



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA  
MOLECULAR**

**DINÂMICA TRANSCRICIONAL EM PLANTAS TRANSGÊNICAS  
SUPEREXPRESSANDO GENES RELACIONADOS À IMUNIDADE  
VEGETAL**

**AMANDA CRISTINA DE ARAÚJO**

Orientador: Prof. Dr. Robert Neil Gerard Miller

Brasília-DF

2025



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA  
MOLECULAR**

**DINÂMICA TRANSCRICIONAL EM PLANTAS TRANSGÊNICAS  
SUPEREXPRESSANDO GENES RELACIONADOS À IMUNIDADE  
VEGETAL**

**AMANDA CRISTINA DE ARAÚJO**

Tese apresentada à Universidade de Brasília  
como requisito para obtenção do título de Doutor em  
Biologia Molecular pelo Programa de Pós-graduação em  
Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Robert Neil Gerard Miller

Brasília-DF

2025

Trabalho realizado junto ao Departamento de Biologia Molecular 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), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e do INCT PlantStress Biotec.

**AMANDA CRISTINA DE ARAÚJO**

**DINÂMICA TRANSCRICIONAL EM PLANTAS  
TRANSGÊNICAS SUPEREXPRESSANDO GENES  
RELACIONADOS À IMUNIDADE VEGETAL**

---

Dr. Robert Neil Gerard Miller (Presidente da Banca – UnB)

---

Eliane Ferreira Noronha (Membro Interno-UNB)

---

Ângela Mehta (Membro Externo-CENARGEN)

---

Adrien Speck (Membro Externo-CENARGEN)

Brasília-DF

2025

*Dedico este trabalho à memória de todas as pessoas que perderam seus entes queridos durante a pandemia, e aos colegas de jornada acadêmica que, por diferentes razões, não conseguiram concluir seus trabalhos acadêmicos. Que este trabalho represente não só uma conquista pessoal, mas também uma homenagem à resiliência coletiva.*



## AGRADECIMENTOS

Concluir este doutorado é, para mim, motivo de profunda gratidão. Receber o título mais alto da vida acadêmica é um privilégio imenso, e tenho plena consciência de que essa conquista não foi solitária.

Início agradecendo ao dono de toda glória, que me protegeu do alto e me deu forças para continuar mesmo quando eu duvidava de mim mesma. Sua presença foi constante nos momentos mais desafiadores.

Sou também profundamente grata ao Governo Federal do Brasil que, mesmo em meio a crises econômicas agravadas por uma pandemia, manteve vivo o compromisso com a ciência e manteve através do CNPq o apoio financeiro que eu precisava para prosseguir meus estudos. Agradeço também ao INCT, à FAPDF à CAPES e à Embrapa, instituições que, direta ou indiretamente, tornaram este trabalho possível.

À Universidade de Brasília e ao Departamento de Biologia Molecular, minha eterna gratidão. Aos docentes que me acolheram e ensinaram com tanto rigor e generosidade: muito obrigada. Levo comigo tudo o que aprendi e me comprometo a seguir transmitindo o conhecimento com a mesma paixão que encontrei em vocês.

Agradeço especialmente ao meu orientador, Prof. Robert Miller, por quase oito anos de paciência, escuta e inspiração. Sua orientação foi fundamental para minha trajetória. O senhor é, para mim, uma referência de cientista e um exemplo de ser humano. Sem seu apoio e suas correções, eu não teria me tornado a profissional que sou hoje.

Estendo meu agradecimento a todos que me acolheram na Embrapa Recursos Genéticos, especialmente à Dra. Patrícia Guimarães, Dra. Ana Brasileiro pela coorientação, Dra. Andressa Martins, Dra. Priscila Grynberg e Dr. Roberto Togawa. Cada experiência ao lado de vocês me marcou — dentro e fora do laboratório.

Aos meus amigos, que são parte essencial desta conquista: obrigada por estarem comigo. Um carinho especial para Deziany Ferreira e Erica Castro — não há como retribuir tudo o que vocês fizeram por mim, e nem duas vidas bastariam para retribuir. Aos amigos do LPP3 e do LBI — em especial Rutiane, Pedro, Vanessa, Thifany e Gabriel — obrigada por cada xícara de café e por todas as vezes em que nos lembramos de rir quando tudo parecia dar errado.

Meu reconhecimento também a todos os profissionais que me acompanharam na minha jornada dupla como professora da educação básica. Conciliar trabalho e doutorado é um desafio que poucos compreendem. Agradeço às coordenadoras Glenda e Renata e aos colegas

professores que enfrentam diariamente comigo essa rotina intensa. Ver em vocês a esperança na educação me motiva a continuar crescendo como educadora.

Por fim — com o coração inteiro — e de forma muito especial agradeço à minha família. À minha incrível mãe Shirley e ao meu superpai Junio, que me apoiaram incondicionalmente desde que decidi vir para Brasília estudar. Aos meus irmãos Ana e Junio, pela paciência com meus altos e baixos. E ao meu namorado Diogo, por nunca me deixar sentir sozinha — nem por um instante. A todos que fizeram parte deste caminho — mesmo que por um breve momento — meu mais sincero agradecimento.

## SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	7
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	15
RESUMO GERAL .....	16
GENERAL ABSTRACT .....	17
INTRODUÇÃO .....	10
OBJETIVO GERAL.....	13
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
REVISÃO DE LITERATURA .....	14
4.1 IMPACTO PROVOCADOS POR FUNGOS NA AGRICULTURA GLOBAL .....	14
4.2 <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i> .....	16
4.3 NEMATOIDES-DAS-GALHAS ( <i>MELOIDOGYNE</i> spp.).....	22
4.4 RESPOSTAS MOLECULARES EM PLANTAS SOB ESTRESSE ABIÓTICO .....	30
4.5 RESPOSTAS MOLECULARES A ESTRESSES COMBINADOS .....	35
4.6 EFEITO DE <i>PRIMING</i> EM PLANTAS TRANSGÊNICAS SUPEREXPRESSANDO GENES DE DEFESA .....	37
4.7 PARENTES SILVESTRES DE CULTIVOS (CWR) COMO FONTE DE GENES DE RESISTÊNCIA .....	42
4.8 EXPANSINAS .....	45
4.9 NLRs .....	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	57
CAPÍTULO 2 .....	10
EXPRESSÃO ECTÓPICA DE UM GENE NLR TRUNCADO DE <i>ARACHIS</i> SELVAGEM AUMENTA A RESISTÊNCIA A <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i> .....	10
RESUMO .....	11
ABSTRACT .....	12
ECTOPIC EXPRESSION OF A TRUNCATED NLR GENE FROM WILD <i>ARACHIS</i> ENHANCES RESISTANCE TO <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i> .....	12
INTRODUÇÃO .....	13
MATERIAIS E MÉTODOS .....	16
TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS .....	16
BIOENSAIOS COM <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i> f.sp. <i>CONGLUTINANS</i> .....	16
EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E SEQUENCIAMENTO (RNA-SEQ) .....	17
PERFIL DE EXPRESSÃO IN SÍLICO .....	18
ANÁLISE FUNCIONAL DOS DEGs .....	19
RESULTADOS.....	20

LINHAGENS DE <i>AsTIR19</i> -OE MOSTRARAM RESISTÊNCIA AUMENTADA À INFECÇÃO POR FOC EM <i>ARABIDOPSIS</i>	20
SEQUENCIAMENTO E QUALIDADE DO TRANSCRITOMA DA LINHAGEM OE-11 E WT	23
ALTERAÇÕES NO PERFIL TRANSCRICIONAL ASSOCIADAS À SUPEREXPRESSÃO DE <i>AsTIR19</i> E À INFECÇÃO POR FOC	25
DISTRIBUIÇÃO GENÔMICA DOS DEGs	27
ENRIQUECIMENTO FUNCIONAL: GO E KEGG	29
DEGs INDUZIDOS POR FOC EM OE-11 E WT	30
ANÁLISE COM MAPMAN E REDES DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO	32
EXPRESSÃO DE GENES MARCADORES DE DEFESA POR QRT-PCR	35
INTEGRAÇÃO DAS VIAS DE DEFESA: SA, JA, ET E ROS	37
<b>DISCUSSÃO</b>	<b>38</b>
A SUPEREXPRESSÃO DE <i>AsTIR19</i> ATIVA MÚLTIPLAS RESPOSTAS DE DEFESA NA PLANTA	40
ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA DAS PLANTAS <i>AsTIR19</i> OE EM RESPOSTA À INOCULAÇÃO COM FOC	41
SUPEREXPRESSÃO DE <i>AsTIR19</i> INDUZ A ATIVAÇÃO DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO (FTs)	42
SUPEREXPRESSÃO DE <i>AsTIR19</i> REGULA POSITIVAMENTE GENES MARCADORES DE DEFESA E VIAS HORMONAIS DAS PLANTAS	43
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>46</b>
<b>REPROGRAMAÇÃO TRANSCRICIONAL MEDIADA POR <i>AdEXLB8</i> PROMOVE TOLERÂNCIA CRUZADA A MÚLTIPLOS ESTRESSSES EM <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i></b>	<b>60</b>
<b>RESUMO</b>	<b>61</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>62</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>63</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>65</b>
ORIGEM DO MATERIAL BIOLÓGICO UTILIZADO	65
FILTRAGEM, MAPEAMENTO E ANÁLISE DA QUALIDADE E DA EXPRESSÃO GÊNICA	66
ANÁLISE DE ONTOLOGIA GÊNICA E VIAS METABÓLICAS	67
<b>RESULTADOS</b>	<b>68</b>
ESTATÍSTICA DO SEQUENCIAMENTO	68
EFEITOS BASAIS DA SUPEREXPRESSÃO DE <i>AdEXLB8</i> NO TRANSCRIPTOMA DE <i>A. THALIANA</i>	69
PERFIL DE EXPRESSÃO DE OE4 SUPEREXPRESSANDO <i>AdEXLB</i> SOB ESTRESSSES ISOLADOS E COMBINADOS. ..	73
ANÁLISE DE ENRIQUECIMENTO DE TERMOS GO EM <i>A. THALIANA</i> SUPEREXPRESSANDO <i>AdEXLB8</i> SOB ESTRESSSES ISOLADOS E COMBINADOS	74
ANÁLISE DE ENRIQUECIMENTO DE VIAS KEGG EM <i>A. THALIANA</i> SUPEREXPRESSANDO <i>AdEXLB8</i> SOB ESTRESSSES ISOLADOS E COMBINADOS	76
ANÁLISE DE INTERAÇÕES PROTEÍNA-PROTEÍNA (PPI)	78

ANÁLISE DE PREDIÇÃO DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO.....	81
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>85</b>
PERFIL TRANSCRIPTOMICO DE <i>AdEXLB</i> SUPEREXPRESSO EM PLANTAS DE <i>A. THALIANA</i> .....	85
PERFIL DE EXPRESSÃO DE <i>AdEXLB</i> SOB ESTRESSES ISOLADOS E COMBINADOS .....	87
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>90</b>
<b>PRODUÇÃO INTELECTUAL.....</b>	<b>102</b>
RESUMOS EVENTOS CIENTÍFICOS .....	102
ARTIGOS E LIVRO .....	103

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. REDE HORMONAL ENVOLVIDA NA DEFESA CONTRA *F. OXYSPORUM* F. SP. *LYCOPERSICI* (Fo5176). OS DIFERENTES HORMÔNIOS (SA, ET, ABA, JA E FOJA) ESTÃO REPRESENTADOS NA PARTE SUPERIOR. ABAIXO, SÃO MOSTRADOS OS RECEPTORES IDENTIFICADOS, OS INTERMEDIÁRIOS DE SINALIZAÇÃO E, POR FIM, OS PRINCIPAIS FATORES DE TRANSCRIÇÃO ASSOCIADOS À RESPOSTA IMUNE. AS SETAS PRETAS INDICAM EFEITOS POSITIVOS, ENQUANTO AS LINHAS COM BARRA INDICAM EFEITOS INIBITÓRIOS (WANG ET AL. 2022). ..... 22
- FIGURA 2. CICLO DE VIDA DE UM NEMATOIDE-DAS-GALHAS RADICULARES. (A) SEÇÃO LONGITUDINAL DE UMA PONTA DE RAIZ MOSTRANDO JUVENIS DE SEGUNDO ESTÁDIO (J2s) GIRANDO NO MERISTEMA PARA MIGRAR AO CILINDRO VASCULAR. (B) SINTOMAS TÍPICOS (GALHAS) EM RAÍZES DE TOMATE. (C) SEÇÃO LONGITUDINAL DE UMA RAIZ INFESTADA, MOSTRANDO UMA FÊMEA MADURA E CINCO CÉLULAS GIGANTES (\*) CONSTITUINDO O LOCAL DE ALIMENTAÇÃO DO NEMATOIDE (CASTAGNONE-SERENO ET AL., 2013) ..... 24
- FIGURA 3. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA REGULAÇÃO DAS EXPANSINAS POR DIVERSOS HORMÔNIOS VEGETAIS (IAA, ARR1, ET, SA, ABA E JA) E SUA INTERAÇÃO COM AS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) E AS ENZIMAS ANTIOXIDANTES (PEROXIDASES). AS EXPANSINAS, MODULADAS POSITIVAMENTE OU NEGATIVAMENTE PELOS DIFERENTES HORMÔNIOS, INFLUENCIAM O RELAXAMENTO DA PAREDE CELULAR, O CRESCIMENTO VEGETAL E A RESPOSTA A ESTRESSES BIÓTICOS E ABIÓTICOS, INCLUINDO O CONTROLE DE ROS. ADAPTADO DE SAMALOVA ET AL. (2022). .... 47
- FIGURA 4. VISÃO GERAL DOS PRINCIPAIS MECANISMOS DA IMUNIDADE INATA EM PLANTAS, ENVOLVENDO RECEPTORES DE RECONHECIMENTO DE PADRÕES NA SUPERFÍCIE CELULAR (PRRs) E RECEPTORES INTRACELULARES NLR (CNLS OU TNLS), ALÉM DE SEUS NLRs AUXILIARES (CNLS OU RNLs) (JONES ET AL., 2024). ..... 53
- FIGURA 5. ANÁLISE DE GENE ONTOLOGY (GO) E VIAS DE MAPMAN DOS GENES EXPRESSOS DIFERENCIALMENTE EM OE4. A- ANÁLISE DE ENRIQUECIMENTO DE VIAS E PROCESSOS PARA OS TERMOS: GO BIOLOGICAL PROCESSES, GO CELLULAR COMPONENTS, GO MOLECULAR FUNCTIONS, KEGG PATHWAY. B- - ANÁLISE DE ENRIQUECIMENTO DE VIAS E PROCESSOS PARA AS VIAS EM MAPMAN. .... 72
- FIGURA 6. ANÁLISE DE SOBREPOSIÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NA LINHAGEM TRANSGÊNICA OE4 DE *ARABIDOPSIS THALIANA*, SUPEREXPRESSANDO AdEXLB8, SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE ESTRESSE. O GRÁFICO UpSet APRESENTA OS GENES REGULADOS POSITIVAMENTE (UP) E NEGATIVAMENTE (DOWN) NA LINHAGEM OE4 EM COMPARAÇÃO AO TIPO SELVAGEM (WT) EM CONDIÇÕES SEM ESTRESSE (OE4 vs. WT) E SOB TRATAMENTOS DE ESTRESSE BIÓTICO COM O NEMATOIDE *MELOIDOGYNE INCOGNITA* (OE4\_NEMA), ESTRESSE ABIÓTICO POR SECA (OE4\_DROUGHT) E ESTRESSE COMBINADO (OE4\_CROSS). AS BARRAS VERTICAIS NO TOPO INDICAM O NÚMERO DE GENES COMPARTILHADOS ENTRE DIFERENTES CONDIÇÕES, ENQUANTO AS CONEXÕES NA MATRIZ INFERIOR REPRESENTAM AS INTERSEÇÕES ESPECÍFICAS. AS BARRAS HORIZONTAIS À ESQUERDA INDICAM O NÚMERO TOTAL DE GENES REGULADOS EM CADA CONDIÇÃO INDIVIDUALMENTE. .... 73
- FIGURA 7. GRÁFICO DE BOLHAS REPRESENTANDO TERMOS DE ONTOLOGIA GENÉTICA (GO) SIGNIFICATIVAMENTE ENRIQUECIDOS NOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS (DEGs) EM TRÊS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS: OE4\_DROUGHT, OE4\_CROSS E OE4\_NEMA. OS TERMOS GO ESTÃO DIVIDIDOS EM TRÊS CATEGORIAS PRINCIPAIS: COMPONENTES CELULARES (CC), FUNÇÕES MOLECULARES (MF) E PROCESSOS BIOLÓGICOS (BP). O TAMANHO DAS

BOLHAS REFLETE O NÚMERO DE GENES ASSOCIADOS A CADA TERMO (nGENES), ENQUANTO A COR DAS BOLHAS INDICA A REGULAÇÃO DOS GENES, SENDO VERMELHO PARA GENES COM REGULAÇÃO POSITIVA (UPREGULATED) E AZUL PARA GENES COM REGULAÇÃO NEGATIVA (DOWNREGULATED). O EIXO X APRESENTA O LOGARITMO NEGATIVO DO FDR AJUSTADO (-LOG <sub>10</sub> (FDR)), QUE REPRESENTA A SIGNIFICÂNCIA DO ENRIQUECIMENTO. ....	75
FIGURA 8. ANÁLISE DE ENRIQUECIMENTO DE VIAS METABÓLICAS KEGG SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE ESTRESSE EM PLANTAS TRANSGÊNICAS SUPEREXPRESSANDO AdEXLB8. O GRÁFICO APRESENTA AS VIAS ENRIQUECIDAS PARA GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS (DEGs) REGULADOS POSITIVAMENTE (UP) E NEGATIVAMENTE (DOWN) NAS CONDIÇÕES DE ESTRESSE HÍDRICO (OE4_DROUGHT), ESTRESSE COMBINADO (OE4_CROSS) E ESTRESSE BIÓTICO POR NEMATOIDES (OE4_NEMA). ....	77
FIGURA 9. REDES DE INTERAÇÃO PROTEÍNA-PROTEÍNA (PPI) DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS (DEGs) SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE ESTRESSE EM <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> . AS REDES FORAM GERADAS UTILIZANDO O BANCO DE DADOS STRING PARA OS GENES REGULADOS POSITIVAMENTE. (A) REDE PPI PARA DEGs EXCLUSIVOS DE ESTRESSE HÍDRICO (DROUGHTG) (B) REDE PPI PARA DEGs EXCLUSIVOS DE ESTRESSE COMBINADO (CROSS-STRESS), (C) REDE PPI PARA DEGs EXCLUSIVOS DE ESTRESSE BIÓTICO (NEMA). (D) REDE PPI DOS GENES REGULADOS EM COMUM ENTRE AS CONDIÇÕES AVALIADAS (COMMON DEGs), COM CLUSTERS ALTAMENTE CONECTADOS INDICANDO PROTEÍNAS COM FUNÇÕES CENTRAIS, COMO REGULAÇÃO METABÓLICA E SINALIZAÇÃO. AS CORES REPRESENTAM DIFERENTES CLUSTERS IDENTIFICADOS PELO MÉTODO K-MEANS (DADOS DE CADA CLUSTER ESTÃO DISPONÍVEIS NA TABELA SUPLEMENTAR). ....	79
FIGURA 10. REDES DE INTERAÇÃO PROTEÍNA-PROTEÍNA (PPI) DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS (DEGs) REGULADOS NEGATIVAMENTE EM DIFERENTES CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS. (A) REDE PPI DOS DEGs REGULADOS NEGATIVAMENTE EM RESPOSTA AO NEMATOIDE (NEMA DEGs). (B) REDE PPI DOS DEGs REGULADOS NEGATIVAMENTE EM RESPOSTA À SECA (DROUGHT DEGs). (C) REDE PPI DOS DEGs REGULADOS NEGATIVAMENTE NA CONDIÇÃO COMBINADA DE NEMATOIDE E SECA (CROSS DEGs). (D) REDE PPI DOS DEGs REGULADOS NEGATIVAMENTE COMPARTILHADOS ENTRE AS CONDIÇÕES DE NEMATOIDE E SECA (COMMON DEGs). CADA NÓ REPRESENTA UMA PROTEÍNA CODIFICADA PELOS DEGs, ENQUANTO AS ARESTAS REPRESENTAM INTERAÇÕES CONHECIDAS ENTRE ESSAS PROTEÍNAS. AS CORES DOS NÓS INDICAM CLUSTERS FUNCIONAIS, DESTACANDO PROCESSOS BIOLÓGICOS ESPECÍFICOS ASSOCIADOS À REGULAÇÃO NEGATIVA EM CADA CONDIÇÃO. REDES MAIORES E MAIS CONECTADAS INDICAM MAIOR NÚMERO DE INTERAÇÕES FUNCIONAIS RELEVANTES .....	81
FIGURA 11. DISTRIBUIÇÃO EMPILHADA DAS FAMÍLIAS DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO (TFs) IDENTIFICADOS NAS DIFERENTES CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS (BIBLIOTECAS). CADA BARRA REPRESENTA UMA FAMÍLIA DE TFs, ENQUANTO AS CORES INDICAM AS DIFERENTES CONDIÇÕES EM QUE OS TFs FORAM PREDITOS. A ALTURA TOTAL DE CADA BARRA CORRESPONDE AO NÚMERO TOTAL DE TFs PERTENCENTES ÀQUELA FAMÍLIA EM TODAS AS CONDIÇÕES .....	83
FIGURA 12. A FIGURA APRESENTA AS PRINCIPAIS VIAS MOLECULARES DE DEFESA MODULADAS EM PLANTAS SUPEREXPRESSANDO AdEXLB8 SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE ESTRESSE: SECA (D), INFECÇÃO POR NEMATOIDES (N), ESTRESSE COMBINADO (C), E CONTROLE (CT). ....	84
FIGURA 13. SOBREPOSIÇÃO DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS (DEGs) INDUZIDOS EXCLUSIVAMENTE PELOS DIFERENTES TIPOS DE TRANSGENE. DIAGRAMA DE VENN COMPARANDO QUATRO SUBCONJUNTOS DE DEGs IDENTIFICADOS SOB CONDIÇÃO BASAL (SEM ESTRESSE) EM <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> TRANSGÊNICA: GENES REGULADOS	

POSITIVAMENTE (UP) OU NEGATIVAMENTE (DOWN) PELA SUPEREXPRESSÃO DE *AdEXLB8* (LINHAGEM OE-4; ÁREAS MAGENTA E VERDE-CLARO) E PELA SUPEREXPRESSÃO DE *AsTIR19* (LINHAGEM OE-11; ÁREAS VERMELHA E AZUL). CADA SUBCONJUNTO FOI OBTIDO EM RELAÇÃO AO RESPECTIVO CONTROLE SELVAGEM (WT) APÓS NORMALIZAÇÃO TMM E ANÁLISE DIFERENCIAL NO EDGE R. FORAM CONSIDERADOS DEGs AQUELES COM  $|\log_2 FC| > 2$  ( $\geq 4$ -FOLD) E  $FDR < 0,01$ . OS TOTAIS ENTRE PARÊNTESES INDICAM O NÚMERO DE GENES POR CLASSE: EXLB\_UP = 465, EXLB\_DOWN = 20, AsTIR19\_UP = 455, AsTIR19\_DOWN = 323. APENAS 25 GENES APARECEM EM INTERSECÇÕES (13 COMPARTILHADOS ENTRE EXLB\_UP E AsTIR19\_UP; 11 ENTRE EXLB\_UP E AsTIR19\_DOWN; 1 ENTRE EXLB\_DOWN E AsTIR19\_UP) E NENHUM GENE É COMUM AOS QUATRO GRUPOS. .... 99

FIGURA 1. ESCALA DIAGRAMÁTICA DE SINTOMAS DE MURCHA DE *FUSARIUM* EM *ARABIDOPSIS THALIANA*. CADA IMAGEM REPRESENTA UMA PLANTA CORRESPONDENTE A UMA PONTUAÇÃO NO ÍNDICE DE DOENÇA (DI): 0 – PLANTA MORTA; 1 – FOLHAS MAIS VELHAS MORTAS E FOLHAS JOVENS SEVERAMENTE ATROFIADAS; 2 – FOLHAS MAIS VELHAS CLORÓTICAS, AMARELAS OU MORTAS, E FOLHAS JOVENS ATROFIADAS; 3 – CLOROSE VASCULAR NAS FOLHAS MAIS VELHAS E ROSETA COMPACTA DEVIDO À ATROFIA FOLIAR; 4 – PECÍOLOS ATROFIADOS; 5 – PLANTA VISUALMENTE INDISTINGUÍVEL DAS NÃO INOCULADAS (SEM SINTOMAS APARENTES). .... 17

FIGURA 2. PADRÕES DE AMPLIFICAÇÃO POR PCR EM AMOSTRAS DE DNA DE *ARABIDOPSIS THALIANA*, UTILIZANDO PRIMERS PARA O GENE *BAR* (AMPLICON: 405 PB). POÇOS 2 A 10: DNA DAS LINHAGENS TRANSGÊNICAS NA GERAÇÃO T1. POÇO 11: CONTROLE POSITIVO (+CTR; DNA WT MISTURADO COM VETOR pPZP-AsTIR19). POÇO 12: CONTROLE NEGATIVO (–CTR; SEM DNA MOLDE). POÇO 14: DNA WT NÃO TRANSGÊNICO. LADDER: 1 Kb PLUS DNA LADDER (THERMO FISHER SCIENTIFIC, CAT. #10787026). .... 21

FIGURA 3. SINTOMAS DE MURCHA EM *A. THALIANA* APÓS INFECÇÃO POR FOC. COMPARAÇÃO ENTRE PLANTAS WT E LINHAGENS OE AOS 7 E 14 DAI, DE ACORDO COM A ESCALA DE SEVERIDADE. A PONTUAÇÃO DE ESCALA VISUAL NO ÍNDICE DE DOENÇA (DI) É ESTABELECIDADA PELAS SEGUINTE NOTAS: 0 – PLANTA MORTA; 1 – FOLHAS MAIS VELHAS MORTAS E FOLHAS JOVENS SEVERAMENTE ATROFIADAS; 2 – FOLHAS MAIS VELHAS CLORÓTICAS, AMARELAS OU MORTAS, E FOLHAS JOVENS ATROFIADAS; 3 – CLOROSE VASCULAR NAS FOLHAS MAIS VELHAS E ROSETA COMPACTA DEVIDO À ATROFIA FOLIAR; 4 – PECÍOLOS ATROFIADOS; 5 – PLANTA VISUALMENTE INDISTINGUÍVEL DAS NÃO INOCULADAS (SEM SINTOMAS APARENTES). .... 22

FIGURA 4. SINTOMAS DA DOENÇA CAUSADA POR FOC E ÍNDICE DE DOENÇA EM QUATRO LINHAGENS AsTIR19 OE INOCULADAS E EM PLANTAS DO TIPO SELVAGEM (WT) DE *ARABIDOPSIS*. A) ÍNDICE DE DOENÇA NAS LINHAS AsTIR19 OE E NAS PLANTAS WT DURANTE A PROGRESSÃO DA DOENÇA CAUSADA POR FOC; B) ÍNDICE DE DOENÇA NAS LINHAGENS AsTIR19 OE E WT AOS 14 DAI ( $P < 0,05$ ). LETRAS DIFERENTES INDICAM UMA DIFERENÇA SIGNIFICATIVA ( $P < 0,05$ ) NO ÍNDICE DE DOENÇA ENTRE AS LINHAS OE E AS PLANTAS WT. .... 23

FIGURA 5. AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DAS AMOSTRAS DE RNA POR BIOANALYZER.  $RIN > 9$  EM TODAS AS AMOSTRAS ANALISADAS. .... 24

FIGURA 6 GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS (DEGs) ( $\log_2$  FOLD CHANGE  $> 2$  E VALOR DE  $P < 0,01$ ) NA LINHAGEM AsTIR19 OE-11 E NAS PLANTAS WT SOB CONDIÇÕES DE INOCULAÇÃO COM FOC (I) E SEM INOCULAÇÃO (NI). A) ANÁLISE DE VOLCANO PLOT DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES, COM O  $-\log_{10}$  (VALOR DE P) DO TESTE T NO EIXO Y E O  $\log_2$  (FOLD CHANGE) NO EIXO X. OS PONTOS VERMELHOS REPRESENTAM DEGs REGULADOS



POSITIVAMENTE, E OS PONTOS AZUIS REPRESENTAM DEGs REGULADOS NEGATIVAMENTE. B) DIAGRAMA DE VENN MOSTRANDO AS INTERSECÇÕES DE DEGs ENTRE AS QUATRO COMPARAÇÕES E O NÚMERO DE DEGs REGULADOS POSITIVAMENTE E NEGATIVAMENTE PARA CADA COMPARAÇÃO. C) HEATMAP DA DISTRIBUIÇÃO DE DEGs POR AGRUPAMENTO HIERÁRQUICO EM *ARABIDOPSIS* TRANSGÊNICA VERSUS PLANTAS WT INOCULADAS E NÃO INOCULADAS COM FOC. AS LINHAS REPRESENTAM GENES INDIVIDUAIS, ENQUANTO OS GENES REGULADOS POSITIVAMENTE E NEGATIVAMENTE EM CADA COMPARAÇÃO (COLUNAS) SÃO INDICADOS EM VERMELHO E AZUL, RESPECTIVAMENTE. .. 26

**FIGURA 7.** MANHATTAN PLOTS MOSTRANDO A POSIÇÃO E A FREQUÊNCIA DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS (DEGs) NOS CINCO CROMOSSOMOS DE *A. THALIANA*. A) DEGs ENTRE A LINHAGEM OE-11 NÃO INOCULADA E AS PLANTAS WT; B) DEGs ENTRE A LINHAGEM OE-11 INOCULADA E NÃO INOCULADA COM FOC; C) DEGs ENTRE AS PLANTAS WT INOCULADAS E NÃO INOCULADAS COM FOC; D) DEGs ENTRE A LINHAGEM OE-11 INOCULADA COM FOC E AS PLANTAS WT. O EIXO X ESTÁ DIVIDIDO PELOS CINCO CROMOSSOMOS, COM OS GENES PLOTADOS EM SUAS POSIÇÕES RESPECTIVAS. O EIXO Y REPRESENTA OS VALORES DE EXPRESSÃO, CALCULADOS COMO  $-10 \times \log(\text{VALOR DE P})$ . AS LINHAS TRACEJADAS VERMELHAS INDICAM O LIMAR PARA A TAXA DE DESCOBERTA FALSA ( $P < 0,00001$ ). OS PONTOS LARANJA REPRESENTAM OS DEGs, COM O TAIR ID DOS GENES COM VALORES  $-\log_{10}(\text{VALOR DE P})$  MAIS ELEVADOS DESTACADOS. .... 28

**FIGURA 8** ANÁLISE DE ENRIQUECIMENTO DE GO E KEGG DOS DEGs ORIUNDOS DE OE-11 NÃO INOCULADA EM COMPARAÇÃO COM AS PLANTAS WT. A) TERMOS SIGNIFICATIVAMENTE ENRIQUECIDOS DE GENE ONTOLOGY (GO) ENTRE OS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS (DEGs). O TAMANHO DAS BOLHAS CORRELACIONA-SE COM O ENRIQUECIMENTO (FOLD ENRICHMENT) (VALOR DE  $P < 0,05$ ) ASSOCIADO A CADA TERMO GO. CÍRCULOS AZUIS INDICAM A REGULAÇÃO NEGATIVA DOS DEGs, ENQUANTO CÍRCULOS VERMELHOS INDICAM REGULAÇÃO POSITIVA. B) VIAS KEGG ENRIQUECIDAS. O EIXO X REPRESENTA O LOGARITMO NEGATIVO DO VALOR DE P AJUSTADO (FDR) PARA AS VIAS KEGG. .... 29

**FIGURA 9.** ANÁLISES FUNCIONAIS DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS (DEGs) OBTIDOS DA LINHA OE-11 E PLANTAS WT (TIPO SELVAGEM) INOCULADAS COM FOC EM COMPARAÇÃO COM SEUS RESPECTIVOS CONTROLES NÃO INOCULADOS. A) CATEGORIAS GO ENRIQUECIDAS NA LINHA OE-11 SOB INFECÇÃO POR FOC; B) CATEGORIAS GO ENRIQUECIDAS EM PLANTAS WT SOB INFECÇÃO POR FOC. O TAMANHO DAS BOLHAS ESTÁ CORRELACIONADO COM O ENRIQUECIMENTO (FOLD ENRICHMENT,  $P$ -VALOR  $< 0,05$ ) ASSOCIADO A CADA TERMO GO RESPECTIVO. CÍRCULOS AZUIS INDICAM A REGULAÇÃO NEGATIVA (DOWNREGULATION) DOS DEGs, ENQUANTO CÍRCULOS VERMELHOS INDICAM A REGULAÇÃO POSITIVA (UPREGULATION). C) VIAS KEGG ENRIQUECIDAS NA LINHA OE-11 SOB INFECÇÃO POR FOC; D) VIAS KEGG ENRIQUECIDAS EM PLANTAS WT SOB INFECÇÃO POR FOC. O EIXO X REPRESENTA O LOGARITMO NEGATIVO DO  $P$ -VALOR AJUSTADO (FDR) PARA AS VIAS KEGG. .... 31

**FIGURA 10.** REDES DE INTERAÇÃO PROTEÍNA-PROTEÍNA BASEADAS EM FATORES DE TRANSCRIÇÃO DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS (TFs) IDENTIFICADOS NA COMPARAÇÃO OE-11-I vs OE-11-NI.) REDE DE TFs REGULADOS POSITIVAMENTE, DESTACANDO MEMBROS DAS FAMÍLIAS WRKY E NAC, ASSOCIADOS À RESPOSTA À INFECÇÃO FÚNGICA (NÓS EM VERMELHO). B) REDE DE TFs REGULADOS NEGATIVAMENTE, INCLUINDO TFs DA FAMÍLIA DREB, COMUMENTE LIGADOS À RESPOSTA A ESTRESSE ABIÓTICO. AS INTERAÇÕES FORAM INFERIDAS COM BASE EM DADOS DE COEXPRESSÃO (LINHAS ROSAS), INTERAÇÕES FÍSICAS (LINHAS ROXAS) E COLOCALIZAÇÃO (LINHAS AZUIS). AS CORES NOS NÓS DA REDE B INDICAM AS FUNÇÕES ANOTADAS SEGUNDO CATEGORIAS GO, COMO LIGAÇÃO ESPECÍFICA À

REGIÃO REGULATÓRIA DO DNA, ATIVIDADE DE ACETILTRANSFERASES DE HISTONAS (H4/H2A), PARTICIPAÇÃO EM COMPLEXOS DE RNA POLIMERASE I E OUTRAS FUNÇÕES NUCLEARES. ....	34
FIGURA 11. ANÁLISE DE EXPRESSÃO POR QRT-PCR NA LINHA OE-11 INOCULADA COM FOC E EM PLANTAS NÃO INOCULADAS. A QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DOS NÍVEIS DE MRNA DE GENES MARCADORES DE <i>ARABIDOPSIS</i> , ENVOLVIDOS EM VIAS HORMONAIS E DE DEFESA, NA LINHA OE-11 INOCULADA COM FOC (LARANJA) FOI CALCULADA EM RELAÇÃO ÀS PLANTAS WT NÃO INOCULADAS (AZUL). OS VALORES DE QUANTIFICAÇÃO RELATIVA (RQ) FORAM CALCULADOS COM BASE NAS MÉDIAS E NOS ERROS PADRÃO DE NOVE INDIVÍDUOS, SEGUIDOS PELO TESTE DE TUKEY ( $P \leq 0,05$ ). ....	36
FIGURA 12 DIAGRAMA DERIVADO DE CÓDIGO PYTHON MOSTRANDO AS VIAS HORMONAIS DE DEFESA (SA, JA, ET) E SEUS GENES ASSOCIADOS QUE ESTÃO REGULADOS POSITIVAMENTE NA LINHA OE-11 INOCULADA COM FOC. NÓS AZUIS REPRESENTAM AS VIAS HORMONAIS, NÓS VERDES REPRESENTAM OS GENES ASSOCIADOS A CADA VIA, E AS SETAS CINZAS INDICAM AS CONEXÕES ENTRE GENES E SUAS RESPECTIVAS VIAS. INTERAÇÕES ADICIONAIS ESTÃO DESTACADAS EM VERMELHO. ....	37

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ABF** – ABRE Binding Factor  
**ABA** – Absciscic Acid  
**AOS** – Allene Oxide Synthase  
**AOC** – Allene Oxide Cyclase  
**AP2** – APETALA2  
**APX2** – Ascorbate Peroxidase 2  
**ARF** – Auxin Response Factor  
**AREB** – ABA-Responsive Element Binding  
**bHLH** – Basic Helix-Loop-Helix  
**DEG** – Differentially Expressed Gene  
**DREB2A** – Dehydration Responsive Element Binding Protein 2A  
**ET** – Ethylene  
**ERF** – Ethylene-Responsive Factor  
**EXLA** – Expansin-Like A  
**EXLB** – Expansin-Like B  
**FC** – Fold Change  
**FDR** – False Discovery Rate  
**GO** – Gene Ontology  
**HSFA2** – Heat Shock Factor A2  
**IAA14** – Auxin/Indole-3-Acetic Acid 14  
**JA** – Jasmonic Acid  
**KEGG** – Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes  
**LEA** – Late Embryogenesis Abundant

**LOX3** – Lipoxygenase 3  
**LT178** – Low Temperature-Induced 78  
**MAPK** – Mitogen-Activated Protein Kinase  
**NAC** – NAM, ATAF1/2, and CUC2  
**NCED3** – 9-cis-Epoxycarotenoid Dioxygenase 3  
**OE** – Overexpression  
**PPI** – Protein-Protein Interaction  
**qPCR** – Quantitative Polymerase Chain Reaction  
**RD22** – Responsive to Desiccation 22  
**RD29A** – Responsive to Desiccation 29A  
**RNA-Seq** – RNA Sequencing  
**ROS** – Reactive Oxygen Species  
**SA** – Salicylic Acid  
**SAR** – Systemic Acquired Resistance  
**STRING** – Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins  
**TAIR** – The *Arabidopsis* Information Resource  
**TF** – Transcription Factor  
**TR** – Transcriptional Regulator  
**TMM** – Trimmed Mean of M-values  
**WT** – Wild Type

## RESUMO GERAL

DE ARAUJO, Amanda Cristina. Dinâmica transcricional em plantas transgênicas superexpressando genes relacionados à imunidade vegetal. 2024. 162p. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília-DF.

Os efeitos negativos do estresse biótico e abiótico na produtividade agrícola variam de acordo com a cultura hospedeira, o patógeno e as condições ambientais. Esses impactos têm amplas consequências econômicas para o setor agrícola e para a segurança alimentar global. Para mitigar as perdas devastadoras causadas por esses estresses na agricultura, as abordagens biotecnológicas para a melhoria das culturas tornaram-se uma estratégia proeminente. Nesse contexto, a exploração e identificação de genes candidatos em espécies de plantas silvestres é particularmente relevante, pois essas plantas, devido à sua coevolução com patógenos e estresses abióticos, servem como um reservatório de diversidade genética. Os genes de defesa incluem aqueles que conferem proteção contra estresses bióticos, como os genes R, que interagem diretamente com os genes Avr nos patógenos. Diversos genes também desempenham papéis cruciais na tolerância a condições ambientais adversas e aos estresses abióticos associados. O objetivo deste estudo foi identificar e analisar o comportamento de genes relacionados à defesa sob diferentes condições de estresse, utilizando a planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Por meio da transformação genética, técnicas de fenotipagem e sequenciamento de transcriptoma, avaliou-se o comportamento de várias categorias de genes candidatos em resposta a estresses bióticos (*Meloidogyne incognita* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*), estresse abiótico (seca) e a combinação de estresses bióticos e abióticos. Nos sistemas estudados, a supressão dos genes *AdEXLB8*, que codifica uma proteína expansina em *Arachis duranensis*, e *AsTIR19*, um gene NLR truncado de *Arachis stenosperma*, resultou em respostas de defesa eficazes, induzindo mudanças transcricionais estatisticamente significativas nas plantas transgênicas. Os resultados obtidos por meio das análises *in planta* dos papéis desses genes candidatos destacam seu potencial para a melhoria das culturas, aumentando a resistência aos estresses bióticos, abióticos e combinados.

**Palavras-chave:** *Arachis duranensis*, *Arachis stenosperma*, estresse biótico, estresse abiótico, murcha de *Fusarium*, nematoide das galhas, seca, defesa vegetal.

## GENERAL ABSTRACT

**DE ARAUJO, Amanda Cristina.** Transcriptional dynamics in transgenic plants overexpressing immunity-related genes. 2024. 162p. Thesis (Ph.D. in Molecular Biology) – University of Brasília, Brasília-DF.

The negative effects of biotic and abiotic stress on agricultural productivity vary according to crop host, pathogen and environmental conditions. These impacts have far-reaching economic consequences for the agricultural sector and for global food security. To mitigate devastating losses caused by such stresses in agriculture, biotechnological approaches for crop improvement have become a prominent strategy. In this context, the exploration and identification of candidate genes from wild plant species is particularly relevant, as these plants, due to their coevolution with pathogens and abiotic stresses, serve as a reservoir of genetic diversity. Of the numerous defense genes that confer protection against biotic stresses, NLR *R* genes can directly or indirectly interact with *Avr* genes in pathogens to initiate effector-triggered immunity (ETI). Numerous other genes also play crucial roles in providing tolerance to adverse environmental conditions and associated abiotic stresses. The aim of this study was to analyze the behavior of defense-related genes in the model plant *Arabidopsis thaliana* under different stress conditions. The behavior of various categories of candidate genes in response to biotic stresses (*Meloidogyne incognita* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*), abiotic stress (drought), and combined biotic and abiotic stresses was evaluated following genetic transformation, phenotyping and transcriptome analysis. Across the studied systems, the overexpressed genes *AdEXLB8*, which encodes an expansin protein from *Arachis duranensis*, and *AsTIR19*, which is a truncated NLR gene from *Arachis stenosperma*, each resulted in effective defense responses, inducing statistically significant transcriptional changes in transgenic plants. The results obtained through the *in-planta* analyses highlight the potential of the candidate genes in crop improvement for enhancing resistance to biotic abiotic and combined stresses.

**Keywords:** *Arachis duranensis*, *Arachis stenosperma*, biotic stress, abiotic stress, *Fusarium* wilt, root-knot nematode, drought, plant defense

## Capítulo 1- Referencial Teórico

### INTRODUÇÃO

A produtividade agrícola é a medida da eficiência com que os recursos disponíveis são utilizados para gerar produtos agrícolas. Esse indicador depende de vários fatores, e é importante para garantir a segurança alimentar e o desenvolvimento econômico e social de uma nação (Schreyer & Pilat, 2001).

A agropecuária é um dos pilares da economia brasileira, representando parcela significativa do PIB e das exportações do país. Segundo dados do MAPA (2024), em 2023, o agronegócio respondeu por 49% de todo o valor exportado pelo Brasil, atingindo um recorde de US\$ 166,55 bilhões em exportações do setor. No mesmo ano, a atividade Agropecuária (lavouras e pecuária) cresceu 15,1% em volume, impulsionando o PIB nacional. Com isso, o agronegócio brasileiro (incluindo insumos, produção, agroindústria e serviços) passou a representar cerca de 23,8% do PIB do país em 2023. Este desempenho excepcional deve-se principalmente a safras recordes e à expansão da produtividade em diversas cadeias produtivas, consolidando o Brasil como líder global em vários produtos agropecuários.

No entanto, a produtividade agrícola brasileira ainda enfrenta diversos desafios para se manter competitiva e sustentável. Um desses desafios é a ocorrência de estresses bióticos e abióticos que afetam negativamente o rendimento das culturas. Os estresses bióticos são causados por organismos vivos que interagem com as plantas de forma prejudicial, como pragas, doenças e plantas daninhas. Já os estresses abióticos são causados por fatores ambientais que limitam o crescimento das plantas ou induzem danos fisiológicos, ou morfológicos nas mesmas. Alguns exemplos de estresses abióticos são: seca, salinidade, temperatura, luz e metais pesados (Lanna et al., 2021).

Para garantir a segurança alimentar a uma população crescente, é essencial estabelecer estratégias eficazes de manejo e controle integrado de pragas e doenças de plantas. O trigo, que fornece mais de 20% das calorias e proteínas da dieta humana, é um exemplo crítico. Anualmente, patógenos e pragas causam uma redução de 20% na produção global. Em outras culturas esses valores podem ser ainda maiores, como o arroz (31,3%), milho (30,1%) e batata (32,0%). As perdas variam dependendo da cultura e da localização. No entanto, estudos recentes indicam que regiões com déficit alimentar e populações em crescimento acelerado enfrentam perdas mais frequentemente, especialmente onde pragas e doenças estão emergindo ou reemergindo (Savary et al., 2019).

Diante desse cenário, é fundamental investir em estratégias para aumentar a resistência ou a tolerância das plantas aos estresses. Uma dessas estratégias é a biotecnologia aplicada à agricultura. A biotecnologia consiste no uso de técnicas que permitem manipular organismos vivos ou seus componentes para obter produtos ou processos úteis para o homem (Wieczorek, 2003). A biotecnologia pode contribuir para melhorar a produtividade agrícola por meio da geração de cultivares transgênicas ou geneticamente modificadas (GM), que possuem genes introduzidos artificialmente que conferem características desejáveis às plantas (Buckwell & Moxey, 1990). Entretanto, antes de qualquer modificação genética, é essencial identificar os genes e as vias moleculares envolvidas na imunidade vegetal.

Neste sentido, a prospecção e identificação de genes de defesa oriundos de plantas silvestres é uma estratégia promissora. Essas plantas mantêm uma relação de coevolução com patógenos e, por isso, são consideradas uma importante fonte de diversidade genética e resistência.

Muitos genes contribuem para a proteção das plantas contra condições adversas externas. Estes incluem genes relacionados à defesa contra estresse biótico, como os genes *R*, que interagem diretamente de maneira específica com os genes *Avr* dos patógenos, bem como genes que proporcionam defesa contra estresse abiótico, auxiliando as plantas a tolerar condições ambientais desfavoráveis (Dodds, 2023; Fitzgerald et al., 2011).

O gênero *Arachis*, que compreende cerca de 80 espécies silvestres além da espécie cultivada *Arachis hypogaea* L., representa uma fonte promissora de genes de resistência, devido à sua adaptação natural a condições ambientais adversas e à sua rica diversidade genética (Bertioli et al., 2016; Brasileiro et al., 2015). A exploração dessa diversidade pode contribuir significativamente para o desenvolvimento de cultivares mais resilientes, especialmente frente aos desafios impostos pelas mudanças climáticas e à crescente demanda por alimentos.

Apesar dos avanços recentes na identificação de genes de resistência em culturas comerciais, ainda existem lacunas significativas no conhecimento sobre os mecanismos moleculares ativados após a inserção de transgenes, sobretudo em contextos de múltiplos estresses. Poucos estudos avaliaram de forma abrangente os impactos funcionais desses genes em plantas transgênicas submetidas simultaneamente a fatores bióticos e abióticos, mesmo em espécies-modelo como *Arabidopsis thaliana*. Essa limitação compromete a aplicação eficiente desses genes em programas de melhoramento genético.

Diante desse cenário, este estudo objetivou identificar e analisar o comportamento de genes candidatos relacionados à defesa provenientes de espécies silvestres de *Arachis sp.* sob diferentes condições de estresse biótico e abiótico. Utilizando a planta modelo *Arabidopsis*

*thaliana* em interação com os patógenos *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* e *Meloidogyne incognita*, foram aplicadas técnicas de transformação gênica, fenotipagem e sequenciamento de transcritos para avaliar a resposta de diversas categorias de genes de resistência e defesa frente aos danos causados por esses estresses, isoladamente e em combinação com seca. A análise funcional dos genes *AsTIR19*, um NLR truncado de *Arachis stenosperma*, e *AdEXLB8*, uma proteína expansina de *A. duranensis*, revelou mudanças transcricionais significativas, indicando seu potencial no aprimoramento da tolerância das plantas a múltiplos desafios ambientais. Dessa forma, os achados deste trabalho podem contribuir para estratégias mais eficazes de melhoramento genético, com o objetivo de obter cultivares mais produtivas e adaptadas a cenários agrícolas cada vez mais adversos.



## OBJETIVO GERAL

Investigar os mecanismos moleculares e fenotípicos associados à superexpressão de genes candidatos de resistência provenientes de espécies silvestres de *Arachis* em resposta a estresses bióticos e abióticos na planta modelo *A. thaliana*, visando compreender suas funções na modulação das respostas de defesa vegetal.

### 3.1. Objetivos específicos

- a) Caracterizar a resposta fisiológica e molecular de *Arabidopsis thaliana* superexpressando genes candidatos associados à resistência contra estresses bióticos e abióticos, avaliando sua influência nos mecanismos de defesa da planta.
- b) Avaliar a interação entre *A. thaliana* transgênica e o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*, analisando a ativação de respostas imunes e os impactos no desenvolvimento da doença.
- c) Identificar de que forma os genes estudados conferem maior eficácia na resistência a múltiplos estresses, correlacionando suas funções biológicas com a capacidade de indução das defesas da planta.
- d) Examinar os padrões de expressão de genes reguladores das principais vias de defesa hormonal, como ácido salicílico (SA), jasmonato (JA), etileno (ET) e ácido abscísico (ABA), para elucidar os mecanismos moleculares acionados pela superexpressão dos genes estudados.
- e) Investigar a interação entre estresses bióticos e abióticos em plantas transgênicas, analisando possíveis efeitos sinérgicos ou antagônicos na resposta da planta, com foco nos mecanismos de *crosstalk* entre as vias de defesa hormonal.
- f) Investigar as redes de coexpressão gênicas associadas aos genes de defesa, utilizando análise dos dados transcriptômicos para identificar genes moduladores e possíveis vias secundárias envolvidas na resposta ao estresse.

## REVISÃO DE LITERATURA

A agricultura enfrenta desafios crescentes devido a fatores como mudanças climáticas, disseminação de patógenos e práticas agrícolas intensivas. Esses fatores impactam diretamente a produtividade agrícola, com estresses bióticos e abióticos frequentemente interagindo de maneira sinérgica, agravando os danos às plantas. Para lidar com essas ameaças, plantas possuem sistemas imunológicos complexos que integram redes de percepção, sinalização e resposta molecular. Entender como essas redes operam é fundamental para o desenvolvimento de estratégias que aumentem a resiliência das culturas agrícolas.

Entre os mecanismos de defesa das plantas, destacam-se os sistemas baseados em proteínas NLR (Nucleotide-binding site Leucine-rich repeat), que reconhecem efetores patogênicos e desencadeiam fortes respostas de defesa. Paralelamente, outras proteínas como as expansinas têm sido associadas à adaptação estrutural e metabólica frente a estresses bióticos e abióticos, sugerindo que sua modulação também pode conferir vantagens em cenários de estresse combinado.

A crescente aplicação de ferramentas moleculares, como RNA-Seq, permitiu avanços significativos na caracterização e manipulação de genes relacionados à imunidade e à adaptação ao estresse em plantas. Isso tem possibilitado não apenas a compreensão dos mecanismos de defesa vegetal, mas também a implementação de estratégias para aumentar a tolerância a ambientes adversos.

No entanto, as interações entre diferentes estresses e a plasticidade molecular associada a esses ainda são pouco exploradas. Este capítulo revisa a literatura sobre os principais mecanismos de defesa vegetal contra patógenos e estresses abióticos, bem como o papel de genes NLR e expansinas.

### 4.1 Impacto provocados por fungos na agricultura global

Em 2023, a série norte-americana "*The Last of Us*", produzida pela HBO, foi uma das produções mais indicadas ao Emmy. A narrativa da série retrata um cenário distópico, no qual um fungo disseminado globalmente leva o mundo ao caos. Apesar de exagerada, a narrativa destaca um ponto real: os fungos são ameaças crescentes. Eles não apenas infectam seres humanos, causando diversas doenças, como também afetam significativamente a agricultura. Podem destruir ecossistemas agrícolas inteiros, ameaçar a subsistência de milhões de pessoas e provocar crises sociais (Fisher et al., 2020).

Historicamente, fungos já causaram eventos catastróficos, como a fome da batata irlandesa no século XIX, provocada pelo fungo *Phytophthora infestans*. Esse episódio resultou na morte de aproximadamente um milhão de pessoas e levou à migração de milhões (Boyce, 2010). Atualmente, essas ameaças continuam relevantes. Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), a produção global de alimentos precisará aumentar em 50% até 2050 para atender à demanda crescente. No entanto, cerca de 40% das colheitas já são perdidas, a cada ano, devido a pragas e doenças. Tais perdas representam prejuízos estimados em US\$ 220 bilhões e a perda de alimentos suficientes para alimentar entre 600 milhões e 4 bilhões de pessoas a cada ano (FAO, 2023; Fisher et al., 2012; Stukenbrock and Gurr, 2023).

Adicionalmente, as perdas pós-colheita agravam a insegurança alimentar, especialmente em países em desenvolvimento com infraestrutura precária para distribuição. Estima-se que fungos sejam responsáveis por cerca de 50% dessas perdas, impactando significativamente as regiões mais vulneráveis (Stukenbrock & Gurr, 2023). Eventos climáticos extremos intensificam essa situação, favorecendo a proliferação de patógenos fúngicos, como *Fusarium oxysporum* que prosperam em ambientes quentes e úmidos (Sillmann & Sippel, 2020). Além disso, a globalização e o comércio internacional aceleram a disseminação dessas doenças, como visto na expansão do *F. oxysporum* raça tropical 4 (TR4) em plantações de banana e da ferrugem amarela (*Puccinia striiformis*) em lavouras de trigo, em áreas antes livres desses patógenos (Elad and Pertot, 2014; Ramya et al., 2015; Yadav et al., 2019a; IPCC, 2021).

Entre os fungos mais devastadores, *F. oxysporum* que se destaca por sua alta adaptabilidade e persistência no solo. Este fungo, destacado como um dos 10 mais importantes do mundo (Dean et al., 2012), infecta as plantas por meio das raízes. Ele causa a murcha vascular, uma doença que bloqueia o transporte de água e nutrientes. Como resultado, pode inutilizar áreas agrícolas por décadas (Michielse & Rep, 2009; García-Bastidas et al., 2019). Uma das cepas mais preocupantes é a TR4, que ameaça variedades de banana como a Cavendish, essencial para o comércio global (Dale et al., 2017; Siamak & Zheng, 2018). A disseminação dessa doença é agravada por diversos fatores. Entre eles, destacam-se a prática de monoculturas, o uso de técnicas agrícolas inadequadas e a ausência de cultivares resistentes. Esses fatores aumentam a pressão da doença e favorecem o surgimento de cepas mais agressivas (FAO, 2023; Singh et al., 2023).

## 4.2 *Fusarium oxysporum*

### *Características gerais, ciclo de vida e interação com plantas hospedeiras*

*F. oxysporum*, pertencente ao filo Ascomycota, é um fungo amplamente distribuído em solos agrícolas e reconhecido por seu impacto em diversas culturas de interesse econômico (Joshi, 2018; Rana et al., 2017). No ambiente, sobrevive como clamidósporos — estruturas espessas e altamente resistentes — capazes de persistir por anos, mesmo na ausência de hospedeiros. Sua habilidade de infectar uma ampla variedade de plantas o torna um dos agentes etiológicos mais relevantes no contexto de doenças vasculares. A murcha de *Fusarium* é um exemplo, afetando culturas essenciais como tomate, banana, algodão e melão. Essas infecções causam perdas expressivas de produtividade (Agrios, 2005; Gordon, 2017).

O complexo de *F. oxysporum* é constituído por inúmeras linhagens com distintos graus de especialização. Variam desde formas saprofíticas até patógenos altamente adaptados, classificados em mais de 100 *formae speciales* (f. sp.), cada uma com especificidade por determinados hospedeiros vegetais (Gordon & Martyn, 1997). Exemplos incluem *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, que afeta tomateiros, e f. sp. *cubense*, agente do Mal do Panamá em bananeiras (Ordonez et al., 2015; Edel-Hermann & Lecomte, 2019; Srinivas et al., 2019). Embora sejam morfológicamente similares, essas linhagens especializadas nem sempre pertencem a grupos monofiléticos. Isso indica que a capacidade de patogenicidade pode ter surgido de forma convergente, por meio de eventos evolutivos independentes (Arroyo-García et al., 2003; van Dam & Rep, 2017).

Essa plasticidade adaptativa tem sido atribuída à ocorrência de transferência horizontal de cromossomos acessórios — segmentos genômicos que codificam genes relacionados à virulência (van Dam & Rep, 2017). Tais cromossomos não são universais, mas sua aquisição pode conferir patogenicidade a linhagens antes saprofíticas. Em *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol), por exemplo, a introdução experimental desses cromossomos em cepas não patogênicas resultou na aquisição da capacidade de causar doença em tomate (Ma et al., 2010). Estudos filogenéticos recentes sugerem uma divisão do complexo *F. oxysporum* (FOSC) em dois grandes grupos, PS1 e PS2, sendo este último associado à maioria das linhagens patogênicas (Laurence et al., 2014).

O ciclo de vida de *F. oxysporum* é exclusivamente assexuado (anamorfo), sem evidências da existência de estágio sexual (teleomorfo) (Gordon, 2017). O fungo produz macroconídios (alongados e multisseptados, em esporodóquios), microconídios (menores,

elípticos, de hifas aéreas) e clamidósporos (espessos e arredondados). Enquanto macro e microconídios atuam na dispersão — por água, solo, ferramentas ou vetores — os clamidósporos asseguram a sobrevivência em ausência de hospedeiros (Ajmal et al., 2023).

A infecção tem início na rizosfera, onde esporos são ativados por exsudatos radiculares (Turrà & Di Pietro, 2015). A penetração ocorre por regiões jovens da raiz, ferimentos ou pontos de emergência, sendo facilitada pela ação de enzimas hidrolíticas (CWDEs), como pectinases, poligalacturonases e xilanases. Além disso, proteases e lipases degradam componentes estruturais das células vegetais. Embora essas enzimas sejam importantes, estudos com mutantes indicam que a deleção de genes individuais raramente elimina a virulência, mas mutações combinadas podem reduzi-la significativamente. Por exemplo, a inativação simultânea dos genes *PG1* (*polygalacturonase 1*) e *PGX6* (*polygalacturonase X6*) reduziu a agressividade em tomateiros. Fatores regulatórios como *SNF1* e os fatores de transcrição *CTF1/CTF2* controlam a expressão desses genes (Di Pietro et al., 2003a).

Outro componente-chave da patogenicidade são os metabólitos secundários. O ácido fusárico é produzido por várias *formae speciales* de *Fusarium*. Ele atua aumentando a permeabilidade das membranas celulares, quelando íons metálicos essenciais e desregulando o equilíbrio hídrico das plantas (Bacon et al., 1996; López-Díaz et al., 2018). Em *Musa* spp., sua ação pode reduzir a condutância estomática em até 40%, agravando os sintomas de murcha e clorose (Dong et al., 2012). A síntese do ácido fusárico é controlada por um cluster gênico denominado *FUB*. A deleção de genes como *FUB1* e *FUB4* compromete severamente a colonização do xilema (Brown et al., 2015; Liu et al., 2020; Niehaus et al., 2014). Além das toxinas, *Fusarium oxysporum* secreta proteínas efetoras, com destaque para as *Secreted in Xylem* (SIX), identificadas em isolados que infectam tomate (Van der Does et al., 2008). Pelo menos nove genes *SIX* foram descritos, como *SIX1*, *SIX3*, *SIX5* e *SIX8*. A deleção desses genes reduz significativamente a virulência (Ma et al., 2015; Jangir et al., 2021). Em *Arabidopsis*, proteínas como *SIX8* e *PSE1* suprimem a produção de camalexina, favorecendo a infecção (Ayukawa et al., 2021).

Efetores enzimáticos também atuam na neutralização das defesas do hospedeiro. Proteases como *Mep1* e *Sep1* degradam quitinases do tomateiro, enquanto a metaloprotease *M35\_1* inibe enzimas similares em bananeiras, suprimindo respostas de hipersensibilidade (Jashni et al., 2015; Zhang et al., 2021). Um efector recentemente caracterizado, *FolSCP1*, interage com a proteína *SIPR5* (defensiva) do tomateiro, bloqueando sua atividade antifúngica (Qian et al., 2025).

Ainda que o papel de algumas micotoxinas, como beauvericina e moniliformina, na indução da murcha vascular permaneça incerto, estudos indicam efeitos citotóxicos relevantes (Mallebrera et al., 2018). Essas substâncias são produtos do metabolismo secundário de *Fusarium oxysporum* e outras espécies do gênero, frequentemente associados à patogenicidade e à modulação das respostas da planta hospedeira (Moretti et al., 2019). A beauvericina, por exemplo, induz apoptose em células vegetais, promovendo fragmentação de DNA e colapso celular (Paciolla et al., 2004). Já a moniliformina pode afetar negativamente o desenvolvimento vegetal, reduzindo a eficiência dos pigmentos fotossintéticos, inibindo a formação de folhas e diminuindo a biomassa de plântulas (Perincherry et al., 2019).

Adicionalmente, estudos recentes apontam que *F. oxysporum* também modula o sinalizador gasoso óxido nítrico (NO) durante a infecção: genes relacionados à síntese e destoxificação de NO são induzidos em *F. oxysporum* f. sp. *cubense* ao infectar banana, e mutantes deficientes na produção de NO apresentaram virulência reduzida (L.-J. Ma et al., 2023).

Estabelecido no xilema, o patógeno se espalha sistemicamente pelos vasos condutores. A infecção vascular leva à obstrução dos vasos por hifas e esporos. Além disso, as próprias respostas de defesa da planta contribuem para essa obstrução, incluindo a formação de tiloses, o depósito de gomas e o acúmulo de compostos fenólicos. Esses processos agravam os sintomas de murcha (Di Pietro et al., 2003). Os sinais típicos incluem escurecimento vascular, murcha epinástica das folhas, clorose, necrose marginal e, sob condições favoráveis (25–30 °C e alta umidade), a morte completa da planta (Beckman & Roberts, 1995). Em *Musa* spp., o Mal do Panamá compromete rizomas e pseudocaules, inviabilizando a planta e encerrando o ciclo do fungo com a formação de novos esporos nos restos vegetais (Ploetz, 2015).

Além das ações diretas sobre a parede celular e os tecidos vasculares, *F. oxysporum* manipula intensamente a sinalização hormonal das plantas hospedeiras. Durante a infecção, o fungo promove a expressão de genes relacionados à biossíntese e transporte de auxina, criando um ambiente fisiológico favorável à sua colonização. Plantas com vias de auxina comprometidas tendem a apresentar maior resistência, reforçando o papel desse hormônio na suscetibilidade (Kidd et al., 2011). Além disso, o patógeno secreta efetores que mimetizam hormônios vegetais, interferindo diretamente nas rotas de sinalização e dificultando o reconhecimento pelo sistema imune (Kamoun & Zipfel, 2016; Patkar & Naqvi, 2017).

Análises realizadas com o modelo *Arabidopsis thaliana*–Fo5176 demonstraram que essa cepa fúngica secreta JA-Ile, um conjugado ativo do ácido jasmônico, que ativa o receptor COI1 da planta. Com isso, o patógeno subverte a via de defesa mediada por jasmonato,

promovendo sintomas como a murcha. Plantas mutantes para *coi1* apresentaram resistência aumentada, sugerindo que essa manipulação hormonal é uma estratégia eficiente de fuga do patógeno (Cole et al., 2014; Wang et al., 2022).

O controle da murcha de *Fusarium* representa um desafio persistente. Métodos convencionais, como rotação de culturas e solarização do solo, mostram eficácia limitada devido à longevidade dos clamidósporos (Klein et al., 2011). Por isso, estratégias integradas são indispensáveis. Entre as estratégias mais eficazes está o uso de cultivares resistentes. Em tomateiros, destacam-se aquelas que contêm os genes *I-1* a *I-7* (Catanzariti et al., 2015; Gonzalez-Cendales et al., 2016). Em bananeiras, o gene *RGA2-3* tem se mostrado promissor (Dale et al., 2017). Avanços em biotecnologia também permitiram a aplicação de silenciamento gênico via RNA de interferência (RNAi). A supressão de genes como *PEX6* e *GAS1* conferiu resistência significativa a plantas transgênicas, sem efeitos indesejados (Tetorya & Rajam, 2021).

Além disso, o controle biológico com *Trichoderma* spp. tem se mostrado promissor, atuando por mecanismos de competição, antibiose e indução de resistência sistêmica (Haque et al., 2025). A correta gestão dos resíduos culturais é essencial, visto que restos infectados servem como fonte contínua de inóculo. Por fim, práticas agrícolas que favorecem a dispersão do patógeno — como irrigação superficial e transporte de solo contaminado — devem ser rigidamente controladas (Agrios, 2005).

### *Mecanismos Imunológicos e Estratégias de Subversão de F. oxysporum na planta hospedeira*

O sucesso da infecção por *Fusarium oxysporum* está intrinsecamente ligado à capacidade do fungo de interferir nas defesas da planta hospedeira, subvertendo uma rede complexa de respostas imunológicas que se ativam desde os primeiros estágios da colonização. A entrada inicial do patógeno ocorre no córtex radicular, onde as hifas se expandem intercelularmente e, em alguns casos, penetram diretamente as paredes celulares. Esse processo envolve dois mecanismos principais: a ação mecânica e a secreção de enzimas hidrolíticas. Essas enzimas degradam componentes estruturais da parede celular, permitindo que o fungo avance até o xilema e estabeleça a infecção sistêmica (Bani et al., 2018).

A imunidade vegetal é geralmente ativada pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), como fragmentos de quitina presentes na parede celular

fúngica. Esses sinais são percebidos por receptores de padrão, como AtLYK5, que se associam a AtCERK1 e desencadeiam cascatas de sinalização intracelular (Cao et al., 2014). Essa ativação resulta na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , ativação de MAPKs e indução de genes de defesa (Chang et al., 2022). Proteínas fúngicas como FocCP1, da família cerato-platanina, funcionam como elicitores adicionais, promovendo a deposição de calose e o fortalecimento da parede celular (Li et al., 2019).

Contudo, muitos patógenos, incluindo *F. oxysporum*, desenvolveram estratégias para mascarar ou inibir esses sinais iniciais. Quando o reconhecimento de PAMPs é comprometido, a planta recorre a uma segunda camada de defesa: o reconhecimento de DAMPs (padrões associados a dano celular). Fragmentos derivados da degradação da parede celular vegetal, como pectinas desmetiladas, servem como sinais de alarme endógenos. Esses DAMPs são detectados por sensores especializados presentes na planta. Entre eles estão *RFOI*, membros da família *WAK* (*WAK1*, *WAK3*, *WAK10*), *THESEUS1*, *MIK2* e *FER* (Bacete et al., 2018; Hématy et al., 2009). O receptor RLK7, por exemplo, reconhece o peptídeo endógeno PIP1 e ativa a oxidase NADPH RbohF, estimulando respostas imunes mesmo na ausência de PAMPs clássicos (Hou et al., 2014).

Paralelamente, a família de peptídeos endógenos SCOOP também desempenha papel central na intensificação da imunidade. Em *Arabidopsis thaliana*, os SCOOPs são reconhecidos pela quinase MIK2, que se associa ao co-receptor BAK1, promovendo a produção de ROS, a deposição de calose e a expressão de genes antimicrobianos (Rhodes et al., 2021; Stahl et al., 2022). Além disso, a sinalização via SCOOP-MIK2 está associada à biossíntese de ácido jasmônico (JA) e glucosinolatos de indol, reforçando a resistência contra patógenos radiculares como *F. oxysporum* e contra herbívoros.

Curiosamente, proteomas de *F. oxysporum* revelaram a presença de peptídeos análogos aos SCOOPs, denominados FoSCOOPs. Embora esses mimetizadores ativem respostas imunes pela mesma via MIK2/BAK1, linhagens mutantes desprovidas desses peptídeos apresentaram maior virulência em *A. thaliana*. Esses dados sugerem que a planta, ao reconhecer erroneamente um "falso alarme", pode, na verdade, expor o patógeno à sua própria vigilância (Rhodes et al., 2021).

É nesse contexto de vigilância celular que *F. oxysporum* aplica uma de suas estratégias de subversão mais sofisticadas: a secreção do peptídeo f-RALF. Essa molécula mimetiza os peptídeos endógenos da planta da família RALF sendo percebida pelo receptor FERONIA (FER). A ativação desses sensores desencadeia uma série de respostas fisiológicas. Entre elas, estão a alcalinização do apoplasto, a inibição da bomba  $\text{H}^+$ -ATPase e a redução da síntese de



celulose. Esses processos promovem uma reconfiguração da parede celular, favorecendo a penetração do fungo (Masachis et al., 2016; Srivastava et al., 2024). Um fenômeno análogo é observado em *Fusarium graminearum*, cujo peptídeo FgRALF interage diretamente com o domínio extracelular de FER e suprime a imunidade mediada por PAMPs. A superexpressão desse domínio em *A. thaliana* demonstrou reverter os efeitos imunossupressores e conferir resistência ao patógeno (Wang et al., 2024b).

Além do reconhecimento molecular, a regulação hormonal desempenha papel crucial na coordenação das defesas vegetais. Ácido salicílico (SA), ácido jasmônico (JA) e etileno (ET) constituem os principais eixos hormonais de resposta, atuando de forma sinérgica ou antagônica conforme o tipo de patógeno. O SA está relacionado à resistência contra biotróficos e à ativação da resistência sistêmica adquirida (SAR), enquanto JA e ET são mais efetivos contra necrotróficos. O ácido abscísico (ABA), embora tradicionalmente associado a estresses abióticos, exerce papel ambíguo na infecção por *F. oxysporum*, reprimindo genes como *PDF1.2* e *PR4* e favorecendo o progresso do patógeno.

Em *A. thaliana*, a resposta hormonal à infecção é espacialmente organizada no sistema radicular. O ácido salicílico (SA) se acumula próximo aos focos de infecção, induzindo barreiras físicas e a morte celular programada (HR). O jasmonato (JA) atua em zonas periféricas, preparando os tecidos ainda não invadidos. Já o etileno (ET) integra esses sinais, coordenando uma resposta coesa (Calabria et al., 2025; Wang et al., 2022).

Outras moléculas, como a proteína SIPR1, também participam da defesa. Embora não tenha ação antifúngica direta, sua expressão precoce ativa as vias de SA e JA. Além disso, leva à liberação do peptídeo CAPE1, um sinalizador sistêmico derivado da extremidade C-terminal da proteína (Li et al., 2023).

Por fim, estudos transcriptômicos e metabolômicos mostram que, em interações incompatíveis, a planta passa por uma reprogramação intensa de seu metabolismo secundário. Compostos como terpenoides, fenóis e alcaloides são produzidos em maior quantidade, acompanhados por um ajuste fino do equilíbrio redox. Fatores de transcrição como ERF1 e ERF14, além de componentes do complexo Mediator, são ativados em infecções por *Fo5176*, ligando as vias hormonais à regulação transcricional da imunidade (Hernández-Aparicio et al., 2021; Upasani et al., 2017; Wang et al., 2022). A complexa integração hormonal desencadeada durante a resposta imune é ilustrada na Figura 1, a qual resume os principais sinalizadores, receptores e fatores de transcrição ativados durante a infecção por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, com destaque para o papel das vias de SA, JA, ET e ABA (Wang et al., 2022).

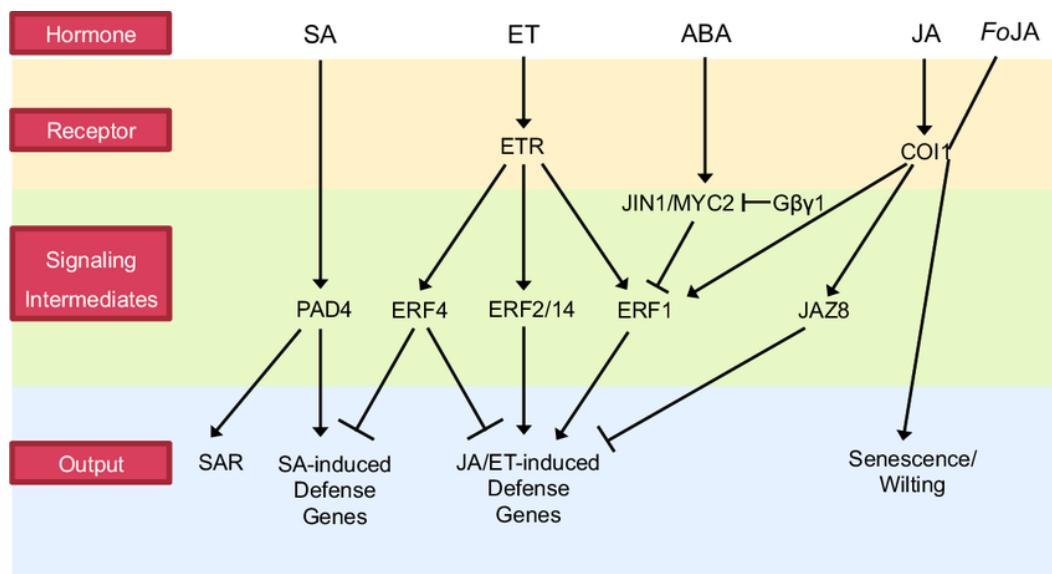


FIGURA 1. Rede hormonal envolvida na defesa contra *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fo5176). Os diferentes hormônios (SA, ET, ABA, JA e FoJA) estão representados na parte superior. Abaixo, são mostrados os receptores identificados, os intermediários de sinalização e, por fim, os principais fatores de transcrição associados à resposta imune. As setas pretas indicam efeitos positivos, enquanto as linhas com barra indicam efeitos inibitórios (Wang et al. 2022).

### 4.3 Nematoides-das-galhas (*Meloidogyne* spp.)

Os nematoides-das-galhas (*Meloidogyne* spp.) são patógenos altamente devastadores na agricultura mundial, responsáveis por perdas anuais estimadas em cerca de 350 bilhões de dólares (Abd-Elgawad & Askary, 2015). Essas espécies parasitam mais de 3.000 tipos de plantas hospedeiras, provocando alterações fisiológicas e morfológicas que reduzem drasticamente a produtividade vegetal (J. T. Jones et al., 2013; Sikandar et al., 2020). Dentro desse grupo, *Meloidogyne incognita* destaca-se como devido à sua ampla gama de hospedeiros economicamente importantes, incluindo soja, algodão e tomate (Fourie et al., 2015; Oso Adeola Abiola, 2020; D. Wang et al., 2022).

Diversos fatores agravam o risco representado pelos nematoides. O modelo agrícola baseado em monoculturas sucessivas favorece a proliferação e o aumento das infestações por nematoides, já que a ausência de rotação de culturas mantém um suprimento constante de hospedeiros suscetíveis, permitindo que as populações nematoides se multipliquem sem controle efetivo (Krueger & McSorley, 2008; Neher et al., 2019).

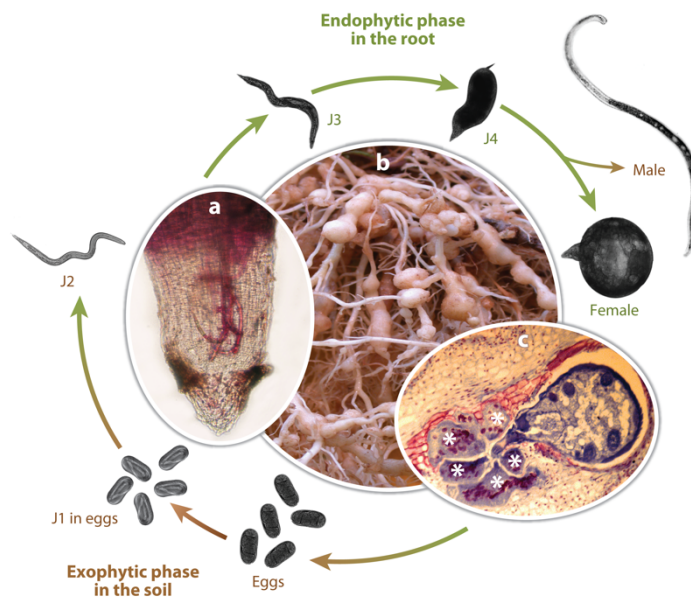
Além disso, as mudanças climáticas globais têm ampliado significativamente a distribuição geográfica e a agressividade dos nematoides fitoparasitas. O aumento das

temperaturas médias facilita a expansão desses patógenos para regiões antes consideradas inadequadas ao seu desenvolvimento, resultando na invasão de novas áreas agrícolas (Dutta and Phani, 2023). Adicionalmente, temperaturas elevadas podem intensificar a virulência de algumas espécies de nematoides, tornando-as mais agressivas e aumentando os danos às culturas hospedeiras, mesmo sem uma elevação proporcional na taxa reprodutiva (Khanal & Land, 2023). Tais fatores, aliados ao uso intensivo de monoculturas, têm contribuído para o agravamento das perdas agrícolas associadas aos nematoides, ressaltando a importância de estratégias de manejo mais sustentáveis e eficientes. Por outro lado, o uso de nematicidas químicos enfrenta restrições cada vez maiores. Isso se deve aos impactos ambientais negativos e às regulamentações mais rigorosas. Essa limitação acompanha uma tendência mundial de redução do uso de pesticidas sintéticos na agricultura (Dutta & Phani, 2023).

Diante desse cenário, surge a necessidade de alternativas sustentáveis de controle que reduzam a população de nematoides fitos parasitas em campo sem a dependência de nematicidas químicos. Este contexto reforça a relevância de pesquisas voltadas à compreensão dos mecanismos de resistência e à identificação de genes de resistência a nematoides, como caminho para soluções sustentáveis de proteção de cultivos de importância global.

#### *Ciclo de vida de *M. incognita* e infecção e sintomatologia provocados nas plantas hospedeiras*

O ciclo de vida de *M. incognita* dura entre três e seis semanas, passando pelas fases de ovo, juvenis (J2, J3, J4) e adulto. Juvenis de segundo estágio (J2), após eclosão no solo, migram até as raízes, penetrando principalmente na zona de alongamento radicular. Neste estágio, os patógenos secretam enzimas hidrolíticas, como celulasas e pectinases. Essas enzimas degradam a parede celular da planta, facilitando sua invasão (Castagnone-Sereno et al., 2013; Sikandar et al., 2020; Subedi et al., 2020). Após a penetração, induzem a formação de células gigantes (GCs) no protoxilema radicular, estruturas que favorecem a nutrição do nematoide. Estas células resultam de divisões nucleares sem citocinese, formando galhas que interferem na absorção de água e nutrientes pela planta hospedeira (M. G. K. Jones & Goto, 2011). As fêmeas adultas sedentárias produzem ovos em massas gelatinosas, enquanto machos, formados predominantemente sob condições adversas, tornam-se móveis e abandonam o hospedeiro (Khan et al., 2023; Oliveira et al., 2024) (FIGURA 2). A infecção por *M. incognita* frequentemente facilita também a entrada de outros patógenos, agravando os danos provocados às plantas (Sikandar et al., 2020).



Castagnone-Sereno P, et al. 2013.  
Annu. Rev. Phytopathol. 51:203–20

FIGURA 2. Ciclo de vida de um nematoide-das-galhas radiculares. (a) Seção longitudinal de uma ponta de raiz mostrando juvenis de segundo estágio (J2s) girando no meristema para migrar ao cilindro vascular. (b) Sintomas típicos (galhas) em raízes de tomate. (c) Seção longitudinal de uma raiz infestada, mostrando uma fêmea madura e cinco células gigantes (\*) constituindo o local de alimentação do nematoide (Castagnone-Sereno et al., 2013)

Plantas infectadas frequentemente exibem sintomas como amarelecimento foliar, crescimento atrofiado, murcha e, em casos graves, morte. Esses sintomas muitas vezes são confundidos com deficiências nutricionais, que ocorrem de fato devido à redução na absorção de água e nutrientes pelas raízes danificadas. Raízes infectadas apresentam galhas características, maior ramificação e menor comprimento (Castagnone-Sereno et al., 2013; Tapia-Vázquez et al., 2022).

#### *Aspectos moleculares da invasão a planta hospedeira*

O sucesso de *M. incognita* está relacionado à secreção de proteínas efetoras que suprimem respostas imunes e alteram o ciclo celular (Mitchum et al., 2013). Proteínas efetoras específicas de *M. incognita*, como *Minc03328*, *Mi-EFF1* e *MiISE6*, podem suprimir vias hormonais de defesa — principalmente a via de JA — e modular expansinas e hidrolases,

favorecendo a formação das células gigantes (Shi et al., 2018; Godinho Mendes et al., 2021; Moreira et al., 2022). Em plantas de *Arabidopsis thaliana* transformadas com RNA de interferência (RNAi) contra o gene *Minc03328*, houve redução significativa no número e no tamanho das galhas. Também foram observadas alterações na ontogênese das células gigantes, que apresentaram menor conteúdo citoplasmático, além de desorganização morfológica do nematoide, incluindo a deterioração da cutícula (Moreira et al., 2022).

Estudos moleculares recentes demonstraram que, durante a interação compatível entre *M. incognita* e tomate, ocorre uma reprogramação significativa no transcriptoma e spliceoma das plantas hospedeiras. Aos quatro dias pós-infecção (dpi), cerca de 63,5% dos genes diferencialmente expressos (DEGs) em galhas também apresentam regulação nas células adjacentes, indicando uma coordenação mediada por espécies reativas de oxigênio (ROS), pequenos peptídeos, hormônios e RNAs não codificantes. Aos 11 dpi, essa coordenação reduz-se para 19%, sugerindo priorização dos recursos da planta hospedeira para sustentar o nematoide. Genes associados à sinalização do ácido jasmônico (JA) são enriquecidos enquanto os relacionados a auxinas e citocininas são suprimidos, destacando o papel central do JA na comunicação sistêmica e transporte de nutrientes. Cerca de 800 fatores de transcrição (TFs), incluindo bHLH, MYB, WRKY e TGA, apresentam expressão diferencial durante a interação. Em particular, a repressão de TGA evita a ativação de respostas de defesa, enquanto a superexpressão de TFs da família E2F, associados à progressão do ciclo celular, promove divisões celulares atípicas e aumento da ploidia nuclear, eventos que favorecem a formação das galhas. Foram identificados 9.064 eventos de splicing alternativo (AS), com predominância de retenção de íntrons (IR) e uso diferencial de éxons (DUE). Esses eventos foram mais frequentes nas células adjacentes aos 4 dias após a infecção (dpi). Eles ajustam a funcionalidade de diversas proteínas, incluindo peroxidases, modulando a resposta ao estresse oxidativo (Ozdemir et al., 2024).

Em conjunto, os mecanismos moleculares que regulam a formação de galhas induzidas por nematoides envolvem uma complexa interação entre o controle do ciclo celular, a sinalização mediada por RNA e o transporte de membranas. Genes relacionados ao ciclo celular, como *MYB3R4* e *CYCBI*, são ativados nas galhas, e a inativação ou mutação desses genes resulta em uma redução significativa na sua formação, evidenciando seu papel crucial. Além disso, genes envolvidos na biogênese de microRNAs, como *AGO7*, e no transporte de membranas, como *ARA6* e *VPS9A*, desempenham papéis essenciais nesse processo de formação das galhas. A reprogramação de genes associados à vasculatura e ao meristema é fundamental

para o desenvolvimento e a manutenção das galhas. Genes como *CUC2* e *KNAT1* participam desse processo, garantindo o suprimento de nutrientes (Suzuki et al., 2021).

### *Mecanismos de defesa das plantas a M. incognita*

Quando uma planta é atacada por *M. incognita*, diversas respostas de defesa são iniciadas. Entre os primeiros mecanismos de resistência, destaca-se a ativação da via dos fenilpropanoides, responsável pela síntese de metabólitos como lignina, fitoalexinas e flavonoides, que atuam na contenção do patógeno. A lignina, por exemplo, deposita-se nas paredes celulares das raízes, conferindo um reforço mecânico que dificulta a penetração e a migração do nematoide nos tecidos vegetais (Singh et al., 2019). Estudos demonstram que genótipos resistentes, como os portadores dos genes *Mi-1.2* e *Mi-3*, exibem uma intensa ativação dessa via metabólica, mediada pela expressão de genes reguladores (PAL e POD) que codificam enzimas essenciais para a biossíntese desses compostos (Du et al., 2020; Li et al., 2018).

Em paralelo, é frequentemente montado um *burst oxidativo* – caracterizado pela produção rápida de espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO). Enquanto as ROS (e.g., peróxido de hidrogênio e ânion superóxido) danificam diretamente o nematoide, atuam também como moléculas sinalizadoras, induzindo respostas de defesa sistêmicas. Para evitar toxicidade celular, plantas resistentes modulam essa resposta por meio de antioxidantes como  $\alpha$ -tocoferol e enzimas (e.g., catalases e superóxido dismutases), que neutralizam o excesso de radicais livres, garantindo proteção ao tecido vegetal adjacente (Zhao et al., 2021; Yang et al., 2023). Esse equilíbrio entre defesa e manutenção celular pode ser observado em *Arachis*, onde níveis elevados de  $\alpha$ -tocoferol foram detectados nas raízes após a infecção pelo nematoide.

Além dessas estratégias metabólicas, a regulação hormonal desempenha um papel crucial na defesa contra *M. incognita*, com destaque para ácido salicílico (SA), jasmonato (JA) e etileno (ET). O SA está associado à resistência sistêmica adquirida contra patógenos biotróficos, como nematoides formadores de galhas, enquanto JA e ET respondem a danos celulares e necrotrofia (Sikder et al., 2021). Em genótipos resistentes, a ativação coordenada ou sequencial dessas vias determina o equilíbrio entre crescimento e defesa (Zou et al., 2023).

A intensidade e a sequência dessa ativação hormonal variam entre espécies, resultando em diferentes graus de resistência ao nematoide. Em *Arachis*, por exemplo, a interação entre SA, JA e ET modula a expressão de fatores de transcrição (*WRKY*, *MYB*), que reprimem genes de crescimento (*GFR*), impedindo a formação de sítios de alimentação do nematoide (Arraes et al., 2022).

Um efeito semelhante pode ser observado em *Cucumis metuliferus*, em que a via mediada por cálcio, SA e JA regula o crescimento celular, reduzindo o tamanho das células gigantes e a proliferação dos nematoides. Embora os juvenis de *M. incognita* consigam penetrar nas raízes dessa espécie, eles não conseguem estabelecer um sítio de alimentação funcional, pois as células infectadas entram em degeneração precoce. Esse mecanismo de resistência pós-penetração incentiva o uso de *C. metuliferus* como porta-enxerto para culturas comerciais de cucurbitáceas (X. Li et al., 2021).

Diferentemente dessas espécies, em *Phaseolus vulgaris*, a resposta inicial ao ataque de *M. incognita* envolve a sinalização por JA e ET, mas, ao longo da infecção, essas vias são reprimidas, permitindo a formação de células gigantes (Santini et al., 2016). No entanto, genótipos resistentes vêm sendo identificados em programas de melhoramento, caracterizados por menor formação de galhas e redução da reprodução do nematoide. Esses genótipos apresentam maior atividade de enzimas de defesa, como quitinases e peroxidases, além do acúmulo de compostos fenólicos nas raízes após a infecção – um padrão de resposta semelhante ao observado em outras espécies resistentes.

Embora não seja uma cultura agrícola, *Arabidopsis thaliana* tem sido amplamente utilizada como modelo para estudar a resistência molecular a nematoides devido à sua ampla caracterização genética, ciclo de vida curto, facilidade de transformação genética e disponibilidade de ferramentas bioinformáticas robustas. Além disso, *A. thaliana* permite uma análise detalhada dos efeitos moleculares do transgene em um sistema experimental bem estabelecido, sendo frequentemente utilizada para estudos de validação funcional de genes de outras espécies. Nessas plantas a infecção por *M. incognita* altera a expressão de genes associados às vias de SA, JA e ET, incluindo *WRKY19* e *DSCI*, que regulam tanto a arquitetura radicular quanto as respostas de defesa (Warmerdam et al., 2020; Araujo et al., 2021). Curiosamente, plantas com resistência elevada frequentemente apresentam modificações na morfologia das raízes, como redução no crescimento da raiz principal e aumento das ramificações laterais. Essas alterações podem ser uma estratégia adaptativa para compensar os danos locais e garantir a absorção de nutrientes pelas raízes não afetadas.

Além disso, em *A. thaliana*, a sinalização mediada por brassinosteroides, via o fator de transcrição *BZR1*, regula genes de transporte hormonal (*PIN3*, *PIN4*) e de plasticidade celular (*EXPA1*), influenciando diretamente o desenvolvimento do nematoide (Warmerdam et al., 2018). Outra descoberta interessante foi o efeito dos exsudatos radiculares na regulação de genes do nematoide, como *P66E1* e *P57E2*, que afetam sua migração e estabelecimento (Teillet et al., 2013). Além disso, proteínas defensivas contribuem para dificultar a formação das células

gigantes. Entre elas, destacam-se os inibidores de pectinesterase e as proteínas ligantes ao cálcio. Essas moléculas tornam o ambiente menos propício ao desenvolvimento do parasita (Wang et al., 2018).

No tomate, o fator *SLWRKY80* organiza rotas de defesa mediadas por SA, JA, ET e ROS, promovendo apoptose celular controlada e regulando proteínas defensivas (PR1 e PR2). Além disso, a regulação via microRNAs (como miR172 e miR167a-3p) modula fatores ARF8 e os módulos miR396-GRF, afetando a formação de galhas (Luo et al., 2024). O tomate é uma das espécies modelo no estudo de resistência a nematoides, notadamente pela presença do gene de resistência *Mi-1* em alguns cultivares, que confere resistência a certas raças de *M. incognita*. Em tomates resistentes, um dos efeitos observados da ativação das defesas é a interrupção do desenvolvimento normal das células gigantes (*giant cells*) que o nematoide induz para se alimentar. Essas células nutritivas, que em plantas suscetíveis se desenvolvem de modo abundante e sustentam o parasita, são restritas em plantas resistentes – seja por meio de uma resposta hipersensitiva localizada que leva à degradação dessas células, seja por alterações hormonais que desfavorecem sua formação. Além disso, verifica-se no tomate resistente uma repressão de genes ligados ao transporte de solutos nas raízes infectadas. Ao reduzir a expressão de transportadores de açúcares, aminoácidos e outros nutrientes em torno do sítio de infecção, a planta dificulta o redirecionamento de recursos para o nematoide. Essencialmente, o tomate “sabota” o abastecimento nutricional das galhas, limitando o crescimento do nematoide. Esses mecanismos, aliados à ativação clássica de genes de defesa (como os genes codificantes de quitinases,  $\beta$ -1,3-glucanases e proteínas relacionadas à patogênese), tornam o tomate com *Mi-1* capaz de resistir à infestação.

Em *N. tabacum* também apresenta resistência genética contra *M. incognita*, conferida pelo gene *Rkl*. Esse gene desencadeia uma resposta hipersensitiva no local de penetração do nematoide, levando à morte das células infestadas e impedindo a formação de galhas viáveis. Além disso, modificações estruturais, como a deposição localizada de calose, lignina e suberina, formam barreiras físicas que restringem a progressão do nematoide nos tecidos vegetais (Sato et al., 2021).

Além das respostas morfológicas e bioquímicas, mecanismos regulatórios ao nível epigenético também desempenham um papel crucial na resistência vegetal. A modificação epitranscricional também emerge como essencial na interação planta nematóide. Em soja, a regulação de m6A influencia vias de proteção da planta. Esse processo afeta genes como *BBE-like 28* e *POD47*, associados ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) e à ativação precoce das defesas (Han et al., 2022).



Além dos mecanismos genéticos já descritos, a modificação epitranscricional tem sido identificada como um fator essencial na interação planta-nematoide. Em soja, por exemplo, já foi demonstrado que a regulação de *m6A* influencia vias de proteção e genes como *BBE-like 28* e *POD47*, associados ao acúmulo de ROS e à ativação precoce das defesas (Han et al., 2022). Esse tipo de modulação permite uma resposta mais ajustável às infecções, o que pode ser vantajoso em ambientes variáveis.

No entanto, apesar dos avanços no entendimento e na identificação de mecanismos de resistência a *M. incognita*, ainda existem diversos desafios para sua aplicação ampla na agricultura. Muitos dos genes de resistência apresentam eficácia restrita a determinadas raças fisiológicas do nematoide, podendo perder funcionalidade diante de populações variantes do patógeno ou sob condições ambientais adversas. Por exemplo, a resistência conferida por *Mi-1* no tomate pode ser suprimida sob altas temperaturas. Além disso, a maioria dos mecanismos de defesa é poligênica e complexa, dificultando a introdução dessas características em novas cultivares por meio de cruzamentos tradicionais. Outro fator limitante é o custo fisiológico da ativação constante de defesas, que pode afetar o crescimento da planta – um equilíbrio que precisa ser cuidadosamente manejado no melhoramento genético.

Diante desses desafios, as abordagens biotecnológicas oferecem novos caminhos para potencializar a resistência das plantas a *M. incognita*. A edição gênica via CRISPR/Cas9 já está sendo utilizada como uma ferramenta importante para desenvolver cultivares resistentes de forma mais precisa e rápida. Com essa tecnologia, é possível, por exemplo, desativar genes de suscetibilidade no hospedeiro, impedindo que o nematoide estabeleça um sítio de alimentação viável. Um bom exemplo dessa estratégia foi demonstrado em *A. thaliana*, onde o nocaute do gene *AtAAP6* reduziu significativamente a multiplicação do nematoide sem comprometer o desenvolvimento da planta (Dutta et al., 2024). Além disso, a edição gênica pode ser utilizada para otimizar vias de defesa já existentes, aumentando a expressão de fatores-chave, como certos *WRKY*, *NPR1* ou enzimas da biossíntese de lignina, nos momentos e locais adequados para impedir a formação das galhas.

Vale destacar que, além da edição gênica, estratégias transgênicas clássicas continuam sendo investigadas como alternativas complementares à resistência genética natural. A expressão de inibidores de enzimas digestivas de nematoides ou o uso de RNA interferente (RNAi) para silenciar genes essenciais do patógeno são abordagens permanecendo em desenvolvimento e podem ser combinadas com outras estratégias (Mani et al., 2020; Papolu et al., 2013).

Entretanto, o controle eficaz de *M. incognita* provavelmente dependerá de uma abordagem integrada, combinando cultivares geneticamente resistentes com boas práticas de manejo agrícola. Medidas como a rotação de culturas com espécies não hospedeiras ou resistentes, o uso de adubos verdes e a aplicação de agentes de controle biológico podem reduzir significativamente a pressão dos nematoides no campo. Entre esses agentes, destacam-se fungos e bactérias nematófagos (Mendes et al., 2022; Jayakumar et al., 2023).

À medida que pesquisas genéticas e moleculares avançam no entendimento das interações planta-nematoide, espera-se o desenvolvimento de marcadores moleculares para seleção assistida e novas formas de controle baseadas no estímulo às defesas naturais das plantas. Em suma, a exploração e a aplicação dos mecanismos de resistência a *M. incognita* representam um passo importante para minimizar as perdas agrícolas causadas por esse patógeno, promovendo assim uma agricultura mais sustentável.

#### **4.4 Respostas Moleculares em Plantas Sob Estresse abiótico**

A agricultura enfrenta desafios crescentes devido às mudanças climáticas, as quais intensificam estresses abióticos, como seca, salinidade e variações extremas de temperatura. Esses fatores frequentemente atuam de forma combinada, resultando em impactos fisiológicos sobrepostos que agravam as condições de cultivo (Palmgren & Shabala, 2024).

No Brasil, esses problemas são particularmente evidentes em regiões como o Semiárido, onde a escassez hídrica e a salinização dos solos representam desafios históricos. Eventos recentes, como as ondas de calor extremo e a seca de 2022, causaram sérios prejuízos à safra de grãos nas regiões Sul e Centro-Oeste. Esses impactos evidenciam um risco iminente à segurança alimentar (EMBRAPA, 2023; Junges et al., 2022). Além disso, o uso intensivo de fertilizantes, aliado a práticas agrícolas pouco sustentáveis, contribui para a salinização de solos e a eutrofização de corpos hídricos, afetando ainda mais a produtividade agrícola (Pandian et al., 2024). A disponibilidade cada vez mais sazonal de chuvas torna esse problema ainda mais grave. Diante desse cenário, torna-se essencial compreender os mecanismos moleculares que permitem às plantas detectar e responder ao déficit hídrico, ajustando sua fisiologia para minimizar os impactos do estresse ambiental.

A resposta inicial ao déficit hídrico começa com a percepção de sinais ambientais. Sensores localizados na membrana plasmática detectam alterações na pressão de turgescência e no potencial osmótico. Esses sinais ativam cascatas de sinalização que envolvem íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), espécies reativas de oxigênio (ROS) e o ácido abscísico (ABA) (X. Yang et al., 2021).

O aumento dos níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ , frequentemente mediado por canais de cálcio ou pela sinalização induzida por ROS, desempenha papel crucial na ativação de vias de transdução de sinal. Entre essas vias destacam-se as quinases do tipo Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs), fundamentais para regular a expressão gênica, modular funções proteicas e coordenar respostas adaptativas a estímulos ambientais (Marcec et al., 2019).

O ABA exerce função central na resposta ao déficit hídrico, coordenando adaptações fisiológicas, como o fechamento estomático, além de respostas moleculares de longo prazo. Em condições de seca, sua síntese é rapidamente intensificada, ativando receptores PYR/PYL/RCAR, que inibem fosfatases PP2C. Como consequência, quinases SnRK2 são ativadas e fosforilam fatores de transcrição como AREB/ABF, responsáveis pela regulação de genes voltados à síntese de osmólitos, proteínas antioxidantes e proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant) (G. K. Rai et al., 2024).

Embora o ABA seja o principal regulador da resposta ao déficit hídrico, outros hormônios também participam desse processo. Auxinas, citocininas, etileno e jasmonatos integram redes de *crosstalk*, influenciando respostas adaptativas e ajustando a fisiologia da planta ao estresse. Por exemplo, a inibição de citocininas durante a seca favorece o aprofundamento radicular, enquanto o etileno atua em sinergia com o ABA no fechamento estomático e na regulação antioxidante (Tanaka et al., 2006). Além de coordenar adaptações fisiológicas, esses hormônios modulam a produção e o efeito das espécies reativas de oxigênio (ROS), que atuam tanto como moléculas sinalizadoras quanto como agentes de estresse oxidativo. (Baxter et al., 2014). Durante a seca, a planta ativa sistemas antioxidantes para manter a homeostase redox. Entre eles estão a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e enzimas do ciclo ascorbato-glutationa. Esses mecanismos ajudam a equilibrar o estado redox celular (Caverzan et al., 2016).

Vários fatores de transcrição (TFs) desempenham um papel central na regulação de genes responsivos ao estresse abiótico, interagindo com vias de sinalização que coordenam respostas adaptativas. Alguns dos principais TFs envolvidos em respostas de estresse estão elencados na tabela 1.

Tabela 1. Fatores de transcrição modulados por estresses abióticos

Fator de Transcrição	Vias de Ativação	Funções Principais	Referências
<b>DREB (DRE-binding)</b>	Via independente de ABA Reconhece elemento DRE/CRT	Expressão de proteínas LEA, osmólitos e outras moléculas protetoras Resposta a desidratação, frio e calor	(Q. Liu et al., 1998; Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 1994)
<b>AREB/ABF (ABRE-binding)</b>	Induzido por ABA Fosforilado por SnRK2	Fechamento estomático Equilíbrio osmótico Síntese de antioxidantes	(Fujita et al., 2011; Warsi et al., 2023)
<b>NAC</b>	Crosstalk com ABA e outros hormônios Ativado em resposta a estresses bióticos e abióticos	Remodelação da parede celular Desenvolvimento radicular Homeostase iônica Redução de danos oxidativos	(Han et al., 2023; Nakashima et al., 2012)
<b>HSFs (Heat Stress)</b>	Ativado por estresse térmico e outros estresses abióticos Reconhece elementos HSE em promotores	Regula a expressão de proteínas de choque térmico (HSPs) Contribui para a tolerância ao calor, salinidade e seca Modulação da homeostase celular	(M. Guo et al., 2016)
<b>bZIP</b>	Ativação dependente de ABA Fosforilação por SnRK2 e quinases dependentes de cálcio Modulação por ubiquitinação	Regulação de genes associados a tolerância ao estresse hídrico, salino e térmico Atuação em adaptações morfológicas e estabilidade proteica Induz a transcrição de genes responsivos à seca, controlando o acúmulo de ROS e proteínas	(Z. Guo et al., 2024; Kim, 2006)
<b>WRKY</b>	Respostas mediadas por ABA Interação com elementos W-box em promotores	Regula a expressão de genes relacionados a estresses bióticos e abióticos por meio da inibição do fechamento estomático, Promove melhor eliminação de ROS e regulação positiva da expressão gênica relacionada ao estresse	(Ge et al., 2024)
<b>C2H2 ZF (Zat)</b>	Induzido por vias de sinalização dependentes e independentes de ABA e via de sinalização MAPK	Múltiplas respostas ao estresse abiótico, incluindo seca, frio, salinidade e estresse oxidativo. Aumenta os níveis de peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) e promove maior atividade da enzima catalase (CAT)	(Y. ; Liu et al., 2022; A. C. Rai et al., 2013)
<b>MYB</b>	Modulado por splicing alternativo é influenciado em respostas ao ABA	Atua no crosstalk entre auxina e ABA, promovendo o crescimento de raízes laterais Controlam abertura e fechamento e estômatos em resposta à seca. Modula a biossíntese de componentes da parede celular Regula metabolismo lipídico	(Baldoni et al., 2015; Zhao et al., 2018)

A ativação desses TFs ocorre por mecanismos como fosforilações mediadas por SnRK2, modulando a expressão de genes envolvidos na síntese de osmólitos, antioxidantes e proteínas estruturais (Z. Ma et al., 2024; Yoshida et al., 2010). Em condições de seca, por exemplo, o ABA induz a ativação de AREB/ABF e colabora com NAC na regulação de genes relacionados à senescência e adaptação radicular (Fujita et al., 2011; Tran et al., 2007). Já o DREB, essencial na resposta ao estresse osmótico e térmico, promove a estabilidade de membranas e proteínas, regulado por modificações pós-traducionais, como fosforilações e interações com ubiquitinas (Morimoto et al., 2013, 2017). Além disso, a ativação de TFs também depende de proteínas reguladoras, como *INDUCER OF CBF EXPRESSION 1* (ICE1) e transdutores de sinalização de cálcio (CAMTA), que, por meio de modificações pós-traducionais, ajustam rapidamente a expressão gênica em resposta ao estresse (Hirayama & Shinozaki, 2010).

A ativação desses fatores de transcrição não apenas modula a expressão gênica, mas também desencadeia mudanças metabólicas essenciais para a sobrevivência sob estresse. Durante condições adversas, as plantas otimizam o uso de seus recursos energéticos, priorizando mecanismos de proteção. O fechamento estomático, característico do estresse hídrico, reduz a concentração de CO<sub>2</sub> nas células, impactando a fotossíntese e alterando os níveis de carboidratos. Estes, por sua vez, atuam como substratos para a biossíntese de biomoléculas essenciais, como osmoprotetores e estabilizadores de membranas, além de funcionarem como sinalizadores na percepção do estresse e na regulação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Zandalinas et al., 2022).

As respostas das plantas a estresses bióticos e abióticos são altamente complexas, envolvendo vias de sinalização interligadas que frequentemente compartilham genes de defesa. Embora existam mecanismos comuns, cada tipo de estresse — ou sua combinação — desencadeia uma reprogramação transcricional específica, influenciando a suscetibilidade da planta a novos desafios ambientais (Nejat & Mantri, 2017). Para lidar com essas condições, as plantas ativam mecanismos de tolerância em múltiplos níveis, desde ajustes moleculares até modificações anatômicas e morfológicas. Entre essas respostas, a produção de metabólitos secundários desempenha um papel essencial na regulação das interações planta-ambiente. Compostos como carboidratos, aminoácidos, fenólicos, polióis, poliaminas e lipídios ajudam a manter a homeostase celular, protegendo as plantas contra danos osmóticos e oxidativos. Além disso, hormônios como ABA, auxinas, citocininas e etileno coordenam o crescimento e o desenvolvimento, permitindo ajustes fisiológicos conforme a intensidade do estresse (Erb & Kliebenstein, 2020).

Outro componente crucial dessa adaptação é a síntese de proteínas de estresse, como as *heat shock proteins* (HSPs), que garantem a estabilidade proteica sob condições adversas. Essas chaperonas impedem a agregação de proteínas desnaturadas e facilitam sua refoltação, preservando a funcionalidade celular (Ortbauer, 2013). Além dessas mudanças bioquímicas, a resposta ao estresse pode ser modulada por mecanismos epigenéticos, como metilação de DNA, modificações de histonas e alterações na cromatina. Essas modificações não alteram a sequência do DNA, mas afetam a acessibilidade dos genes e a taxa de transcrição, podendo ser herdadas e contribuir para a adaptação de longo prazo a ambientes desfavoráveis (Mirouze & Paszkowski, 2011 ;Sahu et al., 2013). Paralelamente, algumas plantas podem desenvolver mutações somáticas induzidas pelo estresse, um fenômeno conhecido como mutação dirigida, que pode conferir vantagens adaptativas sob pressão ambiental (Belfield et al., 2021).

Além dessas mudanças regulatórias, as plantas contam com outro nível de adaptação: a plasticidade fenotípica. Esse mecanismo, caracterizado pela capacidade de modificar o fenótipo sem alteração no genótipo, é essencial para respostas rápidas em ambientes imprevisíveis (Nicotra et al., 2010). Adicionalmente, a interferência por RNA (RNAi) desempenha um papel fundamental no ajuste da expressão gênica em condições de estresse. Esse mecanismo promove o silenciamento pós-transcricional (PTGS) via RNAs de fita dupla (dsRNAs), regulando a expressão de genes específicos envolvidos na resposta ao estresse. Estudos mostram que a indução de RNAi pode aumentar a tolerância ao estresse. No tomate, por exemplo, a inibição do gene *SLAIM1* resultou em maior resistência à salinidade e ao estresse oxidativo. Também foram observados ajustes na sensibilidade ao ABA e no transporte de íons  $\text{Na}^+$  (AbuQamar et al., 2009).

Entre os reguladores centrais da resposta ao estresse, destacam-se as *Mitogen-Activated Protein Kinases* (MAPKs), que atuam na transdução de sinais ambientais. Em *Arabidopsis*, genes como *MPK2*, *MPK3*, *MPK4*, *MPK5*, *MPK12* e *MKK4* apresentam indução específica ao estresse hídrico, participando de vias de resposta que modulam a expressão gênica e ajustam a fisiologia da planta (Kumar et al., 2020; Ma et al., 2017). A ativação dessas quinases é regulada por mecanismos como co-localização, ação de fosfatases e sinalização lipídica, garantindo que as respostas ao estresse sejam ajustadas de forma dinâmica e eficiente.

Para superar os desafios impostos pelas mudanças climáticas, diversas estratégias têm sido desenvolvidas, incluindo melhoramento genético, reintrodução de genes de espécies selvagens e edição genética via CRISPR/Cas9. Essas abordagens têm sido exploradas para produzir cultivares mais tolerantes a condições extremas (Bohra et al., 2022). No entanto, a resistência ao estresse abiótico é um fenômeno multigênico e altamente complexo, exigindo

uma compreensão aprofundada dos mecanismos moleculares e fisiológicos envolvidos (Vandenbroucke & Metzlauff, 2013). Portanto, o investimento contínuo em pesquisa e inovação é essencial para mitigar os impactos climáticos na agricultura, garantindo a segurança alimentar e promovendo sistemas produtivos que garantam a segurança alimentar global.

#### **4.5 Respostas Moleculares a Estresses Combinados**

Plantas submetidas a múltiplos estresses abióticos ou bióticos apresentam respostas fenotípicas e padrões de expressão gênica diferentes daqueles observados sob estresses isolados. Em *Marchantia polymorpha*, por exemplo, sete estresses abióticos testados de forma individual e em 19 combinações ativaram conjuntos de genes exclusivos, evidenciando mecanismos adaptativos específicos (Tan et al., 2023). O mesmo autor apontou ainda que estresses ambientais como calor, frio e escuridão, afetam um número maior de genes diferencialmente expressos (DEGs) do que estresses químicos, como sal e manitol. Em cenários de estresse combinado, é comum que um dos fatores domine a resposta transcricional da planta.

A meta-análise de Mota et al. (2021) em espécies de *Arachis* submetidas a seca e nematoides das galhas (RKN) reforçou essa especificidade: apenas 7,2% dos genes responsivos ao estresse duplo foram previstos a partir de respostas isoladas, sugerindo vias exclusivas para lidar com múltiplos desafios. Já Berens et al. (2019) demonstraram que, em *A. thaliana*, folhas jovens priorizam respostas a estresses bióticos e folhas mais velhas focam em estresses abióticos, orquestradas pela sinalização via ácido salicílico (SA). De maneira semelhante, estudos com diferentes ecótipos de *A. thaliana* apontaram que cerca de 61% das alterações no transcriptoma sob estresses combinados não são antecipadas pelas respostas a estresses únicos (Rasmussen et al., 2013).

Zandalinas et al. (2021) destacaram que, mesmo estresses leves, quando combinados, podem interagir de forma sinérgica e causar danos graves ao crescimento e sobrevivência, refletindo a complexidade das condições ambientais naturais. A homeostase de ferro e espécies reativas de oxigênio (ROS) foi apontada como fundamental na adaptação a esses cenários multifatoriais, com proteínas como *AtNEET* atuando na regulação desses processos. Sewelam et al. (2021) também observaram que calor combinado com estresse osmótico suprime importantes vias de defesa mediadas por SA e JA/ET, aumentando a suscetibilidade a patógenos (*Pseudomonas syringae* e *Botrytis cinerea*).

A pré-exposição a certos estresses pode melhorar a tolerância a desafios subsequentes. Holness et al. (2023) demonstraram que *A. thaliana* exposta à alta luminosidade (HL) exibe “*priming* transcricional” contra seca, intensificando genes associados ao estresse oxidativo e à homeostase celular. Esse efeito envolve vias dependentes e independentes de ABA, além de marca epigenética H3K4me3, indicando memória de estresse. De forma semelhante, Coolen et al. (2016) mostraram que, em estresses sequenciais (por exemplo, infecção fúngica, herbivoria e seca), o transcriptoma se adapta rapidamente ao último fator, mas mantém assinaturas moleculares do inicial, ressaltando a importância do *priming*.

Mooney et al. (2024) investigaram ainda como a hipóxia afeta a imunidade induzida por PAMPs em *A. thaliana*, mostrando uma supressão de genes de defesa (por exemplo, *FLS2* e *EFR*) e de eventos-chave como fosforilação de MAPKs. Embora haja sobreposição entre genes regulados por hipóxia e flg22, surgem também respostas únicas sob combinação.

Os impactos de múltiplos estresses vão além da regulação transcricional e afetam diretamente o balanço hormonal das plantas. Entre os principais hormônios envolvidos, ABA, JA e ET desempenham papéis centrais na adaptação a estresses combinados. O balanço entre ABA, JA e ET é um fator determinante na adaptação a estresses combinados. Em *Arachis*, a seca ativa ABA, enquanto a infestação por RKN mobiliza JA e ET. Em *A. thaliana*, sob infecção por *Pseudomonas syringae* e déficit hídrico, a baixa disponibilidade de água inibe a multiplicação bacteriana, induzindo genes como *AtNCED3* (síntese de ABA) e *AtPR5* (defesa), enquanto fatores supressores, como *AtNAC1*, são reprimidos (Gupta et al., 2016).

A priorização de respostas a fatores bióticos ou abióticos pode mudar conforme a severidade. Por exemplo, quando seca e herbivoria ocorrem simultaneamente, *A. thaliana* ativa mais fortemente genes relacionados à seca, redirecionando recursos para a sobrevivência em detrimento de respostas ao inseto (Atkinson et al., 2013). Ainda assim, certas rotas de defesa podem ser mantidas, a depender da intensidade de cada estresse e dos sinais moleculares envolvidos (Sewelam et al., 2021).

Além dos hormônios, fatores de transcrição (TFs) como MYB, bHLH, WRKY e AP2 têm papel central na integração das vias de sinalização cruzadas (Biniaz et al., 2022; Barah et al., 2015). Estudos sobre redes regulatórias (GRNs) em *A. thaliana* sob diferentes combinações de estresse identificaram 3429 genes diferencialmente expressos, dos quais 294 codificam fatores de transcrição (TFs) envolvidos na regulação metabólica e defesa (Barah et al., 2015).

Nesses cenários combinados, grande parte das respostas transcricionais não pode ser prevista pelos efeitos de cada estresse isolado (Tan et al., 2023; Rasmussen et al., 2013). A análise de interação proteína-proteína (PPI) revelou hubs cruciais, como *CBP60g* e *MPK11*



(para estresses bióticos) e subunidades de ATP sintase e NADH desidrogenase (para estresses abióticos), bem como genes com expressão elevada e papéis centrais na adaptação, a exemplo de *AT2G44890* (citocromo P450) e *AT5G59720* (proteína de choque térmico 18.2) (Biniaz et al., 2022).

A consolidação dessas descobertas indica que estresses combinados podem gerar respostas únicas e muitas vezes imprevisíveis, distintas das respostas observadas em estresses isolados. Compreender os processos moleculares e redes regulatórias é fundamental para desenvolver estratégias que aumentem a resiliência das plantas, garantindo maior sustentabilidade agrícola e segurança alimentar em um mundo onde múltiplos estresses ocorrem com frequência crescente (Zandalinas et al., 2021; Mooney et al., 2024).

#### **4.6 Efeito de *Priming* em Plantas Transgênicas Superexpressando Genes de Defesa**

O *priming* em plantas é caracterizado como um mecanismo adaptativo que permite à planta responder de forma mais rápida e eficaz a estresses bióticos e abióticos após uma exposição inicial a sinais ambientais, como elicitores, patógenos atenuados ou compostos químicos. O processo é frequentemente comparado à vacinação em animais por induzir um estado de prontidão metabólica sem a ativação completa das defesas, otimizando o uso energético até que um novo desafio ocorra (Conrath, 2009; Cooper & Ton, 2022).

O *priming* pode ser descrito em três fases interdependentes. Na fase pré-desafio, a planta estabelece um estado latente por meio de alterações epigenéticas e moleculares — como metilação do DNA, modificações em histonas e acúmulo de proteínas sinalizadoras, incluindo MAP quinases e fatores de transcrição — que mantêm genes de defesa em prontidão. Quando ocorre um novo estresse, inicia-se a fase de desafio, na qual essa memória celular é ativada: há rápida geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), expressão ampliada de genes PR e mobilização coordenada de vias hormonais. Por fim, na fase transgeracional, parte dessas alterações é preservada e transmitida à progênie, estabelecendo uma forma de memória epigenética estável que prepara as gerações seguintes para estímulos semelhantes (Llorens et al., 2020).

Em nível molecular, o *priming* está associado ao acúmulo basal de proteínas-chave da defesa, incluindo MAP quinases (ex.: MPK3/6), fatores de transcrição como WRKY e NAC, e enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD). A ativação do sistema é frequentemente iniciada por um pulso transiente de cálcio citosólico, que leva à produção de

peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), atuando como segundo mensageiro em cascatas de sinalização. Entre elas, destaca-se a via mediada por MPK3/MPK6, que amplifica a transcrição de genes relacionados à resistência (PR), mesmo na ausência de infecção ativa — caracterizando o estado primado da célula (Beckers et al., 2009; Pastor-Fernández et al., 2022).

A regulação hormonal mediada por ácido salicílico (SA), jasmonato (JA) e ácido abscísico (ABA) é fundamental para o estabelecimento e manutenção do estado de priming. Esses hormônios interagem com mecanismos epigenéticos, como a trimetilação da lisina 4 na histona H3 (H3K4me3), que mantém genes de defesa em um estado de prontidão transcricional, facilitando sua rápida reativação durante um novo estresse (Jaskiewicz et al., 2011; Koça et al., 2020). Cascatas de sinalização MAPK, incluindo os módulos MEKK–MKK–MPK, atuam em conjunto com fatores de transcrição como DREB e HSF para integrar sinais hormonais e ambientais. Essa convergência de rotas permite uma resposta eficiente a diferentes tipos de estresse — biótico e abiótico — sem a necessidade de nova reprogramação transcricional a cada desafio (Ramesh et al., 2020).

A superexpressão de genes de defesa em plantas transgênicas tem sido amplamente empregada como estratégia para induzir priming constitutivo. Um exemplo amplamente estudado é a superexpressão do gene *NPR1* (*Non-Expresser of PR Genes 1*), regulador chave da via do ácido salicílico (SA), que induz um estado de ativação basal contínua e respostas rápidas à infecção, mesmo sem estímulo prévio (Conrath, 2009; Boscariol-Camargo et al., 2016). Esse mecanismo está associado à Resistência Sistêmica Adquirida (SAR), mediada por SA, na qual defesas são ativadas de forma sistêmica após uma infecção localizada (Durrant & Dong, 2004). Esse padrão foi observado em diferentes espécies frutíferas. Em *Citrus sinensis*, a expressão heteróloga de *AtNPR1* reduziu a carga bacteriana de *Huanglongbing* (HLB). Esse efeito foi atribuído à indução específica dos genes *PR2* e *EDS1*, ativados apenas após o desafio, o que minimizou os custos metabólicos (Dutt et al., 2015). Em contraste, em *Malus domestica*, a superexpressão de *MpNPR1* levou à supressão de sintomas independentemente da indução prévia, sugerindo especificidade espécie-dependente na regulação da SAR (Malnoy et al., 2007).

Além de *NPR1*, outros genes reguladores têm demonstrado capacidade de induzir priming constitutivo por mecanismos distintos, frequentemente mediados por vias hormonais alternativas. Um exemplo marcante é a superexpressão de *prosystemin* em tomateiro, que evidencia a plasticidade funcional desse processo. Peptídeos endógenos derivados de *prosystemin* ativam, de forma contínua, rotas de jasmonato, ácido salicílico e etileno,

promovendo resistência ampliada a diferentes patógenos, sem impactos negativos sobre o crescimento vegetativo (Coppola et al., 2015).

Entre os reguladores transcricionais envolvidos no priming, destacam-se os fatores da família WRKY, cuja atuação tem se mostrado central na integração de múltiplas rotas de defesa. Em *Arabidopsis thaliana*, a expressão constitutiva de *OsWRKY45* (oriundo de arroz) ativou genes PR e vias de ABA, conferindo resistência cruzada tanto a patógenos quanto a estresses abióticos, como a seca (Qiu & Yu, 2009). Padrões semelhantes foram observados em outras espécies: *SlWRKY6*, em tomateiro, regulou positivamente enzimas antioxidantes por meio da sinalização via ABA; já *MuWRKY3*, em amendoim, aumentou a tolerância à seca por meio da ativação de genes osmoprotetores (H. Chen et al., 2024; Reddy et al., 2018). Estudos mais recentes com *MdWRKY115* (maçã) e *PgWRKY52* (gramíneas) demonstraram uma integração eficaz entre ajuste hormonal (ABA e SA) e controle redox, resultando na redução do acúmulo de ROS sob condições de salinidade e déficit hídrico (Zhang et al., 2023).

Além de fatores transcricionais, componentes das vias de sinalização intracelular também contribuem para o estabelecimento do priming constitutivo. A superexpressão da quinase *MPK3* promoveu um estado de prontidão basal, com aumento na atividade de enzimas antioxidantes, como SOD e POD, e resistência simultânea a estresses bióticos (*ex.*: *Pseudomonas*) e abióticos (*ex.*: seca), sem impacto negativo sobre o crescimento (Soudani, 2024). Esses resultados destacam as MAP quinases como elementos centrais na integração de sinais de estresse durante a resposta primada.

De maneira semelhante, a superexpressão de genes antioxidantes, como *SOD2*, *CAT* e *GPX1*, tem sido usada para induzir um estado oxidativo basal, típico do priming funcional. Organismos modelo com expressão constitutiva desses genes apresentaram maior atividade redox e tolerância a agentes como peróxido de hidrogênio, radiação e xenobióticos, sugerindo que a homeostase oxidativa é um componente fundamental da resposta primada (Tavleeva et al., 2022).

Além dos genes clássicos de defesa, genes estruturais com funções não convencionais também influenciam o priming. A globina *GmGlb1-1*, de soja, reduziu a infecção por *Meloidogyne incognita* por meio do aumento basal de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e da indução de genes antioxidantes (Basso et al., 2022). De forma semelhante, a quitinase *AsECH1* (amendoim silvestre) ativou a NADPH oxidase *RbohD* e rotas de sinalização via JA e SA em tabaco, mesmo na ausência de infecção (da Silva Ferreira et al., 2024). Até genes ribossomais, como *ICT1* (subunidade S30),

demonstraram papel na resposta primada, ao promover o acúmulo de metabólitos com atividade antipatogênica em *Arabidopsis* (Finkelshtein et al., 2024).

Modificações estruturais na parede celular também têm sido associadas ao priming. Swaminathan et al. (2022) descreveram a atuação de enzimas ativas em carboidratos, como celulases e pectinases, na reorganização da matriz extracelular. Essa remodelação favorece a exposição de receptores de padrão (PRRs) e facilita a ativação de respostas de defesa, aumentando a sensibilidade da planta a sinais patogênicos. Dessa forma, alterações na parede celular funcionam como um componente físico adicional à memória imunológica vegetal.

Além dos genes individuais de defesa ou estruturais, estratégias de engenharia genética mais complexas têm se mostrado eficazes para induzir priming constitutivo. Guimarães et al. (2022) demonstraram que a superexpressão do gene truncado *AsTIR19*, isolado da espécie silvestre *Arachis stenosperma*, em tabaco transgênico, promoveu resistência sem comprometer o crescimento. Linhagens *OE-AsTIR19* apresentaram redução de até 50% na área de lesões causadas por *Sclerotinia sclerotiorum*, enquanto combinações com o gene *AdEXLB8* resultaram em reduções de até 57%. Microscopia revelou atraso no desenvolvimento do micélio e ramificações irregulares das hifas, indicando que o priming interfere desde os estágios iniciais da infecção.

A incorporação de mecanismos epigenéticos tem ampliado ainda mais as possibilidades dessa abordagem. Em *Solanum tuberosum*, a introdução de alelos *Rpi* manteve marcas de H3K4me3 em promotores de genes de defesa, acelerando a ativação de proteínas PR durante infecção por míldio (Yang et al., 2020). Já em *Arabidopsis*, a superexpressão de *MpDIR1(t)*, oriundo de *Marchantia polymorpha*, elevou níveis basais de SA, flavonoides e enzimas antioxidantes (SOD, POD, CAT), restringindo a colonização por *Pseudomonas syringae* sem efeitos adversos sobre o metabolismo (Duan et al., 2024).

Além das manipulações genéticas, compostos químicos têm sido utilizados para induzir priming sem alterar o genoma. A aplicação de  $\beta$ -aminobutirato (BABA), por exemplo, induz metilação de DNA e produção de pequenos RNAs (sRNAs) com papel sinalizador, preparando a planta contra *Botrytis cinerea* com efeitos persistentes por vários ciclos celulares (Stevens et al., 2025). Em tomateiro, BABA ativou SAR e marcas epigenéticas herdáveis por enxertia (Luna et al., 2017). Outros compostos, como oligossacarídeos de alginato (AOS), reduziram infecções por *Penicillium expansum* em peras, modulando enzimas de defesa (Dhanasekaran et al., 2025). Abordagens com microrganismos benéficos, como *Metarhizium brunneum*, também

ativaram mecanismos de defesa, como a produção de mirosinase em *Brassica*, aumentando a resistência a herbivoria (Carvalho Cachapa et al., 2020).

Moléculas endógenas como N-hidroxipípecólico (NHP) e o próprio ácido salicílico (SA) participam da manutenção do estado de defesa sistêmica. Ambas promovem a ativação de genes PR e estabilizam marcas epigenéticas em tecidos não infectados, consolidando a resposta sistêmica adquirida (SAR). A interação entre NHP e SA configura um sistema de defesa “treinado”, capaz de gerar respostas mais rápidas e eficazes frente a novos desafios (Hartmann & Zeier, 2019).

Apesar das vantagens adaptativas, o priming pode impor custos fisiológicos. Em *Arabidopsis*, BABA atrasou o florescimento e reduziu o diâmetro da roseta; já linhagens transgênicas com superexpressão de genes PR e *scavengers* de ROS apresentaram menor biomassa (van Hulten et al., 2006; Kim et al., 2025).

Ainda assim, os benefícios agrônômicos são substanciais. Plantas com *TaSOD* mantiveram crescimento estável sob seca e salinidade, enquanto *ApHIPP26* conferiu tolerância a metais pesados por meio da regulação redox (Ying et al., 2023; Zhou et al., 2023). Chaperonas moleculares como *OsHSP17.9* e *PgHSA2* também contribuíram para a manutenção da homeostase celular sob estresses térmicos e salinos, sem comprometer a produtividade (Kim et al., 2025).

Em síntese, as evidências apresentadas demonstram que intervenções baseadas em *priming* — seja por via genética, epigenética ou química — não apenas antecipam a ativação de defesas, mas também moldam circuitos moleculares duráveis, capazes de integrar múltiplos sinais de estresse com precisão regulatória. O conceito de “pré-condicionamento genético”, nesse contexto, não se limita a uma resposta acelerada, mas envolve reprogramações metabólicas e epigenéticas que estabilizam a memória imunológica sem comprometer o desenvolvimento. Ao explorar esses mecanismos, amplia-se o potencial de criar cultivares com resistência adaptativa de base ampla, capazes de responder a pressões ambientais complexas com menor custo fisiológico — uma perspectiva estratégica diante da crescente imprevisibilidade climática e da necessidade de garantir segurança alimentar em longo prazo (Cooper & Ton, 2022; Singh & Sharma, 2023).

#### 4.7 Parentes Silvestres de Cultivos (CWR) como fonte de genes de resistência

As plantas cultivadas atualmente são o resultado de milhares de anos de seleção artificial e domesticação, um processo conduzido pelo ser humano para maximizar características desejáveis, como produtividade e valor nutricional. No entanto, essa intensa pressão seletiva resultou na redução significativa da diversidade genética em muitas culturas, incluindo a perda de genes essenciais para a resistência e tolerância a estresses bióticos e abióticos (H. Zhang et al., 2017).

Os Parentes Silvestres de Cultivos (Crop Wild Relatives, CWRs) são plantas selvagens relacionadas a culturas agrícolas, amplamente reconhecidas como fontes de genes para o melhoramento genético. Esses CWRs podem ser definidos por dois conceitos principais. O primeiro, proposto por Harlan e de Wet (1971), que organiza os CWRs em três grupos (*GP-1 a GP-3*) com base na facilidade de intercâmbio genético com as plantas cultivadas, e o grupo taxonômico, definido por Maxted et al. (2006), que os categoriza com base na hierarquia evolutiva e taxonômica.

Crescendo e evoluindo em ambientes naturais constantemente expostos a uma variedade de patógenos, os CWRs desenvolveram uma ampla gama de mecanismos de defesa, muitos deles mediados por genes de resistência. A identificação e caracterização desses genes em plantas silvestres possibilitam sua aplicação no melhoramento genético de plantas cultivadas, contribuindo para o aumento da resistência a doenças (Harlan & Wet, 1971; Maxted et al., 2006; H. Zhang et al., 2017)

A incorporação de alelos de CWRs em cultivares comerciais tem sido amplamente utilizada para fortalecer a resistência genética. A proximidade entre essas espécies facilita sua introdução por métodos convencionais e biotecnológicos, ampliando a resiliência das culturas agrícolas (Z. Zhang et al., 2009). No trigo, um exemplo relevante é o gene *Pm66*, derivado da espécie selvagem *Aegilops longissima*, que conferiu resistência ao oídio, um dos principais patógenos da cultura (H. Li et al., 2020). No caso da batata, genes como *RB* e *Rpi-blb2*, provenientes de *Solanum bulbocastanum*, e *Rpi-vnt1.1*, de *S. venturii*, foram introduzidos em *Solanum tuberosum*, garantindo resistência à requeima causada por *Phytophthora infestans* (Ghislain et al., 2019). Na cultura da banana, a transferência do gene *RGA2*, de *Musa acuminata* ssp. *malaccensis*, para o subgrupo Cavendish proporcionou resistência ao mal do Panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raça tropical 4 – TR4) uma das maiores ameaças à produção global dessa cultura (Dale et al., 2017). De forma semelhante, na soja, a resistência à podridão da raiz e do caule causada por *Phytophthora sojae* foi atribuída ao locus *Rps11*,

identificado em uma variedade crioula e posteriormente incorporado em programas de melhoramento (W. Wang et al., 2021).

O amendoim cultivado (*Arachis hypogaea*) tem se beneficiado cada vez mais da incorporação de espécies silvestres aparentadas (CWRs) em programas de melhoramento genético, com destaque para *Arachis stenosperma* e *A. duranensis*, que demonstram ampla resistência a estresses bióticos e abióticos.

Dentre essas, *A. stenosperma* destaca-se como fonte relevante de resistência ao nematoide das galhas (*Meloidogyne arenaria*) (Guimarães et al., 2015).. Essa espécie apresenta quase imunidade ao patógeno, com QTLs mapeados nos cromossomos A02 e A09 que reduzem a reprodução do nematoide em até 98% (Leal-Bertioli et al., 2016; Ballén-Taborda et al., 2021, 2022). Em contraste à resistência baseada em um único gene proveniente de *A. cardenasii*, usada em cultivares como ‘Tifguard’, a resistência de *A. stenosperma* é poligênica e, portanto, mais durável. Esses QTLs foram com sucesso introgressados em linhagens elite por meio de retrocruzamento assistido por marcadores, recuperando características agrônômicas enquanto conferem resistência robusta. Essa espécie também oferece resistência significativa a doenças fúngicas como a mancha foliar precoce e tardia (*Passalora arachidicola*, *Nothopassalora personata*) e à ferrugem do amendoim (*Puccinia arachidis*) (Guimarães et al., 2012). Recentemente, um segmento cromossômico de *A. stenosperma* foi associado à resistência à mancha foliar tardia em linhagens cultivadas (Pan et al., 2024).

Outro exemplo é a resistência ao mofo branco (*Athelia rolfsii*), em que híbridos alotetraploides contendo *A. stenosperma* demonstraram resistência significativamente superior. O híbrido ValSten1, por exemplo, permitiu o mapeamento de dois QTLs de resistência oriundos do genoma silvestre (Tsai et al., 2024). Embora alguns alelos deletérios também tenham sido identificados, o estudo fornece marcadores úteis para seleção. *A. stenosperma* também demonstrou potencial contra o Vírus da Murcha Manchada do Tomate (TSWV). O acesso V10309 apresentou a menor taxa de infecção entre dez espécies silvestres testadas, e seu híbrido derivado (ValSten1) manteve baixos níveis de infecção (Y. J. Chen et al., 2023). Já *A. duranensis* contribuiu com redução nos danos de alimentação por tripses, sugerindo efeitos de antixenose ou antibiose.

Comparações transcriptômicas entre espécies reforçam suas especializações ecológicas. *A. stenosperma* induz transcritos de defesa (como peroxidases e quitinases) em resposta a patógenos, enquanto *A. duranensis* ativa genes relacionados à resposta osmótica sob seca (Guimarães et al., 2012). Um gene notável é *AsECH1*, uma endoquitinase de *A. stenosperma*, que foi induzida tanto por infecção de nematoides quanto por seca. Sua superexpressão reduziu

a infecção em ~30% e melhorou a recuperação da seca em *Arabidopsis* transgênica (Mota et al., 2021).

Entretanto, é *A. duranensis* que se consolida como fonte privilegiada de resistência a estresses abióticos, principalmente à seca (Brasileiro et al., 2015). Em estufa e campo, seus acessos superam o amendoim cultivado em produtividade e recuperação sob déficit hídrico (Guimarães et al., 2012; Pokhrel et al., 2024). As plantas acumulam mais osmoprotetores, apresentam maior atividade antioxidante e menor peroxidação lipídica. Genes envolvidos na sinalização por ABA, fechamento estomático e compostos protetores são fortemente induzidos (Thoppurathu et al., 2022). Fatores de transcrição como *AdWRKY* e *NF-YA* já foram funcionalmente validados (Y. Zhang et al., 2022; D. Kumar & Kirti, 2023).

Adicionalmente, *A. duranensis* apresenta tolerância à salinidade. Acessos mantêm crescimento e teor de clorofila superiores sob estresse salino, e genes como antiportadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  e fatores NAC são induzidos (Joshi et al., 2024; Bera et al., 2013). Essa espécie também mostra adaptação a diferentes altitudes e condições climáticas. Estudos de genômica da paisagem identificaram SNPs correlacionados com variações de temperatura e precipitação, sugerindo alelos associados à tolerância ao calor e ao frio (Massa et al., 2024).

A resistência a insetos em *A. duranensis* e *A. batizocoi* tem sido observada em testes com tripes, com danos por alimentação significativamente menores (Y. J. Chen et al., 2023). A ampla distribuição de *A. duranensis* promoveu diversidade intraespecífica, com certos acessos apresentando alelos para resistência a insetos (Massa et al., 2024).

No arroz, a diversidade genética dos seus parentes silvestres também tem sido explorada para a resistência a estresses bióticos. Estudos demonstraram que 22 genes de resistência provenientes de *Oryza rufipogon*, *O. australiensis* e *O. glaberrima* conferem tolerância a pragas de insetos sugadores, além de proteção contra patógenos específicos (Bunga et al., 2024).

Embora a exploração de parentes silvestres de cultivos (CWRs) tenha proporcionado avanços significativos no melhoramento genético, a clonagem e transferência de genes de resistência ainda apresentam desafios substanciais. A presença de características agronomicamente indesejáveis, como baixa produtividade e suscetibilidade a outros fatores ambientais, além das dificuldades na obtenção de progênies viáveis, dificultam a incorporação desses genes em cultivares comerciais (Bohra et al., 2022).

Nos últimos anos, avanços em biotecnologia têm permitido uma exploração mais eficiente do potencial genético dos CWRs. Técnicas como AgRenSeq e MutRenSeq, que integram sequenciamento de próxima geração (NGS) com enriquecimento genômico específico, possibilitam a captura e o isolamento de genes *R* (incluindo NLRs) de forma



direcionada e precisa, acelerando a caracterização de loci de resistência (Arora et al., 2019; Kaur et al., 2021; Steuernagel et al., 2017) .

Além disso, outras abordagens baseadas em RNA-seq vêm sendo amplamente empregadas na identificação de genes de resistência em CWRs. Estudos recentes demonstraram a eficácia do sequenciamento de longa leitura (ONT) na resolução de regiões genômicas complexas e no mapeamento preciso do genoma de linhagens doadoras. Um exemplo é o caso do gene *Pm69*, proveniente do trigo-selvagem *emmer*, associado à resistência ao oídio. A caracterização desse gene foi realizada utilizando MutRNA-seq, que comparou o transcriptoma de plantas resistentes e mutantes suscetíveis, permitindo a identificação precisa de genes candidatos. Para validar a funcionalidade de *Pm69*, os pesquisadores empregaram silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS), confirmando sua relação direta com a resistência.

Apesar desses avanços, a introgressão de genes de resistência em cultivares comerciais ainda demanda estratégias que minimizem os efeitos negativos associados a trade-offs fisiológicos e agrônômicos. O uso de edição gênica via CRISPR/Cas9, combinado à seleção assistida por marcadores (*marker-assisted selection*, MAS), pode permitir uma edição mais precisa de genes de interesse, eliminando características indesejáveis sem comprometer a funcionalidade dos loci de resistência. Além disso, a integração de pangenômica e bioengenharia metabólica pode reduzir o impacto de genes pleiotrópicos, possibilitando ajustes finos no balanço entre crescimento, produtividade e resistência.

#### **4.8 Expansinas**

As expansinas são proteínas extracelulares amplamente distribuídas em plantas, reconhecidas por seu papel essencial no relaxamento da parede celular, apesar de não possuírem atividade hidrolítica direta. Essas proteínas foram inicialmente identificadas em estudos sobre o fenômeno de 'crescimento ácido' em hipocótilos de pepino. Elas desempenham um papel crucial na expansão celular e na adaptação das plantas a diversos estímulos ambientais (Kuluev et al., 2016; McQueen-Mason et al., 1992).

Essas proteínas estão organizadas em uma superfamília composta por quatro subfamílias principais:  $\alpha$ -expansinas (EXPA),  $\beta$ -expansinas (EXPB), expansinas semelhantes a A (EXLA) e expansinas semelhantes a B (EXLB), sendo as EXPA e EXPB as mais bem estudadas devido à sua capacidade de promover o relaxamento da parede celular (Sampedro & Cosgrove, 2005). Estruturalmente, as expansinas apresentam dois domínios principais. O

domínio *DPBB* (*Double-Psi Beta Barrel*) está relacionado à modulação estrutural da parede celular. Já o *CBM63* (*Carbohydrate-Binding Module 63*) é responsável pela ligação às microfibrilas de celulose (Cosgrove, 2015). Diferentemente das glicosídeo-hidrolases — com as quais compartilham similaridades estruturais —, as expansinas não possuem atividade catalítica. No entanto, sua ação depende do pH do apoplasto, permitindo a expansão irreversível da parede celular e, conseqüentemente, o crescimento celular (Samalova et al., 2022).

Do ponto de vista evolutivo, as expansinas são amplamente conservadas, estando presentes em praticamente todas as plantas terrestres e em alguns organismos não vegetais, como fungos e bactérias (Georgelis et al., 2015). Biologicamente, essas proteínas apresentam diversificação funcional importante, desempenhando papéis essenciais em diferentes aspectos do desenvolvimento vegetal. Elas estão envolvidas em processos como crescimento (Hepler, 2019; Z. Wang et al., 2024), germinação de sementes (F. Chen & Bradford, 2000), desenvolvimento radicular (Muthusamy et al., 2020), formação de órgãos florais e amadurecimento de frutos (Chen et al., 2022; Mira et al., 2023), com variações que refletem adaptações específicas ao habitat de diferentes espécies (Marowa et al., 2016).

As expansinas também desempenham um papel central na adaptação das plantas a condições ambientais adversas; seu envolvimento na defesa contra estresses abióticos é bem documentado. Elas atuam principalmente no relaxamento da parede celular, permitindo modificações estruturais. Esses ajustes facilitam a expansão celular e aumentam a plasticidade tecidual — aspectos essenciais para a adaptação a condições de salinidade, seca, calor e frio (Kuluev et al., 2016). Em diversas espécies, a superexpressão de genes relacionados às expansinas melhora significativamente a tolerância das plantas a esses estresses. Por exemplo, a superexpressão do gene *GsEXLB14* em raízes transgênicas de soja aumentou a resistência ao estresse salino e à seca. Nessas condições, as raízes transgênicas apresentaram maior crescimento, com melhor regulação do transporte iônico e respostas antioxidantes reforçadas, atribuídas à modulação de genes como  $H^+$ -ATPases, peroxidases e proteínas relacionadas à desidratação (L. Wang et al., 2024). A ilustração demonstrada na figura 3 traz um fluxograma de como as expansinas atuam no crescimento/desenvolvimento vegetal e na resposta de defesa.

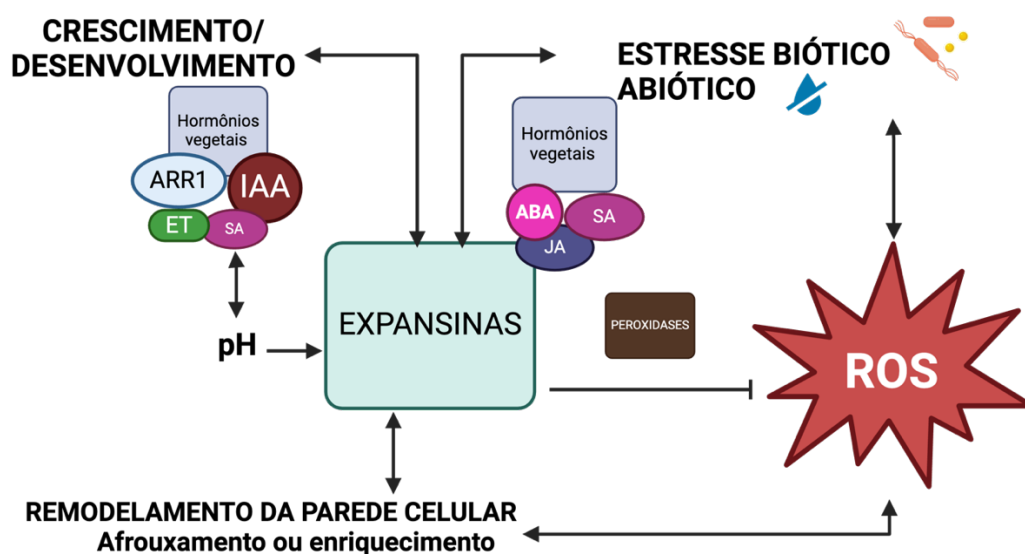


FIGURA 3. Representação esquemática da regulação das expansinas por diversos hormônios vegetais (IAA, ARR1, ET, SA, ABA e JA) e sua interação com as espécies reativas de oxigênio (ROS) e as enzimas antioxidantes (peroxidases). As expansinas, moduladas positivamente ou negativamente pelos diferentes hormônios, influenciam o relaxamento da parede celular, o crescimento vegetal e a resposta a estresses bióticos e abióticos, incluindo o controle de ROS. Adaptado de Samalova et al. (2022).

Em plantas transgênicas de tabaco (*N. tabacum*) modificadas com o gene *TaEXPA2*, uma  $\alpha$ -expansina identificada em trigo (*Triticum aestivum*), observou-se maior número de cápsulas e sementes em comparação com plantas selvagens. Essas plantas desenvolveram sistemas radiculares mais robustos, com maior número de raízes laterais e maior comprimento da raiz primária, resultando em maior capacidade de absorção de água. Outro aspecto relevante é que as plantas transgênicas acumularam níveis elevados de prolina, um componente importante para a retenção de água sob condições de estresse hídrico. Também apresentaram menor acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), como  $H_2O_2$ , reduzindo danos oxidativos. Ademais, enzimas antioxidantes, incluindo superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POD), tiveram atividades significativamente aumentadas em plantas transgênicas sob estresse, destacando sua capacidade de resposta antioxidante (Y. Chen et al., 2016).

Ainda em tabaco, a superexpressão do gene *AtEXPA18* resultou em maior biomassa, maior tolerância à seca e melhor desempenho fotossintético em plantas transgênicas. Tais plantas exibiram um sistema radicular mais desenvolvido, evidenciado pelo maior peso seco das raízes, possivelmente favorecendo a extração de água em camadas mais profundas do solo. O teor de clorofila também foi significativamente mais alto na linha transgênica, indicando

maior eficiência fotossintética sob estresse hídrico. De forma complementar, o conteúdo de ácido abscísico (ABA) foi expressivamente maior nas folhas das plantas transgênicas em comparação às plantas controle. Esse aumento foi observado tanto em condições de estresse quanto em condições normais. Os dados sugerem uma regulação aprimorada do fechamento estomático e maior retenção de água. Observou-se, ainda, aumento nos níveis de citocininas sob estresse severo, indicando que o gene *AtEXPA18* pode desempenhar papel na regulação hormonal na adaptação a condições adversas (Abbasi et al., 2021).

Em cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*), o potencial das expansinas como agentes protetores contra estresses abióticos também foi evidenciado. Ashwin Narayan et al. (2021) mostraram que linhas transgênicas superexpressando o gene *EaEXPA1* apresentaram maior tolerância à seca, com melhorias significativas no conteúdo relativo de água, na estabilidade de membranas, na retenção de clorofila e na capacidade fotossintética. Durante o período de seca, essas plantas mantiveram níveis relativos de água mais altos (79,5–92%) em comparação com as plantas controle (70%). Após a reirrigação, recuperaram-se quase completamente, alcançando valores próximos aos níveis normais. Além disso, as linhas transgênicas exibiram menor lesão de membrana celular sob estresse (45–60%), enquanto as plantas controle sofreram danos consideravelmente maiores (~99%). Genes como *SmEXPA23*, identificado em *Salix matsudana*, e *OfEXLA1*, em *Osmanthus fragrans*, são induzidos por condições de seca e salinidade, promovendo retenção hídrica e resistência ao estresse oxidativo. Esses genes são regulados por hormônios como o ABA, crucial na ativação de respostas de defesa e adaptação (Dong et al., 2024; R. Yang et al., 2023).

As expansinas também influenciam as respostas das plantas à deficiência de nutrientes. Wang et al., (2023), demonstraram que a superexpressão do gene *SgEXPB1* em raízes transgênicas de *Stylosanthes guianensis* promoveu crescimento radicular significativamente maior e aumentou a eficiência na absorção de fósforo (P) em condições de baixa disponibilidade desse nutriente. Esses efeitos foram atribuídos à capacidade do gene de modular processos de divisão e alongamento celular, favorecendo o desenvolvimento radicular e a adaptação a solos pobres em fósforo.

Em interação com patógenos, a alteração da integridade da parede celular pelas expansinas pode tanto favorecer quanto dificultar a penetração e disseminação de microrganismos (Narváez-Barragán et al., 2022). Ao relaxar a parede celular e romper ligações não covalentes entre polímeros, as expansinas podem aumentar a suscetibilidade a infecções. No estudo de Otulak-Kozieł et al., (2020) plantas suscetíveis apresentaram aumento significativo na expressão do gene *StEXPA3* e na produção de proteínas *StEXPAs*. Essas

alterações promoveram o relaxamento da parede celular e facilitaram a propagação do *Potato virus Y* (PVY<sup>NTN</sup>). Em contraste, em plantas resistentes que apresentaram reação de hipersensibilidade, a expressão de *StEXPA3* e a presença de *StEXPA*s foram reduzidas, indicando um possível reforço da parede celular como estratégia de defesa.

Durante interações planta-patógeno, as expansinas podem exercer dupla função. A superexpressão do gene *MaEXPA11*, por exemplo, conferiu resistência da amoreira (*Morus* sp.) ao fungo *Ciboria shiraiana*. Entretanto, a redução da expressão de *MaEXPA11* aumentou a resistência a estresses abióticos, como frio e seca. (Y. Guo et al., 2024).

Chen et al., (2018a) observaram que plantas com redução de expressão (RNAi) de *NtEXPA4* apresentaram maior sensibilidade ao estresse salino e à seca, enquanto as linhas de superexpressão exibiram maior tolerância, evidenciada por menor dano celular, maior peso fresco, maior acúmulo de açúcar solúvel e prolina, além de níveis elevados de genes responsivos a estresses. Em contrapartida, a superexpressão de *NtEXPA4* aumentou a suscetibilidade ao vírus do mosaico do tabaco (TMV-GFP) e à bactéria *Pseudomonas syringae* DC3000, reduzindo a indução do sistema antioxidante, a produção de fitohormônios associados à defesa e a expressão de genes relacionados à resposta imunológica.

Em plantas de arroz (*Oryza sativa*), Tan et al., (2018) reforçaram a ideia de que as expansinas podem atuar de forma dupla ao mediar crescimento e resistência a estresses bióticos. Nesse estudo, a superexpressão de *OsEXPA10* favoreceu o crescimento da planta, resultando em grãos maiores. Entretanto, também afrouxou a parede celular, tornando as plantas mais vulneráveis ao percevejo-marrom (*Nilaparvata lugens*) e ao fungo causador da brusone (*Magnaporthe oryzae*). Por outro lado, quando a expressão de *OsEXPA10* foi reduzida, as plantas exibiram menor altura e grãos menores, mas apresentaram parede celular mais rígida, o que aumentou a resistência ao estresse biótico.

A redução da expressão do gene *EXLA2*, regulado por vias independentes de ácido jasmônico (JA), em mutantes de *Arabidopsis thaliana*, resultou em maior resistência a patógenos necrotróficos, como *Botrytis cinerea* e *Alternaria brassicicola* (AbuQamar et al., 2017). Essa resposta sugere que a menor atividade do gene contribui para o fortalecimento da parede celular, dificultando a penetração dos patógenos. Além disso, o mesmo estudo mostrou que *EXLA2* é induzido por estresses abióticos, como frio e salinidade. No aspecto fenotípico, mutantes com perda de função apresentaram maior crescimento, enquanto plantas transgênicas que superexpressavam o gene exibiram porte reduzido, indicando seu papel como regulador negativo do desenvolvimento vegetal.

Em contraste, há registros de que a superexpressão de expansinas pode conferir vantagens adaptativas em cenários de estresses combinados. Plantas transgênicas de tabaco expressando AdEXLB8, uma expansina-like B de *A. duranensis*, demonstraram tolerância simultânea à seca e ao ataque de patógenos como *M. incognita* e *Sclerotinia sclerotiorum*. Esse resultado foi atribuído à reconfiguração da parede celular e à ativação de vias hormonais. Entre elas, destacam-se aquelas mediadas por ABA, jasmonato e etileno. Juntas, essas vias promovem um estado geral de *priming* contra patógenos (Brasileiro et al., 2021).

Em outro exemplo, Samalova et al., (2024) analisaram o papel das expansinas na regulação hormonal, na localização e nas propriedades biomecânicas da parede celular durante o crescimento radicular em *A. thaliana*. O estudo demonstrou que as expansinas *EXPA1*, *EXPA10*, *EXPA14* e *EXPA15* são reguladas por citocininas (*ARR1*, *ARR10*, *ARR12*) e possivelmente por auxinas (*ARF5*). Além disso, evidenciou que *EXPA1* pode modular as propriedades viscoelásticas da parede celular por meio de interações com enzimas que modificam pectinas, pois a rápida desmetilesterificação desses polissacarídeos, induzida pela superexpressão de *EXPA1*, sugere que as expansinas atuam diretamente no controle da plasticidade da parede celular.

Há ainda diversos relatos reforçando a relação entre a expressão de expansinas e a regulação de vias hormonais. Por exemplo, em *Brassica rapa*, a expressão de *BrEXLB1* é induzida por fitohormônios como ácido indol-3-acético (IAA), ácido abscísico (ABA), ácido salicílico (SA) e etileno, todos relacionados a respostas ao estresse e ao desenvolvimento. Nesse estudo, os autores concluíram que a inibição de *BrEXLB1* pode suprimir a sinalização de auxinas, contribuindo para a resistência a *Plasmodiophora brassicae*. Também foi demonstrado que, durante infecções iniciais por *P. brassicae* (1–3 dias pós-inoculação), o promotor de *BrEXLB1* apresentou atividade aumentada, indicando um papel na resposta inicial ao patógeno; em estágios posteriores, a expressão foi drasticamente reduzida. Essa regulação diferencial reforça a ideia de que essas proteínas podem atuar como reguladoras-chave de resistência (Muthusamy et al., 2022).

Corroborando a participação das expansinas na defesa contra patógenos, Yang et al., (2024) demonstraram que a superexpressão de *NtEXPA7*, uma expansina expressa especificamente em células de pelos radiculares de tabaco, aumenta a resistência contra *M. incognita*.

A supressão ou superexpressão de expansinas já demonstrou efeito protetor contra patógenos em outras plantas, como soja (Guimaraes et al., 2017), tomate (*Solanum lycopersicum*) (Gal et al., 2006) e *Arabidopsis* (Jammes et al., 2005). Nesta última, a

superexpressão de GmEXPA1 foi associada a menor suscetibilidade ao nematoide, incluindo redução no número de ovos, de galhas e no fator de reprodução do patógeno em linhas transgênicas de *A. thaliana* e *N. tabacum* (Basso et al., 2023).

Por fim, os avanços recentes em modelagem estrutural, como o uso do algoritmo AlphaFold, têm permitido uma análise mais detalhada das interações entre expansinas e os polímeros da parede celular. Esses progressos ampliam as perspectivas de aplicação biotecnológica, especialmente no desenvolvimento de culturas agrícolas mais adaptadas a ambientes adversos (Jumper et al., 2021; Samalova et al., 2022).

#### 4.9 NLRs

A imunidade inata nas plantas, embora amplamente conservada entre diferentes táxons, opera por meio de vias especializadas capazes de detectar sinais de invasão com elevada especificidade e sensibilidade. Este sistema não apenas determina a capacidade da planta de resistir a infecções, mas também constitui um eixo central na adaptação evolutiva das espécies vegetais a pressões bióticas e abióticas. A base dessa resposta imune reside em uma rede complexa e altamente regulada de interações moleculares, cuja elucidação tem avançado significativamente nas últimas décadas (Jones and Dangl, 2006; Rafiqi et al., 2009; Bonardi et al., 2012).

A resposta imune pode ser deflagrada tanto por sinais extracelulares quanto intracelulares (van der Burgh and Joosten, 2019), e envolve receptores especializados que detectam sinais moleculares de patógenos e desencadeiam mecanismos de defesa. Atualmente, reconhece-se que o sistema imunológico vegetal é composto por dois ramos principais: a imunidade induzida por padrões moleculares (PTI) e a imunidade mediada por efetores (ETI).

A PTI constitui a primeira linha de defesa e é ativada pelo reconhecimento de padrões moleculares conservados de patógenos (PAMPs), microrganismos (MAMPs) ou sinais associados a danos celulares (DAMPs) (Monaghan & Zipfel, 2012; Yamaguchi & Kawasaki, 2021). Esses sinais são reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), que incluem receptores do tipo quinase (RLKs) e receptores similares (RLPs). A ativação desses PRRs pela detecção de moléculas como flagelina (*flg22*), lipopolissacarídeos ou peptideoglicanos (Choi & Klessig, 2016) desencadeia cascatas de sinalização intracelular que culminam na ativação de genes de defesa, reforço da parede celular, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e biossíntese de metabólitos antimicrobianos (Thomma et al., 2011; Desaki et al., 2018).

No entanto, muitos patógenos evoluíram efetores que inibem componentes cruciais da sinalização da PTI, promovendo o que se denomina suscetibilidade induzida por efetores (*effector-triggered susceptibility*, ETS) (Chisholm et al., 2006; Göhre & Robatzek, 2008). Como resposta evolutiva, as plantas desenvolveram genes de resistência (R), cujos produtos — particularmente os receptores da família NLR (*nucleotide-binding leucine-rich repeat receptors*) — são capazes de detectar esses efetores e deflagrar a ETI, uma resposta imune amplificada, comumente associada à morte celular programada localizada (hipersensibilidade, HR) (Jones & Dangl, 2006; Ellis et al., 2000). A eficácia da ETI depende da presença de alelos funcionais de genes R em diferentes genótipos (Dalio et al., 2021), sendo o reconhecimento do efector possível tanto por interação direta quanto por mecanismos indiretos, como o modelo de guarda-e-isca (Cesari, 2018).

A principal classe de genes de resistência (R) em plantas codifica os receptores NLRs, proteínas intracelulares modulares compostas por uma região central de ligação a nucleotídeos (domínio NB-ARC), um domínio N-terminal do tipo TIR (presentes nos TNLs) ou coiled-coil (nos CNLs), e uma região C-terminal contendo repetições ricas em leucina (LRR) (Dangl & Jones, 2001; Jones & Dangl, 2006). Além das formas canônicas, variantes estruturais truncadas — como as proteínas TIR-NB (TN) e CC-NB (CN) — têm sido identificadas em diferentes espécies, apresentando funções imunológicas relevantes mesmo na ausência de domínios completos (Contreras et al., 2023a; Nishimura et al., 2017a).

Avanços recentes na genômica e nas tecnologias de clonagem permitiram a caracterização de mais de 450 genes R em 42 espécies vegetais, sendo aproximadamente 72% deles classificados como PRRs ou NLRs (Chen et al., 2024). Embora esses genes frequentemente exibam especificidade taxonômica (Jones et al., 2016), a transferência funcional entre espécies filogeneticamente distantes já foi demonstrada, destacando o potencial desses receptores para aplicações em melhoramento genético (Zhang et al., 2017a; 2017b; Xu et al., 2018). Estudos genômicos adicionais revelam que genes NLR tendem a se organizar em agrupamentos ("clusters") originados por duplicações em tandem, o que resulta em alta similaridade entre os membros de um mesmo grupo e dificulta a caracterização funcional individual (Hao et al., 2023).

Importante destacar que a PTI e a ETI não constituem vias redundantes, mas sim complementares e sinérgicas. Evidências acumuladas indicam que a ativação simultânea desses mecanismos fortalece a produção de ROS, a deposição de calose e a expressão de genes de defesa, culminando em respostas imunes mais robustas (Jones et al., 2024). Em *Arabidopsis thaliana*, a integração funcional entre PRRs e NLRs é exemplificada pela proteína ZAR1, que,



após o reconhecimento do efector, forma complexos oligoméricos denominados resistossomos. Esses resistossomos atuam como canais de íons, promovendo o influxo de cálcio e induzindo a morte celular localizada (Ngou et al., 2022). Adicionalmente, o "*priming*" transcricional promovido pela ativação prévia da PTI prepara a planta para uma resposta ETI mais eficaz, modulando positivamente a expressão de genes envolvidos em sinalização hormonal e biossíntese de metabólitos secundários (Espinas et al., 2016).

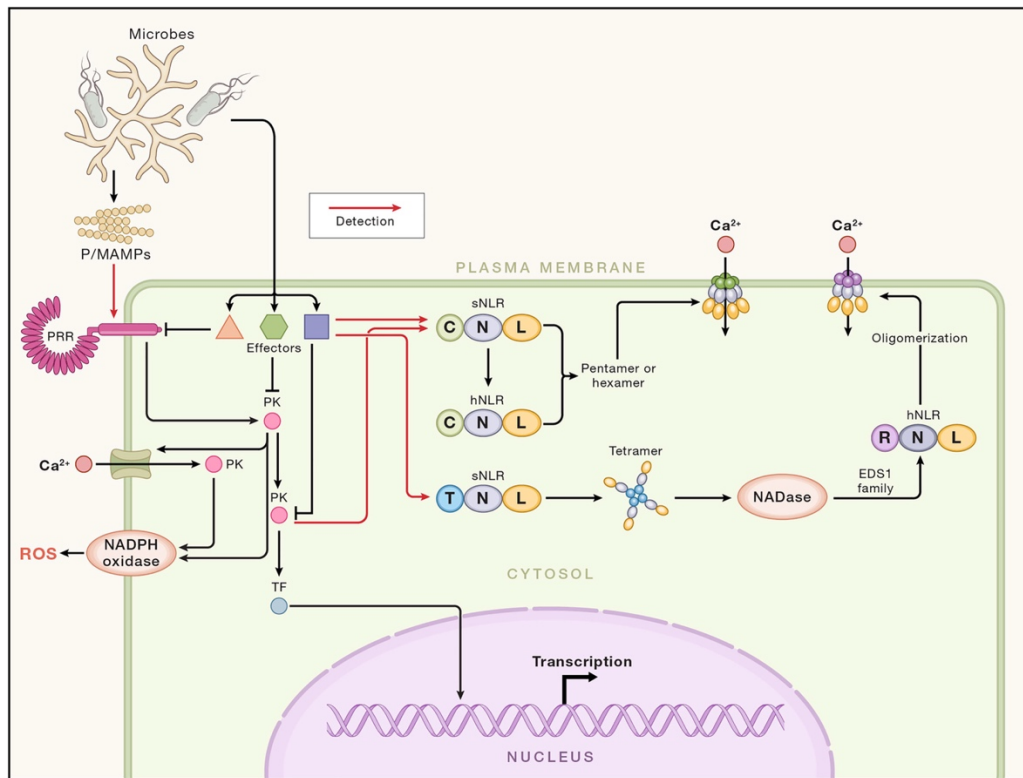


FIGURA 4. Visão geral dos principais mecanismos da imunidade inata em plantas, envolvendo receptores de reconhecimento de padrões na superfície celular (PRRs) e receptores intracelulares NLR (CNLs ou TNLs), além de seus NLRs auxiliares (CNLs ou RNLs) (Jones et al., 2024).

Avanços recentes em genômica funcional e biotecnologia têm acelerado significativamente a clonagem de genes R, promovendo o desenvolvimento de estratégias mais eficazes de proteção de cultivos (Chen et al., 2024). Nesse cenário, os NLRs truncados têm ganhado destaque por sua versatilidade funcional e arquitetura não convencional. Diferentemente dos NLRs canônicos — que apresentam domínio NB-ARC, TIR ou CC na extremidade N-terminal e repetições ricas em leucina (LRR) na região C-terminal —, os truncados carecem de um ou mais desses domínios. Ainda assim, são capazes de desempenhar funções críticas na imunidade vegetal (Contreras et al., 2023).

A ausência parcial de domínios não compromete necessariamente a funcionalidade. O receptor RBA1, um TIR-only NLR de *Arabidopsis thaliana*, é capaz de reconhecer diretamente o efetor HopBA1, mesmo na ausência dos domínios NB-ARC e LRR, promovendo a ativação da morte celular programada (Nishimura et al., 2017). Modelagens estruturais indicam que a capacidade de oligomerização e de sinalização por meio do domínio TIR é mantida, mesmo em receptores altamente truncados.

Outros NLRs truncados, como TN2, atuam em reconhecimentos indiretos conforme o modelo guarda-e-isca. Nesse caso, a detecção do patógeno ocorre via monitoramento de proteínas hospedeiras-alvo, como EXO70B1, sendo a resposta imune dependente de receptores auxiliares da família ADR1 (Wang et al., 2021). Uma síntese comparativa entre NLRs canônicos e truncados é apresentada na Tabela 1, destacando diferenças estruturais, funcionais e aplicacionais (Contreras et al., 2023).

Tabela 2 Comparação entre NLRs canônicos e truncados. Elaborado pela autora com base em Contreras et al. (2023)

Característica	NLRs Canônicos	NLRs Truncados
Domínios presentes	TIR/CC, NB-ARC, LRR	Ausência parcial de TIR/CC e/ou LRR
Localização subcelular	Predominantemente citoplasmática	Variável (núcleo, condensados)
Modo de reconhecimento	Direto ou indireto (guarda/isca)	Direto ou indireto
Formação de resistossomos	Comum	Comum em alguns tipos, como TIR-only e CC-MADA, pode variar com a perda de domínios funcionais.
Exemplo funcional	<i>ZAR1</i> , <i>RPS4</i> , <i>RGAS</i>	<i>RBA1</i> , <i>TN2</i> , <i>NRG1C</i> , <i>AsTIR19</i>
Potencial de engenharia	Alto, mas risco de autoimunidade	Alto, com menor risco de autoimunidade

Notavelmente, os NLRs truncados também podem atuar como reguladores negativos, limitando a ativação excessiva da resposta imune e evitando fenótipos autoimunes. A isoforma NRG1C, por exemplo, exerce efeito antagonista sobre NRG1A/B em *Arabidopsis*, inibindo sua atividade (Wu et al., 2022). De forma análoga, NRCX atua como regulador negativo da rede NRC em solanáceas, controlando a ativação de helpers como NRC2 e NRC3 (Adachi et al., 2023).

A funcionalidade dessas variantes também se estende a contextos de estresse abiótico. O gene *ACQOS* codifica um TIR-NLR envolvido em um trade-off entre resistência a patógenos e tolerância osmótica. A presença ou ausência deste gene modula a osmotolerância de *Arabidopsis*, indicando a interconexão entre redes de defesa biótica e abiótica (Ariga et al., 2017).

Contudo, em certos contextos genéticos, mutações em NLRs truncados podem gerar efeitos deletérios. O gene *DM10*, por exemplo, quando combinado com alelos específicos do locus *DM11*, provoca necrose letal em plântulas híbridas, evidenciando incompatibilidades resultantes de seleção local (Barragan et al., 2021b).

Estudos estruturais revelam que NLRs — mesmo os truncados — podem formar resistossomos, complexos oligoméricos que atuam como plataformas de sinalização. Em CC-NLRs singleton como ZAR1, o reconhecimento de efetores leva à montagem de resistossomos pentaméricos, com organização em poros funcionais de membrana que permitem o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e desencadeiam morte celular e acúmulo de ROS (Bi et al., 2021; Chen et al., 2021).

Em redes do tipo sensor-helper, como a NRC em solanáceas, a ativação ocorre por meio da cooperação entre sensores especializados e helpers como NRC2, NRC3 e NRC4. Estes últimos também formam resistossomos de forma autônoma após a detecção do sinal (Ahn et al., 2023). No caso dos TNLs, a formação de resistossomos envolve a atividade NADase dos domínios TIR, com liberação de moléculas sinalizadoras que ativam os eixos EDS1-PAD4 (com ADR1) ou EDS1-SAG101 (com NRG1), levando à montagem de resistossomos com atividade de canal de cálcio (Ma et al., 2020; Martin et al., 2020; Pruitt et al., 2021; Lapin et al., 2022; Yu et al., 2022).

Curiosamente, a expressão isolada de domínios TIR pode conferir imunidade mesmo sob estresse térmico — uma condição em que NLRs completos geralmente perdem estabilidade. No caso de RBA1, esse receptor forma condensados nucleares após a percepção de HopBA1, sendo essa agregação essencial para a ativação da HR em altas temperaturas (Demont et al., 2024; Song et al., 2024).

A geração de isoformas via splicing alternativo representa mais uma camada de complexidade funcional entre os NLRs. O gene *RPS4*, por exemplo, origina uma isoforma completa (TIR-NBS-LRR) e uma truncada (TIR-NBS), sendo ambas necessárias para uma resposta imune eficaz contra *Pseudomonas* com AvrRps4, sugerindo um modelo cooperativo intragênico (Zhang and Gassmann, 2003). Padrão semelhante foi observado no gene *N* do tabaco.

Essa versatilidade funcional torna os NLRs truncados candidatos valiosos para aplicações biotecnológicas. A introdução do gene *AtTIR19* — um TIR-only NLR de *Arachis stenosperma* — em *Arabidopsis* conferiu resistência ao fungo *Fusarium oxysporum* sem prejudicar o desenvolvimento vegetal, provavelmente por evitar ativação constitutiva (Guimarães et al., 2022; de Araújo et al., 2024).

Paralelamente, abordagens de engenharia genética vêm explorando pares sintéticos inspirados em duplas naturais como *RRS1/RPS4* (em *Arabidopsis*) e *RGA5/RGA4* (em arroz), com resultados promissores na redução da autoimunidade e no aumento da especificidade. Técnicas de edição genômica, como CRISPR/Cas9, também têm sido empregadas para modular a resposta imune. (Cesari et al., 2014; Maqbool et al., 2015; Adachi et al., 2019). Essas descobertas permitem modular a resposta imune conforme o contexto agrícola: silenciar reguladores para resistência máxima ou inseri-los estrategicamente para evitar autoimunidade.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbasi, A., Malekpour, M., & Sobhanverdi, S. (2021). The *Arabidopsis* expansin gene (*AtEXPA18*) is capable to ameliorate drought stress tolerance in transgenic tobacco plants. *Molecular Biology Reports*, 48, 5913–5922.
- Abd-Elgawad, M. M. M., & Askary, T. H. (2015). Impact of phytonematodes on agriculture economy. In *Biocontrol agents of phytonematodes* (pp. 3–49). CABI.
- AbuQamar, S., Luo, H., Laluk, K., Mickelbart, M. V., & Mengiste, T. (2009). Crosstalk between biotic and abiotic stress responses in tomato is mediated by the AIM1 transcription factor. *The Plant Journal*, 58, 347–360.
- AbuQamar, S., Moustafa, K., & Tran, L. S. P. (2017). Mechanisms and strategies of plant defense against *Botrytis cinerea*. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37, 262–274.
- Adachi, H., Derevnina, L., & Kamoun, S. (2019). NLR singletons, pairs, and networks: Evolution, assembly, and regulation of the intracellular immunoreceptor circuitry of plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 50, 121–131.
- Adachi, H., Sakai, T., Harant, A., Pai, H., Honda, K., Toghiani, A. A., Claeys, J., Duggan, C., Bozkurt, T. O., Wu, C., & Kamoun, S. (2023). An atypical NLR protein modulates the NRC immune receptor network in *Nicotiana benthamiana*. *PLOS Genetics*, 19(1), e1010500.
- Agrios, G. N. (2005). *Plant pathology* (5th ed.). Academic Press.
- Ahn, H., Lin, X., Olave-Achury, A. C., Derevnina, L., Contreras, M. P., Kourelis, J., Wu, C., Kamoun, S., & Jones, J. D. G. (2023). Effector-dependent activation and oligomerization of plant NRC class helper NLRs by sensor NLR immune receptors *Rpi-amr3* and *Rpi-amr1*. *The EMBO Journal*, 42(5).
- Ajmal, M., Hussain, A., Ali, A., Chen, H., & Lin, H. (2022). Strategies for controlling the sporulation in *Fusarium* spp. *Journal of Fungi*, 9(1), 10.
- Araujo, A. C. G., Guimaraes, P. M., Mota, A. P. Z., Guimaraes, L. A., Pereira, B. M., Vinson, C. C., Brasileiro, A. C. M., & Leal-Bertioli, S. C. M. (2021). Overexpression of DUF538 from wild *Arachis* enhances plant resistance to *Meloidogyne* spp. *Agronomy*, 11, 559.
- Ariga, H., Katori, T., Tsuchimatsu, T., Hirase, T., Tajima, Y., Parker, J. E., Alcázar, R., Koornneef, M., Hoekenga, O., Lipka, A. E., Gore, M. A., Sakakibara, H., Kojima, M., Kobayashi, Y., Iuchi, S., Kobayashi, M., Shinozaki, K., Sakata, Y., Hayashi, T., & Saijo, Y.

(2017). NLR locus-mediated trade-off between abiotic and biotic stress adaptation in *Arabidopsis*. *Nature Plants*, 3, 17072.

Arora, S., Steuernagel, B., Gaurav, K., Chandramohan, S., Long, Y., Matny, O., Johnson, R., & Uauy, C. (2019). Resistance gene cloning from a wild crop relative by sequence capture and association genetics. *Nature Biotechnology*, 37, 139–143.

Arraes, F. B. M., Vasquez, D. D. N., Tahir, M., Pinheiro, D. H., Faheem, M., & Freitas-Alves, N. S. (2022). Integrated omic approaches reveal molecular mechanisms of tolerance during soybean and *Meloidogyne incognita* interactions. *Plants*, 11.

Arroyo-García, R., Cenis, J. L., Tello, J., Martínez-Zapater, J. M., & Cifuentes, D. (2003). Genetic relationships among seven specialized forms of *Fusarium oxysporum* determined by DNA sequencing of the ITS region and AFLPs. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 1, 55–63.

Narayan, J. A., Chakravarthi, M., Nerkar, G., Manoj, V. M., Dharshini, S., & Subramonian, N. (2021). Overexpression of expansin *EaEXPA1*, a cell wall loosening protein, enhances drought tolerance in sugarcane. *Industrial Crops and Products*, 159, 113035.

Atkinson, N. J., Lilley, C. J., & Urwin, P. E. (2013). Identification of genes involved in the response of *Arabidopsis* to simultaneous biotic and abiotic stresses. *Plant Physiology*, 162, 2028–2041.

Ayukawa, Y., Asai, S., Gan, P., Tsushima, A., Ichihashi, Y., Shibata, A., Uehara, T., & Shirasu, K. (2021). A pair of effectors encoded on a conditionally dispensable chromosome of *Fusarium oxysporum* suppress host-specific immunity. *Communications Biology*, 4.

Bacete, L., Mérida, H., Miedes, E., & Molina, A. (2018). Plant cell wall-mediated immunity: Cell wall changes trigger disease resistance responses. *The Plant Journal*, 93, 614–636.

Bacon, C. W., Porter, J. K., Norred, W. P., & Leslie, J. F. (1996). Production of fusaric acid by *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 4039–4043.

Baldoni, E., Genga, A., & Cominelli, E. (2015). Plant MYB transcription factors: Their role in drought response mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 15811–15851.

Ballén-Taborda, C., Chu, Y., Ozias-Akins, P., Holbrook, C. C., Timper, P., Jackson, S. A., Bertoli, D. J., & Leal-Bertoli, S. C. M. (2022). Development and genetic characterization of peanut advanced backcross lines that incorporate root-knot nematode resistance from *Arachis stenosperma*. *Frontiers in Plant Science*, 12.

Bani, M., Pérez-de-Luque, A., Rubiales, D., & Rispail, N. (2018). Physical and chemical barriers in root tissues contribute to quantitative resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* in pea. *Frontiers in Plant Science*, 9, 199.

Barah, P., Naika, B. N. M., Jayavelu, N. D., Sowdhamini, R., Shameer, K., & Bones, A. M. (2015). Transcriptional regulatory networks in *Arabidopsis thaliana* during single and combined stresses. *Nucleic Acids Research*, 44, 3147–3164.

Barragan, A. C., Collenberg, M., Wang, J., Lee, R. R. Q., Cher, W. Y., & Rabanal, F. A. (2021). A truncated singleton NLR causes hybrid necrosis in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Biology and Evolution*, 38, 557–574.

Basso, M. F., Lourenço-Tessutti, I. T., Moreira-Pinto, C. E., Mendes, R. A. G., Paes-de-Melo, B., das Neves, M. R., & Grossi-de-Sa, M. F. (2022). Overexpression of a soybean globin (*GmGlb1-1*) gene reduces plant susceptibility to *Meloidogyne incognita*. *Planta*, 256(4), 83.

Basso, M. F., Lourenço-Tessutti, I. T., Moreira-Pinto, C. E., Mendes, R. A. G., Pereira, D. G., Grandis, A., & Grossi-de-Sa, M. F. (2023). Overexpression of the *GmEXPA1* gene reduces plant susceptibility to *Meloidogyne incognita*. *Plant Cell Reports*, 42(1), 137–152.

Baxter, A., Mittler, R., & Suzuki, N. (2014). ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of Experimental Botany*, 65, 1229–1240.

Beckers, G. J. M., Jaskiewicz, M., Liu, Y., Underwood, W. R., He, S. Y., Zhang, S., & Conrath, U. (2009). Mitogen-activated protein kinases 3 and 6 are required for full priming of stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 21(3), 944–953.

Beckman, C. H., & Roberts, E. M. (1995). On the nature and genetic basis for resistance and tolerance to fungal wilt diseases of plants. *Advances in Botanical Research*, 21, 35–77.

Belfield, E. J., Brown, C., Ding, Z. J., Chapman, L., Luo, M., & Hinde, E. (2021). Thermal stress accelerates *Arabidopsis thaliana* mutation rate. *Genome Research*, 31, 40–50.

Bera, S. K., Ajay, B. C., & Singh, A. L. (2013). WRKY and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter genes conferring tolerance to salinity in interspecific derivatives of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Australian Journal of Crop Science*, 7(8).

Berens, M. L., Wolinska, K. W., Spaepen, S., Ziegler, J., Nobori, T., & Nair, A. (2019). Balancing trade-offs between biotic and abiotic stress responses through leaf age-dependent variation in stress hormone crosstalk. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116, 2364–2373.

Bi, G., Su, M., Li, N., Liang, Y., Dang, S., Xu, J., et al. (2021). The *ZAR1* resistosome is a calcium-permeable channel triggering plant immune signaling. *Cell*, *184*, 3528–3541.e12.

Biniiaz, Y., Tahmasebi, A., Afsharifar, A., Tahmasebi, A., & Poczai, P. (2022). Meta-analysis of common and differential transcriptomic responses to biotic and abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Plants*, *11*.

Bohra, A., Kilian, B., Sivasankar, S., Caccamo, M., Mba, C., & McCouch, S. R. (2022). Reap the crop wild relatives for breeding future crops. *Trends in Biotechnology*, *40*, 412–431.

Bonardi, V., Cherkis, K., Nishimura, M. T., & Dangl, J. L. (2012). A new eye on NLR proteins: Focused on clarity or diffused by complexity? *Current Opinion in Immunology*, *24*, 41–50.

Boscariol-Camargo, R. L., Takita, M. A., & Machado, M. A. (2016). Genetic transformation of *Citrus sinensis* with the *NPR1* gene as a strategy to increase tolerance to citrus canker. *Genetics and Molecular Research*, *15*(1).

Boyce, B. (2010). Pandemics aren't just for people: How disease can affect crops and the food supply. *Journal of the American Dietetic Association*, *110*, 24. Brasileiro, A. C. M., Lacorte, C., Pereira, B. M., Oliveira, T. N., Ferreira, D. S., & Mota, A. P. Z. (2021). Ectopic expression of an expansin-like B gene from wild *Arachis* enhances tolerance to both abiotic and biotic stresses. *The Plant Journal*, *107*, 1681–1696.

Brasileiro, A. C. M., Morgante, C. V., Araujo, A. C. G., Leal-Bertioli, S. C. M., Silva, A. K., Martins, A. C. Q., Vasconcelos, A. V. M., Godoy, I. J., Guimarães, P. M., & Bertioli, D. J. (2015). Transcriptome profiling of wild *Arachis* from water-limited environments uncovers drought tolerance candidate genes. *Plant Molecular Biology Reporter*, *33*, 1876–1892.

Brown, D. W., Lee, S. H., Kim, L. H., Ryu, J. G., Lee, S., Seo, Y., Busman, M., Ha, B. K., & Proctor, R. H. (2015). Identification of a 12-gene fusaric acid biosynthetic gene cluster in *Fusarium* species through comparative and functional genomics. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *28*, 319–332.

Buckwell, A., & Moxey, A. (1990). Biotechnology and agriculture. *Food Policy*, *15*(1), 44–56.

Bunga, A. P., Avinashe, H., Dubey, N., Choudhary, S., Rasane, P., & Sachan, S. (2024). Dissecting brown planthopper resistance genes in *Oryza* and its wild relatives: A review. *Euphytica*, *220*, 1–15.



Calabria, J., Wang, L., Rast-Somssich, M. I., Chen, H.-W., Watt, M., Persson, S., & Vermeer, J. E. M. (2025). Resolving spatially distinct phytohormone response zones in *Arabidopsis thaliana* roots colonized by *Fusarium oxysporum*. *Journal of Experimental Botany*.

Cao, Y., Liang, Y., Tanaka, K., Nguyen, C. T., Jedrzejczak, R. P., Joachimiak, A., Stacey, G., & Zhou, J.-M. (2014). The kinase LYK5 is a major chitin receptor in *Arabidopsis* and forms a chitin-induced complex with related kinase CERK1. *eLife*, 3, e03766.

Carvalho Cachapa, M. J., Meyling, N. V., Burow, M., & Hauser, T. P. (2020). Endophytic *Metarhizium brunneum* increases glucosinolate-dependent resistance in *Brassica oleracea* without fitness costs. *Frontiers in Plant Science*, 11, 787.

Castagnone-Sereno, P., Danchin, E. G. J., Perfus-Barbeoch, L., & Abad, P. (2013). Diversity and evolution of root-knot nematodes, genus *Meloidogyne*: New insights from the genomic era. *Annual Review of Phytopathology*, 51, 203–220.

Catanzariti, A. M., Lim, G. T. T., & Jones, D. A. (2015). The tomato *I-3* gene: A novel gene for resistance to *Fusarium* wilt disease. *New Phytologist*, 207, 106–118.

Caverzan, A., Casassola, A., & Brammer, S. P. (2016). Antioxidant responses of wheat plants under stress. *Genetics and Molecular Biology*, 39, 1–6.

Cesari, S. (2018). Multiple strategies for pathogen perception by plant immune receptors. *New Phytologist*, 219, 17–24.

Cesari, S., Bernoux, M., Moncuquet, P., Kroj, T., & Dodds, P. N. (2014). A novel conserved mechanism for plant NLR protein pairs: The “integrated decoy” hypothesis. *Frontiers in Plant Science*, 5.

Chang, M., Chen, H., Liu, F., & Fu, Z. Q. (2022). PTI and ETI: Convergent pathways with diverse elicitors. *Trends in Plant Science*, 27, 113–115.

Chen, F., & Bradford, K. J. (2000). Expression of an expansin is associated with endosperm weakening during tomato seed germination. *Plant Physiology*, 124, 1265–1274.

Chen, H., Zhang, X., Wang, T., Liu, Z., & Li, J. (2024). The transcription factor *SIWRKY6* enhances drought tolerance in tomato via modulation of ABA signaling and ROS homeostasis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 195, 41–52.

Chen, J., Li, M., Liu, L., Chen, G., & Fu, Z. Q. (2021). ZAR1 resistosome and helper NLRs: Bringing in calcium and inducing cell death. *Molecular Plant*, 14, 1234–1236.

Chen, L. J., Zou, W. S., Fei, C. Y., Wu, G., Li, X. Y., & Lin, H. H. (2018).  $\alpha$ -Expansin *EXPA4* positively regulates abiotic stress tolerance but negatively regulates pathogen resistance in *Nicotiana tabacum*. *Plant and Cell Physiology*, 59, 2317–2330.

Chen, R., Gajendiran, K., & Wulff, B. B. H. (2024). R we there yet? Advances in cloning resistance genes for engineering immunity in crop plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 77, 102489.

Chen, Y., Xie, B., An, X., Ma, R., Zhao, D., Cheng, C., Yang, Z. Q., & Zhang, Z. (2022). Overexpression of the apple expansin-like gene *MdEXLB1* accelerates the softening of fruit texture in tomato. *Journal of Integrative Agriculture*, 21, 3578–3588.

Chen, Y. J., Pandey, S., Catto, M., Leal-Bertioli, S., Abney, M. R., Bag, S., Hopkins, M., Culbreath, A., & Srinivasan, R. (2023). Evaluation of wild peanut species and their allotetraploids for resistance against thrips and thrips-transmitted tomato spotted wilt orthotospovirus (TSWV). *Pathogens*, 12.

Chen, Y., Han, Y., Meng, Z., Zhou, S., Kuang, X., & Wei, W. (2016). Overexpression of the wheat expansin gene *TaEXPA2* improved seed production and drought tolerance in transgenic tobacco plants. *PLOS ONE*, 11, e0153494.

Chisholm, S. T., Coaker, G., Day, B., & Staskawicz, B. J. (2006). Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 124, 803–814.

Choi, H. W., & Klessig, D. F. (2016). DAMPs, MAMPs, and NAMPs in plant innate immunity. *BMC Plant Biology*, 16, 1–10.

Cole, S. J., Yoon, A. J., Faull, K. F., & Diener, A. C. (2014). Host perception of jasmonates promotes infection by *Fusarium oxysporum* formae speciales that produce isoleucine- and leucine-conjugated jasmonates. *Molecular Plant Pathology*, 15, 589–600.

Conrath, U. (2009). Priming of induced plant defense responses. *Advances in Botanical Research*, 51, 361–395.

Contreras, M. P., Lüdke, D., Pai, H., Toghiani, A., & Kamoun, S. (2023). NLR receptors in plant immunity: Making sense of the alphabet soup. *EMBO Reports*, 24.

Coolen, S., Proietti, S., Hickman, R., Davila Olivas, N. H., Huang, P. P., Van Verk, M. C., Cambiagno, D. A., & Pieterse, C. M. J. (2016). Transcriptome dynamics of *Arabidopsis* during sequential biotic and abiotic stresses. *The Plant Journal*, 86, 249–267.

Cooper, W. R., & Ton, J. (2022). Mechanisms of stress memory in plants: Emerging concepts and unresolved questions. *Current Opinion in Plant Biology*, 67, 102194.

Coppola, M., Corrado, G., Coppola, V., Cascone, P., Martinelli, R., Digilio, M. C., Pennacchio, F., & Rao, R. (2015). *Prosystemin* overexpression in tomato enhances resistance to different biotic stresses by activating genes of multiple signaling pathways. *Plant Molecular Biology Reporter*, 33(5), 1270–1285.

Cosgrove, D. J. (2015). Plant expansins: Diversity and interactions with plant cell walls. *Current Opinion in Plant Biology*, 25, 162–172.

da Silva Ferreira, D., da Cunha Quintana Martins, A., Berbert, P. S., dos Anjos, R. M., de Passos Saraiva, M. A., Brasileiro, A. C. M., Miller, R. N. G., & Guimarães, P. M. (2024). A wild *Arachis* endochitinase enhances *Sclerotinia* resistance in transgenic plants. *Tropical Plant Biology*, 17(2), 138–155.

Dale, J., James, A., Paul, J. Y., Khanna, H., Smith, M., Peraza-Echeverria, S., Garcia-Bastidas, F., Kema, G., Waterhouse, P., & Mengersen, K. (2017). Transgenic Cavendish bananas with resistance to *Fusarium* wilt tropical race 4. *Nature Communications*, 8, 1–8.

Dalio, R. J. D., Paschoal, D., Arena, G. D., Magalhães, D. M., Oliveira, T. S., Merfa, M. V., Ribeiro, L. F., & Silva, M. C. (2021). Hypersensitive response: From NLR pathogen recognition to cell death response. *Annals of Applied Biology*, 178, 268–280.

Dangl, J. L., & Jones, J. D. G. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, 411, 826–833.

de Araújo, A. C., Brasileiro, A. C. M., Martins, A. da C. Q., Grynberg, P., Togawa, R. C., Saraiva, M. A. de P., et al. (2024). Ectopic expression of a truncated NLR gene from wild *Arachis* enhances resistance to *Fusarium oxysporum*. *Frontiers in Plant Science*, 15, 1486820.

Dean, R., Van Kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., & Ellis, J. (2012). The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13, 414–430.

Demont, H., Remblière, C., Deslandes, L., & Bernoux, M. (2024). Immune signaling induced by plant Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domains is thermostable. *bioRxiv*.

Desaki, Y., Miyata, K., Suzuki, M., Shibuya, N., & Kaku, H. (2018). Plant immunity and symbiosis signaling mediated by LysM receptors. *Innate Immunity*, 24, 92–100.

Dhanasekaran, L., Wang, Y., Jiang, L., Zhou, X., & Chen, T. (2025). Alginated oligosaccharides activate defense-related gene expression and reduce postharvest decay in pears. *Postharvest Biology and Technology*, 196, 112174.

Di Pietro, A., Madrid, M. P., Caracuel, Z., Delgado-Jarana, J., & Roncero, M. I. G. (2003). *Fusarium oxysporum*: Exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Molecular Plant Pathology*, 4, 315–325.

Dodds, P. N. (2023). From gene-for-gene to resistosomes: Flor's enduring legacy. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 36, 461–467.

Dong, B., Wang, Q., Zhou, D., Wang, Y., Miao, Y., & Zhong, S. (2024). Abiotic stress treatment reveals expansin-like A gene *OfEXLA1* improving salt and drought tolerance of *Osmanthus fragrans* by responding to abscisic acid. *Horticultural Plant Journal*, 10, 573–585.

Dong, X., Ling, N., Wang, M., Shen, Q., & Guo, S. (2012). Fusaric acid is a crucial factor in the disturbance of leaf water imbalance in *Fusarium*-infected banana plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 60, 171–179.

Du, C., Jiang, J., Zhang, H., Zhao, T., Yang, H., Zhang, D., Zhou, Y., Fan, G., & Liu, Y. (2020). Transcriptomic profiling of *Solanum peruvianum* LA3858 revealed a *Mi-3*-mediated hypersensitive response to *Meloidogyne incognita*. *BMC Genomics*, 21.

Duan, Y., Yang, H., Gong, X., Qiao, Y., Liu, M., Zhu, J., & Wang, B. (2024). *MpDIR1(t)* overexpression improves plant immunity through enhanced systemic acquired resistance and ROS scavenging. *Plant Molecular Biology*, 114, 163–181.

Durrant, W. E., & Dong, X. (2004). Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 42, 185–209.

Dutt, M., Barthe, G., Irely, M., & Grosser, J. W. (2015). Transgenic citrus expressing an *Arabidopsis NPR1* gene exhibit enhanced resistance against Huanglongbing (HLB; citrus greening). *Tree Physiology*, 35(6), 569–575.

Dutta, T. K., & Phani, V. (2023). The pervasive impact of global climate change on plant–nematode interaction continuum. *Frontiers in Plant Science*, 14.

Dutta, T. K., Rupinikrishna, K., Akhil, V. S., Vashisth, N., & Phani, V. (2024). CRISPR/Cas9-induced knockout of an amino acid permease gene (*AAP6*) reduced *Arabidopsis thaliana* susceptibility to *Meloidogyne incognita*. *BMC Plant Biology*, 24, 1–14.

Edel-Hermann, V., & Lecomte, C. (2019). Current status of *Fusarium oxysporum* formae speciales and races. *Phytopathology*, 109, 512–530.

Elad, Y., & Pertot, I. (2014). Climate change impacts on plant pathogens and plant diseases. *Journal of Crop Improvement*, 28, 99–139.

Ellis, J., Dodds, P., & Pryor, T. (2000). Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. *Current Opinion in Plant Biology*, 3, 278–284.

EMBRAPA. (2023). Impactos da onda de calor no plantio da soja. *Embrapa*.

Erb, M., & Kliebenstein, D. J. (2020). Plant secondary metabolites as defenses, regulators, and primary metabolites: The blurred functional trichotomy. *Plant Physiology*, 184, 39–52.

Espinas, N. A., Saze, H., & Saijo, Y. (2016). Epigenetic control of defense signaling and priming in plants. *Frontiers in Plant Science*, 7.

FAO. (2023). *The state of food security and nutrition in the world 2023. Food and Agriculture Organization of the United Nations*.

Finkelshtein, A., Khamesa-Israelov, H., & Chamovitz, D. A. (2024). Overexpression of S30 ribosomal protein leads to transcriptional and metabolic changes that affect plant development and responses to stress. *Biomolecules*, 14(3), 319.

Fisher, M. C., Gurr, S. J., Cuomo, C. A., Blehert, D. S., Jin, H., & Stukenbrock, E. H. (2020). Threats posed by the fungal kingdom to humans, wildlife, and agriculture. *mBio*, 11.

Fisher, M. C., Henk, D. A., Briggs, C. J., Brownstein, J. S., Madoff, L. C., McCraw, S. L., & Gurr, S. J. (2012). Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature*, 484, 186–194.

Fitzgerald, T. L., Shapter, F. M., McDonald, S., Waters, D. L. E., Chivers, I. H., Drenth, A., & Henry, R. J. (2011). Genome diversity in wild grasses under environmental stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 21140–21145.

Fourie, H., De Waele, D., Mc Donald, A. H., Mienie, C., Marais, M., & De Beer, A. (2015). Nematode pests threatening soybean production in South Africa, with reference to *Meloidogyne*. *South African Journal of Science*, 111.

Fujita, Y., Fujita, M., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2011). ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *Journal of Plant Research*, 124, 509–525.

Gal, T. Z., Aussenberg, E. R., Burdman, S., Kapulnik, Y., & Koltai, H. (2006). Expression of a plant expansin is involved in the establishment of root knot nematode parasitism in tomato. *Planta*, 224(1), 155–162.

García-Bastidas, F. A., Van der Veen, A. J. T., Nakasato-Tagami, G., Meijer, H. J. G., Arango-Isaza, R. E., & Kema, G. H. J. (2019). An improved phenotyping protocol for Panama disease in banana. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1006.

Ge, M., Tang, Y., Guan, Y., Lv, M., Zhou, C., & Ma, H. (2024). TaWRKY31, a novel WRKY transcription factor in wheat, participates in regulation of plant drought stress tolerance. *BMC Plant Biology*, 24, 1–18.

Georgelis, N., Nikolaidis, N., & Cosgrove, D. J. (2015). Bacterial expansins and related proteins from the world of microbes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 3807–3823.

Ghislain, M., Byarugaba, A. A., Magembe, E., Njoroge, A., Rivera, C., & Román, M. L. (2019). Stacking three late blight resistance genes from wild species directly into African highland potato varieties confers complete field resistance to local blight races. *Plant Biotechnology Journal*, 17, 1119–1129.

Godinho Mendes, R. A., Basso, M. F., Paes de Melo, B., Ribeiro, T. P., Lima, R. N., Fernandes de Araújo, J., Teixeira, C. R., & Mattos, V. L. S. (2021). The Mi-EFF1/Minc17998 effector interacts with the soybean GmHub6 protein to promote host plant parasitism by *Meloidogyne incognita*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 114, 101630.

Göhre, V., & Robatzek, S. (2008). Breaking the barriers: Microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annual Review of Phytopathology*, 46, 189–215.

Gonzalez-Cendales, Y., Catanzariti, A. M., Baker, B., McGrath, D. J., & Jones, D. A. (2016). Identification of I-7 expands the repertoire of genes for resistance to *Fusarium* wilt in tomato to three resistance gene classes. *Molecular Plant Pathology*, 17, 448–463.

Gordon, T. R. (2017). *Fusarium oxysporum* and the Fusarium wilt syndrome. *Annual Review of Phytopathology*, 55, 23–39.

Gordon, T. R., & Martyn, R. D. (1997). The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. *Annual Review of Phytopathology*, 35, 111–128.

Guimaraes, L. A., Mota, A. P. Z., Araujo, A. C. G., de Alencar Figueiredo, L. F., Pereira, B. M., & de Passos Saraiva, M. A. (2017). Genome-wide analysis of expansin superfamily in wild *Arachis* discloses a stress-responsive expansin-like B gene. *Plant Molecular Biology*, 94, 79–96.

Guimaraes, P. M. (2015). Root transcriptome analysis of wild peanut reveals candidate genes for nematode resistance. *PLoS ONE*, 10, 1–22.

Guimarães, P. M., Brasileiro, A. C. M., Morgante, C. V., Martins, A. C. Q., Pappas, G., Silva, O. B., Togawa, R., Leal-Bertioli, S. C. M., Araujo, A. C. G., Moretzsohn, M. C., & Bertioli, D. J. (2012). Global transcriptome analysis of two wild relatives of peanut under drought and fungi infection. *BMC Genomics*, 13(1), 1–15.

Guimarães, P. M., Ferreira, D. S., Martins, A. C. Q., de Araújo, A. C., Brasileiro, A. C. M., da Silva Ferreira, D., & de Passos Saraiva, M. A. (2022). Engineering pyramided disease resistance in tobacco by combining AsTIR19 and AdEXLB8 genes. *Plant Biotechnology Journal*, 20(4), 715–728.

Guimaraes, P. M., Quintana, A. C., Mota, A. P. Z., Berbert, P. S., Ferreira, D. S., & de Aguiar, M. N. (2022). Engineering resistance against *Sclerotinia sclerotiorum* using a truncated NLR (TNx) and a defense-priming gene. *Plants*, 11, 3483.

Guo, M., Liu, J. H., Ma, X., Luo, D. X., Gong, Z. H., & Lu, M. H. (2016). The plant heat stress transcription factors (HSFs): Structure, regulation, and function in response to abiotic stresses. *Frontiers in Plant Science*, 7.

Guo, Y., Kang, X., Huang, Y., Guo, Z., Wang, Y., & Ma, S. (2024). Functional characterization of *MaEXP11* and its roles in response to biotic and abiotic stresses in mulberry. *Plant Physiology and Biochemistry*, 206, 108289.

Guo, Z., Dzinyela, R., Yang, L., & Hwarari, D. (2024). bZIP transcription factors: Structure, modification, abiotic stress responses and application in plant improvement. *Plants*, 13.

Gupta, A., Dixit, S. K., & Senthil-Kumar, M. (2016). Drought stress predominantly endures *Arabidopsis thaliana* to *Pseudomonas syringae* infection. *Frontiers in Plant Science*, 7.

Han, K., Zhao, Y., Sun, Y., & Li, Y. (2023). NACs, generalist in plant life. *Plant Biotechnology Journal*, 21, 2433–2457.

Han, X., Shi, Q., He, Z., Song, W., Chen, Q., & Qi, Z. (2022). Transcriptome-wide N6-methyladenosine (m6A) methylation in soybean under *Meloidogyne incognita* infection. *aBIOTECH*, 3, 197–211.

Hao, Y., Pan, Y., Chen, W., Rashid, M. A. R., Li, M., & Che, N. (2023). Contribution of duplicated nucleotide-binding leucine-rich repeat (NLR) genes to wheat disease resistance. *Plants*, 12, 2794.

Haque, Z., Nawaz, S., Haidar, L., & Ansari, M. S. A. (2025). Development of novel *Trichoderma* bioformulations against *Fusarium* wilt of chickpea. *Scientific Reports*, 15, 1–8.

Harlan, J. R., & de Wet, J. M. J. (1971). Toward a rational classification of cultivated plants. *Taxon*, 20, 509–517.

Hartmann, M., & Zeier, J. (2019). N-hydroxyphenylacetic acid and salicylic acid: A metabolic duo for systemic acquired resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, 50, 44–57.

Hématy, K., Cherk, C., & Somerville, S. (2009). Host-pathogen warfare at the plant cell wall. *Current Opinion in Plant Biology*, 12, 406–413.

Hepler, N. K. (2019). *Insights into the evolution of expansin function using in vitro, in vivo, and phylogenetic methodologies* [Doctoral dissertation, The Pennsylvania State University].

Hernández-Aparicio, F., Lisón, P., Rodrigo, I., Bellés, J. M., & López-Gresa, M. P. (2021). Signaling in the tomato immunity against *Fusarium oxysporum*. *Molecules*, 26.

Hirayama, T., & Shinozaki, K. (2010). Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: Past, present and future. *The Plant Journal*, 61, 1041–1052.

Holness, S., Bechtold, U., Mullineaux, P., Serino, G., & Vittorioso, P. (2023). Highlight-induced transcriptional priming against a subsequent drought stress in *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Molecular Sciences*, 24, 6608.

Hou, S., Wang, X., Chen, D., Yang, X., Wang, M., Turrà, D., Di Pietro, A., & Zhang, W. (2014). The secreted peptide PIP1 amplifies immunity through receptor-like kinase 7. *PLoS Pathogens*, 10, e1004331.

IPCC. (2021). *Climate change widespread, rapid, and intensifying*. Intergovernmental Panel on Climate Change.

Jammes, F., Lecomte, P., De Almeida-Engler, J., Bitton, F., Martin-Magniette, M. L., & Renou, J. P. (2005). Genome-wide expression profiling of the host response to root-knot nematode infection in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 44, 447–458.

Jangir, P., Mehra, N., Sharma, K., Singh, N., Rani, M., & Kapoor, R. (2021). Secreted in xylem genes: Drivers of host adaptation in *Fusarium oxysporum*. *Frontiers in Plant Science*, 12, 628611.

Jashni, M. K., Dols, I. H. M., Iida, Y., Boeren, S., Beenen, H. G., Mehrabi, R., Collemare, J., & De Wit, P. J. G. M. (2015). Synergistic action of a metalloprotease and a serine protease from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* cleaves chitin-binding tomato chitinases, reduces their antifungal activity, and enhances fungal virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28, 996–1008.

Jaskiewicz, M., Conrath, U., & Parker, J. E. (2011). Epigenetic memory contributes to systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 23(3), 988–996.

Jayakumar, J., Shanmugapriya, M., Ganapathy, S., Ravichandran, V., Veeramani, P., & Thiruvarassan, S. (2023). Biological control of root knot nematode, *Meloidogyne incognita* using nematode antagonist in tomato. *International Journal of Plant & Soil Science*, 35(23), 4243.

Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444, 323–329.

Jones, J. D. G., Staskawicz, B. J., & Dangl, J. L. (2024). The plant immune system: From discovery to deployment. *Cell*, 187, 2095–2116.

Jones, J. D. G., Vance, R. E., & Dangl, J. L. (2016). Intracellular innate immune surveillance devices in plants and animals. *Science*, 354.



Jones, J. T., Haegeman, A., Danchin, E. G. J., Gaur, H. S., Helder, J., Jones, M. G. K., Kikuchi, T., Manzanilla-López, R., Palomares-Rius, J. E., & Wesemael, W. M. L. (2013). Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 14, 946–961.

Jones, M. G. K., & Goto, D. B. (2011). Root-knot nematodes and giant cells. In *Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions* (pp. 83–100). Springer Netherlands.

Joshi, M. K., Marviya, G. V., Jacob, F., Kandoliya, U. K., Pandya, P. M., & Vala, A. G. (2024). System-wide analysis of groundnut's salinity resilience: Integrating plant-cell interactions with environmental stress dynamics through cutting-edge transcriptomics. *Journal of Biotechnology*, 394, 34–47.

Joshi, R. (2018). A review of *Fusarium oxysporum* on its plant interaction and industrial use. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 6, 112–115.

Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Židek, A., & Potapenko, A. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596, 583–589.

Junges, A. H., Tazzo, I. F., Cardoso, L. S., & Cera, J. C. (2022). Avaliação da onda de calor ocorrida em janeiro de 2022 no Rio Grande do Sul. *Agrometeoros*, 30.

Kamoun, S., & Zipfel, C. (2016). Fungal pathogenesis: Host modulation every which way. *Nature Microbiology*, 1, 16075.

Kaur, B., Bhatia, D., & Mavi, G. S. (2021). Eighty years of gene-for-gene relationship and its applications in identification and utilization of R genes. *Journal of Genetics*, 100, 1–17.

Khan, A., Khan, A., Ali, A., Fatima, S., & Siddiqui, M. A. (2023). Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.): Biology, plant-nematode interactions and their environmentally benign management strategies. *Gesunde Pflanzen*, 75, 2187–2205.

Khanal, C., & Land, J. (2023). Study on two nematode species suggests climate change will inflict greater crop damage. *Scientific Reports*, 13.

Kidd, B. N., Kadoo, N. Y., Dombrecht, B., Tekeoglu, M., Gardiner, D. M., Thatcher, L. F., Bradbury, L. M. T., Jia, G., Singh, K. B., & Manners, J. M. (2011). Auxin signaling and transport promote susceptibility to the root-infecting fungal pathogen *Fusarium oxysporum* in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24, 733–748.

Kim, S. Y. (2006). The role of ABF family bZIP class transcription factors in stress response. *Physiologia Plantarum*, 126, 519–527.

Kim, Y., Park, C. J., Lee, S., Kim, H. J., Lee, J., Cho, M. H., & Lee, Y. (2025). Heat shock proteins and PR gene co-expression in transgenic *Arabidopsis* modulate tolerance to abiotic stress and trade-offs in biomass. *Plant Science*, 335, 111466.

Klein, E., Katan, J., & Gamliel, A. (2011). Soil suppressiveness to *Fusarium* disease following organic amendments and solarization. *Plant Disease*, 95, 1116–1123.

Koça, N. E., Marković, D., Ninković, V., & Martinez, J. (2020). Transcriptional bookmarks and early warning signals in stress-primed plants. *Plant Signaling & Behavior*, 15(6), 1741532.

Krueger, R., & McSorley, R. (2008). Nematode management in organic agriculture. *EDIS*, 2008.

Kuluev, B., Avalbaev, A., Mikhaylova, E., Nikonorov, Y., Berezhneva, Z., & Chemeris, A. (2016). Expression profiles and hormonal regulation of tobacco expansin genes and their involvement in abiotic stress response. *Journal of Plant Physiology*, 206, 1–6.

Kumar, D., & Kirti, P. B. (2023). The genus *Arachis*: An excellent resource for studies on differential gene expression for stress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1275854.

Kumar, K., Raina, S. K., & Sultan, S. M. (2020). *Arabidopsis* MAPK signaling pathways and their cross talks in abiotic stress response. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 29, 700–714.

Lai, Y., & Eulgem, T. (2018). Transcript-level expression control of plant NLR genes. *Molecular Plant Pathology*, 19, 1267–1281.

Lanna, A. C., Filippi, M. C. C. de, Ferreira, C. M., & Nascente, A. S. (2021). Mitigação dos estresses abióticos na agricultura mediada pela interação de microrganismos e plantas (Doc. 319). *Embrapa Arroz e Feijão*.

Lapin, D., Johannrees, O., Wu, Z., Li, X., & Parker, J. E. (2022). Molecular innovations in plant TIR-based immunity signaling. *Plant Cell*, 34, 1479–1496.

Laurence, M. H., Summerell, B. A., Burgess, L. W., & Liew, E. C. Y. (2014). Genealogical concordance phylogenetic species recognition in the *Fusarium oxysporum* species complex. *Fungal Biology*, 118, 374–384.

Leal-Bertioli, S. C. M., Moretzsohn, M. C., Roberts, P. A., Ballén-Taborda, C., Borba, T. C. O., Valdisser, P. A. M. R., Gouvea, E. G., Guimarães, P. M., Guimarães, L. A., & Bertioli, D. J. (2016). Genetic mapping of resistance to *Meloidogyne arenaria* in *Arachis stenosperma*: A new source of nematode resistance for peanut. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 6, 1407–1419.

Li, H., Dong, Z., Ma, C., Xia, Q., Tian, X., & Sehgal, S. (2020). A spontaneous wheat-*Aegilops longissima* translocation carrying *Pm66* confers resistance to powdery mildew. *Theoretical and Applied Genetics*, *133*, 1149–1159.

Li, J., Wang, C., Yang, L., Qiu, F., Li, Y., Zheng, Y., Liu, J., Han, Z., & Wang, Y. (2023). Enhancing tomato resistance by exploring early defense events against *Fusarium* wilt disease. *Phytopathology Research*, *5*.

Li, S., Dong, Y., Li, L., Zhang, Y., Yang, X., Zeng, H., Tan, Q., Zhu, Z., & Li, Q. (2019). The novel cerato-platanin-like protein *FocCPI* from *Fusarium oxysporum* triggers an immune response in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*, 2849.

Li, X., Sun, Y., Yang, Y., Yang, X., Xue, W., Wu, M., Feng, Y., & Zhao, H. (2021). Transcriptomic and histological analysis of the response of susceptible and resistant cucumber to *Meloidogyne incognita* infection revealing complex resistance via multiple signaling pathways. *Frontiers in Plant Science*, *12*.

Li, X., Xing, X., Tian, P., Zhang, M., Huo, Z., Zhao, K., Zhang, S., & Qiu, D. (2018). Comparative transcriptome profiling reveals defense-related genes against *Meloidogyne incognita* invasion in tobacco. *Molecules*, *23*, 2081.

Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (1998). Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, *10*, 1391–1406.

Liu, S., Li, J., Zhang, Y., Liu, N., Viljoen, A., Mostert, D., Yang, Q., Sheng, O., & Xu, L. (2020). Fusaric acid instigates the invasion of banana by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* TR4. *New Phytologist*, *225*, 913–929.

Liu, Y., Khan, A. R., Gan, Y., Liu, Y., Khan, A. R., & Gan, Y. (2022). C2H2 zinc finger proteins response to abiotic stress in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*, 2730.

Llorens, E., Bernal-Vicente, A., Fernandez-Crespo, E., Pascual, J. A., & Garcia-Agustin, P. (2020). Priming plant resistance by mycorrhizal fungi and its effect on plant fitness. *Journal of Experimental Botany*, *71*(14), 4183–4195.

López-Díaz, C., Rahjoo, V., Sulyok, M., Ghionna, V., Martín-Vicente, A., Capilla, J., Di Pietro, A., & López-Berges, M. S. (2018). Fusaric acid contributes to virulence of *Fusarium oxysporum* on plant and mammalian hosts. *Molecular Plant Pathology*, *19*, 440–453.

Lu, Y., & Tsuda, K. (2021). Intimate association of PRR- and NLR-mediated signaling in plant immunity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 34, 3–14.

Luna, E., Pastor, V., Robert, J., Flors, V., Mauch-Mani, B., & Ton, J. (2017). Callose deposition: A multifaceted plant defense response. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(2), 183–193.

Luo, X., Jin, Y., Shen, F., & Zhang, W. (2024). Integrated analysis of the lncRNA–miRNA–mRNA expression profiles in response to *Meloidogyne incognita* in radish (*Raphanus sativus* L.). *Agronomy*, 14.

Ma, H., Chen, J., Zhang, Z., Ma, L., Yang, Z., & Zhang, Q. (2017). MAPK kinase 10.2 promotes disease resistance and drought tolerance by activating different MAPKs in rice. *The Plant Journal*, 92, 557–570.

Ma, L.-J., Van Der Does, H. C., Borkovich, K. A., Coleman, J. J., Daboussi, M.-J., Di Pietro, A., Dufresne, M., Freitag, M., Grabherr, M., & Henrissat, B. (2010). Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature*, 464, 367–373.

Ma, L., Houterman, P. M., Gawehns, F., Cao, L., Sillo, F., Richter, H., Lin, M., Cornelissen, B. J. C., Takken, F. L. W., & Rep, M. (2015). The AVR2–SIX5 gene pair is required to activate I-2-mediated immunity in tomato. *New Phytologist*, 208, 507–518.

Ma, S., Lapin, D., Liu, L., Sun, Y., Song, W., Zhang, X., et al. (2020). Direct pathogen-induced assembly of an NLR immune receptor complex to form a holoenzyme. *Science*, 370.

Ma, Z., Hu, L., & Jiang, W. (2024). Understanding AP2/ERF transcription factor responses and tolerance to various abiotic stresses in plants: A comprehensive review. *International Journal of Molecular Sciences*, 25.

Mallebrera, B., Prosperini, A., Font, G., & Ruiz, M. J. (2018). In vitro mechanisms of beauvericin toxicity: A review. *Food and Chemical Toxicology*, 111, 537–545.

Malnoy, M., Jin, Q., Borejsza-Wysocka, E. E., He, S. Y., & Aldwinckle, H. S. (2007). Overexpression of the Arabidopsis NPR1 gene in apple increases disease resistance. *Plant Cell Reports*, 26(3), 377–386.

Mani, V., Reddy, C. S., Lee, S. K., Park, S., Ko, H. R., Kim, D. G., & Hahn, B. S. (2020). Chitin biosynthesis inhibition of *Meloidogyne incognita* by RNAi-mediated gene silencing increases resistance to transgenic tobacco plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 6626.

MAPA. (2024). Exportações do agronegócio fecham 2023 com US\$ 166,55 bilhões em vendas. *Agência Gov; Ministério Da Agricultura E Pecuária*. Disponível

<<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/exportacoes-do-agronegocio-fecham-2023-com-us-166-55-bilhoes-em-vendas>> Acesso em maio de 2024.

Maqbool, A., Saitoh, H., Franceschetti, M., Stevenson, C., Uemura, A., Kanzaki, H., et al. (2015). Structural basis of pathogen recognition by an integrated HMA domain in a plant NLR immune receptor. *eLife*, 4.

Marcec, M. J., Gilroy, S., Poovaiah, B. W., & Tanaka, K. (2019). Mutual interplay of  $\text{Ca}^{2+}$  and ROS signaling in plant immune response. *Plant Science*, 283, 343–354.

Marowa, P., Ding, A., & Kong, Y. (2016). Expansins: Roles in plant growth and potential applications in crop improvement. *Plant Cell Reports*, 35, 949–965.

Martin, R., Qi, T., Zhang, H., Liu, F., King, M., Toth, C., et al. (2020). Structure of the activated ROQ1 resistosome directly recognizing the pathogen effector XopQ. *Science*, 370.

Masachis, S., Segorbe, D., Turrà, D., Leon-Ruiz, M., Fürst, U., El Ghalid, M., Leonard, G., Felix, G., & Di Pietro, A. (2016). A fungal pathogen secretes plant alkalinizing peptides to increase infection. *Nature Microbiology*, 1, 16043.

Massa, A. N., Sobolev, V. S., Faustinelli, P. C., Tallury, S. P., Thomas Stalker, H., Lamb, M. C., & Arias, R. S. (2024). Genetic diversity, disease resistance, and environmental adaptation of *Arachis duranensis* L.: New insights from landscape genomics. *PLoS ONE*, 19.

Maxted, N., Ford-Lloyd, B. V., Jury, S., Kell, S., & Scholten, M. (2006). Towards a definition of a crop wild relative. *Biodiversity and Conservation*, 15, 2673–2685.

McQueen-Mason, S., Durachko, D. M., & Cosgrove, D. J. (1992). Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *The Plant Cell*, 4, 1425–1433.

Mendes, R. A. G., Basso, M. F., Amora, D. X., Silva, A. P., Paes-de-Melo, B., Togawa, R. C., ... & Grossi-de-Sa, M. F. (2022). *In planta* RNAi approach targeting three *M. incognita* effector genes disturbed the process of infection and reduced plant susceptibility. *Experimental Parasitology*, 237, 108246.

Michielse, C. B., & Rep, M. (2009). Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology*, 10, 311–324.

Mira, J. P., Arenas-M, A., Calderini, D. F., & Canales, J. (2023). Integrated transcriptome analysis identified key expansin genes associated with wheat cell wall, grain weight and yield. *Plants*, 12, 2868.

Mirouze, M., & Paszkowski, J. (2011). Epigenetic contribution to stress adaptation in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 14, 267–274.

- Mitchum, M. G., Hussey, R. S., Baum, T. J., Wang, X., Elling, A. A., & Wubben, M. (2013). Nematode effector proteins: An emerging paradigm of parasitism. *New Phytologist*, *199*, 879–894.
- Monaghan, J., & Zipfel, C. (2012). Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Current Opinion in Plant Biology*, *15*, 349–357.
- Mooney, B. C., Doorly, C. M., Mantz, M., García, P., Huesgen, P. F., & Graciet, E. (2024). Hypoxia represses pattern-triggered immune responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*.
- Moreira, V. J. V., Lourenço-Tessutti, I. T., Basso, M. F., Lisei-de-Sa, M. E., Morgante, C. V., Paes-de-Melo, B., Silva, R. L. O., & Brasileiro, A. C. M. (2022). *Minc03328* effector gene downregulation severely affects *Meloidogyne incognita* parasitism in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, *255*, 1–16.
- Moretti, A., Pascale, M., & Logrieco, A. F. (2019). Mycotoxin risks under a climate change scenario in Europe. *Trends in Food Science & Technology*, *84*, 38–40.
- Morimoto, K., Mizoi, J., Qin, F., Kim, J. S., Sato, H., & Osakabe, Y. (2013). Stabilization of *Arabidopsis* DREB2A is required but not sufficient for the induction of target genes under conditions of stress. *PLoS ONE*, *8*, e80547.
- Morimoto, K., Ohama, N., Kidokoro, S., Mizoi, J., Takahashi, F., Todaka, D., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2017). BPM–CUL3 E3 ligase modulates thermotolerance by facilitating negative regulatory domain-mediated degradation of DREB2A in *Arabidopsis*. *PNAS*, *114*, E8528–E8536.
- Mota, A. P. Z. (2018). Comparative root transcriptome of wild *Arachis* reveals NBS–LRR genes related to nematode resistance. *BMC Plant Biology*, *18*, 1–16.
- Mota, A. P. Z., Brasileiro, A. C. M., Vidigal, B., Oliveira, T. N., da Cunha Quintana Martins, A., & Saraiva, M. A. de P. (2021). Defining the combined stress response in wild *Arachis*. *Scientific Reports*, *11*, 11097.
- Muthusamy, M., Kim, J. H., Kim, J. A., Park, S. R., Suh, E. J., & Park, J.-I. (2022). *Brassica rapa* expansin genes differentially respond to clubroot pathogens and suppression of root-abundant *BrEXLB1* improves host resistance to *Plasmodiophora brassicae* race 2. *SSRN Electronic Journal*.
- Muthusamy, M., Kim, J. Y., Yoon, E. K., Kim, J. A., & Lee, S. I. (2020). *BrEXLB1*, a *Brassica rapa* expansin-like B1 gene is associated with root development, drought stress response, and seed germination. *Genes*, *11*, 404.

Nakashima, K., Takasaki, H., Mizoi, J., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2012). NAC transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1819, 97–103.

Narváez-Barragán, D. A., Tovar-Herrera, O. E., Guevara-García, A., Serrano, M., & Martínez-Anaya, C. (2022). Mechanisms of plant cell wall surveillance in response to pathogens, cell wall-derived ligands and the effect of expansins to infection resistance or susceptibility. *Frontiers in Plant Science*, 13, 969343.

Neher, D. A., Nishanthan, T., Grabau, Z. J., & Chen, S. Y. (2019). Crop rotation and tillage affect nematode communities more than biocides in monoculture soybean. *Applied Soil Ecology*, 140, 89–97.

Nejat, N., & Mantri, N. (2017). Plant immune system: Crosstalk between responses to biotic and abiotic stresses—The missing link in understanding plant defence. *Current Issues in Molecular Biology*, 23, 1–16.

Ngou, B. P. M., Ding, P., & Jones, J. D. G. (2022). Thirty years of resistance: Zig-zag through the plant immune system. *The Plant Cell*, 34, 1447–1478.

Nicotra, A. B., Atkin, O. K., Bonser, S. P., Davidson, A. M., Finnegan, E. J., Mathesius, U., Poot, P., Purugganan, M. D., Richards, C. L., & Valladares, F. (2010). Plant phenotypic plasticity in a changing climate. *Trends in Plant Science*, 15, 684–692.

Niehaus, E. M., von Bargen, K. W., Espino, J. J., Pfannmüller, A., Humpf, H. U., & Tudzynski, B. (2014). Characterization of the fusaric acid gene cluster in *Fusarium fujikuroi*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 1749–1762.

Nishimura, M. T., Anderson, R. G., Cherkis, K. A., Law, T. F., Liu, Q. L., Machius, M., et al. (2017). TIR-only protein RBA1 recognizes a pathogen effector to regulate cell death in *Arabidopsis*. *PNAS*, 114, E2053–E2062.

Oliveira, J. O., Silva, R. V., Gondim, J. P. E., Furtado, J. P. M., Castro, B. M. C., & Zanuncio, J. C. (2024). *Meloidogyne incognita* and *Meloidogyne javanica* (Rhabditida: Meloidogynidae): First report parasitizing cassava in Goiás State, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 84.

Ordonez, N., Seidl, M. F., Waalwijk, C., Drenth, A., Kilian, A., Thomma, B. P. H. J., Ploetz, R. C., & Kema, G. H. J. (2015). Worse comes to worst: Bananas and Panama disease—When plant and pathogen clones meet. *PLoS Pathogens*, 11, e1005197.

Ortbauer, M. (2013). Abiotic stress adaptation: Protein folding stability and dynamics. In K. Vahdati & C. Leslie (Eds.), *Abiotic Stress - Plant Responses and Applications in Agriculture* (Ch. 1). IntechOpen.

Oso Adeola Abiola. (2020). Vegetable production and nematodes infestation: Impacts on small-scale farming communities of South Africa. *World Journal of Advanced Research and Reviews*, 7, 168–177.

Otulak-Kozieł, K., Kozieł, E., Lockhart, B. E. L., & Bujarski, J. J. (2020). The expression of potato expansin A3 (*StEXPA3*) and extensin 4 (*StEXT4*) genes with distribution of *StEXPAs* and HRGPs-extensin changes as an effect of cell wall rebuilding in two types of *PVYNTN*–*Solanum tuberosum* interactions. *Viruses*, 12, 66.

Ozdemir, S., Piya, S., Lopes-Caitar, V. S., Coffey, N., Rice, J. H., & Hewezi, T. (2024). Local and systemic transcriptome and spliceome reprogramming induced by the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in tomato. *Horticulture Research*.

Paciolla, C., Dipierro, N., Mulè, G., Logrieco, A., & Dipierro, S. (2004). The mycotoxins beauvericin and T-2 induce cell death and alteration to the ascorbate metabolism in tomato protoplasts. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 65, 49–56.

Palmgren, M., & Shabala, S. (2024). Adapting crops for climate change: Regaining lost abiotic stress tolerance in crops. *Frontiers in Science*, 2.

Pan, J., Li, X., Fu, C., Bian, J., Wang, Z., Yu, C., Liu, X., Wang, G., Tian, R., Song, X., Li, C., Xia, H., Zhao, S., Hou, L., Gao, M., Zi, H., Bertoli, D., Leal-Bertoli, S., Pandey, M. K., ... Zhao, C. (2024). High-density bin-based genetic map reveals a 530-kb chromosome segment derived from wild peanut contributing to late leaf spot resistance. *Theoretical and Applied Genetics*, 137.

Pandian, K., Mustaffa, M. R. A. F., Mahalingam, G., Paramasivam, A., John Prince, A., & Gajendiren, M. (2024). Synergistic conservation approaches for nurturing soil, food security and human health towards sustainable development goals. *Journal of Hazardous Materials Advances*, 16.

Papolu, P. K., Gantasala, N. P., Kamaraju, D., Banakar, P., Sreevathsa, R., & Rao, U. (2013). Utility of host delivered RNAi of two FMRF amide like peptides, *flp-14* and *flp-18*, for the management of root knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *PLoS ONE*, 8(11), e80603.

Pastor-Fernández, J., López-Gresa, M. P., Bellés, J. M., & Rodrigo, I. (2022). Tomato Systemin primes defense against necrotrophic fungi by activating MPK3/MPK6 signaling cascade. *Plant Molecular Biology Reporter*, 40(1), 105–117.

Patkar, R. N., & Naqvi, N. I. (2017). Fungal manipulation of hormone-regulated plant defense. *PLoS Pathogens*, 13, e1006334.



Perincherry, L., Lalak-Kánczugowska, J., & Stępień, Ł. (2019). *Fusarium*-produced mycotoxins in plant-pathogen interactions. *Toxins*, 11, 664.

Ploetz, R. C. (2015). Fusarium wilt of banana. *Phytopathology*, 105, 1512–1521.

Pokhrel, S., Kharel, P., Pandey, S., Botton, S., Nugraha, G. T., Holbrook, C., & Ozias-Akins, P. (2024). Understanding the impacts of drought on peanuts (*Arachis hypogaea* L.): Exploring physio-genetic mechanisms to develop drought-resilient peanut cultivars. *Frontiers in Genetics*, 15.

Pottinger, S. E., & Innes, R. W. (2020). RPS5-mediated disease resistance: Fundamental insights and translational applications. *Annual Review of Phytopathology*, 58, 139–160.

Pruitt, R. N., Locci, F., Wanke, F., Zhang, L., Saile, S. C., Joe, A., et al. (2021). The EDS1–PAD4–ADR1 node mediates *Arabidopsis* pattern-triggered immunity. *Nature*, 598, 495–499.

Qian, H., Xiao, Z., Cheng, L., Geng, R., Ma, Y., Bi, Y., Liu, Z., Huang, Y., & Xie, Y. (2025). A novel secreted protein of *Fusarium oxysporum* promotes infection by inhibiting PR-5 protein in plant. *Plant, Cell & Environment*, 48, 1021–1036.

Qiu, Y., & Yu, D. (2009). Over-expression of the stress-induced *OsWRKY45* enhances disease resistance and drought tolerance in *Arabidopsis*. *Environmental and Experimental Botany*, 65(1), 35–47.

Rafiqi, M., Bernoux, M., Ellis, J. G., & Dodds, P. N. (2009). In the trenches of plant pathogen recognition: Role of NB-LRR proteins. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20, 1017–1024.

Rai, A. C., Singh, M., & Shah, K. (2013). Engineering drought tolerant tomato plants over-expressing *BcZAT12* gene encoding a C2H2 zinc finger transcription factor. *Phytochemistry*, 85, 44–50.

Rai, G. K., Khanday, D. M., Choudhary, S. M., Kumar, P., Kumari, S., & Martínez-Andújar, C. (2024). Unlocking nature's stress buster: Absciscic acid's crucial role in defending plants against abiotic stress. *Plant Stress*, 11.

Ramesh, S. A., Kumar, M., & Praveen, G. (2020). MAPK signaling in plant immunity: A double-edged sword. *Biotechnology Advances*, 45, 107649.

Ramya, M., Balaji, C., & Girish, L. (2015). Environment change prediction to adapt climate-smart agriculture using big data analytics. *International Journal of Advanced Research in Computer Engineering & Technology (IJARCET)*, 4.

- Rana, A., Sahgal, M., & Johri, B. N. (2017). *Fusarium oxysporum*: Genomics, diversity and plant-host interaction. In N. Kharwar, R. Upadhyay, R. Dubey, & R. Raghuwanshi (Eds.), *Developments in Fungal Biology and Applied Mycology* (pp. 159–199). Springer Singapore.
- Rasmussen, S., Barah, P., Suarez-Rodriguez, M. C., Bressendorff, S., Friis, P., Costantino, P., Bones, A. M., & Mundy, J. (2013). Transcriptome responses to combinations of stresses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, *161*, 1783–1794.
- Reddy, A. S., Nair, S., & Mahalingam, R. (2018). *MuWRKY3* overexpression enhances abiotic stress tolerance in peanut. *Plant Physiology and Biochemistry*, *132*, 1–10.
- Rhodes, J., Yang, H., Moussu, S., Boutrot, F., Santiago, J., & Zipfel, C. (2021). Perception of a divergent family of phytocytokines by the *Arabidopsis* receptor kinase MIK2. *Nature Communications*, *12*, 705.
- Roth, C., Lüdke, D., Klenke, M., Quathamier, A., Valerius, O., Braus, G. H., Wiermer, M., & Scheel, D. (2017). The truncated NLR protein TIR-NBS13 is a MOS6/IMPORTIN- $\alpha$ 3 interaction partner required for plant immunity. *The Plant Journal*, *92*, 808–821.
- Sahu, P. P., Pandey, G., Sharma, N., Puranik, S., Muthamilarasan, M., & Prasad, M. (2013). Epigenetic mechanisms of plant stress responses and adaptation. *Plant Cell Reports*, *32*, 1151–1159.
- Samalova, M., Gahurova, E., & Hejatkó, J. (2022). Expansin-mediated developmental and adaptive responses: A matter of cell wall biomechanics? *Quantitative Plant Biology*, *3*.
- Samalova, M., Melnikava, A., Elsayad, K., Peaucelle, A., Gahurova, E., & Gumulec, J. (2024). Hormone-regulated expansins: Expression, localization, and cell wall biomechanics in *Arabidopsis* root growth. *Plant Physiology*, *194*, 209–228.
- Sampedro, J., & Cosgrove, D. J. (2005). The expansin superfamily. *Genome Biology*, *6*, 242.
- Santini, L., De Freitas Munhoz, C., Bonfim, M. F., Brandão, M. M., Inomoto, M. M., & Vieira, M. L. C. (2016). Host transcriptional profiling at early and later stages of the compatible interaction between *Phaseolus vulgaris* and *Meloidogyne incognita*. *Phytopathology*, *106*, 282–294.
- Sato, K., Uehara, T., Holbein, J., Sasaki-Sekimoto, Y., Gan, P., Bino, T., Fukuda, H., & Takahashi, H. (2021). Transcriptomic analysis of resistant and susceptible responses in a new model root-knot nematode infection system using *Solanum torvum* and *Meloidogyne arenaria*. *Frontiers in Plant Science*, *12*.

- Savary, S., Willocquet, L., Pethybridge, S. J., Esker, P., McRoberts, N., & Nelson, A. (2019). The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecology & Evolution*, 3, 430–439.
- Schreyer, P., & Pilat, D. (2001). Measuring productivity. *OECD Economic Studies*, 33(2), 127–170.
- Sewelam, N., El-Shetehy, M., Mauch, F., & Maurino, V. G. (2021). Combined abiotic stresses repress defense and cell wall metabolic genes and render plants more susceptible to pathogen infection. *Plants*, 10.
- Shi, Q., Mao, Z., Zhang, X., Ling, J., Lin, R., Zhang, X., Abad, P., & Peng, D. (2018). The novel secreted *Meloidogyne incognita* effector MiISE6 targets the host nucleus and facilitates parasitism in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 9, 252.
- Siamak, S. B., & Zheng, S. (2018). Banana Fusarium wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) control and resistance, in the context of developing wilt-resistant bananas within sustainable production systems. *Horticultural Plant Journal*, 4, 208–218.
- Sikandar, A., Zhang, M. Y., Wang, Y. Y., Zhu, X. F., Liu, X. Y., & Fan, H. Y. (2020). *Meloidogyne incognita* (root-knot nematode): A risk to agriculture. *Applied Ecology and Environmental Research*, 18, 1679–1690.
- Sikder, M. M., Vestergård, M., Kyndt, T., Kudjorjic, E. N., & Nicolaisen, M. (2021). Phytohormones selectively affect plant parasitic nematodes associated with *Arabidopsis* roots. *New Phytologist*, 232, 1272–1285.
- Sillmann, J., & Sippel, S. (2020). Climate extremes and their implications for impact and risk assessment: A short introduction. In *Climate Extremes and Their Implications for Impact and Risk Assessment* (pp. 1–9).
- Singh, B. K., Delgado-Baquerizo, M., Egidi, E., Guirado, E., Leach, J. E., Liu, H., Zhang, X., Wang, J., & Maestre, F. T. (2023). Climate change impacts on plant pathogens, food security and paths forward. *Nature Reviews Microbiology*, 21, 640–656.
- Singh, R. R., Chinnasri, B., De Smet, L., Haeck, A., Demeestere, K., Van Cutsem, P., Smagghe, G., & Gheysen, G. (2019). Systemic defense activation by COS-OGA in rice against root-knot nematodes depends on stimulation of the phenylpropanoid pathway. *Plant Physiology and Biochemistry*, 142, 202–210.
- Singh, V., & Sharma, A. (2023). Engineering plants for climate resilience: Prospects and challenges. *Trends in Plant Science*, 28(2), 105–117.

Son, S., Kim, S., Lee, K., Oh, J., Choi, I., & Do, J. (2021). The *Capsicum baccatum*-specific truncated NLR protein CbCN enhances the innate immunity against *Colletotrichum acutatum*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 7672.

Song, W., Liu, L., Yu, D., Bernardy, H., Jirschitzka, J., Huang, S., et al. (2024). Substrate-induced condensation activates plant TIR domain proteins. *Nature*, 627, 847–853.

Soudani, M. (2024). Functional genomics of MAPK3: From antioxidant balance to broad-spectrum resistance. *Plant Cell Reports*, 43(1), 11–24.

Srinivas, C., Nirmala Devi, D., Narasimha Murthy, K., Mohan, C. D., Lakshmeesha, T. R., Singh, B. P., Kalagatur, N. K., Niranjana, S. R., Hashem, A., & Alqaeawi, A. A. (2019). *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* causal agent of vascular wilt disease of tomato: Biology to diversity—A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26, 1315–1324.

Srivastava, V., Patra, K., Pai, H., Aguilar-Pontes, M. V., Berasategui, A., Kamble, A., Rivas-Ubach, A., Requena, N., & Dicke, M. (2024). Molecular dialogue during host manipulation by the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum*. *Annual Review of Phytopathology*, 62, 97–126.

Staal, J., Kaliff, M., Dewaele, E., Persson, M., & Dixelius, C. (2008). RLM3, a TIR domain-encoding gene involved in broad-range immunity of *Arabidopsis* to necrotrophic fungal pathogens. *The Plant Journal*, 55, 188–200.

Stahl, E., Fernandez Martin, A., Glauser, G., Guillou, M. C., Aubourg, S., Renou, J. P., Reymond, P., & Mauch-Mani, B. (2022). The MIK2/SCOOP signaling system contributes to *Arabidopsis* resistance against herbivory by modulating jasmonate and indole glucosinolate biosynthesis. *Frontiers in Plant Science*, 13, 852808.

Steuernagel, B., Witek, K., Jones, J. D. G., & Wulff, B. B. H. (2017). MutRenSeq: A method for rapid cloning of plant disease resistance genes. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1659, pp. 215–229).

Stevens, K., Roberts, M. R., Jeynes-Cupper, K., Majeed, L., Pastor, V., Catoni, M., & Luna, E. (2025). Developmentally regulated generation of a systemic signal for long-lasting defence priming in tomato. *New Phytologist*, 245(3), 1145–1157.

Stukenbrock, E., & Gurr, S. (2023). Address the growing urgency of fungal disease in crops. *Nature*, 617, 31–34.

Subedi, S., Thapa, B., & Shrestha, J. (2020). Root-knot nematode management: A review (*Meloidogyne incognita*). *Journal of Agriculture and Natural Resources*, 3, 21–31.

Sun, X., Lapin, D., Feehan, J. M., Stolze, S. C., Kramer, K., Dongus, J. A., et al. (2021). Pathogen effector recognition-dependent association of NRG1 with EDS1 and SAG101 in TNL receptor immunity. *Nature Communications*, 12.

Suzuki, R., Ueda, T., Wada, T., Ito, M., Ishida, T., & Sawa, S. (2021). Identification of genes involved in *Meloidogyne incognita*-induced gall formation processes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotechnology*, 38, 1–8.

Swaminathan, M., Lionetti, V., & Zabortina, O. A. (2022). Cell wall modifications and priming against pathogens: Emerging roles of carbohydrate-active enzymes. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19), 11438.

Tan, J., Wang, M., Shi, Z., & Miao, X. (2018). *OsEXPA10* mediates the balance between growth and resistance to biotic stress in rice. *Plant Cell Reports*, 37, 993–1002.

Tan, Q. W., Lim, P. K., Chen, Z., Pasha, A., Provart, N., & Arend, M. (2023). Cross-stress gene expression atlas of *Marchantia polymorpha* reveals the hierarchy and regulatory principles of abiotic stress responses. *Nature Communications*, 14, 1–19.

Tanaka, Y., Sano, T., Tamaoki, M., Nakajima, N., Kondo, N., & Hasezawa, S. (2006). Cytokinin and auxin inhibit abscisic acid-induced stomatal closure by enhancing ethylene production in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 57, 2259–2266.

Tapia-Vázquez, I., Montoya-Martínez, A. C., De los Santos-Villalobos, S., Ek-Ramos, M. J., Montesinos-Matías, R., & Martínez-Anaya, C. (2022). Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) a threat to agriculture in Mexico: Biology, current control strategies, and perspectives. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 38, 1–18.

Tavleeva, M. M., Belykh, E. S., Rybak, A. V., Rasova, E. E., Chernykh, A. A., Ismailov, Z. B., & Velegzhaninov, I. O. (2022). Effects of antioxidant gene overexpression on stress resistance and malignization in vitro and in vivo: A review. *Antioxidants*, 11(12), 2316.

Teillet, A., Dybal, K., Kerry, B. R., Miller, A. J., Curtis, R. H. C., & Hedden, P. (2013). Transcriptional changes of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in response to *Arabidopsis thaliana* root signals. *PLoS ONE*, 8, e61259.

Tetorya, M., & Rajam, M. V. (2021). RNAi-mediated silencing of *PEX6* and *GAS1* genes of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* confers resistance against Fusarium wilt in tomato. *3 Biotech*, 11, 1–8.

Thomma, B. P. H. J., Nürnberger, T., & Joosten, M. H. A. J. (2011). Of PAMPs and effectors: The blurred PTI–ETI dichotomy. *The Plant Cell*, 23, 4–15.

Thoppurathu, F. J., Ghorbanzadeh, Z., Vala, A. K., Hamid, R., & Joshi, M. (2022). Unravelling the treasure trove of drought-responsive genes in wild-type peanut through

transcriptomics and physiological analyses of root. *Functional and Integrative Genomics*, 22, 215–233.

Tran, L. S. P., Nakashima, K., Sakuma, Y., Osakabe, Y., Qin, F., Simpson, S. D., Maruyama, K., Fujita, Y., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Co-expression of the stress-inducible zinc finger homeodomain ZFHD1 and NAC transcription factors enhances expression of the *ERD1* gene in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 49, 46–63.

Tsai, Y. C., Brenneman, T. B., Gao, D., Chu, Y., Lamon, S., Bertioli, D. J., & Leal-Bertioli, S. C. M. (2024). The identification of the peanut wild relative *Arachis stenosperma* as a source of resistance to stem rot and analyses of genomic regions conferring disease resistance through QTL mapping. *Agronomy*, 14.

Turrà, D., & Di Pietro, A. (2015). Chemotropic sensing in fungus–plant interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 26, 135–140.

Upasani, M. L., Limaye, B. M., Gurjar, G. S., Kasibhatla, S. M., Joshi, R. R., Kadoo, N. Y., & Gupta, V. S. (2017). Chickpea–*Fusarium oxysporum* interaction transcriptome reveals differential modulation of plant defense strategies. *Scientific Reports*, 7, 1–12.

van Dam, P., & Rep, M. (2017). The distribution of miniature Impala elements and SIX genes in the *Fusarium* genus is suggestive of horizontal gene transfer. *Journal of Molecular Evolution*, 85(1–2), 14–25.

van Dam, P., Fokkens, L., Ayukawa, Y., van der Gragt, M., ter Horst, A., Brankovics, B., Houterman, P. M., Arie, T., & Rep, M. (2017). A mobile pathogenicity chromosome in *Fusarium oxysporum* for infection of multiple cucurbit species. *Scientific Reports*, 7, Article 9042.

van der Burgh, A. M., & Joosten, M. H. A. J. (2019). Plant immunity: Thinking outside and inside the box. *Trends in Plant Science*, 24, 587–601.

van der Does, H. C., Lievens, B., Claes, L., Houterman, P. M., Cornelissen, B. J. C., & Rep, M. (2008). The presence of a virulence locus discriminates *Fusarium oxysporum* isolates causing tomato wilt from other isolates. *Environmental Microbiology*, 10, 1475–1485.

van Hulten, M., Pelser, M., van Loon, L. C., Pieterse, C. M. J., & Ton, J. (2006). Costs and benefits of priming for defense in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(14), 5602–5607.

Vandenbroucke, K., & Metzlaff, M. (2013). Abiotic stress tolerant crops: Genes, pathways and bottlenecks. In *Sustainable food production* (pp. 1–17). Springer.

Wang, D., Wang, J., Su, P., Dai, J., Tan, X., & Zhang, D. (2022). Effects of dazomet combined with *Rhodopseudomonas palustris* PSB-06 on root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* infecting ginger and soil microorganisms diversity. *Frontiers in Microbiology*, *13*, Article 967521.

Wang, L., Wang, W., Miao, Y., Peters, M., Schultze-Kraft, R., & Liu, G. (2023). Development of transgenic composite *Stylosanthes* plants to study root growth regulated by a  $\beta$ -expansin gene, *SgEXPB1*, under phosphorus deficiency. *Plant Cell Reports*, *42*, 575–585.

Wang, L., Zhang, T., Li, C., Zhou, C., Liu, B., & Wu, Y. (2024). Overexpression of wild soybean expansin gene *GsEXLB14* enhanced the tolerance of transgenic soybean hairy roots to salt and drought stresses. *Plants*, *13*, 1656.

Wang, W., Chen, L., Fengler, K., Bolar, J., Llaca, V., Wang, X., Lazo, G. R., & Jones, J. D. G. (2021). A giant NLR gene confers broad-spectrum resistance to *Phytophthora sojae* in soybean. *Nature Communications*, *12*, 6263.

Wang, W., Liu, N., Gao, C., Rui, L., Jiang, Q., Chen, S., et al. (2021). The truncated TNL receptor TN2-mediated immune responses require ADR1 function. *The Plant Journal*, *108*, 672–689.

Wang, X., Cheng, C., Zhang, K., Tian, Z., Xu, J., Yang, S., & Zhu, L. (2018). Comparative transcriptomics reveals suppressed expression of genes related to auxin and the cell cycle contributes to the resistance of cucumber against *Meloidogyne incognita*. *BMC Genomics*, *19*, Article 200.

Wang, Y., Liu, X., Yuan, B., Chen, X., Zhao, H., Ali, Q., Wang, Z., & Ma, X. (2024b). *Fusarium graminearum* rapid alkalization factor peptide negatively regulates plant immunity and cell growth via the FERONIA receptor kinase. *Plant Biotechnology Journal*, *22*, 1800–1811.

Wang, Y., Zhang, Y., Wang, Z., Zhang, X., & Yang, S. (2013). A missense mutation in CHS1, a TIR-NB protein, induces chilling sensitivity in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, *75*, 553–565.

Wang, Z., Cao, J., Lin, N., Li, J., Wang, Y., & Liu, W. (2024). Origin, evolution, and diversification of the expansin family in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*, 11814.

Warmerdam, S., Sterken, M. G., Sukarta, O. C. A., van Schaik, C. C., Oortwijn, M. E. P., Lozano-Torres, J. L., Goverse, A., & Smant, G. (2020). The TIR-NB-LRR pair DSC1 and WRKY19 contributes to basal immunity of *Arabidopsis* to the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *BMC Plant Biology*, *20*, Article 242.

Warmerdam, S., Sterken, M. G., van Schaik, C., Oortwijn, M. E. P., Sukarta, O. C. A., Lozano-Torres, J. L., Goverse, A., & Smant, G. (2018). Genome-wide association mapping of the architecture of susceptibility to the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 218, 724–737.

Warsi, M. K., Howladar, S. M., & Alsharif, M. A. (2023). Regulon: An overview of plant abiotic stress transcriptional regulatory system and role in transgenic plants. *Brazilian Journal of Biology*, 83.

Wieczorek, A. (2003). Use of biotechnology in agriculture—Benefits and risks. *NABC Report*, 15, 3–11.

Wu, C. H., Abd-El-Haliem, A., Bozkurt, T. O., Belhaj, K., Terauchi, R., Vossen, J. H., et al. (2017). NLR network mediates immunity to diverse plant pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114, 8113–8118.

Wu, Z., Tian, L., Liu, X., Huang, W., Zhang, Y., & Li, X. (2022). The N-terminally truncated helper NLR NRG1C antagonizes immunity mediated by its full-length neighbors NRG1A and NRG1B. *The Plant Cell*, 34, 1621–1640.

Xu, Y., Liu, F., Zhu, S., & Li, X. (2018). The maize NBS-LRR gene ZmNBS25 enhances disease resistance in rice and *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 9, Article 1033.

Yadav, S. S., Hegde, V. S., Habibi, A. B., Dia, M., & Verma, S. (2019). Climate change, agriculture and food security. In *Food Security and Climate Change* (pp. 1–24). Springer.

Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (1994). A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *The Plant Cell*, 6, 251–264.

Yamaguchi, K., & Kawasaki, T. (2021). Pathogen- and plant-derived peptides trigger plant immunity. *Peptides*, 144, 170528.

Yang, C., Jiang, L., Leng, Z., Yuan, S., Wang, Y., & Liu, G. (2024). Overexpression of NtEXPA7 promotes seedling growth and resistance to root-knot nematode in tobacco. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 720, 150086.

Yang, L., Zhao, D., Li, X., Chen, H., Wang, Y., & Zhang, Y. (2020). R gene-mediated histone modifications improve plant resistance in *Solanum tuberosum*. *The Plant Journal*, 103(5), 1736–1749.



Yang, R., Yang, L., Wang, X., Wang, Y., Zhang, J., & Xu, J. (2023). Overexpression of the *Salix matsudana* expansin gene *SmEXPA23* enhances plant salt tolerance. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 152, 309–316.

Yang, X., Lu, M., Wang, Y., Wang, Y., Liu, Z., & Chen, S. (2021). Response mechanism of plants to drought stress. *Horticulturae*, 7, 50.

Ying, Y., Yang, H., Zhang, L., Chen, M., Li, J., & Zhou, Q. (2023). Overexpression of TaSOD improves drought and salt stress tolerance in wheat. *Plant Physiology and Biochemistry*, 198, 106832.

Yoshida, T., Fujita, Y., Sayama, H., Kidokoro, S., Maruyama, K., & Mizoi, J. (2010). AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. *The Plant Journal*, 61, 672–685.

Yu, D., Song, W., Tan, E. Y. J., Liu, L., Cao, Y., Jirschitzka, J., et al. (2022). TIR domains of plant immune receptors are 2',3'-cAMP/cGMP synthetases mediating cell death. *Cell*, 185(13), 2370–2386.e18.

Yu, H., Xu, W., Chen, S., Wu, X., Rao, W., Liu, X., et al. (2024). Activation of a helper NLR by plant and bacterial TIR immune signaling. *Science*, 386, 1413–1420.

Yuan, C., Li, C., Lu, X., Zhao, X., Yan, C., Wang, J., Sun, Q., & Shan, S. (2020). Comprehensive genomic characterization of NAC transcription factor family and their response to salt and drought stress in peanut. *BMC Plant Biology*, 20, Article 254.

Zandalinas, S. I., Balfagón, D., Gómez-Cadenas, A., & Mittler, R. (2022). Plant responses to climate change: Metabolic changes under combined abiotic stresses. *Journal of Experimental Botany*, 73, 3339–3354.

Zandalinas, S. I., Sengupta, S., Fritschi, F. B., Azad, R. K., Nechushtai, R., & Mittler, R. (2021). The impact of multifactorial stress combination on plant growth and survival. *New Phytologist*, 230, 1034–1048.

Zhang, C., Chen, H., Cai, T., Deng, Y., Zhuang, R., & Zhang, N. (2017). Overexpression of a novel peanut NBS-LRR gene *AhRRS5* enhances disease resistance to *Ralstonia solanacearum* in tobacco. *Plant Biotechnology Journal*, 15, 39–55.

Zhang, H., Mittal, N., Leamy, L. J., Barazani, O., & Song, B. H. (2017). Back into the wild—Apply untapped genetic diversity of wild relatives for crop improvement. *Evolutionary Applications*, 10, 5–24.

Zhang, X. C., & Gassmann, W. (2003). RPS4-mediated disease resistance requires the combined presence of RPS4 transcripts with full-length and truncated open reading frames. *The Plant Cell*, 15, 2333–2342.

Zhang, X., Dodds, P. N., & Bernoux, M. (2017). What do we know about NOD-like receptors in plant immunity? *Annual Review of Phytopathology*, 55, 205–229.

Zhang, X., Huang, H., Wu, B., Xie, J., Viljoen, A., Wang, W., Qin, L., Xu, L., & Li, G. (2021). The M35 metalloprotease effector *FocM35\_1* is required for full virulence of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4. *Pathogens*, 10(7), 893.

Zhang, Y., Du, P., Xiong, F., Zhang, X., & Song, H. (2022). WRKY genes improve drought tolerance in *Arachis duranensis*. *Frontiers in Plant Science*, 13, 910408.

Zhang, Y., Wang, M., Jiang, F., & Zhang, H. (2023). Functional analysis of WRKY transcription factors in abiotic stress tolerance and hormonal crosstalk. *BMC Plant Biology*, 23, Article 143.

Zhang, Z., Lin, Z., & Xin, Z. (2009). Research progress in BYDV resistance genes derived from wheat and its wild relatives. *Journal of Genetics and Genomics*, 36, 567–573.

Zhao, J., Sun, Q., Quentin, M., Ling, J., Abad, P., Zhang, X., Liu, F., & Rosso, M. N. (2021). A *Meloidogyne incognita* C-type lectin effector targets plant catalases to promote parasitism. *New Phytologist*, 232, 2124–2137.

Zhao, T., Rui, L., Li, J., Nishimura, M. T., Vogel, J. P., & Liu, N. (2015). A truncated NLR protein, TIR-NBS2, is required for activated defense responses in the *exo70B1* mutant. *PLoS Genetics*, 11(5), e1004945.

Zhao, Y., Cheng, X., Liu, X., Wu, H., Bi, H., & Xu, H. (2018). The wheat MYB transcription factor *TaMYB31* is involved in drought stress responses in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 9, Article 303.

Zhou, J., Ma, J., Yang, Y., Chen, X., Li, H., & Zhao, D. (2023). *ApHIPP26* overexpression in *Arabidopsis* confers tolerance to heavy metal stress via enhanced antioxidant system. *Environmental and Experimental Botany*, 200, 105017.

Zou, J., Chen, X., Liu, C., Guo, M., Kanwar, M. K., Qi, Z., Lin, H., Xie, Z., & Liu, F. (2023). Autophagy promotes jasmonate-mediated defense against nematodes. *Nature Communications*, 14, Article 2499. h

## Capítulo 2

---

### **Expressão ectópica de um gene NLR truncado de *Arachis* selvagem aumenta a resistência a *Fusarium oxysporum***

(Os dados deste capítulo fazem parte do manuscrito publicado no periódico *Frontiers in Plant Science*- 2024)

de Araújo, A. C., Brasileiro, A. C. M., Martins, A. da C. Q., Grynberg, P., Togawa, R. C., Saraiva, M. A. de P., et al. (2024). Ectopic expression of a truncated NLR gene from wild *Arachis* enhances resistance to *Fusarium oxysporum*. *Front Plant Sci* 15, 1486820. doi: 10.3389/FPLS.2024.1486820

Os links de acesso para os artigos suplementares dessa tese estão disponíveis em:  
[Arquivos suplementares](#)

## RESUMO

*Fusarium oxysporum* causa marchas vasculares severas em diversas espécies de plantas cultivadas, resultando em perdas significativas de produtividade. O sistema modelo *Arabidopsis thaliana*–*F. oxysporum* f.sp. *conglutinans* (FOC) permite a identificação de correlações robustas entre genótipos e fenótipos, sendo empregado neste estudo para avaliar os efeitos da superexpressão do gene NLR truncado *AsTIR19*, oriundo de *Arachis stenosperma*, na resistência à infecção fúngica. Linhagens transgênicas de *Arabidopsis* superexpressando *AsTIR19* (*overexpression*, OE) apresentaram resistência aumentada ao FOC, sem exibir alterações fenotípicas discerníveis. Para investigar os mecanismos moleculares associados a essa resistência, foi realizado o sequenciamento do transcriptoma completo de uma linhagem OE e de plantas selvagens (WT), inoculadas ou não com FOC, utilizando a plataforma Illumina HiSeq4000. A análise comparativa revelou 778 genes diferencialmente expressos (DEGs) atribuídos à superexpressão do transgene, e 434 DEGs induzidos pela inoculação com o fungo na linhagem OE, muitos deles associados a categorias de ontologia gênica (GO) relacionadas à defesa. As análises de enriquecimento funcional (GO e KEGG) indicaram que os DEGs estavam concentrados nas vias do fenilpropanoide e dos flavonoides nas plantas OE. Essa análise transcriptômica evidencia como a superexpressão de *AsTIR19* reprograma redes de expressão gênica, ativando vias de resposta ao estresse em múltiplos processos metabólicos. Esses resultados fornecem novos insights sobre os mecanismos moleculares envolvidos na ação desse gene NLR sob estresse, destacando seu potencial para o aumento da resistência a *Fusarium oxysporum*.

Palavras-chave: NLR truncado, transcriptoma, defesa vegetal, estresse, fungos

## ABSTRACT

### **Ectopic expression of a truncated NLR gene from wild *Arachis* enhances resistance to *Fusarium oxysporum***

*Fusarium oxysporum* causes devastating vascular wilt diseases in numerous crop species, resulting in substantial yield losses. The *Arabidopsis thaliana*-*F. oxysporum* f.sp. *conglutinans* (FOC) model system enables the identification of meaningful genotype–phenotype correlations and was applied in this study to evaluate the effects of overexpressing an NLR gene (*AsTIR19*) from *Arachis stenosperma* against pathogen infection. *AsTIR19* overexpression (OE) lines exhibited enhanced resistance to FOC without any discernible phenotype penalties. To elucidate the underlying resistance mechanisms mediated by *AsTIR19* overexpression, we conducted whole transcriptome sequencing of an *AsTIR19*-OE line and non-transgenic wild-type (WT) plants inoculated and non-inoculated with FOC using Illumina HiSeq4000. Comparative analysis revealed 778 differentially expressed genes (DEGs) attributed to transgene overexpression, while fungal inoculation induced 434 DEGs in the OE line, with many falling into defense-related Gene Ontology (GO) categories. GO and KEGG enrichment analysis showed that DEGs were enriched in the phenylpropanoid and flavonoid pathways in the OE plants. This comprehensive transcriptomic analysis underscores how *AsTIR19* overexpression reprograms transcriptional networks, modulating the expression of stress-responsive genes across diverse metabolic pathways. These findings provide valuable insights into the molecular mechanisms underlying the role of this NLR gene under stress conditions, highlighting its potential to enhance resistance to *Fusarium oxysporum*.

**Keywords:** *truncated-NLR, transcriptome, plant defense, stress, fungi*

## INTRODUÇÃO

Embora os avanços em biotecnologia, genética e melhoramento tenham resultado em ganhos significativos de produtividade agrícola (FAO, 2023), diversos estresses abióticos e bióticos, como aqueles causados por patógenos, insetos, salinidade do solo e seca, ainda representam ameaças substanciais à produção de alimentos. Além disso, a interação entre diferentes estresses, resultante da natureza multifatorial das mudanças climáticas, impõe riscos ainda maiores às principais culturas agrícolas, comprometendo a produção global de alimentos e a segurança alimentar (Rivero et al., 2022).

Espécies selvagens de plantas apresentam uma ampla gama de características agrônômicas, como resiliência a estresses bióticos e abióticos, que são relevantes para sua introgressão em variedades cultivadas, com vistas à adaptação às mudanças climáticas globais (Bohra et al., 2022). A identificação de genes de resistência a doenças em espécies silvestres ou em variedades geneticamente próximas às culturas-alvo constitui uma estratégia promissora de melhoramento genético. Espécies selvagens do gênero *Arachis* têm despertado grande interesse como fontes de resistência a diferentes patógenos, incluindo fungos, nematoides e insetos (Sharma et al., 2003; Guimarães et al., 2012; Mota et al., 2018), além de tolerância ao estresse hídrico (Vinson et al., 2020; Brasileiro et al., 2021; Puli et al., 2021). Essas espécies são recursos valiosos para o melhoramento de plantas, com alelos de *Arachis* já introgressos no amendoim cultivado (Fonceka et al., 2012; Dutra et al., 2018; Bertoli et al., 2021; Moretzsohn et al., 2023) e transferidos para outras espécies por meio de abordagens de transgenia (Mota et al., 2019; Brasileiro et al., 2021; Guimarães et al., 2022; da Silva Ferreira et al., 2024).

Genes NLR (*Nucleotide-binding site and Leucine-rich repeat*) constituem uma grande família de genes de resistência (R) em plantas, sendo componentes-chave do sistema imunológico vegetal por sua capacidade de detectar patógenos e ativar respostas de defesa (Dangl e Jones, 2001; Lu e Tsuda, 2021). As proteínas NLR atuam como receptores intracelulares que reconhecem efetores patogênicos por meio de mecanismos que envolvem ligação direta ou estratégias de guarda-e-isca (Cesari, 2018). Sua ativação manifesta a Imunidade Desencadeada por Efetores (ETI) geralmente resultante de uma interação gene-a-gene com efetores cognatos, culminando em resposta de hipersensibilidade (HR) no local da infecção (Pottinger e Innes, 2020).

Os NLRs em plantas apresentam estrutura modular, incluindo um domínio central de ligação a nucleotídeos (NBS), uma região N-terminal variável — que pode conter um domínio do tipo Toll/interleucina-1 (TIR) (TNLs) ou um domínio de hélice enrolada (CC) (CNLs) —, e um domínio C-terminal com repetições ricas em leucina (LRR). Além desses, genomas de plantas superiores também codificam NLRs truncados ou atípicos, como TIR-NBS (TN) e CC-NBS (CN), que não apresentam o domínio LRR. Embora os genes R possam apresentar funções específicas em determinados grupos taxonômicos, sua transferência funcional entre espécies filogeneticamente distantes já foi amplamente documentada (Zhao e Fernald, 2005; Zhang et al., 2017; Xu et al., 2018).

A aplicação de NLRs truncados para aumentar a imunidade contra patógenos fúngicos e bacterianos já foi demonstrada com sucesso em *Arabidopsis* e tabaco (Staal et al., 2008; Wang et al., 2013; Zhao et al., 2015; Roth et al., 2017; Barragan et al., 2021; Son et al., 2021; Guimarães et al., 2022). Embora a superexpressão de NLRs possa levar à autoimunidade e comprometimento do crescimento vegetal, mecanismos de regulação transcricional e pós-transcricional de NLRs truncados, auxiliares e inibidores tornam esses genes alvos atrativos para engenharia genética, permitindo o reforço das defesas da planta com impacto mínimo no desenvolvimento e vigor (Lai e Eulgem, 2018).

*Fusarium oxysporum* é um fungo de solo amplamente distribuído que causa murcha vascular em uma grande variedade de plantas, provocando sintomas como amarelecimento, queda das folhas e morte da planta. Este patógeno é capaz de infectar mais de 100 espécies hospedeiras, gerando prejuízos severos em culturas como melão, tomate, algodão e banana (Dean et al., 2012). Pesquisas recentes ampliaram a compreensão sobre a genética desse fungo, fornecendo dados moleculares sobre os mecanismos responsáveis por fatores de virulência (Rauwane et al., 2020; Zuriegat et al., 2021), adaptação ao hospedeiro (Jangir et al., 2021), cromossomos de patogenicidade (Ma et al., 2010; Li et al., 2020) e a complexidade adaptativa (Li et al., 2020). Medidas de controle contra esse patógeno incluem estratégias culturais, biológicas e químicas. Embora essas abordagens possam reduzir a incidência da doença, elas não eliminam o patógeno presente no solo e podem ser financeiramente onerosas e impactar negativamente o meio ambiente (Li et al., 2020). A resistência ao *F. oxysporum* é comum em diferentes culturas e, frequentemente, mediada por mecanismos de ETI (Beckman & Roberts, 1995); contudo, sua capacidade adaptativa frequentemente supera essas defesas, o que desafia o desenvolvimento de resistência durável (Michielse & Rep, 2009). Dessa forma, a identificação de novas fontes de

resistência, especialmente oriundas de parentais selvagens, e a adoção de abordagens biotecnológicas avançadas — como piramidação de genes e edição genômica — são estratégias necessárias para desenvolver uma resistência durável.

A expressão ectópica de genes de defesa em plantas transgênicas — como quitinases, proteínas relacionadas à patogênese (PRs), defensinas, proteínas tipo taumatina e fatores de transcrição (TFs) — tem sido bem-sucedida na redução da infecção por *F. oxysporum* em diferentes espécies vegetais (Swathi Anuradha et al., 2008; Mahdavi et al., 2012; Liu et al., 2016; Diao et al., 2022). Da mesma forma, o silenciamento gênico induzido pelo hospedeiro (HIGS), via RNA de interferência (RNAi) direcionado a genes essenciais para a virulência ou desenvolvimento do patógeno (Ghag et al., 2014; Singh et al., 2020; Fernandes et al., 2016; Hu et al., 2016; Bharti et al., 2017). Espécies selvagens têm sido utilizadas com sucesso em programas de melhoramento voltados ao aumento da resistência contra *F. oxysporum* em culturas como tomate, maracujá e berinjela (Melo et al., 2020; Chitwood-Brown et al., 2021; Tassone et al., 2022). Além disso, a superexpressão de um NLR de *Musa acuminata*, banana diploide selvagem, conferiu resistência à raça 4 de *F. oxysporum* f.sp. *cubense* em plantas transgênicas (Dale et al., 2017).

Recentemente, foi demonstrado que a superexpressão de *AsTIR19*, um gene NLR truncado (TNx) da espécie selvagem *Arachis stenosperma*, aumentou a resistência contra o fungo fitopatogênico necrotrófico *Sclerotinia sclerotiorum* em plantas de tabaco transgênico (Guimarães et al., 2022). Neste estudo, investigaram-se os efeitos da superexpressão de *AsTIR19* sobre a infecção pelo hemibiotrófico *F. oxysporum* f.sp. *conglutinans* (FOC) em *Arabidopsis*, bem como a reprogramação transcriptômica em linhagens OE inoculadas e não inoculadas. O aumento na expressão de genes associados à resposta ao estresse — incluindo vias do fenilpropanoide e dos flavonoides, e subsequente ativação positiva de genes das vias de sinalização do ácido salicílico (SA) e do ácido jasmônico-etileno (JA-ET) após inoculação — indica uma resposta coordenada e robusta à infecção fúngica.

Embora o uso de genes NLR seja um importante recurso para aumentar a resiliência das culturas, é essencial uma compreensão mais aprofundada dos mecanismos moleculares por trás da resistência ou tolerância conferida pela sua expressão ectópica, a fim de minimizar efeitos não intencionais da transgenia e apoiar o desenvolvimento de estratégias genéticas mais eficazes para o melhoramento de plantas.



## MATERIAIS E MÉTODOS

### Transformação de plantas

Plantas de *A. thaliana* foram transformadas por meio do método *floral dip*, utilizando a cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens*. A construção utilizada continha a sequência codificadora de 1.920 pares de bases (bp) do gene *AsTIR19*, oriundo de *Arachis stenosperma*, clonada no vetor binário pPZP-BAR (Guimarães et al., 2022). As plantas transformadas foram cultivadas em câmara de crescimento controlada (21 °C, fotoperíodo de 12 h, 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

Indivíduos da geração T0 resistentes ao glufosinato e com expressão positiva de eGFP foram selecionados para obtenção da geração T1. Os transformantes foram triados sucessivamente quanto à resistência ao herbicida glufosinato de amônio, visando à obtenção de linhagens homozigotas de superexpressão de *AsTIR19* (OE) na geração T2, conforme Vinson et al. (2020). A confirmação da transgenia nas linhagens OE foi feita por PCR, com detecção do gene marcador *bar* em plântulas resistentes ao glufosinato da geração T1. A expressão relativa de *AsTIR19* foi determinada nas linhagens T2 por qRT-PCR, utilizando primers específicos (Tabela Suplementar S1).

### Bioensaios com *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans*

Sementes das plantas transgênicas da geração T2 (*AsTIR19*-OE) e das plantas controle (*wild type* – WT) foram desinfetadas com etanol e semeadas em vasos de 200 mL contendo substrato esterilizado (Carolina Soil, CSC, Brasil). As plantas foram cultivadas em câmara de crescimento sob as mesmas condições previamente descritas.

O isolado PHW 699-3 (ATCC 58110) de *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* (FOC) (Hou et al., 2014) foi cultivado em meio BDA (batata-dextrose-ágar) por dois dias a 28 °C. Em seguida, foi transferido para meio líquido PDB (batata-dextrose) e incubado por mais três dias em agitador rotativo (110 rpm) a 28 °C. Após cultivo, a suspensão fúngica foi filtrada com papel estéril, centrifugada e diluída em água estéril para uma concentração final de 10<sup>6</sup> conídios/mL.

As plantas com quatro semanas de idade foram inoculadas com 5 mL da suspensão de FOC, aplicados em quatro pontos equidistantes diretamente no substrato. As plantas do

grupo controle (não inoculadas) receberam o mesmo volume de água destilada autoclavada. Após a inoculação, os vasos foram mantidos em câmara de crescimento com fotoperíodo de 8/16 h (claro/escuro) a 23 °C, em disposição aleatória.

A severidade da infecção por FOC foi avaliada aos 7 e 14 dias após a inoculação (DAI), com base na escala diagramática de índice de doença (DI) proposta por Diener e Ausubel (2005) (Figura 1):

- 0 – Planta morta;
- 1 – Folhas mais velhas mortas e folhas jovens severamente atrofiadas;
- 2 – Folhas mais velhas cloróticas, amarelas ou mortas e folhas jovens atrofiadas;
- 3 – Folhas mais velhas com clorose vascular e roseta compacta;
- 4 – Pecíolos atrofiados;
- 5 – Plantas visualmente indistinguíveis das não inoculadas.

Três réplicas biológicas compostas por cinco plantas de cada linha OE e WT foram avaliadas nos dias 0, 7 e 14 DAI para monitoramento da progressão dos sintomas. A média dos valores de DI foi utilizada para aplicação do teste de Tukey, a fim de verificar a significância estatística das diferenças entre os grupos.



FIGURA 1. Escala diagramática de sintomas de Murcha de *Fusarium* em *Arabidopsis thaliana*. Cada imagem representa uma planta correspondente a uma pontuação no índice de doença (DI): 0 – planta morta; 1 – folhas mais velhas mortas e folhas jovens severamente atrofiadas; 2 – folhas mais velhas cloróticas, amarelas ou mortas, e folhas jovens atrofiadas; 3 – clorose vascular nas folhas mais velhas e roseta compacta devido à atrofia foliar; 4 – pecíolos atrofiados; 5 – planta visualmente indistinguível das não inoculadas (sem sintomas aparentes).

### Extração de RNA total e sequenciamento (RNA-Seq)

O RNA total foi extraído de três *pools* de tecidos radiculares, cada um composto por cinco plântulas T2 da linhagem *AsTIR19*-OE-11 e de plantas WT, inoculadas com FOC (7

dias após a inoculação – DAI) ou mantidas como controles não inoculados. A extração foi realizada com o reagente TRIzol® (Ambion®, Foster City, CA, EUA) e o RNA foi purificado com o kit RNeasy Plant Mini (Qiagen, Hilden, Alemanha).

A integridade e a quantidade do RNA extraído foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose a 1% e com o equipamento Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA).

Doze bibliotecas de cDNA foram preparadas (triplicatas para cada condição: OE-11 inoculado e não inoculado, WT inoculado e não inoculado), utilizando o kit TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit (Illumina Inc., San Diego, CA, EUA). As amostras foram sequenciadas na plataforma Illumina HiSeq-4000, na Macrogen Inc. (Seul, Coreia do Sul).

Os dados brutos de sequenciamento estão disponíveis no repositório Sequence Read Archive (NCBI-SRA), sob o projeto PRJNA1125443.

## **Perfil de expressão in silico**

As sequências obtidas foram alinhadas ao genoma de referência de *Arabidopsis thaliana* (versão TAIR10; <https://www.Arabidopsis.org/>). As etapas de pré-processamento incluíram controle de qualidade com FASTp (Chen et al., 2018), mapeamento com STAR (Dobin e Gingeras, 2016) e quantificação com HTSeq (Anders et al., 2015). A validação estatística dos dados foi realizada com ClustVis (Metsalu e Vilo, 2015).

A análise de expressão gênica diferencial foi conduzida no pacote edgeR (Robinson et al., 2010), com correção para múltiplos testes pelo método de Benjamini-Hochberg ( $FDR < 0,01$ ) e corte de significância para  $\log_2FC > 2$  ou  $< -2$  (equivalente a fold change  $\geq 4$ ). As comparações realizadas foram: (i) OE-11-NI vs. WT-NI; (ii) OE-11-I vs. OE-11-NI; (iii) WT-I vs. WT-NI; e (iv) OE-11-I vs. WT-I.

Os genes diferencialmente expressos (DEGs) foram visualizados com *volcano plots*, gerados no ggplot2 (Wickham, 2016) e BioRender (BioRender.com). A sobreposição entre conjuntos de DEGs foi avaliada com diagramas de Venn (InteractiVenn; Heberle et al., 2015).

Para análise de agrupamento, foi gerado um mapa de calor (heatmap) com ClustVis, incluindo todos os DEGs identificados em pelo menos uma comparação. A correlação média foi utilizada como métrica de distância para as linhas, e a distância euclidiana média, para as colunas.

A distribuição genômica dos DEGs foi representada por *Manhattan plots*, com mapeamento às posições cromossômicas específicas segundo TAIR10. Os valores de  $p$  foram transformados em  $-\log_{10}(p)$  e ajustados pela correção de Bonferroni ( $p < 0,00001$ ). As representações gráficas foram elaboradas com o pacote qqman (Turner, 2014).

## **Análise funcional dos DEGs**

A associação entre os genes diferencialmente expressos (DEGs) e categorias funcionais de ontologia gênica (GO) foi avaliada com o teste hipergeométrico, por meio do pacote FUNC (Prüfer et al., 2007), seguindo metodologia previamente descrita por Vinson et al. (2018). Apenas termos com taxa de erro familiar (FWER) inferior a 0,05 foram considerados significativos.

Para a análise de vias metabólicas, os identificadores KEGG Orthology (KO) foram atribuídos aos DEGs significativos utilizando o *blastKOALA* (<https://www.kegg.jp/blastkoala/>). As vias metabólicas relevantes em raízes de *Arabidopsis* foram visualizadas com o KEGG Mapper-Color (<https://www.genome.jp/kegg/mapper/color.html>) e representadas graficamente na plataforma SRplot (Tang et al., 2023).

A classificação funcional dos DEGs foi realizada com o MapMan v.3.5.1.R2 (<https://MapMan.gabipd.org/>), e os dados foram submetidos à análise de enriquecimento funcional utilizando o PageMan. Valores de  $\log_2FC$  dos DEGs regulados positiva e negativamente foram inseridos na análise de super-representação (ORA), com aplicação do teste exato de Fisher. Foi adotado um limiar mínimo de 1 (equivalente a uma alteração  $\geq 2$  vezes na expressão). Categorias funcionais com número de genes significativamente maior ou menor que o esperado foram destacadas com diferentes intensidades de cor, de acordo com o grau de desvio estatístico.

Genes codificadores de fatores de transcrição (TFs) foram identificados por busca de similaridade contra o banco PlantTFDB 5.0 (Tian et al., 2020), utilizando um valor de corte  $E \leq 1E-10$ . As redes de interação proteína-proteína dos TFs de *Arabidopsis* foram inferidas com as ferramentas GeneMANIA (<http://genemania.org/>; acessado em 4 de junho de 2024) e STRING (<https://www.string-db.org/>; confiabilidade média  $\geq 0,4$ ; acessado em 16 de junho de 2024).

As mesmas amostras de RNA da linhagem *AsTIR19*-OE-11.1 e das plantas WT, utilizadas para o RNA-Seq, foram empregadas na validação por qRT-PCR de 15 genes marcadores de estresse.

O RNA total (2 µg) foi tratado com DNase para remoção de contaminantes genômicos, e a síntese de cDNA foi realizada em tubo único, conforme Morgante et al. (2013). Os primers específicos para genes relacionados a estresse, defesa e sinalização hormonal foram desenhados com a ferramenta Primer3 (Untergasser et al., 2012) (Tabela Suplementar S1).

As reações de qRT-PCR foram conduzidas em três réplicas biológicas e duplicatas técnicas por amostra, utilizando o sistema StepOne Plus Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, EUA), conforme protocolo de Morgante et al. (2013). A eficiência dos primers e os valores de quantificação (Cq) foram avaliados com a ferramenta Real-Time PCR Miner (Zhao e Fernald, 2005). As razões de expressão foram calculadas e analisadas com a plataforma SATqPCR (<http://satqpcr.sophia.inra.fr>; acessado em fevereiro de 2024), utilizando os genes de referência *GAPDH* e *EF-1α* (Czechowski et al., 2005) para normalização.

## RESULTADOS

### **Linhagens de *AsTIR19*-OE mostraram resistência aumentada à infecção por FOC em *Arabidopsis***

Para avaliar os efeitos da superexpressão do gene *AsTIR19* na infecção por FOC, cinco linhagens transgênicas de *Arabidopsis thaliana* foram geradas (OE1.4, OE2.6, OE6.4, OE8.2 e OE-11.1). A transformação foi confirmada por PCR utilizando primers específicos para o gene marcador BAR (*Fosfinotricina N-acetil transferase*) (Figura Suplementar S1). A superexpressão do transgene nas linhagens T2 foi validada por qRT-PCR, revelando variações leves nos níveis de expressão entre as linhagens (Figura 2). Como esperado, a expressão de *AsTIR19* não foi detectada em plantas do tipo selvagem (WT). As linhagens OE não apresentaram alterações fenotípicas visíveis (vegetativas ou reprodutivas) em

comparação com as plantas WT, indicando que os diferentes níveis de expressão não afetaram o desenvolvimento normal.

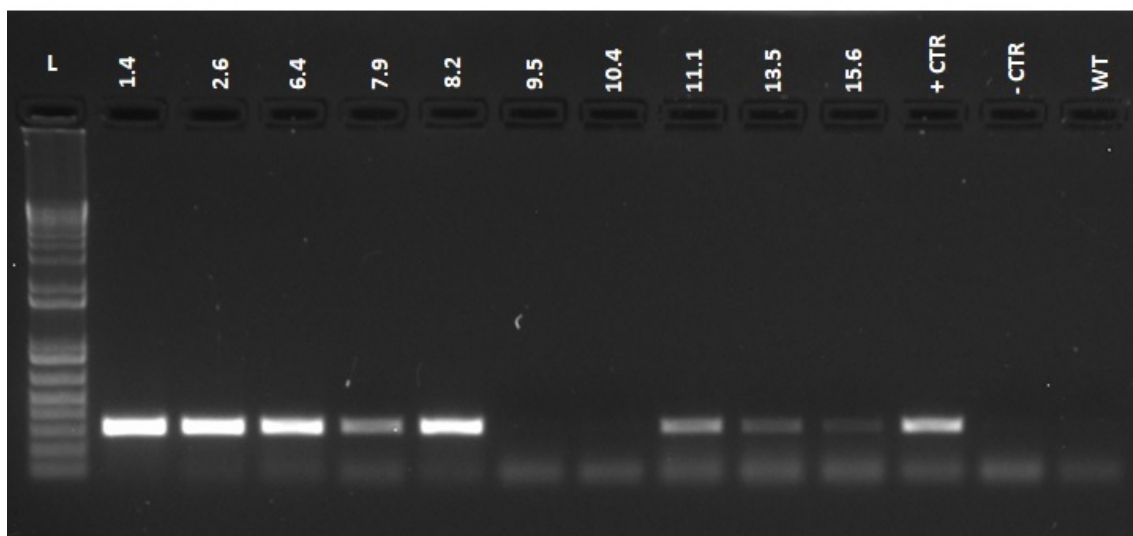


FIGURA 2 . Padrões de amplificação por PCR em amostras de DNA de *Arabidopsis thaliana*, utilizando primers para o gene *BAR* (amplicon: 405 pb). Poços 2 a 10: DNA das linhagens transgênicas na geração T1. Poço 11: controle positivo (+CTR; DNA WT misturado com vetor pPZP-AsTIR19). Poço 12: controle negativo (-CTR; sem DNA molde). Poço 14: DNA WT não transgênico. Ladder: 1 Kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Cat. #10787026).

A resistência ao FOC foi avaliada nas linhas OE e em plantas WT, com base na escala de sintomas proposta por Diener e Ausubel (2005). Aos 7 dias após a inoculação (DAI), as plantas WT apresentaram sintomas iniciais de murcha, como amarelecimento das folhas mais velhas (Figura 3). Nesse mesmo período, quatro das cinco linhagens OE não apresentaram sintomas, exceto OE2.6, que mostrou sintomas leves. Aos 14 DAI, as plantas WT exibiram progressão clara da doença, com clorose avançada, lesões necróticas e morte das plantas. Em contraste, a progressão da doença foi significativamente mais lenta nas linhagens OE. Linhagens OE6.4 e OE-11.1 permaneceram sem sintomas, enquanto OE1.4 e OE8.2 apresentaram apenas clorose leve nas folhas mais velhas (Figura 3).

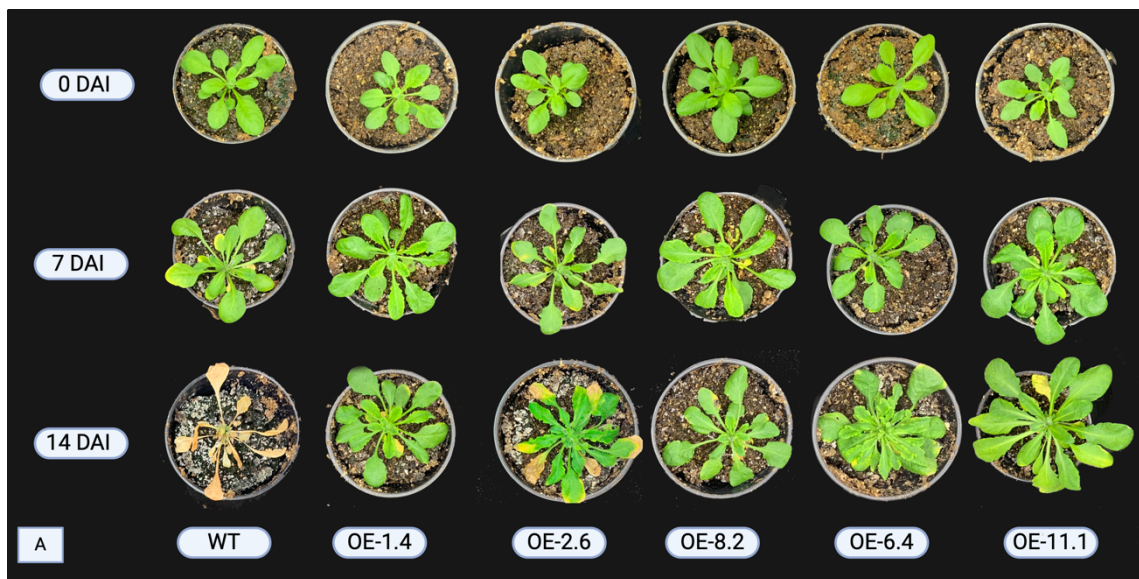


FIGURA 3. Sintomas de murcha em *A. thaliana* após infecção por FOC. Comparação entre plantas WT e linhagens OE aos 7 e 14 DAI, de acordo com a escala de severidade. A pontuação de escala visual no índice de doença (DI) é estabelecida pelas seguintes notas: 0 – planta morta; 1 – folhas mais velhas mortas e folhas jovens severamente atrofiadas; 2 – folhas mais velhas cloróticas, amarelas ou mortas, e folhas jovens atrofiadas; 3 – clorose vascular nas folhas mais velhas e roseta compacta devido à atrofia foliar; 4 – pecíolos atrofiados; 5 – planta visualmente indistinguível das não inoculadas (sem sintomas aparentes).

O índice de doença (DI), avaliado aos 7 e 14 DAI, variou de 0 (planta morta) a 5 (sem sintomas). Todas as linhagens *AsTIR19*-OE apresentaram índices significativamente maiores que as plantas WT ( $p < 0,05$ ), indicando maior resistência (Figura 4). Aos 7 DAI, os índices nas OE foram até 1,6 vezes superiores aos da WT; aos 14 DAI, essa diferença aumentou para até 4 vezes. As linhagens OE-11.1 e OE6.4 apresentaram os maiores índices, com plantas praticamente assintomáticas. Esses resultados sugerem que a superexpressão de *AsTIR19* contribui para a redução da severidade da doença e o atraso no surgimento dos sintomas típicos da infecção por FOC.



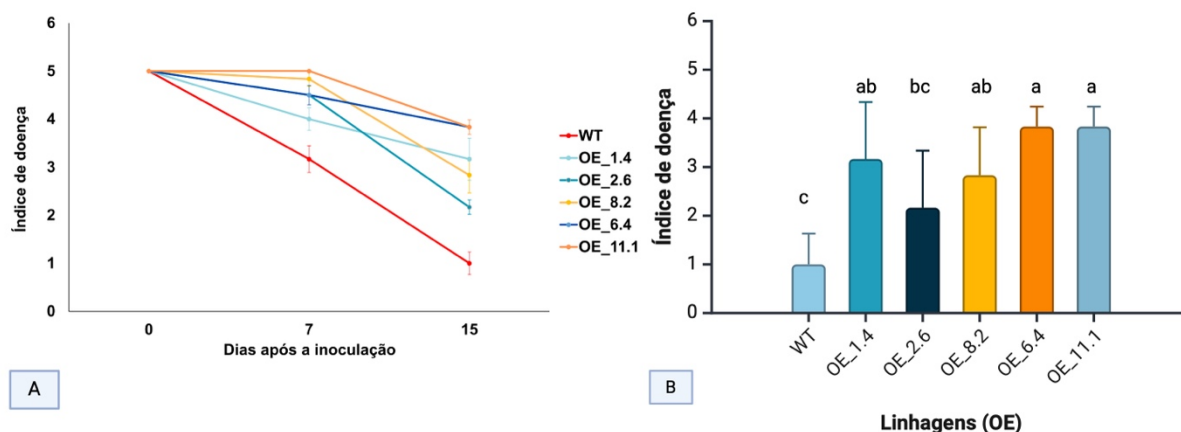


FIGURA 4. Sintomas da doença causada por FOC e índice de doença em quatro linhagens *AsTIR19* OE inoculadas e em plantas do tipo selvagem (WT) de *Arabidopsis*. A) índice de doença nas linhas *AsTIR19* OE e nas plantas WT durante a progressão da doença causada por FOC; B) índice de doença nas linhagens *AsTIR19* OE e WT aos 14 DAI ( $p < 0,05$ ). Letras diferentes indicam uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) no índice de doença entre as linhas OE e as plantas WT.

## Sequenciamento e qualidade do transcrito da linhagem OE-11 e WT

A fim de investigar os mecanismos moleculares associados à resistência aumentada conferida por *AsTIR19*, foi realizado o sequenciamento do transcrito das raízes da linhagem OE-11.1 e de plantas WT, tanto inoculadas quanto controles. A linha OE-11 foi selecionada por apresentar o maior índice de resistência e ausência de sintomas durante todo o bioensaio, além de bom desenvolvimento de sementes. As amostras foram previamente avaliadas em termos de qualidade com o Bioanalyzer 2100. O Índice de Integridade do RNA (RIN) foi superior a 9 em todas as amostras, confirmando sua adequação para sequenciamento (Figura 5).



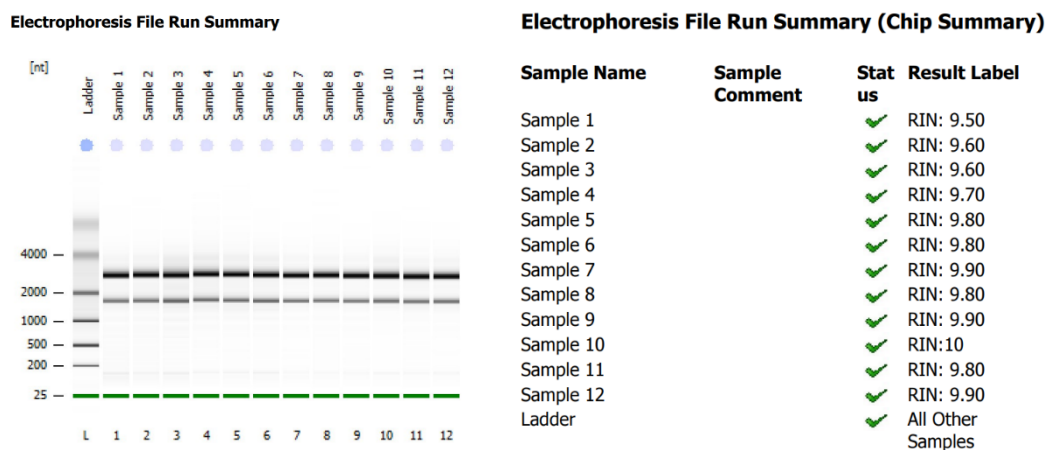


FIGURA 5. Avaliação da integridade das amostras de RNA por Bioanalyzer. RIN > 9 em todas as amostras analisadas.

No total, foram geradas 12 bibliotecas de cDNA (triplicatas para cada condição experimental), resultando em 152.872.554 sequências brutas. A média de alinhamento ao genoma de *A. thaliana* (TAIR10) foi de 96,3%, com elevado percentual de mapeamento único (Tabela 1).

**Tabela 1.** Resumo da análise de qualidade e mapeamento dos *reads* obtidos pelo RNA-seq via HiSeq-4000 (Illumina).

Bibliotecas	Réplicas	Número bruto de <i>reads</i> (Mb)	<i>Reads</i> quantificados no genoma de referência (Mb)	<i>Reads</i> mapeados unicamente (%)
WT-NI	1	12.176.599	11.849.536	97,31%
	2	13.223.736	12.865.936	97,29%
	3	13.717.822	13.294.759	96,92%
WT-I	1	12.108.740	11.602.017	95,82%
	2	12.566.504	12.074.051	96,08%
	3	13.019.656	12.407.413	95,30%
OE-11-NI	1	11.816.371	11.438.781	96,80%
	2	13.239.287	12.781.353	96,54%
	3	12.868.120	12.389.145	96,28%
OE-11-I	1	13.409.145	12.775.833	95,28%
	2	12.529.267	12.060.867	96,26%
	3	12.197.307	11.674.586	95,71%

### **Alterações no perfil transcricional associadas à superexpressão de *AsTIR19* e à infecção por FOC**

A análise global dos genes diferencialmente expressos (DEGs) entre a linhagem OE-11 e plantas WT, sob condições de inoculação ou não com FOC, está representada nos volcano plots da Figura 6A. Em todas as comparações, o número de DEGs regulados positivamente (em vermelho) foi superior ao de regulados negativamente (em azul). A maior amplitude de expressão foi observada na comparação entre OE-11 inoculada e não inoculada (OE-11-I vs. OE-11-NI). O maior número de DEGs foi identificado entre OE-11-NI e WT-NI, totalizando 778 genes (455 regulados positivamente e 323 negativamente), indicando forte influência da superexpressão de *AsTIR19* sobre o transcriptoma (Figura 6B). Esse conjunto representa aproximadamente 2,88% do genoma de *A. thaliana*.

A infecção por FOC também induziu alterações significativas na expressão gênica, tanto em OE-11 (316 DEGs ↑, 118 ↓) quanto em WT (324 ↑, 304 ↓), com 179 DEGs exclusivos da linhagem transgênica inoculada (Figura 6B). O heatmap da Figura 6C resume os padrões gerais de expressão. Destaca-se um contraste entre os DEGs associados à superexpressão de *AsTIR19* (OE-11-NI vs WT-NI) e aqueles induzidos pela infecção em OE-11 (OE-11-I vs OE-11-NI), sugerindo que a maioria dos genes ativados pelo transgene não se sobrepõe aos ativados pelo patógeno. Isso indica que *AsTIR19* aciona um conjunto distinto de vias de defesa.

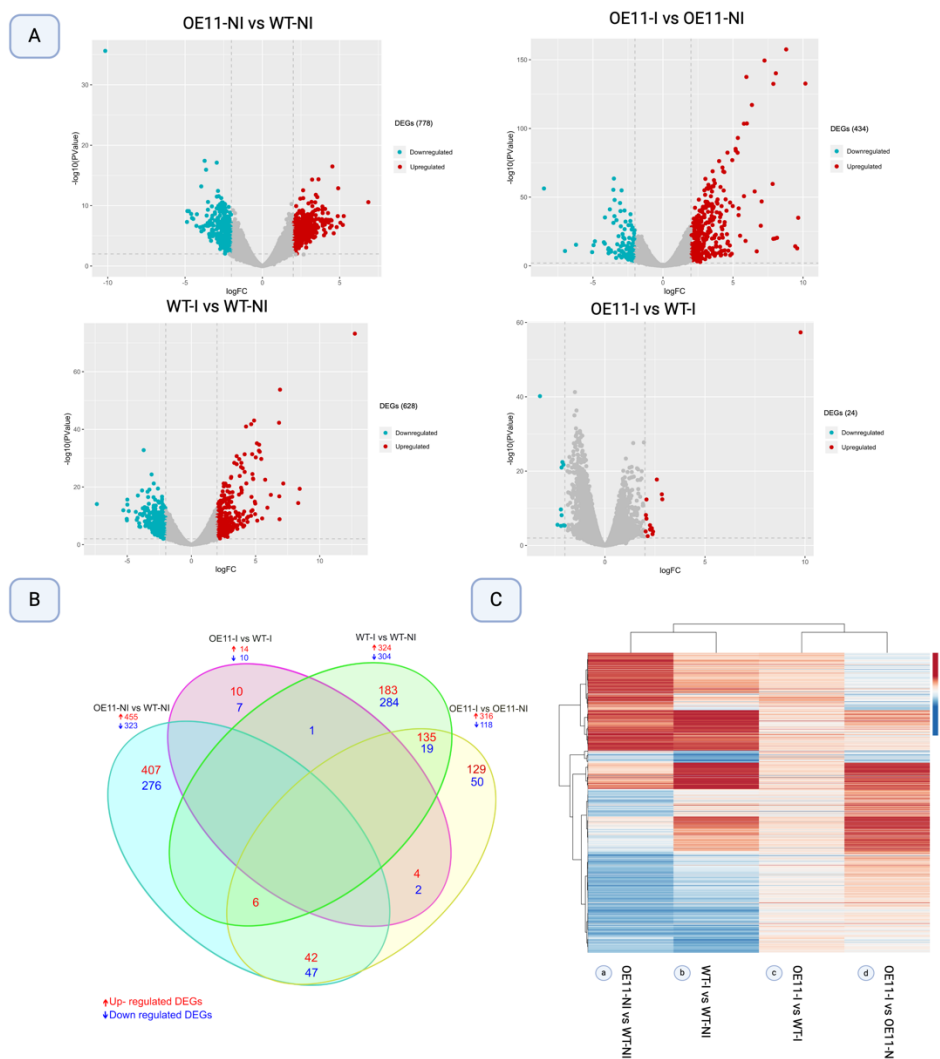


FIGURA 6 Genes diferencialmente expressos (DEGs) ( $\log_2$  Fold change  $> 2$  e valor de  $p < 0,01$ ) na linhagem *AsTIR19* OE-11 e nas plantas WT sob condições de inoculação com FOC (I) e sem inoculação (NI). A) Análise de volcano plot da expressão diferencial de genes, com o  $-\log_{10}$  (valor de  $p$ ) do teste  $t$  no eixo y e o  $\log_2$  (fold change) no eixo x. Os pontos vermelhos representam DEGs regulados positivamente, e os pontos azuis representam DEGs regulados negativamente. B) Diagrama de Venn mostrando as intersecções de DEGs entre as quatro comparações e o número de DEGs regulados positivamente e negativamente para cada comparação. C) Heatmap da distribuição de DEGs por agrupamento hierárquico em *Arabidopsis* transgênica versus plantas WT inoculadas e não inoculadas com FOC. As linhas representam genes individuais, enquanto os genes regulados positivamente e negativamente em cada comparação (colunas) são indicados em vermelho e azul, respectivamente.

## Distribuição genômica dos DEGs

Manhattan plots foram gerados para mapear a distribuição dos DEGs ao longo dos cinco cromossomos (Figura 7), utilizando correção de Bonferroni ( $p < 0,00001$ ). Foram identificados 29 DEGs significativamente regulados por *AsTIR19* (OE-11-NI vs WT-NI), destacados em laranja (Figura 7A; Tabela Suplementar S4).

Esses genes incluem receptores de membrana, proteínas transmembranares, transportadores de aminoácidos, expansinas, RLKs, genes envolvidos em detoxificação de ROS e produção de metabólitos de defesa. Na comparação OE-11-I vs OE-11-NI, foram identificados 14 DEGs, incluindo expansinas (percepção de membrana), glutamato racemase (acúmulo de transcritos de defesa), e genes relacionados a jacalina, arginase, mirosinase e lectinas de acetil-ornitina — todos envolvidos em resposta a patógenos (Figura 7B). Nas plantas WT, a infecção induziu 23 DEGs, incluindo quitinases, quinases de parede celular (WAK) e osmotina (Figura 7C).

Na comparação entre OE-11-I e WT I, os DEGs compartilhados incluíram fatores de transcrição como WRKY e bHLH, associados a respostas de estresse (Figura 7D). Nenhum agrupamento regional ou *cluster* gênico foi identificado como diferencialmente expresso entre as condições, indicando uma distribuição uniforme dos DEGs ao longo do genoma.

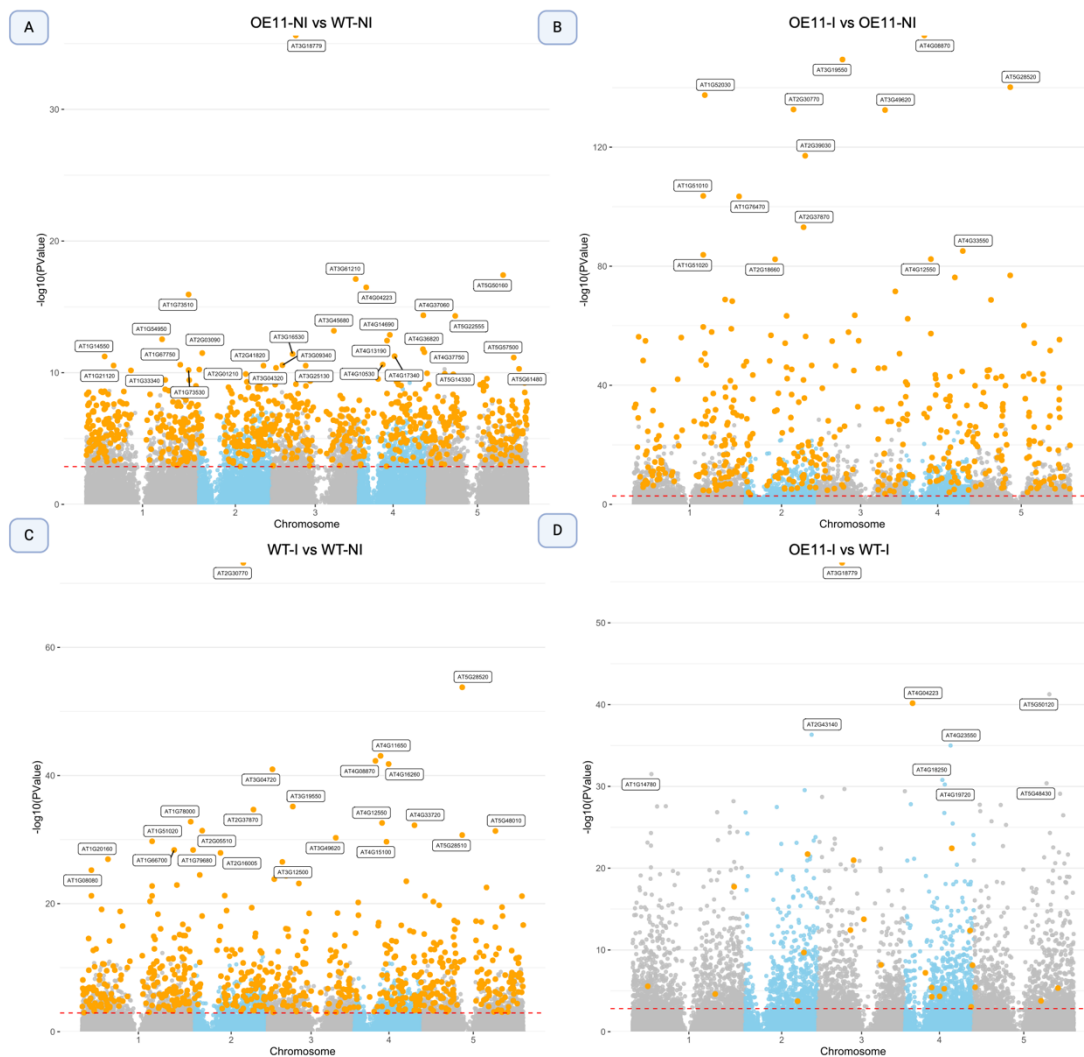


FIGURA 7. Manhattan plots mostrando a posição e a frequência dos genes diferencialmente expressos (DEGs) nos cinco cromossomos de *A. thaliana*. A) DEGs entre a linhagem OE-11 não inoculada e as plantas WT; B) DEGs entre a linhagem OE-11 inoculada e não inoculada com FOC; C) DEGs entre as plantas WT inoculadas e não inoculadas com FOC; D) DEGs entre a linhagem OE-11 inoculada com FOC e as plantas WT. O eixo x está dividido pelos cinco cromossomos, com os genes plotados em suas posições respectivas. O eixo y representa os valores de expressão, calculados como  $-10 \cdot \log(\text{valor de } p)$ . As linhas tracejadas vermelhas indicam o limiar para a taxa de descoberta falsa ( $p < 0,00001$ ). Os pontos laranja representam os DEGs, com o TAIR ID dos genes com valores  $-\log_{10}(\text{valor de } p)$  mais elevados destacados.

## Enriquecimento funcional: GO e KEGG

A análise de enriquecimento GO dos DEGs regulados positivamente na linhagem OE-11 revelou categorias funcionais associadas à resposta a estresses diversos, metabolismo de ROS e sinalização por etileno (Figura 8A; Tabela Suplementar S3). Entre as categorias enriquecidas estão: Resposta ao estresse, Atividade oxidoredutase, Via de sinalização do etileno, Membrana celular, Atividade de peroxidase.

Também foi observada regulação positiva em vias relacionadas ao metabolismo de carboidratos, indicando o papel energético dessas vias na resposta imune (Rojas et al., 2014). Em contraste, os DEGs regulados negativamente estavam enriquecidos nas categorias: Transporte e secreção, Membrana plasmática e Transporte de aminoácidos.

Interessantemente, algumas categorias como “atividade oxidoredutase” e “membrana” continham DEGs regulados em ambas as direções, sugerindo um remodelamento funcional complexo.

A análise KEGG identificou 11 vias significativamente enriquecidas. A mais proeminente foi a biossíntese de metabólitos secundários, incluindo jacalina, quitinase e proteínas PR. Também houve enriquecimento em: Degradação de valina, leucina e isoleucina e Biossíntese de fenilpropanóides.

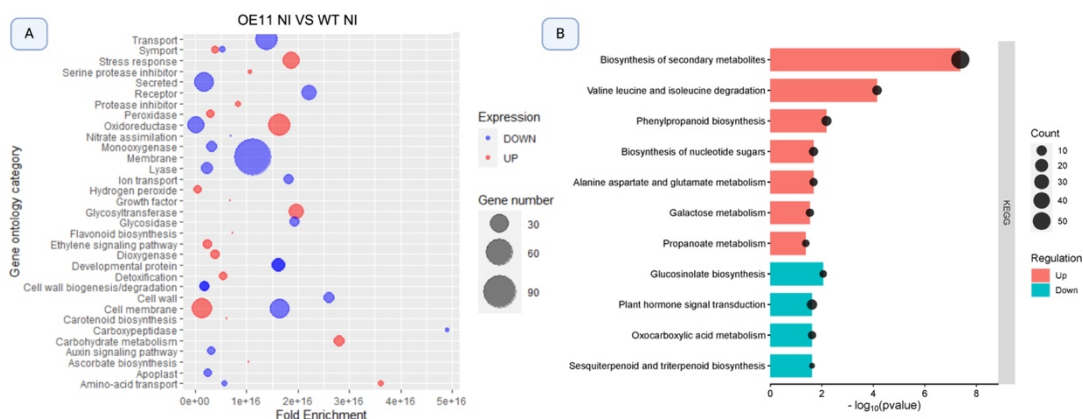


FIGURA 8 Análise de enriquecimento de GO e KEGG dos DEGs oriundos de OE-11 não inoculada em comparação com as plantas WT. A) termos significativamente enriquecidos de Gene Ontology (GO) entre os genes diferencialmente expressos (DEGs). O tamanho das bolhas correlaciona-se com o enriquecimento (Fold Enrichment) (valor de  $p < 0,05$ ) associado a cada termo GO. Círculos azuis indicam a regulação negativa dos DEGs, enquanto círculos vermelhos indicam regulação positiva. B) Vias KEGG enriquecidas. O eixo x representa o logaritmo negativo do valor de p ajustado (FDR) para as vias KEGG.

Essas vias apontam para um estado de defesa potencializado na linhagem OE-11, provavelmente mediado pela expressão ectópica de *AsTIR19*.

## **DEGs induzidos por FOC em OE-11 e WT**

Na linhagem OE-11 inoculada com FOC, as categorias de ontologia gênica (GO) mais significativamente enriquecidas foram “defesa vegetal”, “secreção” e “atividade oxidoredutase”, todas compostas por genes regulados positivamente com grandes amplitudes de expressão (Figura 9A). Além disso, genes com funções associadas à “monooxigenase”, “glicosidase” e “peroxidase” também foram enriquecidos, sugerindo a ativação coordenada de vias relacionadas à defesa da planta e à neutralização de espécies reativas de oxigênio (ROS), em linha com observações anteriores (Baxter et al., 2014).

De forma semelhante, as plantas WT inoculadas com FOC apresentaram enriquecimento de DEGs regulados positivamente nas categorias “secreção” e “atividade oxidoredutase” quando comparadas às plantas não inoculadas (WT-I vs WT-NI). No entanto, diferentemente da OE-11, observou-se um enriquecimento marcante de DEGs regulados negativamente em categorias essenciais para a resposta de defesa, como “resposta ao estresse”, “glicosiltransferase”, “metabolismo de carboidratos” e “biossíntese

de flavonoides” (Figura 9B), indicando uma possível supressão funcional dessas rotas em WT.

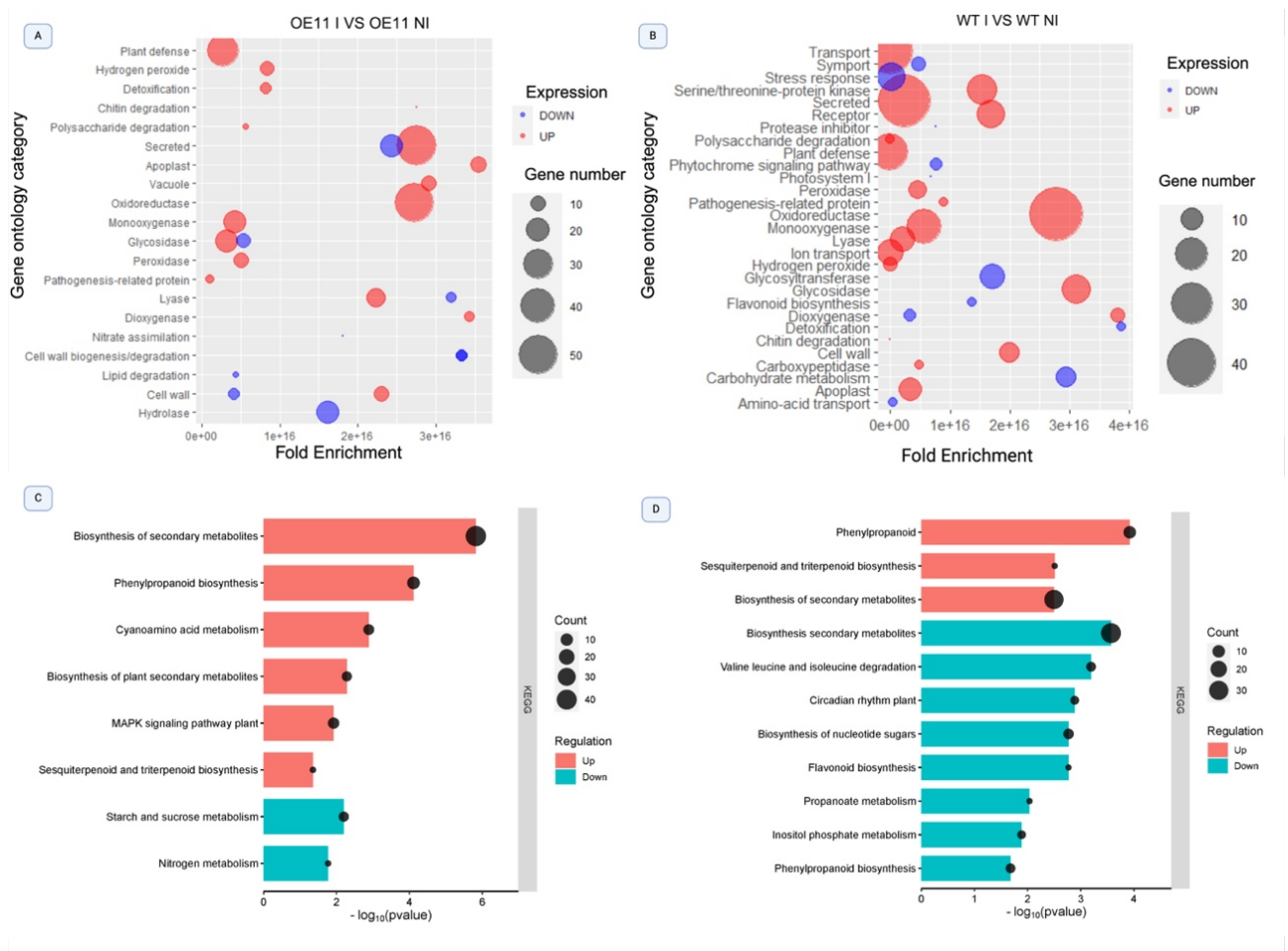


FIGURA 9. Análises funcionais dos genes diferencialmente expressos (DEGs) obtidos da linha OE-11 e plantas WT (tipo selvagem) inoculadas com FOC em comparação com seus respectivos controles não inoculados. A) Categorias GO enriquecidas na linha OE-11 sob infecção por FOC; B) Categorias GO enriquecidas em plantas WT sob infecção por FOC. O tamanho das bolhas está correlacionado com o enriquecimento (Fold Enrichment, p-valor < 0,05) associado a cada termo GO respectivo. Círculos azuis indicam a regulação negativa (downregulation) dos DEGs, enquanto círculos vermelhos indicam a regulação positiva (upregulation). C) Vias KEGG enriquecidas na linha OE-11 sob infecção por

A análise de enriquecimento de vias KEGG revelou que, após a inoculação com FOC, a maioria dos DEGs da linhagem OE-11 estavam regulados positivamente em rotas metabólicas associadas à biossíntese de metabólitos secundários, incluindo “biossíntese de fenilpropanoides” e “biossíntese de sesquiterpenoides e triterpenoides” (Figura 9C). Esses compostos fitoquímicos são tradicionalmente associados a respostas a estresses bióticos, muitas vezes com propriedades antimicrobianas ou funções defensivas contra herbivoria (Guerriero et al., 2018). Também foi observado o enriquecimento da via de sinalização por



“proteína quinase ativada por mitógeno” (MAPK), que desempenha papel central na percepção de PAMPs e na ativação da imunidade mediada por padrões (PTI), além de estar associada à adaptação ao estresse (Manna et al., 2023).

Em contraste, nas plantas WT inoculadas com FOC, o enriquecimento de vias KEGG evidenciou predominância de DEGs regulados negativamente, mesmo em rotas biossintéticas importantes para a defesa, como “biossíntese de metabólitos secundários”, “flavonoides” e “fenilpropanoides”. Além disso, observou-se a regulação negativa de vias do metabolismo primário, incluindo “degradação de valina e isoleucina”, “metabolismo de fosfato de inositol” e “biossíntese de açúcares nucleotídicos” (Figura 9D). Esses resultados sugerem que, ao contrário da OE-11, a resposta transcricional das plantas WT à infecção pode envolver a repressão de processos metabólicos fundamentais para a defesa.

### **Análise com MapMan e redes de fatores de transcrição**

A análise com a ferramenta MapMan permitiu visualizar os padrões de expressão gênica nas quatro condições experimentais, com ênfase em vias associadas ao estresse biótico (Figura Suplementar S5). Na comparação OE-11-NI vs WT-NI, observaram-se DEGs regulados positivamente em vias relacionadas ao metabolismo de carboidratos, aminoácidos, biossíntese de RNA e proteínas. Em contrapartida, genes ligados à homeostase de metais e à estrutura da parede celular foram regulados negativamente. Esses resultados sugerem que a superexpressão de *AsTIR19* modula o metabolismo primário da planta mesmo na ausência do patógeno, em linha com os dados obtidos nas análises de GO e KEGG.

Após a inoculação com FOC, a linhagem OE-11 apresentou um aumento considerável na expressão de genes relacionados à biossíntese de proteínas, resposta ao estresse, modulação da parede celular e homeostase de metais (OE-11-I vs OE-11-NI). Notavelmente, categorias funcionais específicas de defesa, como “estresse biótico”, “receptores de estresse biótico” e “proteínas PR”, foram reguladas positivamente apenas na OE-11 inoculada. Em contraste, nas plantas WT inoculadas (WT-I vs WT-NI), esses mesmos genes foram regulados negativamente, embora tenha havido indução de genes em vias relacionadas ao metabolismo e à estrutura celular. A consistência entre as categorias identificadas pelo MapMan e aquelas observadas nas análises de GO e KEGG reforça a

robustez dos dados, evidenciando que *AsTIR19* reprograma a resposta transcricional da planta para um perfil defensivo mais eficaz frente à infecção.

Com base nos DEGs anotados como fatores de transcrição (TFs) pelo banco PlantTFDB e nos termos GO enriquecidos em OE-11-I vs OE-11-NI, foram construídas redes de interação proteína-proteína para investigar os mecanismos regulatórios subjacentes ao estresse biótico (Figura 10). As redes consideraram interações baseadas em coexpressão, contatos físicos, co-localização e domínios proteicos compartilhados.

A Rede A representa os TFs regulados positivamente na OE-11 inoculada, com destaque para membros das famílias WRKY e NAC, amplamente conhecidos por sua atuação na resposta a infecções fúngicas (nós destacados em vermelho). Essas famílias estão entre os principais reguladores da imunidade vegetal, atuando na ativação de genes de defesa após percepção do patógeno.

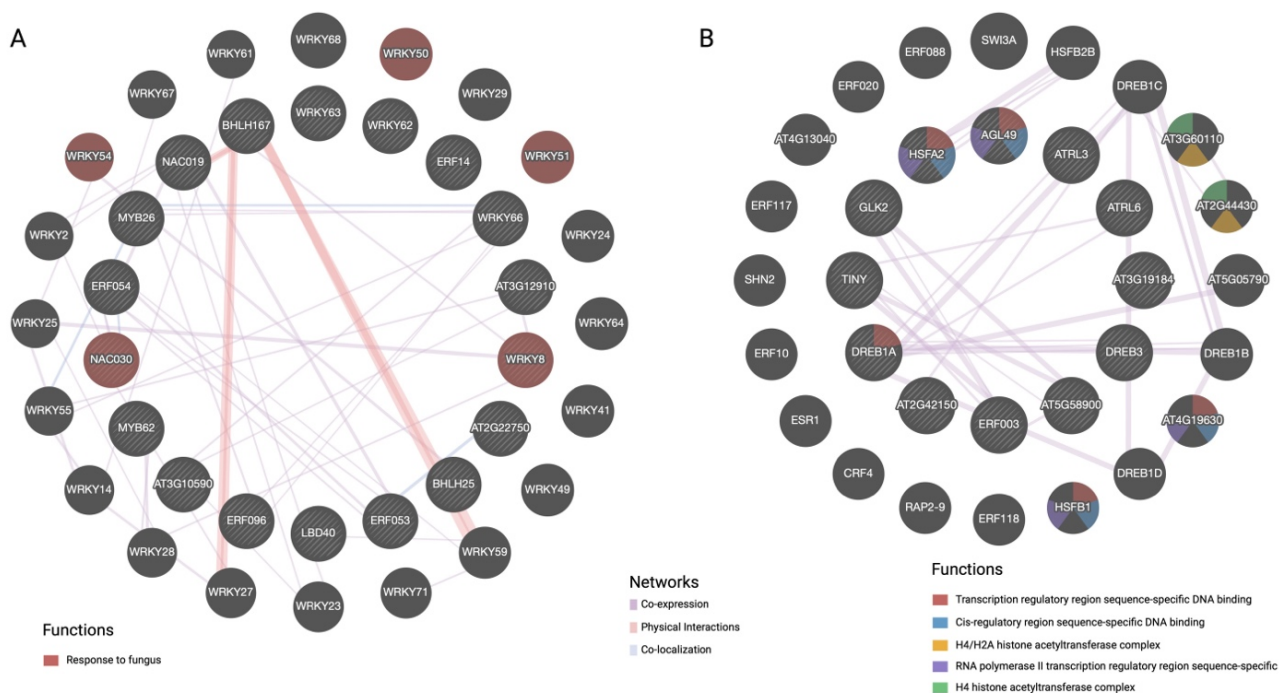


FIGURA 10. Redes de interação proteína-proteína baseadas em fatores de transcrição diferencialmente expressos (TFs) identificados na comparação OE-11-I vs OE-11-NI.) Rede de TFs regulados positivamente, destacando membros das famílias WRKY e NAC, associados à resposta à infecção fúngica (nós em vermelho). B) Rede de TFs regulados negativamente, incluindo TFs da família DREB, comumente ligados à resposta a estresse abiótico. As interações foram inferidas com base em dados de coexpressão (linhas rosas), interações físicas (linhas roxas) e colocalização (linhas azuis). As cores nos nós da Rede B indicam as funções anotadas segundo categorias GO, como ligação específica à região

A Rede B, por sua vez, mostra os TFs regulados negativamente, incluindo membros da família DREB (elemento responsivo à desidratação), geralmente associados ao estresse abiótico. A redução na expressão dos DREB em OE-11 após a infecção por FOC sugere um redirecionamento das rotas de sinalização, priorizando mecanismos especializados no combate a estresses bióticos. Isso contrasta com a ativação das famílias WRKY, NAC e bHLH, que são mais expressivas durante a resposta imune a patógenos (Baillo et al., 2019; Guo et al., 2020). A identificação dessas redes destaca o papel central de WRKY e NAC como reguladores mestres da defesa fúngica, e reforça o potencial de suas interações como alvos para estratégias de melhoramento genético voltadas à resistência de plantas a doenças.

## Expressão de genes marcadores de defesa por qRT-PCR

As respostas de defesa contra estresses bióticos em plantas são reguladas principalmente pelas vias de sinalização hormonal do ácido salicílico (SA), ácido jasmônico (JA) e etileno (ET). Além disso, o ácido indolilacético (IAA) e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) também desempenham papéis cruciais, tanto na modulação da resposta quanto na contenção inicial de patógenos.

Para investigar a ativação dessas vias na linhagem transgênica OE-11, foram avaliados por qRT-PCR 15 genes marcadores relacionados a diferentes rotas de defesa (Tabela Suplementar S1; Figura 11). Os níveis de expressão foram comparados entre plantas OE-11 inoculadas com FOC e não inoculadas, utilizando genes de referência apropriados. Os dados revelaram um aumento significativo na expressão de todos os marcadores após a inoculação, indicando uma ativação coordenada das vias de defesa.

Os genes relacionados à via de SA incluíram reguladores centrais como NPR1, componentes de reconhecimento como NLR e TIR, proteínas relacionadas à patogênese (PR5), genes de resistência sistêmica (SAR) e sinalizadores conservados como SBT3. Na via de JA, foram avaliados VSP2, ML3, MD\_2-like e PR6, ligados à síntese de compostos defensivos e ativação transcricional. A via de ET foi representada por fatores de transcrição ERF e EIN3, além do gene PADRE, envolvido na percepção de sinais derivados de patógenos. A via de IAA foi monitorada via IAN, enquanto APX indicou a ativação do sistema antioxidante frente à produção de ROS.

A indução consistente desses genes após inoculação com FOC sugere que a superexpressão de *AsTIR19* sensibiliza as plantas transgênicas, intensificando sua

capacidade de resposta ao estresse biótico. Essa ativação foi também observada nos dados de RNA-Seq (Tabela Suplementar S3), confirmando a robustez dos achados.

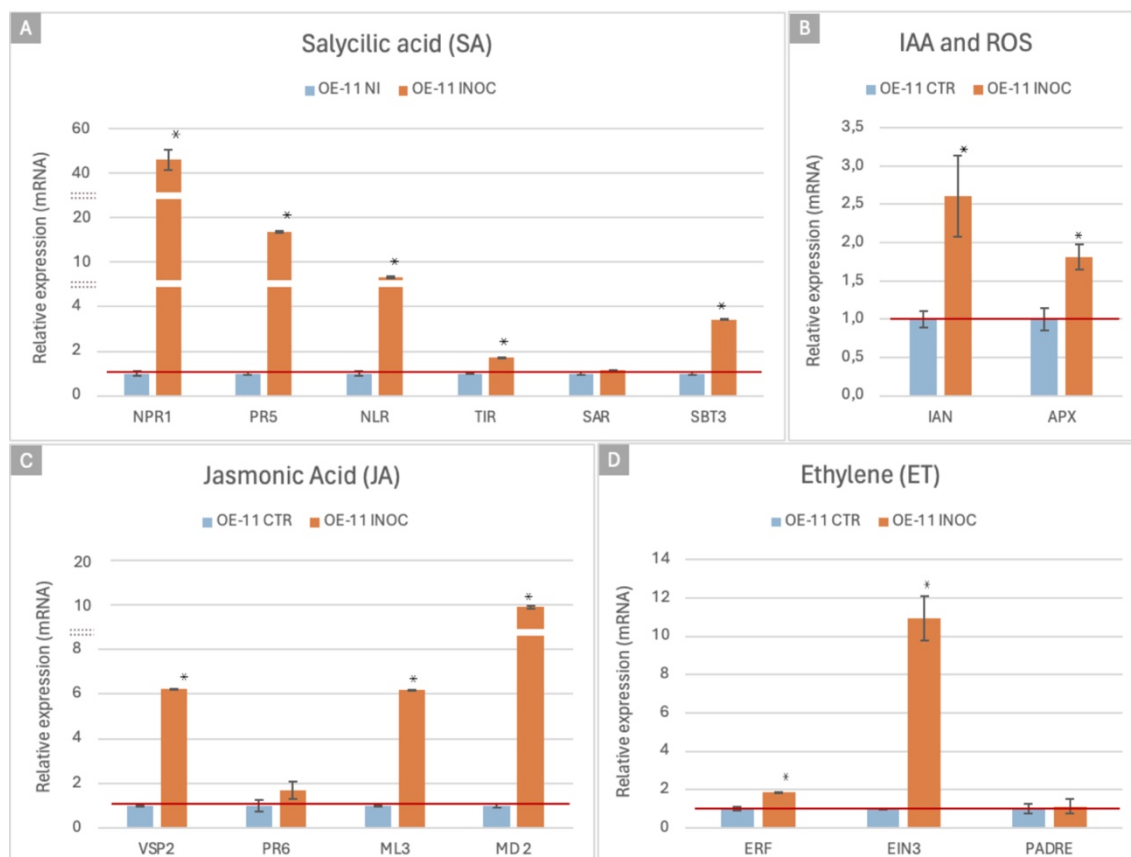


FIGURA 11. Análise de expressão por qRT-PCR na linha OE-11 inoculada com FOC e em plantas não inoculadas. A quantificação relativa dos níveis de mRNA de genes marcadores de *Arabidopsis*, envolvidos em vias hormonais e de defesa, na linha OE-11 inoculada com FOC (laranja) foi calculada em relação às plantas WT não inoculadas (azul). Os valores de quantificação relativa (RQ) foram calculados com base nas médias e nos erros padrão de nove indivíduos, seguidos pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

## Integração das vias de defesa: SA, JA, ET e ROS

O diagrama da Figura 12 resume as principais interações entre os genes marcadores de defesa ativados e suas respectivas vias hormonais. As conexões entre SA, JA e ET configuram o núcleo da resposta imunológica em OE-11, com crosstalk funcional mediado principalmente por NPR1 — um integrador chave entre as vias de SA e JA.

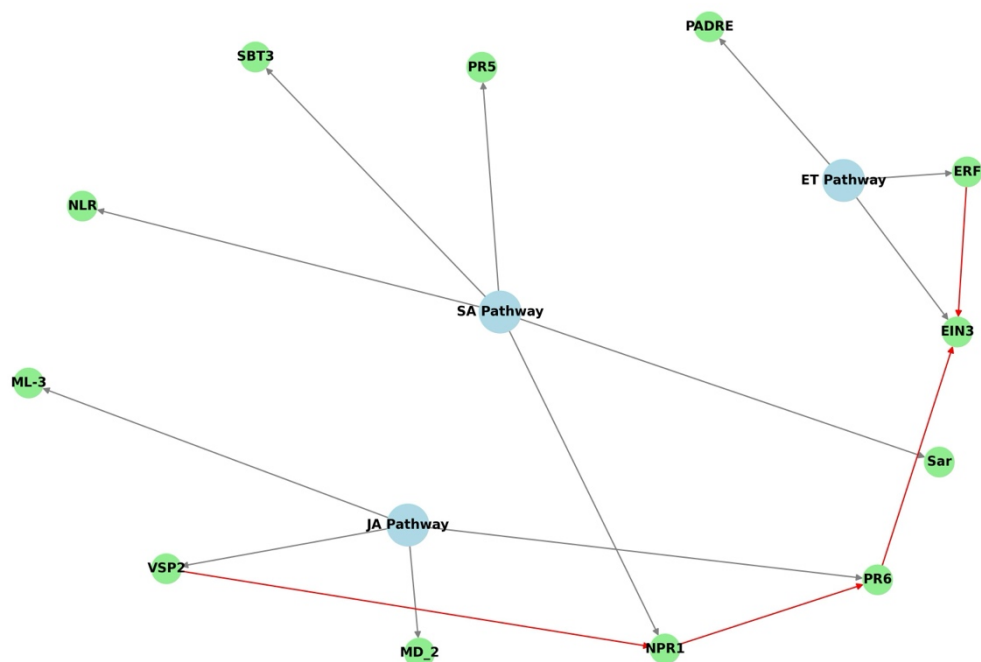


FIGURA 12 Diagrama derivado de código Python mostrando as vias hormonais de defesa (SA, JA, ET) e seus genes associados que estão regulados positivamente na linha OE-11 inoculada com FOC. Nós azuis representam as vias hormonais, nós verdes representam os genes associados a cada via, e as setas cinzas indicam as conexões entre genes e suas respectivas vias. Interações adicionais estão destacadas em vermelho.

A análise revelou a coordenação entre múltiplos componentes de defesa: receptores de resistência (NLR, TIR), sinalizadores e reguladores hormonais (NPR1, ERF, EIN3), genes de resposta a PAMPs (PADRE, SBT3, MD\_2), e genes relacionados a resistência sistêmica (SAR) e metabolismo oxidativo (APX). A ativação simultânea dessas vias indica que *AsTIR19* não apenas intensifica a resposta defensiva imediata, como também favorece a consolidação de uma resistência sistêmica prolongada.

Essa arquitetura de resposta multifatorial sugere que *AsTIR19* atua como um amplificador transcricional, capaz de integrar múltiplas rotas de defesa para conferir resistência robusta ao FOC em *Arabidopsis*.

## DISCUSSÃO

A ampla diversidade de *formae speciales* em *Fusarium oxysporum* é provavelmente resultado de seu modo predominante de reprodução assexuada, aliado a interações específicas do tipo gene-a-gene com plantas hospedeiras (Katan & Di Primo, 1999; Michielse & Rep, 2009). Como muitas das espécies vegetais afetadas ocorrem em regiões tropicais e subtropicais, a frequência e severidade da doença podem ser exacerbadas pelo aquecimento global (Berrocal-Lobo & Molina, 2008).

*F. oxysporum* emprega múltiplas estratégias para estabelecer infecção, incluindo a produção de efetores que suprimem as respostas imunes da planta e enzimas que degradam a parede celular, facilitando a penetração radicular e a colonização vascular (Wang et al., 2022b). Estudos anteriores revelaram que genes NLR truncados, além de atuarem em diferentes interações planta-patógeno, podem funcionar como reguladores de tolerância a estresses abióticos, como ajudantes de NLRs completos ou ainda conferir resistência de amplo espectro (Tamborski & Krasileva, 2020). A eficácia desse tipo de NLR foi demonstrada previamente com *AsTIR19*, isolado de *Arachis stenosperma*, cuja superexpressão conferiu resistência significativa a *Sclerotinia sclerotiorum* (Guimarães et al., 2022).

Neste estudo, foram geradas cinco linhagens transgênicas de *Arabidopsis thaliana* superexpressando *AsTIR19*, e os efeitos desse NLR truncado foram avaliados na resposta imune inata contra FOC. Como o patógeno coloniza tecidos vasculares, os sintomas de murcha, clorose e o grau de colonização estão diretamente correlacionados com a capacidade da planta de restringir essa colonização (Gao et al., 1995; Diener & Ausubel, 2005). Todas as linhas OE apresentaram redução dos sintomas visíveis de clorose e murcha, resultando em uma pontuação significativamente maior (até 4 vezes) em comparação com as plantas WT aos 14 DAI, evidenciando um forte efeito do transgene na mitigação da infecção por FOC em *Arabidopsis*. Assim como observado para outros NLRs truncados (Zhao et al., 2015; Barragan et al., 2021; Son et al., 2021) — e especificamente para *AsTIR19* contra fungos necrotróficos (Guimarães et al., 2022), onde sua superexpressão aumentou a resistência a *S. sclerotiorum* —, os dados sugerem que este NLR atua no

reconhecimento de múltiplos efetores de patógenos hemibiotróficos e necrotróficos, amplificando a resposta imune da planta.

De modo geral, observou-se regulação positiva de genes nas linhas OE em comparação com as WT, tanto em plantas inoculadas quanto não inoculadas com FOC. No entanto, a interação entre plantas e fungos patogênicos também pode resultar na regulação negativa de genes de defesa específicos da planta hospedeira, facilitando a alocação de recursos, o gerenciamento de estresse e a modulação das respostas imunes (Nishad et al., 2020). É sabido que patógenos empregam diversas estratégias para suprimir genes de defesa da planta, incluindo a secreção de efetores inibitórios, manipulação de vias hormonais — especialmente envolvendo ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno —, e ativação de reguladores negativos da defesa (Patkar et al., 2017; Han & Kahmann, 2019). No ponto de tempo analisado neste estudo (7 DAI), foram observados padrões de expressão contrastantes em genes relacionados à resposta ao FOC, em plantas OE de *Arabidopsis* inoculadas e não inoculadas. Entre eles, destacam-se NLRs, proteínas ricas em leucina, receptores para padrões moleculares associados a microrganismos (MAMPs) e patógenos (PAMPs), como quinases do tipo receptor (RLKs) e proteínas do tipo receptor (RLPs). Também foram observadas alterações na expressão de genes codificadores de proteínas da parede celular, como pectinases e expansinas, bem como de metabólitos secundários, como concanavalina e tioredoxina, além de fatores de transcrição relevantes, como a proteína MYB (RSM1), ERF e DREB. Embora esses genes estivessem regulados positivamente nas OE em relação às plantas transgênicas não inoculadas, foram regulados negativamente durante a infecção. Esses achados destacam a complexidade das interações entre as defesas da planta e as estratégias do patógeno, evidenciando que mesmo em plantas geneticamente modificadas, a regulação negativa de genes de defesa durante a infecção representa um desafio para o aprimoramento da resistência vegetal por meio de estratégias genéticas ou biotecnológicas.

Estudos anteriores com *Arabidopsis* mostraram que a percepção de *F. oxysporum* ocorre por meio de elicitores, que ativam múltiplas vias de defesa, incluindo as mediadas por SA, ET, JA e ABA (Berrocal-Lobo & Molina, 2008; Zhu et al., 2013; Chen et al., 2014; Wang et al., 2022a). Neste estudo, a análise transcricional da linha OE-11 demonstrou que os DEGs induzidos pela superexpressão de *AsTIR19* diferem substancialmente daqueles ativados pela infecção por FOC. Especificamente, os genes regulados positivamente por *AsTIR19* estavam ligados a categorias de GO associadas à percepção de patógenos,



incluindo proteínas de membrana (expansinas, pectinases, transmembrana), enzimas modificadoras da parede celular (glicosiltransferases), ROS (peroxidases, metiltransferases) e metabolismo de carboidratos (galactosiltransferases). Em contraste, após a infecção, os genes mais frequentemente induzidos estavam relacionados à produção de compostos de defesa secundária — como fenilpropanoides e terpenoides —, incluindo lectinas, racemases, mirosinases, enzimas de ROS e proteínas PR. Esses resultados sugerem que a superexpressão de *AsTIR19* contribui para a resiliência da planta à infecção por FOC, possivelmente ao modular vias de resposta ao estresse e mecanismos específicos de defesa.

### **A superexpressão de *AsTIR19* ativa múltiplas respostas de defesa na planta**

Uma análise comparativa mais detalhada dos transcritomas das plantas OE-11 e WT revelou que a superexpressão deste NLR truncado resultou no enriquecimento de categorias funcionais de GO associadas a mecanismos gerais de defesa contra o estresse, como resposta ao estresse e atividade oxidoredutase. A reprogramação transcricional global observada na linha *AsTIR19*-OE reflete o padrão normalmente desencadeado por NLRs endógenos, que, ao serem ativados pela percepção de patógenos, promovem a produção de ROS, a sinalização hormonal de defesa e a indução de respostas imunes (Lolle et al., 2020). Além disso, o enriquecimento em vias de metabolismo de carboidratos observado nas plantas transgênicas é essencial para a defesa, uma vez que os carboidratos fornecem energia e matéria-prima para a ativação da resposta imune e regulam a expressão de proteínas PR em resposta à infecção (Rojas et al., 2014).

A superexpressão de *AsTIR19* também impactou significativamente vias metabólicas celulares, mecanismos imunes e processos biossintéticos especializados. Entre os DEGs regulados positivamente nas vias KEGG enriquecidas, destacam-se genes relacionados à biossíntese de compostos fenólicos, como flavonoides, monolignóis, ácidos fenólicos, estilbenos e cumarinas. Esses metabólitos atuam como componentes estruturais da parede celular, filtros contra luz UV e, principalmente, fitoalexinas com ação antimicrobiana contra patógenos e herbívoros (Deng & Lu, 2017). Observou-se também o enriquecimento de genes ligados à biossíntese de metabólitos secundários, incluindo propanoatos — precursores do ácido propiônico, conhecido por inibir o crescimento micelial de fungos como *B. cinerea*, *S. sclerotiorum* e *F. oxysporum* (Şehirli & Saydam, 2016).

Além da ativação de genes de defesa e de vias relacionadas, a superexpressão de *AsTIR19* também induziu genes associados a vias metabólicas primárias, como aquelas envolvidas na síntese e degradação de carboidratos, aminoácidos e lipídios. Os açúcares atuam não apenas como fontes de energia e blocos estruturais nas respostas imunes, mas também como moléculas sinalizadoras que interagem com as redes de sinalização hormonal nas plantas (Morkunas & Ratajczak, 2014). Neste estudo, foi identificado um aumento na expressão de genes envolvidos no metabolismo de alanina, aspartato e glutamato, bem como na degradação de valina, leucina e isoleucina. Esses dados estão em concordância com estudos anteriores em *Arabidopsis*, que mostram que o acúmulo de açúcares e aminoácidos em tecidos infectados pode contribuir para o aumento da resistência da planta (Rojas et al., 2014; Ward et al., 2010).

### **Análise do Transcriptoma das Plantas *AsTIR19* OE em Resposta à Inoculação com FOC**

A análise do transcriptoma das plantas transgênicas *AsTIR19*-OE após a inoculação com FOC revelou um aumento expressivo no número de DEGs regulados positivamente em categorias de GO relacionadas às respostas de defesa vegetal. Entre esses genes destacam-se quitinases, proteínas relacionadas à patogênese do tipo taumatina (PRs) e peroxidases, que já haviam sido associadas a estágios iniciais da resposta ao ácido salicílico em *Arabidopsis* (Agrawal et al., 2010). Esses resultados sugerem que as plantas transgênicas ativam uma resposta de defesa ampla, combinando ação antimicrobiana direta com sinalização regulatória. Reprogramações transcricionais similares induzidas por estresses bióticos e abióticos já foram observadas em *Arabidopsis* superexpressando fatores de transcrição heterólogos, em *Populus* contendo múltiplos genes de resistência, e em trigo transgênico expressando *GmDREB* para tolerância à seca e salinidade (Quan et al., 2019; Fu et al., 2021; Zhang et al., 2014; Jiang et al., 2014).

As quitinases e proteínas do tipo taumatina (TLs) atuam como proteínas PR em reações de defesa diretas e indiretas (Dong et al., 2017; Wang et al., 1996). Enquanto as quitinases exercem papel duplo — inibindo o crescimento de patógenos e liberando PAMPs (padrões moleculares associados ao patógeno) que ativam defesas no hospedeiro (Zhang et al., 2016) —, as PR5 do tipo taumatina estão envolvidas na resistência sistêmica adquirida (SAR) e em respostas a estresses ambientais. A produção de ROS e a ativação de enzimas como as peroxidases também ajudam a proteger a célula e remover peróxidos tóxicos

acumulados. O aumento na expressão de PRs e peroxidases observado nas plantas OE inoculadas, em comparação com plantas OE não inoculadas, indica que os sinais derivados do patógeno amplificam a resposta de defesa nas plantas transgênicas.

O enriquecimento de vias KEGG ligadas à biossíntese de metabólitos secundários e compostos fenólicos, assim como à via de sinalização por MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno), também foi notável nas plantas transgênicas inoculadas com FOC. Cascatas de MAPK são ativadas por diversos estímulos de estresse e modulam a expressão gênica e a sinalização hormonal (Romeis et al., 1999; Taj et al., 2010). A análise funcional dos DEGs entre as plantas OE inoculadas e não inoculadas indica que a infecção fúngica desencadeia respostas de defesa mediadas pelas vias de SA e JA via sinalização MAPK, promovendo a produção de ROS, enzimas antioxidantes e genes relacionados à defesa (Jagodzick et al., 2018).

Vale destacar que muitas das mudanças rápidas na expressão gênica observadas na linha OE também foram identificadas na resposta suscetível das plantas WT. DEGs em WT inoculadas versus não inoculadas foram associados a categorias de GO como defesa vegetal e secreção de proteínas, mas com menor intensidade de enriquecimento do que na linha transgênica. Além disso, enquanto nas OE os DEGs regulados positivamente incluíram genes de flavonoides e metabolismo de propanoato, nas WT essas mesmas categorias mostraram predominância de regulação negativa.

Em resumo, a comparação funcional entre a linha transgênica inoculada e as plantas WT destaca o impacto da superexpressão de *AsTIR19* na ativação de vias de defesa relacionadas à biossíntese de metabólitos secundários e compostos fenólicos. Esse enriquecimento inclui genes envolvidos na produção de terpenoides, fenóis e aminoácidos cianogênicos, que provavelmente contribuem para a resistência aumentada observada na linha transgênica (Häusler et al., 2014; Zaynab et al., 2018).

### **Superexpressão de *AsTIR19* induz a ativação de Fatores de Transcrição (FTs)**

Os fatores de transcrição (FTs) são componentes cruciais dos mecanismos de defesa das plantas, atuando na regulação do metabolismo secundário, na ativação de genes de defesa e na mediação de vias de sinalização hormonal. Suas interações coordenadas são essenciais para a montagem de uma resposta eficaz frente a diferentes tipos de estresse (Buscaill & Rivas, 2014; Wani et al., 2021).

Neste estudo, identificamos a regulação positiva significativa de FTs pertencentes a quatro famílias conhecidas por seu envolvimento em respostas imunes: bHLH, WRKY, NAC e MYB. Essa regulação foi observada na linha transgênica *AsTIR19*-OE inoculada com FOC, em comparação com o controle. Os FTs da família bHLH atuam na ativação de genes relacionados ao estresse, incluindo genes que codificam peptídeos antimicrobianos e enzimas de defesa, além de participarem da regulação da via do ácido jasmônico (JA) e da biossíntese de flavonoides e antocianinas (Li, 2014; Naik et al., 2022).

As proteínas WRKY, por sua vez, interagem com outros FTs e reguladores para modular processos celulares cruciais, percebendo estímulos externos por meio de moléculas sinalizadoras. São particularmente relevantes na sinalização mediada por ácido salicílico (SA) e na ativação de genes primários associados à resposta a *F. oxysporum* (Jiang et al., 2017; Aamir et al., 2018; Li et al., 2021).

Nossos dados indicam que os FTs WRKY e bHLH fazem parte de uma rede regulatória integrada que combina diferentes vias de sinalização nas plantas *AsTIR19*-OE. Interações entre WRKYs (via SA) e bHLHs (via JA) parecem facilitar a modulação coordenada das defesas, potencializando a resposta da planta a múltiplos patógenos. Além disso, FTs da família NAC — conhecidos por seu papel na regulação de respostas a múltiplos estresses (Nuruzzaman et al., 2013; Saidi et al., 2022; Srivastava et al., 2022) — também apresentaram regulação positiva na linha OE. A superexpressão de genes NAC já foi associada à reprogramação transcricional em trigo, fortalecendo a resposta a *Fusarium graminearum* por meio das vias hormonais de JA e ácido abscísico (ABA) (Vranić et al., 2023).

A interação funcional entre esses FTs observada nas plantas transgênicas durante a infecção por FOC parece contribuir de forma relevante para a resistência adquirida. Estudos anteriores já demonstraram interações proteína-proteína entre FTs que regulam a expressão de genes PR em resposta a infecções, reforçando a resistência mediada por SA e JA contra patógenos (Tran et al., 2007; Shan et al., 2016; Nuruzzaman et al., 2013).

### **Superexpressão de *AsTIR19* regula positivamente genes marcadores de defesa e vias hormonais das plantas**

Genes marcadores associados a vias biológicas específicas são amplamente utilizados como indicadores da ativação ou supressão de cascatas de sinalização

relacionadas (Zhang et al., 2020b). Neste estudo, análises de qRT-PCR revelaram um aumento expressivo na expressão de 15 genes marcadores de defesa comumente utilizados, na linha transgênica OE-11 inoculada com FOC, em comparação com plantas não inoculadas. De forma geral, a resposta de defesa ativada na OE-11 inoculada é robusta e multifatorial, envolvendo a ativação coordenada de genes marcadores das vias de sinalização do ácido salicílico (SA), ácido jasmônico e etileno (JA-ET), além de genes associados à sinalização por auxina (IAA) e ao controle de espécies reativas de oxigênio (ROS). Esses resultados indicam a atuação de um mecanismo de defesa integrado, altamente regulado e eficiente contra FOC.

O gene NPR1, regulador central da via mediada por SA, apresentou expressão aumentada em mais de 40 vezes, acompanhado de uma indução superior a 16 vezes do gene PR5. Esses dados destacam o papel central da via de SA na resposta imune à infecção por FOC, e reforçam a viabilidade de estratégias genéticas que aumentem a expressão de NPR1 como forma de elevar a resistência em plantas transgênicas (Spoel et al., 2009; Cao et al., 1997).

Além disso, dois genes NLR previamente descritos em *Arabidopsis* — *Atlg72910* (NLR) e *Atlg72930* (TIR truncado) — também foram regulados positivamente após a infecção nas plantas OE, sugerindo que *AsTIR19* pode atuar em sinergia com outros NLRs endógenos, como discutido por Ngou et al. (2022). Nessas redes cooperativas, múltiplos NLRs trabalham em conjunto para ampliar o reconhecimento de efetores fúngicos e coordenar a ativação de respostas imunes.

A subtilase SBT3, também regulada positivamente, contribui para a ativação de pectin metilesterases (PMEs), remodelando a parede celular e promovendo o “priming” imune dependente de SA (Ramírez et al., 2013; Coculo et al., 2023).

A ativação da via de JA foi evidenciada pela regulação positiva dos genes MD-2-like e ML3, que respondem a componentes patogênicos como PAMPs e HAMPS (Fridborg et al., 2013; Song et al., 2022). A indução de VSP2 e PR6 — genes relacionados à biossíntese de metabólitos antimicrobianos — reforça a função da via de JA na resposta antifúngica, particularmente contra patógenos necrotróficos.

Curiosamente, essa ativação ampla de vias hormonais também foi observada anteriormente em *Nicotiana tabacum* expressando *AsTIR19* e infectada por *S. sclerotiorum* (Guimarães et al., 2022), indicando que a ativação constitutiva do transgene em diferentes hospedeiros promove um perfil de defesa consistente frente a diferentes patógenos.

A via do etileno (ET) também foi ativada, como indicado pela regulação positiva dos fatores de transcrição EIN3 e ERF, além da indução do gene PADRE, associado à resposta ao estresse patogênico (Zhao et al., 2021; Didelon et al., 2020).

A via de auxina, representada pelo gene IAN, e a sinalização redox, indicada pela regulação positiva de APX (ascorbato peroxidase), também parecem contribuir para a resposta de defesa. A auxina pode modular a expressão de genes PR e a arquitetura da parede celular, enquanto ROS atuam como sinais, antimicrobianos e elementos estruturais, promovendo reforço da parede celular e morte celular programada (Remans et al., 2006; Ali et al., 2018).

Esse conjunto de respostas demonstra que a linha OE-11 ativa uma complexa rede de sinalização hormonal e defesa molecular, ampliando sua resistência ao patógeno.

A murcha-de-fusário permanece um desafio significativo devido à sua base genética complexa e à persistência do patógeno no solo (Gordon, 2017). Estratégias como o uso de genes de defesa nativos (Hao et al., 2020; Zhang et al., 2020a; Sadhu et al., 2023) e tecnologias como o HIGS via RNAi (Singh et al., 2020) vêm sendo exploradas com resultados variados.

Neste trabalho, mostramos que a superexpressão do gene NLR truncado *AsTIR19*, oriundo da espécie silvestre *A. stenosperma*, aumenta a tolerância a FOC em *Arabidopsis*. A análise transcricional revelou que a expressão do transgene altera profundamente vias de defesa, processos metabólicos e redes de regulação gênica. Esses dados elucidam como *AsTIR19* pode atuar como gatilho da resposta imune, reforçando sua aplicabilidade em biotecnologia vegetal.

Por fim, *AsTIR19* apresenta forte potencial para ser explorado em programas de melhoramento assistido por marcadores ou transgenia, inclusive em culturas economicamente importantes. Sua combinação com outros genes de resistência pode formar um empilhamento genético estratégico, ampliando o espectro de proteção e reduzindo a chance de evasão por parte dos patógenos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aamir, M., Singh, V. K., Dubey, M. K., Kashyap, S. P., Zehra, A., Upadhyay, R. S., et al. (2018). Structural and functional dissection of differentially expressed tomato WRKY transcripts in host defense response against the vascular wilt pathogen (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*). *PLoS One* 13.
- Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) Function as Transcriptional Activators in Abscissic Acid Signaling. *Plant Cell* 15, 63–78.
- Adams, E., Abdollahi, P., and Shin, R. (2013). Cesium Inhibits Plant Growth through Jasmonate Signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 4545–4559.
- Agrawal, G. K., Jwa, N. S., Lebrun, M. H., Job, D., and Rakwal, R. (2010). Plant secretome: unlocking secrets of the secreted proteins. *Proteomics* 10, 799–827.
- Ali, M., Cheng, Z., Ahmad, H., and Hayat, S. (2018). Reactive oxygen species (ROS) as defenses against a broad range of plant fungal infections and case study on ROS employed by crops against *Verticillium dahliae* wilts. *J. Plant Interact.* 13, 353–363.
- Anders, S., Pyl, P. T., and Huber, W. (2015). HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 31, 166–169.
- Baillo, E. H., Kimotho, R. N., Zhang, Z., and Xu, P. (2019). Transcription Factors Associated with Abiotic and Biotic Stress Tolerance and Their Potential for Crops Improvement. *Genes* 10, 771.
- Barragan, A. C., Collenberg, M., Wang, J., Lee, R. R. Q., Cher, W. Y., Rabanal, F. A., et al. (2021). A Truncated Singleton NLR Causes Hybrid Necrosis in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Biol. Evol.* 38, 557–574.
- Baxter, A., Mittler, R., and Suzuki, N. (2014). ROS as key players in plant stress signalling. *J. Exp. Bot.* 65, 1229–1240.
- Beckman, C. H., and Roberts, E. M. (1995). On the Nature and Genetic Basis for Resistance and Tolerance to Fungal Wilt Diseases of Plants. *Adv. Bot. Res.* 21, 35–77.
- Berrocal-Lobo, M., and Molina, A. (2008). *Arabidopsis* defense response against *Fusarium oxysporum*. *Trends Plant Sci.* 13, 145–150.
- Bertioli, D. J., Gao, D., Ballen-Taborda, C., Chu, Y., Ozias-Akins, P., Jackson, S. A., et al. (2021). Registration of GA-BatSten1 and GA-MagSten1, two induced allotetraploids

derived from peanut wild relatives with superior resistance to leaf spots, rust, and root-knot nematode. *J. Plant Regist.* 15, 372–378.

Bharti, P., Jyoti, P., Kapoor, P., Sharma, V., Shanmugam, V., and Yadav, S. K. (2017). Host-Induced Silencing of Pathogenicity Genes Enhances Resistance to *Fusarium oxysporum* Wilt in Tomato. *Mol. Biotechnol.* 59, 343–352. Y

Bohra, A., Kilian, B., Sivasankar, S., Caccamo, M., Mba, C., McCouch, S. R., et al. (2022). Reap the crop wild relatives for breeding future crops. *Trends Biotechnol.* 40, 412–431.

Brasileiro, A. C. M., Lacorte, C., Pereira, B. M., Oliveira, T. N., Ferreira, D. S., Mota, A. P. Z., et al. (2021). Ectopic expression of an expansin-like B gene from wild *Arachis* enhances tolerance to both abiotic and biotic stresses. *Plant J.* 107, 1681–1696.

Buscaill, P., and Rivas, S. (2014). Transcriptional control of plant defense responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 20, 35–46.

Cao, H., Glazebrook, J., Clarke, J. D., Volko, S., and Dong, X. (1997). The *Arabidopsis* NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell* 88, 57–63.

Cesari, S. (2018). Multiple strategies for pathogen perception by plant immune receptors. *New Phytologist* 219, 17–24.

Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., and Gu, J. (2018). fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics* 34, i884–i890.

Chen, Y. C., Wong, C. L., Muzzi, F., Vlaardingerbroek, I., Kidd, B. N., and Schenk, P. M. (2014). Root defense analysis against *Fusarium oxysporum* reveals new regulators to confer resistance. *Sci. Rep.* 4, 5584.

Chen, Y., Zhong, G., Cai, H., Chen, R., Liu, N., Wang, W., et al. (2021). A truncated TIR-NBS protein TN10 pairs with two clustered TIR-NBS-LRR immune receptors and contributes to plant immunity in *Arabidopsis*. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 4004.

Chhajed, S., Mostafa, I., He, Y., Abou-Hashem, M., El-Domiaty, M., and Chen, S. (2020). Glucosinolate Biosynthesis and the Glucosinolate–Myrosinase System in Plant Defense. *Agronomy* 10, 1786.

Chitwood-Brown, J., Vallad, G. E., Lee, T. G., and Hutton, S. F. (2021). Breeding for Resistance to *Fusarium* Wilt of Tomato: A Review. *Genes* 12, 1673.

Clough, S. J., and Bent, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16, 735–743.



Coculo, D., Del Corpo, D., Martínez, M. O., Vera, P., Piro, G., De Caroli, M., et al. (2023). *Arabidopsis* subtilases promote defense-related pectin methylesterase activity and robust immune responses to *Botrytis* infection. *Plant Physiol. Biochem.* 201, 107865.

Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M. K., and Scheible, W. R. (2005). Genome-Wide Identification and Testing of Superior Reference Genes for Transcript Normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 139, 5.

Da Silva Ferreira, D., da Cunha Quintana Martins, A., Berbert, P. S., dos Anjos, R. M., de Passos Saraiva, M. A., Brasileiro, A. C. M., et al. (2024). A Wild *Arachis* Endochitinase Enhances *Sclerotinia* Resistance in Transgenic Plants. *Tropical Plant Biology* 17, 138–155.

Dale, J., James, A., Paul, J. Y., Khanna, H., Smith, M., Peraza-Echeverria, S., et al. (2017). Transgenic Cavendish bananas with resistance to *Fusarium* wilt tropical race 4. *Nature Commun.* 8, 1496.

Dangl, J. L., and Jones, J. D. G. (2001). Plant pathogens and integrated defense responses to infection. *Nature* 411, 826–833. doi: 10.1038/35081161

De Macedo Leal-Bertioli, S.C., De Farias, M.P., Silva, P.T., Guimarães, P.M., Brasileiro, A.C.M., Bertioli, D.J. and De Araujo, A.C.G. (2010). Ultrastructure of the Initial Interaction of *Puccinia arachidis* and *Cercosporidium personatum* with Leaves of *Arachis hypogaea* and *Arachis stenosperma* . *J. of Phytopathol.* 158, 792-796.

Dean, R., Van Kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., et al. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 13, 414–430.

Deng, Y., and Lu, S. (2017). Biosynthesis and Regulation of Phenylpropanoids in Plants. *CRC Crit Rev. Plant Sci.* 36, 257–290.

Diao, J., Li, M., Zhang, P., Zong, C., Ma, W., and Ma, L. (2022). Overexpression of the PdpapERF109 gene enhances resistance of *Populus davidiana* × *P. alba* var. *pyramidalis* to *Fusarium oxysporum* infection. *J. For. Res.* 33, 1925–1937.

Didelon, M., Khafif, M., Godiard, L., Barbacci, A., and Raffaele, S. (2020). Patterns of Sequence and Expression Diversification Associate Members of the PADRE Gene Family with Response to Fungal Pathogens. *Front. Genet.* 11, 526991.

Diener, A. C., and Ausubel, F. M. (2005). RESISTANCE TO *FUSARIUM OXYSPORUM* 1, a dominant *Arabidopsis* disease-resistance gene, is not race specific. *Genetics* 171, 305–321.

Dobin, A., and Gingeras, T. R. (2016). Optimizing RNA-Seq Mapping with STAR. *Methods Mol. Biol.* 1415, 245–262.

Dong, X., Zhao, Y., Ran, X., Guo, L., and Zhao, D. G. (2017). Overexpression of a New Chitinase Gene EuCHIT2 Enhances Resistance to *Erysiphe cichoracearum* DC in Tobacco Plants. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 2361.

Dutra, W. F., Guerra, Y. L., Ramos, J. P. C., Fernandes, P. D., Silva, C. R. C., Bertioli, D. J., et al. (2018). Introgression of wild alleles into the tetraploid peanut crop to improve water use efficiency, earliness and yield. *PLoS One* 13, e0198776.

Esch, L., and Schaffrath, U. (2017). An Update on Jacalin-Like Lectins and Their Role in Plant Defense. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 1592.

FAO, IFAD, UNICEF, WFP and WHO. (2023). The State of Food Security and Nutrition in the World 2023. *Urbanization, agrifood systems transformation and healthy diets across the rural–urban continuum*. Rome,

Fernandes, J. S., Angelo, C. S., Cruz, J. C., Santos, J. M. M., Sousa, N. R., and Silva, G. F. (2016). Post-transcriptional silencing of the SGE1 gene induced by a dsRNA hairpin in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, the causal agent of Panama disease. *Genet. Mol. Res.* 15.

Fonceka, D., Tossim, H. A., Rivallan, R., Vignes, H., Faye, I., Ndoeye, O., et al. (2012). Fostered and left behind alleles in peanut: Interspecific QTL mapping reveals footprints of domestication and useful natural variation for breeding. *BMC Plant Biol.* 12, 1–16.

Fridborg, I., Johansson, A., Lagensjö, J., Leelarasamee, N., Floková, K., Tarkowská, D., et al. (2013). ML3: a novel regulator of herbivory-induced responses in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 64, 935–948.

Fu, J., Zhu, C., Wang, C., Liu, L., Shen, Q., Xu, D., et al. (2021). Maize transcription factor ZmEREB20 enhanced salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiol. Biochem.* 159, 257–267.

Gao, H., Beckman, C. H., and Mueller, W. C. (1995). The nature of tolerance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in polygenically field-resistant marglobe tomato plants. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 46, 401–412.

Ghag, S. B., Shekhawat, U. K. S., and Ganapathi, T. R. (2014). Native cell-death genes as candidates for developing wilt resistance in transgenic banana plants. *AoB Plants* 6, plu037.

Gipson, A. B., Morton, K. J., Rhee, R. J., Simo, S., Clayton, J. A., Perrett, M. E., et al. (2017). Disruptions in valine degradation affect seed development and germination in *Arabidopsis*. *Plant J.* 90, 1029–1039.

Gordon, T. R. (2017). *Fusarium oxysporum* and the *Fusarium* Wilt Syndrome. *Annu. Rev. Phytopathol.* 55, 23–39.

Guerriero, G., Berni, R., Muñoz-Sanchez, J. A., Apone, F., Abdel-Salam, E. M., Qahtan, A. A., et al. (2018). Production of Plant Secondary Metabolites: Examples, Tips and Suggestions for Biotechnologists. *Genes* 9, 309.

Guimarães, P. M., Brasileiro, A. C., Morgante, C. V., Martins, A. C., Pappas, G., Silva, O. B. Jr. et al. (2012). Global transcriptome analysis of two wild relatives of peanut under drought and fungi infection. *BMC Genomics* 13, 387.

Guimaraes, P. M., Quintana, A. C., Mota, A. P. Z., Berbert, P. S., Ferreira, D. da S., de Aguiar, M. N., et al. (2022). Engineering Resistance against *Sclerotinia sclerotiorum* Using a Truncated NLR (TNx) and a Defense-Priming Gene. *Plants* 11, 3483.

Guo, L., Li, C., Jiang, Y., Luo, K., and Xu, C. (2020). Heterologous Expression of Poplar WRKY18/35 Paralogs in *Arabidopsis* Reveals Their Antagonistic Regulation on Pathogen Resistance and Abiotic Stress Tolerance via Variable Hormonal Pathways. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 1–17.

Han, X., and Kahmann, R. (2019). Manipulation of phytohormone pathways by effectors of filamentous plant pathogens. *Front. Plant. Sci.* 10, 464951.

Hao, G., Bakker, M. G., and Kim, H. S. (2020). Enhanced Resistance to *Fusarium graminearum* in Transgenic *Arabidopsis* Plants Expressing a Modified Plant Thionin. *Phytopathology* 110, 1056–1066.

Häusler, R. E., Ludewig, F., and Krueger, S. (2014). Amino acids--a life between metabolism and signaling. *Plant Sci.* 229, 225–237.

Haynes, W. (2013). Benjamini–Hochberg Method. In: Encyclopedia of Systems Biology, eds. Dubitzky, W., Wolkenhauer, O., Cho, K.H., Yokota, H. (Springer, New York, NY).

Heberle, H., Meirelles, V. G., da Silva, F. R., Telles, G. P., and Minghim, R. (2015). InteractiVenn: A web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC Bioinformatics* 16, 1–7.

Hou, S., Wang, X., Chen, D., Yang, X., Wang, M., Turrà, D., et al. (2014). The Secreted Peptide PIP1 Amplifies Immunity through Receptor-Like Kinase 7. *PLoS Pathog.* 10, e1004331.

Hu, Z., Parekh, U., Maruta, N., Trusov, Y., and Botella, J. R. (2016). Down-regulation of *Fusarium oxysporum* endogenous genes by Host-Delivered RNA interference enhances disease resistance. *Front. Chem.* 3, 1.

Ibrahim, A. B., Monteiro, T. R., Cabral, G. B., and Aragão, F. J. L. (2017). RNAi-mediated resistance to whitefly (*Bemisia tabaci*) in genetically engineered lettuce (*Lactuca sativa*). *Transgenic Res.* 26, 613–624.

Jagodzik, P., Tajdel-Zielinska, M., Ciesla, A., Marczak, M., and Ludwikow, A. (2018). Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades in Plant Hormone Signaling. *Front. Plant. Sci.* 9: 1387.

Jangir, P., Mehra, N., Sharma, K., Singh, N., Rani, M., and Kapoor, R. (2021). Secreted in xylem genes: Drivers of host adaptation in *Fusarium oxysporum*. *Front. Plant Sci.* 12, 628611.

Jiang, J., Ma, S., Ye, N., Jiang, M., Cao, J., and Zhang, J. (2017). WRKY transcription factors in plant responses to stresses. *J. Integr. Plant Biol.* 59, 86–101.

Jiang, Q., Hu, Z., Zhang, H., and Ma, Y. (2014). Overexpression of GmDREB1 improves salt tolerance in transgenic wheat and leaf protein response to high salinity. *Crop J.* 2, 120–131.

Jones, J. D. G., Vance, R. E., and Dangl, J. L. (2016). Intracellular innate immune surveillance devices in plants and animals. *Science* 354, aaf6395.

Joshi, V., Joung, J. G., Fei, Z., and Jander, G. (2010). Interdependence of threonine, methionine and isoleucine metabolism in plants: accumulation and transcriptional regulation under abiotic stress. *Amino Acids* 39, 933–947.

Kalamaki, M. S., Merkouropoulos, G., and Kanellis, A. K. (2009). Can ornithine accumulation modulate abiotic stress tolerance in *Arabidopsis*? *Plant Signal. Behav.* 4, 1099–1101.

Katan, T., and Di Primo, P. (1999). Current status of vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum*: *Phytoparasitica* 27, 273–277.

Kwaaitaal, M., Huisman, R., Maintz, J., Reinstädler, A., and Panstruga, R. (2011). Ionotropic glutamate receptor (iGluR)-like channels mediate MAMP-induced calcium influx in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. J.* 440, 355–373.

Lai, Y., and Eulgem, T. (2018). Transcript-level expression control of plant NLR genes. *Mol. Plant. Pathol.* 19, 1267–1281.

Li, J., Fokkens, L., Conneely, L. J., and Rep, M. (2020). Partial pathogenicity chromosomes in *Fusarium oxysporum* are sufficient to cause disease and can be horizontally transferred. *Environ. Microbiol.* 22, 4985–5004.

Li, S. (2014). Transcriptional control of flavonoid biosynthesis: Fine-tuning of the MYB-bHLH-WD40 (MBW) complex. *Plant. Signal. Behav.* 9.

Li, S., Liu, G., Pu, L., Liu, X., Wang, Z., Zhao, Q., et al. (2021). WRKY Transcription Factors Actively Respond to *Fusarium oxysporum* in *Lilium regale*. *Phytopathology* 111, 1625–1637.

Liu, J., Sun, P., Zhang, J., Wang, J., Zhang, J., Wang, J., et al. (2016). Efficient regeneration system applicable to five *Musa* cultivars. *Front. Agric. Sci. Eng.* 3, 330–334.

Li, X., Pan, Y., Chang, B., Wang, Y., and Tang, Z. (2016). NO promotes seed germination and seedling growth under high salt may depend on EIN3 protein in *Arabidopsis*. *Front. Plant Sci.* 6, 166049.

Lolle, S., Stevens, D., and Coaker, G. (2020). Plant NLR-triggered immunity: from receptor activation to downstream signaling. *Curr. Opin. Immunol.* 62, 99–105.

Lu, Y., and Tsuda, K. (2021). Intimate Association of PRR- and NLR-Mediated Signaling in Plant Immunity. *Mol. Plant Microbe Interact.* 34, 3–14.

Mahdavi, F., Sariah, M., and Maziah, M. (2012). Expression of rice thaumatin-like protein gene in transgenic banana plants enhances resistance to *Fusarium* wilt. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 166, 1008–1019.

Ma, J., Hou, X., Xiao, D., Qi, L., Wang, F., Sun, F., et al. (2010). Cloning and Characterization of the BcTuR3 Gene Related to Resistance to Turnip Mosaic Virus (TuMV) from Non-heading Chinese Cabbage. *Plant Mol. Biol. Report* 28, 588–596.

Manna, M., Rengasamy, B., and Sinha, A. K. (2023). Revisiting the role of MAPK signalling pathway in plants and its manipulation for crop improvement. *Plant Cell Environ.* 46, 2277–2295.

Melo, N. J. de A., Negreiros, A. M. P., Medeiros, H. L. de S., and Sales Júnior, R. (2020). Evaluation of *Fusarium* wilt disease in passion fruit species inoculated with *Fusarium oxysporum* f.sp. *passiflorae*. *J. of Phytopathol.* 168, 81–87.

Metsalu, T., and Vilo, J. (2015). ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. *Nucleic Acids Res.* 43, W566–W570.

Michelotto, M. D., Barioni, W., De Resende, M. D. V., De Godoy, I. J., Leonardecz, E., and Fávero, A. P. (2015). Identification of Fungus Resistant Wild Accessions and Interspecific Hybrids of the Genus *Arachis*. *PLoS One* 10, e0128811.

Michielse, C. B., and Rep, M. (2009). Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Mol. Plant. Pathol.* 10, 311–324.

Moretzsohn, M. de C., Santos, J. F. dos, Moraes, A. R. A., Custódio, A. R., Michelotto, M. D., Mahrajan, N., et al. (2023). Marker-assisted introgression of wild chromosome segments conferring resistance to fungal foliar diseases into peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Front. Plant. Sci.* 14, 1139361.

Morgante, C. V, Brasileiro, A. C. M., Roberts, P. A., Guimaraes, L. A., Araujo, A. C. G., Fonseca, L. N., et al. (2013). A survey of genes involved in *Arachis stenosperma* resistance to *Meloidogyne arenaria* race 1. *Functional Plant Biol.* 40, 1298–1309.

Morkunas, I., and Ratajczak, L. (2014). The role of sugar signaling in plant defense responses against fungal pathogens. *Acta Physiol. Plant* 36, 1607–1619.

Mota, A. P. Z., Oliveira, T. N., Vinson, C. C., Williams, T. C. R., Costa, M. M. do C., Araujo, A. C. G., et al. (2019). Contrasting effects of wild *Arachis* dehydrin under abiotic and biotic stresses. *Front. Plant. Sci.* 10, 443681.

Mota, A.P.Z., Vidigal, B., Danchin, E.G.J. et al. (2018). Comparative root transcriptome of wild *Arachis* reveals NBS-LRR genes related to nematode resistance. *BMC Plant Biol.* 18, 159.

Myagmarjav, D., Sukweenadhi, J., Kim, Y. J., Jang, M. G., Rahimi, S., Silva, J., et al. (2017). Molecular characterization and expression analysis of pathogenesis related protein 6 from *Panax ginseng*. *Russ. J. Genet.* 53, 1211–1220.

Naik, J., Misra, P., Trivedi, P. K., and Pandey, A. (2022). Molecular components associated with the regulation of flavonoid biosynthesis. *Plant. Sci.* 317, 111196.

Nandety, R. S., Caplan, J. L., Cavanaugh, K., Perroud, B., Wroblewski, T., Michelmore, R. W., et al. (2013). The role of TIR-NBS and TIR-X proteins in plant basal defense responses. *Plant Physiol.* 162, 1459–1472.

Nasim, Z., Fahim, M., Gawarecka, K., Susila, H., Jin, S., Youn, G., et al. (2020). Role of AT1G72910, AT1G72940, and ADR1-LIKE 2 in Plant Immunity under Nonsense-Mediated mRNA Decay-Compromised Conditions at Low Temperatures. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 1–17.

Ngou, B. P. M., Ding, P., and Jones, J. D. G. (2022). Thirty years of resistance: Zig-zag through the plant immune system. *Plant Cell* 34, 1447–1478.

Nishad, R., Ahmed, T., Rahman, V. J., and Kareem, A. (2020). Modulation of Plant Defense System in Response to Microbial Interactions. *Front. Microbiol.* 11.

Nuruzzaman, M., Sharoni, A. M., and Kikuchi, S. (2013). Roles of NAC transcription factors in the regulation of biotic and abiotic stress responses in plants. *Front. Microbiol.* 4, 55831.

Pandey, S. P., and Somssich, I. E. (2009). The Role of WRKY Transcription Factors in Plant Immunity. *Plant Physiol.* 150, 1648.

Pantelides, I. S., Tjamos, S. E., Pappa, S., Kargakis, M., and Paplomatas, E. J. (2013). The ethylene receptor ETR1 is required for *Fusarium oxysporum* pathogenicity. *Plant Pathol.* 62, 1302–1309.

Patkar, R. N., and Naqvi, N. I. (2017). Fungal manipulation of hormone-regulated plant defense. *PLoS Pathog.* 13, e1006334.

Pottinger, S. E., and Innes, R. W. (2020). RPS5-mediated disease resistance: fundamental insights and translational applications. *Annu. Rev. Phytopathol.* 58, 139–160.

Prüfer, K., Muetzel, B., Do, H.-H., Weiss, G., Khaitovich, P., Rahm, E., et al. (2007). FUNC: a package for detecting significant associations between gene sets and ontological annotations. *BMC Bioinform.* 8, 41.

Puli, C. O. R., Akila, C. S., Pandit, V., Konduru, S., Kandi, S. R., and Chinta, S. (2021). Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Transgenic Plants for Abiotic Stress Tolerance. In *Genetically Modified Crops*, eds. Kavi Kishor, P.B., Rajam, M.V., Pullaiah, T. (Springer, Singapore), 139–173.

Quan, W., Liu, X., Wang, L., Yin, M., Yang, L., and Chan, Z. (2019). Ectopic expression of *Medicago truncatula* homeodomain finger protein, MtPHD6, enhances drought tolerance in *Arabidopsis*. *BMC Genomics* 20, 982.

Ramírez, V., López, A., Mauch-Mani, B., Gil, M. J., and Vera, P. (2013). An Extracellular Subtilase Switch for Immune Priming in *Arabidopsis*. *PLoS Pathog.* 9, e1003445.

Rancurel, C., van Tran, T., Elie, C., and Hilliou, F. (2019). SATQPCR: Website for statistical analysis of real-time quantitative PCR data. *Mol. Cell Probes* 46, 101418.

Rauwane, M. E., Ogugua, U. V, Kalu, C. M., Ledwaba, L. K., Woldesemayat, A. A., and Ntushelo, K. (2020). Pathogenicity and virulence factors of *Fusarium graminearum* including factors discovered using next generation sequencing technologies and proteomics. *Microorganisms* 8, 305.

Remans, R., Spaepen, S., and Vanderleyden, J. (2006). Auxin signaling in plant defense. *Science* 313, 171–171.

Rivero, R.M., Mittler, R., Blumwald, E., and Zandalinas, S.I. (2022). Developing climate-resilient crops: improving plant tolerance to stress combination. *Plant J.* 109, 373–389.

Robinson, M. D., McCarthy, D. J., and Smyth, G. K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26, 139–140.

Rojas, C. M., Senthil-Kumar, M., Tzin, V., and Mysore, K. S. (2014). Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense. *Front. Plant. Sci.* 5, 17.

Romeis, T., Piedras, P., Zhang, S., Klessig, D. F., Hirt, H., and Jones, J. D. G. (1999). Rapid Avr9- and Cf-9–Dependent Activation of MAP Kinases in *Tobacco* Cell Cultures and Leaves: Convergence of Resistance Gene, Elicitor, Wound, and Salicylate Responses. *Plant Cell* 11, 273–287.

Roth, C., Lüdke, D., Klenke, M., Quathamier, A., Valerius, O., Braus, G. H., et al. (2017). The truncated NLR protein TIR-NBS13 is a MOS6/IMPORTIN- $\alpha$ 3 interaction partner required for plant immunity. *Plant J.* 92, 808–821.

Sadhu, S. K., Jogam, P., Gande, K., Marapaka, V., Penna, S., and Peddaboina, V. (2023). Expression of radish defensin (RsAFP2) gene in chickpea (*Cicer arietinum* L.) confers resistance to *Fusarium* wilt disease. *Mol. Biol. Rep.* 50, 11–18. doi: 10.1007/S11033-022-08021-9

Saidi, M. N., Mergby, D., Souibgui, A., and Yacoubi, I. (2022). Overexpression of durum wheat NAC transcription factor TtNLT3A promotes early flowering and increases multiple stress tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiol. Biochem.* 192, 1–9.

Salehin, M., Li, B., Tang, M., Katz, E., Song, L., Ecker, J. R., et al. (2019). Auxin-sensitive Aux/IAA proteins mediate drought tolerance in *Arabidopsis* by regulating glucosinolate levels. *Nature Commun.* 2019 10:1 10, 1–9.

Şehirli, S., and Saydam, C. (2016). The Effect of Acetic, Formic and Propionic Acids on Plant Pathogenic Fungi. *J. Biol. Environ. Sci.* 10, 129–137.

Shan ,W., Chen, J.Y., Kuang, J.F., and Lu, W.J. (2016). Banana fruit NAC transcription factor MaNAC5 cooperates with MaWRKYs to enhance the expression of pathogenesis-related genes against *Colletotrichum musae*. *Mol. Plant Pathol* 17, 330–338.



Sharma, H. C., Pampapathy, G., Dwivedi, S. L., and Reddy, L. J. (2003). Mechanisms and Diversity of Resistance to Insect Pests in Wild Relatives of Groundnut. *J. Econ. Entomol.* 96, 1886–1897.

Shukla, D., Waigel, S., Rouchka, E. C., Sandhu, G., Trivedi, P. K., and Sahi, S. V. (2021). Genome-wide expression analysis reveals contrasting regulation of phosphate starvation response (PSR) in root and shoot of *Arabidopsis* and its association with biotic stress. *Environ. Exp. Bot.* 188, 104483.

Singh, N., Mukherjee, S. K., and Rajam, M. V. (2020). Silencing of the Ornithine Decarboxylase Gene of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by Host-Induced RNAi Confers Resistance to *Fusarium* Wilt in Tomato. *Plant Mol. Biol. Report* 38, 419–429.

Son, S., Kim, S., Lee, K., Oh, J., Choi, I., Do, J., et al. (2021). The *Capsicum baccatum*-Specific Truncated NLR Protein CbCN Enhances the Innate Immunity against *Colletotrichum acutatum*. *Int. J. Mol. Sci.* 22.

Song, Y., Zhou, K., Nan, X., Qin, Y., Zhao, K., Li, W., et al. (2022). A novel ML protein functions as a pattern recognition protein in antibacterial responses in *Eriochir sinensis*. *Dev. Comp. Immunol.* 127.

Spoel, S. H., Mou, Z., Tada, Y., Spivey, N. W., Genschik, P., and Dong, X. (2009). Proteasome-mediated turnover of the transcription coactivator NPR1 plays dual roles in regulating plant immunity. *Cell* 137, 860–872.

Srivastava, R., Kobayashi, Y., Koyama, H., and Sahoo, L. (2022). Overexpression of cowpea NAC transcription factors promoted growth and stress tolerance by boosting photosynthetic activity in *Arabidopsis*. *Plant Sci.* 319, 111251.

Staal, J., Kaliff, M., Dewaele, E., Persson, M., and Dixelius, C. (2008). RLM3, a TIR domain encoding gene involved in broad-range immunity of *Arabidopsis* to necrotrophic fungal pathogens. *Plant J.* 55, 188–200.

Swathi Anuradha, T., Divya, K., Jami, S. K., and Kirti, P. B. (2008). Transgenic tobacco and peanut plants expressing a mustard defensin show resistance to fungal pathogens. *Plant Cell Rep.* 27, 1777–1786.

Taj, G., Agarwal, P., Grant, M., and Kumar, A. (2010). MAPK machinery in plants. *Plant. Signal. Behav.* 5, 1370–1378.

Tamborski, J., and Krasileva, K. V. (2020). Evolution of Plant NLRs: From Natural History to Precise Modifications. *Annu. Rev. Plant Biol.* 71, 355–378.

Tang, D., Chen, M., Huang, X., Zhang, G., Zeng, L., Zhang, G., et al. (2023). SRplot: A free online platform for data visualization and graphing. *PLoS ONE* 18, e0294236.

Tassone, M. R., Bagnaresi, P., Desiderio, F., Bassolino, L., Barchi, L., Florio, F. E., et al. (2022). A Genomic BSaseq Approach for the Characterization of QTLs Underlying Resistance to *Fusarium oxysporum* in Eggplant. *Cells* 11, 2548.

Thimm, O., Bläsing, O., Gibon, Y., Nagel, A., Meyer, S., Krüger, P., et al. (2004). MAPMAN: A user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant J.* 37, 914–939.

Tian, F., Yang, D. C., Meng, Y. Q., Jin, J., and Gao, G. (2020). PlantRegMap: charting functional regulatory maps in plants. *Nucleic Acids Res.* 48, D1104–D1113.

Tran, L. S. P., Nakashima, K., Sakuma, Y., Osakabe, Y., Qin, F., Simpson, S. D., et al. (2007). Co-expression of the stress-inducible zinc finger homeodomain ZFHD1 and NAC transcription factors enhances expression of the ERD1 gene in *Arabidopsis*. *Plant J.* 49, 46–63.

Turner, S. D. (2014). qqman: an R package for visualizing GWAS results using Q-Q and manhattan plots. *bioRxiv*, 005165.

Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., et al. (2012). Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 40.

Vinson, C. C., Mota, A. P. Z., Oliveira, T. N., Guimaraes, L. A., Leal-Bertioli, S. C. M., Williams, T. C. R., et al. (2018). Early responses to dehydration in contrasting wild *Arachis* species. *PLoS One* 13, e019819.

Vinson, C. C., Mota, A. P. Z., Porto, B. N., Oliveira, T. N., Sampaio, I., Lacerda, A. L., et al. (2020). Characterization of raffinose metabolism genes uncovers a wild *Arachis* galactinol synthase conferring tolerance to abiotic stresses. *Sci. Rep.* 10, 15258.

Vranić, M., Perochon, A., and Doohan, F. M. (2023). Transcriptional Profiling Reveals the Wheat Defences against *Fusarium* Head Blight Disease Regulated by a NAC Transcription Factor. *Plants* 12, 2708.

Wang, L., Calabria, J., Chen, H. W., and Somssich, M. (2022a). The *Arabidopsis thaliana*-*Fusarium oxysporum* strain 5176 pathosystem: an overview. *J. Exp. Bot.* 73, 6052–6067.

Wang, X., Zafian, P., Choudhary, M., and Lawton, M. (1996). The PR5K receptor protein kinase from *Arabidopsis thaliana* is structurally related to a family of plant defense proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 2598–2602.

Wang, Y., Zhang, X., Wang, T., Zhou, S., Liang, X., Xie, C., et al. (2022b). The Small Secreted Protein FoSsp1 Elicits Plant Defenses and Negatively Regulates Pathogenesis in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc4). *Front Plant. Sci.* 13, 873451.

Wang, Y., Zhang, Y., Wang, Z., Zhang, X., and Yang, S. (2013). A missense mutation in CHS1, a TIR-NB protein, induces chilling sensitivity in *Arabidopsis*. *Plant J.* 75, 553–565.

Wani, S. H., Anand, S., Singh, B., Bohra, A., and Joshi, R. (2021). WRKY transcription factors and plant defense responses: latest discoveries and future prospects. *Plant Cell Rep.* 40, 1071–1085.

Ward, J. L., Forcat, S., Beckmann, M., Bennett, M., Miller, S. J., Baker, J. M., et al. (2010). The metabolic transition during disease following infection of *Arabidopsis thaliana* by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Plant J.* 63, 443–457.

Wickham H (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York. 260 p.

Xu, Y., Liu, F., Zhu, S., and Li, X. (2018). The maize NBS-LRR gene ZmNBS25 enhances disease resistance in rice and *Arabidopsis*. *Front. Plant. Sci.* 9, 1033.

Zaynab, M., Fatima, M., Abbas, S., Sharif, Y., Umair, M., Zafar, M. H., et al. (2018). Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. *Microb. Pathog.* 124, 198–202.

Zhang, F., Ruan, X., Wang, X., Liu, Z., Hu, L., and Li, C. (2016). Overexpression of a Chitinase Gene from *Trichoderma asperellum* Increases Disease Resistance in Transgenic Soybean. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 180, 1542–1558.

Zhang, M., Liu, Q., Yang, X., Xu, J., Liu, G., Yao, X., et al. (2020a). CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of Clpsk1 in watermelon to confer resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum*. *Plant Cell Rep.* 39, 589–595.

Zhang, N., Zhou, S., Yang, D., and Fan, Z. (2020b). Revealing Shared and Distinct Genes Responding to JA and SA Signaling in *Arabidopsis* by Meta-Analysis. *Front. Plant. Sci.* 11, 512053.

Zhang, W., Chu, Y., Ding, C., Zhang, B., Huang, Q., Hu, Z., et al. (2014). Transcriptome sequencing of transgenic poplar (*Populus × euramericana* 'Guariento') expressing multiple resistance genes. *BMC Genet.* 15, 1–17.

Zhang, X., Dodds, P. N., and Bernoux, M. (2017). What Do We Know About NOD-Like Receptors in Plant Immunity? *Annu. Rev. Phytopathol.* 55, 205–229.

Zhao, H., Yin, C. C., Ma, B., Chen, S. Y., and Zhang, J. S. (2021). Ethylene signaling in rice and *Arabidopsis*: New regulators and mechanisms. *J. Integr. Plant Biol.* 63, 102–125.

Zhao, S., and Fernald, R. D. (2005). Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. *J. Comput. Biol.* 12, 1047–1064.

Zhao, T., Rui, L., Li, J., Nishimura, M. T., Vogel, J. P., Liu, N., et al. (2015). A Truncated NLR Protein, TIR-NBS2, Is Required for Activated Defense Responses in the *exo70B1* Mutant. *PLoS Genet* 11, e1004945.

Zhu, Q. H., Stephen, S., Kazan, K., Jin, G., Fan, L., Taylor, J., et al. (2013). Characterization of the defense transcriptome responsive to *Fusarium oxysporum*-infection in *Arabidopsis* using RNA-seq. *Gene* 512, 259–266.

Zuriegat, Q., Zheng, Y., Liu, H., Wang, Z., and Yun, Y. (2021). Current progress on pathogenicity-related transcription factors in *Fusarium oxysporum*. *Mol. Plant Pathol.* 22, 882–895.

## CAPÍTULO 3

---

---

**Reprogramação transcricional mediada por *AdEXLB8* promove tolerância cruzada a múltiplos estresses em *Arabidopsis thaliana***

## Resumo

As expansinas vegetais são proteínas que afrouxam a estrutura da parede celular, participando de diversos processos de desenvolvimento e da resposta a estresses bióticos e abióticos em plantas. As reações das plantas a esses estresses envolvem mecanismos complexos, que demandam uma comunicação eficiente entre múltiplas vias de sinalização. Partindo da hipótese de que a superexpressão de genes pode reprogramar redes transcricionais, auxiliando no processo de tolerância cruzada, este trabalho analisou dados de transcriptoma de plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* superexpressando o gene *AdEXLB8*, oriundo de *Arachis duranensis*, sob estresse hídrico, infecção por *Meloidogyne incognita* e estresse combinado. Foram identificados 2.088 genes diferencialmente expressos (DEGs) sob seca e 1.289 DEGs no estresse combinado, com enriquecimento em vias osmorreguladoras (ex.: biossíntese de ABA) e supressão de genes ligados ao crescimento celular. A infecção por nematoides modulou 58 DEGs, ativando vias de defesa mediadas por ácido jasmônico (JA) e etileno (ET). Em condições basais, plantas transgênicas exibiram priming molecular, com indução de genes de hipoxia e detoxificação de ROS. Esses resultados demonstram que *AdEXLB8* pode atuar como integrador de respostas a estresses múltiplos, modulando redes hormonais (ABA/JA/ET) e ajustes estruturais da parede celular. Esses achados fornecem bases moleculares para o desenvolvimento de cultivares com tolerância simultânea a seca e nematoides, direcionando estratégias de melhoramento para agricultura em ambientes adversos.

Palavras-chave: AdEXLB8; Expressão gênica; Tolerância a estresse; *Meloidogyne incognita*; RNAseq.

### Abstract

Plant expansins are cell wall-modulating proteins that loosen the cell wall structure and are involved in key developmental processes and responses to biotic and abiotic stresses. Plant stress responses require complex mechanisms involving cross-talk between multiple signaling pathways. This study tested the hypothesis that overexpression of *AdEXLB8*—a gene isolated from the wild peanut *Arachis duranensis*—reprograms transcriptional networks to confer cross-tolerance to combined stresses. We analyzed transcriptomic data from transgenic *Arabidopsis thaliana* overexpressing *AdEXLB8* under drought, *Meloidogyne incognita* infection, and combined stress conditions. Our analysis identified 2,088 differentially expressed genes (DEGs) under drought stress and 1,289 DEGs under combined stress, with enrichment in osmoregulatory pathways (e.g., ABA biosynthesis) and suppression of genes linked to cell wall expansion. Nematode infection modulated 58 DEGs, activating jasmonic acid (JA)- and ethylene (ET)-mediated defense pathways. Under control conditions, transgenic plants exhibited a molecular priming profile, marked by induction of hypoxia-responsive genes and ROS detoxification mechanisms. These findings demonstrate that *AdEXLB8* acts as a hub for integrating multi-stress responses by orchestrating hormonal crosstalk (ABA/JA/ET) and structural cell wall adaptations. This work provides a molecular framework for developing crop varieties with dual tolerance to drought and nematodes, offering strategic insights for breeding programs targeting agriculture in challenging environments.

Keywords: *AdEXLB8*; Gene expression; Stress tolerance; *Meloidogyne incognita*; RNA-Seq; Transcriptional reprogramming; Cross-tolerance.

## INTRODUÇÃO

As plantas cultivadas enfrentam, frequentemente, múltiplas condições ambientais adversas que limitam seu crescimento, desenvolvimento e produtividade. Dentre os principais fatores estressantes, destacam-se os estresses bióticos, como infecções por patógenos, e os estresses abióticos, como seca, salinidade e temperaturas extremas (Gupta & Huang, 2014; Sillmann & Sippel, 2020; Zhu, 2016). Esses estresses não atuam de forma isolada; sua ocorrência combinada é comum no ambiente natural e resulta em respostas fisiológicas e moleculares complexas, que não podem ser previstas a partir da simples soma dos efeitos individuais (Atkinson & Urwin, 2012; Mota et al., 2021; Rasmussen et al., 2013). Em regiões semiáridas, por exemplo, a combinação de seca prolongada e infestações por nematoides reduz drasticamente a produtividade de culturas-chave, como o amendoim (Fourie et al., 2015; Tapia-Vázquez et al., 2022), destacando a urgência de estratégias que englobem vias multirresistentes.

Embora diversos mecanismos regulatórios já tenham sido descritos para estresses isolados, as estratégias moleculares que sustentam a resposta integrada a estresses múltiplos permanecem pouco compreendidas. Tais respostas são altamente específicas e envolvem interações complexas entre fitormônios, espécies reativas de oxigênio (ROS) e fatores de transcrição (Jagodzick et al., 2018; Xia et al., 2015). Nesse contexto, destaca-se a necessidade de investigar proteínas envolvidas na mediação dessa rede integrada, como as expansinas.

As expansinas formam uma superfamília de proteínas vegetais envolvidas na modulação da arquitetura da parede celular, desempenhando papéis centrais no crescimento celular e na adaptação a condições ambientais adversas. Essa família é dividida em quatro subgrupos funcionalmente distintos:  $\alpha$ -expansinas (EXPA),  $\beta$ -expansinas (EXPB), expansinas-like A (EXLA) e expansinas-like B (EXLB) (Sampedro & Cosgrove, 2005), todas com participação comprovada em processos estruturais e de resposta a estresses (Sun et al., 2021).

Dentre essas subfamílias, as EXLB têm ganhado destaque por seu potencial envolvimento na integração de respostas bióticas e abióticas, especialmente sob estresses múltiplos (Brasileiro et al., 2021a). No entanto, os mecanismos moleculares mediados por genes dessa classe permanecem pouco elucidados, particularmente no que se refere à reprogramação transcricional associada à sua superexpressão.



Estudos com genes de outras subfamílias de expansinas reforçam sua relevância na tolerância a estresses. A superexpressão do gene *TaEXPB7-B*, uma  $\beta$ -expansina do trigo, regulada por ácido abscísico (ABA) e fatores de transcrição AREB/ABF, conferiu maior capacidade antioxidante e resistência ao frio em *Arabidopsis thaliana* (Feng et al., 2019). De forma semelhante, o gene *GmEXPA1*, da soja, reduziu a suscetibilidade à infecção por *Meloidogyne incognita* em *A. thaliana* e *Nicotiana tabacum* (Basso et al., 2023b), indicando que diferentes classes de expansinas podem modular respostas fisiológicas e imunes frente a desafios ambientais distintos.

Espécies silvestres de amendoim, como *Arachis duranensis*, têm se mostrado boas fontes de genes relacionados à tolerância a estresses, devido à sua ampla variabilidade genética e capacidade adaptativa (Araujo et al., 2021; Bertoli et al., 2016; da Silva Ferreira et al., 2024; Morgante et al., 2013; Mota, 2019). Nesse contexto, o gene *AdEXLB8*, isolado de *A. duranensis*, foi identificado como um candidato promissor à caracterização funcional em espécies modelo.

Neste trabalho, optou-se pelo uso de *A. thaliana* como organismo modelo devido à sua ampla caracterização genética, ciclo de vida curto, facilidade de transformação genética e disponibilidade de ferramentas bioinformáticas robustas. Além disso, *A. thaliana* permite uma análise detalhada dos efeitos moleculares do transgene em um sistema experimental bem estabelecido, sendo frequentemente utilizada para estudos de validação funcional de genes de outras espécies.

Assim, este capítulo apresenta uma análise transcriptômica de plantas transgênicas de *A. thaliana* superexpressando o gene *AdEXLB8*, submetidas a três condições de estresse: seca, infecção por *M. incognita* e estresse combinado. Os dados analisados foram gerados previamente em experimentos conduzidos por colaboradores da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

O objetivo desta etapa do trabalho foi investigar como a superexpressão de *AdEXLB8* afeta o perfil de expressão gênica em raízes de *A. thaliana* em diferentes cenários de estresse. A partir da identificação de genes diferencialmente expressos, enriquecimento funcional e análise de redes de coexpressão, buscou-se compreender os mecanismos moleculares subjacentes à ação de *AdEXLB8* e seu potencial papel na promoção de tolerância a estresses combinados.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Origem do material biológico utilizado

As plantas utilizadas nesta tese fazem parte de um experimento de caracterização funcional do gene *AdEXLB8*, conduzido no âmbito de um projeto colaborativo com a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN). O gene, isolado da espécie silvestre *A. duranensis*, foi previamente caracterizado quanto à sua sequência codificante e propriedades moleculares.

A construção do vetor de expressão e a transformação de *A. thaliana* (ecótipo Col-0) resultaram em plantas transgênicas da geração T2 superexpressando *AdEXLB8*, entre as quais a linhagem OE-4 foi selecionada para os experimentos posteriores devido a sua ampla expressão gênica e resposta fenotípica compatível com tolerância a múltiplos estresses. A superexpressão do transgene foi confirmada previamente por RT-qPCR (Dados ainda não publicados).

As plantas selvagens (WT) e transgênicas (OE-4) foram submetidas a diferentes condições de estresse em ambiente controlado. Após os tratamentos, as raízes foram coletadas para extração de RNA e construção das bibliotecas para sequenciamento (RNA-Seq). As condições experimentais estão descritas na Tabela 1. Nesta tese, as análises concentraram-se exclusivamente nos dados transcriptômicos gerados a partir dessas amostras. O objetivo foi identificar genes diferencialmente expressos e caracterizar as vias moleculares moduladas pela superexpressão de *AdEXLB8* sob diferentes cenários de estresse. Como os dados experimentais ainda não foram publicados, são aqui descritos de forma resumida, apenas com a finalidade de contextualizar as análises bioinformáticas realizadas.

Tabela 3 Condições experimentais das amostras utilizadas na análise transcriptômica.

Amostra	Genótipo	Condição	Descrição
WT_CTRL	WT (*Col-0*)	Controle	Planta selvagem bem irrigada
OE4_CTRL	OE-4	Controle	<i>AdEXLB8</i> , irrigada
OE4_DROUGHT	OE-4	Seca controlada	Suspensão gradual da irrigação
OE4_NEMA	OE-4	Infecção por nematoides	Inoculação com <i>Meloidogyne incognita</i>
OE4_CROSS	OE-4	Estresse combinado (seca + nematoide)	Seca por 7 dias seguida de inoculação com J2

\*Nota: Cada condição experimental incluiu 3 réplicas biológicas, compostas por raízes de 9 indivíduos por grupo. \*

### Filtragem, mapeamento e análise da qualidade e da expressão gênica

As análises transcriptômicas foram realizadas utilizando como genoma de referência o conjunto anotado de *A. thaliana* (TAIR10). Os dados de sequenciamento em formato FASTQ foram processados em um fluxo que integrou as ferramentas FASTp (S. Chen et al., 2018) para controle de qualidade e remoção de adaptadores, STAR (Dobin & Gingeras, 2016) para alinhamento ao genoma de referência, e HTSeq (Anders et al., 2015) para quantificação da expressão gênica. Todo processamento dos dados foi realizado em ambiente Linux, utilizando servidor da Embrapa Recursos Genéticos, com sistema operacional Ubuntu 20.04, 128 GB de RAM e 32 núcleos.

A análise de expressão gênica diferencial foi conduzida com o pacote edgeR (Robinson et al., 2010), utilizando normalização pelo método TMM e o teste estatístico quasi-likelihood F-test. Foram considerados como diferencialmente expressos os genes com  $\log_2FC \geq |1|$  e  $FDR < 0,01$ , conforme o procedimento de correção de múltiplos testes de Benjamini-Hochberg (Haynes, 2013).

As comparações incluíram os seguintes contrastes experimentais:

- OE4\_CTRL vs. WT\_CTRL (efeito do transgene sob condição basal),
- OE4\_DROUGHT vs. OE4\_CTRL (resposta à seca),
- OE4\_NEMA vs. OE4\_CTRL (resposta ao nematoide),
- OE4\_CROSS vs. OE4\_CTRL (resposta ao estresse combinado).

As listas de DEGs foram geradas para cada comparação, resultando em conjuntos variando de 58 a 2088 genes por condição. A sobreposição entre conjuntos de genes diferencialmente expressos (DEGs) foi visualizada por meio de diagramas de Venn e gráficos do tipo UpSet, gerados com a ferramenta Intervene (Khan & Mathelier (2017); <https://asntech.shinyapps.io/intervene/>). As listas completas de genes diferencialmente expressos, termos enriquecidos e redes PPI estão disponíveis como material suplementar juntamente com os scripts utilizados.

### **Análise de ontologia gênica e vias metabólicas**

A anotação funcional dos genes diferencialmente expressos (DEGs) foi realizada com o objetivo de identificar os processos biológicos, componentes celulares, funções moleculares e vias metabólicas associados às respostas a diferentes condições de estresse. Para isso, foi utilizada a ferramenta ShinyGO (<https://bioinformatics.sdstate.edu/go/> (S. X. Ge et al., 2020)).

Foram realizadas análises de enriquecimento funcional para cada conjunto de DEGs identificado nos contrastes experimentais, utilizando como referência os genes anotados do genoma de *A. thaliana*. As categorias analisadas incluíram: GO Biological Processes, GO Cellular Components, GO Molecular Functions, e KEGG Pathways (Kanehisa et al., 2016). Foram considerados termos com p-valor < 0,05, um mínimo de 3 genes associados e fator de enriquecimento > 1,5. Os termos enriquecidos foram posteriormente agrupados com base em similaridade funcional.

A visualização gráfica dos resultados foi realizada com a ferramenta SRPlot (<https://www.bioinformatics.com.cn/> (Tang et al., 2023)). As vias metabólicas associadas aos DEGs também foram analisadas no software MapMan (versão 3.5.1.R2; Thimm et al. (2004)), permitindo a representação das principais rotas fisiológicas e metabólicas moduladas nas diferentes condições. A visualização final das vias foi organizada utilizando o editor gráfico BioRender (<https://biorender.com/>).

As redes de interação proteína-proteína (PPI) foram construídas com base nos genes diferencialmente expressos (DEGs) identificados nas comparações experimentais. As análises foram conduzidas utilizando a base de dados STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins), versão 12.0, com o modelo de organismo *A. thaliana* e pontuação mínima de interação definida como medium confidence (score  $\geq 0.4$ ). As listas de genes regulados positivamente e negativamente foram analisadas separadamente para cada condição

experimental (seca, infecção por nematoide e estresse combinado), além do conjunto de genes regulados em comum.

As redes geradas foram avaliadas quanto à densidade de conexões, número de interações esperadas vs. observadas (PPI enrichment p-value), conectividade média e coeficiente de agrupamento. A identificação de módulos funcionais foi realizada utilizando o método de agrupamento K-means, com posterior categorização funcional baseada em enriquecimento GO e KEGG. Os dados foram visualizados por meio de diagramas de rede exportados do STRING (versão 12.0; (Szkarczyk et al., 2023)), organizados por clusters funcionais de proteínas.

Além disso, foi utilizada a plataforma iTAK (<http://itak.feilab.net/cgi-bin/itak/index.cgi>; Zheng et al. (2016)) para identificação de fatores de transcrição (TFs) e reguladores transcricionais (TRs) presentes entre os DEGs, empregando os parâmetros padrão da ferramenta.

## RESULTADOS

### Estatística do sequenciamento

Com o objetivo de investigar os mecanismos moleculares associados à resistência conferida pela superexpressão do gene *AdEXLB8* em *A. thaliana*, foi conduzida uma análise comparativa de transcriptoma por RNA-Seq. A linhagem transgênica OE-4 foi avaliada sob diferentes condições de estresse: abiótico (seca), biótico (*M. incognita*) e estresse combinado, além de plantas controle (WT e OE-4 irrigadas).

Foram construídas 15 bibliotecas de cDNA, com três réplicas biológicas para cada condição experimental. No total, o sequenciamento gerou aproximadamente 157 milhões de leituras de alta qualidade ( $Q > 30$ ). Em média, 95% das leituras foram mapeadas ao genoma de referência de *A. thaliana* (TAIR10), com aproximadamente 85% das leituras alinhadas de forma exclusiva, garantindo elevada confiança para as análises subsequentes de expressão gênica. A Tabela 2 apresenta as métricas de sequenciamento, incluindo o número total de leituras por amostra, o total de reads mapeados e o percentual de mapeamento por condição.

Tabela 2. Estatísticas do sequenciamento de RNA de raízes de *Arabidopsis thaliana* (WT e OE-4), sob diferentes condições de estresse.

Condição	Amostra	Leituras Totais	Leituras Mapeadas	% Mapeamento
WT	#1	26,476,789	25,636,371	96,83%
	#2	27,193,660	26,386,899	97,04%
	#3	31,296,481	30,280,892	96,96%
	Média	28,322,310	27,450,721	96,92%
OE4	#1	27,499,798	25,457,765	92,57%
	#2	22,135,772	20,963,456	94,70%
	#3	22,617,892	21,549,001	95,27%
	Média	24,084,487	22,656,741	94,18%
OE4_NEMA	#1	12,495,300	11,543,522	92,38%
	#2	10,894,085	10,291,109	94,47%
	#3	11,147,432	10,531,939	94,48%
	Média	11,512,272	10,788,857	93,78%
OE4_DROUGHT	#1	11,809,910	11,299,577	95,68%
	#2	12,645,767	11,790,280	93,23%
	#3	11,747,035	10,840,024	92,28%
	Média	12,067,571	11,309,960	93,73%
OE4_CROSS	#1	10,590,014	9,763,308	92,19%
	#2	10,470,754	9,628,935	91,92%
	#3	12,487,051	10,903,124	90,50%
	Média	11,182,606	10,231,122	91,53%

Observou-se que as bibliotecas derivadas de plantas transgênicas submetidas a estresses apresentaram, de forma geral, menor número de *reads* em comparação às bibliotecas controle. Essa redução pode estar relacionada a fatores biológicos, como a integridade do RNA sob estresse, ou técnicos, como variações na eficiência de construção das bibliotecas. Para garantir a comparabilidade entre as amostras, os dados foram normalizados por Counts Per Million (CPM) utilizando o pacote edgeR.

### Efeitos basais da superexpressão de AdEXLB8 no transcriptoma de *A. thaliana*

Para investigar os efeitos da superexpressão do gene *AdEXLB8* em *A. thaliana* sob condições não estressantes, foi realizada uma análise de expressão gênica diferencial entre a linhagem transgênica OE-4 e plantas selvagens (WT), utilizando o pacote edgeR. Foram

aplicados critérios de corte mais rigorosos ( $FDR < 0,01$  e  $|\log_2FC| > 2$ ), resultando na identificação de 485 genes diferencialmente expressos (DEGs).

Dentre esses, 465 genes (95,8%) foram regulados positivamente, com  $\log_2FC$  variando entre +2 e +3,6 — o que corresponde a aumentos de expressão entre 4 e aproximadamente 12 vezes na escala linear. Apenas 20 genes apresentaram regulação negativa (Figura 5-A).

Os DEGs induzidos pela superexpressão de *AdEXLB8* incluíram um conjunto robusto de genes associados à resposta ao estresse, como fatores de transcrição da família WRKY (*WRKY46*, *WRKY33*, *WRKY40*, *WRKY18*, *WRKY62*) (Warmerdam et al., 2020) e componentes reguladores das vias hormonais de etileno, ácido jasmônico e ácido salicílico, incluindo *JAZ*, *NPR3* e *ERF2*. Genes envolvidos na detoxificação de espécies reativas de oxigênio (ROS), como *APX2*, também foram fortemente induzidos.

A análise de enriquecimento funcional por ontologia gênica (GO) revelou que esses genes estavam significativamente associados a processos de defesa e sinalização por ROS. Termos como "ativação de mecanismos antioxidantes", "resposta a espécies reativas de oxigênio", e "regulação da homeostase redox" destacaram-se nas análises (Ali et al., 2018). Esses mecanismos são amplamente reconhecidos por sua atuação como sinalizadores secundários em respostas a estresses múltiplos e pela capacidade de induzir efeito priming e memória de estresse (Brasileiro et al., 2021; Mauch-Mani et al., 2017).

Na análise por vias metabólicas KEGG, foi observado enriquecimento em categorias relacionadas à biossíntese de ácido jasmônico, sinalização mediada por ácido salicílico, interação planta-patógeno e resposta imunológica inata, sugerindo o envolvimento de *AdEXLB8* na indução de resistência adquirida sistêmica (SAR) e integração hormonal multivias (Figura 5-C). O metabolismo de compostos secundários — como fenilpropanoides, flavonoides e ácidos monocarboxílicos — também foi induzido, indicando a ativação de mecanismos antimicrobianos e antioxidantes.

A análise funcional no MapMan complementou esses achados, revelando a ativação de vias ligadas ao metabolismo secundário, regulação hormonal e defesa. Destacaram-se genes envolvidos na síntese de ácido jasmônico (*LOX3*, *AOS*, *AOC*, *OPR*), na sinalização por cálcio e MAPKs, e em outras rotas associadas à percepção e resposta ao estresse (Figura 5-B).

Por fim, a superexpressão de *AdEXLB8* modulou um conjunto expressivo de fatores de transcrição (TFs) e reguladores transcricionais (TRs). A identificação realizada com a ferramenta iTAK apontou forte indução de famílias como AP2/ERF, WRKY, MYB, NAC e bHLH, com destaque para os genes do grupo ERF, que compuseram a família mais

representada entre os DEGs positivamente regulados (Figura 5-D). Apesar de em menor número, também foram identificados TFs negativamente modulados, principalmente das famílias MYB, NAC e bHLH.

Esses resultados indicam que a presença constitutiva do transgene *AdEXLB8* gera um estado transcricional de ativação basal de defesas, mesmo na ausência de estresse, preparando a planta para uma resposta mais rápida e eficiente frente a desafios ambientais subsequentes.



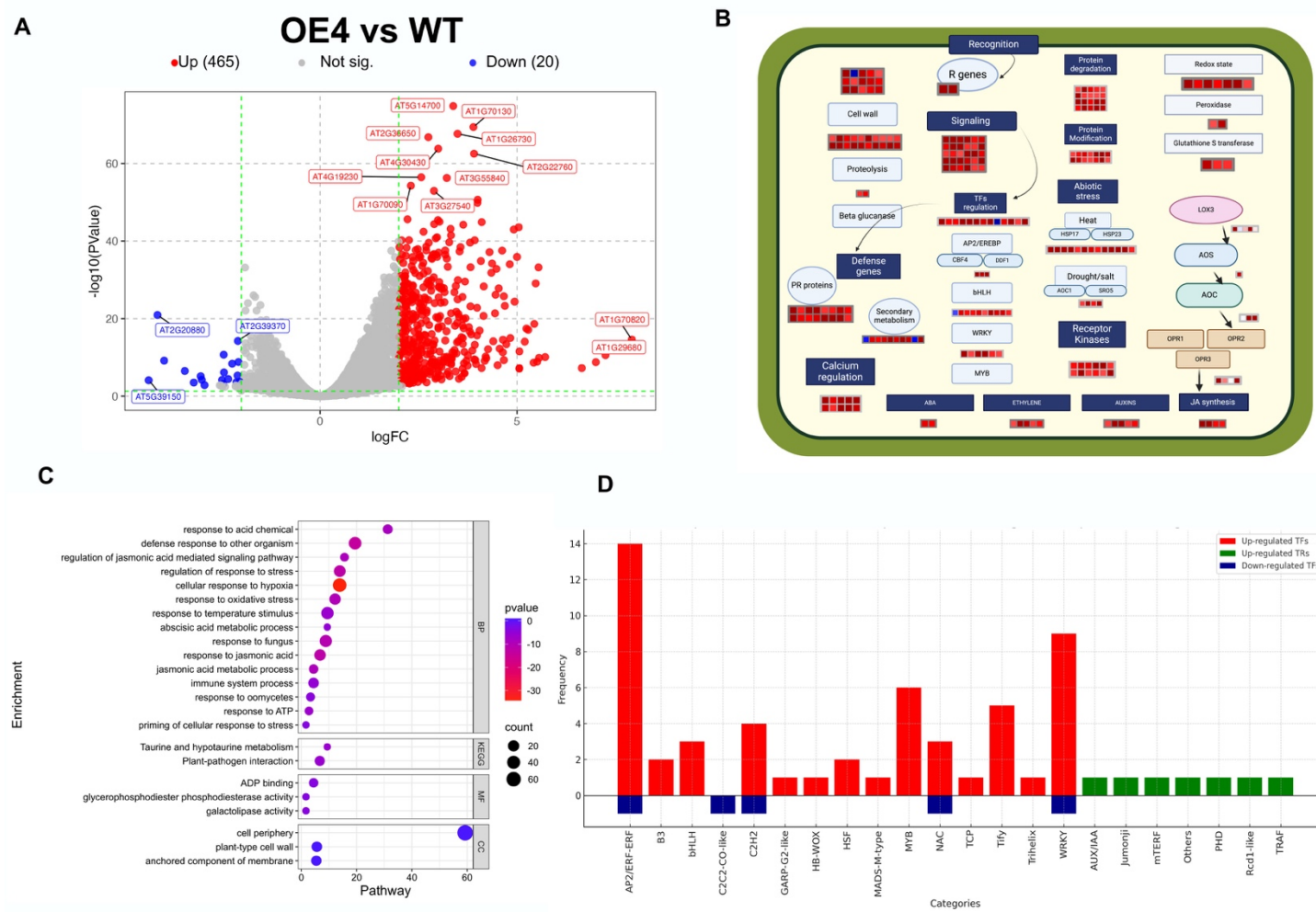


FIGURA 5. Análise de Gene Ontology (GO) e vias de Mapman dos genes expressos diferencialmente em OE4. A- Análise de enriquecimento de vias e processos para os termos: GO Biological Processes, GO Cellular Components, GO Molecular Functions, KEGG Pathway. B- - Análise de enriquecimento de vias e processos para as vias em Mapman.

### Perfil de expressão de OE4 superexpressando AdEXLB sob estresses isolados e combinados.

A linhagem transgênica OE-4 foi avaliada em quatro condições experimentais: ausência de estresse (controle comparado ao genótipo selvagem), estresse abiótico (seca), estresse biótico (infecção por *M. incognita*) e estresse combinado (seca + nematoide). A sobreposição entre os conjuntos de DEGs foi visualizada por meio de gráficos UpSet (Figura 6), e as listas completas de genes regulados positiva e negativamente encontram-se na Tabela Suplementar.

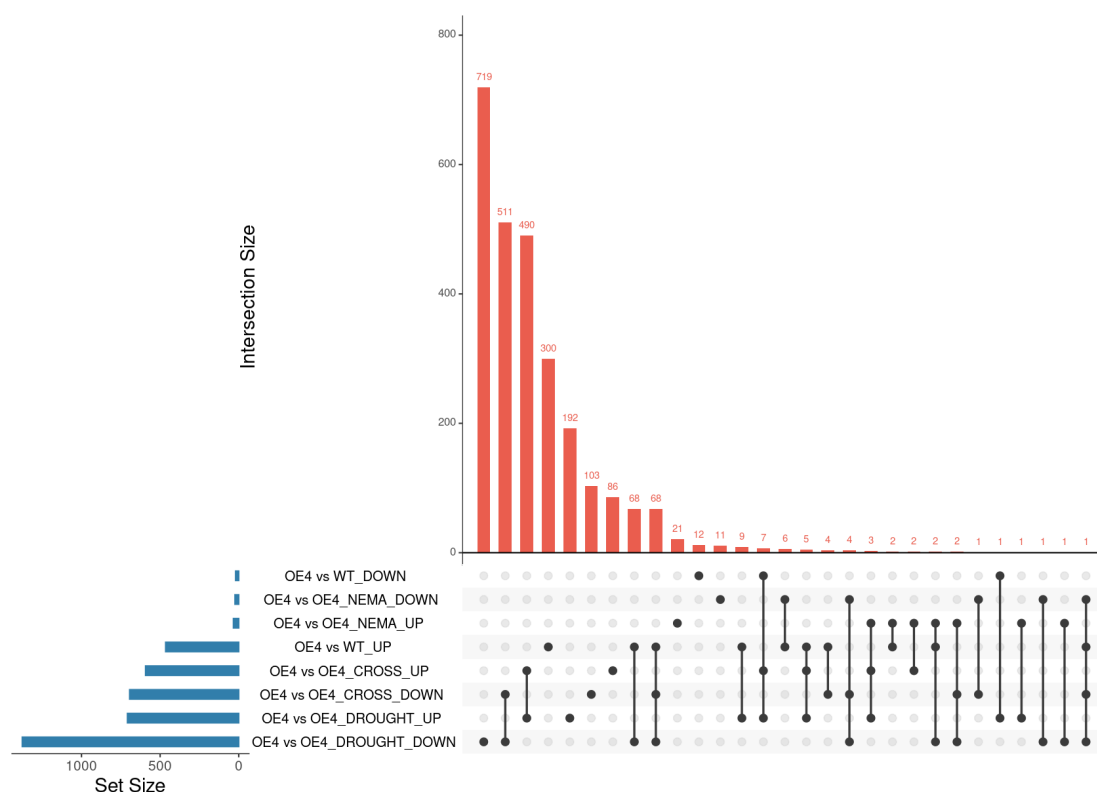


FIGURA 6. Análise de sobreposição de genes diferencialmente expressos na linhagem transgênica OE4 de *Arabidopsis thaliana*, superexpressando *AdEXLB8*, sob diferentes condições de estresse. O gráfico UpSet apresenta os genes regulados positivamente (UP) e negativamente (DOWN) na linhagem OE4 em comparação ao tipo selvagem (WT) em condições sem estresse (OE4 vs. WT) e sob tratamentos de estresse biótico com o nematoide *Meloidogyne incognita* (OE4\_NEMA), estresse abiótico por seca (OE4\_DROUGHT) e estresse combinado (OE4\_CROSS). As barras verticais no topo indicam o número de genes compartilhados entre diferentes condições, enquanto as conexões na matriz inferior representam as interseções específicas. As barras horizontais à esquerda indicam o número total de genes regulados em cada condição individualmente.

A análise revelou perfis de regulação gênica distintos para cada tipo de estresse. A infecção por nematoides resultou na modulação de 58 genes, dos quais 34 foram regulados positivamente e 24 negativamente. Entre os genes reprimidos, 24 foram exclusivos do estresse

biótico, enquanto outros 6 apresentaram regulação compartilhada com as condições de seca e estresse combinado.

O estresse hídrico desencadeou a resposta transcricional mais robusta, com um total de 2.088 genes diferencialmente expressos, dos quais 708 foram induzidos e 1.377 reprimidos. Dentre esses, 193 genes upregulated e 790 downregulated foram exclusivos dessa condição, refletindo uma resposta molecular intensamente específica à escassez hídrica.

Na condição de estresse combinado, foram identificados 1.289 DEGs, sendo 593 regulados positivamente e 694 negativamente. A maior parte desses genes (497 upregulated e 581 downregulated) também foi modulada sob seca, sugerindo que a resposta ao estresse hídrico predomina no contexto combinado. No entanto, conjuntos exclusivos de genes regulados apenas no cross-stress foram observados, indicando que essa condição ativa vias regulatórias específicas, não presentes sob os estresses isolados.

Um padrão de regulação cruzada também foi identificado entre as condições de controle e estresse. Ao todo, 68 genes que estavam induzidos em OE-4 sob condição basal (sem estresse) foram reprimidos tanto sob seca quanto no estresse combinado (*OE4\_UP vs drought\_DOWN*; *OE4\_UP vs cross\_DOWN*). Esse padrão sugere que a superexpressão de *AdEXLB8* promove um estado de priming molecular em condição não estressante, mas que, diante de estresses mais severos, ocorre uma supressão estratégica desses genes, possivelmente para priorizar vias adaptativas mais específicas.

### **Análise de enriquecimento de termos GO em *A. thaliana* superexpressando *AdEXLB8* sob estresses isolados e combinados**

A análise de enriquecimento de Gene Ontology (GO) foi conduzida para os genes diferencialmente expressos (DEGs) identificados nas condições de estresse hídrico (*OE4\_Drought*), estresse biótico (*OE4\_NEMA*) e estresse combinado (*OE4\_CROSS*). As categorias analisadas incluíram Processos Biológicos (BP), Funções Moleculares (MF) e Componentes Celulares (CC), com o objetivo de caracterizar os principais mecanismos regulatórios envolvidos em cada contexto. Os resultados revelaram padrões funcionais distintos, refletindo respostas adaptativas específicas das plantas transgênicas a diferentes tipos de estresse (Figura 7).

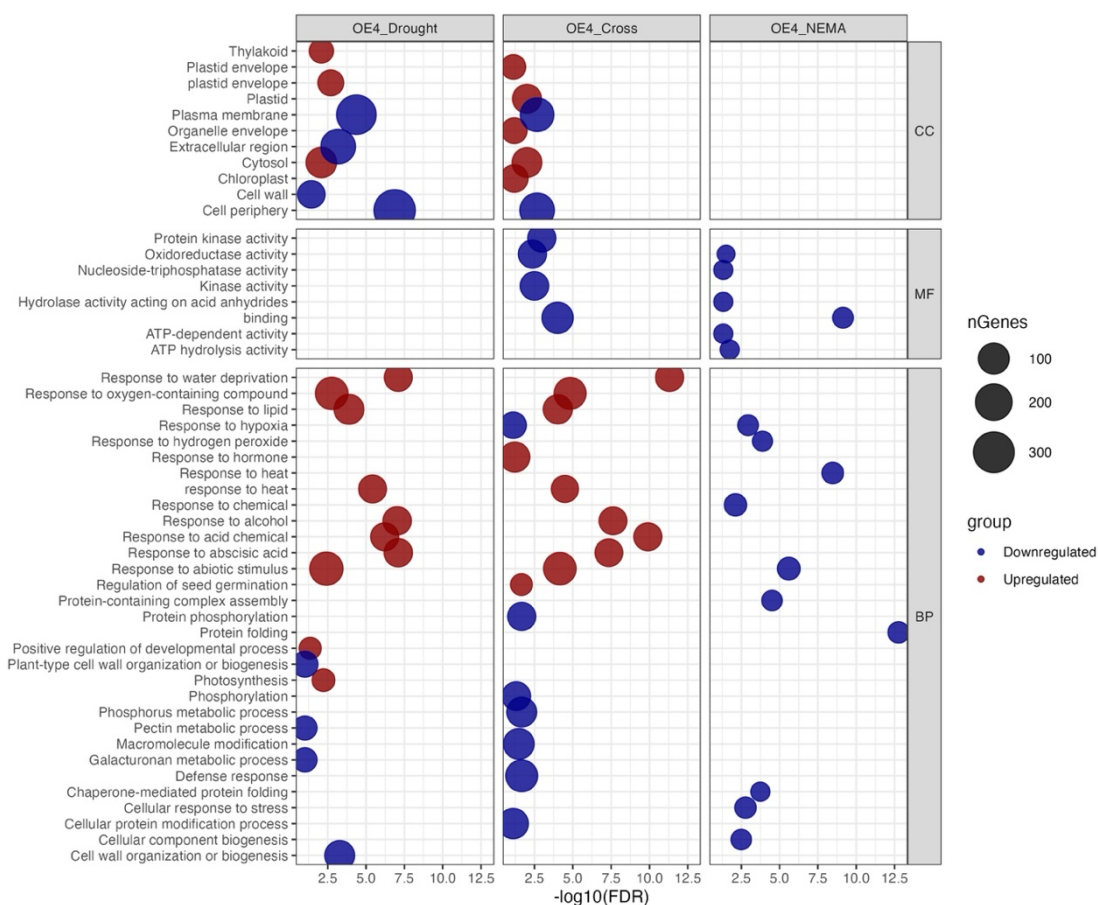


FIGURA 7. Gráfico de bolhas representando termos de Ontologia Genética (GO) significativamente enriquecidos nos genes diferencialmente expressos (DEGs) em três condições experimentais: OE4\_Drought, OE4\_Cross e OE4\_NEMA. Os termos GO estão divididos em três categorias principais: Componentes Celulares (CC), Funções Moleculares (MF) e Processos Biológicos (BP). O tamanho das bolhas reflete o número de genes associados a cada termo (nGenes), enquanto a cor das bolhas indica a regulação dos genes, sendo vermelho para genes com regulação positiva (upregulated) e azul para genes com regulação negativa (downregulated). O eixo X apresenta o logaritmo negativo do FDR ajustado ( $-\log_{10}(\text{FDR})$ ), que representa a significância do enriquecimento.

Sob déficit hídrico, os genes induzidos apresentaram enriquecimento em processos como “resposta à privação de água”, “resposta ao ácido abscísico (ABA)” e “resposta ao peróxido de hidrogênio”, evidenciando a ativação coordenada de vias hormonais e antioxidantes (Rai et al. 2024; Brasileiro et al., 2021). A atuação do ABA na regulação estomática e no ajuste osmótico reforça sua relevância na adaptação ao estresse hídrico (X. Yang et al., 2021). Em termos funcionais, destacaram-se categorias associadas à atividade de ATPases e hidrolases, sugerindo alta demanda energética para manutenção da homeostase celular.

Os genes reprimidos estavam fortemente associados à “organização da parede celular” e ao “metabolismo de galacturonanos”, o que indica uma supressão de rotas ligadas ao crescimento e expansão celular, priorizando ajustes estruturais compatíveis com condições de

restrição hídrica (Lawlor & Tezara, 2009). Além disso, os genes induzidos localizaram-se preferencialmente em compartimentos fotossintéticos como cloroplastos e tialacoides, reforçando o papel do reequilíbrio metabólico no suporte à fotossíntese sob estresse (Z. Wang et al., 2024).

Na condição de estresse combinado, os DEGs induzidos foram enriquecidos em categorias relacionadas a “resposta ao calor”, “resposta a compostos químicos” e “resposta ao estresse oxidativo”, indicando a ativação de mecanismos celulares de proteção e homeostase. Destaca-se a indução de proteínas chaperonas envolvidas no dobramento proteico e controle de danos, comumente associadas à adaptação em ambientes multifatoriais (Mittler, 2006; Brasileiro et al., 2021).

Por outro lado, os genes reprimidos incluíram termos como “biogênese de componentes celulares” e “organização da parede celular”, sugerindo uma priorização das defesas celulares sobre processos anabólicos. Em termos funcionais, a regulação negativa de quinases e oxidoredutases destaca o envolvimento da sinalização intracelular e do metabolismo redox na resposta adaptativa ao estresse composto (Zandalinas et al., 2021).

No contexto de infecção por *M. incognita*, os genes reprimidos foram principalmente associados à “organização da parede celular” e ao “metabolismo de galacturonanos”, indicando que o crescimento e a integridade estrutural são sacrificados em prol de mecanismos de defesa. Embora o número de genes induzidos tenha sido mais restrito, observou-se modulação de genes envolvidos em sinalização hormonal e respostas imunes locais, incluindo fatores de transcrição das famílias bHLH e NAC, reconhecidas por seu papel em defesas localizadas e modulação hormonal (Brasileiro et al., 2021; Jones et al., 2013).

A modulação da parede celular, associada à ativação coordenada de vias hormonais como JA, SA e ET, é fundamental para restringir a penetração e o avanço de patógenos endoparasitas como os nematoides (Warmerdam et al., 2020).

### **Análise de enriquecimento de vias KEGG em *A. thaliana* superexpressando *AdEXLB8* sob estresses isolados e combinados**

A análise de enriquecimento de vias metabólicas KEGG permitiu identificar os ajustes bioquímicos e fisiológicos promovidos pela superexpressão de *AdEXLB8* em resposta a diferentes tipos de estresse. De forma geral, os dados revelaram que as plantas transgênicas

priorizam vias de defesa e adaptação, muitas vezes em detrimento de processos metabólicos primários (Figura 8).

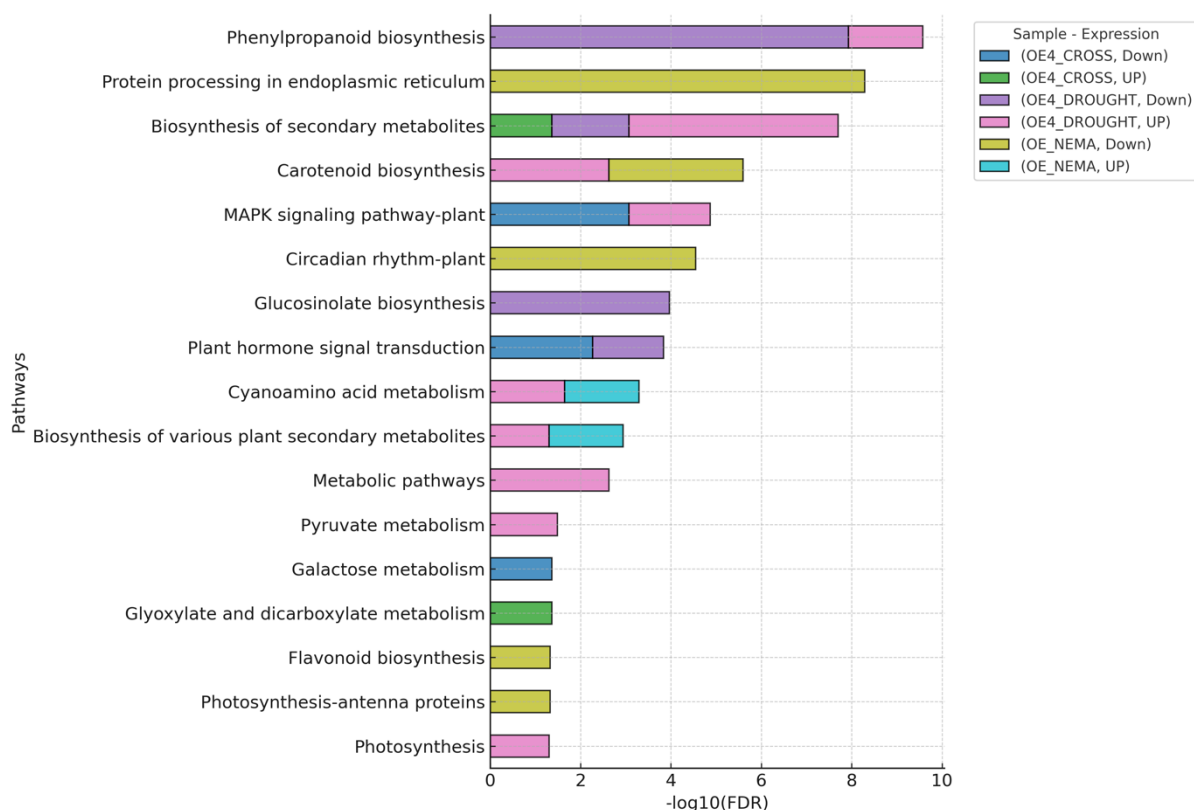


FIGURA 8. Análise de enriquecimento de vias metabólicas KEGG sob diferentes condições de estresse em plantas transgênicas superexpressando AdEXLB8. O gráfico apresenta as vias enriquecidas para genes diferencialmente expressos (DEGs) regulados positivamente (UP) e negativamente (DOWN) nas condições de estresse hídrico (OE4\_DROUGHT), estresse combinado (OE4\_CROSS) e estresse biótico por nematoides (OE4\_NEMA).

Sob déficit hídrico, os genes induzidos enriqueceram vias fundamentais para a adaptação ao estresse, como “biossíntese de carotenoides” e “fotossíntese”. Essas rotas estão diretamente ligadas à proteção antioxidante e à manutenção da produção de energia, mesmo em condições adversas (Uarrota et al., 2018). A ativação da “sinalização MAPK” reforça a rápida transdução de sinais ambientais e preparação celular para defesa (K. Kumar et al., 2020b).

Outras vias ativamente induzidas incluem o “metabolismo de piruvato”, importante para o fornecimento de intermediários energéticos, e o “metabolismo de aminoácidos cianogênicos”, potencialmente associado à síntese de compostos de defesa. A rota da “biossíntese de fenóis por fenilpropanóides” foi também enriquecida, sugerindo aumento na produção de flavonoides com propriedades antioxidantes e antimicrobianas (Y. J. Park et al., 2023).

Entre os genes reprimidos, observou-se enriquecimento em vias como “biossíntese de glucosinolatos”, “fenilpropanóides” e “transdução de sinal hormonal”, incluindo rotas mediadas por ABA. Essa supressão pode indicar um redirecionamento de recursos celulares — reduzindo a defesa contra herbivoria, por exemplo — para focar em estratégias mais específicas ao estresse hídrico (Van Der Most et al., 2011). Além disso, esse ajuste pode refletir um balanceamento entre vias hormonais e sinais oxidativos independentes, como ROS (Choudhury et al., 2017).

O perfil transcriptômico sob estresse combinado apresentou forte sobreposição com o observado sob seca isolada, especialmente no que diz respeito ao metabolismo energético e à biossíntese de compostos secundários, sugerindo que a resposta ao déficit hídrico predomina nesta condição multifatorial. O enriquecimento da via do “metabolismo de glicoxilato e dicarboxilatos” aponta para mecanismos de reciclagem de carbono e adaptação metabólica.

Por outro lado, os genes reprimidos enriqueceram vias relacionadas à “sinalização celular”, incluindo “sinalização MAPK”, e ao “metabolismo de carboidratos”, sugerindo uma desaceleração da atividade metabólica não essencial. A repressão de rotas hormonais, como a de ABA, também foi observada, apontando para ajustes finos de sinalização frente ao estresse cruzado.

Em resposta à infecção por *M. incognita*, os genes induzidos enriqueceram vias associadas à “biossíntese de metabólitos secundários” e ao “metabolismo de aminoácidos”, incluindo a rota dos aminoácidos cianogênicos, comumente ligados à defesa contra herbivoria e patógenos (Jones et al., 2013). A ativação de fenóis e ligninas pode reforçar a parede celular, criando uma barreira física à penetração do nematoide (Warmerdam et al., 2020).

Em contraste, os genes reprimidos estavam concentrados em vias como “fotossíntese”, “biossíntese de carotenoides”, “biossíntese de flavonoides” e “ritmo circadiano”, sugerindo um redirecionamento do metabolismo para defesa localizada. A supressão da atividade fotossintética em tecidos infectados pode representar uma estratégia para evitar a disseminação do patógeno e conservar recursos energéticos.

### **Análise de Interações Proteína-Proteína (PPI)**

As redes de interação proteína-proteína (PPI) foram construídas a partir dos genes diferencialmente expressos (DEGs) sob estresses hídrico, biótico e combinado, com o objetivo de identificar módulos funcionais e processos biológicos integrados modulados pela superexpressão de *AdEXLB8*. As interações foram inferidas a partir do banco STRING e

analisadas quanto à conectividade, agrupamentos funcionais e enriquecimento estatístico (Figura 9).

A rede PPI de genes induzidos sob seca foi composta por 209 proteínas conectadas por 225 interações significativas (PPI enrichment  $p < 1.0e-16$ ), com conectividade média de 2,15 interações por proteína e coeficiente de agrupamento local de 0,236. Os módulos funcionais identificados incluíram processos fotossintéticos (subunidades dos fotossistemas I e II), biossíntese de carotenoides, catabolismo de clorofila e sinalização hormonal, especialmente por MAPKs, citocininas e o complexo de transcrição NF-Y. A presença de genes como *RD29A* e *DREB2A* destaca a integração entre regulação hormonal e estresse osmótico/desidratativo.

Sob condições de estresse combinado, nesta condição, os DEGs formaram oito módulos principais, indicando uma resposta integrativa altamente compartimentalizada. Dentre os destaques estão proteínas associadas ao estresse oxidativo (glutaredoxinas, peroxidases), fatores da família NAC relacionados à sinalização retrógrada mitocondrial, proteínas envolvidas na remodelação da parede celular, metabolismo glicolítico, regulação energética e metabolismo de cobre.

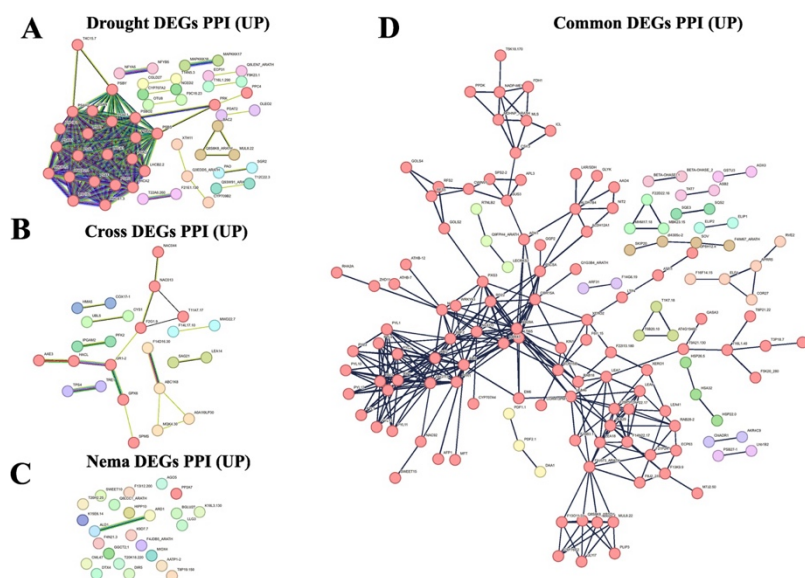


FIGURA 9. Redes de interação proteína-proteína (PPI) dos genes diferencialmente expressos (DEGs) sob diferentes condições de estresse em *Arabidopsis thaliana*. As redes foram geradas utilizando o banco de dados STRING para os genes regulados positivamente. (A) Rede PPI para DEGs exclusivos de estresse hídrico (Droughtg) (B) Rede PPI para DEGs exclusivos de estresse combinado (Cross-stress), (C) Rede PPI para DEGs exclusivos de estresse biótico (Nema). (D) Rede PPI dos genes regulados em comum entre as condições avaliadas (Common DEGs), com clusters altamente conectados indicando proteínas com funções centrais, como regulação metabólica e sinalização. As cores representam diferentes clusters identificados pelo método K-means (Dados de cada cluster estão disponíveis na tabela suplementar).



Em contraste, a rede PPI de genes induzidos sob infecção por *M. incognita* apresentou baixa densidade de conexões, com apenas 24 proteínas e uma interação identificada (PPI enrichment  $p = 0,175$ ). Dois módulos foram destacados: um centrado no gene *ARD1* (possivelmente associado à regulação epigenética), e outro no gene *ALD1*, envolvido na produção de sinais sistêmicos para ativação da imunidade adquirida (SAR), como proposto por Jiang et al. (2021) (Figura 10-C).

Os DEGs compartilhados entre todas as condições de estresse formaram uma rede robusta com 502 proteínas e 297 interações (PPI enrichment  $p < 1.0\text{e-}16$ ). Um dos principais módulos englobava genes associados à resposta ao ABA e adaptação ao estresse hídrico, incluindo *ABI5*, *NCED3* e *RD29A*. Outros clusters estavam ligados à regulação circadiana, termotolerância e biossíntese de carotenoides.

Para os DEGs regulados negativamente, a rede continha 605 proteínas e 358 interações, com organização funcional moderada (grau médio = 1,18). Os módulos incluíram genes relacionados à sinalização de cálcio, resposta a ROS, biossíntese de glucosinolatos e remodelação da parede celular, sugerindo supressão coordenada de vias de crescimento e defesa secundária em favor de estratégias mais imediatas de sobrevivência.

Diferentemente da rede positiva, os genes reprimidos por *M. incognita* formaram uma rede densa com 22 proteínas e 116 interações (PPI enrichment  $p < 1.0\text{e-}16$ ). Os principais módulos estavam relacionados à resposta ao estresse proteotóxico, incluindo *HSCA2* e chaperonas *HSPs*, além de genes associados ao ritmo circadiano e ao estresse do retículo endoplasmático — uma via comumente ativada durante infecções e sobrecarga metabólica.

Por fim, os genes reprimidos sob seca formaram uma rede altamente conectada com 810 proteínas e 739 interações (PPI enrichment  $p < 1.0\text{e-}16$ ). Os módulos funcionais abrangeram a formação de arabinogalactanas, remodelação da parede celular, resposta a ROS e a ação de TFs da família DREB. Menores agrupamentos foram observados para a biossíntese hormonal e metabolismo de glucosinolatos.

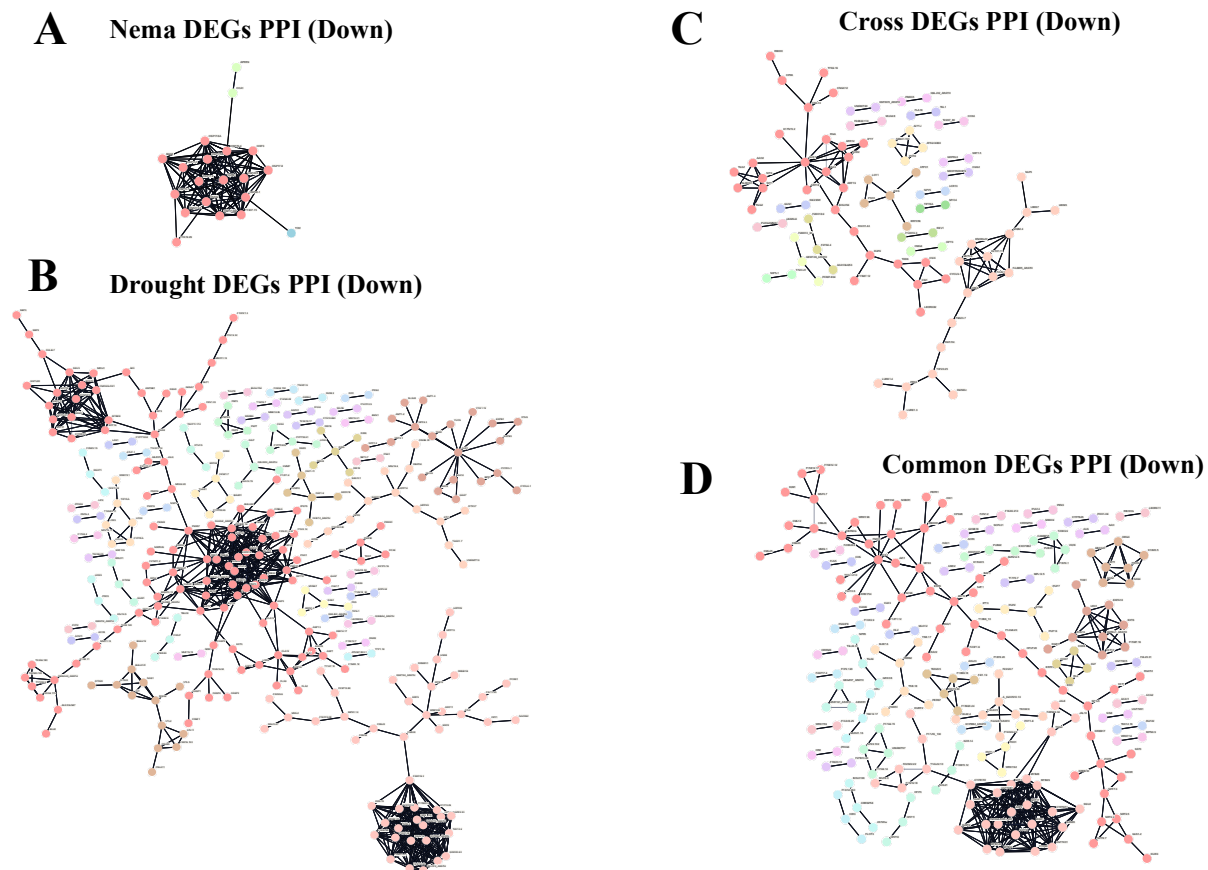


FIGURA 10. Redes de interação proteína-proteína (PPI) dos genes diferencialmente expressos (DEGs) regulados negativamente em diferentes condições experimentais. (A) Rede PPI dos DEGs regulados negativamente em resposta ao nematoide (Nema DEGs). (B) Rede PPI dos DEGs regulados negativamente em resposta à seca (Drought DEGs). (C) Rede PPI dos DEGs regulados negativamente na condição combinada de nematoide e seca (Cross DEGs). (D) Rede PPI dos DEGs regulados negativamente compartilhados entre as condições de nematoide e seca (Common DEGs). Cada nó representa uma proteína codificada pelos DEGs, enquanto as arestas representam interações conhecidas entre essas proteínas. As cores dos nós indicam clusters funcionais, destacando processos biológicos específicos associados à regulação negativa em cada condição. Redes maiores e mais conectadas indicam maior número de interações funcionais relevantes

### Análise de predição de fatores de transcrição

A predição de fatores de transcrição (TFs) foi realizada com base nas listas de genes diferencialmente expressos (DEGs) obtidas em cada condição experimental. As famílias de TFs foram agrupadas por frequência e distribuição nas bibliotecas transcriptômicas,

permitindo a identificação de padrões específicos de resposta aos diferentes tipos de estresse (Figura 11).

Sob estresse biótico, os TFs regulados negativamente foram majoritariamente das famílias HSF e MYB-related, incluindo *HSFA2* e *CCA1*, associados à resposta ao estresse proteotóxico e regulação circadiana. Por outro lado, entre os genes induzidos, destacaram-se membros das famílias bHLH e NAC, como *NAC19*, implicados na sinalização hormonal e defesa localizada.

A condição de estresse hídrico revelou maior diversidade de TFs. Entre os genes reprimidos, 78 TFs foram identificados, com prevalência das famílias RAV, WRKY e ERF, incluindo *WRKY61*, *ERF13* e *RAV1*, que participam da integração entre estresse oxidativo e regulação hormonal. Entre os genes induzidos, 43 TFs foram anotados, principalmente das famílias WRKY, ERF e HD-ZIP, com destaque para *WRKY28*, *ERF11* e *HB12*, que regulam processos adaptativos como fechamento estomático e expressão de genes de defesa mediados por ABA e ROS.

Em estresse combinado (seca + nematoide), os perfis de TFs regulados foram similares aos observados sob seca, refletindo a dominância do componente abiótico. Foram identificados 38 TFs reprimidos e 39 induzidos, com destaque recorrente para as famílias

NAC, WRKY e ERF. Entre os mais representativos estavam *NAC60*, *WRKY32*, *ERF1* e *AP2-6*, sugerindo a ativação coordenada de vias de resposta a múltiplos estresses.

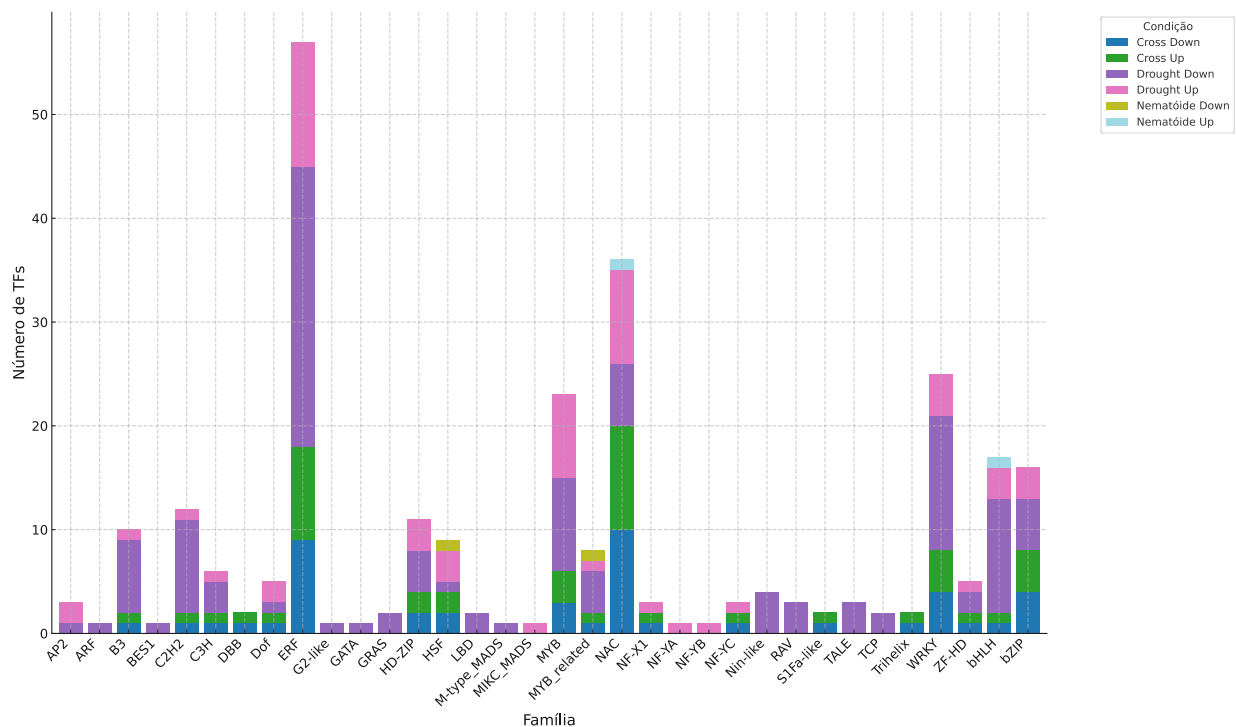


FIGURA 11. Distribuição empilhada das famílias de fatores de transcrição (TFs) identificados nas diferentes condições experimentais (bibliotecas). Cada barra representa uma família de TFs, enquanto as cores indicam as diferentes condições em que os TFs foram preditos. A altura total de cada barra corresponde ao número total de TFs pertencentes àquela família em todas as condições

Esses padrões indicam que a superexpressão de *AdEXLB8* influencia a expressão de um conjunto distinto de TFs sob diferentes condições de estresse, com a família WRKY aparecendo como núcleo regulador comum entre as respostas. Essa modulação reforça o papel de *AdEXLB8* na reprogramação transcricional de vias adaptativas que envolvem percepção de estresse, regulação hormonal e proteção contra danos oxidativos

A Figura 12 ilustra as principais vias de defesa moduladas em plantas superexpressando *AdEXLB* sob diferentes condições de estresse. Observou-se que, em resposta à seca, as vias tradicionalmente ativadas em OE4, como aquelas mediadas por ácido jasmônico, são suprimidas. Os dados sugerem que a resposta ao estresse hídrico é predominantemente regulada por fatores mediados por ABA, espécies reativas de oxigênio (ROS), etileno e auxina.



## Discussão

As expansinas são proteínas extracelulares amplamente distribuídas em plantas, reconhecidas por sua capacidade de relaxar a parede celular sem atividade hidrolítica direta. Essa propriedade é essencial não apenas para o crescimento e desenvolvimento vegetal, mas também para a adaptação a condições ambientais adversas (Kuluev et al., 2016b; McQueen-Mason et al., 1992).

Estudos apontam sua participação na resposta a estresses abióticos, como seca e salinidade, bem como em defesas contra patógenos, especialmente por meio de alterações estruturais na parede celular que resultam em tecidos mais rígidos e de difícil penetração (AbuQamar et al., 2017; Kuluev et al., 2016). Em cenários de estresse combinado, as expansinas também já demonstraram fornecer resistência, mediada principalmente pela modulação de vias hormonais (Brasileiro et al., 2021b). Contudo, a forma como cada tipo de estresse é modulada molecularmente em plantas que superexpressam expansinas ainda é pouco explorada na literatura.

Apesar desses avanços, os mecanismos moleculares específicos ativados por cada tipo de estresse em plantas que superexpressam expansinas ainda são pouco explorados. Diante disso, este estudo apresenta uma análise detalhada do perfil transcriptômico de plantas de *A. thaliana* superexpressando o gene *AdEXLB8*, sob condições de estresse biótico (infecção por *M. incognita*), abiótico (seca) e estresse combinado. Os dados gerados trazem novas contribuições sobre os mecanismos de ação envolvidos nas respostas integradas a múltiplos estresses em plantas transgênicas de *AdEXLB8*.

### Perfil transcriptômico de *AdEXLB* superexpresso em plantas de *A. thaliana*

A parede celular representa a primeira barreira física de defesa das plantas frente a agentes estressantes. Alterações em sua composição e estrutura figuram entre os mecanismos adaptativos mais rápidos e eficazes diante de condições adversas (Narváez-Barragán et al., 2022b). As expansinas desempenham papel essencial nesse processo ao reorganizar microfibrilas de celulose, promovendo sistemas reticulares independentes que conferem tanto rigidez quanto flexibilidade à parede celular — características críticas para a sobrevivência em ambientes hostis (Sampedro & Cosgrove, 2005).

Estudos prévios indicam que a superexpressão de genes codificantes de expansinas aumenta a tolerância a estresses como seca, salinidade e deficiência nutricional (Abbasi et al., 2021b; Y. Chen et al., 2016; L. Wang et al., 2023, 2024). Além disso, também já foi observado que a superexpressão de *AdEXLB8* pode conferir maior resiliência a diferentes tipos de estresses, incluindo seca e infecção por nematoides, por meio de alterações na parede celular e ativação de rotas de defesa (Brasileiro et al., 2021; Guimaraes et al., 2017). Com base nessa hipótese, este trabalho buscou investigar os efeitos moleculares da superexpressão de *AdEXLB8* em *A. thaliana*, com foco na análise de redes transcriptômicas ativadas sob diferentes condições de estresse.

Para elucidar os mecanismos moleculares subjacentes a essa tolerância ampliada, foi realizada uma análise transcriptômica de raízes de plantas transgênicas. A superexpressão de *AdEXLB8* modulou 485 genes sob condição controle, incluindo fatores de transcrição das famílias NAC, AP2/ERF, WRKY e MYB, além de genes relacionados a vias hormonais de ABA, JA, SA e etileno. Esse padrão transcricional aponta para a indução de um estado de *priming* fisiológico, caracterizado pela ativação basal de rotas de defesa, sinalização e adaptação antes da exposição ao estresse (Figura 18).

Esse padrão transcricional observado em *A. thaliana* guarda semelhanças com resultados obtidos em outros modelos experimentais. Em estudos anteriores, a superexpressão de *AdEXLB8* em tabaco resultou em maior tolerância à seca, à infecção por *M. incognita*, a estresses combinados e a outros nematoides formadores de galhas, como *M. javanica* e *M. arenaria*, inclusive em raízes de soja e amendoim suscetíveis (Brasileiro et al., 2021; Guimaraes et al., 2017). Nesses casos, a resistência foi atribuída a modificações estruturais na parede celular, à ativação de vias de sinalização hormonal (incluindo SA, JA/ET e AIA) e ao estabelecimento de um estado de defesa constitutiva (SAR).

De forma consistente, os dados transcriptômicos obtidos neste estudo indicam uma regulação significativa de genes associados à estrutura da parede celular e à sinalização de estresse. Foram identificadas expansinas como *EXLA1*, *EXLA3*, *EXL5* e *EXLA2*, além de genes relacionados à biossíntese de celulose, como *CSLC4*, um componente essencial para a integridade da parede celular. Também foi observada indução de *XTH22*, enzima ligada à modificação da matriz extracelular, cuja expressão é conhecida por ser rapidamente ativada em resposta a estímulos ambientais (C. Zhang et al., 2022).

Além disso, genes relacionados à detoxificação de espécies reativas de oxigênio (ROS), como *APX2*, estiveram entre os mais fortemente regulados, indicando o envolvimento do

sistema antioxidante na proteção celular. No nível metabólico, vias associadas à biossíntese de compostos fenólicos, especialmente flavonoides com propriedades antioxidantes e antimicrobianas, foram enriquecidas.

A ativação de genes da via de biossíntese de JA, como *LOX3*, *AOS* e *AOC*, assim como genes ligados à regulação estomática e à retenção hídrica, reforça a associação entre *AdEXLB8* e uma resposta integrada ao estresse. Os dados também apontam para mecanismos moleculares já descritos na literatura, como geração de ROS, influxo de cálcio intracelular, ativação de MAPKs e expressão de genes de defesa (Marcec et al., 2019; J. Yang et al., 2019).

Um aspecto importante identificado foi a interação hormonal entre ABA, JA e etileno. Embora o ABA seja tradicionalmente vinculado à resposta a estresses abióticos, estudos recentes sugerem seu papel em respostas planta-patógeno (Fujita et al., 2011; Soma et al., 2021). O JA, por sua vez, atua como mediador central na integração entre estresses bióticos e abióticos, com cooperação evidente com o etileno (J. Yang et al., 2019; N. Zhang et al., 2020). Neste estudo, a indução de genes como *LEA18*, *ACS2* e *ERF1* corrobora o envolvimento do etileno na resistência sistêmica adquirida (SAR).

A superexpressão de *AdEXLB8* também modulou genes reguladores como *GH3* e *IAA14*, além dos microRNAs *ath-MIR160a* e *ath-MIR167d*, os quais atuam sobre fatores de resposta à auxina (ARFs), sugerindo um mecanismo fino de ajuste hormonal que envolve também vias de crescimento.

Em conjunto, esses dados indicam que a superexpressão de *AdEXLB8* promove uma reconfiguração coordenada da parede celular, do sistema antioxidante e de múltiplas vias hormonais, particularmente aquelas mediadas por ABA, JA, ET e auxina. Essa integração resulta na ativação de mecanismos de defesa tanto constitutivos quanto induzíveis, caracterizando um estado de prontidão fisiológica. Esses achados reforçam o potencial desse gene como ferramenta biotecnológica estratégica para o desenvolvimento de cultivares com tolerância simultânea a estresses diversos com possibilidade de aplicação direta em cenários agrícolas reais.

### **Perfil de expressão de *AdEXLB* sob estresses isolados e combinados**

As mudanças climáticas têm acentuado a frequência e a intensidade de eventos extremos, como secas prolongadas, impactando diretamente a produtividade agrícola global. Esse cenário é especialmente preocupante em regiões áridas e semiáridas da África, Ásia e Pacífico,



onde cerca de 70% da população depende da agroindústria para sua subsistência (Yadav et al., 2019). Diante da crescente escassez de recursos hídricos, garantir a resistência das culturas torna-se essencial para a segurança alimentar (Verschuuren, 2016).

As plantas desenvolveram estratégias morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares para lidar com estresses ambientais, ativando cascatas de sinalização que envolvem canais iônicos, MAPKs, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a modulação de hormônios vegetais (Razi & Muneer, 2021). Nesse contexto, as expansinas destacam-se por sua atuação na modulação da parede celular, contribuindo para a manutenção da integridade estrutural sob estresse hídrico e salino (F. Li et al., 2011; J. Yang et al., 2020). Nos estudos de Lü et al., (2013) foi demonstrado que plantas transgênicas superexpressando expansina mostraram maior tolerância à seca e ao estresse salino com maiores taxas de sobrevivência após a seca, mais raízes laterais e maior teor de clorofila a foliar sob estresse salino.

Neste estudo, foi avaliado o impacto da superexpressão de *AdEXLB8* em *A. thaliana* frente a diferentes condições de estresse: seca, infecção por nematoides e estresse combinado. A análise revelou padrões transcriptômicos distintos entre os tratamentos, com a condição de seca induzindo a resposta mais robusta, totalizando 2088 genes diferencialmente expressos. Essa resposta reflete uma ativação sistêmica, com adaptações estruturais e metabólicas direcionadas à manutenção da homeostase hídrica e energética. Em contraste, a infecção por *M. incognita* modulou um conjunto mais restrito de genes, principalmente ligados a respostas localizadas de contenção da infecção. O estresse combinado regulou 1289 genes, com significativa sobreposição com os genes ativados pela seca, sugerindo que o déficit hídrico é o fator predominante na configuração transcricional desta condição. No entanto, a presença de genes exclusivos nesta condição demonstra a ativação de vias específicas associadas à integração de múltiplos sinais ambientais.

A análise das vias hormonais revelou um *crosstalk* funcional entre ABA, JA e ET. Sob estresse hídrico, predominou a via ABA, com indução de genes clássicos como *RD22* e *LTI78*, relacionados à adaptação osmótica. O estresse biótico, por sua vez, ativou preferencialmente a via JA, com destaque para *JAZ1* e *ORA59*, enquanto o estresse combinado resultou na co-regulação de genes integradores como *MYC2* (JA/ABA) e *ERF2* (JA/ET), indicando uma regulação complexa e sinérgica. Essa integração hormonal permite à planta ajustar sua resposta de forma eficiente, conciliando custo metabólico e eficácia adaptativa.

Além da regulação hormonal, observou-se um conjunto de ajustes estruturais e metabólicos específicos. Durante a seca, a repressão de genes associados à expansão celular sugere uma priorização de mecanismos de sobrevivência. Ao mesmo tempo, houve ativação de genes ligados à fotossíntese e biossíntese de carotenoides, que contribuem para a manutenção energética e proteção contra ROS. Estudos prévios com a expansina *LsEXPA6* demonstram que sua superexpressão pode aumentar a eficiência fotossintética sob estresse por metais pesados, sugerindo um papel generalizável das expansinas na preservação da atividade fotossintética sob condições adversas (Tao et al., 2025).

Na resposta ao nematoide, a ativação de genes de lignificação e biossíntese de compostos fenólicos — como fenóis e flavonoides — indica um reforço estrutural da parede celular, criando barreiras físicas e químicas contra a penetração do patógeno. Esses metabólitos também exercem papel antioxidante, auxiliando no controle do estresse oxidativo induzido pela infecção.

As redes de interação proteína-proteína (PPI) revelaram padrões funcionais distintos conforme a condição de estresse. Sob seca, as redes foram mais densas, com envolvimento de genes ligados à fotossíntese, regulação redox e sinalização por MAPKs. No estresse combinado, módulos relacionados à modulação celular, detoxificação e vias hormonais predominaram, enquanto a resposta ao nematoide apresentou redes mais esparsas, compatíveis com defesas localizadas. A recorrente presença de reguladores como *ABI5* e *RD29A* entre os hubs funcionais sugere que esses genes desempenham papel central na adaptação a estresses múltiplos.

Esses dados demonstram que a superexpressão de *AdEXLB8* não apenas amplia a capacidade de resposta das plantas frente a diferentes estresses, mas também promove uma resposta coordenada e flexível. Genes como *LTI78*, *MYC2* e *ERF2* destacam-se como alvos promissores para estratégias de melhoramento voltadas à construção de perfis adaptativos mais robustos. A predominância da via ABA sob estresse combinado reforça a importância do déficit hídrico como modulador central da resposta transcricional integrada.

Em conjunto, os resultados deste estudo demonstram que a superexpressão de *AdEXLB8* amplia a capacidade adaptativa das plantas ao ativar uma resposta transcricional coordenada frente a estresses abióticos, bióticos e combinados. O conhecimento gerado aqui contribui para o entendimento dos mecanismos de integração entre defesas bióticas e abióticas, essencial para o desenvolvimento de cultivares melhores frente às mudanças climáticas e à crescente instabilidade ambiental.

## Referências Bibliográficas

Abbasi, A., Malekpour, M., & Sobhanverdi, S. (2021). The *Arabidopsis* expansin gene (*AtEXPA18*) is capable to ameliorate drought stress tolerance in transgenic tobacco plants. *Molecular Biology Reports*, 48(8), 5913–5922.

AbuQamar, S., Moustafa, K., & Tran, L. S. P. (2017). Mechanisms and strategies of plant defense against *Botrytis cinerea*. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(2), 262–274.

Ali, M., Cheng, Z., Ahmad, H., & Hayat, S. (2018). Reactive oxygen species (ROS) as defenses against a broad range of plant fungal infections and case study on ROS employed by crops against *Verticillium dahliae* wilts. *Journal of Plant Interactions*, 13(1), 353–363.

Anders, S., Pyl, P. T., & Huber, W. (2015). HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, 31(2), 166–169.

Araujo, A. C. G., Guimaraes, P. M., Mota, A. P. Z., Guimaraes, L. A., Pereira, B. M., Vinson, C. C., Lacerda, A. L., Martins, A. C. Q., & Brasileiro, A. C. M. (2021). Overexpression of *DUF538* from wild *Arachis* enhances plant resistance to *Meloidogyne* spp. *Agronomy*, 11, 559.

Atkinson, N. J., & Urwin, P. E. (2012). The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *Journal of Experimental Botany*, 63(10), 3523–3543.

Basso, M. F., Lourenço-Tessutti, I. T., Moreira-Pinto, C. E., Mendes, R. A. G., Pereira, D. G., Grandis, A., Macedo, L. L. P., Macedo, A. F., Gomes, A. C. M. M., Arraes, F. B. M., Togawa, R. C., do Carmo Costa, M. M., Marcelino-Guimaraes, F. C., Silva, M. C. M., Floh, E. I. S., Buckeridge, M. S., de Almeida Engler, J., & Grossi-de-Sa, M. F. (2023). Overexpression of the *GmEXPA1* gene reduces plant susceptibility to *Meloidogyne incognita*. *Plant Cell Reports*, 42(1), 137–152.

Bertioli, D. J., Cannon, S. B., Froenicke, L., Huang, G., Farmer, A. D., Cannon, E. K. S., Liu, X., Gao, D., Clevenger, J., Dash, S., Ren, L., Moretzsohn, M. C., Shirasawa, K., Huang, W., Vidigal, B., Abernathy, B., Chu, Y., Niederhuth, C. E., Umale, P., ... Ozias-Akins, P. (2016). The genome sequences of *Arachis duranensis* and *Arachis ipaensis*, the diploid ancestors of cultivated peanut. *Nature Genetics*, 48(4), 438–446.

Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., & Gu, J. (2018). *fastp*: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, 34(17), i884–i890.

Chen, Y., Han, Y., Meng, Z., Zhou, S., Xiangzhu, K., & Wei, W. (2016). Overexpression of the wheat expansin gene *TaEXPA2* improved seed production and drought tolerance in transgenic tobacco plants. *PLOS ONE*, *11*(4), e0153494.

Choudhury, F. K., Rivero, R. M., Blumwald, E., & Mittler, R. (2017). Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *The Plant Journal*, *90*(5), 856–867.

da Silva Ferreira, D., da Cunha Quintana Martins, A., Berbert, P. S., dos Anjos, R. M., de Passos Saraiva, M. A., Brasileiro, A. C. M., Miller, R. N. G., & Guimaraes, P. M. (2024). A wild *Arachis* endochitinase enhances *Sclerotinia* resistance in transgenic plants. *Tropical Plant Biology*, *17*(2), 138–155.

Dobin, A., & Gingeras, T. R. (2016). Optimizing RNA-seq mapping with STAR. *Methods in Molecular Biology*, *1415*, 245–262.

Feng, X., Xu, Y., Peng, L., Yu, X., Zhao, Q., Feng, S., Zhao, Z., Li, F., & Hu, B. (2019). *TaEXPB7-B*, a  $\beta$ -expansin gene involved in low-temperature stress and abscisic acid responses, promotes growth and cold resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology*, *240*, 153004.

Fourie, H., De Waele, D., Mc Donald, A. H., Mienie, C., Marais, M., & De Beer, A. (2015). Nematode pests threatening soybean production in South Africa, with reference to *Meloidogyne*. *South African Journal of Science*, *111*.

Fujita, Y., Fujita, M., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2011). ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *Journal of Plant Research*, *124*, 509–525.

Ge, S. X., Jung, D., & Yao, R. (2020). ShinyGO: A graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. *Bioinformatics*, *36*(8), 2628–2629.

Guimaraes, L. A., Mota, A. P. Z., Araujo, A. C. G., de Alencar Figueiredo, L. F., Pereira, B. M., de Passos Saraiva, M. A., Silva, R. B., Danchin, E. G. J., Guimaraes, P. M., & Brasileiro, A. C. M. (2017). Genome-wide analysis of expansin superfamily in wild *Arachis* discloses a stress-responsive expansin-like B gene. *Plant Molecular Biology*, *94*(1–2), 79–96.

Gupta, B., & Huang, B. (2014). Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. *International Journal of Genomics*, *2014*.

Haynes, W. (2013). Benjamini–Hochberg method. In *Encyclopedia of Systems Biology* (pp. 78–78).

Jagodzík, P., Tajdel-Zielinska, M., Ciesla, A., Marczak, M., & Ludwikow, A. (2018). Mitogen-activated protein kinase cascades in plant hormone signaling. *Frontiers in Plant Science*, 9.

Jiang, S. C., Engle, N. L., Banday, Z. Z., Cecchini, N. M., Jung, H. W., Tschaplinski, T. J., & Greenberg, J. T. (2021). *ALDI* accumulation in *Arabidopsis* epidermal plastids confers local and non-autonomous disease resistance. *Journal of Experimental Botany*, 72, 2710–2726.

Jones, J. T., Haegeman, A., Danchin, E. G. J., Gaur, H. S., Helder, J., Jones, M. G. K., Kikuchi, T., Manzanilla-López, R., Palomares-Rius, J. E., & Wesemael, W. M. L. (2013). Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 14(9), 946–961.

Kanehisa, M., Sato, Y., & Morishima, K. (2016). BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG tools for functional characterization of genome and metagenome sequences. *Journal of Molecular Biology*, 428(4), 726–731.

Khan, A., & Mathelier, A. (2017). Intervene: A tool for intersection and visualization of multiple gene or genomic region sets. *BMC Bioinformatics*, 18(1), 1–8.

Kuluev, B., Avalbaev, A., Mikhaylova, E., Nikonorov, Y., Berezhneva, Z., & Chemeris, A. (2016a). Expression profiles and hormonal regulation of tobacco expansin genes and their involvement in abiotic stress response. *Journal of Plant Physiology*, 206, 1–12.

Kuluev, B., Avalbaev, A., Mikhaylova, E., Nikonorov, Y., Berezhneva, Z., & Chemeris, A. (2016b). Expression profiles and hormonal regulation of tobacco expansin genes and their involvement in abiotic stress response. *Journal of Plant Physiology*, 206, 1–12.

Kumar, K., Raina, S. K., & Sultan, S. M. (2020). *Arabidopsis* MAPK signaling pathways and their cross talks in abiotic stress response. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 29(4), 700–714.

Lawlor, D. W., & Tezara, W. (2009). Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: a critical evaluation of mechanisms and integration of processes. *Annals of Botany*, 103(4), 561–579.

Li, F., Xing, S., Guo, Q., Zhao, M., Zhang, J., Gao, Q., Wang, G., & Wang, W. (2011). Drought tolerance through over-expression of the expansin gene *TaEXPB23* in transgenic tobacco. *Journal of Plant Physiology*, 168(9), 960–966.

Lü, P., Kang, M., Jiang, X., Dai, F., Gao, J., & Zhang, C. (2013). RhEXPA4, a rose expansin gene, modulates leaf growth and confers drought and salt tolerance to *Arabidopsis*. *Planta*, 237(6), 1547–1559.

Marcec, M. J., Gilroy, S., Poovaiah, B. W., & Tanaka, K. (2019). Mutual interplay of  $\text{Ca}^{2+}$  and ROS signaling in plant immune response. *Plant Science*, 283, 343–354.

Mauch-Mani, B., Baccelli, I., Luna, E., & Flors, V. (2017). Defense priming: An adaptive part of induced resistance. *Annual Review of Plant Biology*, 68, 485–512.

McQueen-Mason, S., Durachko, D. M., & Cosgrove, D. J. (1992). Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *The Plant Cell*, 4(11), 1425–1433.

Mittler, R. (2006). Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science*, 11(1), 15–19.

Morgante, C. V., Brasileiro, A. C. M., Roberts, P. A., Guimaraes, L. A., Araujo, A. C. G., Fonseca, L. N., Leal-Bertioli, S. C. M., Bertioli, D. J., & Guimaraes, P. M. (2013). A survey of genes involved in *Arachis stenosperma* resistance to *Meloidogyne arenaria* race 1. *Functional Plant Biology*, 40(12), 1298–1309.

Mota, A. P. Z. (2019). *A study of molecular responses to abiotic and biotic stresses in Arachis* [Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul].

Mota, A. P. Z., Brasileiro, A. C. M., Vidigal, B., Oliveira, T. N., da Cunha Quintana Martins, A., Saraiva, M. A. P., de Araújo, A. C. G., Togawa, R. C., Grossi-de-Sá, M. F., & Guimaraes, P. M. (2021). Defining the combined stress response in wild *Arachis*. *Scientific Reports*, 11(1), 11097.

Narváez-Barragán, D. A., Tovar-Herrera, O. E., Guevara-García, A., Serrano, M., & Martínez-Anaya, C. (2022). Mechanisms of plant cell wall surveillance in response to pathogens, cell wall-derived ligands and the effect of expansins to infection resistance or susceptibility. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1–13.

Park, Y. J., Kwon, D. Y., Koo, S. Y., Truong, T. Q., Hong, S. C., Choi, J., Moon, J., & Kim, S. M. (2023). Identification of drought-responsive phenolic compounds and their biosynthetic regulation under drought stress in *Ligularia fischeri*. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1140509.

Rai, G. K., Khanday, D. M., Choudhary, S. M., Kumar, P., Kumari, S., Martínez-Andújar, C., Martínez-Melgarejo, P. A., Rai, P. K., & Pérez-Alfocea, F. (2024). Unlocking nature's stress buster: Absciscic acid's crucial role in defending plants against abiotic stress. *Plant Stress*, 11.

Rasmussen, S., Barah, P., Suarez-Rodriguez, M. C., Bressendorff, S., Friis, P., Costantino, P., Bones, A. M., Nielsen, H. B., & Mundy, J. (2013). Transcriptome responses to combinations of stresses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 161, 1783–1794.

Razi, K., & Muneer, S. (2021). Drought stress-induced physiological mechanisms, signaling pathways and molecular response of chloroplasts in common vegetable crops. *Critical Reviews in Biotechnology*, 41(5), 669–691.

Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2010). edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139–140.

Sampedro, J., & Cosgrove, D. J. (2005). The expansin superfamily. *Genome Biology*, 6(12), 242.

Sillmann, J., & Sippel, S. (2020). Climate extremes and their implications for impact and risk assessment: A short introduction. In *Climate Extremes and Their Implications for Impact and Risk Assessment* (pp. 1–9).

Soma, F., Takahashi, F., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2021). Cellular phosphorylation signaling and gene expression in drought stress responses: ABA-dependent and ABA-independent regulatory systems. *Plants*, 10(4), 756.

Sun, W., Yu, H., Liu, M., Ma, Z., & Chen, H. (2021). Evolutionary research on the expansin protein family during the plant transition to land provides new insights into the development of *Fagopyrum tataricum* fruit. *BMC Genomics*, 22(1), 252.

Szklarczyk, D., Kirsch, R., Koutrouli, M., Nastou, K., Mehryary, F., Hachilif, R., Gable, A. L., Fang, T., Doncheva, N. T., Pyysalo, S., Bork, P., Jensen, L. J., & Von Mering, C. (2023). The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Research*, 51, D638–D646.

Tang, D., Chen, M., Huang, X., Zhang, G., Zeng, L., Zhang, G., Wu, S., & Wang, Y. (2023). SRplot: A free online platform for data visualization and graphing. *PLOS ONE*, 18(11), e0294236.

Tao, H., Wu, Y., Liu, S., Yang, S., & Xu, X. (2025). Over-expression of *LsEXPA6*, a lettuce expansin gene, improves cadmium stress tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Gene*, 933.

Tapia-Vázquez, I., Montoya-Martínez, A. C., De los Santos-Villalobos, S., Ek-Ramos, M. J., Montesinos-Matías, R., & Martínez-Anaya, C. (2022). Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) a threat to agriculture in Mexico: biology, current control strategies, and perspectives. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 38(2), 1–18.

Thimm, O., Bläsing, O., Gibon, Y., Nagel, A., Meyer, S., Krüger, P., Selbig, J., Müller, L. A., Rhee, S. Y., & Stitt, M. (2004). MAPMAN: A user-driven tool to display genomics data

sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant Journal*, 37(6), 914–939.

Uarrota, V. G., Stefen, D. L. V., Leolato, L. S., Gindri, D. M., & Nerling, D. (2018). Revisiting carotenoids and their role in plant stress responses: From biosynthesis to plant signaling mechanisms during stress. In *Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants* (pp. 207–232).

Van Der Most, P. J., De Jong, B., Parmentier, H. K., & Verhulst, S. (2011). Trade-off between growth and immune function: A meta-analysis of selection experiments. *Functional Ecology*, 25(1), 74–80.

Verschuuren, J. (2016). The Paris Agreement on climate change: Agriculture and food security. *European Journal of Risk Regulation*, 7(1), 54–57.

Wang, L., Wang, W., Miao, Y., Peters, M., Schultze-Kraft, R., Liu, G., & Chen, Z. (2023). Development of transgenic composite *Stylosanthes* plants to study root growth regulated by a  $\beta$ -expansin gene, *SgEXPB1*, under phosphorus deficiency. *Plant Cell Reports*, 42(3), 575–585.

Wang, L., Zhang, T., Li, C., Zhou, C., Liu, B., Wu, Y., He, F., Xu, Y., Li, F., & Feng, X. (2024). Overexpression of wild soybean expansin gene *GsEXLB14* enhanced the tolerance of transgenic soybean hairy roots to salt and drought stresses. *Plants*, 13(12), 1656.

Wang, Z., Cao, J., Lin, N., Li, J., Wang, Y., Liu, W., Yao, W., & Li, Y. (2024). Origin, evolution, and diversification of the expansin family in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(21), 11814.

Warmerdam, S., Sterken, M. G., Sukarta, O. C. A., Van Schaik, C. C., Oortwijn, M. E. P., Lozano-Torres, J. L., Bakker, J., Smant, G., & Goverse, A. (2020). The TIR-NB-LRR pair *DSC1* and *WRKY19* contributes to basal immunity of *Arabidopsis* to the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *BMC Plant Biology*, 20.

Xia, X. J., Zhou, Y. H., Shi, K., Zhou, J., Foyer, C. H., & Yu, J. Q. (2015). Interplay between reactive oxygen species and hormones in the control of plant development and stress tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 66(10), 2839–2856.

Yadav, S. S., Hegde, V. S., Habibi, A. B., Dia, M., & Verma, S. (2019). Climate change, agriculture and food security. In *Food Security and Climate Change* (pp. 1–24).

Yang, J., Duan, G., Li, C., Liu, L., Han, G., Zhang, Y., & Wang, C. (2019). The crosstalks between jasmonic acid and other plant hormone signaling highlight the involvement of jasmonic acid as a core component in plant response to biotic and abiotic stresses. *Frontiers in Plant Science*, 10, 458580.



Yang, J., Zhang, G., An, J., Li, Q., Chen, Y., Zhao, X., Wu, J., Wang, Y., Hao, Q., Wang, W., & Wang, W. (2020). Expansin gene *TaEXPA2* positively regulates drought tolerance in transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Science*, 298, 110596.

Yang, X., Lu, M., Wang, Y., Wang, Y., Liu, Z., & Chen, S. (2021). Response mechanism of plants to drought stress. *Horticulturae*, 7(3), 50.

Zandalinas, S. I., Sengupta, S., Fritschi, F. B., Azad, R. K., Nechushtai, R., & Mittler, R. (2021). The impact of multifactorial stress combination on plant growth and survival. *New Phytologist*, 230, 1034–1048.

Zhang, C., He, M., Jiang, Z., Liu, L., Pu, J., Zhang, W., Wang, S., & Xu, F. (2022). The xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase gene *XTH22/TCH4* regulates plant growth by disrupting the cell wall homeostasis in *Arabidopsis* under boron deficiency. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3).

Zhang, N., Zhou, S., Yang, D., & Fan, Z. (2020). Revealing shared and distinct genes responding to JA and SA signaling in *Arabidopsis* by meta-analysis. *Frontiers in Plant Science*, 11, 512053.

Zheng, Y., Jiao, C., Sun, H., Rosli, H. G., Pombo, M. A., Zhang, P., Banf, M., Dai, X., Martin, G. B., Giovannoni, J. J., Zhao, P. X., Rhee, S. Y., & Fei, Z. (2016). iTAK: A program for genome-wide prediction and classification of plant transcription factors, transcriptional regulators, and protein kinases. *Molecular Plant*, 9(12), 1667–1670.

Zhu, J. K. (2016). Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell*, 167(2), 313–324.

## CONCLUSÕES GERAIS

Diante dos desafios impostos pelos estresses ambientais na agricultura e da crescente valorização da biodiversidade genética como fonte de inovação, esta tese propôs investigar como genes oriundos de espécies silvestres podem contribuir para a construção de fenótipos vegetais mais resilientes. A adoção de diferentes tipos de estresse (biótico, abiótico e combinado), bem como a utilização de genes provenientes de espécies silvestres distintas em cada capítulo, foi fundamentada na hipótese de que genes de resistência oriundos de ambientes ecologicamente contrastantes ativam mecanismos fisiológicos e moleculares distintos. A seleção de *AsTIR19*, um NLR truncado de *Arachis stenosperma*, e de *AdEXLB8*, uma expansina-like de *Arachis duranensis*, partiu da premissa de que essas proteínas atuariam por rotas diferenciadas — a primeira como receptor imunológico voltado à detecção de patógenos; a segunda como regulador estrutural e transcricional frente a estresses abióticos e múltiplos. A escolha por *Arachis duranensis* e *Arachis stenosperma* foi respaldada por evidências de estudos anteriores, que identificam essas espécies como reservatórios estratégicos de genes associados à resistência a patógenos e à tolerância a estresses ambientais.

A partir dessa hipótese geral, esta tese empregou uma abordagem transcriptômica de alta resolução para investigar como a superexpressão de dois genes de defesa silvestres — *AsTIR19* e *AdEXLB8* — reconfigura a fisiologia de *Arabidopsis thaliana* diante de estresses bióticos, abióticos e combinados. O desenho experimental foi estruturado para simular desafios ambientais de alta relevância agrônômica, considerando a crescente incidência de estresses múltiplos associados às mudanças climáticas.

No plano experimental, a superexpressão do NLR truncado *AsTIR19*, oriundo de *Arachis stenosperma*, conferiu resistência a *Fusarium oxysporum* sem impacto detectável sobre o crescimento, demonstrando que receptores truncados podem funcionar como sensores imunitários eficazes mesmo na ausência dos domínios LRR canônicos. A análise transcriptômica corroborou esse efeito, revelando que, em condições basais, *AsTIR19* ativou um conjunto robusto de genes reguladores das rotas de ácido salicílico, jasmonato e etileno — incluindo *PRI*, *WRKY70*, *ERF1* e enzimas da via do triptofano — além de módulos de metabolismo secundário associados a fenóis e flavonoides. Aproximadamente 40% desses genes mantiveram-se inalterados após o desafio fúngico, sugerindo que o transgene estabelece um estado de “pré-alerta” molecular que reduz a necessidade de reprogramação transcricional diante do estresse. Esse perfil é compatível com o

conceito de *priming*, no qual a planta investe em vigilância basal contínua em troca de uma resposta mais rápida e intensa ao ataque do patógeno.

A análise transcriptômica de plantas superexpressando *AdEXLB8*, oriunda de *Arachis duranensis*, revelou que essa expansina exerce funções que vão além do afrouxamento da parede celular. Assim como observado com *AsTIR19*, sua superexpressão induziu um estado de prontidão molecular em condições basais — neste caso, caracterizado pela ativação de genes relacionados à hipoxia e à detoxificação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Os dados indicam que *AdEXLB8* promove uma reprogramação transcricional sistêmica que amplia a capacidade da planta de responder a múltiplos estresses — incluindo seca, nematoides e sua combinação — sugerindo um efeito de *priming* constitutivo mediado por mecanismos distintos daqueles associados aos receptores imunológicos mencionados no capítulo 2.

Dentre os tratamentos aplicados, a seca se destacou como o fator mais imponente, com a modulação de 2.088 genes diferencialmente expressos (DEGs). Esse cenário incluiu a supressão de expansinas endógenas e de genes associados ao crescimento, acompanhada da ativação de rotas ligadas à osmorregulação e ao fechamento estomático, predominantemente reguladas por ácido abscísico (ABA). A indução de hubs exclusivos do fotossistema durante o estresse hídrico reforça o papel de *AdEXLB8* na mediação de um fenótipo multirresistente, articulando respostas específicas a diferentes tipos de estresse por meio da regulação integrada de processos energéticos e hormonais.

Embora os padrões de expressão sob estresse combinado (seca + nematoide) apresentem ampla sobreposição com aqueles induzidos pela seca isolada, também foram identificadas assinaturas exclusivas nesse contexto, indicando que a planta percebe e responde de forma qualitativamente distinta quando submetida a desafios simultâneos. A infecção por nematoides, por sua vez, induziu um número reduzido de DEGs ( $n = 58$ ), predominantemente associados às vias de jasmonato (JA) e etileno (ET). No entanto, essas vias foram negativamente reguladas ou mantidas inativas nos tratamentos com seca ou combinação de estresses — sugerindo que a planta prioriza o enfrentamento do déficit hídrico, mais ameaçador à sua sobrevivência, em detrimento da resposta ao agente biótico.

A sobreposição residual entre os conjuntos de genes diferencialmente expressos por *AdEXLB8* e *AsTIR19* — apenas 25 entre 1.263 DEGs identificados — reforça a noção de que cada transgene aciona redes transcricionais amplamente independentes (Figura 13). Essa especificidade funcional sustenta o potencial uso combinado dos dois alelos em estratégias de piramidamento, reduzindo a redundância e minimizando o risco de epistasia negativa. Além disso, os dados afastam a hipótese de que os fenótipos observados resultem de efeitos inespecíficos da

transformação, uma vez que cada classe gênica responde de forma distinta em suas respectivas linhagens. Por fim, a disparidade nas rotas ativadas levanta questões relevantes sobre possíveis interações sinérgicas ou antagonistas entre receptores não canônicos e proteínas estruturais, bem como sobre a identidade e função dos genes compartilhados — os quais podem convergir para etapas críticas do metabolismo de defesa, representando uma fronteira promissora para investigações funcionais futuras.

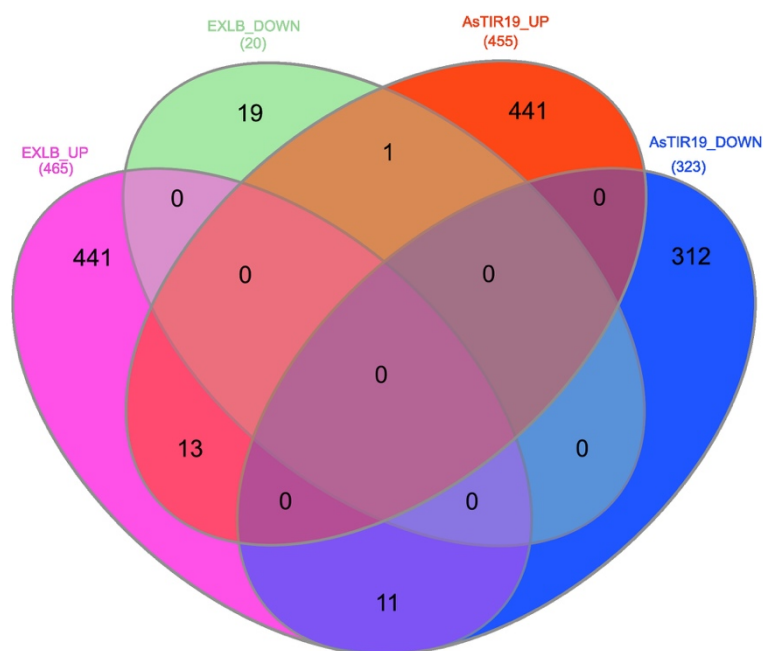


FIGURA 13. Sobreposição dos genes diferencialmente expressos (DEGs) induzidos exclusivamente pelos diferentes tipos de transgene. Diagrama de Venn comparando quatro subconjuntos de DEGs identificados sob condição basal (sem estresse) em *Arabidopsis thaliana* transgênica: genes regulados positivamente (UP) ou negativamente (DOWN) pela superexpressão de *AdEXLB8* (linhagem OE-4; áreas magenta e verde-claro) e pela superexpressão de *AsTIR19* (linhagem OE-11; áreas vermelha e azul). Cada subconjunto foi obtido em relação ao respectivo controle selvagem (WT) após normalização TMM e análise diferencial no edgeR. Foram considerados DEGs aqueles com  $|\log_2FC| > 2$  ( $\geq 4$ -fold) e  $FDR < 0,01$ . Os totais entre parênteses indicam o número de genes por classe: EXLB\_UP = 465, EXLB\_DOWN = 20, AsTIR19\_UP = 455, AsTIR19\_DOWN = 323. Apenas 25 genes aparecem em intersecções (13 compartilhados entre EXLB\_UP e AsTIR19\_UP; 11 entre EXLB\_UP e AsTIR19\_DOWN; 1 entre EXLB\_DOWN e AsTIR19\_UP) e nenhum gene é comum aos quatro grupos.

No tocante à aplicação prática, *AsTIR19* e *AdEXLB8* se apresentam como candidatos promissores para programas de melhoramento genético voltados à resistência múltipla. A especificidade das vias que regulam reduz o risco de epistasia negativa, enquanto a complementaridade dos fenótipos observados sugere ganhos em robustez fisiológica. A

identificação de genes-hub em redes de coexpressão oferece marcadores moleculares valiosos para seleção assistida e alvos precisos para edição de promotores ou desenvolvimento de construções multigênicas.

Para consolidar o potencial biotecnológico de *AdEXLB8*, será essencial aprofundar sua caracterização funcional por meio de análises temporais refinadas de expressão e acessibilidade cromatínica, a fim de elucidar os mecanismos associados ao priming e à regulação transcricional sustentada. A integração entre transcriptômica, proteômica quantitativa e metabolômica dirigida permitirá verificar se as alterações em nível de RNA resultam em ajustes metabólicos compatíveis com a sustentabilidade energética da planta. Em paralelo, a validação agrônômica do fenótipo deverá ser realizada em condições de estresse combinado, em ambientes que simulem cenários reais de cultivo. Adicionalmente, análises estruturais baseadas em previsões computacionais — como modelagem via AlphaFold — e o mapeamento de interações proteína–proteína poderão identificar parceiros moleculares diretamente envolvidos na regulação das vias hormonais de defesa, especialmente aquelas mediadas por ABA e JA. Essa abordagem integrada permitirá avaliar os custos e benefícios do uso de *AdEXLB8* em programas de melhoramento, ao mesmo tempo em que revelará os nós regulatórios que conferem à proteína um papel central na adaptação a estresses múltiplos.

Embora *Arabidopsis* não tenha apresentado penalidades de crescimento, a reconfiguração metabólica induzida por *AsTIR19* pode implicar custos energéticos em espécies de ciclo longo ou sob limitação nutricional. Ensaios futuros, conduzidos em culturas de interesse agrônômico e em ambiente de campo, serão essenciais para quantificar o equilíbrio entre investimento metabólico e benefício fitossanitário, e para viabilizar sua incorporação a estratégias de melhoramento.

Dessa análise emergem várias frentes promissoras: (a) estudos proteômicos capazes de confirmar se alterações transcricionais se refletem em mudanças de abundância ou modificações pós-traducionais; (b) modelagem estrutural e docking in silico para mapear interações de *AsTIR19* e *AdEXLB8* com parceiros sinalizadores; (c) geração, via CRISPR, de mutantes simples e duplos em espécies agrícolas, com avaliação dos custos de defesa versus produtividade; (d) ensaios de campo multifatoriais que exponham linhagens editadas a estresses combinados em diferentes fases fenológicas; e (e) integração de dados multi-ômicos para construção de modelos sistêmicos da defesa vegetal.

Em conjunto, os achados aqui apresentados não apenas respondem afirmativamente à hipótese de que genes silvestres, funcionalmente caracterizados, podem aumentar a resiliência vegetal frente a estresses combinados, como também propõem novos caminhos para o desenvolvimento de cultivares mais adaptáveis. A possibilidade de modular estados defensivos

por vias não convencionais, como receptores truncados ou proteínas estruturais da parede celular, amplia o repertório conceitual da imunidade vegetal e oferece alternativas inovadoras frente às limitações da agricultura contemporânea.

## PRODUÇÃO INTELECTUAL

### Resumos eventos científicos

Alves, G. S. C., Mota, A. Z., Fonseca, F. C. A., de Araújo, A. C., Cotta, M. G., Togawa, R. C., Costa, M. M. C., Silva Junior, O. B., Arraes, F. B., Sá, M. F. G., Brasileiro, A. C. M., Enk, J., Lan, T., Guimarães, P. M., & Miller, R. N. G. (2020, janeiro). *SMRT-RenSeq for NLR resistance gene characterization in Arachis, Glycine and Musa species* [Apresentação de trabalho]. The Plant and Animal Genome XXVII Conference (PAG), San Diego, CA, Estados Unidos.

---

Araújo, A. C. de, Grynberg, P., & Costa, G. G. S. F. (2023). *Exploring the use of bioinformatics tools in teaching genetics to high school and elementary students* [Apresentação de trabalho]. X-Meeting, Curitiba, PR, Brasil.

---

Araújo, A. C. de, (2023). \*Differential gene expression analysis of *Arabidopsis thaliana* overexpressing expansin AdEXLB8 from *Arachis duranensis* [Apresentação de trabalho]. X-Meeting, Curitiba, PR, Brasil.

---

Araujo, A. C., Alves, G. S. C., Martins, A. C. Q., Brasileiro, A. C. M., Guimarães, P. M., & Miller, R. N. G. (2021, novembro). *Prospection of genes involved in biotic stress responses in the wild diploid species Arachis stenosperma and Musa acuminata Calcutta 4* [Resumo em vídeo]. X Simpósio do Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

---

Araujo, A. C., Brasileiro, A. C. M., Miller, R. N. G., Grynberg, P., Togawa, R. C., & Guimaraes, P. M. (2024, janeiro). *Transcriptional dynamics in transgenic plants overexpressing genes related to plant immunity* [Apresentação de pôster]. XII Simpósio do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) da Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

---

Araújo, A. C., Grynberg, P., Costa, G. G. S. F., & Brasileiro, A. C. M. (2022, dezembro). *O uso de ferramentas de bioinformática para o ensino de genética nos anos finais do ensino fundamental e médio* [Apresentação de pôster]. XXVI Congresso de Iniciação Científica – Talento Estudantil, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

---

Guimarães, P. M., Togawa, R. C., Miller, R. N. G., Pereira, B. M., Martins, A. C. Q., Brasileiro, A. C. M., & Araújo, A. C. (2024, janeiro). \*Ectopic expression of an NLR gene from wild *Arachis* enhances resistance against *Fusarium oxysporum* [Apresentação de trabalho]. Plant and Animal Genome Conference / PAG 31, San Diego, CA, Estados Unidos.

### **Artigos e livro**

de Araújo, A. C., Brasileiro, A. C. M., Martins, A. D. C. Q., Grynberg, P., Togawa, R. C., Saraiva, M. A. D. P., ... & Guimaraes, P. M. (2024). Ectopic expression of a truncated NLR gene from wild *Arachis* enhances resistance to *Fusarium oxysporum*. *Frontiers in Plant Science*, 15, 1486820.

---

Araújo, A. C. de. (2023). *Tecnologias emergentes na agrocomputação* (220p.). Indaial, SC: Centro Universitário Leonardo da Vinci – UNIASSELVI.