, and the second cluster containing all *Arachis* ECHI genes from Class I (blue) and Class II (yellow), together with the Class II genes from the other nine legume species (yellow) (Fig. 1). As expected, within each main cluster (pink and yellow), ECHI Class I and II representatives of warm-season legume species (*P. vulgaris*, *G. max*, *V. unguiculata*, *V. radiata*, *V. angularis*), were separated from the cool-season legume species (*M. truncatula*, *T. pratense* and *L. japonicus*, *C. arietinum*) (Fig. 1).

Arachis ECHI genes formed three sub-clusters, of which two were exclusively composed by genes from *Arachis* species. *Arachis* Class I genes (blue) comprised two sub-clusters, with ten and seven members, respectively, while the third sub-cluster (yellow) contained four *Arachis* orthologues from Class II (Fig.1). Each of the three *Arachis* sub-clusters contained members from all three *Arachis* species studied, with the number of tetraploid *A. hypogaea* representatives (11) being roughly the combination of genes from its diploid wild progenitors, i.e, six for *A. duranensis* and four for *A. ipaënsis* (Fig. 1). Class II ECHI genes from the other nine legume species (yellow) are subdivided in two main sub-clusters: one with seven ECHI genes from tropical (*P. vulgaris*, *G. max*, *V. unguiculata*, *V. radiata*, *V. angularis*) and six genes from temperate (*L. japonicus*, *C. arietinum*, *T. pratense* and *M. truncatula*) regions, and another containing only tropical legume with seven representatives (*G. max*, *P. vulgaris*, *V. unguiculata*, *V. radiata*) and four members of the three *Arachis* species, including *AdECHI1* (Fig. 1). Interestingly, the two ECHI Class II *P. vulgaris* orthologues (Phvul.002G114200, Phvul.002G114100) in this tropical legume group have previously been linked to *S. sclerotiorum* resistance, as it is located in a QTL region associated with resistance against white mold disease (OLADZAD et al., 2023). Similarly, the *G. max* representative located in the same ECHI

Class II group (Glyma.01G160100) showed upregulation in soybean plantlets when inoculated with *S. sclerotiorum* at different time-points, suggesting a role in the resistance against this pathogen (LV et al., 2022).

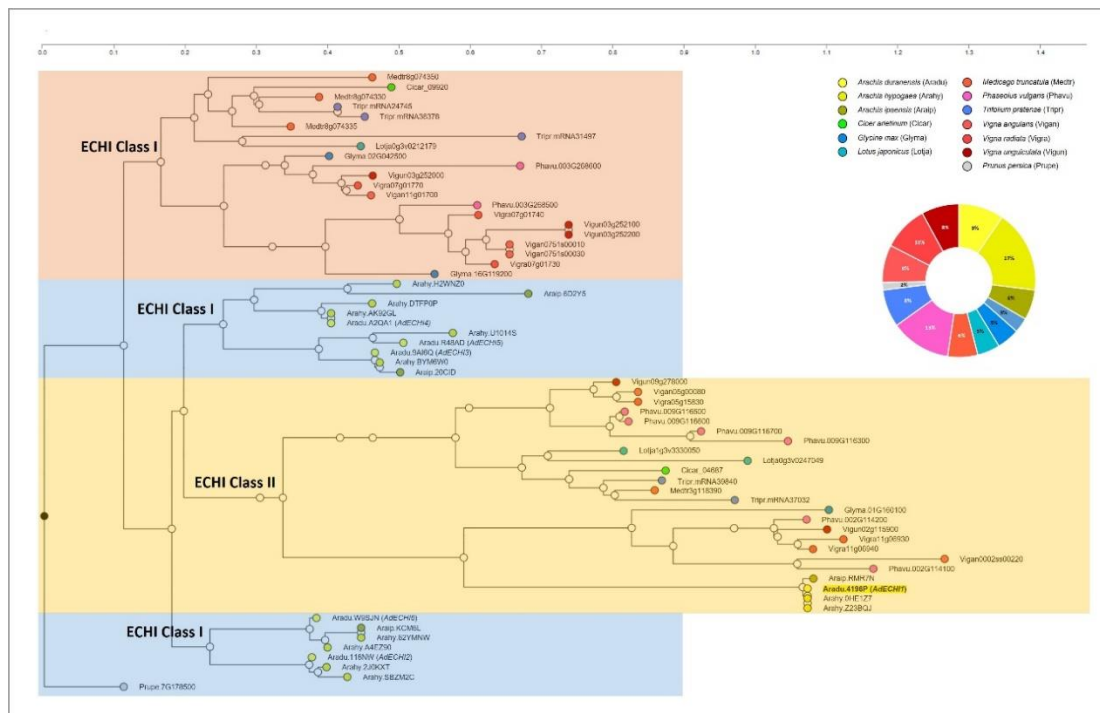


Fig. 1 Phylogenetic gene tree of *AsECHII* orthologous genes in legume species. Gene tree containing the *AsECHII* gene orthologues. Colors of terminal nodes indicate species. Gene names are prefixed with five-letter strings that indicate the species, with the first three letters indicating the genus and the last two indicating the species epithet.

We also analyzed the predicted protein structures and phylogenetic relationships of 67 *AdECHII* orthologues in legumes, including in this analysis five novel *A. stenosperma* orthologous proteins (Suppl. Table 1; Fig. 2). To identify the *A. stenosperma* *AdECHII* orthologues, we explored a set of protein orthogroups shared among 22 plant species, including *A. stenosperma*, previously characterized by our team, that identified an orthogroup containing five ECHI orthologues between *A. duranensis* and *A. stenosperma* (MOTA et al., 2020). Structural domains analysis (Fig. 2) showed that all 67 *AdECHII* orthologous proteins have a highly conserved main structure, with the great majority belonging to Class I (78%) and the remaining proteins (22%) to Class II of the glycosyl hydrolase 19 family (GH19) (Fig. 2). Chitinases belonging to GH19 family Class I contain the highly conserved N-terminal cysteine-rich domain involved in chitin-

binding, known as the chitin-binding domain (CBD) (PF00187; Motif 6) followed by the highly consistent C-terminal catalytic Glyco_hydro_19 domain (PF00182; Motif 1 to 5), while those belonging to Class II lack the CBD domain, but contain the catalytic domain (Motifs 1 to 5) with high sequence and structural similarity to Class I chitinases (Fig.2) (PASSARINHO and VRIES, 2002; CHOUHAN et al., 2023).

The ECHIs from four *Arachis* species are distributed in two of the three legume protein clusters identified (Cluster 1 to 3 – Fig. 2). Cluster 2 (Fig. 2) contains only (21) *Arachis* proteins belonging exclusively to ECHI Class I, with the typical CBD domain (Motif 6) followed by the glyco_hydro_19 domain (Motifs 1 to 5). Cluster 3 contains a sub-cluster consists of only (five) *Arachis* ECHI proteins belonging to Class II, displaying solely the expected glyco_hydro_19 domain (Motifs 1 to 5; Fig. 2). Both *Arachis* ECHI clusters (Boxes in Fig. 2) contain members from all four *Arachis* species studied, with the tetraploid *A. hypogaea* being the most represented, as expected (Fig. 2). All legume ECHI Class II (12) belong to Cluster 3 and form two sub-clusters, one containing seven ECHIs from different tropical legume species (*P. vulgaris*, *G. max*, *V. unguiculata*, *V. radiata*, *V. angularis*), whilst the other is formed exclusively by five members of the four *Arachis* species (Fig. 2). As previously observed in the phylogenetic gene tree, three representatives of these Class II ECHIs from *P. vulgaris* (Phvu.002G114200 and Phvu.002G114100) and *G. max* (Glyma.01G160100) have previously been linked to *S. sclerotiorum* resistance (LV et al., 2022; OLADZAD et al., 2023).

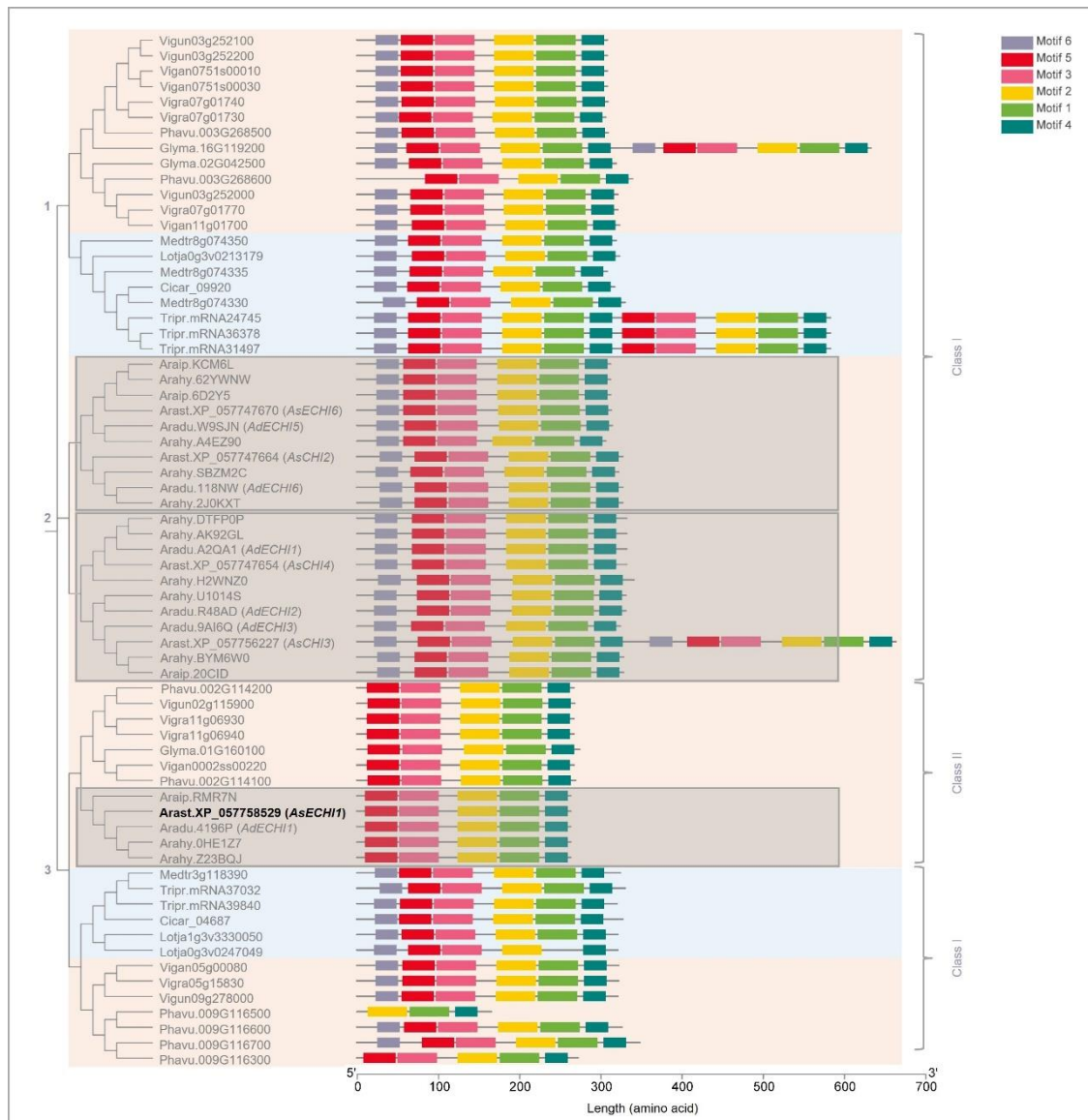


Fig. 2 *AsECHII* orthologous proteins and their domain structure in legume species. Colored boxes indicate conserved domains and gray lines represent non-conserved sequences. The length of motifs in each protein is showed proportionally.

Expression Profiling of *AsECHII* orthologue genes in *Arachis*

The expression behavior of the 11 genes orthologues of *AsECHII* in *A. duranensis* (*AdECHI* 1 to 6) and *A. stenosperma* (*AsECHI* 1 to 5) (Suppl. Table 2) in response to biotic stress was analyzed using our previously produced RNA-Seq data comprising transcripts of both species under *M. arenaria* infection and of *A. stenosperma* submitted to UV exposure (Fig. 3) (GUIMARAES et al., 2015; MARTINS et al., 2022). Overall, all six *A. duranensis* *ECHI* genes were responsive to nematode infection, albeit with slight

magnitude (up- or downregulation) (Fig. 3A), except for *AdECH12* exhibiting a clear induction during all stages (3, 6 and 9 DAI) of the nematode infection (Fig. 3A).

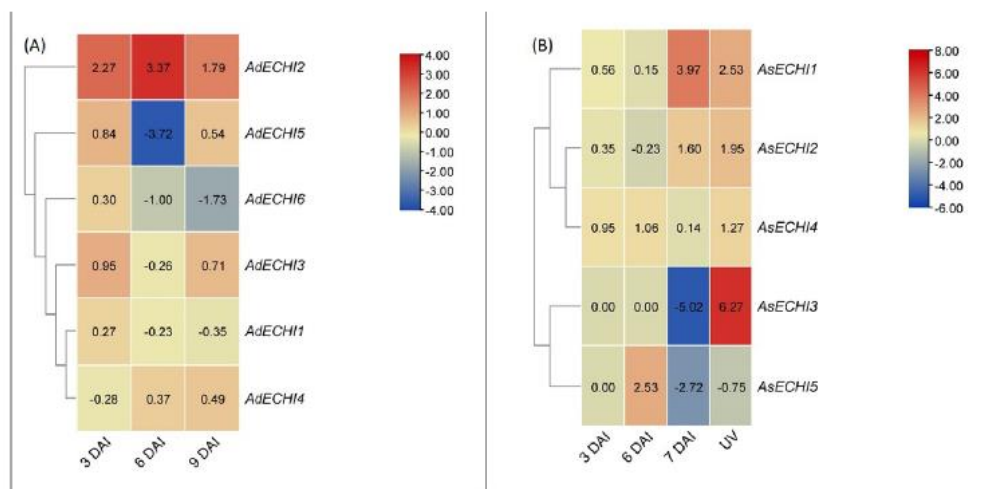


Fig. 3 Heatmap of relative RNASeq expression of *AsECH11* orthologous genes. (A) *A. duranensis* and (B) *A. stenosperma* plants subjected to biotic stress treatments. Plants submitted to *M. arenaria* infection for three, six, seven and nine days (3, 6, 7, 9 DAI) and UV exposure (UV). (FDR < 0.05; log₂FC)

Similarly, the transcript levels of the five *A. stenosperma* ECHI genes were rather constant or were slightly affected by early stages of nematode infection (3 to 7 DAI), with the exception of *AsECH11* upregulation observed following nematode infection at 7 DAI (4-fold) (Fig. 3B). Exposure to UV light (SUV), however, induced higher levels of expression of all *A. stenosperma* ECHI genes identified, with the highest expression magnitude observed for *AsECH14* (6.3-fold) (Fig. 3B), which conversely was the most downregulated gene (-5.0-fold) during nematode infection (7 DAI) (Fig. 3B). In sum, *A. stenosperma* ECHI genes show a general induction following exposure to biotic stress, including nematode infection and exposure to UV light, which is a widely adopted approach for mimicking pathogen-induced responses (MARTINS et al., 2022).

AsECH11 draws attention, as its overexpression in transgenic *Arabidopsis* has previously shown to enhance tolerance against *Meloidogyne incognita* (MOTA et al., 2021), and is highly responsive upon UV exposure in leaves, indicating its potential involvement in the well-known *A. stenosperma* resistance against foliar fungi diseases (STALKER, 2017). Therefore, to better understand the role of ECHI genes from wild *A. stenosperma* in the molecular response underlying its resistance to fungi, we selected

AsECHII as a candidate gene for in planta functional validation against the ubiquitous necrotrophic fungi *S. sclerotiorum* using transgenic tobacco as a model heterologous system.

AsECHII gene structure and protein domains

The *AsECHII* gene from *A. stenosperma* located on chromosome 5 is 1,927 bp long and contains three exons (283bp, 145bp and 367bp) and two introns (Figure 4). The predicted protein contains 265 amino acid residues, with a molecular mass of 28 KDa and a theoretical pI value of 6.29. *AsECHII* is an acidic endochitinase belonging to chitinase Class II, with the catalytic glyco_hydro_19 domain observed of 227 amino acid residues (31-258 – PF00182) (Fig. 2 and 4; Motifs 1 to 5). The presence of a signal peptide (Fig. 4; Suppl. Fig. 1B) predicts an extracellular location of *AsECHI* and its participation in the secretory pathway, consistent with the finding that the majority of plant chitinases are secretory (HAMEL et al., 1997; PASSARINHO and VRIES, 2002).

The multiple sequence alignment of *AsECHII* coding sequence (795 bp) and its orthologues in three other *Arachis* species revealed seven single nucleotide polymorphisms (SNPs) with each *A. duranensis* and *A. ipaensis*, and 14 SNPs with *A. hypogaea* (Suppl. Fig. 1A), reinforcing a high degree of homology among these species and that *A. ipaensis* and *A. duranensis* are the most probable ancestors of the cultivated peanut (BERTIOLI et al., 2016). Likewise, high degrees of amino acids similarity, especially in the catalytic domain, were observed among these *Arachis* species (Suppl. Figure 2B). *AsECHII* showed high levels of similarity (99.62%) to *ECHI* proteins in other *Arachis* species, with *A. ipaensis* showing the highest number of amino acid substitutions (6) (Suppl. Fig. 1B).

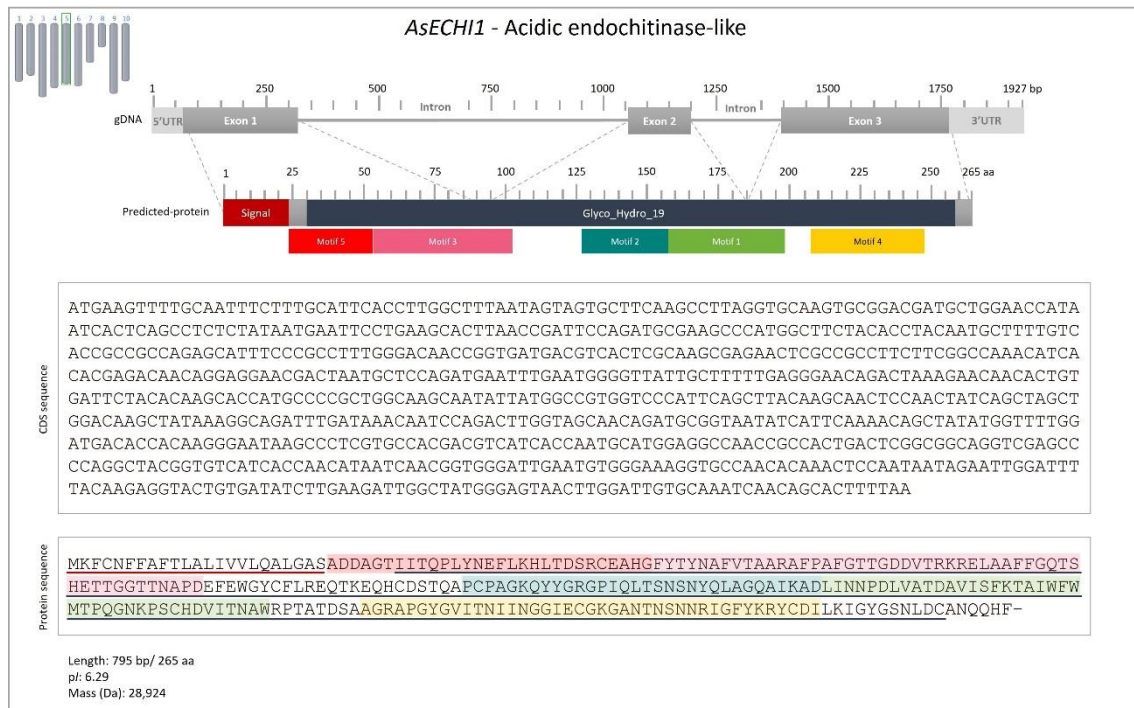


Fig. 4 *AsECH11* gene structure and predicted protein organization. **(A)** Gene structure (dark grey -exons; light grey - transcription initiation and termination sites); **(B)** *AsECH11* protein domains (dark red-signal peptide sequence; colored blocksprotein motifs); **(C)** *AsECH11* amino acid sequence (colored letters correspond to different motifs).

Transgenic tobacco plants overexpressing *AsECH11* and *AdEXLB8*:*AsECH11* genes show increased resistance to *S. sclerotiorum*

The effects of *AsECH11* overexpression in transgenic tobacco OE-lines (singly) and in combination with *AdEXLB8* (stacked) against *S. sclerotiorum* were analyzed in tobacco detached leaves. The overexpression of *AdEXLB8* gene induced enhanced plant defense responses against both biotic and abiotic stresses in tobacco (BRASILEIRO et al., 2021). Therefore, to construct the stacked lines, we transformed one of the previously obtained EXLB8 OE- lines (EXLB8-OE-10) with the pPZP-*AsECH11* binary vector as described before (BRASILEIRO et al., 2021).

The overexpression of the *AsECH11* and *AdEXLB8* transgenes were confirmed in the transformed tobacco plants by qRT-PCR (Suppl. Fig. 2), and a total of three independent ECHI-OE lines (OE-3, OE-10 and OE-20) and two stacked OE lines (EXLB:ECHI-OE-3 and EXLB:ECHI-OE-6) were selected for further plant-fungal bioassays, together with the parental EXLB8 OE-10 line and untransformed wild-type (WT) plants as control. No apparent phenotypic changes between the transgenic tobacco

OE lines and WT plants were observed in five examined individuals of each of the six OE lines (data not shown), suggesting that overexpression of *AsECH11* did not cause changes in the plant morphology.

For the *S. sclerotiorum* bioassays, individual detached leaves from each OE line and WT plants were inoculated with two separate 7-day-old *S. sclerotiorum* plugs and photographed every 12 hours after inoculation (HAI) up to a total of 48 hours, by which time disease spots advanced to the edge of WT leaves (Fig.5). The experiments were replicated twice. In the WT plants, *S. sclerotiorum* infection resulted in clearly defined brown necrotic spots around individual fungal plug sites from 24 HAI, rapidly progressing and, in some cases, connecting both plug sites, leading to necrotic lesions after 48 HAI that reached the edge of the leaf blade at 60 HAI (Fig. 5). Conversely, symptoms of *S. sclerotiorum* infection appeared later in the transgenic lines (36 to 48 HAI), and leaf lesions were smaller (Fig. 5). The transgenic lines ECHI-OE-3 and ECHI-OE-20, together with the stacked line EXLB:ECHI-OE-3 all showed the smallest necrotic areas at 48 HAI (Fig. 6A).

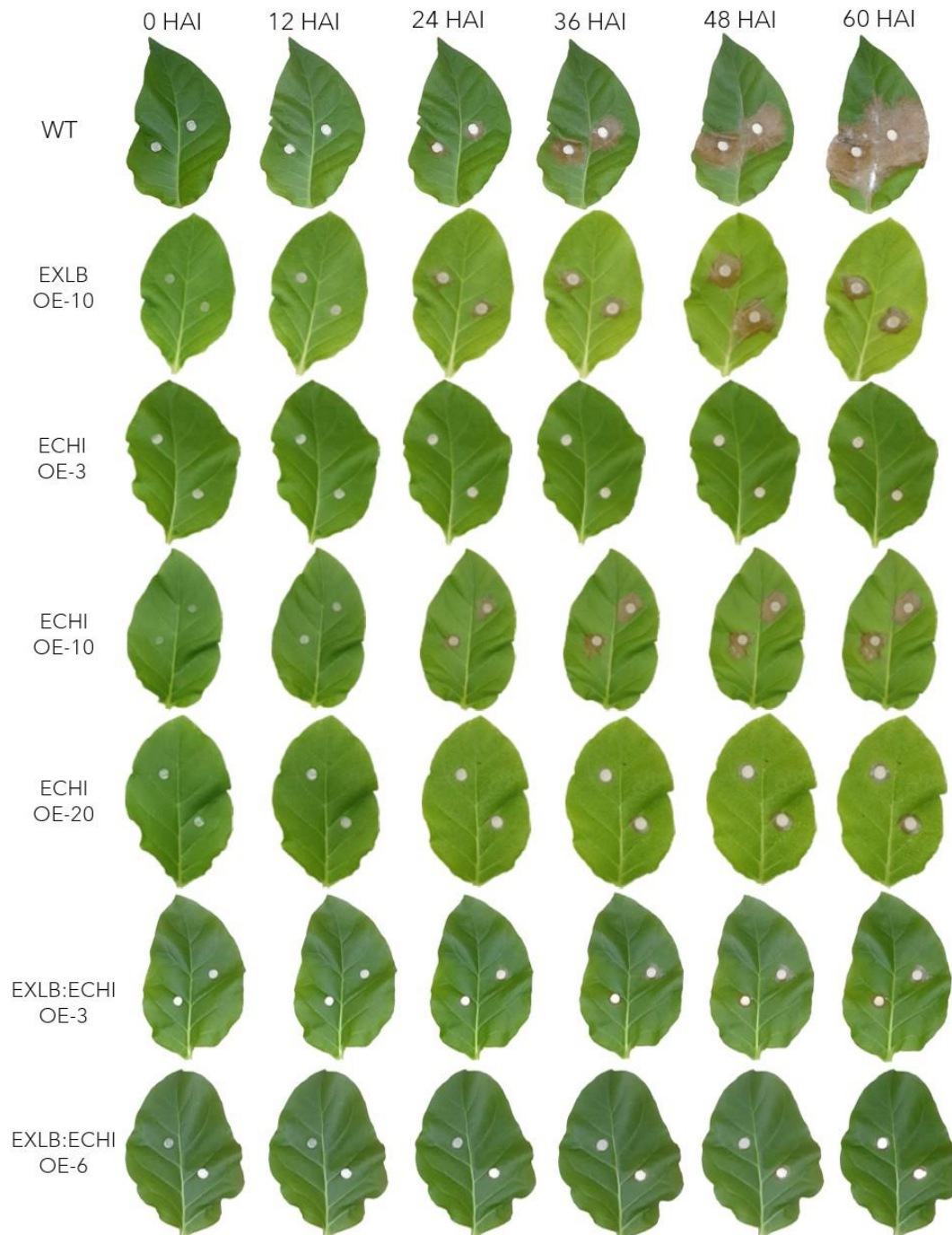


Fig. 5 Symptoms in detached tobacco leaves following *S. sclerotiorum* inoculation, with lesion areas observed in WT, EXLB-OE-10, ECHI-OE-3, ECHI-OE-10, ECHI-OE-20, EXLB:ECHI-OE-3 and EXLB:ECHI-OE-6 at 0, 12, 24, 36, 48 h after inoculation (HAI).

All OE lines showed significant reductions in fungal lesion sizes in relation to the WT, indicating an enhancement in the resistance to pathogen infection (Fig. 6B and C). The average reduction in lesion area in the OE lines in relation to WT control was 40.2%, varying from 46% to 33.7% according to the line (Fig.6B). Greatest differences between

OE lines and WT were observed at 48 HAI (Fig. 6A), with ECHI-OE-3 (46%), ECHI-OE-20 (42%) and EXLB:ECHI-OE-3 (41.6%) showing the most pronounced reductions in relation to the WT ($p \leq 0.001$) (Fig. 5 and 6B). Values of infection reduction at 60 HAI were not considered in this analysis since the lesion area in WT plants has reached the edge of the leaf blade at this time.

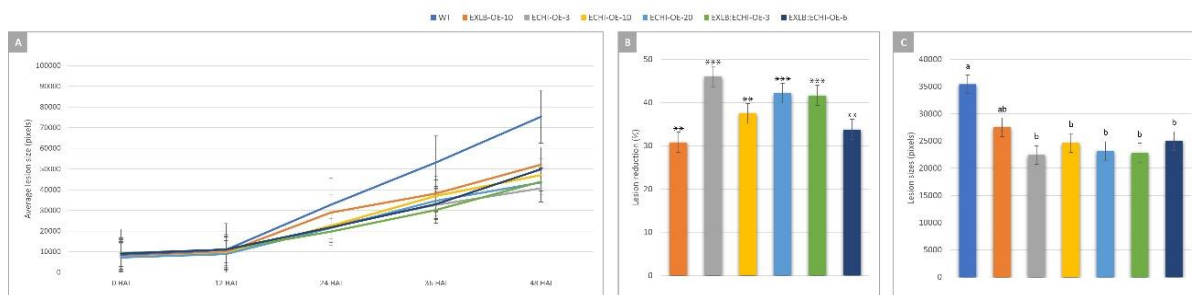


Fig. 6 Analysis of the necrotic areas caused by *S. sclerotiorum* and the progress of the disease in the different transgenic lines and in the non-transformed control (WT) tested. A) Disease progress up to 48 HAI based on the area of necrotic fungal lesions (pixels). B) Relative reduction (%) of infection in leaves of OE lines compared to WT at 48 HAI. C) Lesion sizes (pixel numbers) of *S. sclerotiorum* in transgenic lines (OE) in relation to WT. Asterisks indicate a significant difference in infection reduction levels between untransformed tobacco and transgenic tobacco if $P \leq 0.01$ (**) and $P \leq 0.001$ (***). Letters indicate a significant difference in lesion sizes between the transgenic tobacco lines.

No significant differences ($p \leq 0.05$) in infection reduction were observed among singly ECHI lines (OE-3 10 and 20), or between them and the stacked EXLB:ECHI lines (OE-3 and OE-6) (Fig. 6C). Nonetheless, a slower progression of the disease was observed in the stacked OE-lines in relation to the WT, EXLB and ECHI-OE lines (24-36 HAI) (Suppl. Table 3), which may contribute to a greater tolerance to disease development (TAOUTAOU et al., 2023).

S. sclerotiorum infection induces ROS accumulation in *AsECHI1* transgenic lines

In order to clarify the defense mechanisms triggered by *AsECHI1* overexpression in the transgenic tobacco plants, we analyzed ROS accumulation using DAB staining in the best performing singly transformed lines (ECHI-OE-3). Reactive oxygen species (ROS), including H_2O_2 , act as signaling molecules for regulating plant development and physiological processes in response to various biotic and abiotic stresses (CHOUDHURY et al., 2017). To elucidate whether the overexpression of *AsECHI1* in the transgenic plants enhanced H_2O_2 production, we stained leaves with DAB, which polymerizes as an

insoluble brown colored precipitate in the presence of H_2O_2 and peroxidase (Thordal-CHRISTENSEN et al., 1997). Whilst non-inoculated ECHI-OE-3 and WT tobacco leaves subjected to DAB treatment did not show evidence of ROS accumulation (Figure 7A and C), ECHI-OE-3 leaves inoculated with *S. sclerotiorum* (8 HAI) displayed an intense brown color at 8 HAI, indicative of H_2O_2 accumulation at the site of pathogen penetration and adjacent areas (Figure 7D). These results suggest a higher H_2O_2 accumulation in transgenic leaves and that ROS was strongly induced by fungal infection in plants overexpressing *AsECHI1*, promoting innate immune signaling and therefore contributing to an increase in plant resistance to *S. sclerotiorum*.

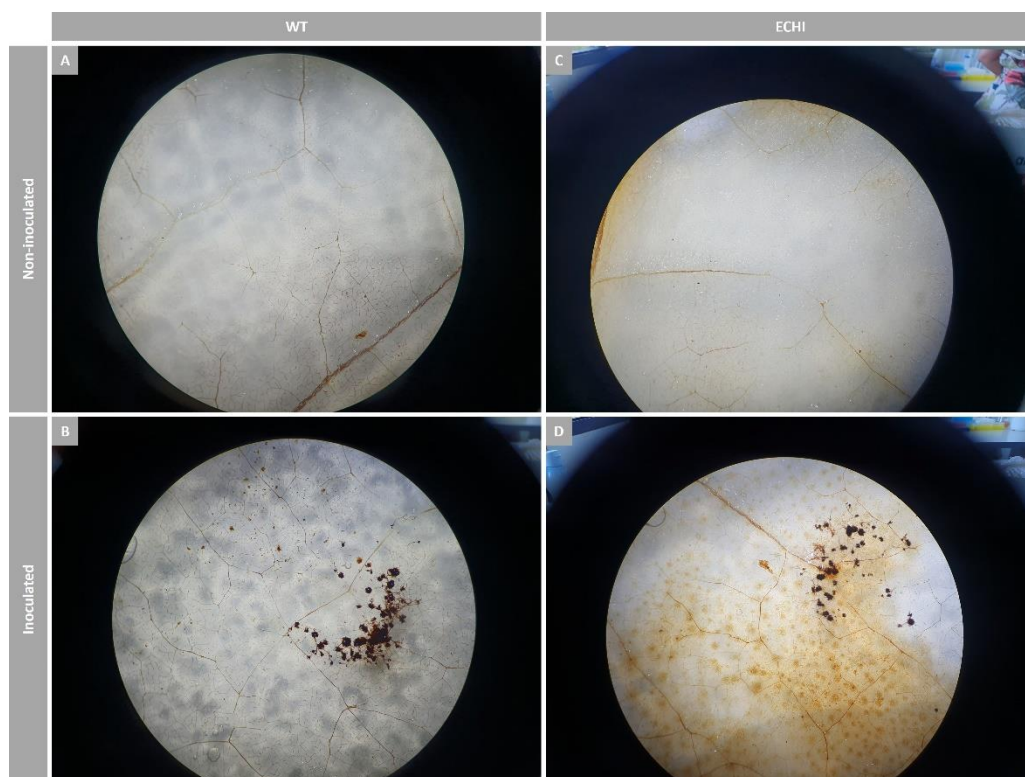


Fig. 7 DAB staining analysis on ECHI1 OE-3 and control (WT) tobacco leaves. A) Non-inoculated WT tobacco leaf stained with DAB; B) Non-inoculated ECHI-OE3 tobacco leaf stained with DAB; C) WT tobacco leaf inoculated with *S. sclerotiorum* eight hours after inoculation (8HAI) and stained with DAB; D) ECHI-OE3 leaf inoculated with *S. sclerotiorum* eight hours after inoculation (8HAI) and stained with DAB, showing ROS accumulation. Bar 5 μ m.

qRT-PCR expression analysis of defense-related and ROS marker genes in tobacco OE lines

In order to investigate whether the overexpression of *AsECHI* altered the transcriptional dynamics of defense signaling pathways were altered in the tobacco ECHI

OE-lines, we analyzed the expression profiles of defense-related and ROS marker genes in two singly (OE-3 and OE-10), two stacked (EXLB:ECHI-OE-3 and EXLB:ECHI-OE-6) and one EXLB (AdEXLB-OE-10) lines in relation to WT by qRT-PCR. For that, five stress-marker genes (Suppl. Table 4) representing the ethylene (ET), jasmonic acid (JA) and auxin signaling pathways, and ROS signaling and detoxification activities were analyzed. The qRT-PCR analysis showed that all five stress-marker genes were upregulated in both singly and stacked OE lines in comparison to WT, indicating that *AsECHI* overexpression in the transgenic plants triggers defense signaling pathways similar to those observed during PAMP- triggered immunity (PTI) responses (ZHANG and ZHOU, 2010) (Fig. 8).

For the singly and stacked OE-lines, the highest expression levels of marker genes were observed for the auxin transcriptional regulator (AUX-IAA27) and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase (ACS), suggesting that ethylene and auxin hormone pathways were highly induced in these lines (Fig. 8). Likewise, but to a lesser extent, allene oxidase cyclase (AOC), which is a marker gene for the jasmonic acid (JA) biosynthesis, and a peroxidase (APX), responsible for catalyzing H₂O₂ to O₂, showed higher expression in the singly and stacked OE lines in comparison to WT, indicating the activation of the jasmonic pathway and the antioxidative defense machinery by *AsECH1* overexpression. As previously observed (BRASILEIRO et al., 2021), ROS, JA-ET and AUX hormonal pathways were also induced in the parental EXLB-OE-10 line in comparison to WT plants, which most likely contribute to the improved tolerance against fungi and drought observed in this OE line. Interestingly, the most induced marker gene in the stacked lines was a NADH oxidase gene (*RbohD*) (Fig. 8), responsible for the autopropagation wave of ROS production and required for PAMP-induced ROS production (ZHANG et al., 2007). Moreover, *RbohD* is a possible hub for systemic signaling to achieve ROS homeostasis, that is precisely regulated in response to different elicitors, mediating plant acclimation and defense responses to multiple stresses (WU et al., 2023). This suggests a central role for this gene in mediating immune responses in plants co-expressing the two transgenes (*ECHI* and *EXLB*), as previously seen by our group in other gene pyramids (GUIMARAES et al., 2022).

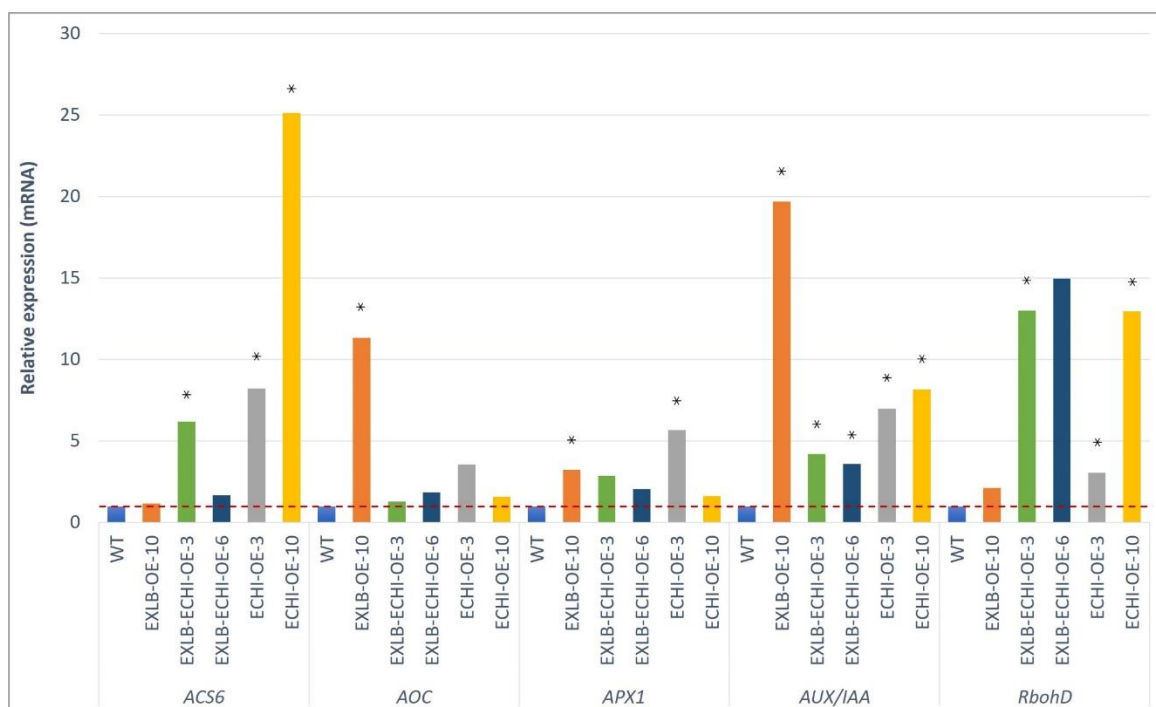


Fig. 8 Expression analysis of defense-related genes in WT, EXLB-OE-10, ECHI-OE-3, ECHI-OE-10, EXLB-ECHI-OE-3 and EXLB-OE-6 by qRT-PCR. The results represent the mean \pm SE of three independent experiments. Asterisks indicate a significant difference in gene expression levels between untransformed tobacco and transgenic tobacco at $P \leq 0.05$ (*).

It is worth noting that the increased levels of certain hormone defense-related genes, such as ET and JA, and of ROS denoted by the induction of *APX* and *RbohD*, was observed in all ECHI singly and stacked OE-lines even in the absence of pathogen challenge. This is in accordance with previous reports showing that the overexpression of a chitinase gene from *Trichoderma* sp. induced the rapid ROS accumulation followed by ROS scavenging enzyme activities, leading to an increase in the defense responses against *R. solani* in transgenic cotton (KUMAR et al., 2009) and *S. sclerotiorum* in soybean (ZHANG et al., 2016). These results suggest that, in addition to the activity of the transgene-encoded endochitinase, the derivative elevated defensive state here observed in the transgenic lines, may act synergistically to confer a strong resistance to *S. sclerotiorum* infection, leading to diminished host cell death as well as greater expression of various defense-related genes.

DISCUSSION

Diseases caused by fungal pathogens pose the greatest biotic challenge to the leading food crops in the world (FONES et al., 2020). This is intensified by modern agricultural practices that rely on the employment of genetically uniform crops, often harboring only one or a few inbred resistance genes. Single target site antifungals also offer only limited protection from disease (STEINBERG and GURR, 2020), with the effects of non-specific pesticides often causing adverse environmental issues and resulting in health hazards to humans as well as other non-target organisms (NAGPURE et al., 2014). As such, it is important that today's crop cultivars contain broad built-in genetic resistances against fungal pathogens.

The soilborne fungus *S. sclerotiorum* is a devastating fungal pathogen that affects important field, vegetable, fruit, ornamental, tree, shrub, and numerous weed crops (SAHARAN and MEHTA, 2008), resulting in a huge globally negative economic impact. Management of white mold and stem rot diseases through rotation with non-host crops is often inefficient, given the extensive host range of the pathogen and survival duration of sclerotia in soil (WILLBUR et al., 2019). In addition, the general lack of resistant cultivars to this pathogen for most economically important crops highlights the need for development of new cultivars and a more detailed understanding of the disease development (CESSNA et al., 2000).

Chitinases are PR proteins that hydrolyze chitin, a structural component of the fungal cell walls and insect integument. The application of chitinases in plants for control of pathogenic fungi and insect pests is an attractive alternative to agrochemicals, considering their perceived increased level of safety and absence of negative environmental impacts (NAGPURE et al., 2014). Chitin does not occur in plants, whereas in many plant-pathogenic fungi this macromolecule comprises between 22–44% of cell wall material, maintaining the structural integrity of hyphae. As such, chitin is an interesting molecule for selective targeted control as biopesticides through overexpression in heterologous transgenic plants. To date, there have been numerous reports on the application of chitinase genes from antagonistic fungal species within the genus *Trichoderma* in transgenic plants, with the aim of improving resistance to *S. sclerotiorum* and other important fungal pathogens (PARMAR et al., 2017). Increased resistance to fungal diseases through ectopic overexpression of chitinase genes from plants and mycoparasitic fungi has been reported in diverse crop species, including canola (ZIAEI et al., 2016; AGHAZADEH et al., 2016; ZARINPANJEH et al., 2016), soybean

(YANG et al., 2020), tomato (GOUGERDCHI et al., 2022), lettuce (SHARMA et al., 2022) and peanut (IQBAL et al., 2012; MARKA and NANNA, 2021; HOA et al., 2023). While several chitinase genes originating from different plant species have been applied to increase fungal resistance, to our knowledge, there have been no reports yet on the overexpression of chitinases from wild plant species to increase the resistance to *S. sclerotiorum*.

Our previous studies showed that the overexpression of *AsECHII* from the wild *A. stenosperma* decreased nematode infection (*M. incognita*) and enhanced water deficit tolerance in transgenic *Arabidopsis* (MOTA et al., 2021). Here, we have expanded the knowledge of endochitinases in wild *Arachis* by analyzing the phylogenetic relationships of 62 *AsECHII* orthologues across 12 legume species and found chitinase genes previously reported as being involved in fungal resistance. The phylogenetic analysis revealed two clusters containing *Arachis* genes from Class I and one from Class II, with each cluster including orthologues from peanut (*A. hypogaea*) and its diploid relatives (*A. duranensis*, *A. ipaënsis*) orthologues. Interestingly, chitinase genes previously reported as being involved in *S. sclerotiorum* resistance in *P. vulgaris* (Phvul.002G114200, Phvul.002G114100) and *G. max* (Glyma.01G160100) fell within the same group as *AsECHII* Class II orthologues. Both *P. vulgaris* genes were identified within the main QTL interval linked to white mold resistance in a resistant genotype (OLADZAD et al., 2023), while the soybean chitinase gene was shown to be upregulated after inoculation with *S. sclerotiorum* (LV et al., 2022). The phylogenetic proximity between *AsECHII* and these other legume genes involved in *S. sclerotiorum* resistance, together with our previous results, supported *AsECHII* gene as a promising candidate gene not only for nematode resistance but also against white mold.

The motif organization and conserved segments of the 67 legume ECHI proteins analyzed showed that the great majority (82%), including *Arachis* proteins, belongs to the Class I of endochitinases that is characterized by a CBD domain followed by the catalytic Glyco_hydro_19 domain. Otherwise, *AsECHII* and the other three legume proteins previously associated with *S. sclerotiorum* resistance (LV et al., 2022; OLADZAD et al., 2023), all belong to the Class II GH19 chitinase family, which are highly similar to chitinases from Class I, except by lacking the CBD domain (OYELEYE and NORMI, 2018). Whether the differences in the occurrence of this auxiliary CBD domain interfere

in the activity of chitinases Class I and II or in the specificity to their targets is not yet clear (ITO et al., 2002).

The expression profiling of six ECHI genes from *A. duranensis* and five from *A. stenosperma* revealed that *AsECHII* was induced during early stages of nematode infection (3 to 6 DAI) and in response to UV exposure in these two wild *Arachis* species. This broad response is in accordance with studies showing that chitinases, which are also known as PR-3 family proteins, can be induced by different biotic and abiotic stresses (TAKENAKA et al., 2009; MIR et al., 2020). The occurrence of SA and JA motifs in the cis-regulatory elements of chitinase genes in different plants, such as *Brassica juncea*, *Camelina sativa* and *G. max* provide preliminary evidence for the involvement of chitinase genes in the response to multiple plant stress (ALI et al., 2017; MIR et al., 2020; LV et al., 2022). In addition, the structure of the *AsECHII* gene shows three exons interspaced by two small introns. This simple gene architecture, with fewer introns than non-stress responsive genes, is also found for other chitinase genes such as those from *G. max* (MIR et al., 2020; LV et al., 2022), and is characteristic of stress related genes, as it allows them to react quickly and respond to stress conditions immediately (JEFFARES et al., 2008).

Wild species constitute an excellent reservoir of alleles to be used in crop breeding, as they have been challenged in natural environments for thousands of years, and maintain higher levels of genetic diversity when compared to domesticated cultivars (MAXTED et al., 2010). Considering the diverse interactions between plants and environmental factors, it is surprising that evolutionary principles encompassing wild relatives have been relatively underexploited in crop breeding to counteract biotic stresses (ZHANG et al., 2017). In this study, the overexpression of an endochitinase (*AsECHII*) gene from the wild species *A. stenosperma*, showed an average reduction of 40% in *S. sclerotiorum* lesions in transgenic tobacco. *AsECHII* has also been reported as increasing resistance against *M. incognita* and tolerance to hydric stress in transgenic *Arabidopsis* when these stresses were applied isolated or in combination (MOTA et al., 2021). Together, these results indicate that *AsECHII* could have an important role in the resistance of wild *Arachis* to multiple and combined stresses. This substantial enhancement in *S. sclerotiorum* resistance is comparable to that induced by other chitinase genes such as those from *Trichoderma* spp. (ZIAEI et al., 2016; AGHAZADEH et al., 2016; ZARINPANJEH et al., 2016; YANG et al., 2020) and rice (SHARMA et al.,

2023), reinforcing the potential in employment of targeted genes from wild *Arachis* in breeding strategies to broaden the genetic repertoire of resistances against fungal pathogens.

The fungal chitin polymer is a well-recognized pathogen-associated molecular pattern (PAMP) (WAN et al., 2008; MARTÍNEZ-CRUZ et al., 2022). Degradation by plant chitinases at pathogen penetration sites releases chitin oligomers that can be recognized by plant receptor proteins such as the chitin elicitor receptor kinase (CERK1) and the chitin elicitor-binding protein (CEBiP), activating PAMP or chitin-triggered immunity (TANAKA et al., 2013). In this context, previous studies in transgenic plants overexpressing chitinase genes revealed that increase in fungal resistance can be not only due to the chitinolytic activity of transgenic enzymes damaging the fungal cell wall, but also as a result of the induction of plant defense mechanisms following perception of the degraded fungal chitin fragment PAMPs (LORITO et al., 1998; SHIBUYA and MINAMI, 2001; EMANI et al., 2003; DE LAS MERCEDES DANA et al., 2006). Such studies showed increased ROS content such as superoxide, hydrogen peroxide and hydroxyl radicals, leading to the enhancement of antioxidant defense-responsive enzymes activities that include peroxidase, superoxide dismutase, phenylalanine ammonia lyase, and polyphenol oxidase in the transgenic plants. Chitin oligomers have also shown to induce additional defense-related responses in many plants that include increased lignification, protein phosphorylation, induction of glucose oxidase, and terpenoid production in relation to non-transformed plants (KUMAR et al., 2009).

While ROS function in cells as signaling molecules, and in higher plants regulate development, differentiation, redox levels, stress signaling, interactions with other organisms, systemic responses, and cell death (MITTLER, 2017), ROS detoxification is also essential for the protection of plant cells and their organelles against the toxic effects of these species (APEL and HIRT, 2004; MITTLER et al., 2004). Transgenic soybean plants overexpressing chitinase genes from the fungus *C. minitans* and *T. asperellum* conferred enhanced resistance to *S. sclerotiorum*, with accumulation of H₂O₂ and upregulation of defense-related genes and enzymes at infection sites, as well as increased ROS levels, peroxidase and catalase activities (ZHANG et al., 2016; YANG et al., 2020). Similarly, transgenic cotton overexpressing a chitinase from *T. virens* also showed rapid and greater induction of ROS, associated with the expression of several defense-related genes encoding PR proteins and enzymes involved the terpenoid pathway (KUMAR et

al., 2009). In our study, transgenic tobacco plants with constitutive expression of *AsECH1*, singly or stacked with *AdEXLB*, showed increased resistance to *S. sclerotiorum* compared to WT plants, with rises in ROS accumulation and in ascorbate peroxidase (APX) transcript expression, as confirmed by DAB staining and qRT-PCR analysis. We also observed an upsurge in the respiratory burst oxidase homolog (*RbohD*), which is well-known to be phosphorylated upon PAMP perception. Induction of *RbohD* has been observed in responses to pathogens with different lifestyles such as bacteria (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) and necrotrophic fungi (*Plectosphaerella cucumerina*) (MORALES et al., 2016), and also by the overexpression of resistance genes from the NLR receptor family (GUIMARAES et al., 2022) or expansin-like B genes (BRASILEIRO et al., 2021). The qRT-PCR analysis of defense marker genes suggests that increased chitinolytic activity through *AsECH1* overexpression singly or stacked with the priming-inducer *AdEXLB8* gene confers PTI-associated defense responses that include induction of ROS signaling (*RbohD*), followed by the increase in ROS scavenging enzymes activity (APX), to avoid cell membrane damage and cell death. Such ROS accumulation, followed by the induction of ROS scavenging enzymes presumably leading to improved resistance to *S. sclerotiorum*, has also been observed in chitinase overexpressing transgenic soybean plants (ZHANG et al., 2016), as well as transgenic rice plants against *R. solani* (KARMAKAR et al., 2016).

In addition to a greater induction of ROS, defense related genes from the JA/ET pathways were also induced in all singly and stacked OE-lines, as denoted by the increased expression of JA (*AOC*) and ET (*ACS*) gene markers. As mentioned earlier, the liberation of fungal cell wall or apoplastic glycoprotein-derived oligomers following hydrolysis by chitinases, which then act as PAMPs, triggers one or more defense-signaling pathways that can lead to a downstream systemic acquired resistance-like state in plants (DE LAS MERCEDES DANA et al., 2006; DONG et al., 2017). Such activation of phytohormone signaling pathways has also been observed in cotton plants overexpressing a chitinase gene from *T. virens* with increase resistance to *R. solani*, associated with upregulation of various defense-related endogenous genes and products, including higher basal levels of JA transcripts and enzymes (KUMAR et al., 2009). We also observed an increased expression of the auxin transcriptional regulator *AUX-IAA* transcripts in the singly OE and stacked OE-lines, which mediates the interaction between ET and auxin signaling pathways in plants (LIU et al., 2018). It is well known that auxin

responsive genes are differentially expressed during various stresses, and oxidative stress-related genes are regulated differentially by auxin, with ROS and auxin metabolism interfering and leading to morphological changes, including oxidative degradation by stress-induced peroxidases, increased auxin catabolism, transport and redistribution to avoid deleterious effects of environmental stress (BIELACH et al., 2017). In addition, it has been reported that certain stress-related hormones, such as ethylene (ET), upregulate auxin biosynthesis, while auxin has been linked to stress-induced JA biosynthesis (TOGNETTI et al., 2012). In this context, we suggest that the enhanced ROS and presumptive upregulation of the JA-ET hormone pathways herein observed mediated by *AsECH1* overexpression also altered auxin homeostasis, demonstrated by the increased expression of AUX-IAA transcripts.

Genetic engineering is a valuable approach for the control of fungal pathogens and has facilitated the introgression of novel genes from diverse sources into crops providing beneficial agronomic traits. The stacking of genes with different mechanisms of control aims to increase the magnitude of disease resistance and durability, reducing the ability for a pathogen to overcome the resistance. A number of such studies for enhanced resistance to fungal pathogens have successfully applied chitinase genes together with other defense related genes, such as defensins (ZARINPANJEH et al., 2016), polygalacturonases (ZIAEI et al., 2016) and thaumatin-like proteins (AGHAZADEH et al., 2016). In our study, we analyzed the effects of combining two genes for control of *S. sclerotiorum* with different mode of actions, structural (*AdEXLB8*) and enzymatic (*AsECH1*). *AdEXLB8* overexpression, in addition to modifications in the biomechanical properties of the cell wall, has also shown to interfere with phytohormone dynamics, leading to a defense primed state in the plant and contributing to plant defense responses against *S. sclerotiorum* (BRASILEIRO et al., 2021). Here, the investigation of the effects of stacking *AsECH1* with *AdEXLB8* in two tobacco OE-lines showed a significant reduction of fungi lesion in comparison to WT plants, also enabling a delay in lesion development, as previously observed for other gene stacking combinations against fungal pathogens (KIM et al., 2012; TAOUTAOU et al., 2023). Such employment of pyramid systems has the potential to enhance pathogen recognition spectrum, thus offering resistance against several races of the pathogen (ZAFAR et al., 2020), and to increase the durability of plant resistance, by reducing the probability of the pathogen to overcome all the defense genes simultaneously (FUKUOKA et al., 2015). Therefore, the

use of ECHI genes from wild *Arachis* species, singly or in a gene pyramid, appears as an appealing strategy for *S. sclerotiorum* management and development of more tolerant sustainable crops (ZHU et al., 2012; MUNDT, 2018).

REFERENCES

- ABDEEN, A. et al. Multiple insect resistance in transgenic tomato plants over-expressing two families of plant proteinase inhibitors. **Plant Mol Biol**, v. 57, p.189–202, 2005.
- AGHAZADEH, R. et al. (2016) Co-transformation of canola by chimeric chitinase and tlp genes towards improving resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 32, 2016.
- ALI, S. et al. Identification and comparative analysis of *Brassica juncea* pathogenesis-related genes in response to hormonal, biotic and abiotic stresses. **Acta Physiol Plant**, v. 39, p. 1–15, 2017.
- ANDRADE, C. M. et al. Host-induced gene silencing in the necrotrophic fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Pathol**, v. 65, p. 626–632, 2016.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annu Rev Plant Biol**, v. 55, p. 373–399, 2004.
- BERENDZEN, J. et al. The legume information system and associated online genomic resources. **Legum Sci**, v. 3, 2021.
- BERTIOLI, D. J. et al. The genome sequences of *Arachis duranensis* and *Arachis ipaensis*, the diploid ancestors of cultivated peanut. **Nat Genet**, v.48, p. 438–446, 2016.
- BIELACH, A.; HRTYAN, M.; TOGNETTI, V. B. Plants under stress: involvement of auxin and cytokinin. **Int J Mol Sci**, v. 18, 2017.
- BRASILEIRO, A. C. M. et al. (2021) Ectopic expression of an expansin-like B gene from wild *Arachis* enhances tolerance to both abiotic and biotic stresses. **Plant J**, 2016.
- BYRON, S. A. et al. Gene help: integrated access to genes of genomes in the reference sequence collection. **Nat Rev Genet**, v. 17, p.257–271, 2022.
- CESSNA, S. G. et al. Oxalic acid, a pathogenicity factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, suppresses the oxidative burst of the host plant. **Plant Cell**, v. 12, p. 2191–2199, 2000.
- CHEN, C.; CHEN, H.; ZHANG, Y. et al. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. **Mol Plant**, v. 13, p. 1194–1202, 2020.
- CHOUDHURY, F. K. et al. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. **Plant J**, v. 90, p. 856–867, 2017.
- CHOUHAN, R.; AHMED, S.; GANDHI, S. G. Over-expression of PR proteins with chitinase activity in transgenic plants for alleviation of fungal pathogenesis. **J Plant Pathol**, v. 105, p.69–81, 2023.
- CHRISTOU, P. et al. Recent developments and future prospects in insect pest control in transgenic crops. **Trends Plant Sci.**, v. 11, p. 302–308, 2006.

- CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic Acids Res**, v. 16, p. 10881–10890, 1988.
- DASH, S. et al. Legume information system (LegumeInfo.org): a key component of a set of federated data resources for the legume family. **Nucleic Acids Res**, v. 44, p.D1181, 2016.
- DATTA K. et al. Enhanced resistance to sheath blight by constitutive expression of infection-related rice chitinase in transgenic elite indica rice cultivars. **Plant Sci**, v. 160, p. 405–414, 2001.
- DAUDI, A.; O'BRIEN, J. A. (2012) Detection of hydrogen peroxide by dab staining in *Arabidopsis* Leaves. **Bio-protocol**, v. 2, 2012.
- DE LAS MERCEDES DANA, M. PINTOR-TORO, J. A. CUBERO, B. Transgenic tobacco plants overexpressing chitinases of fungal origin show enhanced resistance to biotic and abiotic stress agents. **Plant Physiol**, v. 142, p. 722–730, 2006.
- DONG, X. et al. Overexpression of a new chitinase gene *euchit2* enhances resistance to *Erysiphe cichoracearum* dc in tobacco plants. **Int J Mol Sci**, v. 18, 2017.
- EMANI, C. et al. Enhanced fungal resistance in transgenic cotton expressing an endochitinase gene from *Trichoderma virens*. **Plant Biotechnol J**, v. 1, p. 321–336, 2003.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer analysis system to fixed effects split plot type designs. **Brazilian J Biometrics**, v. 37, p. 529–535, 2019.
- FINN, R. D.; CLEMENTS, J.; EDDY, S. R. HMMER web server: interactive sequence similarity searching. **Nucleic Acids Res**, v. 39, 2011.
- FONES, H. N. et al. Threats to global food security from emerging fungal and oomycete crop pathogens. **Nat food**, v.1, p. 332–342, 2020.
- FUKUOKA, S. et al. Gene pyramiding enhances durable blast disease resistance in rice. **Sci Reports**, v. 51, n. 5, p. 1–7, 2015.
- GOUGERDCHI, V. et al. Overexpression of the chimeric chitinase (ChBD) gene in *Lycopersicon esculentum* L. enhanced resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v. 151, p. 165–175, 2022.
- GRISON, R. et al. Field tolerance to fungal pathogens of *Brassica napus* constitutively expressing a chimeric chitinase gene. **Nat Biotechnol**, v. 14, p. 643–646, 1996.
- GUIMARAES, P. M. et al. Functional genomics in peanut wild relatives. In: Varshney, R., Pandey, M., Puppala N (ed) The peanut genome. **Compendium of Plant Genome**. p. 149–164, 2017.
- GUIMARAES, P. M. et al. Root Transcriptome analysis of wild peanut reveals candidate genes for nematode resistance. **PLoS One**, v. 10, 2015.
- GUIMARAES, P. M. et al. Engineering resistance against *Sclerotinia sclerotiorum* using a truncated NLR (TNx) and a defense-priming gene. **Plants**, v. 11, 2022.
- HAJJAR, R.; HODGKIN, T. The use of wild relatives in crop improvement: A survey of developments over the last 20 years. **Euphytica**, v. 156, p. 1–13, 2017.
- HAMEL F. et al. Structural and evolutionary relationships among chitinases of flowering plants. **J Mol Evol**, v. 44, p. 614–624, 1997.

- HOA, P. T. B. et al. Overexpression of 42 kDa chitinase genes from *Trichoderma asperellum* SH16 in peanut (*Arachis hypogaea*). **J Crop Improv**, v. 37, p. 463–478, 2023.
- HORSCH, R. B. et al. A simple and general method for transferring genes into plants. **Science**, v. 227, p. 1229–1230, 1985.
- IQBAL, M. M. et al. Over expression of rice chitinase gene in transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L.) improves resistance against leaf spot. **Mol Biotechnol**, v. 50, p. 129–136, 2012.
- ITOH, Y. et al. Functional analysis of the chitin-binding domain of a family 19 chitinase from *Streptomyces griseus* HUT6037: substrate-binding affinity and cis-dominant increase of antifungal function. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 66, p. 1084–1092, 2002.
- JEFFARES, D. C.; PENKETT, C. J.; BÄHLER, J. Rapidly regulated genes are intron poor. **Trends Genet**, v. 24, p. 375–378, 2008.
- JONES, P. et al. InterProScan 5: genome-scale protein function classification. **Bioinformatics**, v. 30, p. 1236–1240, 2014.
- KARMAKAR, S. et al. Green tissue-specific co-expression of chitinase and oxalate oxidase 4 genes in rice for enhanced resistance against sheath blight. **Plants**, v. 243, p. 115–130, 2016.
- KIM, H. J. et al. Broad spectrum late blight resistance in potato differential set plants MaR8 and MaR9 is conferred by multiple stacked R genes. **Theor Appl Genet**, v. 124, p.923–935, 2012.
- KUMAR, V. et al. Defense-related gene expression and enzyme activities in transgenic cotton plants expressing an endochitinase gene from *Trichoderma virens* in response to interaction with *Rhizoctonia solani*. **Plants**, v. 230, p. 277–291, 2009.
- LEAL-BERTIOLI, S. C. M. et al. Genetic mapping of resistance to *Meloidogyne arenaria* in *Arachis stenosperma*: A new source of nematode resistance for peanut. **G3 Genes, Genomes, Genet**, v. 6, p. 377–390, 2016.
- LIANG, Y. et al. Identification of QTLs associated with *Sclerotinia* blight resistance in peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Genet Resour Crop Evol**, v. 68, p. 629–637, 2021.
- LIU, M. et al. The tomato Ethylene Response Factor Sl-ERF.B3 integrates ethylene and auxin signaling via direct regulation of Sl-Aux/IAA27. **New Phytol**, v. 219, p. 631–640, 2018.
- LORITO, M. et al. Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.95, p. 7860–7865, 1998.
- LV, P. et al. Genome-wide identification and expression analyses of the chitinase gene family in response to white mold and drought stress in soybean (*Glycine max*). **Life**, v. 12, 2022
- MARKA, R.; NANNA, R. S. Expression of Tcchitinase-I gene in transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L.) confers enhanced resistance against leaf spot and rust diseases. **Plant Growth Regul**, v. 93, p. 53–63, 2021.
- MARTÍNEZ-CRUZ, J. M. et al. Suppression of chitin-triggered immunity by a new fungal chitin-binding effector resulting from alternative splicing of a chitin deacetylase gene. **J fungi**, v. 8, 2022.
- MARTINS, A. C. Q. et al. Proteomics unravels new candidate genes for *Meloidogyne* resistance in wild *Arachis*. **J Proteomics**, v. 217, p. 103690, 2020.

- MARTINS, A. C. Q. et al. Transcriptome responses of wild arachis to uv-c exposure reveal genes involved in general plant defense and priming. **Plants**, v. 11, 2022.
- MAXTED, N. et al. A global approach to crop wild relative conservation: Securing the gene pool for food and agriculture. **Kew Bull**, v. 65, p. 561–576, 2010.
- MIR, Z. A. et al. Genome-wide identification and characterization of Chitinase gene family in *Brassica juncea* and *Camelina sativa* in response to *Alternaria brassicae*. **Genomics**, v. 112, p. 749–763, 2020.
- MITTLER, R. ROS Are Good. **Trends Plant Sci**, v. 22, p. 11–19, 2017.
- MITTLER, R. et al. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends Plant Sci**, v. 9, p. 490–498, 2004.
- MORALES, J. et al. The *Arabidopsis* NADPH oxidases RbohD and RbohF display differential expression patterns and contributions during plant immunity. **J Exp Bot**, v. 67, p. 1663–1676, 2016.
- MORGANTE, C. V. et al. A survey of genes involved in *Arachis stenosperma* resistance to *Meloidogyne arenaria* race 1. **Funct Plant Biol**, v. 40, p. 1298, 2013.
- MOTA, A. P. Z. et al. Defining the combined stress response in wild *Arachis*. **Sci Reports**, v. 11, n. 11, p. 1–12, 2021.
- MOTA, A. P. Z. et al. Evolutionarily conserved plant genes responsive to root-knot nematodes identified by comparative genomics. **Mol Genet Genomics**, v. 295, p. 1063–1078, 2020.
- MOTA, A. P. Z. et al. Comparative root transcriptome of wild *Arachis* reveals NBS-LRR genes related to nematode resistance. **BMC Plant Biol**, v. 18, p. 1–16, 2018.
- MUNDT, C. C. Pyramiding for Resistance Durability: Theory and Practice. **Phytopathology**, v. n. 108, p. 792–802, 2018.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol Plant**, v. 15, p. 473–497, 1962.
- NAGPURE, A.; CHOUDHARY, B.; GUPTA, R. K. Chitinases: in agriculture and human healthcare. **Crit Rev Biotechnol**, v. 34, p. 215–232, 2014.
- OLADZAD, A. et al. Linked candidate genes of different functions for white mold resistance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L) are identified by multiple QTL mapping approaches. **Front Plant Sci**, v. 14, p. 1233285, 2023.
- OYELEYE, A.; NORMI, Y. M. Chitinase: diversity, limitations, and trends in engineering for suitable applications. **Biosci Rep**, v.38, 2018.
- PARMAR, N. et al. Genetic engineering strategies for biotic and abiotic stress tolerance and quality enhancement in horticultural crops: a comprehensive review. **3 Biotech**, v.7, 2017.
- PASSARINHO, P. A.; VRIES, S. C. *Arabidopsis* chitinases: a genomic survey. *Arabidopsis Book* 1:e0023, 2002.
- PERCHEPIED, L. et al. Nitric oxide participates in the complex interplay of defense-related signaling pathways controlling disease resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in *Arabidopsis thaliana*. **Mol Plant-Microbe Interact**, v. 23, p. 846–860, 2010.

RANCUREL, C. et al. SATQPCR: Website for statistical analysis of real-time quantitative PCR data. **Mol Cell Probes**, v. 46, p. 101418, 2019.

SAHAI, A. S.; MANOCHA, M. S. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host—parasite interaction. **FEMS Microbiol Rev**, v. 11, p. 317–338, 1993.

SAHARAN, G. S.; MEHTA, N. *Sclerotinia* diseases of crop plants: Biology, ecology and disease management. **Sclerotinia Dis Crop Plants Biol Ecol Dis Manag**, p. 1–485, 2008.

SHARMA, M. et al. Transgenic rice expressing *Trichoderma* spp. endochitinase gene exhibits moderate resistance to sheath blight. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v. 153, p. 53–65, 2023.

SHARMA, S. et al. Transgenic lettuce (*Lactuca sativa* L.) harboring chitinase gene expressed resistance against a devastating fungus, *Sclerotinia sclerotiorum*. **Vegetos**, p.1–10, 2022.

SHIBUYA, N.; MINAMI, E. Oligosaccharide signalling for defence responses in plant. **Physiol Mol Plant Pathol**, v. 59, p.223–233, 2001.

SINGH, D. et al. Expression of rice chitinase gene in transgenic eggplant confers resistance to fungal wilts. **Indian J Biotechnol**, v. 14, p. 233–240, 2015.

SRINIVAS, K. R. CISGENESIS AND CISGENIC CROPS: Need for a Paradigm Shift in Harnessing and Governance. 255–268, 2023.

STALKER HT (2017) Utilizing wild species for peanut improvement. **Crop Sci**, v. 57, p. 1102–1120, 2017.

STEINBERG, G.; GURR, S. J. Fungi, fungicide discovery and global food security. **Fungal Genet Biol**, v. 144, 2020.

TAKENAKA, Y. et al. Chitinase gene expression in response to environmental stresses in *Arabidopsis thaliana*: chitinase inhibitor allosamidin enhances stress tolerance. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 73, p. 1066–1071, 2009.

TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. **Mol Biol Evol**, v. 38, p. 3022–3027, 2021.

TANAKA, K. et al. Role of *LysM* receptors in chitin-triggered plant innate immunity. **Plant Signal Behav**, v. 8, p. 147–153, 2013.

TAOUTAOU, A. et al. Defeated stacked resistance genes induce a delay in disease manifestation in the pathosystem *Solanum tuberosum*—*Phytophthora infestans*. **Agron**, v. 13, p. 1255, 2023.

TELEM, R. S. et al. Cisgenics - A sustainable approach for crop improvement. **Curr Genomics**, v. 14, p. 468, 2013.

THIBAUD, M. C. et al. Sucrose increases pathogenesis-related PR-2 gene expression in *Arabidopsis thaliana* through an SA-dependent but NPR1-independent signaling pathway. **Plant Physiol Biochem**, v. 42, p. 81–88, 2004.

THORDAL-CHRISTENSEN, H. et al. Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley—powdery mildew interaction. **Plant J**, v.11, p. 1187–1194, 1997.

TOGNETTI, V. B.; MÜHLENBOCK, P.; VAN BREUSEGEM, F. Stress homeostasis – the redox and auxin perspective. **Plant Cell Environ**, v. 35, p. 321–333, 2012.

- VAGHELA, B. et al. Plant chitinases and their role in plant defense: A comprehensive review, 2022.
- VALLS, J.; MAASS, B. L.; LOPES, C. Genetic resources of wild *Arachis* and genetic diversity, 1994.
- VELLICCE, G. R. et al. Enhanced resistance to *Botrytis cinerea* mediated by the transgenic expression of the chitinase gene ch5B in strawberry. **Transgenic Res**, v. 15, p. 57–68, 2006.
- WALLY, O.; JAYARAJ, J.; PUNJA, Z. Comparative resistance to foliar fungal pathogens in transgenic carrot plants expressing genes encoding for chitinase, β -1,3-glucanase and peroxidase. **Eur J Plant Pathol**, v. 123, p. 331–342, 2009.
- WAN, J.; ZHANG, X. C.; STACEY, G. Chitin signaling and plant disease resistance. **Plant Signal Behav**, v. 3, p. 831, 2008.
- WARBURTON, M. L. et al. The use of crop wild relatives in maize and sunflower breeding. **Crop Sci**, v. 57, p. 1227–1240, 2017.
- WILLBUR, J. et al. An overview of the *Sclerotinia sclerotiorum* pathosystem in soybean: impact, fungal biology, and current management strategies. **Trop Plant Pathol**, v. 44, p. 3–11, 2019.
- WU, B.; QI, F.; LIANG, Y. Fuels for ROS signaling in plant immunity. **Trends Plant Sci**, v. 28, p. 1124–1131, 2023.
- YANG, X. et al. Overexpression of the chitinase gene *CmCHI* from *Coniothyrium minitans* renders enhanced resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Transgenic Res**, v. 29, p. 187–198, 2020.
- ZAFAR, M. M. et al. Insect resistance management in *Bacillus thuringiensis* cotton by MGPS (multiple genes pyramiding and silencing). **J Cott Res**, v.31, n. 3, p. 1–13, 2020.
- ZARINPANJEH, N. et al. Enhanced resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in *Brassica napus* by co-expression of defensin and chimeric chitinase genes. **J Appl Genet**, v.57, p. 417–425, 2016.
- ZHANG, F. et al. Overexpression of a chitinase gene from *Trichoderma asperellum* Increases disease resistance in transgenic soybean. **Appl Biochem Biotechnol**, v.180, p. 1542–1558, 2016.
- ZHANG, H. et al. Back into the wild—Apply untapped genetic diversity of wild relatives for crop improvement. **Evol Appl**, v. 10, p. 5–24, 2017.
- ZHANG, J. et al. A *Pseudomonas syringae* effector inactivates MAPKs to suppress PAMP-induced immunity in plants. **Cell Host Microbe**, v. 1, p. 175–185, 2007.
- ZHANG, J.; ZHOU, J. M. Plant immunity triggered by microbial molecular signatures. **Mol Plant**, v. 3, p. 783–793, 2010.
- ZHAO, S.; FERNALD, R. D. Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. **J Comput Biol**, v. 12, p. 1047–1064, 2005.
- ZHU, S. et al. Functional stacking of three resistance genes against *Phytophthora infestans* in potato. **Transgenic Res**, v.21, p. 89, 2012.
- ZIAEI, M. et al. Co-expression of chimeric chitinase and a polygalacturonase-inhibiting protein in transgenic canola (*Brassica napus*) confers enhanced resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Biotechnol Lett**, v. 38, p. 1021–1032, 2016.

Suppl. Table 2. *AsECH11* orthologues in *A. duranensis* and *A. stenosperma*

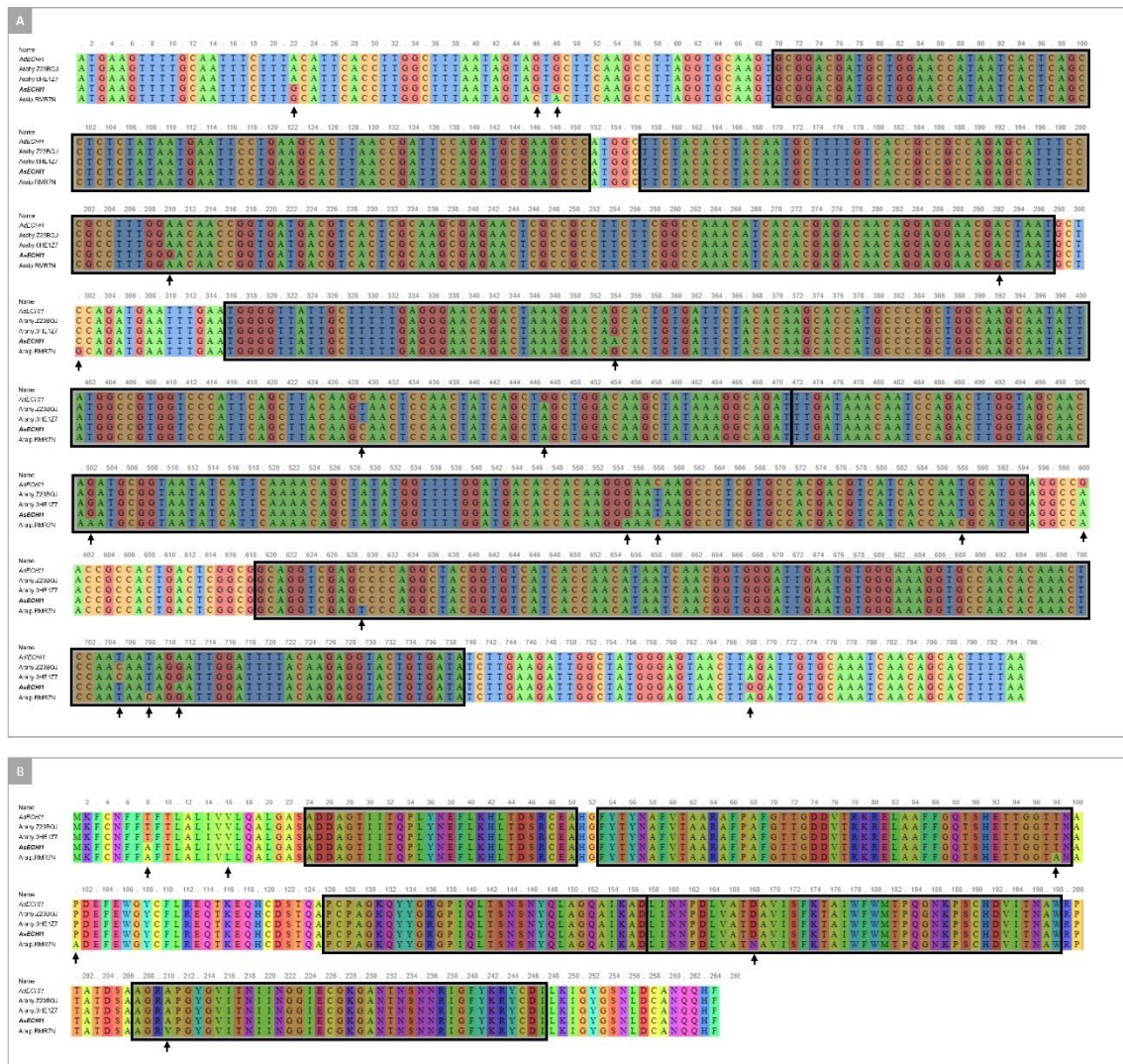
<i>Arachis duranensis</i>		<i>Arachis stenosperma</i>	
Gene model		NCBI reference sequence	
Aradu.4196P	<i>AdECH11</i>	XP_057758529	<i>AsECH11</i>
Aradu.118NW	<i>AdECH12</i>	XP_057747664	<i>AsECH12</i>
Aradu.9A16Q	<i>AdECH13</i>	XP_057756227	<i>AsECH13</i>
Aradu.A2QA1	<i>AdECH14</i>	XP_057747654	<i>AsECH14</i>
Aradu.R48AD	<i>AdECH15</i>	XP_057747670	<i>AsECH15</i>
Aradu.W9SJN	<i>AdECH16</i>		

Suppl. Table 3. *Sclerotinia sclerotiorum* lesion sizes (based on pixel numbers) in OE transgenic lines in relation to WT.

HAI	WT	EXLB OE-10	ECHI OE-3	ECHI OE-10	ECHI OE-20	EXLB:ECHI OE-3	EXLB:ECHI OE-6	Mean
0	8098 aD	7651 aB	7324 aC	7229 aC	7225 aC	9360 aB	9095 aC	7850 D
12	11189 aD	8738 aB	8875 aC	9310 aC	8889 aC	11017 aB	11070 aC	9979 D
24	33825 aC	30951 aA	22607 aBC	22515 aBC	21451 aBC	19720 aB	21817 aC	26226 C
36	52053 aB	38154 abA	32598 abBC	37048 abAB	34642 abB	30176 bB	33045 abB	39859 B
48	71892 aA	52098 bA	40650 bA	47057 bA	43530 bA	43927 bA	49866 bA	53533 A
Mean	35412 a	27518 ab	22411 b	24632 b	23148 b	22840 b	24979 b	
small letters are related to genotype								
Capital letters are relate to the infection period (HAI)								

Suppl. Table 4. Primers used for PCR and qRT-PCR in this study.

Primer name	Putative function	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Amplicon (bp)	Efficiency of primer	Reference
GFP	Green Fluorescent Protein	CGACCACATGAAGCAGCAGAC	TCCTCGATGTTGGCGGATCT	294	-	Martins et al., 2020.
BAR	Glufosinate ammonium	AAACCCACGTCATGCCAGTT	CATCGAGACAAGCAGCGTCA	405	-	Ibrahim et al., 2017.
HPT	Hygromycin phosphotransferase	TCCGGAAGTGTGACATTG	ATGTTGGCGACCTCGTATTG	474	-	Lacorte et al., 2010.
AsECH1	Endochitinase	GCCCATGGCTTCTACACCTA	CCCCATTCAAATTCATCTGG	173	0,88	Carmo et al., 2019.
AdEXLB8	Expansin-like B	TGGGTTCTCAACATCAAACT	CGCAGCTCAAAACCACACTA	150	?	Brasileiro et al., 2015.
NtActin	Actin	CATTGGCGCTGAGAGATTCC	GCAGCTTCCATCCGATCA	68	0,87	Chen et al., 2016.
NtGAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphophate dehydrogen	TGGGTGTCAACGAGAAGGAA	TCTGGGTGGCAGTAAGGGA	158	0,89	Xie et al., 2014.
NtL25	Ribosomal protein L25	GCTAAGGTTGCCAAGGCTGCAAG	GCCTAATAACGAGGTTACTGGGGTT	133	0,88	Brasileiro et al., 2021.
NtACS6	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase	ATGCCAAGGAAAAGGATTCTACA	TGGGAGGTTTGGCGGAAGA	132	0,86	Dang et al., 2018.
NtAOCb	Allene oxide cyclase	CCTGCTTATCTTGGCTTGAG	ATGCAGAGTCCAGCCGTTAT	121	0,89	Alon et al., 2013.
NtAOS	Allene oxide synthase	GCCAAAACGCGACCTTATGAT	CCACAAAATCCTTCCGGCA	249	0,90	Chen et al. 2016b.
NtAPX1	Ascorbate peroxidase	GAGAAATATGCTGCGGATGA	CGTCTAATAACAGCTGCCAA	235	0,83	Chen et al. 2016a.
NtAUX-IAA	Auxin-responsive protein	AAGGGGTTTTGTGACACTATGAATG	TTTGGAGCAGCCTTTTCCAGCATT	164	0,94	Xing et al., 2017.
NtCA	Beta-Carbonic anhydrase	CGCCTGTGGAGGTATCAAA	GAGAAGGAGAAAAGCCGAAT	116	0,87	Chen et al. 2016a.
NtCAT1	Catalase 1	TGGACTTCATACTGGTCTCA	TCCATTGTTTCAGTCATTCA	275	0,86	Chen et al. 2016a.
NtRbohD	Respiratory burst oxidase homologue D	ACCAGCACTGACCAAGAA	TAGCATCACAACCACAATA	237	0,88	Chen et al. 2016a.



Capítulo 4. Validação funcional de genes candidatos envolvidos na resistência a *Sclerotinia sclerotiorum* em plantas transgênicas de tabaco

RESUMO

Sclerotinia sclerotiorum é o agente etiológico do mofo branco com ampla distribuição e que afeta diversas culturas agrícolas, como soja, feijão, algodão e hortaliças. Os genes *AsAOC3*, *AsTIL* e *AsSTS4* isolados da espécie silvestre *Arachis stenosperma*, são candidatos a funções específicas: Alene Oxidase Ciclase (*AsAOC3*) desempenha um papel na biossíntese de ácido jasmônico (JA) e compostos relacionados, enquanto a Lipocalina (*AsTIL*) está relacionada a regulação de altos níveis de ácido salicílico (SA) e na modulação da tolerância ao estresse oxidativo. Além disso, a enzima Estilbeno Sintase (*AsSTS4*) é responsável pela síntese da fitoalexina resveratrol, oferecendo proteção contra diversos estresses em plantas. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da superexpressão desses genes candidatos, em plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), durante sua interação com o patógeno necrotrófico *S. sclerotiorum* utilizando o método de folha destacada. Para os bioensaios, o isolado (CMES 1795) foi aplicado à superfície adaxial de folhas totalmente expandidas das linhagens de tabaco superexpressando os três genes candidatos e das folhas do controle não-transgênico (“wild-type”; WT). O progresso da lesão fúngica foi avaliado a cada 12 horas após a inoculação (HAI) e a média da área da lesão de cada folha foi calculada e testada estatisticamente pelo teste t. Os resultados demonstraram que para os três genes testados, não houve diferença significativa no progresso da doença em relação ao controle. A análise dos dados utilizando os controles (WT) e teste de variância (ANOVA), seguido pelo teste Tukey, demonstrou que a metodologia utilizada é reprodutível e está bem estabelecida.

Palavras-chave: *Podridão do caule*, Mofo branco, Inoculação.

Functional validation of candidate genes involved in resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in transgenic tobacco plants

ABSTRACT

Sclerotinia sclerotiorum is the causative agent of white mold, a widespread disease affecting several agricultural crops such as soybeans, beans, cotton, and vegetables. The *AsAOC3*, *AsTIL*, and *AsSTS4* genes, isolated from the wild species *Arachis stenosperma*, are candidates for specific functions: Alene Oxidase Cyclase (*AsAOC3*) plays a role in the biosynthesis of jasmonic acid (JA) and related compounds, while Lipocalin (*AsTIL*) is associated with the regulation of high levels of salicylic acid (SA) and modulation of tolerance to oxidative stress. Furthermore, the enzyme Stilbene Synthase (*AsSTS4*) is responsible for the synthesis of the phytoalexin resveratrol, offering protection against various stresses in plants. The objective of the present study was to evaluate the effects of overexpression of these candidate genes in transgenic tobacco plants (*Nicotiana tabacum*) during their interaction with the necrotrophic pathogen *S. sclerotiorum* using the detached leaf method. For bioassays, the isolate (CMES 1795) was applied to the adaxial surface of fully expanded leaves of tobacco lines overexpressing the three

candidate genes and leaves of the non-transgenic control (wild-type; WT). The progress of the fungal lesion was evaluated every 12 hours after inoculation (HAI), and the average lesion area of each leaf was calculated and statistically tested using the t-test. The results demonstrated that for the three genes tested, there was no significant difference in the progress of the disease compared to the control. Data analysis using controls (WT) and variance test (ANOVA), followed by the Tukey test, demonstrated that the methodology used is reproducible and well-established.

Keywords: Stem rot, White mold, Inoculation.

INTRODUÇÃO

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary (1884) é classificado como pertencente ao reino Fungi, filo Ascomycota, e é conhecido por ser o agente causador do mofo branco (ou murcha de esclerotinia) e de doenças de podridão do caule em mais de 400 espécies de plantas. Este fungo é caracterizado como um patógeno necrotrófico, pois excretam proteínas e metabólitos para matar rapidamente as células do hospedeiro e completar seu ciclo de infecção nas células mortas (BOLAND; HALL, 1994; BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006). *Sclerotinia sclerotiorum* persiste no solo como micélio ou escleródios, que são estruturas de sobrevivência melanizadas e compostas de micélios compactos, que podem permanecer viáveis no solo por até oito anos e germinar carpogenicamente ou miceliogenicamente, a depender das condições ambientais (ADAMS; AYERS, 1979; WILLETTS; WONG, 1980).

Por *S. sclerotiorum* apresentar uma ampla variedade de hospedeiros, não há sintomas característicos, variando consideravelmente entre diferentes espécies de plantas hospedeiras afetadas (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006). As folhas geralmente possuem lesões encharcadas que se expandem rapidamente e se alastram do pecíolo ao caule (BOLAND; HALL, 1994). As lesões geralmente se desenvolvem em tecidos necróticos que subsequentemente desenvolvem micélio branco com aspecto cotonoso e, à medida que o fungo progride para os caules principais, ocorre murchamento. Os escleródios são tipicamente formados dentro do tecido infectado, mas podem se formar na superfície dos tecidos em condições de alta umidade (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006).

Devido à sua capacidade de infectar culturas economicamente importantes, como soja, feijão, algodão e hortaliças, causando grandes perdas de produção, *S. sclerotiorum* tem sido o foco de vários programas de pesquisa (AMSELEM et al., 2011). Por ser causado por fungo de solo, o mofo branco é de difícil controle, principalmente pela ausência de cultivares resistentes e pela sobrevivência dos fungos em estruturas de resistência, que permanecem viáveis no solo ou em restos vegetais por vários anos. Assim, os tratamentos existentes para controle desta doença são principalmente preventivos e incluem o uso de fungicidas, agentes de controle biológico, e práticas agrícolas tradicionais. Portanto, o desenvolvimento de cultivares resistentes é a estratégia mais eficaz para reduzir as perdas de produtividade causadas por essa doença (LIANG et al., 2021).

Parentes silvestres do amendoim (*Arachis hypogaea* L.) têm sido uma valiosa fonte de genes de resistência a doenças devido à sua ampla diversidade genética, resultado de adaptações ao longo da evolução em diversos ambientes e exposição a diferentes pressões bióticas (STALKER; SIMPSON, 1995). Nos últimos anos, equipes de pesquisa da Embrapa têm investigado a diversidade genética de espécies silvestres de *Arachis*, visando à identificação de genes relacionados à adaptação dessas espécies a uma ampla gama de ambientes desafiadores presentes em seu ambiente natural (BRASILEIRO et al., 2021; CARMO et al., 2019; MARTINS et al., 2020; MOTA et al., 2018, 2021; VINSON et al., 2018). A prospecção e identificação de genes ‘silvestres’ relacionados à adaptação a condições adversas permitem uma melhor compreensão dos sistemas moleculares envolvidos nas respostas de resistência a diferentes estresses (VON WETTBERG; DAVIS; SMÝKAL, 2020).

A principal abordagem adotada pelo grupo de pesquisa da Embrapa Cenargen para identificação de genes, envolve a análise em larga escala da expressão gênica em resposta a diversos estresses bióticos e/ou abióticos (BRASILEIRO et al., 2014; GUIMARAES et al., 2015; VINSON et al., 2018). A espécie silvestre *A. stenosperma* tem sido um dos principais focos desses estudos, por abrigar altos níveis de resistência a uma variedade de patógenos. Em estudos realizados pela equipe nos últimos anos, plantas de *A. stenosperma* inoculadas com o nematoide das galhas *Meloidogyne arenaria* tiveram seu transcriptoma analisado em diferentes tempos da interação para estudo da ação do nematoide e resposta da planta (GUIMARAES et al., 2010; GUIMARAES et al., 2015; MARTINS et al., 2020; MORGANTE et al., 2013; MOTA et al., 2018; PROITE et al., 2007). *Meloidogyne arenaria* ocasiona perdas de produtividade superiores a 50% em campos infestados e, em alguns casos, foram registradas perdas de até 100% em regiões com infestações intensas (DICKSON; WAELE, 2005; TIMPER; DICKSON; STEENKAMP, 2018). Na espécie de amendoim cultivado não é encontrada resistência a várias pragas e doenças, o que faz com que seus parentes silvestres sejam uma boa alternativa, por possuírem um conjunto genético diversificado que pode ser incorporado a programas de melhoramento (BALLÉN-TABORDA et al., 2021).

Diante da importância de *M. arenaria* à cultura, uma análise do transcriptoma e do proteoma da raiz durante os primeiros estágios de interação incompatível *M. arenaria/A. stenosperma* foi realizada com a finalidade de identificar genes e reguladores que desencadeiam respostas de defesa. Uma posterior análise por RT-qPCR validou a

expressão de alguns genes candidatos potencialmente envolvidos na resposta de resistência a nematoide. Esses estudos identificaram vários genes como potencialmente envolvidos na resposta de resistência a *M. arenaria* em *A. stenosperma*, como aqueles envolvidos com as vias de ácido jasmônico (JA), ácido salicílico (SA), homeostase hormonal, à plasticidade (capacidade adaptativa) e sinalização celular (GUIMARAES et al., 2010; GUIMARAES et al., 2015).

Grande parte das perdas econômicas do amendoim cultivado é imposta por doenças foliares, causadas por uma gama de fungos (IZGE; MOHAMMED; GONI, 2007; RATHOD et al., 2020; SHIRASAWA et al., 2018; TSHILENGE-LUKANDA et al., 2012). Perdas na cultura também são observadas por fungos associados ao solo como *Sclerotinia sclerotiorum* e *S. minor* Jagger, responsáveis por causar perdas significativas de safra na cultura (MARINELLI et al., 1998; WOODWARD et al., 2006), o que faz com que produtores e pesquisadores estejam constantemente à procura de fontes de resistência (CHAMBERLIN; PUPPALA, 2018; DURA et al., 2021; HU et al., 2016; LIVINGSTONE et al., 2005; TALLURY et al., 2014; YOL; UPADHYAYA; UZUN, 2015). A utilização de espécies silvestres da seção *Arachis* como doadoras de alelos de interesse agrônômico em programas de melhoramento do amendoim cultivado tem aumentado nos últimos anos e, em sua maioria, voltados para o incremento da resistência a doenças (DWIVEDI et al., 2007).

O ácido jasmônico (JA) exerce um papel crucial na promoção da resistência contra doenças, estimulando a ativação de genes de resistência que desempenham um papel defensivo em resposta a danos e ataques de patógenos nas plantas (ISAYENKOV et al., 2005). Alene Oxidase Ciclase (*AsAOC3*) é uma enzima funcional envolvida na biossíntese de JA e compostos relacionados (GUIMARAES et al., 2015; RIEMANN et al., 2013). Apesar deste gene ser um candidato promissor na resistência a doenças, o conhecimento sobre ele ainda é limitado, sendo notável que, após extensa pesquisa de literatura, apenas um artigo foi identificado até o momento abordando sua relação com a resistência a fungos (YANG et al., 2023). Na literatura, seu emprego tem sido em grande parte direcionado para pesquisas relacionadas à resistência a insetos (WU et al., 2015) e estresses abióticos, como salinidade (PI et al., 2009; WU et al., 2011; ZHAO et al., 2014) e estresse oxidativo (WANG; LIU; XIN, 2015).

Altos níveis de ácido salicílico (SA), que muitas vezes levam à reação de hipersensibilidade, são regulados por outras proteínas, como as Lipocalinas, envolvidas

na modulação da tolerância ao estresse oxidativo, as quais já mostraram atuar como sequestradores de moléculas potencialmente nocivas, conhecidas por serem induzidas por estresse de temperatura extrema e luz excessiva (CHARRON et al., 2008; ZINOVIEVA et al., 2011). Assim como para o gene *AsAOC3*, as pesquisas relacionadas ao gene *AsTIL* são limitadas, com sua ênfase voltada para estresses abióticos (ABO-OGIALA et al., 2014; HE et al., 2015; HUANG et al., 2021; WU; ZHAO, 2023). Embora a literatura até o momento não apresente estudos específicos sobre a interação do gene *AsTIL* com patógenos, é imperativo reconhecer a importância de realizar testes direcionados a esses agentes. O conhecimento atual sobre o gene, mesmo centrado em respostas a estresses abióticos, sugere a necessidade de explorar sua possível contribuição para a resistência a patógenos, mais especificamente, resistência a *S. sclerotiorum*.

Estilbeno Sintase (STS) é responsável pela síntese da fitoalexina resveratrol e desempenha um papel crucial na defesa das plantas contra uma ampla gama de estresses abióticos e bióticos (VALLETTA; IOZIA; LEONELLI, 2021). A produção ectópica de resveratrol não apenas confere resistência de amplo espectro contra fungos em linhagens transgênicas, mas também potencializa as atividades antioxidantes em diversas frutas, destacando a importância intrínseca desse composto no controle de doenças de plantas (DELAUNOIS et al., 2009). Nesse cenário, uma série de estudos tem sido conduzida explorando o potencial de STS para fortalecer as defesas das plantas (COUTOS-THÉVENOT et al., 2001; DABAUZA et al., 2015; GIORCELLI et al., 2004; HAIN et al., 1993; KOBAYASHI et al., 2000; LECKBAND; LÖRZ, 1998; XU et al., 2019; ZHANG et al., 2023; ZHU et al., 2004). No entanto, apesar do vasto conjunto de pesquisas que abordam a resistência a patógenos em plantas expressando STS, pouca atenção tem sido dedicada ou está disponível na literatura quanto à resposta dessas plantas a *S. sclerotiorum*. A ausência de informações destaca uma área de pesquisa significativa e, embora haja uma compreensão considerável sobre os benefícios gerais proporcionados por este gene, a falta de informações específicas sobre a interação com *S. sclerotiorum* destaca a necessidade premente de investigações mais detalhadas.

O tabaco (*Nicotiana tabacum*) é amplamente utilizado como planta modelo para a validação funcional de genes devido a características vantajosas, incluindo um ciclo de vida curto de aproximadamente seis meses, facilidade de cultivo *in vitro* e em casa de vegetação, bem como uma alta taxa de transformação e regeneração de plantas transgênicas (HORSCH et al., 1985). Além disso, o tabaco é suscetível a diversos

patógenos, possibilitando uma variedade de estudos de resistência (HUANG; RUSSELL, 1992), possui fácil manuseio e se adapta bem a climas tropicais, o que contribui para a facilidade de cultivo e a disponibilidade contínua de plantas para experimentação ao longo do ano. Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo avaliar *in planta* os efeitos da superexpressão de três genes candidatos (*AsAOC3*, *AsTIL* e *AsSTS4*) na resistência ao fungo causador do mofo branco em plantas transgênicas de tabaco.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*; cultivar ‘Xanthi’) superexpressando cada um dos três genes candidatos (*AsAOC3*, *AsTIL* e *AsSTS4*) foram previamente obtidas pela equipe da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Embrapa/Cenargen). Os três genes candidatos foram identificados a partir da análise do transcriptoma da espécie silvestre de *A. stenosperma* submetidas a diferentes tipos de estresses bióticos e abióticos (GUIMARAES et al., 2015; MARTINS et al., 2022; MORGANTE et al., 2013). Posteriormente, as sequências codantes dos genes *AsAOC3* (750 pb; (GUIMARAES et al., 2015)) e *AsTIL* (558 pb; (PEREIRA et al., 2019)) foram clonadas no sítio de restrição XhoI do vetor binário pPZP-HIGRO (CHU et al., 2014) sob o controle do promotor de actina 2 de *Arabidopsis thaliana* (ACT-2) e do terminador de nopalina sintase (NOS) de *Agrobacterium tumefaciens*. O vetor pPZP-HIGRO também possui dois cassetes adicionais para a expressão constitutiva em plantas do gene repórter que codifica a proteína Verde Fluorescente (eGFP) e do gene marcador de seleção Higromicina Fosfotransferase (hpt). A sequência codante do gene *AsSTS4* (1.173 pb; (BRASILEIRO et al., 2023)) foi clonada no mesmo cassete de expressão do vetor binário pPZP-BAR (MOTA et al., 2021), derivado de pPZP-HIGRO, no qual o gene de resistência à Higromicina foi substituído pelo gene bar de *Streptomyces hygrosopicus* para resistência ao herbicida glufosinato de amônio.

Os vetores binários pPZP-HIGRO e pPZP-BAR contendo as sequências clonadas dos genes *AsAOC3*, *AsTIL* e *AsSTS4* foram então introduzidas na cepa desarmada ‘GV3101’ de *Agrobacterium tumefaciens* usando o protocolo de eletroporação padrão (LACORTE; ROMANO, 2015). Colônias transformadas foram selecionadas e

usadas para gerar tabaco transgênico baseado no protocolo de transformação de plantas-modelo via *Agrobacterium* spp.

Crescimento de plantas de *N. tabacum*

Sementes em geração T1 de tabaco, superexpressando seus respectivos genes, foram desinfestadas com gás cloro, que consiste em dispor as sementes em placas de Petri e manter em dessecador para desinfestação por uma hora. O gás é produzido pela adição de 500 µl de ácido clorídrico em cinco ml de hipoclorito de sódio comercial 2,0%. Após a exposição ao gás, as placas foram transferidas para um fluxo laminar, onde permaneceram abertas por 30 minutos para liberação do gás. Em seguida, as sementes foram semeadas *in vitro* em meio de cultura para plantas MS sólido (1X; (MURASHIGE T; SKOOG F, 1962)) contendo sacarose 3% (p/v). Para plantas transformadas com os genes *AsAOC3* e *AsTIL* (vetor pPZP-HIGRO), realizou-se o plantio das sementes em meio adicionado do antibiótico Higromicina (20 mg/ml) e, após cerca de 15 dias, realizou-se o transplante das plântulas selecionadas. Para plantas transformadas com o gene *AsSTS4* (vetor pPZP-BAR), realizou-se o plantio das sementes em potes de 200 ml contendo substrato (Carolina Soil; Carolina Soil Company) e, logo após a emergência das plântulas, cerca de um mês após o plantio, realizou-se a aplicação do herbicida glufosinato de amônio na concentração de 200 mg/l em três aplicações com intervalo de um dia a cada aplicação. Após uma semana, as plântulas que sobreviveram às aplicações, ou seja, as plântulas selecionadas, foram transplantadas. Todas as plântulas germinadas foram visualizadas quanto à expressão da proteína Verde Fluorescente (GFP) em microscópio óptico de fluorescência (AxioPhot; Zeiss, Oberkochen, Alemanha). As plantas foram mantidas em câmara de crescimento com condições controladas (25 ± 2 °C; fotoperíodo de 12 h; intensidade de luz de $120 \mu\text{mols/m}^2/\text{s}^1$).

Um total de 14 linhagens GFP-positivas foram selecionadas para os bioensaios, sendo: cinco linhagens independentes superexpressando (OE; “overexpressing”) o gene *AsAOC3* (AOC-OE-5, OE-6, OE-7, OE-10 e OE-11) e o gene *AsTIL* (TIL-OE-1, OE-3, OE-4, OE-5 e OE-7) e quatro linhagens OE do gene *AsSTS4*, (STS-OE-1, OE-5, OE-6 e OE-10). Foram selecionadas cinco plântulas GFP-positivas por linhagem que foram transplantadas para vasos de 500 ml, contendo uma mistura de solo e substrato (2:1) e mantidas em câmara de crescimento nas condições acima descritas. Para controle

negativo, sementes de tabaco não-transgênico (“wild-type”; WT) foram semeadas em substrato e transplantadas para a mistura de solo e substrato juntamente com as linhagens OE.

Isolado de *S. sclerotiorum*

O isolado “CMES 1795” de *S. sclerotiorum* é proveniente de uma área de produção de soja (*Glycine max*) em Palmeira (PR), onde foi coletado de uma haste de planta infectada e mantido armazenado no Laboratório de Engenharia Genética Aplicada à Agricultura Tropical da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Inoculação de folhas destacadas com *S. sclerotiorum*

O isolado “CMES 1795” de *S. sclerotiorum* foi cultivado em placas de Petri contendo meio batata dextrose ágar (BDA) a 25 °C por 72 horas. Os bioensaios de folhas destacadas de tabaco foram realizados usando dois discos de micélio (5 mm de diâmetro) cortados, com o auxílio de um perfurador de couro em aço, da borda da colônia em crescimento e aplicados à superfície adaxial da folha totalmente expandida destacada de cada uma das linhagens OE de tabaco e do controle WT. Duas folhas destacadas por planta (cinco plantas por linhagem OE e WT) foram inoculadas, sendo cada disco micelial representando um inóculo padronizado em termos de quantidade e agressividade (PERCHEPIED et al., 2010). No processo de inoculação, utilizou-se dois palitos autoclavados para retirada do disco da placa que posteriormente foi colocado sobre a folha com a parte do micélio voltada para baixo para o correto contato com a folha.

As folhas destacadas foram colocadas em placas de Petri (23x23cm) contendo papel de filtro úmido e mantidas a 22 °C no escuro. Para cada genótipo de plantas (linhagens OEs AOC; TIL e STS) foram realizados dois bioensaios utilizando as mesmas plantas com intervalo de sete dias entre um experimento e outro.

Para registro das imagens das folhas inoculadas, um estúdio foi confeccionado utilizando-se placas de MDF (*Medium Density Fiberboard*) (Figura 1). O mesmo conta com um suporte para colocação do aparelho celular e uma luz circular, a qual permite que as imagens sejam captadas em uma mesma intensidade de luz e distância, mantendo-se

um padrão. As placas contendo folhas inoculadas foram fotografadas a cada 12 horas iniciando-se em zero horas após inoculação (HAI), se estendendo até 48 ou 60 HAI.

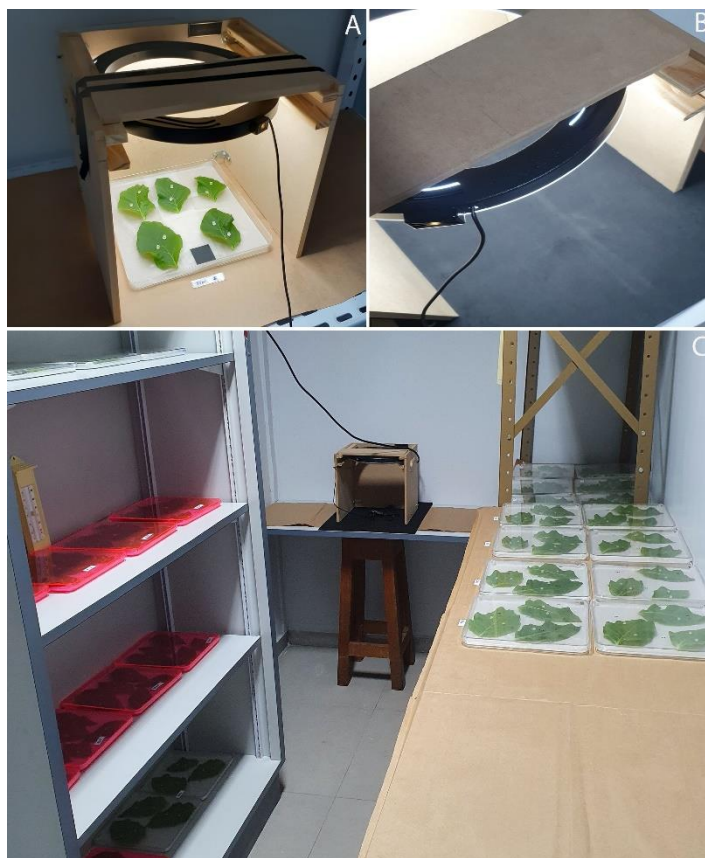


Figura 1. Estúdio montado para registro das placas. A) Placa contendo folhas inoculadas posicionada no estúdio. B) Luz circular utilizada para manter um padrão de iluminação das fotos. C) Sala escura utilizada para realização dos bioensaios.

Análise dos bioensaios

Para analisar as imagens geradas ao longo dos bioensaios, utilizou-se o software Photoshop (versão CC; sistemas Adobe), o qual, por meio da seleção da área desejada, determina a quantidade de pixels existente. Assim, para cada placa, em seu respectivo horário de registro, a área lesionada de cada folha foi medida, gerando a contagem do número de pixels na área da lesão necrótica. Após análise de todas as imagens, a área média e o desvio padrão da lesão foi calculada e avaliada estatisticamente pelo teste t de Student ($p < 0,05$). Para a análise entre experimentos, as médias do controle (WT) para os três experimentos (duas repetições cada) a 48 HAI foram submetidas a análise de variância (ANOVA) utilizando o software R para comparação de médias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Folhas destacadas de plantas de tabaco superexpressando os transgenes *AsAOC3*, *AsTIL* e *AsSTS4*, e seus respectivos controles não-transgênicos (WT), foram inoculadas com *S. sclerotiorum* e analisadas a cada 12 horas após inoculação (HAI), utilizando-se o estúdio (Figura 1) criado pelo grupo para o registro das imagens e acompanhamento do desenvolvimento da infecção. O estúdio mostrou-se eficiente e contribuiu de forma significativa para a padronização das imagens, proporcionando uniformidade no momento da avaliação.

Foi observado que para as cinco linhagens OE *AsAOC3* (AOC-OE-5, OE-6, OE-7, OE-10 e OE-11) não houve diferença significativa no progresso da doença em relação às folhas WT ao longo de 48 HAI (Figura 2). Nenhuma diferença significativa também foi observada entre as cinco linhagens OE *AsTIL* (TIL-OE-1, OE-3, OE-4, OE-5 e OE-7) e o controle WT (Figura 3). Das quatro linhagens OE *AsSTS4* (STS-OE-1, OE-5, OE-6 e OE-10) testadas, apenas a linhagem STS-OE-6 apresentou uma taxa de redução de aproximadamente 2% que, quando submetida ao teste t, não se mostrou significativa comparada ao controle não-transgênico, assim como os demais genes (Figura 4). Portanto, constatou-se que para os três genes testados não houve um retardo significativo no progresso da doença em relação ao controle (Figuras 2, 3 e 4).

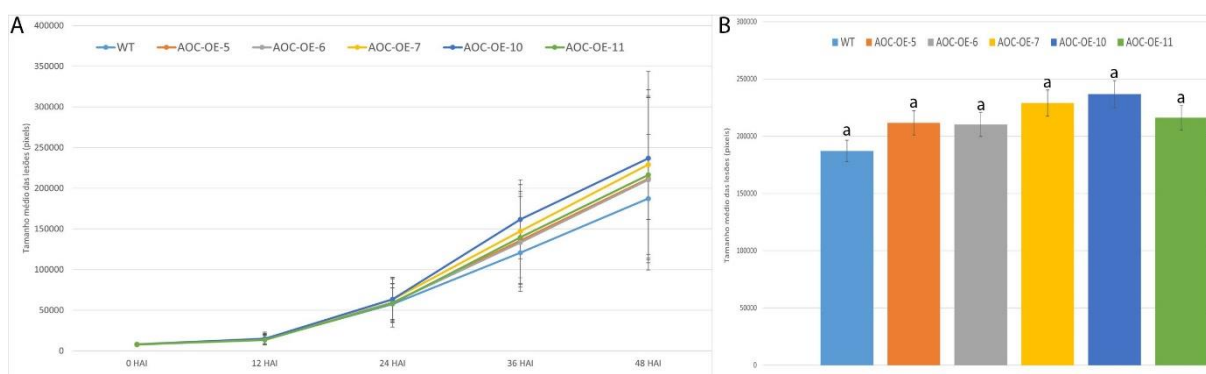


Figura 2. Análise das áreas necróticas causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* e do progresso da doença nas linhagens transgênicas de tabaco *AsAOC3* e no controle não transformado (WT) testado. A) Progresso da doença até 48 HAI com base na área de lesões fúngicas necróticas (pixels). B) Tamanhos das lesões (números de pixels) de *S. sclerotiorum* em linhagens transgênicas (OE) em relação ao WT. As letras iguais indicam

que não há diferença significativa nos tamanhos das lesões entre as linhagens de tabaco transgênico.

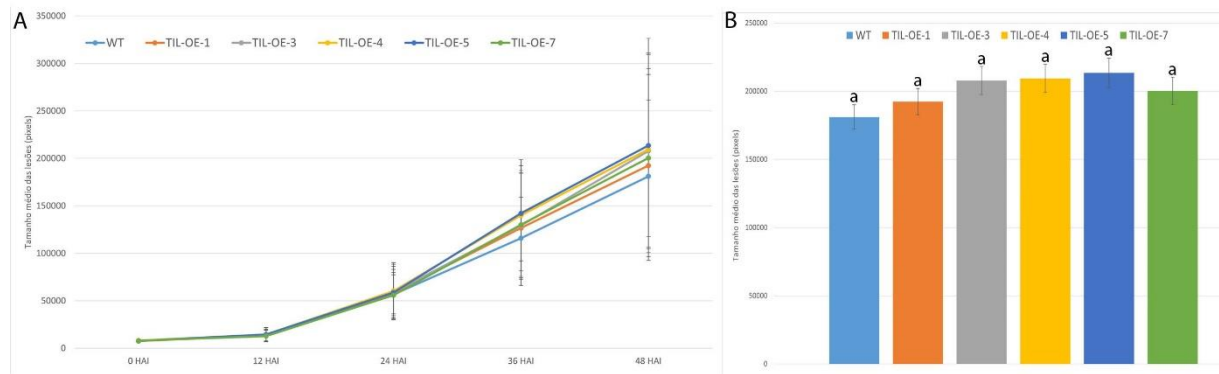


Figura 3. Análise das áreas necróticas causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* e do progresso da doença nas linhagens transgênicas de *AsTIL* e no controle não transformado (WT) testado. A) Progresso da doença até 48 HAI com base na área de lesões fúngicas necróticas (pixels). B) Tamanhos das lesões (números de pixels) de *S. sclerotiorum* em linhagens transgênicas (OE) em relação ao WT. As letras diferentes indicam diferença significativa nos tamanhos das lesões entre as linhagens de tabaco transgênico.

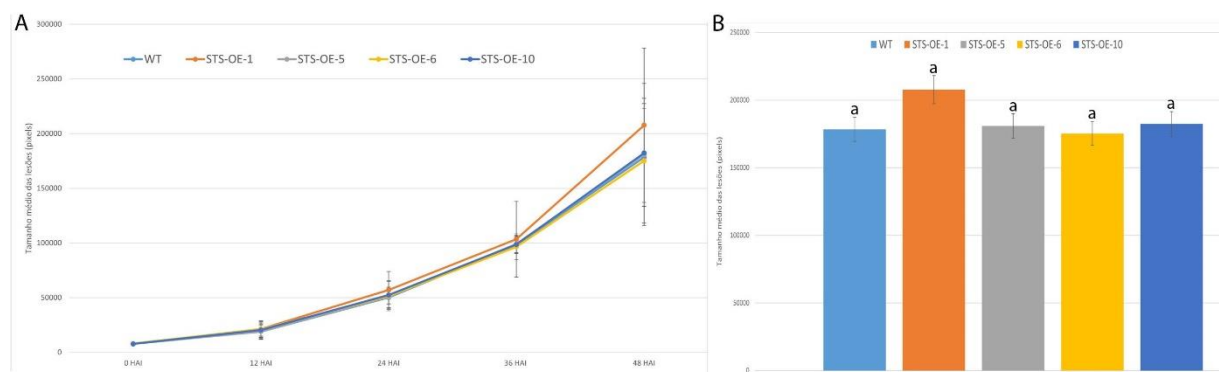


Figura 4. Análise das áreas necróticas causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* e do progresso da doença nas linhagens transgênicas de *AsSTS4* e no controle não transformado (WT) testado. A) Progresso da doença até 48 HAI com base na área de lesões fúngicas necróticas (pixels). B) Tamanhos das lesões (números de pixels) de *S. sclerotiorum* em linhagens transgênicas (OE) em relação ao WT. As letras iguais indicam que não há diferença significativa nos tamanhos das lesões entre as linhagens de tabaco transgênico.

Embora a superexpressão dos transgenes *AsAOC3*, *AsTIL* e *AsSTS4* não tenha induzido uma redução significativa da infecção pelo fungo (Figuras 5, 6 e 7), os

bioensaios realizados permitiram otimizar o protocolo de infecção de folhas destacadas de tabaco nas nossas condições de laboratório. Assim, um protocolo simples, rápido e confiável foi estabelecido em tabaco para pré-seleção de genes candidatos submetidos a infecção pelo fungo causador do mofo branco. Este protocolo já havia sido descrito por outras equipes para tabaco (ANDRADE et al., 2016; FAN et al., 2021; PENG et al., 2021; WALZ et al., 2008; YANG et al., 2018; ZHANG et al., 2018) assim como para outras espécies suscetíveis a *S. sclerotiorum* (CUNHA et al., 2010; DURA et al., 2021; JIANG et al., 2020; KAMVAR et al., 2017; KULL et al., 2003; LIMA et al., 2022; NA et al., 2018; WANG et al., 2014; YANG et al., 2020). O protocolo de inoculação em si não apresentou grandes modificações comparado aos que já foram descritos anteriormente para tabaco, porém é relevante enfatizar que a abordagem metodológica adotada na aquisição das imagens, mediante utilização do estúdio (Figura 1), conferiu uma significativa contribuição às análises, permitindo a obtenção de um padrão qualitativo constante das imagens durante todo o período de execução dos experimentos.

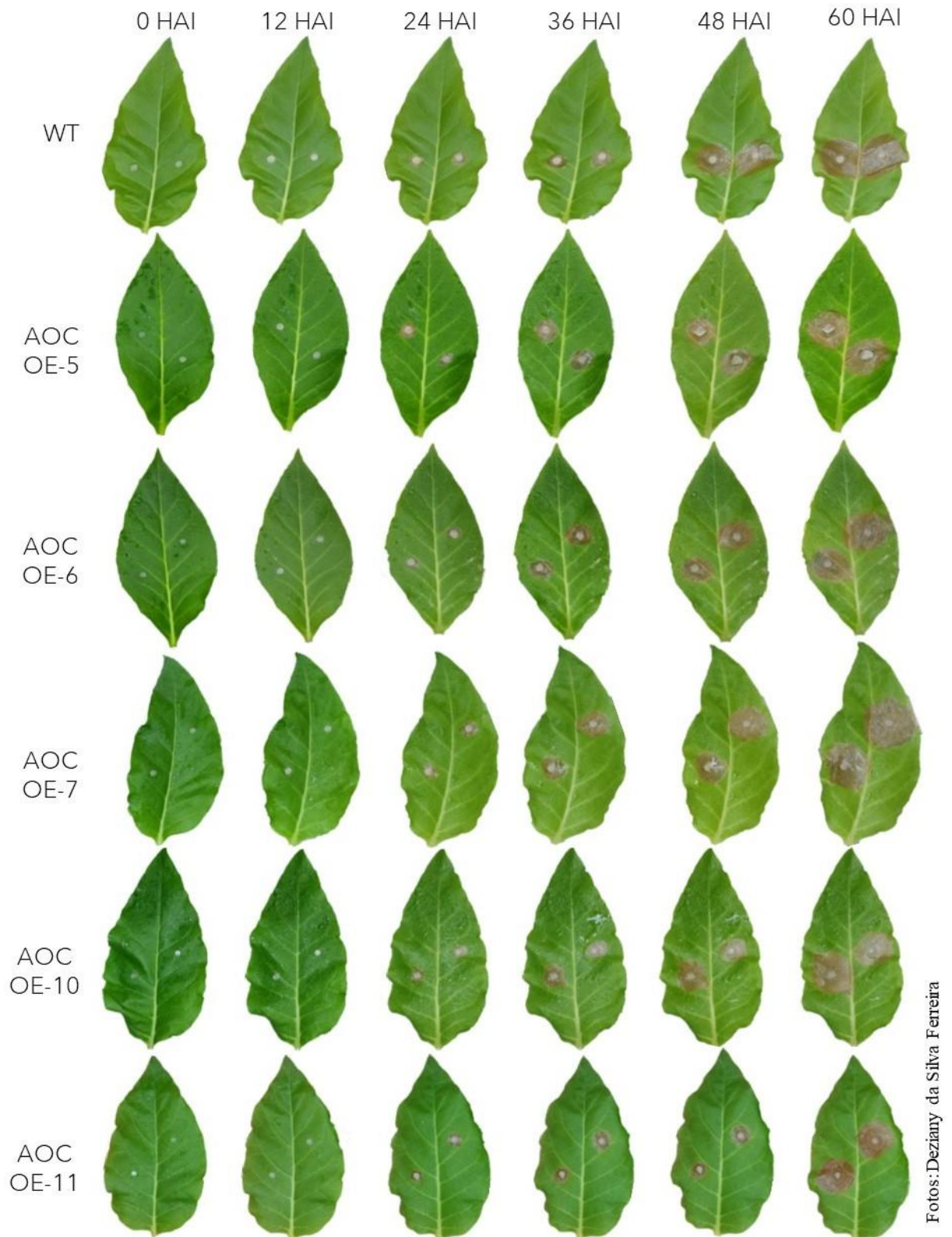
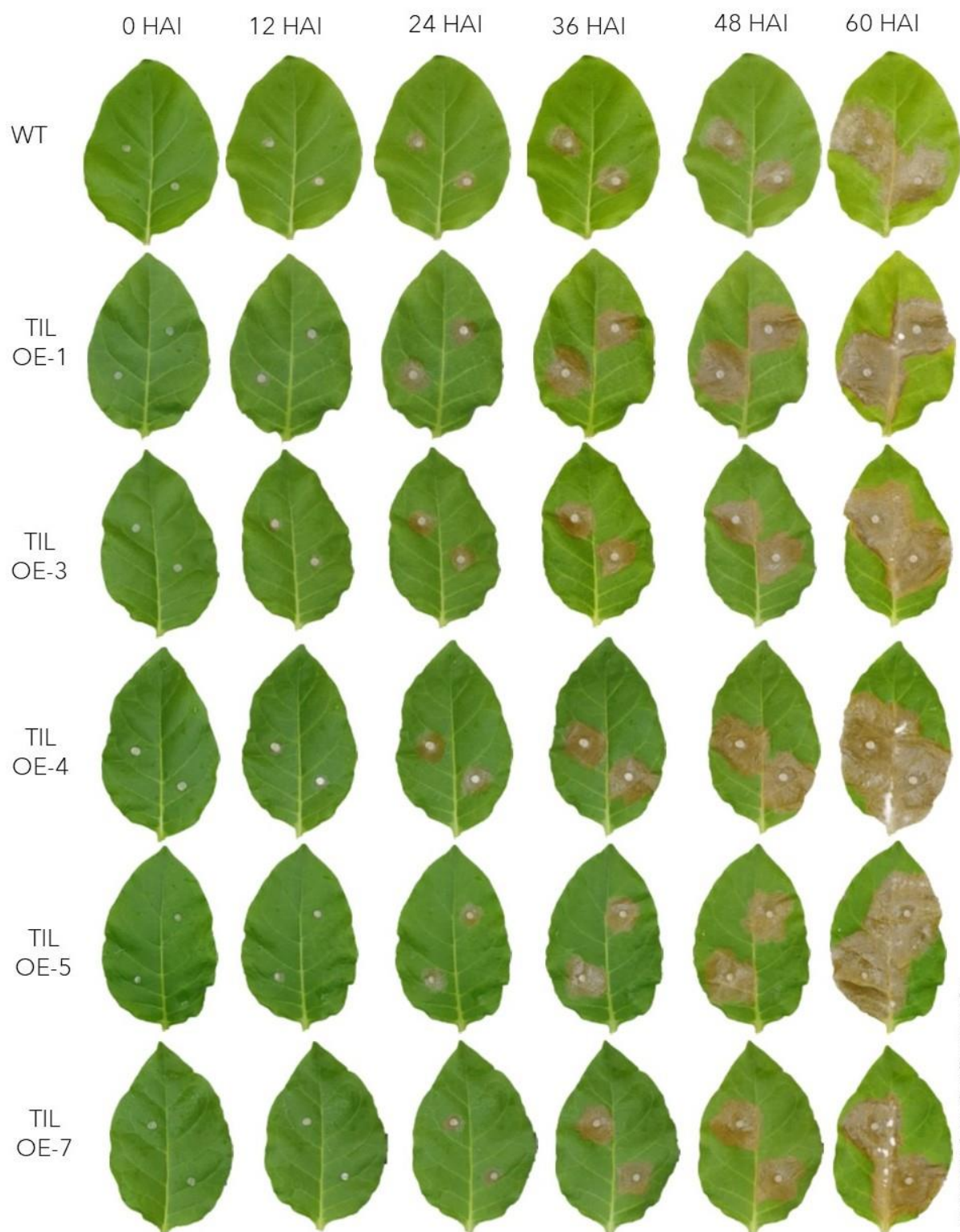


Figura 5. Progresso da infecção por *Sclerotinia sclerotiorum* em folhas destacadas de cinco linhagens de tabaco superexpressando o transgene *AsAOC3* (AOC-OE-5, OE-6, OE-7, OE-10 e OE-11) e folhas de plantas não-transgênicas (WT), analisadas em 0, 12, 24, 36, 48 e 60 horas após inoculação (HAI).



Fotos: Deiziany da Silva Ferreira

Figura 6. Progresso da infecção por *Sclerotinia sclerotiorum* em folhas destacadas de cinco linhagens de tabaco superexpressando o transgene *AsTIL* (TIL-OE-1, OE-3, OE-4, OE-5 e OE-7) e folhas de plantas não-transgênicas (WT), analisadas em 0, 12, 24, 36, 48 e 60 horas após inoculação (HAI).

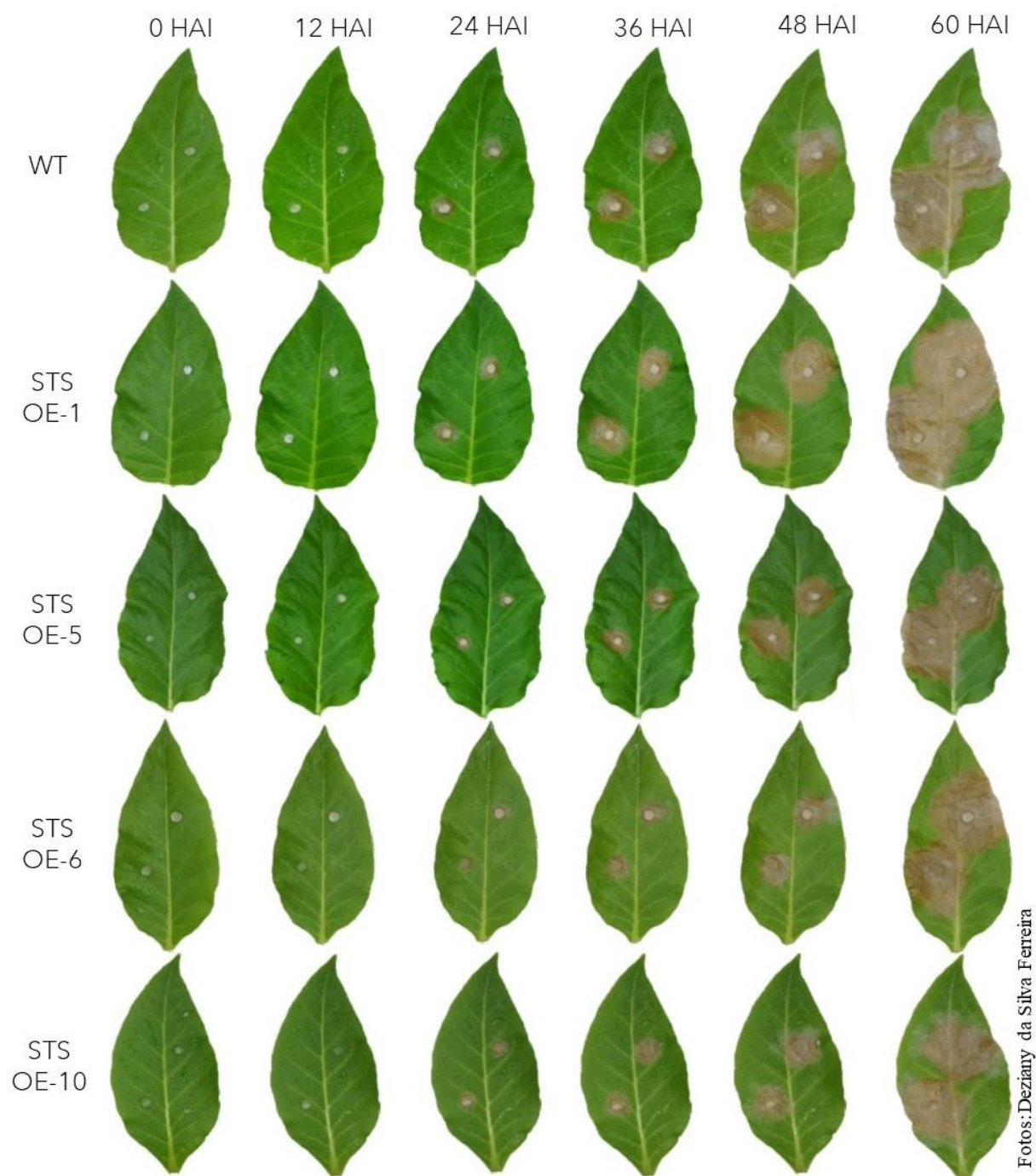


Figura 7. Progresso da infecção por *Sclerotinia sclerotiorum* em folhas destacadas de quatro linhagens de tabaco superexpressando o transgene *AsSTS4* (STS-OE-1, OE-5, OE-6 e OE-10) e folhas de plantas não-transgênicas (WT), analisadas em 0, 12, 24, 36, 48 e 60 horas após inoculação (HAI).

Observou-se uma padronização com relação à infecção das folhas WT, isto é, para os seis experimentos realizados (dois experimentos por genótipo) as folhas WT,

utilizadas como controle, se comportaram de maneira semelhante quanto a infecção de *S. sclerotiorum* (Figura 8A). Isto pôde ser confirmado a partir da análise de variância (ANOVA), que mostrou não haver diferença significativa entre as médias dos experimentos a 48 horas após inoculação $Pr(>F)$ (0.921) (Figura 8B). Estes resultados demonstram que a metodologia utilizada é reprodutível e está bem estabelecida.

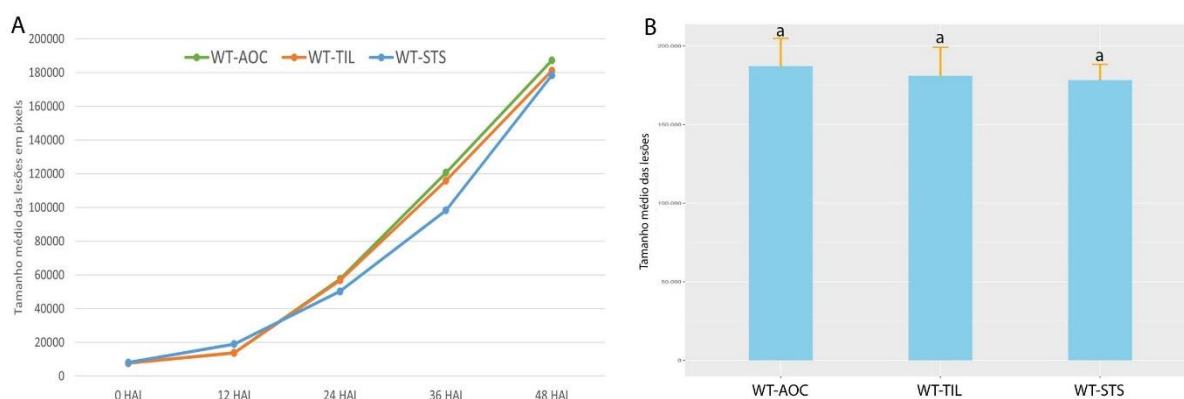


Figura 8. Valores médios das lesões em pixels dos controles de tabaco não-transgênicos (WT) dos dois bioensaios (repetições biológicas) realizados para cada um dos genótipos transgênicos: *AsAOC3* (WT-AOC), *AsTIL* (WT-TIL) e *AsST54* (WT-ST5). A) Tamanho médio das lesões em pixels até 48 HAI. B) Comparação das médias em pixels dos controles WT (WT-AOC, WT-TIL e WT-ST5) realizados em duas repetições biológicas em 48 HAI, indicando que não há diferença significativa entre os WT dos três experimentos, com base na análise de variância (ANOVA). As letras iguais indicam que não há diferença significativa nos tamanhos das lesões.

A seleção de genes candidatos para resistência a patógenos em ensaios de campo apresentam alguns desafios, que incluem a falta de uniformidade do inóculo no local experimental, a necessidade de uma área específica para os ensaios e a dependência de condições ambientais adequadas para a progressão da doença, como umidade e temperatura (ANTWI-BOASIAKO et al., 2021). Estes problemas são acentuados quando os ensaios são realizados em plantas geneticamente modificadas (PGMs) que necessitam de toda uma infraestrutura e protocolos específicos para atender as normas de biossegurança, que incluem potenciais riscos ambientais, tais como possibilidade de fluxo gênico, efeitos adversos em organismos não-alvo, resistência em plantas daninhas e insetos, entre outros (KUMAR et al., 2020). Tais desafios, fazem com que a utilização de

ambientes controlados seja uma opção preferencial na execução de ensaios de resistência a patógenos, em particular para PGMs (KAMVAR et al., 2017).

Por outro lado, alguns estudos indicam diferenças significativas entre ensaios de resistência a patógenos realizados em condições a campo e em ambiente controlado e mostram que os resultados vindos de ensaios de campo se apresentam mais confiáveis e robustos (HOFFMAN et al., 2002; KANDEL et al., 2018; MOELLERS et al., 2017). Em contrapartida, ensaios realizados em ambiente controlado utilizando a técnica de folha destacada mostram uma correlação positiva quando comparados estudos realizados a campo para resistência (GUO et al., 2016; NOWAKOWSKA et al., 2014; TWIZEYIMANA et al., 2007).

A utilização da técnica de folhas destacadas promove ensaios rápidos, de baixo custo, com boa reprodutibilidade, e é amplamente usada para triagem de genótipos resistentes a diversos patógenos e insetos. Bioensaios com folhas destacadas permitem uma grande amostragem aumentando assim a precisão das análises estatísticas. Além do que, riscos de resultados ambíguos devido à coinfeção de diversos patógenos, danos causados por insetos ou fatores abióticos são significativamente menores em ensaios em condições controladas do que aqueles a campo (AREGBESOLA et al., 2020). Em geral, os métodos de triagem devem garantir resultados confiáveis, evidenciar poder discriminatório e serem eficazes em relação ao tempo e custo, permitindo uma pré-seleção efetiva dos genótipos mais promissores (KULL et al., 2003; MIORINI et al., 2019).

A realização de ensaios de folhas destacadas em um ambiente controlado supera as limitações inerentes às avaliações de campo e de casa de vegetação com plantas inteiras. Esse cenário proporciona avaliações mais uniformes, aprimorando tanto a quantidade quanto a homogeneidade das amostras avaliadas. Alguns estudos apontam que os métodos de inoculação utilizando apenas partes das plantas, como folhas destacadas, caules e pecíolos e raízes, fornecem informações úteis sobre a resistência de genótipos a *S. sclerotiorum*, contudo, a resistência identificada pelos métodos de inoculação deve ser confirmada com testes a campo, uma vez que estes métodos podem classificar erroneamente a resistência de algumas cultivares (KIM et al., 2000).

Apesar do gene *AsAOC3* ser um candidato promissor na resistência a doenças, o conhecimento sobre o mesmo ainda é limitado. Ao revisar extensivamente a literatura disponível, destaca-se que apenas um estudo encontrado até o momento, explorando sua relação com a resistência a doenças (YANG et al., 2023). Curiosamente, apenas um

deses estudos abordou a resistência a fungos, mostrando que plantas transgênicas de *Medicago truncatula* Gaerth. superexpressando o gene *MfAOC2* isolado de *Medicago sativa* subsp. *falcata* L. apresentavam tolerância ao frio e resistência ao patógeno fúngico *Rhizoctonia solani* (YANG et al., 2023). A utilização desse gene na pesquisa tem sido predominantemente voltada para estudos relacionados à resistência a insetos e a estresses abióticos, como salinidade e estresse oxidativo. Um exemplo é o estudo de Wu et al. (2011), que revelou que a superexpressão de *GmAOC1* e *GmAOC5* de soja em plantas de tabaco transgênicas resultou em um aumento na tolerância à salinidade e ao estresse oxidativo, respectivamente. Da mesma forma, Liu et al. (2015) demonstraram que a superexpressão de *AhAOC* do amendoim no arroz promoveu aumento no alongamento da raiz e na altura da planta, além de melhorar a tolerância à salinidade. Outros estudos também indicam a eficácia do gene em conferir resistência a diferentes condições. Wang; Liu; Xin, (2015), ao estudar plantas transgênicas de *Arabidopsis* superexpressando *GhAOC1* do algodão sob estresse de cobre, observaram significativa taxa de sobrevivência, redução nos danos à membrana celular e peroxidação lipídica. Além disso, linhagens transgênicas superexpressando *GmAOC3* da soja mostraram notável resistência a lagartas, apresentando menor dano comparado às plantas controle, e uma redução significativa na taxa de crescimento relativo das lagartas alimentadas com folhas das linhagens transgênicas em comparação com as alimentadas com folhas das plantas controle (WU et al., 2015). Há uma lacuna na literatura quanto aos estudos relacionados à resistência a fungos. Notavelmente, uma busca aprofundada revelou a ausência de estudos relevantes associando o gene *AOC* à resistência a *Sclerotinia sclerotiorum*. Esta lacuna destaca uma área de pesquisa potencialmente crucial, uma vez que a resistência a fungos, especialmente a *Sclerotinia sclerotiorum*, continua sendo um desafio significativo na agricultura (O'SULLIVAN; BELT; THATCHER, 2021).

As Lipocalinas desempenham um papel importante na modulação da tolerância ao estresse oxidativo, especialmente aquelas induzidas por estresse de temperatura. Embora a literatura, até o momento, não ofereça *insights* detalhados sobre a relação do gene com patógenos, sua ênfase em respostas a estresses abióticos sugere a importância de se explorar sua contribuição para a resistência a patógenos, em particular, a *S. sclerotiorum*. Estudos envolvendo plantas transgênicas de tabaco superexpressando o gene *MfTILI* isolado de alfafa revelaram tolerância ao frio e estresse oxidativo, destacando a eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a regulação positiva da

expressão de múltiplos genes responsivos ao frio (HE et al., 2015). De maneira semelhante, a superexpressão do gene *EuTIL1* de *Eucommia ulmoides* Oliv. em plantas de tabaco resultou em aumento da tolerância ao frio, associado ao incremento das atividades da superóxido dismutase, catalase e peroxidase (WU; ZHAO, 2023). Embora existam avanços promissores relacionados à Lipocalina em respostas a estresses abióticos, destaca-se a ausência de pesquisas associando-a a patógenos fúngicos. Similarmente ao gene *AsAOC3*, onde a escassez inicial de pesquisas não impediu conduzir estudos específicos para compreender interações com patógenos, enfatiza-se a necessidade de investigações adicionais sobre a *AsTIL*. Explorar seu potencial papel na resistência a patógenos fúngicos, como *S. sclerotiorum*, pode fornecer dados valiosos para o desenvolvimento de estratégias eficazes de proteção das plantas contra ameaças bióticas. A lacuna existente nesse conhecimento vislumbra uma importante área de pesquisa que merece atenção para avançar na compreensão dos mecanismos de defesa das plantas, contribuindo assim para avanços significativos na agricultura sustentável.

O crescente interesse nos estudos de Estilbeno Sintase (STS) é motivado não apenas por suas notáveis capacidades antioxidantes e antitumorais aos seres humanos, mas também por suas propriedades antimicrobianas, atuando como um aleloquímico ou fitoalexina em plantas (HALLS; YU, 2008; JEANDET et al., 2013). HAIN et al. (1993) deram início aos primeiros estudos de superexpressão de dois genes STS da videira (*Vst1* e *Vst2*) em plantas de tabaco e demonstraram uma maior resistência à infecção por *Botrytis cinerea*. Avançando nesse contexto, Dabauza et al. (2015) observaram que videiras transgênicas com o gene *Vst1* apresentaram aumento da resistência contra o patógeno necrotrófico *B. cinerea*, com lesões consistentemente menores em comparação com plantas controle. Em outro cenário, plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* superexpressando *VpSTS29/STS2* de videira demonstraram aumento do acúmulo de resveratrol, associado a reações de hipersensibilidade locais, inibição do crescimento micelial e redução da incidência de *Golovinomyces cichoracearum* (DC.) V. P. Heluta, fungo causador de oídio (XU et al., 2019).

Aqui, o gene *AsSTS4* não demonstrou redução significativa na infecção pelo fungo *S. sclerotiorum*, um resultado consistente com a observação de Giorcelli et al. (2004), em que plantas transgênicas de álamo branco, superexpressando o gene *StSy* de videira, não apresentaram aumento de resistência contra o patógeno *Melampsora pulcherrima* Maire, causador da ferrugem, em bioensaios *in vitro*. Da mesma forma,

Kobayashi et al. (2000) evidenciaram que a superexpressão de três genes da videira no Kiwi não conferiu resistência ao patógeno *Botrytis cinerea*, causador da doença do mofo cinzento. Além disso, ao avaliar o efeito inibitório dos Estilbenos no crescimento fúngico de três patógenos da cultura da soja, incluindo *S. sclerotiorum*, por meio de testes *in vitro*, Lygin et al. (2014) demonstraram que *S. sclerotiorum* conseguiu retomar seu crescimento após uma inicial inibição pelo resveratrol, quando sua concentração foi reduzida nas culturas devido à degradação. Essa série de resultados contraditórios aponta para a complexidade do controle de patógenos por meio de plantas transgênicas STS, ressaltando sua natureza empírica e a falta de previsibilidade em certas interações patógeno-planta.

CONCLUSÕES

A superexpressão dos transgenes *AsAOC3*, *AsTIL* e *AsSTS4* não conferiu redução significativa no progresso da doença causada por *S. sclerotiorum* quando comparado ao controle não-transgênico (WT). A inoculação de folhas destacadas de tabaco com o fungo *S. sclerotiorum* fornece resultados confiáveis e reprodutíveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABO-OGIALA, A. et al. Temperature-induced lipocalin (TIL) is translocated under salt stress and protects chloroplasts from ion toxicity. **Journal of Plant Physiology**, v. 171, n. 3–4, p. 250–259, 2014.
- ADAMS, P. B.; AYERS, W. A. Ecology of *Sclerotinia* Species. **The American Phytopathology Society**, 1979.
- AMSELEM, J. et al. Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. **PLoS Genetics**, v. 7, n. 8, 2011.
- ANDRADE, C. M. et al. Host-induced gene silencing in the necrotrophic fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Pathology**, v. 65, n. 4, p. 626–632, 2016.
- ANTWI-BOASIAKO, A. et al. Progress towards germplasm evaluation and genetic improvement for resistance to *Sclerotinia* white mold in soybean. **Euphytica**, v. 217, n. 9, p. 178, 2021.
- AREGBESOLA, E. et al. A detached leaf assay to rapidly screen for resistance of maize to *Bipolaris maydis*, the causal agent of southern corn leaf blight. **European Journal of Plant Pathology**, v. 156, n. 1, p. 133–145, 2020.
- BALLÉN-TABORDA, C. et al. Validation of resistance to root-knot nematode incorporated in peanut from the wild relative *Arachis stenosperma*. **Agronomy Journal**, v. 113, n. 3, p. 2293–2302, 2021.

- BOLAND, G. J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 16, n. 2, p. 93–108, 1994.
- BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J.; NELSON, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, v. 7, n. 1, p. 1–16, 2006.
- BRASILEIRO, A. C. M. et al. Ectopic expression of an expansin-like B gene from wild *Arachis* enhances tolerance to both abiotic and biotic stresses. **The Plant Journal**, v. 107, n. 6, p. 1681–1696, 2021.
- BRASILEIRO, A. C. M. et al. The stilbene synthase family in arachis: a genome-wide study and functional characterization in response to stress. **Genes**, v. 14, n. 12, p. 2181, 2023.
- BRASILEIRO, M. et al. Genomics and genetic transformation in *Arachis*. **International Journal of Plant Biology**, v. 2, n. 3, p. 1017, 2014.
- CARMO, L. S. T. et al. Comparative proteomics and gene expression analysis in *Arachis duranensis* reveal stress response proteins associated to drought tolerance. **Journal of Proteomics**, v. 192, p. 299–310, 2019.
- CHAMBERLIN, K. D.; PUPPALA, N. Genotyping of the valencia peanut core collection with a molecular marker associated with *Sclerotinia* blight resistance. **Peanut Science**, v. 45, n. 1, p. 12–18, 2018.
- CHARRON, J.-B. F. et al. The plant apolipoprotein D ortholog protects *Arabidopsis* against oxidative stress. **BMC Plant Biology**, v. 8, n. 1, p. 86, 2008.
- CHU, Y. et al. A Technique to study *Meloidogyne arenaria* resistance in *Agrobacterium rhizogenes*-transformed peanut. **Plant Disease**, v. 98, n. 10, p. 1292–1299, 2014.
- COUTOS-THÉVENOT, P. et al. In vitro tolerance to *Botrytis cinerea* of grapevine 41B rootstock in transgenic plants expressing the stilbene synthase *Vst1* gene under the control of a pathogen-inducible PR 10 promoter. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, n. 358, p. 901–910, 2001.
- CUNHA, W. G. et al. High resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in transgenic soybean plants transformed to express an oxalate decarboxylase gene. **Plant Pathology**, v. 59, n. 4, p. 654–660, 2010.
- DABAUZA, M. et al. Enhanced resistance to *Botrytis cinerea* in genetically-modified *Vitis vinifera* L. plants over-expressing the grapevine stilbene synthase gene. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 120, n. 1, p. 229–238, 2015.
- DELAUNOIS, B. et al. Molecular engineering of resveratrol in plants. **Plant Biotechnology Journal**, v. 7, n. 1, p. 2–12, 2009.
- DICKSON, D. W.; WAELE, D. DE. Nematode parasites of peanut. In: **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. UK: CABI Publishing, 2005. p. 393–436.
- DURA, S. et al. Screening US peanut mini-core accessions for resistance to *Sclerotinia* blight caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 101, n. 1, p. 53–60, 2021.
- DWIVEDI, S. L. et al. Enhancing crop gene pools with beneficial traits using wild relatives. Em: **Plant Breeding Reviews**. [s.l.] Wiley, 2007. p. 179–230.

- FAN, H. et al. A Novel effector Protein *SsERP1* Inhibits Plant Ethylene Signaling to Promote *Sclerotinia sclerotiorum* Infection. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 10, p. 825, 2021.
- GIORCELLI, A. et al. Expression of the stilbene synthase (StSy) gene from grapevine in transgenic white poplar results in high accumulation of the antioxidant resveratrol glucosides. **Transgenic Research**, v. 13, n. 3, p. 203–214, 2004.
- GUIMARAES, P. M. et al. A study of gene expression in the nematode resistant wild peanut relative, *Arachis stenosperma*, in response to challenge with *Meloidogyne arenaria*. **Tropical Plant Biology**, v. 3, n. 4, p. 183–192, 2010.
- GUIMARAES, P. M. et al. Root transcriptome analysis of wild peanut reveals candidate genes for nematode resistance. **Plos one**, v. 10, n. 10, p. e0140937, 2015.
- GUO, Y. et al. Use of mycelium and detached leaves in bioassays for assessing resistance to boxwood blight. **Plant Disease**, v. 100, n. 8, p. 1622–1626, 2016.
- HAIN, R. et al. Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. **Nature**, v. 361, n. 6408, p. 153–156, 1993.
- HALLS, C.; YU, O. Potential for metabolic engineering of resveratrol biosynthesis. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 2, p. 77–81, 2008.
- HE, X. et al. A temperature induced Lipocalin gene from *Medicago falcata* (MFTIL1) confers tolerance to cold and oxidative stress. **Plant Molecular Biology**, v. 87, n. 6, p. 645–654, 2015.
- HOFFMAN, D. D. et al. Selected soybean plant introductions with partial resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, v. 86, n. 9, p. 971–980, 2002.
- HORSCH, R. B. et al. A simple and general method for hybridization revealed the expected. **Biological Science**, v. 227, p. 1229–1231, 1985.
- HU, J. et al. Comparative susceptibility of peanut genetically engineered for *Sclerotinia* blight resistance to non-target peanut pathogens. **European Journal of Plant Pathology**, v. 145, n. 1, p. 177–187, 2016.
- HUANG, B. Q.; RUSSELL, S. D. Synergid degeneration in *Nicotiana*: a quantitative, fluorochromatic and chlorotetracycline study. **Sexual Plant Reproduction**, v. 5, n. 2, 1992.
- HUANG, Q. et al. Lysine crotonylation of *DgTIL1* at *K72* modulates cold tolerance by enhancing *DgnsLTP* stability in *Chrysanthemum*. **Plant Biotechnology Journal**, v. 19, n. 6, p. 1125–1140, 2021.
- ISAYENKOV, S. et al. Suppression of Allene Oxide Cyclase in hairy roots of *Medicago truncatula* reduces jasmonate levels and the degree of mycorrhization with glomus intraradices. **Plant Physiology**, v. 139, n. 3, p. 1401–1410, 2005.
- IZGE, A. U.; MOHAMMED, Z. H.; GONI, A. Levels of variability in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) to *Cercospora* leaf spot disease-implication for selection. **African Journal of Agricultural Research**, 2007.
- JEANDET, P. et al. Engineering microbial cells for the biosynthesis of natural compounds of pharmaceutical significance. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–13, 2013.
- JIANG, M. et al. Over-expression of a transcription factor gene *BoC3H4* Enhances salt stress tolerance but reduces *Sclerotinia* stem rot disease resistance in broccoli. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 39, n. 3, p. 1162–1176, 2020.

- KAMVAR, Z. N. et al. Population structure and phenotypic variation of *Sclerotinia sclerotiorum* from dry bean (*Phaseolus vulgaris*) in the United States. **PeerJ**, v. 5, p. e4152, 2017.
- KANDEL, R. et al. Soybean resistance to white mold: evaluation of soybean germplasm under different conditions and validation of QTL. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, 2018.
- KIM, H. S. et al. Reaction of soybean cultivars to *Sclerotinia* stem rot in field, greenhouse, and laboratory evaluations. **Crop Science**, v. 40, n. 3, p. 665–669, 2000.
- KOBAYASHI, S. et al. Kiwifruits (*Actinidia deliciosa*) transformed with a *Vitis* stilbene synthase gene produce piceid (resveratrol-glucoside). **Plant Cell Reports**, v. 19, n. 9, p. 904–910, 2000.
- KULL, L. S. et al. Evaluation of resistance screening methods for *Sclerotinia* stem rot of soybean and dry bean. **Plant Disease**, v. 87, n. 12, p. 1471–1476, 2003.
- KUMAR, K. et al. Genetically modified crops: current status and future prospects. **Plants**, v. 251, n. 4, p. 91, 2020.
- LACORTE, C.; ROMANO, E. Transferência de vetores para *Agrobacterium* spp. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. DE C. (Eds.). Manual de transformação genética de plantas. 2a ed. Brasília: [s.n.]. p. 55–71, 2015.
- LECKBAND, G.; LÖRZ, H. Transformation and expression of a stilbene synthase gene of *Vitis vinifera* L. in barley and wheat for increased fungal resistance. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 96, n. 8, p. 1004–1012, 1998.
- LIANG, Y. et al. Identification of QTLs associated with *Sclerotinia* blight resistance in peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 68, n. 2, p. 629–637, 2021.
- LIMA, J. G. et al. Research Article Diallel analysis for soybean resistance to the fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. **Genetics and Molecular Research**, v. 21, n. 4, 2022.
- LIU, H. H. et al. Cloning and characterization of peanut allene oxide cyclase gene involved in salt-stressed responses. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 1, p. 2331–2340, 2015.
- LIVINGSTONE, D. M. et al. Enhancing resistance to *Sclerotinia minor* in peanut by expressing a barley oxalate oxidase gene. **Plant Physiology**, v. 137, n. 4, p. 1354–1362, 2005.
- LYGIN, A. V. et al. Inhibitory effects of stilbenes on the growth of three soybean pathogens in culture. **Phytopathology®**, v. 104, n. 8, p. 843–850, 2014.
- MARINELLI, A. et al. Assessment of crop loss in peanut caused by *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. minor*, and *Sclerotium rolfsii* in Argentina. **International Journal of Pest Management**, v. 44, n. 4, p. 251–254, 1998.
- MARTINS, A. C. Q. et al. Proteomics unravels new candidate genes for *Meloidogyne* resistance in wild *Arachis*. **Journal of Proteomics**, v. 217, p. 103690, 2020.
- MARTINS, A. C. Q. et al. Transcriptome responses of wild *Arachis* to UV-C exposure reveal genes involved in general plant defense and priming. **Plants**, v. 11, 2022.
- MIORINI, T. J. J. et al. Differential aggressiveness of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from North and South America and partial host resistance in Brazilian soybean and dry bean cultivars. **Tropical Plant Pathology**, v. 44, n. 1, p. 73–81, 2019.

- MOELLERS, T. C. et al. Main and epistatic loci studies in soybean for *Sclerotinia sclerotiorum* resistance reveal multiple modes of resistance in multi-environments. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 3554, 2017.
- MORGANTE, C. V. et al. A survey of genes involved in *Arachis stenosperma* resistance to *Meloidogyne arenaria* race 1. **Functional Plant Biology**, v. 40, n. 12, p. 1298, 2013.
- MOTA, A. P. Z. et al. Comparative root transcriptome of wild *Arachis* reveals NBS-LRR genes related to nematode resistance. **BMC Plant Biology**, v. 18, n. 1, p. 159, 2018.
- MOTA, A. P. Z. et al. Defining the combined stress response in wild *Arachis*. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 11097, 2021.
- MURASHIGE T; SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473–497, 1962.
- NA, R. et al. Responses of sunflower induced by *Sclerotinia sclerotiorum* infection. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 102, p. 113–121, 2018.
- NOWAKOWSKA, M. et al. Appraisal of artificial screening techniques of tomato to accurately reflect field performance of the late blight resistance. **PLoS one** v. 9, n. 10, p. e109328, 2014.
- O’SULLIVAN, C. A.; BELT, K.; THATCHER, L. F. Tackling Control of a Cosmopolitan Phytopathogen: *Sclerotinia*. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, 2021.
- PENG, K.-C. et al. Expression of L-amino acid oxidase of *Trichoderma harzianum* in tobacco confers resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. **Plant Science**, v. 303, p. 110772, 2021.
- PERCHEPIED, L. et al. Nitric Oxide Participates in the Complex Interplay of Defense-Related Signaling Pathways Controlling Disease Resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Plant-Microbe Interactions MPMI**, v. 23, n. 7, p. 846–860, 2010.
- PEREIRA, B. M. et al. Overexpression of wild *Arachis* Lipocalin enhances root-knot nematode resistance in peanut hairy roots. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 37, n. 1–2, p. 74–86, 2019.
- PI, Y. et al. Allene Oxide Cyclase from *Camptotheca acuminata* improves tolerance against low temperature and salt stress in tobacco and bacteria. **Molecular Biotechnology**, v. 41, n. 2, p. 115–122, 2009.
- PROITE, K. et al. ESTs from a wild *Arachis* species for gene discovery and marker development. **BMC Plant Biology**, v. 7, n. 1, p. 7, 2007.
- RATHOD, V. et al. Comparative RNA-Seq profiling of a resistant and susceptible peanut (*Arachis hypogaea*) genotypes in response to leaf rust infection caused by *Puccinia arachidis*. **Biotech**, v. 10, n. 6, p. 284, 2020.
- RIEMANN, M. et al. Identification of rice Allene Oxide Cyclase mutants and the function of jasmonate for defence against *Magnaporthe oryzae*. **The Plant Journal**, v. 74, n. 2, p. 226–238, 2013.
- SHIRASAWA, K. et al. Sequencing analysis of genetic loci for resistance for later leaf spot and rust in peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Frontiers in Plant Science**, v. 9, 2018.
- STALKER, H. T.; SIMPSON, C. E. Genetic resources in *Arachis*. **Advances in peanut Science**, p. 14–53, 1995.

- TALLURY, S. P. et al. Greenhouse evaluation of section *Arachis* wild species for *Sclerotinia* blight and *Cylindrocladium* black rot resistance. **Peanut Science**, v. 41, n. 1, p. 17–24, 2014.
- TIMPER, P.; DICKSON, D. W.; STEENKAMP, S. Nematode parasites of groundnut. In: **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. UK: CAB International, 2018. p. 411–445.
- TSHILENGE-LUKANDA, L. et al. Epidemiology of the groundnut (*Arachis hypogaea* L.) leaf spot disease: genetic analysis and developmental cycles. **American Journal of Plant Sciences**, v. 03, n. 05, p. 582–588, 2012.
- TWIZEYIMANA, M. et al. Rapid screening of *Musa* species for resistance to black leaf streak using *in vitro* plantlets in tubes and detached leaves. **Plant Disease**, v. 91, n. 3, p. 308–314, 2007.
- VALLETTA, A.; IOZIA, L. M.; LEONELLI, F. Impact of environmental factors on stilbene biosynthesis. **Plants MDPI**, 2021.
- VINSON, C. C. et al. Early responses to dehydration in contrasting wild *Arachis* species. **Plone**, v. 13, n. 5, p. e0198191, 2018.
- VON WETTBERG, E.; DAVIS, T. M.; SMÝKAL, P. Editorial: wild plants as source of new crops. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, 2020.
- WALZ, A. et al. Reactive oxygen intermediates and oxalic acid in the pathogenesis of the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 120, n. 4, p. 317–330, 2008.
- WANG, Y.; LIU, H.; XIN, Q. Improvement of copper tolerance of *Arabidopsis* by transgenic expression of an allene oxide cyclase gene, *GhAOC1*, in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **The Crop Journal**, v. 3, n. 4, p. 343–352, 2015.
- WANG, Z. et al. Overexpression of *BnWRKY33* in oilseed rape enhances resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Molecular Plant Pathology**, v. 15, n. 7, p. 677–689, 2014.
- WILLETTS, H. J.; WONG, J. A. L. The biology of *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. trifoliorum*, and *S. minor* with emphasis on specific nomenclature. **The Botanical Review**, v. 46, n. 2, p. 101–165, 1980.
- WOODWARD, J. E. et al. *Sclerotinia* blight in Georgia and evidence for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in runner peanuts. **Plant Health Progress**, v. 7, n. 1, 2006.
- WU, Q. et al. Sequence and expression divergence of the AOC gene family in soybean: insights into functional diversity for stress responses. **Biotechnology Letters**, v. 33, n. 7, p. 1351–1359, 2011.
- WU, Q. et al. Soybean *GmAOC3* promotes plant resistance to the common cutworm by increasing the expression of genes involved in resistance and volatile substance emission in transgenic tobaccos. **Journal of Plant Biology**, v. 58, n. 4, p. 242–251, 2015.
- WU, X.; ZHAO, D. Cloning, Characterization, and functional analysis of *EuTILL1*, a gene-encoding temperature-induced Lipocalin in *Eucommia ulmoides* oliv. **Horticulturae**, v. 9, n. 9, p. 950, 2023.
- XU, W. et al. *VpSTS29/STS2* enhances fungal tolerance in grapevine through a positive feedback loop. **Plant, Cell & Environment**, v. 42, n. 11, p. 2979–2998, 2019.

- YANG, G. et al. A cerato-platanin protein *SsCPI* targets plant PR1 and contributes to virulence of *Sclerotinia sclerotiorum*. **New Phytologist**, v. 217, n. 2, p. 739–755, 2018.
- YANG, L. et al. Jasmonate biosynthesis enzyme allene oxide cyclase 2 mediates cold tolerance and pathogen resistance. **Plant Physiology**, v. 193, n. 2, p. 1621–1634, 2023.
- YANG, X. et al. Overexpression of the chitinase gene *CmCHI* from *Coniothyrium minitans* renders enhanced resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Transgenic Research**, v. 29, n. 2, p. 187–198, 2020.
- YOL, E.; UPADHYAYA, H. D.; UZUN, B. Molecular diagnosis to identify new sources of resistance to *Sclerotinia* blight in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). **Euphytica**, v. 203, n. 2, p. 367–374, 2015.
- ZHANG, J. et al. Overexpressing 4-coumaroyl-CoA ligase and stilbene synthase fusion genes in red raspberry plants leads to resveratrol accumulation and improved resistance against *Botrytis cinerea*. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 85–91, 2023.
- ZHANG, Y. et al. Overexpression of germin-like protein *GmGLP10* enhances resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in transgenic tobacco. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 497, n. 1, p. 160–166, 2018.
- ZHAO, Y. et al. A Wheat Allene Oxide Cyclase Gene Enhances Salinity Tolerance via Jasmonate Signaling. **Plant Physiology**, v. 164, n. 2, p. 1068–1076, 2014.
- ZHU, Y. J. et al. Expression of the grapevine stilbene synthase gene *VST1* in papaya provides increased resistance against diseases caused by *Phytophthora palmivora*. **Plants**, v. 220, n. 2, p. 241–250, 2004.
- ZINOVIEVA, S. V. et al. Involvement of salicylic acid in induction of nematode resistance in plants. **Biology Bulletin**, v. 38, n. 5, p. 453–458, 2011.

CONCLUSÕES GERAIS

A superexpressão do gene *AdEXLB8* em tabaco transgênico demonstrou aumento na tolerância a *S. sclerotiorum*, sugerindo seu potencial como gene candidato para melhorar a resistência ao mofo branco.

A análise da resposta de plantas transgênicas superexpressando o gene *AsTIR19* em resposta à infecção por *S. sclerotiorum* revelou uma complexa interação planta-patógeno, e levou a uma redução significativa na infecção causada por *S. sclerotiorum*. A combinação dos genes *AdEXLB8* e *AsTIR19* resultou em significativa redução de lesões fúngicas em plantas de tabaco transgênico. O emprego de sistemas de piramidação de genes, como esse, apresenta potencial para ampliar o espectro de resistência contra diferentes raças do patógeno, contribuindo para o desenvolvimento de culturas mais resilientes.

Da mesma maneira, a combinação dos genes *AdEXLB8* e *AsECH11* resultou em uma diminuição significativa do tamanho das lesões fúngicas. A compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos nessa interação destaca a engenharia genética como uma ferramenta promissora para fortalecer a resistência das plantas e impulsionar a agricultura sustentável, auxiliando na redução de danos provocados por patógenos como o fungo *S. sclerotiorum*.

A superexpressão dos transgenes *AsAOC3*, *AsTIL* e *AsSTS4* não demonstrou redução significativa no progresso da doença causada por *S. sclerotiorum* em comparação com o controle não-transgênico. Esses resultados destacam a complexidade do controle de patógenos, enfatizando a natureza empírica e a falta de previsibilidade em algumas interações entre planta e patógeno.

Com base nas conclusões apresentadas, as perspectivas dessa pesquisa indicam caminhos promissores. Primeiramente, a identificação do gene *AdEXLB8* como candidato potencial para aprimorar a tolerância a *S. sclerotiorum* destaca a importância de investigações mais aprofundadas o que leva ao desenvolvimento de estratégias precisas de engenharia genética visando otimizar a resistência das plantas não apenas a *S. sclerotiorum*, mas também a outros patógenos. Além disso, a abordagem de piramidação de genes bem-sucedida dos genes sugere que a combinação de diferentes modos de ação pode ser uma estratégia eficaz para ampliar a resistência das plantas a patógenos diversos. Essa descoberta aponta para a necessidade de explorar e integrar mais genes de espécies selvagens de *Arachis*, em busca de uma abordagem mais abrangente e duradoura no

manejo de *S. sclerotiorum*. No contexto mais amplo, a continuidade da pesquisa sobre os transgenes *AsAOC3*, *AsTIL* e *AsSTS4*, que não demonstraram redução significativa no progresso da doença, indica a importância de compreender as vias moleculares subjacentes e explorar combinações genéticas mais complexas. A evolução dessas estratégias pode contribuir não apenas para resistência a *S. sclerotiorum*, mas também para o desenvolvimento de culturas mais robustas e adaptáveis em face dos desafios agrícolas emergentes. O contínuo aprimoramento da engenharia genética e aprofundamento na compreensão das interações planta-patógeno representam perspectivas cruciais para impulsionar a agricultura sustentável e a segurança alimentar.