



GERALD A. M. SORMANTI VALENZUELA

**AVANÇOS GENÉTICOS NA RESPOSTA DO ARROZ DE
TERRAS ALTAS AOS ESTRESSES BIÓTICOS**

**LAVRAS-MG
2025**

GERALD A. M. SORMANTI VALENZUELA

**AVANÇOS GENÉTICOS NA RESPOSTA DO ARROZ DE TERRAS ALTAS AOS
ESTRESSES BIÓTICOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de Doutor.

Prof. Dra. Flávia Barbosa Silva Botelho
Orientadora

Dra. Valácia Lemes da Silva Lobo
Coorientador

**LAVRAS-MG
2025**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Sormanti Valenzuela, Gerald A. M.

Avanços genéticos na resposta do arroz de terras altas aos estresses
bióticos/ Sormanti Valenzuela, Gerald A. M. - 2025.

52 p.: il.

Orientadora: Flávia Barbosa Silva Botelho

Coorientadora: Valácia Lemes da Silva Lobo

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2025.

Bibliografia.

1. Melhoramento Genético. 2. *Oryza sativa*. 3 Tolerância a
fatores bióticos e abióticos. I. Barbosa Silva Botelho, Flavia. II.
Lemes da Silva Lobo, Valácia. III. Andrade Pereira, Welison.
IV. Magalhães Guedes, Janine. V. Barbosa Abreu, Guilherme.

GERALD A. M. SORMANTI VALENZUELA

**AVANÇOS GENÉTICOS NA RESPOSTA DO ARROZ DE TERRAS ALTAS AOS
ESTRESSES BIÓTICOS**

**GENETIC ADVANCES IN UPLAND RICE RESPONSE TO
BIOTIC STRESSES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 16 de dezembro de 2024.

Dra. Flávia Barbosa Silva Botelho - UFLA

Dra. Valácia Lemes da Silva Lobo – EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO

Dr. Welison Andrade Pereira - UFLA

Dra. Janine Magalhães Guedes- EPAMIG

Dr. Guilherme Barbosa Abreu – EMBRAPA CAFÉ

Prof. Dra. Flávia Barbosa Silva Botelho
Orientadora

Dra. Valácia Lemes da Silva Lobo
Coorientadora

**LAVRAS-MG
2025**

Aos meus pais e meu irmão, pelo apoio, carinho e confiança.
Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelas tantas oportunidades que ele coloca na minha vida e, por ser meu guia e sustento sempre.

A meus pais, Miguel e Clara, pelo amor, os ensinamentos no dia a dia, e principalmente por serem os primeiros que acreditam nos meus sonhos.

A meus irmãos, Miguel, Carmiña e Magali, por ser muitas vezes exemplos para mim e, por todo o amor que sentimos um pelo outro.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Biologia, instituição de prestígio a nível nacional e internacional, pela oportunidade concedida para realização do mestrado.

À Embrapa, pela parceria e suporte na realização deste trabalho.

À Universidade de Arkansas, pela oportunidade de intercâmbio nos EUA e a capacitação como profissional.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e ao Programa CAPES PRINT.

A Professora Flavia Barbosa Silvia Botelho pela orientação e ensinamentos, por ser um exemplo de compromisso e dedicação ao trabalho que nós realizamos.

A Dra. Valácia pela coorientação, por todo o apoio neste trabalho.

A Dra. Professora Vibha Srivastava, pela orientação e ensinamentos.

Ao grupo do Laboratório de Biotecnologia da Universidade de Arkansas e em especial a Dr. Soumen pelo suporte durante os meses de trabalho em conjunto.

Ao grupo de Melhoramento de Arroz de Terras Altas da Universidade Federal de Lavras e aos colegas do GEN, por todos esses anos compartilhados juntos.

A TODOS, MUITO OBRIGADO!

RESUMO

Os estudos apresentados destacam avanços no melhoramento genético do arroz com foco na resistência aos estresses bióticos. O primeiro trabalho abordou a severidade da brusone foliar (*Magnaporthe oryzae*) em genótipos elites de arroz de terras altas. Utilizando 36 anos de dados do Viveiro Nacional de Brusone (VNB), foram analisados os impactos de fatores ambientais na expressão da doença e o progresso genético na resistência. Observou-se um progresso acumulado de -4,50 na severidade ao longo das safras, com a temperatura sendo o principal fator associado ao aumento da doença. Estratégias como a estratificação ambiental foram essenciais para identificar mega-ambientes e otimizar a seleção de linhagens adaptadas às condições regionais. No segundo trabalho, o foco foi a superexpressão do gene *DREB1a* em uma linhagem transgênica de arroz e seu potencial uso na resistência a fungos de solo. As plantas transgênicas demonstraram melhor desenvolvimento, especialmente no sistema radicular, mesmo sob condições de estresse biótico, em comparação ao parental selvagem. Esse resultado sugere que o gene *DREB1a*, além de ser amplamente associado à tolerância a estresses abióticos, desempenha um papel relevante em respostas contra fungos de solo. Ambos os trabalhos reforçam a importância da associação da biotecnologia e melhoramento convencional para desenvolver cultivares mais adaptadas e resistentes, promovendo sustentabilidade e produtividade na cultura do arroz.

Palavras-chave: melhoramento genético de plantas; resistência; estresse biótico.

ABSTRACT

The studies presented highlight advances in rice genetic breeding, focusing on resistance to biotic stresses. The first study addressed the severity of rice blast (*Magnaporthe oryzae*) in elite upland rice genotypes. Using 36 years of data from the National Blast Nursery (VNB), the impacts of environmental factors on disease expression and genetic progress in resistance were analyzed. An accumulated progress of -4.50 in disease severity was observed over the seasons, with temperature being the main factor associated with increased disease incidence. Strategies such as environmental stratification were essential to identify mega-environments and optimize the selection of lines adapted to regional conditions. The second study focused on the overexpression of the *DREB1a* gene in a transgenic rice line and its potential use in resistance to soil fungi. The transgenic plants demonstrated better development, especially in the root system, even under biotic stress conditions, compared to the wild-type parent. This result suggests that the *DREB1a* gene, in addition to being widely associated with tolerance to abiotic stresses, plays a significant role in responses against soil fungi. Both studies reinforce the importance of integrating biotechnology with conventional breeding to develop more adapted and resistant cultivars, promoting sustainability and productivity in rice cultivation.

Keywords: plant genetic breeding; resistance; biotic stress.

INDICADORES DE IMPACTOS

Os trabalhos desenvolvidos abordaram o impacto de avanços genéticos no controle de doenças em arroz e o uso de biotecnologia para melhoria da resistência a patógenos. A pesquisa no Brasil, conduzida em parceria com instituições como a Embrapa, mostraram um progresso significativo na redução da severidade da brusone em arroz de terras altas. Ao longo de 36 anos, foram avaliados 285 ambientes em nove estados, resultando em um progresso genético médio de -1,25 na escala de severidade da doença a cada 10 anos. Esse avanço indica que estratégias de melhoramento genético, combinadas com práticas de manejo agrícola, reduziram o impacto da doença nas principais regiões de cultivo. Além disso, o experimento realizado nos Estados Unidos utilizando linhagens transgênicas demonstraram que a superexpressão do gene *DREB1a* aumenta a resistência a fungos de solo, reforçando sua aplicação como alternativa para lidar com estresses bióticos. Investigações como estas promovem sustentabilidade ambiental ao reduzir a dependência de insumos químicos e fortalecem a segurança alimentar, mitigando perdas na produção global de arroz. Os resultados possuem impacto direto em áreas agrícolas vulneráveis do Brasil. Esses avanços se alinham aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da ONU, contribuindo para a segurança alimentar, inovação em produção sustentável e adaptação às mudanças climáticas.

IMPACT INDICATORS

The work developed addressed the impact of genetic advances on disease control in rice and the use of biotechnology to improve resistance to pathogens. The research in Brazil, conducted in partnership with institutions such as Embrapa Rice and Bean, showed significant progress in reducing the severity of rice blast in upland rice. Over 36 years, 285 environments in nine states were evaluated, resulting in an average genetic progress of -1.25 on the disease severity scale every 10 years. This progress indicates that genetic improvement strategies, combined with agricultural management practices, reduced the impact of the disease in the main cultivation regions. In addition, the experiment carried out in the United States using transgenic lines demonstrated that overexpression of the *DREB1a* gene increases resistance to soil fungi, reinforcing its application as an alternative to deal with biotic stresses. These types of investigations promote environmental sustainability by reducing dependence on chemical inputs and strengthen food security, mitigating losses in global rice production. The results have an impact on vulnerable agricultural areas in Brazil. These advances align with the UN Sustainable Development Goals (SDGs), contributing to food security, innovation in sustainable production and adaptation to climate change.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE.....	11
1	INTRODUÇÃO.....	12
	SEGUNDA PARTE - ARTIGOS.....	13
	ARTIGO 1 - GENETIC ADVANCES AND CLIMATIC CHALLENGES IN THE MANAGEMENT OF BLAST IN UPLAND RICE.....	14
	ARTIGO 2 - LINHAGEM DE ARROZ SUPEREXPRESSANDO O AtDREB1a MOSTRA RESPOSTA POSITIVA DAS PLANTAS DESAFIADAS POR ESTRESSE BIÓTICO.....	35

PRIMEIRA PARTE

1. INTRODUÇÃO

A demanda de alimentos está aumentando exponencialmente a nível mundial. Atrelado a isso, os cientistas enfrentam o desafio de conduzir programas de melhoramento genético de plantas mais eficientes que permitam oferecer cultivares de alta produtividade e resiliência diante das condições ambientais adversas.

O arroz representa uma das principais fontes de alimentos da população mundial, e essa produção de grãos é afetada por diversos fatores de origem biótica e abiótica, de forma isolada ou combinada. Nos últimos anos diversas regiões agrícolas vêm sofrendo os efeitos do aquecimento global, sejam por falta de água, temperaturas extremas, maior salinidade ou mudanças nas populações de insetos-pragas, plantas daninhas e patógenos. Contudo, os danos causados por doenças fúngicas na cultura do arroz, tem impactado de forma significativa na sustentabilidade da produção do cereal, fato que pode afetar diretamente na segurança alimentar da população.

Entre as principais estratégias utilizadas pelos melhoristas para evitar os efeitos danosos de tais estresses está o desenvolvimento de cultivares resistentes as doenças, abordagem que pode ser desenvolvida por meio de diferentes métodos biotecnológicos ou de melhoramento tradicional/convencional. Independentemente da estratégia selecionada, é sumamente importante uma constante avaliação da eficiência na obtenção desses genótipos, de forma tal a poder realizar os ajustes necessários para maior eficiência do programa.

Adicionalmente, a combinação de técnicas biotecnológicas com o melhoramento convencional demonstrou nos últimos anos os melhores resultados, possibilitando que esses programas de melhoramento consigam atingir seus objetivos de forma acelerada e precisa. Nesse sentido, é igualmente necessário direcionar esforços para investigações relacionadas com a descoberta de novos genes com potencial de aprimorar a resposta de defesa das plantas contra o ataque de patógenos.

Diante do exposto, estudou-se no presente trabalho os avanços genéticos e os desafios climáticos no manejo da brusone na cultura do arroz de terras altas, analisando a severidade da brusone foliar (*Magnaporthe oryzae*) em genótipos elites, determinando o progresso genético e associando os impactos ambientais que influenciam no desenvolvimento da doença. E, visando associar técnicas biotecnológicas ao melhoramento genético de arroz, objetivou-se com o segundo artigo científico o estudo da resposta de genótipos transgênicos de arroz expressando o Gene *AtDREB1a* à inoculação com fungos de solo.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1 - GENETIC ADVANCES AND CLIMATIC CHALLENGES IN THE MANAGEMENT OF BLAST IN UPLAND RICE

Artigo elaborado de acordo com as normas do periódico *Journal of Phytopathology*

Gerald Sormanti Valenzuela¹, Valácia Lemes da Silva-Lobo², Flávia Barbosa Silva Botelho¹

¹ Department of Agriculture, Federal University of Lavras, Lavras, Brazil.

² Brazilian Agricultural Research Corporation – Rice and Beans Unit (Embrapa Arroz e Feijão), Santo Antônio de Goiás, Brazil

Correspondence

Flávia Barbosa Silva Botelho, Department of Agriculture, Federal University of Lavras, Lavras, Brazil.
(flaviabotelho@ufla.br)

ABSTRACT

The severity of leaf blast (*Magnaporthe oryzae*) in upland rice genotypes was analyzed based on evaluations conducted at the National Blast Nursery (NBN) across different environments in Brazil over 36 growing seasons. The objective was to understand the influence of environmental factors on leaf blast severity in rice, as well as the genetic progress achieved over time. The trials were conducted in nine Brazilian states, covering diverse climatic conditions and totaling 285 environments. Approximately 180 cultivars/lines were evaluated per season, 30 days after plant emergence, using a 0-to-9 rating scale for disease severity. The results showed significant variability in disease severity and genotype performance across regions. The North, Central-West, and Southeast regions exhibited higher severity ratings, associated with humid subtropical and tropical climates. In contrast, the Northeast and South regions displayed lower severity ratings, likely due to more extreme climatic conditions that affected pathogen development. Environments such as Santo Antônio de Goiás (GO), Brazabranes (GO), Lavras (MG), and Pindamonhangaba (SP) showed high disease severity, highlighting the importance of these locations in conducting upland rice breeding programs. Environmental stratification and the clustering of environments into mega-environments based on severity ratings allowed for a more precise approach in selecting lines with resistance tailored to the specific environmental conditions of each region. The results also indicated that temperature is the primary environmental factor associated with blast severity, with moderate to high temperatures promoting disease development. Precipitation showed an inverse relationship with severity, suggesting that excessive rainfall may reduce pathogen inoculum. Over time, a genetic progress of -1.25 in disease severity ratings was determined per decade.

Key-words: *Oryza sativa*; *Magnaporthe oryzae*; disease resistance.

1. INTRODUCTION

The grain yield trait can be significantly affected, both in terms of quantity and quality, by various factors resulting from environmental conditions of abiotic and/or biotic stresses. Among the main biotic factors, the occurrence of diseases stands out. Environmental conditions such as temperature, humidity, precipitation, solar radiation, altitude, and soil type are directly correlated with disease severity. Understanding these relationships enables breeders to gain insights into pathogen-plant interactions, disease progression, and genotype performance in a specific region, allowing them to act more precisely and anticipate future challenges (GHINI, 2005).

According to Martins Nunes et al. (2014), blast, caused by the fungus *Magnaporthe oryzae* B. Couch (anamorph *Pyricularia oryzae* Cav.), is one of the most significant rice diseases, leading to leaf lesions that reduce the photosynthetic area and, consequently, decrease grain yield and quality. Estimates indicate that global losses are around 30%, which is equivalent to the food supply for 60 million people (PETER, 2013). In this context, preventive management strategies, such as genetic resistance, cultural practices, and fungicide application, are widely recommended (NALLEY et al., 2016).

Considering economic and environmental aspects, the use of adapted and disease-resistant cultivars emerges as one of the main solutions due to its effectiveness and environmental sustainability. The development of such genotypes involves a series of breeding methods, both conventional and modern, focused on monitoring the main pathogen races or pathotypes and evaluating genotype responses, especially in rice production environments (PEIXOTO DE MORAIS JÚNIOR et al., 2017; BORÉM et al., 2017).

The development of cultivars with complete and specific resistance to the predominant *M. oryzae* races in a given region is widely used in breeding programs (MALAVOLTA et al., 2008). However, there is a continuous need to develop resistant rice cultivars due to the high pathogenic variability of the fungus *M. oryzae*, which has led to the rapid loss of cultivar-specific resistance, reducing their lifespan to only a few years of continuous cultivation.

Observations indicate that continuously evaluating genotypes in different environments, under varying pathogen populations and climatic conditions, is crucial for selecting and recommending lines with more durable resistance. Likewise, it is worth noting that, on average, for upland rice, the proportion between genetic (G), environmental (E), and interaction (GE) effects is approximately 1:4:2 (VELÁSQUEZ; CASTROVERDE; HE, 2018; COSTA NETO et al., 2020). Since the genotype-by-environment interaction has a significant influence on phenotype expression, the most promising approach to minimize this effect is the evaluation of

lines/genotypes in a network of experiments across multiple environments representative of the cultivation regions (KARLING FACCHINELLO et al., 2018).

Thus, aiming to select genotypes that are more adapted and stable to the pathogen population in the cultivation environment, Embrapa Arroz e Feijão has been coordinating the National Blast Nursery (NBN) since 1982, in partnership with other research institutions. The objective is to study the stability of blast resistance and evaluate advanced lines from regional and national rice breeding programs in Brazil. The outcome of this project is the development of a comprehensive database encompassing multiple growing seasons, environments, and genotypes in relation to disease severity.

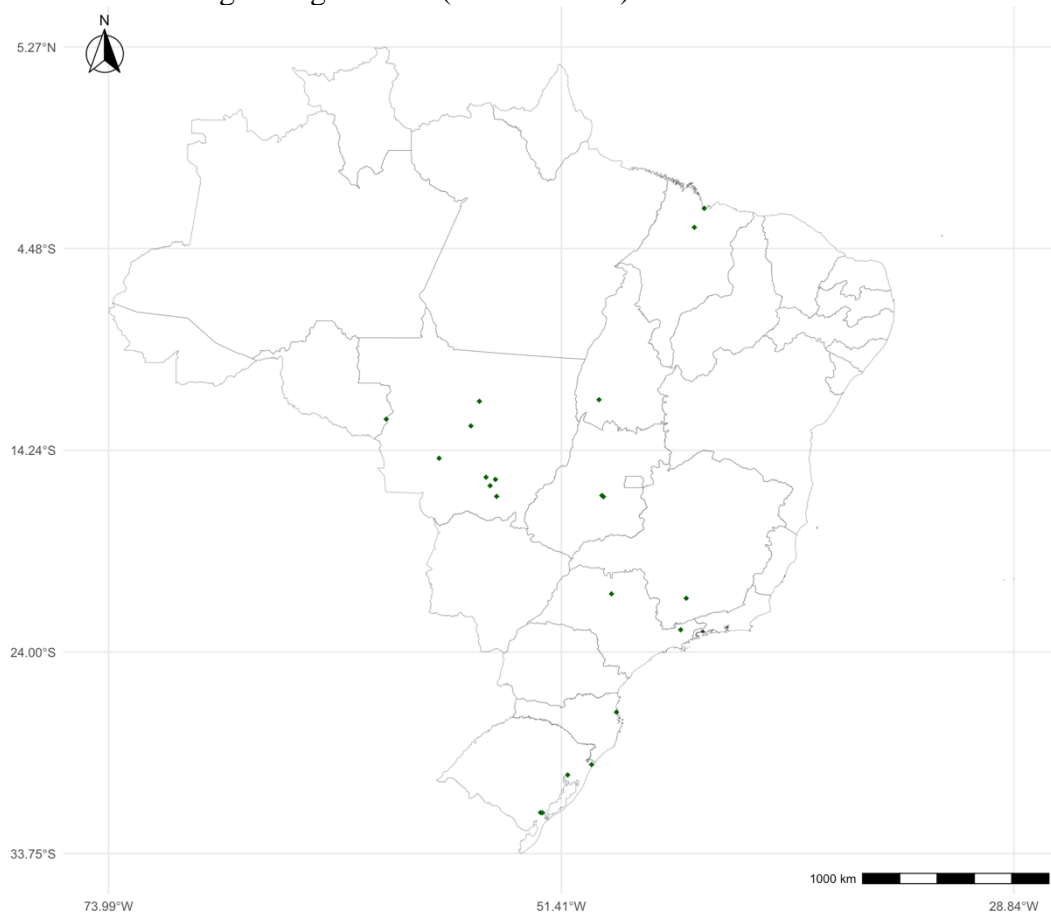
The objective of this study was to estimate the genetic progress in evaluations conducted at the National Blast Nursery (NBN) over 36 growing seasons, as well as to assess the influence of environmental factors on leaf blast severity in elite upland rice genotypes.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Evaluation Sites and Period

The National Blast Nursery (NBN) trials considered in this study were conducted in different locations each year, distributed across nine Brazilian states: Goiás, São Paulo, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Mato Grosso, Tocantins, Rondônia, Maranhão, and Minas Gerais, as shown in **Figure 1**. The dataset includes growing seasons from 1984/85 to 2020/21, totaling 285 environments, considering both location and growing season.

Figure 1. NBN trials conducted in different locations across nine Brazilian states over the evaluated growing seasons (1984 to 2020).



Source: Author (2024).

2.2 Germplasm

On average, approximately 180 upland rice cultivars/lines were evaluated per growing season, originating from the breeding programs of various institutions. Over the years, some genotypes were replaced due to the continuous introduction of superior lines in breeding programs. The cultivar Três Marias was included in all seasons and environments as the resistant check.

2.3 Trail Setup

The genotypes evaluated in each environment were sown in experimental plots at the Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa), Federal University of Lavras (UFLA), Agricultural Research Company of Minas Gerais (Epamig), Paraíba Research Company (Empaer), Agronomic Institute (IAC), Rio Grande do Sul Rice Institute (IRGA), and the Agricultural Research and Rural Extension Company of Santa Catarina (EPAGRI).

Furthermore, since the disease is considered endemic in these regions, no pathogen inoculations were performed. Instead, favorable environmental conditions for infection and pathogen development were ensured, including late-season planting, high seeding density, reduced row spacing, the inclusion of blast-susceptible genotypes within the experiments, and excessive nitrogen fertilization.

2.4 Evaluation of Blast Severity

The severity of leaf blast (*M. oryzae*) in rice genotypes was evaluated 30 days after plant emergence using a 0-to-9 rating scale. In this scale, presented in **Table 1**, genotypes with an average score of up to 3 were classified as resistant, those with scores above 3 and up to 5 were considered moderately resistant, and those above 5 were classified as susceptible (INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE, 1996; IRRI 2013; EMBRAPA, 2003).

Table 1. Rating scale for blast evaluation in rice. DBI – UFLA, Lavras, Brazil.

Scale	Observation
0	No symptoms
1	Small brown pinhead-sized lesions with no sporulation center
3	Lesions of 1 a 2 mm, slightly elongated, brown with white or gray center
5	Isolated or coalescing elliptical lesions, gray and highly sporulative
7	Lesions with yellow, brown or purple margins, covering up to 50% of the leaf area
9	Numerous whitish coalescing lesions, covering more than 75% of the leaf area

Source: IRRI (2013).

2.5 Climatic data

Climatic data were obtained from the Climate Research Unit (CRU TS version 4.05; released on March 17, 2021; <https://crudata.uea.ac.uk/cru/data/hrg/>) (HARRIS et al., 2020), including monthly mean temperature (°C), monthly mean daily maximum temperature (°C), and monthly precipitation (mm). To downscale the CRU precipitation and temperature data to a 1 km² resolution, data from WorldClim were used (FICK; HIJMANS, 2017; PENG et al., 2019). After downscaling, the mean annual temperature (MAT), maximum temperature (Max Temp), and mean annual precipitation (MAP) were calculated over the agricultural years from 1984 to 2021 (October to February of each growing season).

2.6 Data Analysis

The modeling was performed by treating disease scores (ranging from 0 to 9) as continuous data. In this case, Linear Mixed Model (LMM) were used, as recommended by Greven and Kneib (2009), as presented below:

$$P_{ijkmpt} = \mu + G_i + O_m + Y_j + L_k + PR_p + T_t + G/L_{ik} + Y/L_{jk} + Y/PR_{jp} + Y/T_{jt} + PR/T_{pt} + e_{ijkmpt}$$

Blast severity was modeled as a function of genotypes (G_i), genotype origin (O_m), year or growing season (Y_j), evaluation location (L_k), precipitation (PR_p), temperature (T_t), and their interactions. The variables genotypes, genotype origin, location, and genotype x location interaction were treated as random intercept effects. Additionally, the year x location interaction was included as a random slope to assess the progression of the disease over time across different locations.

The statistical significance of fixed and random effects was determined using Likelihood Ratio Tests (LRT). The model was fitted using Restricted Maximum Likelihood (REML), as this method provides unbiased estimates of variance parameters (random effects and residual standard deviation).

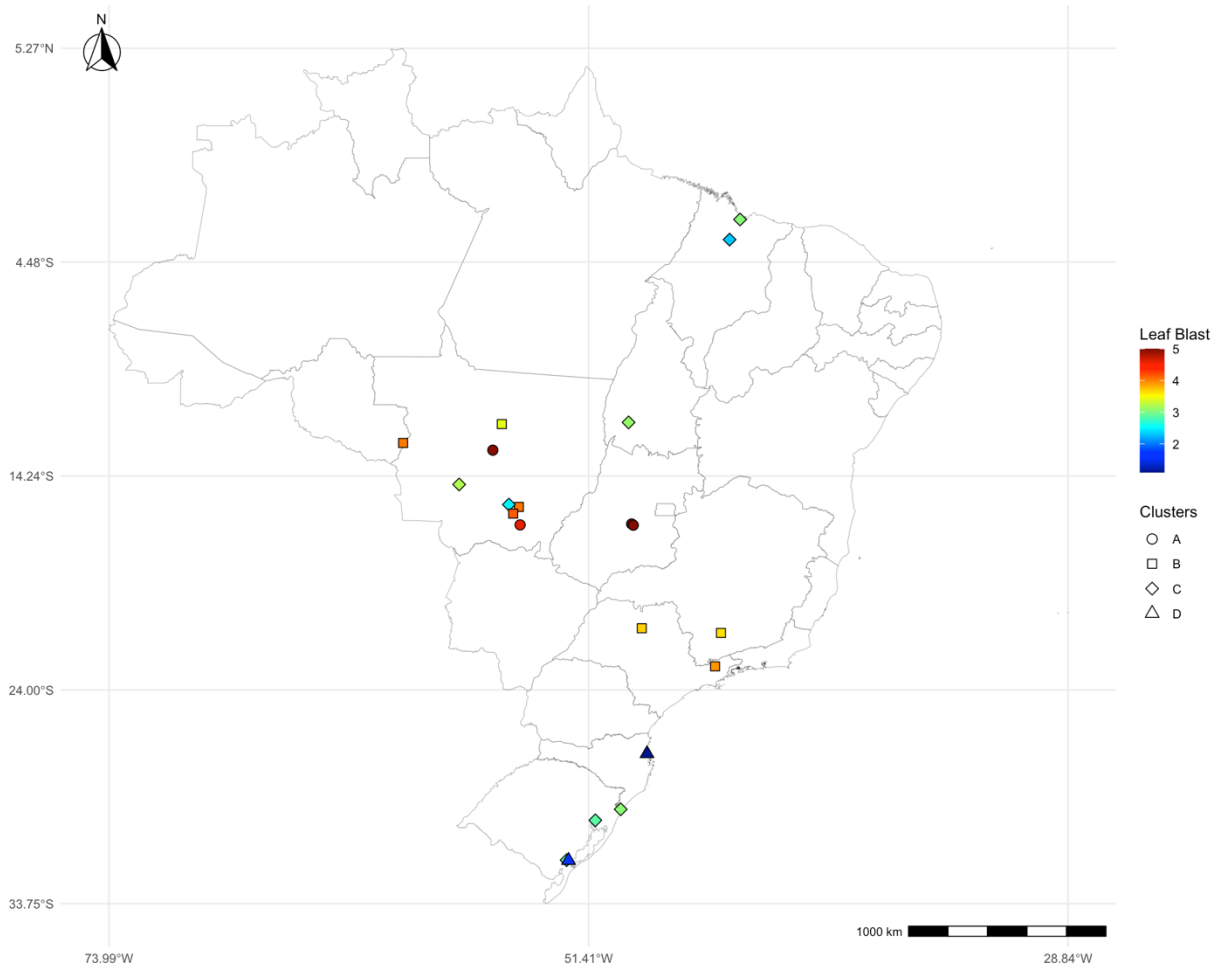
Based on this, a descriptive analysis of the G x E interaction was performed, along with environment clustering (dendrogram) and genetic progress estimation (based on year factor estimates, which reflect genotype performance over time in relation to leaf blast resistance). In all cases, R software packages were used for the analyses (ggplot2, RColorBrewer, lme4, corrplot, Car, emmeans, lmerTest, Metrics, MuMIn, pbkrtest, cAIC4, DHARMA, sjPlot, jtools, interactions, cowplot, gridExtra, geobr, ggspatial, plotly, stats, factoextra).

3. RESULTS

Geographical Distribution of Leaf Blast Severity in Brazil Analyzed in Upland Rice Genotypes

Figure 2 shows the geographical distribution of leaf blast severity in upland rice genotypes evaluated across different environments in Brazil during the previously mentioned growing seasons. Blast severity varied according to the color scale, which corresponds to the rating scale used in the evaluations: blue indicates low severity, whereas red represents high severity (lower resistance of genotypes to the disease). A wide distribution of evaluation sites was observed (21 locations in major upland rice-producing states), enabling a comprehensive assessment of the variability in disease severity at a national level. Furthermore, the groups identified in the dendrogram (**Figure 3**), which are associated with leaf blast severity, were also included.

Figure 2. Map of Leaf Blast Severity Distribution in Different Locations in Brazil.



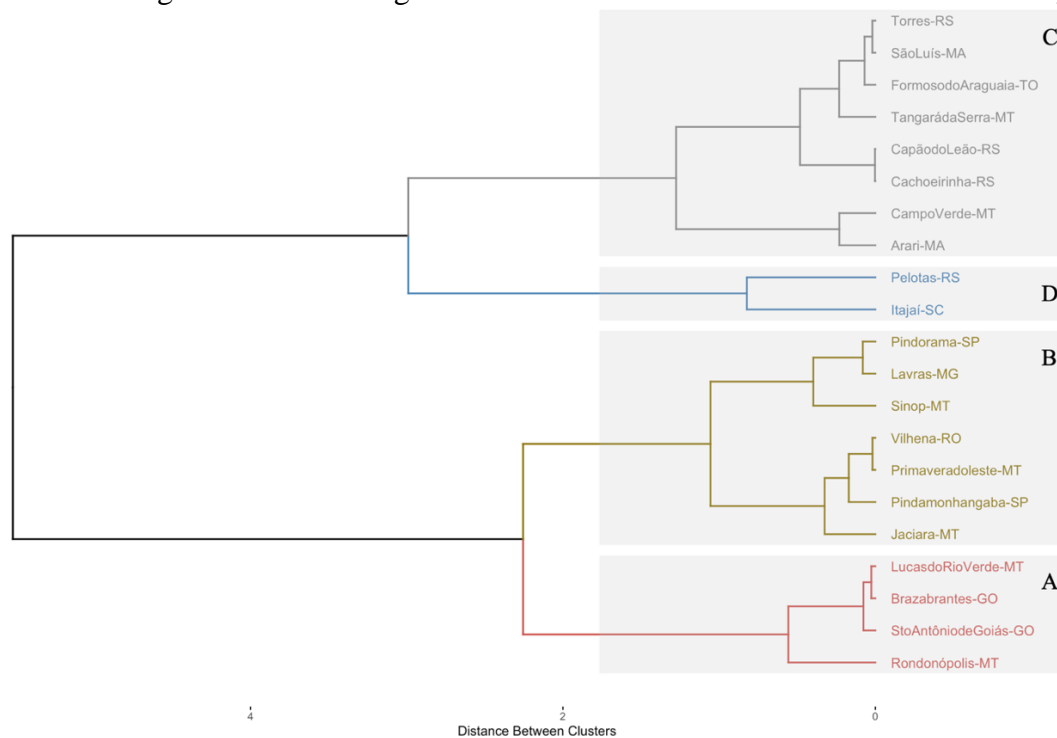
Source: Author (2024).

Notably, the North, Central-West, and Southeast regions of Brazil showed a higher concentration of red to orange symbols, indicating greater disease severity (lower resistance of genotypes to blast). This increased severity may be associated with various factors, such as crop management practices and/or favorable environmental conditions for disease development, as well as the interaction between these factors and the genetic variability of both the rice lines and the pathogen population. In contrast, the Northeast and South regions predominantly displayed blue and green symbols, suggesting lower disease severity (higher resistance of genotypes to the fungus in these locations).

Clustering of Environments Used in the Evaluation of Blast Severity

The dendrogram presented in **Figure 3** successfully grouped different locations/environments in Brazil based on average leaf blast severity scores, ranging from 0 to 9, where lower scores indicate lower susceptibility and higher scores indicate greater susceptibility of genotypes to the disease. Additionally, the distance between the branches in the dendrogram represents the dissimilarity between environments, meaning that environments that cluster earlier in the dendrogram are more similar in terms of blast resistance or susceptibility. Four main environment groups were identified: A (red), B (yellow), C (gray) and D (blue), each representing a mega-environment (grouping two or more environments) with a similar response pattern to leaf blast severity. Furthermore, all cluster means can be found in Appendix **Figure S1**.

Figure 3. Dendrogram for Clustering of Different Environments Based on Blast Severity.



Source: Author (2024).

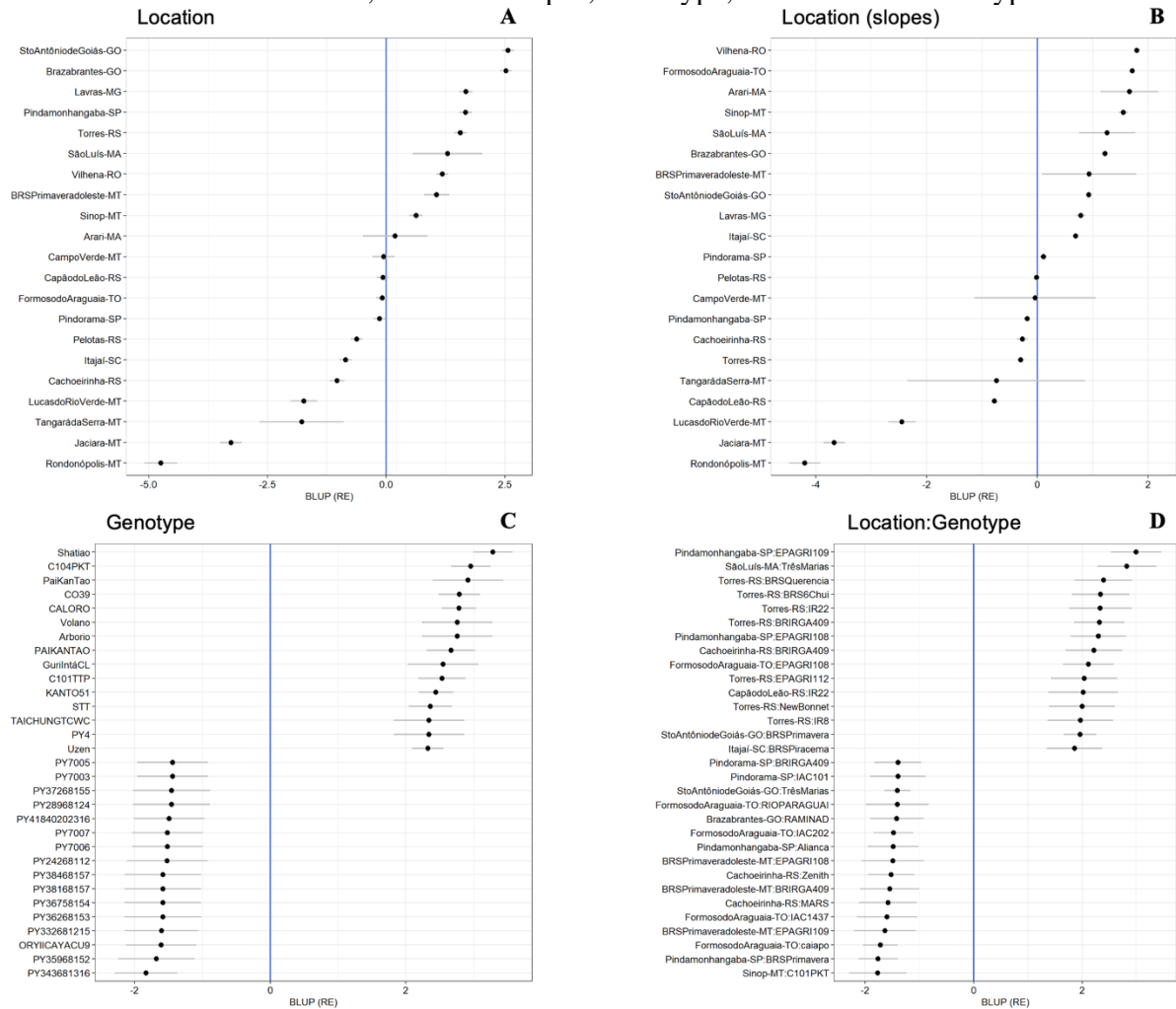
Group D (blue) includes two environments located in the states of Santa Catarina and Rio Grande do Sul, respectively. These environments showed high similarity and had the lowest average severity score (1.4) among all groups. Next, Group C (gray) consists of eight environments from four Brazilian states (Rio Grande do Sul, Mato Grosso, Tocantins, and Maranhão), with an average severity score of 2.9 on the rating scale. Both Groups C and D can be considered mega-environments with low susceptibility to leaf blast (≤ 3).

In contrast, Group B (yellow) includes seven environments from four states (São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso, and Rondônia), which exhibited high homogeneity in severity scores (3.8). Group A (red), consisting of four environments from two states (Mato Grosso and Goiás), showed divergent behavior, recording the highest severity score among all groups (4.9). Both Groups A and B can be considered mega-environments with moderate susceptibility (>3 and ≤ 5 , respectively).

BLUPs for Leaf Blast Severity in Upland Rice

Figure 4 presents the BLUP (Best Linear Unbiased Prediction) analyses, which provide the estimated adjusted random effects for Location, Location Slopes (representing location trends over time), and Genotypes/Lines, as well as their G x L interaction. **Zero values** serve as a neutral reference, indicating that the estimated effect for a given factor (Location, Location Slopes, Genotype, or Location x Genotype Interaction) is equal to the overall mean adjusted by the model. Values close to zero suggest that the factor or interaction does not deviate significantly from the mean. **Positive values** indicate that the environment favored higher leaf blast severity, whereas **negative values** indicate lower severity. Additionally, the variation in severity scores is represented by the lines on the points in all figures.

Figure 4. Caterpillar plot with adjusted BLUPs for leaf blast severity, considering the random effects of Location, Location Slopes, Genotype, and Location:Genotype Interaction.



Source: Author (2024).

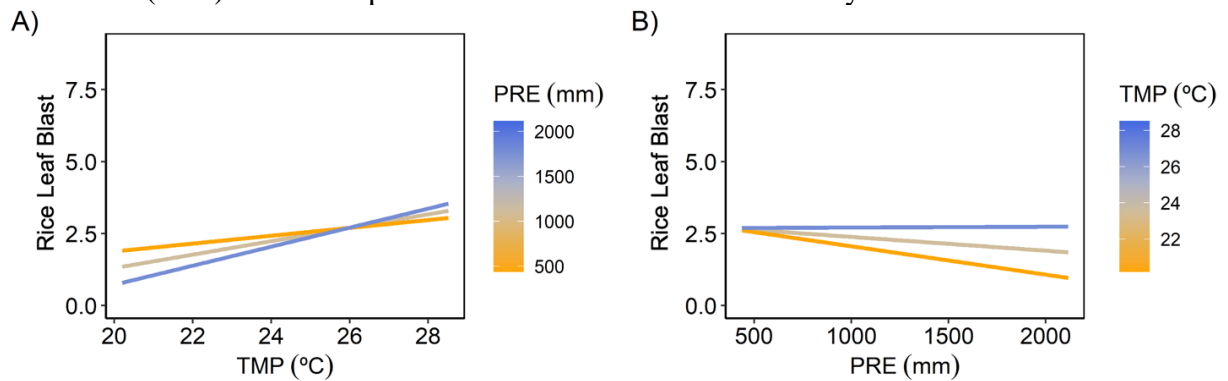
The results in the upper left graph (**Figure 4A**) indicate that environments such as Santo Antônio de Goiás (GO), Brazabrantes (GO), Lavras (MG), and Pindamonhangaba (SP) exhibited, on average, higher severity, whereas Rondonópolis (MT), Jaciara (MT), and Tangará da Serra (MT) showed lower severity. Additionally, the upper right graph (**Figure 4B**) reveals that environments such as Vilhena (RO), Formoso do Araguaia (TO), and Arari (MA) displayed increasing disease severity estimates over time. In contrast, Rondonópolis (MT), Jaciara (MT), and Lucas do Rio Verde (MT) continued to show a decreasing severity score trend over time.

Regarding the behavior of the lines (**Figure 4C**), the analyses revealed that genotypes such as Sha-Tia-Tsao, C104PKT, and Paikan-Tao were, on average, the most susceptible to leaf blast, whereas PY34368316, PY35968152, and ORYIICAYACU9 exhibited greater resistance. The genotype × location interaction (**Figure 4D**) highlights specific combinations that are particularly more susceptible or resistant to the disease (e.g., Sinop × C101PKT).

Influence of Environmental Factors on Leaf Blast Development

The graphs in **Figure 5** demonstrate that both temperature and precipitation influence leaf blast severity, with complex interactions between them. **Figure 5A**, disease severity increased with rising temperature across all precipitation levels, remaining stable at low precipitation levels (500 mm). In **Figure 5B**, disease severity decreased with increasing precipitation, depending on temperature, with a more pronounced effect at lower temperatures (22°C). The results indicate that temperature has a greater impact on blast development than increased rainfall; however, high precipitation levels reduce disease severity, particularly at temperatures between 22–25°C.

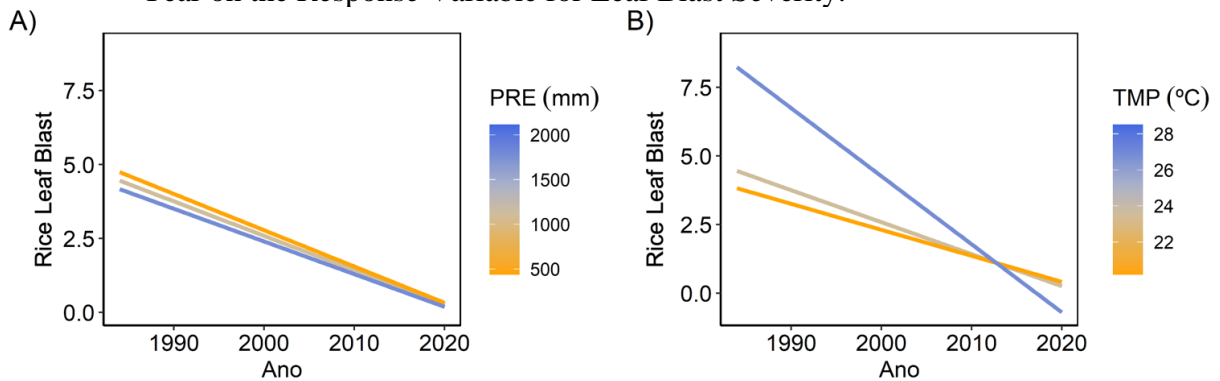
Figure 5. Simultaneous Effects of Continuous Variables Temperature (TMP) and Precipitation (PRE) on the Response Variable for Leaf Blast Severity.



Source: Author (2024).

The graphs in **Figure 6** show that leaf blast severity in upland rice has consistently decreased over the years, regardless of precipitation (PRE) and temperature (TMP) levels. In **Figure 6A**, the decline in severity is observed across all precipitation levels, being slightly more pronounced at lower levels (500 mm). In **Figure 6B**, a reduction in disease severity is also observed across all temperature ranges, though it is more pronounced at higher temperatures (28°C), likely due to greater breeding efforts focused on developing improved cultivars for these regions.

Figure 6. Impact of the Continuous Variables Temperature (TMP), Precipitation (PRE), and Year on the Response Variable for Leaf Blast Severity.

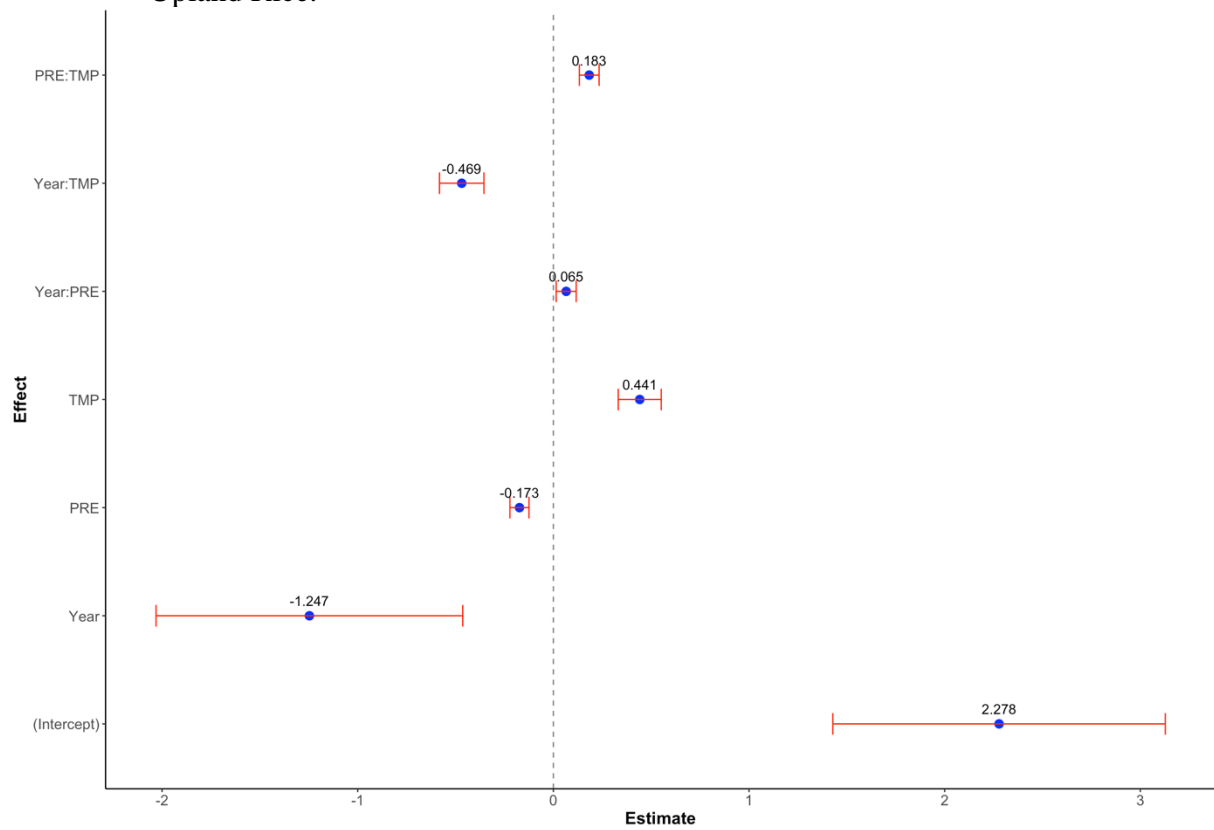


Source: Author (2024).

Coefficients and Confidence Intervals of Fixed Effects Considered in the Statistical Model

The coefficient estimates revealed that both individual variables and their interactions have statistically significant effects on leaf blast severity in upland rice (**Figure 7**). Specifically, disease severity decreased by -1.25 every 10 years, resulting in a cumulative progress of -4.50 over the 36 growing seasons considered in this study. This highlights the substantial improvements in the development of more resistant genotypes in Brazil. Additionally, the results once again confirm that increased precipitation is associated with reduced disease severity (-0.17), while higher temperatures are linked to increased severity (0.44). Regarding variable interactions, the year x temperature combination had an effect that reduced severity, whereas the year x precipitation interaction slightly increased disease severity (0.06), suggesting that rainier years may not always have as beneficial an effect as expected. Finally, the precipitation x temperature interaction was associated with an increase in severity (0.18), indicating that when both precipitation and temperature are high, a microclimate favorable for disease development is created.

Figure 7. Estimates of Fixed Effects and Their Confidence Intervals for Leaf Blast Severity in Upland Rice.



Source: Author (2024).

4. DISCUSSION

Evaluation and Selection of Environments in Leaf Blast Assessment Trials

The present study indicates a geographical diversification in leaf blast severity, which may be associated with various factors, such as climatic conditions that either favor or hinder the interaction between the fungus *Magnaporthe oryzae* and rice genotypes. Castejón-Muñoz (2008), found that climatic parameters, such as temperatures between 26 and 30°C and relative humidity around 90% in the morning, stimulate spore production by the pathogen, consequently leading to increased infection and foliar lesions in rice plants.

According to data provided by the National Institute of Meteorology (INMET, 2024), over the past 30 years, the Southeast region recorded an average relative humidity of 80% between 00:00 and 12:00, an average precipitation of 122 mm, and an average temperature of 22°C. In the North region, the average estimates were similar, with a relative humidity of 80% (00:00–12:00), an average precipitation of 133 mm, and an average temperature of 26°C. For the Central-West region, the relative humidity was 85% (00:00–12:00), with an average precipitation of 135 mm and an average temperature of 25°C. In these three regions, the

evaluated genotypes exhibited the highest leaf blast severity scores, which can be well explained by the prevailing environmental conditions observed in these regions over the years of evaluation in the National Blast Nursery (NBN) trials. The range of variation in severity scores among genotypes averaged 2.5 points, with estimates ranging from 2.5 to 5.0.

On the other hand, in the Northeast region, the relative humidity was 80%, with an average precipitation of 150 mm, an average temperature of 28°C, and maximum temperatures exceeding 33°C. Finally, in the Southern region of Brazil, the relative humidity was also 80%, with an average precipitation of 141 mm, an average temperature of 18°C, and minimum temperatures below 14°C.

The North (states of Rondônia and Tocantins), Central-West, and Southeast regions exhibited moderate, humid subtropical, and tropical climates, which can create favorable conditions for increased disease occurrence, as observed in this study. In contrast, extreme temperatures (<17°C and >30°C) and/or high relative humidity at night (>54%) may correlate negatively with disease development, which could explain the lower leaf blast severity scores in the Northeast and South regions of Brazil, where the average severity estimates ranged from 1.1 to 3.0 (PANDIT et al., 2023). It is important to highlight that these temperature, relative humidity, and rainfall conditions occurred during the establishment and conduction periods of the experiments for evaluating leaf blast severity in rice genotypes.

From the study of the severity x environment relationship, it is also possible to group environments/locations based on disease severity scores, creating so-called mega-environments, which are used to enhance the targeting of strategies in the rice breeding program. According to Salleh et al. (2022), environmental stratification has become a highly important tool for reducing the G x E interaction, by subdividing or grouping regions based on soil type, rainfall distribution, and temperature gradients. This approach greatly aids the selection and recommendation process of adapted and stable cultivars.

Considering the environments from the A and B groups (moderate susceptibility), in addition to serving as testing sites to evaluate the potential of lines under high disease pressure, they should be regarded as priority areas for the introduction of cultivars with broad resistance (the ability to resist multiple pathogen races) (**Figure 3**). These environment-based severity analyses will allow for a more tailored approach during genotype selection, focusing on those with specific resistance to particular environmental conditions. This strategy could facilitate the selection of parental genotypes for generating segregating populations with higher resistance levels (PANDA et al., 2023).

Furthermore, information on similarities and dissimilarities between environments could also help breeding programs become more efficient in selecting field trial locations, avoiding the repetition of environments with similar climatic profiles and/or disease severity levels, and allowing for the selection of lines/genotypes with greater adaptability and stability across different regions. The adoption of such strategies would enable more effective management of rice blast, while also contributing to cost reduction within the breeding program (GOMES BRANQUINHO et al., 2014).

In order to more accurately identify environments with lower and higher disease severity and to assist in the selection of sites for future trials, BLUP (Best Linear Unbiased Prediction) means were analyzed. These estimates provide detailed information on genetic effects and the G x E interaction, allowing the identification of genotypes with broad resistance, which can be recommended for multiple environments.

Considering that Santo Antônio de Goiás, Brazabrantas, Lavras, and Pindamonhangaba exhibited, on average, higher disease severity, this information is highly valuable for conducting a breeding program for blast resistance, as locations with high disease incidence should be prioritized for identifying superior genotypes. Conversely, the environments of Rondonópolis, Jaciara, and Lucas do Rio Verde showed the lowest average severity estimates and even demonstrated a decline in severity scores over time. This observation initially raises an important question regarding the continued inclusion of these locations in the upland rice breeding program within the NBN trials.

The BLUP analyses also allowed for the evaluation of location x genotype interactions, such as the example of Sinop with the C101PKT line, which exhibited the lowest disease severity score. This type of combination should be considered to enhance grain yield and promote the sustainability of upland rice cultivation.

Climatic Factors and Their Influence on Genetic Advances for Leaf Blast Control

Studies on environmental factors and their association with blast development have shown that temperature is the primary determining factor, being positively correlated with the disease. According to Kirtphaiboon et al. (2021), studying the dynamics and severity of blast in rice under tropical climate conditions through modeling, the researchers found that temperature is the primary factor affecting disease incidence. As temperature increases, disease severity also intensifies.

However, an unexpected reduction in blast severity with increasing precipitation has been observed, which may be related to excessive rainfall causing spore leaching or creating a microclimate unfavorable for pathogen development. In studies conducted to quantify *M. oryzae* conidia, Da Silva and Prabhu (2005) reported this inverse relationship between precipitation levels and the lower number of conidia collected in volumetric traps.

Similarly, a reduction in leaf blast severity over time was observed in upland rice lines, regardless of the climatic factors evaluated (temperature and precipitation). Analyzing the disease progression, an average reduction of 1.25 on the severity rating scale every 10 years was estimated. This finding demonstrates, as emphasized by Oliveira et al. (2021), that efforts in genetic breeding programs aimed at developing more resistant genotypes have significantly contributed to the reduction in disease severity.

Additionally, it is important to consider the various approaches being used for cultivar development, including the use of molecular markers, which facilitate the identification and incorporation of resistance genes, as well as advances in tolerance to various other types of stress (e.g., drought tolerance). These factors may directly or indirectly contribute to these results (LANNA et al., 2012; SAHU et al., 2022).

5. FINAL REMARKS

Finally, the integration of geographical information and environmental conditions into statistical models enhances the understanding of the pathogen-host relationship, allowing for the identification of superior cultivars for specific regions. Based on this, recommendations can be made for other environments with similar characteristics, thereby increasing the effectiveness of decision-making in upland rice breeding programs.

REFERENCES

- BORÉM, A.; MIRANDA, G.; FRITSCHÉ-NETO, R. **Melhoramento de plantas**. Editora UFV, 7 ed. 543 p. 2017.
- CASTEJÓN-MUÑOZ, M. The effect of temperature and relative humidity on the airborne concentration of *Pyricularia oryzae* spores and the development of rice blast in southern Spain Introduction 1. **INIA) Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 6, n. 1, p. 61–69, 2008.
- COSTA NETO, G. M. F.; BATISTA DUARTE, J.; PEREIRA DE CASTRO, A.; BRYAN HEINEMANN, A. Uso de Informações Ambientais na Modelagem e Interpretação da Interação Genótipo x Ambiente. 2020, p. 1–48.
- DEVANNA, B. N.; JAIN, P.; SOLANKE, A. U.; DAS, A.; THAKUR, S.; SINGH, P. K.; KUMARI, M.; DUBEY, H.; JASWAL, R.; PAWAR, D.; KAPOOR, R.; SINGH, J.; ARORA, K.; SAKLANI, B. K.; ANILKUMAR, C.; MAGANTI, S. M.; SONAH, H.; DESHMUKH, R.; RATHOUR, R.; SHARMA, T. R. Understanding the Dynamics of Blast Resistance in Rice-Magnaporthe oryzae Interactions. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 6, 1 jun. 2022. doi: 10.3390/jof8060584.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Cadeia produtiva de arroz**. 21 ed. Embrapa Arroz e Feijão. 280 p. 2003.
- FICK, S. E.; HIJMANS, R. J. WorldClim 2: new 1-km spatial resolution climate surfaces for global land areas. **International Journal of Climatology**, v. 37, n. 12, p. 4302–4315, 1 out. 2017. doi: 10.1002/joc.5086.
- FOSTER, A. J.; MARTIN-URDIROZ, M.; YAN, X.; WRIGHT, H. S.; SOANES, D. M.; TALBOT, N. J. CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein-mediated co-editing and counterselection in the rice blast fungus. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2018. doi: 10.1038/s41598-018-32702-w.
- GHINI, R. **Mudanças Climáticas globais e doenças de plantas**. 2005. [s.l.: s.n.].
- GOMES BRANQUINHO, R.; DUARTE, J. B.; MELLO DE SOUZA, P. I.; DA SILVA NETO, S. P.; MIRANDA PACHECO, R. Estratificação ambiental e otimização de rede de ensaios de genótipos de soja no Cerrado. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 49, n. 10, p. 783–795, 2014. doi: 10.1590/S0100-204X2014001000005.
- GREVEN, S.; KNEIB, T. **Marginal and Conditional Akaike Information Criteria in Linear Mixed Models**. [s.l.: s.n.]. Acesso em: 27 maio. 2024.
- HAQUE, E.; TANIGUCHI, H.; HASSAN, M. M.; BHOWMIK, P.; KARIM, M. R.; ŠMIECH, M.; ZHAO, K.; RAHMAN, M.; ISLAM, T. Application of CRISPR/Cas9 genome editing technology for the improvement of crops cultivated in tropical climates: Recent progress, prospects, and challenges. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, 8 maio 2018. doi: 10.3389/fpls.2018.00617.
- HARRIS, I., OSBORN, T.J., JONES, P. ET AL. Version 4 of the CRU TS monthly high-1001 resolution gridded multivariate climate dataset. *Sci Data* 7, 109 (2020). 1002 <https://doi.org/10.1038/s41597-020-0453-3>

- HUANG, J.; COOK, D. E. CRISPR-Cas12a ribonucleoprotein-mediated gene editing in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe oryzae*. **STAR Protocols**, v. 3, n. 1, 18 mar. 2022. doi: 10.1016/j.xpro.2021.101072.
- INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA (INMET). 2024. Normais Climatológicas. Available: https://clima.inmet.gov.br/NormaisClimatologicas/1961-1990/precipitacao_acumulada_mensal_anual . Accessed 7 Mar 2024.
- INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE (IRRI). **Standard evaluation system for rice**. Manila: IRRI, 1996.
- INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE (IRRI) 2013. Standard Evaluation System for Rice (SES). Disponível em: <https://ricepedia.blogspot.com/2018/04/2013-irri-ses-standard-evaluation.html>. Acesso em: 19 jan. 2025.
- KARLING FACCHINELLO, P. H.; MACEDO FEIJÓ, M.; ANIBELE STRECK, E.; ALMEIDA AGUIAR, G.; RAMOS PEREIRA, R.; BUENO LONGARAY, M.; MARTINS DE MAGALHÃES JR, A. **ADAPTABILIDADE E ESTABILIDADE DE LINHAGENS DE ARROZ IRRIGADO NO ENSAIO REGIONAL PARA O SUL DO BRASIL**. [s.l: s.n.] . Acesso em: 27 maio. 2024.
- KIRTPHAIBOON, S.; HUMPHRIES, U.; KHAN, A.; YUSUF, A. Model of rice blast disease under tropical climate conditions. **Chaos, Solitons and Fractals**, v. 143, 1 fev. 2021. doi: 10.1016/j.chaos.2020.110530.
- LANNA, A. C.; ALVES DE FIGUEIREDO CARVALHO, M.; HEINEMANN, A. B.; STEIN, V. C. **Panorama Ambiental e Físio-Molecular do Arroz de Terras Altas**. 2012. [s.l: s.n.].
- MALAVOLTA, V. M. A.; AZZINI, L. E.; BASTOS, C. R.; SALOMON, M. V.; LOPES DE CASTRO, J. Progresso da brusone nas folhas e panículas de genótipos de arroz de terras altas. **Summa Phytopathol**, v. 34, n. 2, p. 186–188, 2008. Acesso em: 27 maio. 2024.
- MARTINS NUNES, C. D.; MOTA, M. S.; FÉLIX DE CARVALHO, F. I.; COSTA DE OLIVEIRA, A. Variabilidade de *Pyricularia oryzae* Cav. em genótipos de arroz. **Pesq. Agropec. Trop.**, v. 44, n. 3, p. 263–270, 2014.
- NALLEY, L.; TSIBOE, F.; DURAND-MORAT, A.; SHEW, A.; THOMA, G. Economic and Environmental Impact of Rice Blast Pathogen (*Magnaporthe oryzae*) Alleviation in the United States 2016.pdf. v. 11, n. 12, p. 15, 2016.
- OLIVEIRA NIZOLLI, V.; PEGORARO, C.; COSTA DE OLIVEIRA, A. Rice blast: strategies and challenges for improving genetic resistance Rice blast: strategies and challenges for improving genetic resistance ARTICLE. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 21, n. S, p. 387721–387730, 2021. doi: 10.1590/1984.
- PANDA, S.; NAVEEN KUMAR, R.; PAVANI S, L.; GANESAN, S.; SINGH, P. K.; SAH, R. P.; PADMAKUMAR, V.; SUBUDHI, H.; MAHENDER, A.; ANANDAN, A.; ALI, J. Multi-environment evaluation of rice genotypes: impact of weather and culm biochemical parameters against sheath blight infection. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, 2023. doi: 10.3389/fpls.2023.1280321.

PANDIT, D.; SINGH, A. K.; SINGH, S. K.; SINGH, V. B. Effect of weather parameters on the development and progression of rice blast disease in Jammu plains. **Indian Phytopathology**, v. 76, n. 1, p. 89–94, 1 mar. 2023. doi: 10.1007/s42360-022-00577-7.

PEIXOTO DE MORAIS JÚNIOR, O.; MELO, P. G. S.; MORAIS, O. P. de; FILHO, J. C. Variabilidade genética durante quatro ciclos de seleção recorrente em arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 52, n. 11, p. 1033–1041, 2017. doi: 10.1590/S0100-204X201700110000x.

PENG, S.; DING, Y.; LIU, W.; LI, Z. 1 km monthly temperature and precipitation dataset for China from 1901 to 2017. **Earth System Science Data**, v. 11, n. 4, p. 1931–1946, 13 dez. 2019. doi: 10.5194/essd-11-1931-2019.

PETER M. Rice Blast Research Reveals Details of How a Fungus Invades Plants. K-State. 2013. Available: <http://www.k-state.edu/today/announcement.php?id=9034&category=research&referredBy=K-State>. Accessed 7 Mar 2024.

SAHU, P. K.; SAO, R.; CHOUDHARY, D. K.; THADA, A.; KUMAR, V.; MONDAL, S.; DAS, B. K.; JANKULOSKI, L.; SHARMA, D. Advancement in the Breeding, Biotechnological and Genomic Tools towards Development of Durable Genetic Resistance against the Rice Blast Disease. **Plants**, v. 11, n. 18, 1 set. 2022. doi: 10.3390/plants11182386.

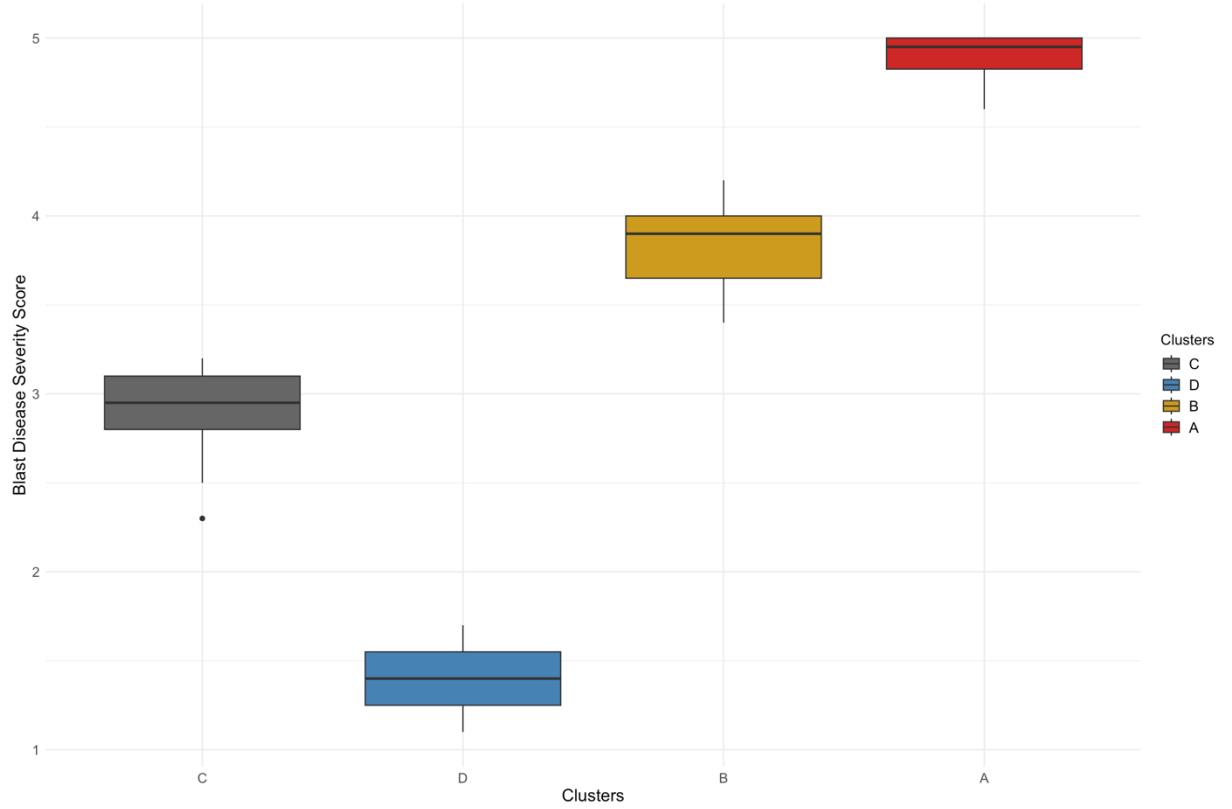
SALLEH, S. B.; RAFII, M. Y.; ISMAIL, M. R.; RAMLI, A.; CHUKWU, S. C.; YUSUFF, O.; HASAN, N. Genotype-by-environment interaction effects on blast disease severity and genetic diversity of advanced blast-resistant rice lines based on quantitative traits. **Frontiers in Agronomy**, v. 4, 7 dez. 2022. doi: 10.3389/fagro.2022.990397.

SILVA, G. B.; PRABHU, A. S. Quantificação de Conídios de *Pyricularia grisea* no Plantio Direto e Convencional de Arroz de Terras Altas. **Fitopatol. bras**, v. 30, n. 6, p. 569–573, 2005.

VELÁSQUEZ, A. C.; CASTROVERDE, C. D. M.; HE, S. Y. Plant–Pathogen Warfare under Changing Climate Conditions. **Current Biology**, v. 28, n. 10, p. R619–R634, 21 maio 2018. doi: 10.1016/j.cub.2018.03.054.

APPENDIX

Figure S1. Mean Leaf Blast Severity (*M. oryzae*) by Environment Groups in Brazil, Associated with the Dendrogram.



Source: Author (2024).

ARTIGO 2 - LINHAGEM DE ARROZ SUPEREXPRESSANDO O *AtDREB1a* MOSTRA RESPOSTA POSITIVA DAS PLANTAS DESAFIADAS POR ESTRESSE BIÓTICO

Artigo elaborado de acordo com as normas do periódico *Journal of Phytopathology*

Gerald Sormanti¹, Flavia B. S. Botelho¹, Vibha Srivastava²

¹ Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil.

² Departamento Cultura, Solos, Ciências Ambientais, Universidade de Arkansas, Fayetteville, Arkansas, EUA.

Email: vibhas@uark.edu

RESUMO

Os fungos de solo podem interferir de forma significativa no desempenho fenotípico das plantas da cultura do arroz. Ao longo dos anos, principalmente, no sistema de cultivo inundado, a incidência de tais fungos tem gerado uma preocupação intensa dentro da cadeia produtiva do cereal, fazendo com que a pesquisa se direcione para alcançar medidas assertivas e eficientes. O emprego da biotecnologia aliada ao melhoramento genético tem sido considerada uma estratégia promissora no intuito de obter genótipos resistentes aos ataques de fungos de solo. Assim, objetivou-se com a execução do trabalho, analisar o efeito da superexpressão do gene *DREB1a* (*RD29a:DREB1a*) em linhagens transgênicas de arroz Taipei-309 infectadas com fungos de solo, comparando-as com seu parental selvagem não inoculado, no desenvolvimento fenotípico das plantas. O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia da Universidade de Arkansas, EUA, entre os meses de julho a setembro de 2024. O fungo de solo foi isolado a partir de amostras da própria casa de vegetação e amostras foram enviadas para sua identificação. O substrato comercial utilizado foi misturado com o inóculo e, posteriormente, as plantas foram transferidas aos vasos, mantendo-as por duas semanas. As plantas em V3-V4 foram avaliadas para determinar a influência da ocorrência da doença nas características: altura das plantas, peso fresco da parte aérea e peso fresco da raiz. Foram realizadas análises de correlação de Pearson entre características agronômicas; Análises de Componentes Principais (PCA); Análises Multivariadas (MANOVA) para determinar a influência dos fatores genéticos, inoculação e interação entre ambas sobre as características agronômicas; teste Scottknott para determinar diferenças de suscetibilidade ao fungo inoculado entre genótipos; e, finalmente teste Scottknott para determinar diferenças entre as plantas inoculadas comparadas com as não inoculadas. Os resultados indicaram uma resposta de defesa melhor das plantas transgênicas relativamente às selvagens, principalmente para a característica de peso fresco da raiz. Foi possível comprovar que a superexpressão do gene *DREB1a* melhora a resposta das plantas de arroz aos fungos de solo, sendo um novo papel do gene na influência positiva contra estresses bióticos, fato ainda, não relatado na literatura.

Palavras-chave: melhoramento genético; biotecnologia vegetal; resistência a doenças.

1. INTRODUÇÃO

A cultura de arroz é altamente afetada por fatores abióticos e bióticos. Diante disso, o melhoramento genético utilizando abordagens de biotecnologia para identificar e incorporar genes que melhorem a tolerância das plantas aos estresses, tem se tornado cada vez mais frequente pelos pesquisadores a nível mundial (HAQUE et al., 2021; DAS; PATRA; BAEK, 2017).

Considerando as mudanças climáticas acentuadas nos últimos anos, fatores abióticos como temperaturas extremas ou estresse hídrico, têm gerado grande preocupação à cadeia produtiva e se tornado um desafio a ser enfrentado por parte dos melhoristas (MASUTOMI et al., 2019; NAHAR et al., 2018). Nesse sentido, o gene *DREB1a*, inicialmente investigado em *Arabidopsis thaliana*, pertencente à família DREB de fatores de transcrição, destaca-se devido a sua capacidade de regular a expressão de genes responsivos ao estresse hídrico, ligando-se aos Cis Elementos Regulatórios ou CREs do tipo DRE (Elementos de Resposta à Desidratação) no DNA (LIU et al., 1998; CHAKRABORTY et al., 2022). Diversos trabalhos têm demonstrado o sucesso da estratégia da introdução ou modificação do referido gene para incremento dessa tolerância em importantes culturas como trigo e arroz (BERCHEMBROCK et al., 2022; YANG et al., 2020).

No entanto, embora os genes *DREBs* estejam principalmente associados ao estresse abiótico, eles podem também influenciar rotas metabólicas relacionadas ao estresse biótico, e vice-versa (AGARWAL et al., 2006). Um exemplo disso é o trabalho de Chini et al. (2004), no qual a partir de uma avaliação da tolerância à seca estabelecida pela expressão aprimorada do gene *ADRI* (associado a resistência a doenças), detectaram que plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* contendo o gene *ADRI* apresentaram um número significativo de genes regulados positivamente e associados com a resposta ao estresse hídrico, dentre eles, o *DREB2A*.

Todos os anos são reportadas perdas significativas na produtividade de arroz associadas às doenças fúngicas e, entre as quais, os fungos de solo são bem conhecidos por sua agressividade (OKUBARA, PEETZ, SHARPE, 2019). Os principais efeitos negativos podem ser associados ao crescimento e desenvolvimento das plantas (diminuição da altura, da biomassa parte aérea e radicular), às atividades fisiológicas (alteração no conteúdo de clorofila e atividades enzimáticas), entre outros que conseqüentemente levam a uma redução dos grãos de arroz produzidos (SHASMITA et al., 2019). Segundo relatos apresentados por Voss-F et al., (2018), os danos causados pelos patógenos de solo na cultura do arroz podem reduzir de 30 a 60% a produtividade de grãos.

A incorporação de genes como *DREB1a*, relacionados direta ou indiretamente com o incremento da tolerância ao estresse biótico e abiótico, oferece uma melhora simultânea de várias características agronômicas importantes, fortalece a capacidade de defesa da planta às doenças, permitindo que ela seja mais duradoura, tudo isso sendo uma opção econômica e amigável com o meio-ambiente (HU et al., 2017; DORMATEY et al., 2020). Contudo, pesquisas que comprovam o efeito direto dos genes da família *DREB* à resistência a patógenos na cultura do arroz é limitado (GUTHA & REDDY., 2008; BERCHEMBROCK et al. 2022; FILYUSHIN et al., 2023)

Diante do exposto, objetivou-se analisar a influência da superexpressão do gene *DREB1a* (*RD29a:DREB1a*) em linhagens transgênicas de arroz Taipei-309 infectadas com fungo de solo, comparando-as com seu parental selvagem não inoculado, no desenvolvimento fenotípico das plantas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

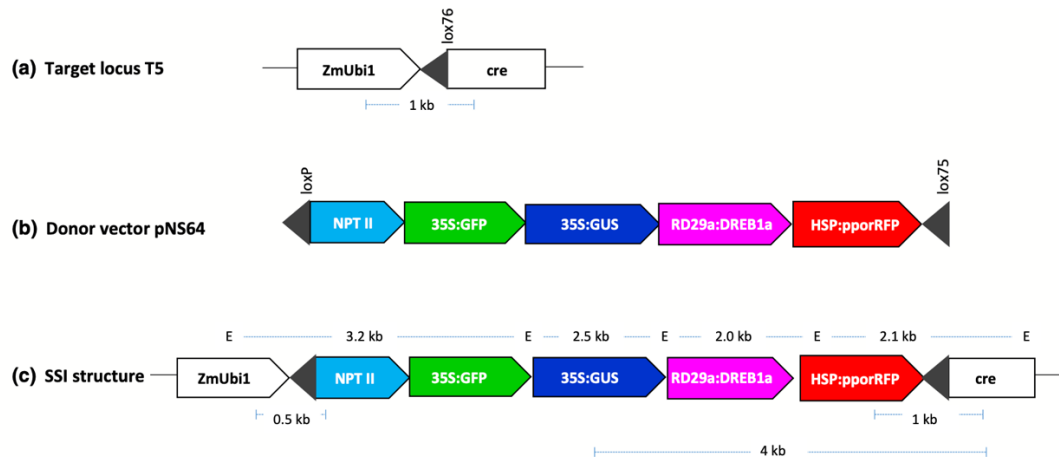
2.1 Local e período de avaliação

O experimento foi desenvolvido na Universidade de Arkansas, Departamento de Cultura, Solo e Ciências Ambientais, Laboratório de Biotecnologia aplicada a Plantas, entre os meses de julho a setembro de 2024.

2.2 Germoplasma

Foram utilizadas linhagens Taipei-309 transgênicas contendo o gene *RD29a:DREB1a* (TR) e seu parental selvagem isogênico (WT). As linhagens homozigotas TR foram desenvolvidas previamente com uma abordagem de integração específica de sítio (SSI), para empilhamento de vários genes e evitando inserções aleatórias no genoma. O processo consistiu de um evento inicial de transformação realizado para introduzir no genoma do arroz o gene *Cre* na região alvo. Esse gene facilita a recombinação posterior com o vetor doador (apresentando sítios IoxP e Iox76 nas extremidades, que atuam como pontos de reconhecimento para a recombinase *Cre*). Na etapa final foi desenvolvido para a região alvo do genoma o vetor doador multigene denominado pNS64, por PATHAK & SRIVASTAVA (2020), conforme apresentado na **Figura 1**, contendo, além do mencionado gene *RD29a:DREB1a*, quatro genes marcadores *NPTII*, *GUS*, *GFP* e *pporRFP*.

Figura 1. Integração do sítio específico para empilhamento de genes. (a) Locus T5 em cultivar de arroz Taipei-309. (b) Vetor doador, pNS64. (c) Estrutura do sítio específico de integração predito que expressa o conjunto de genes selecionados.



Fonte: Pathak e Srivastava (2020).

2.3 Instalação do experimento

As sementes TR e WT foram submetidas a esterilização com álcool 70% (1min), hipoclorito de sódio a 30% (2 vezes, agitando por 15min), lavagem em água destilada e autoclavada (5 vezes, agitando por 20 segundos) e secagem completa utilizando papel toalha autoclavado. Após esse processo, as sementes foram pré-germinadas em meio de cultura ½ MS (15 sementes/placa de Petri), por sete dias.

O fungo de solo utilizado no experimento, foi isolado a partir de amostras coletadas das raízes de arroz localizadas na casa de vegetação na Universidade de Arkansas, e transferido para placas de Petri contendo meio de cultura BDA acidificado. Amostras foram preparadas e enviadas para identificação via análises molecular no laboratório de fitopatologia da Universidade do Estado de Michigan, USA.

Seguidamente, para obter o preparo do inóculo, o fungo foi misturado ao milho (origem comercial), e armazenado por dez dias em condições de temperatura ambiente e fotoperíodo de 12h luz.

Finalmente, as plântulas de ambas as linhagens TR e WT, foram transferidas para vasos contendo 500g de substrato esterilizado (vermiculita + solo). No caso do tratamento de inoculação, foram adicionados ao substrato 10g de inóculo previamente preparado. Já para o controle, adicionou-se apenas o milho sem o fungo. As plantas foram mantidas por duas semanas em câmara de crescimento, temperaturas de 27 °C durante o dia e 22 °C de noite, fotoperíodo de 12h e uma fina camada de água nas bandejas. Empregou-se o delineamento de blocos casualizados com 10 repetições, sendo a parcela constituída de uma planta.

2.4 Avaliações realizadas

No estágio V3-V4 de desenvolvimento das plantas TR e WT, foram realizadas avaliações para determinar a influência da ocorrência da doença nas características: altura das plantas, peso fresco da parte aérea e peso fresco da raiz. A altura foi estimada com o uso de fita métrica, medindo-se desde a base do caule, na altura do solo, até a folha mais distante. Para o peso fresco, as plantas foram cuidadosamente lavadas para remover impurezas e colocadas sobre papel-toalha para secagem. Em seguida, um bisturi foi utilizado para separar a parte aérea da radicular, e ambas as estruturas foram pesadas em uma balança de precisão. Na etapa final, foi realizada uma avaliação da incidência da doença nas raízes das duas linhagens, comparando-se as raízes infectadas com seus respectivos controles. As raízes com sintomas causados pelo fungo (necroses, descoloração, atrofia radicular) foram atribuídas nota 1 e raízes sem sintomas da doença nota 0, para posterior obtenção das notas médias de incidência da doença por genótipo.

2.5 Análise de dados

Os dados obtidos foram processados e analisados estatisticamente utilizando o Software R (readxl, dplyr, factoextra, FactoMineR, ggplot2, ffcorrplot, fields, metan, car, rstatix, lmtest, ggpmisc, ggubr, ggrepel, gridExtra, tidyverse).

Foram realizadas as seguintes análises: correlação de Pearson entre características agronômicas; Análises de Componentes Principais (PCA); Análises Multivariada (MANOVA) para determinar a influência dos fatores genéticos, inoculação e interação entre ambas sobre as características agronômicas; teste Scottknott para determinar diferenças de suscetibilidade ao fungo inoculado entre genótipos e; finalmente teste Scottknott para determinar diferenças entre as plantas inoculadas comparadas com as não inoculadas, para cada genótipo e característica agronômica.

O modelo linear adotado foi o seguinte:

$$Y_{ijkl} = \mu + \text{Genótipo}_i + \text{Fungo}_j + (\text{Genótipo} \times \text{Fungo})_{ij} + \text{Bloco}_k + E_{ijkl}$$

Onde:

Y_{ijkl} representa o fenótipo observado para o genótipo i , na inoculação j , repetição k ; μ é a média geral observada; Genótipo_i é o efeito do genótipo i ; Fungo é o efeito da presença do fungo j ; $\text{Genótipo} \times \text{Fungo}_{ij}$ é o efeito da interação entre o genótipo e o fungo; Repetição_k é o efeito da k -ésima repetição; E_{ijkl} é o erro aleatório.

3. RESULTADOS

Inicialmente, foram obtidos os resultados preliminares das análises moleculares relacionadas com a identificação dos fungos de solo, **Tabela 1**. Com 99% de confiança foi possível identificar o patógeno dentro do filo como Ascomycota da classe Sordariomycetes, em todas as amostras analisadas. Contudo, a partir da classificação em ordens, observou-se a presença de variabilidade na população de patógeno, sendo que, em duas amostras, os patógenos foram identificados como Sordariales. Detectou-se três alternativas de família e gênero, sendo a que apresentou maior confiabilidade pertence à família Lasiosphaeriaceae e ao gênero *Triangularia*.

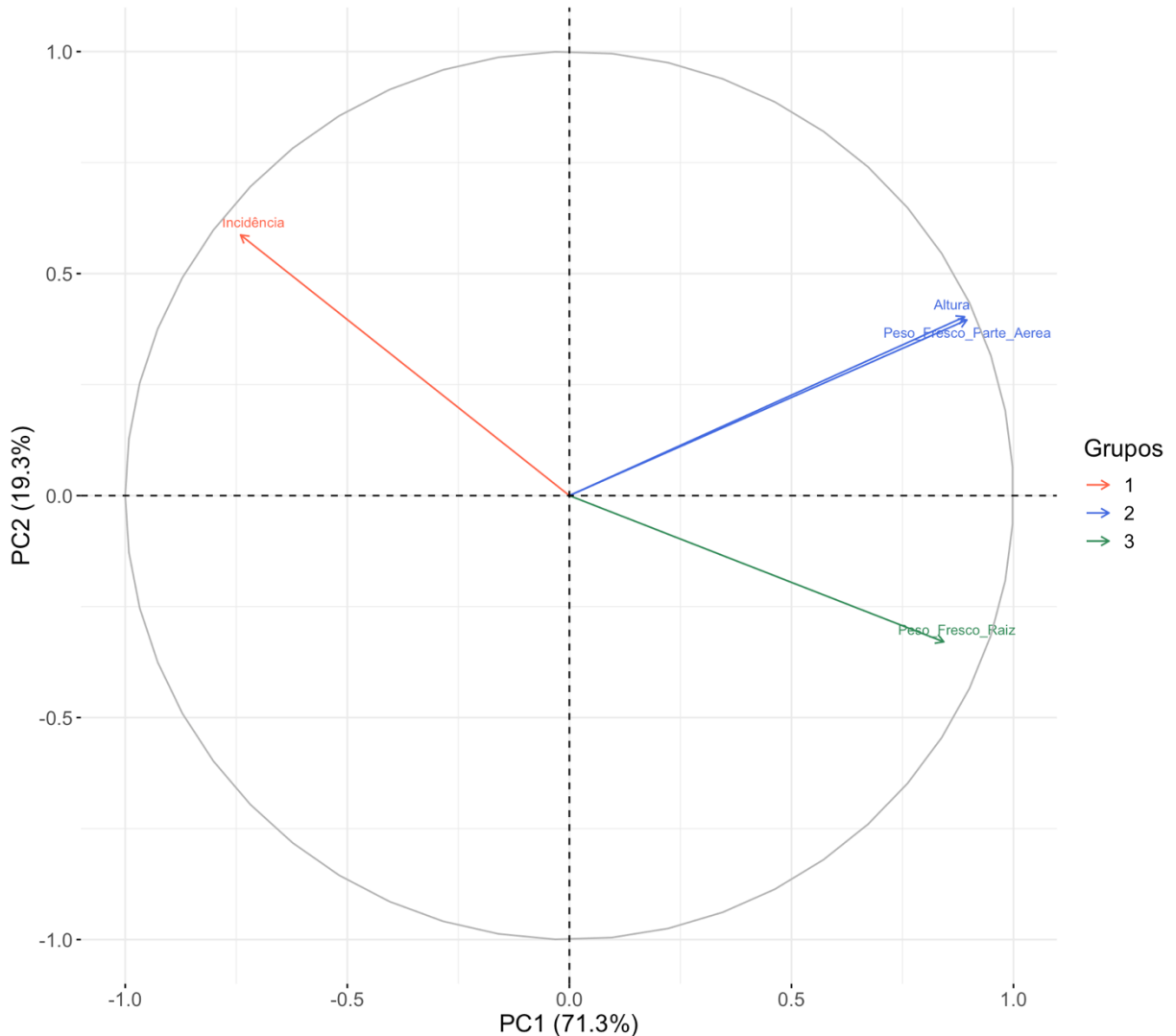
Tabela 1. Sequenciamento das amostras contendo os fungos de solo obtidas de plantas de arroz cultivadas em substrato em casa de vegetação.

Amostras	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero
S1	Ascomycota (99%)	Sordariomycetes (99%)	Sordariales (24%)	Cephalothecaceae (25%)	Gilmaniella (23%)
S2	Ascomycota (99%)	Sordariomycetes (77%)	Rhytismatales (43%)	Annulatascaceae (22%)	Pseudorhizophila (37%)
S3	Ascomycota (99%)	Sordariomycetes (95%)	Sordariales (63%)	Lasio-sphaeriaceae (26%)	Triangularia (53%)

Fonte: Do Autor (2024).

Seguidamente, por meio da análise de componentes principais (PCA) foi possível estimar a contribuição de cada característica agrônômica estudada quanto à variação observada nos genótipos de arroz inoculados com o fungo, sendo que os dois primeiros componentes, explicaram 90,6% da variância total. Na **Figura 2**, o comprimento de cada vetor, representa as características agrônômicas, refletindo sua relevância na diferenciação entre os genótipos. Vetores mais longos indicam maior influência no agrupamento ou separação dos genótipos. Além disso, vetores ou características com direções semelhantes ou próximos apresentam correlação positiva, enquanto aqueles com direções opostas indicam correlação negativa.

Figura 2. Análises de componentes principais das características agrônômicas avaliadas em plantas de arroz inoculadas com o fungo de solo.

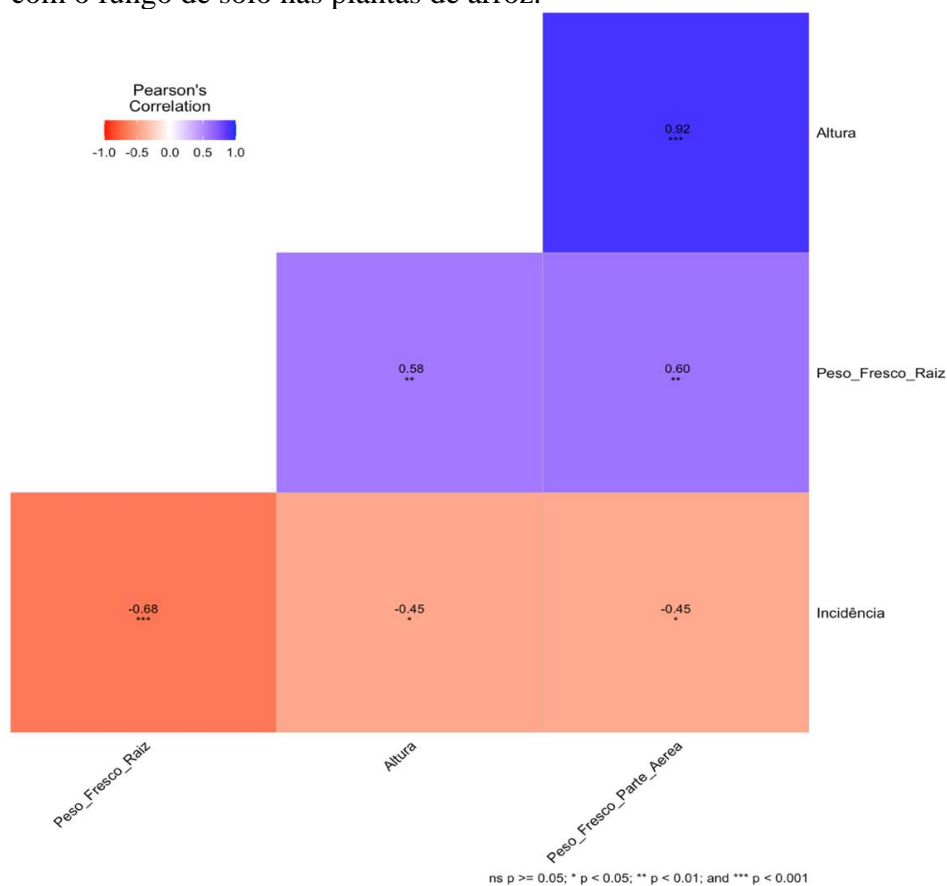


Fonte: Do Autor (2024).

Notavelmente, embora as variáveis de crescimento (altura, peso fresco da parte aérea e da raiz) apresentem uma correlação positiva entre si, elas foram classificadas em dois grupos diferentes (verde e azul). Isso indicaria que a inoculação do fungo no solo não afetou da mesma forma essas características. Além disso, o vetor suscetibilidade apresentou uma marcada correlação negativa com o peso fresco da raiz.

Adicionalmente, com base nas análises de correlação de Pearson apresentada na **Figura 3**, foi possível observar a correlação negativa (-0.68^{***}) entre o peso fresco da raiz e a suscetibilidade ao fungo, sendo estatisticamente significativa e sugerindo que genótipos mais tolerantes apresentaram maior peso quando comparadas com aqueles mais suscetíveis.

Figura 3. Correlação de Pearson entre características agronômicas avaliadas após inoculação com o fungo de solo nas plantas de arroz.



Fonte: Do Autor (2024).

Além disso, tanto a altura quanto o peso fresco da parte aérea demonstraram uma menor influência por parte do fungo, porém sendo igualmente significativa estatisticamente. Levando em consideração tanto o comprimento do vetor “peso fresco da raiz” quanto sua correlação negativa com a suscetibilidade, pode-se afirmar que o fungo afetou principalmente o sistema radicular.

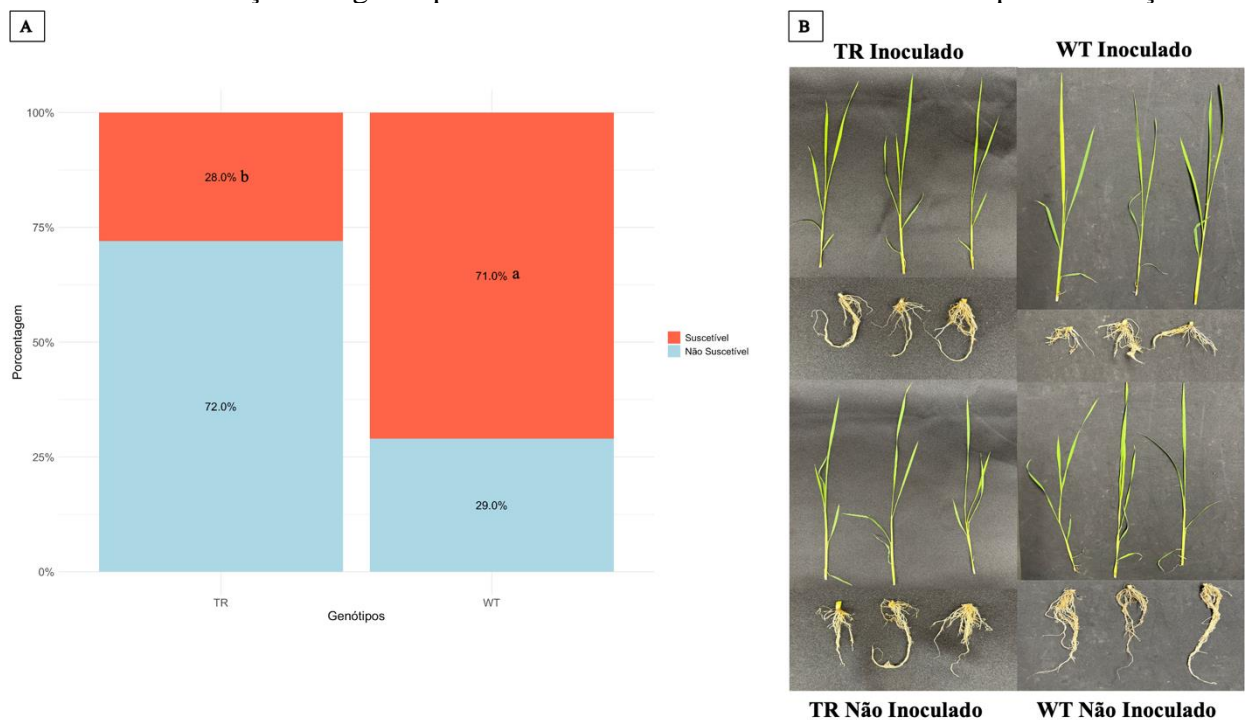
Por outra parte, a análise multivariada de variância confirmou que os genótipos, o fungo e interação genótipos x fungo influenciaram significativamente sobre o conjunto de características agronômicas ($p < 0.001$, Tabela S1 no anexo). Por conseguinte, podemos inferir que os genótipos responderam de forma diferente ao fungo.

O teste de Scottknott realizado para a suscetibilidade destacou essa diferença significativa entre os genótipos WT e TR, **Figura 4A**. O genótipo WT apresentou uma alta suscetibilidade ao fungo (71%), classificado com a letra “a”, enquanto o TR (carregando o gene de interesse) demonstrou uma baixa suscetibilidade (28%), classificado com a letra “b”. Isso

aponta que a introdução do gene *DREB1a* contribuiu no aumento da resistência à infecção do fungo de solo.

Os sintomas gerados pelo fungo nas raízes das plantas de arroz foram observados em ambos os genótipos, porém com maior intensidade no WT, apresentando mais lesões necróticas e raízes atrofiadas, **Figura 4B**. Considerando que a raiz representa a principal porta de entrada dos insumos (água, nutrientes etc.) em uma planta, e que problemas como os observados nesse estrato afetariam diretamente a produtividade de grãos, torna-se imprescindíveis mais investigações aprofundando nos efeitos do gene *DREB1a* nessa resposta ao estresse.

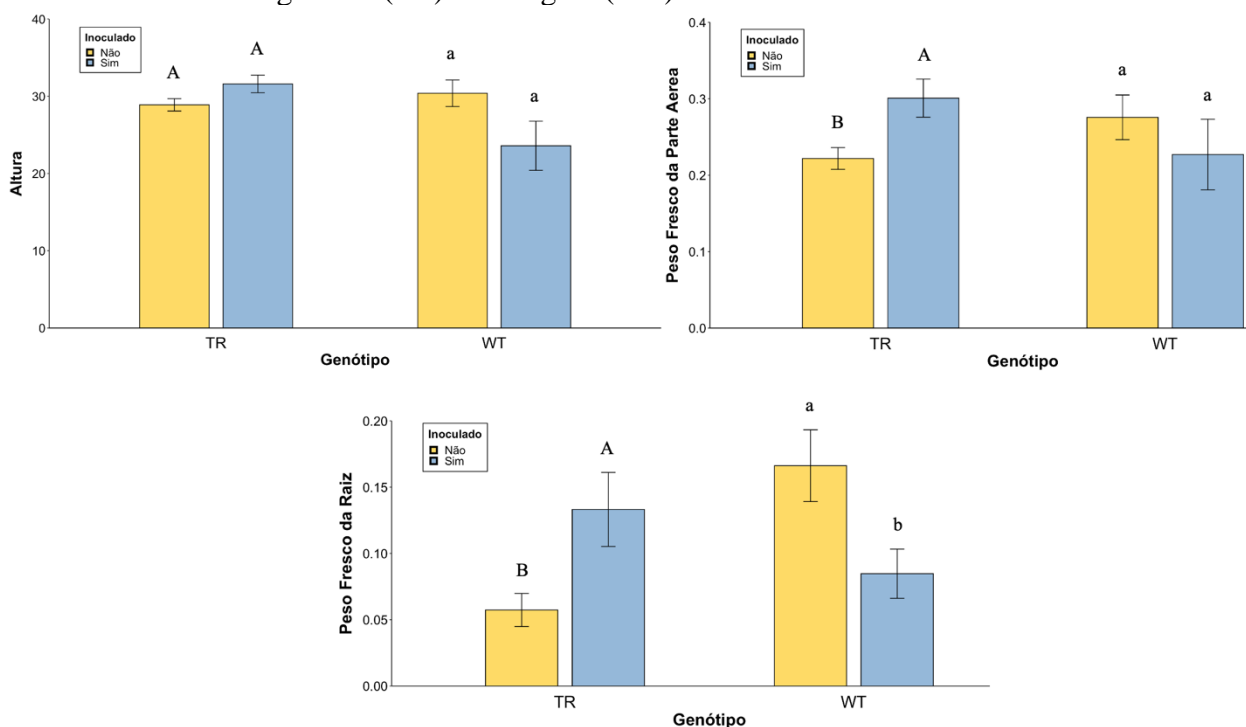
Figura 4. A. Teste Scottknott da porcentagem de raízes com sintomas da doença após inoculação nos genótipos de arroz. B. Plantas de arroz avaliadas após inoculação.



Fonte: Do Autor (2024).

Por último, foram realizados testes Scottknott comparando o desempenho médio de cada genótipo inoculado com seu correspondente não inoculado para as características agrônômicas em estudo, **Figura 5**. Importante ressaltar que, neste caso não foram realizadas comparações diretas entre os genótipos TR e WT, devido a que em trabalhos anteriores foi constatado que a introdução do gene *DREB1a* modifica não apenas a tolerância ao estresse (biótico e/ou abiótico), mas também outras características como o tamanho da planta, gerando um genótipo menor.

Figura 5. Efeito da inoculação na altura, peso fresco da parte aérea e da raiz de genótipos de arroz transgênicos (TR) e selvagem (WT).



Legenda: Letras minúsculas correspondem às comparações entre plantas selvagens inoculadas em relação às não inoculadas. Letras maiúsculas correspondem às comparações de plantas TR inoculadas em relação às não inoculadas.

Fonte: Do Autor (2024).

A primeira constatação obtida pelo gráfico de barras (**Figura 5**) elucidada, em todos os casos, o genótipo selvagem (WT), com uma redução no seu desempenho ao ser inoculado com o patógeno de solo, resultado esperado. Porém, no caso das plantas transgênicas (TR), observou-se efeito contrário apresentando aumentos significativos para várias características. Estudos prévios (dados ainda não publicados), relacionados a análise de transcriptômica nas linhagens TR e WT submetidas ao estresse abiótico, revelaram mudanças na atividade de rotas metabólicas (fotossínteses, biogêneses ribossômica, regulação do ácido jasmônico, regulação da resposta de defesa) que levariam ao TR a armazenar mais recursos e manter-se em um estado de alerta frente ao estresse (preparado para uma rápida resposta). Nesse contexto, a presença do fungo poderia servir como um “gatilho” que ativa mecanismos de defesa e crescimento vegetativo.

Em relação a altura das plantas, o TR inoculado não diferiu estatisticamente do não inoculado, indicado pelas mesmas letras maiúsculas no teste Scottknott. De igual forma o genótipo selvagem (WT) teve um desempenho similar entre o inoculado e não inoculado, representado pelas letras minúsculas. Esses resultados sugerem, que a princípio, a altura não seria uma característica impactada diretamente pelo fungo, e provavelmente, o tempo de

crescimento das plantas antes das avaliações, podem não ter sido suficiente para detectar diferenças entre os genótipos.

No caso do peso fresco da parte aérea, o genótipo TR apresentou diferenças significativas entre tratamentos (letras maiúsculas distintas), indicando que as plantas inoculadas direcionaram mais recursos na produção de biomassa aérea. Tal comportamento não foi detectado no genótipo WT, evidenciado pelas mesmas letras minúsculas.

Constatou-se, na característica peso fresco da raiz, o maior impacto do patógeno e ação do gene *DREB1a*. O genótipo TR inoculado apresentou novamente um maior peso das raízes quando comparado com o não inoculado. No genótipo WT inoculado foi observado o comportamento oposto, com redução significativa do peso médio das raízes.

4. DISCUSSÃO

Os fungos identificados no estudo como pertencentes ao Filo Ascomycota e Ordem Sordariomycetes, com 77 - 99 % de confiança, são amplamente reconhecidos por sobreviver em tecido vegetal suspenso na água, enquadrado com o sistema de cultivo inundado da cultura do arroz (LESLIE & SUMMERELL, 2006). Além disso, eles podem ser transmitidos via sementes contaminadas, e estão se tornando um problema crescente para cultivares de arroz asiáticas (SUNANI et al., 2020). Tais patógenos, também, sobrevivem no solo e em restos de culturas infectadas, podendo gerar até mais de 40% de perdas na produtividade de grãos de arroz (JIANG et al., 2021).

No presente experimento, foram constatados diferentes sintomas gerados pela inoculação, como o apodrecimento das raízes, apodrecimentos das plântulas, anomalias no desenvolvimento das plantas. Esses efeitos são habitualmente gerados por fungos pertencentes à mesma ordem Sordariomycetes (BASHYAL, 2018), e refletem diretamente na redução da produtividade de grãos. Os danos acometidos pelos patógenos na produtividade são severos e variam de 20 a 70%, tanto em regiões de clima tropical como temperado (GNANAMANICKAM, 2009 ; ABBAS et al., 2023).

A análise de componentes principais evidenciou que as características avaliadas sofreram diferentes níveis de danos por parte do fungo inoculado no solo (Figura 2). Tanto o peso fresco da parte aérea quanto a altura, não foram afetadas da mesma forma que a raiz em relação a incidência da doença (correlações não significativas pelo teste de Pearson), possivelmente devido ao experimento ter sido interrompido em V4-V5, sendo pouco tempo para alterar de forma significativa esses caracteres da planta. Contrariamente, o sistema radicular teve contato direto com o fungo desde o transplante, e por isso a detecção de diferença

para esse caráter, indicada na correlação significativa entre a incidência da doença e peso fresco do sistema radicular (Figura 3)

Os resultados demonstram que o gene *DREB1a* contribuiu positivamente para a modulação da resistência de plantas de arroz ao estresse causado pelo fungo de solo. Essa hipótese é reforçada pela baixa incidência da doença nas plantas transgênicas inoculadas em comparação com as selvagens inoculadas. Além disso, o genótipo selvagem inoculado apresentou maiores danos radiculares, com menor desenvolvimento das raízes e sintomas visíveis de necrose, alinhando-se aos níveis de suscetibilidade observados (Figura 4). Por outro lado, nas plantas transgênicas, o sistema radicular se manteve saudável e com um bom desenvolvimento, indicando que o gene *DREB1a* pode atuar, também, em respostas a estresses bióticos, e não exclusivamente a fatores abióticos.

Como mencionado anteriormente, o número de investigações que vinculam diretamente os genes da família *DREB* à resistência a patógenos na cultura do arroz é limitado. No entanto, tais estudos podem representar uma oportunidade para explorar novas aplicações dos genes. Um indicativo dessa nova ação do referido gene, pode ser encontrado no estudo realizado por Filyushin et al. (2023), que identificaram e categorizaram genes *DREB1* e *DREB2* em alho (*Allium sativum* - *As*), e com base nos resultados, concluíram que genes *AsaDREB1* são mais ativos nas raízes e estimulados por infecções de fungos de solo como *Fusarium*. As transcrições de genes *AsaDREB2* também foram modificadas por infecções deste fungo do filo Ascomycota, sugerindo a contribuição nas respostas adaptativas. Foi ressaltada, a provável, contribuição desses genes e suas relevâncias dentro de programas de melhoramento para a resistência ao estresse biótico.

Relatos apresentados por Gutha e Reddy (2008), mencionam que ao superexpressar o gene *OsDREB1B* em plantas de tabaco e, posteriormente, inoculá-las com o *Tobacco streak virus* (TSV), observaram uma melhora significativa da resistência contra o vírus, gerando menos lesões necróticas e menos problemas de desenvolvimento nas plantas, quando comparados o genótipo transgênico com o selvagem. Berchembrock et al. (2022), por meio de uma análise transcriptômica, investigaram as rotas metabólicas reguladas pelo gene *DREB1a* em plantas de arroz submetidas a diferentes tipos de estresse abiótico. No trabalho citam a ativação de rotas de sinalização do ácido jasmônico (JA), do etileno (ET) e fatores de transcrição (TF) da família WRKY. Todas elas são igualmente reconhecidas por seu papel nas respostas de defesa de plantas contra patógenos (DE VLEESSCHAUWER et al., 2014; RUSHTON et al., 2010).

O fato do gene *DREB1a* ser amplamente associado com a tolerância à seca, não implica que sua capacidade de regular essas rotas metabólicas seja supeditada a uma exposição prévia de estresse hídrico. Ramegowda e Senthil-Kumar (2015), apresentam esquemas simplificados que demonstram uma diversidade de genes compartilhados entre a tolerância ao estresse hídrico e a patógenos, capazes de atuar em momentos diferentes de ocorrência desses estresses, afetando a planta de forma sequencial ou simultânea. Nesse caso, os autores mencionam que antecipar a resposta de tolerância ou suscetibilidade torne-se ainda mais complexa devido a que também depende do tempo de exposição a cada estresse, da cultura, e do estágio de desenvolvimento entre outros. Destacam-se fatores de transcrição AP2/ERF e WRKY participando na resposta combinada a ambos os estresses.

Na cultura de arroz, tanto as rotas de sinalização do JA e ET como os membros da família de fatores de transcrição WRKY já foram associadas previamente com a resistência a fungos de solo como *Rhizoctonia solani* (YANG et al., 2023). Os autores realizaram análises transcriptômica dos genótipos de arroz tolerantes comparados com os suscetíveis após inoculação e, identificaram uma ativação e regulação positiva de 20 genes das rotas de sinalização JA e ET. Além disso, no que respeita aos fatores de transcrição da família WRKY, um total de 35 foram regulados positivamente e apenas 6 regulados negativamente.

Em um trabalho similar, Peng et al. (2016) detectaram que um dos genes da família WRKY, o denominado *OsWRKY80*, foi significativamente expresso nas primeiras 24 horas posteriores a inoculação com o patógeno de solo *R. solani*. Igualmente foi constatado um aumento da expressão deste gene induzido por aumentos na concentração de JA e ET. Por meio desses resultados, foram demonstrados o vínculo entre genes da família WRKY com as rotas de sinalização JA e ET, e principalmente o envolvimento na ativação de mecanismos de resposta contra o patógeno de solo.

Um outro ponto a ser abordado, foi o bom desempenho das plantas transgênicas inoculadas para as características agronômicas (altura, peso fresco da parte aérea e da raiz), evento que pode estar diretamente vinculada com o gene *DREB1a* e sua capacidade de regulação otimizada das rotas de sinalização JA, ET e de fatores de transcrição WRKY. Importante mencionar que o conjunto de respostas de uma planta frente ao estresse e o momento de atuação ou não, é controlado de diversas formas, um exemplo disso é apresentado no estudo de Djafi et al. (2013), na qual se constatam vias metabólicas como PI-PLCs desempenhando uma importante função para reprimir os genes *DREB* sob condições normais e de ativá-los em condições de estresse.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

É altamente aconselhável a continuidade das investigações dos genes da família *DREB* para compreender seu papel na resistência contra o estresse biótico. Contudo, ficou comprovado que a superexpressão do gene *DREB1a* melhora a resposta das plantas de arroz aos fungos de solo, sendo um novo papel do gene na influência positiva contra estresses bióticos, fato ainda, não relatado na literatura. Além disso, considerando as características do gene, também seria recomendado conduzir experimentos submetendo as plantas de arroz ao estresse hídrico e de infecção do patógeno, sequencial e combinado (SUZUKI et al., 2014).

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.; MUBEEN, M.; IFTIKHAR, Y.; SHAKEEL, Q.; ARSHAD, H. M. I.; ROMANO, M. del C. Z.; HUSSAIN, S. Rice Sheath Blight: A Comprehensive Review on the Disease and Recent Management Strategies. *Sarhad Journal of Agriculture*, 2023. doi: 10.17582/journal.sja/2023/39.1.111.125.
- AGARWAL, P. K.; AGARWAL, P.; REDDY, M. K.; SOPORY, S. K. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants *Plant Cell Reports*, dez. 2006. . doi: 10.1007/s00299-006-0204-8.
- BASHYAL, B. M. Etiology of an emerging disease: bakanae of rice *Indian Phytopathology* Springer, , 30 dez. 2018. . doi: 10.1007/s42360-018-0091-2.
- BERCHEMBROCK, Y. V.; PATHAK, B.; MAURYA, C.; BOTELHO, F. B. S.; SRIVASTAVA, V. Phenotypic and transcriptomic analysis reveals early stress responses in transgenic rice expressing Arabidopsis DREB1a. *Plant Direct*, v. 6, n. 10, 1 out. 2022. doi: 10.1002/pld3.456.
- CHAKRABORTY, K.; JENA, P.; MONDAL, S.; DASH, G. K.; RAY, S.; BAIG, M. J.; SWAIN, P. Relative contribution of different members of OsDREB gene family to osmotic stress tolerance in indica and japonica ecotypes of rice. *Plant Biology*, v. 24, n. 2, p. 356–366, 1 mar. 2022. doi: 10.1111/plb.13379.
- CHINI, A.; GRANT, J. J.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; LOAKE, G. J. Drought tolerance established by enhanced expression of the CC-NBS-LRR gene, ADR1, requires salicylic acid, EDS1 and ABI1. *Plant Journal*, v. 38, n. 5, p. 810–822, jun. 2004. doi: 10.1111/j.1365-313X.2004.02086.x.
- DAS, G.; PATRA, J. K.; BAEK, K. H. Insight into MAS: A molecular tool for development of stress resistant and quality of rice through gene stacking. *Frontiers in Plant Science*, v. 8, 13 jun. 2017. doi: 10.3389/fpls.2017.00985.
- DE VLEESSCHAUWER, D.; XU, J.; HÖFTE, M. Making sense of hormone-mediated defense networking: From rice to Arabidopsis *Frontiers in Plant Science* Frontiers Media S.A., , 11 nov. 2014. . doi: 10.3389/fpls.2014.00611.
- DJAFI, N.; VERGNOLLE, C.; CANTREL, C.; WIETRZYŃSKI, W.; DELAGE, E.; COCHET, F.; PUYAUBERT, J.; SOUBIGOU-TACONNAT, L.; GEY, D.; COLLIN, S.; BALZERGUE, S.; ZACHOWSKI, A.; RUELLAND, E. The arabidopsis DREB2 genetic pathway is constitutively repressed by basal phosphoinositide-dependent phospholipase C coupled to diacylglycerol kinase. *Frontiers in Plant Science*, v. 4, n. AUG, 8 ago. 2013. doi: 10.3389/fpls.2013.00307.
- DORMATEY, R.; SUN, C.; ALI, K.; COULTER, J. A.; BI, Z.; BAI, J. Gene Pyramiding for Sustainable Crop Improvement against Biotic and Abiotic Stresses, 4 ago. 2020. . doi: 10.20944/preprints202008.0088.v1.
- FILYUSHIN, M. A.; ANISIMOVA, O. K.; SHCHENNIKOVA, A. V.; KOCHIEVA, E. Z. DREB1 and DREB2 Genes in Garlic (*Allium sativum* L.): Genome-Wide Identification,

Characterization, and Stress Response. *Plants*, v. 12, n. 13, 1 jul. 2023. doi: 10.3390/plants12132538.

GNANAMANICKAM, S. S. *Biological Control of Rice Diseases*. [s.l.] Springer Netherlands, 2009.

GUTHA, L. R.; REDDY, A. R. Rice DREB1B promoter shows distinct stress-specific responses, and the overexpression of cDNA in tobacco confers improved abiotic and biotic stress tolerance. *Plant Molecular Biology*, v. 68, n. 6, p. 533–555, dez. 2008. doi: 10.1007/s11103-008-9391-8.

HAQUE, M. A.; RAFII, M. Y.; YUSOFF, M. M.; ALI, N. S.; YUSUFF, O.; DATTA, D. R.; ANISUZZAMAN, M.; IKBAL, M. F. Recent advances in rice varietal development for durable resistance to biotic and abiotic stresses through marker-assisted gene pyramiding Sustainability (Switzerland) MDPI, , 1 out. 2021. . doi: 10.3390/su131910806.

HU, K.; CAO, J.; ZHANG, J.; XIA, F.; KE, Y.; ZHANG, H.; XIE, W.; LIU, H.; CUI, Y.; CAO, Y.; SUN, X.; XIAO, J.; LI, X.; ZHANG, Q.; WANG, S. Improvement of multiple agronomic traits by a disease resistance gene via cell wall reinforcement. *Nature Plants*, v. 3, 17 fev. 2017. doi: 10.1038/nplants.2017.9.

JIANG, H.; WU, N.; JIN, S.; AHMED, T.; WANG, H.; LI, B.; WU, X.; BAO, Y.; LIU, F.; ZHANG, J. Z. Identification of rice seed-derived fusarium spp. and development of lamp assay against fusarium Fujikuroi. *Pathogens*, v. 10, n. 1, p. 1–23, 1 jan. 2021. doi: 10.3390/pathogens10010001.

LESLIE, J. F. .; SUMMERELL, B. A. . *The fusarium laboratory manual*. [s.l.] Blackwell Pub., 2006.

LIU, Q.; KASUGA, M.; SAKUMA, Y.; ABE, H.; MIURA, S.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. 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, Respectively, in Arabidopsis *The Plant Cell*. [s.l.: s.n.].

MASUTOMI, Y.; TAKIMOTO, T.; SHIMAMURA, M.; MANABE, T.; ARAKAWA, M.; SHIBOTA, N.; OOTO, A.; AZUMA, S.; IMAI, Y.; TAMURA, M. Rice grain quality degradation and economic loss due to global warming in japan. *Environmental Research Communications*, v. 1, n. 12, 19 dez. 2019. doi: 10.1088/2515-7620/ab52e7.

NAHAR, A.; LUCKSTEAD, J.; WAILES, E. J.; ALAM, M. J. An assessment of the potential impact of climate change on rice farmers and markets in Bangladesh. *Climatic Change*, v. 150, n. 3–4, p. 289–304, 1 out. 2018. doi: 10.1007/s10584-018-2267-2.

OKUBARA, P. A.; PEETZ, A. B.; SHARPE, R. M. Cereal root interactions with soilborne pathogens—from trait to gene and back *Agronomy* MDPI AG, , 13 abr. 2019. . doi: 10.3390/agronomy9040188.

PENG, X.; WANG, H.; JANG, J. C.; XIAO, T.; HE, H.; JIANG, D.; TANG, X. OsWRKY80-OsWRKY4 Module as a Positive Regulatory Circuit in Rice Resistance Against *Rhizoctonia solani*. *Rice*, v. 9, n. 1, 1 dez. 2016. doi: 10.1186/s12284-016-0137-y.

RAMEGOWDA, V.; SENTHIL-KUMAR, M. The interactive effects of simultaneous biotic and abiotic stresses on plants: Mechanistic understanding from drought and pathogen combination *Journal of Plant Physiology* Urban und Fischer Verlag GmbH und Co. KG, , 5 mar. 2015. . doi: 10.1016/j.jplph.2014.11.008.

RUSHTON, P. J.; SOMSSICH, I. E.; RINGLER, P.; SHEN, Q. J. WRKY transcription factors *Trends in Plant Science* Elsevier Ltd, , 2010. . doi: 10.1016/j.tplants.2010.02.006.

SHASMITA; SWAIN, H.; NAIK, S. K.; MUKHERJEE, A. K. Comparative analysis of different biotic and abiotic agents for growth promotion in rice (*Oryza sativa* L.) and their effect on induction of resistance against *Rhizoctonia solani*: A soil borne pathogen. *Biological Control*, v. 133, p. 123–133, 1 jun. 2019. doi: 10.1016/j.biocontrol.2019.02.013.

SUNANI, S. K.; BASHYAL, B. M.; KHARAYAT, B. S.; PRAKASH, G.; KRISHNAN, S. G.; AGGARWAL, R. Identification of rice seed infection routes of *Fusarium fujikuroi* inciting bakanae disease of rice. *Journal of Plant Pathology*, v. 102, n. 1, p. 113–121, 1 fev. 2020. doi: 10.1007/s42161-019-00390-8.

SUZUKI, N.; RIVERO, R. M.; SHULAEV, V.; BLUMWALD, E.; MITTLER, R. Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytologist*, v. 203, n. 1, p. 32–43, 2014. doi: 10.1111/nph.12797.

VOSS-FELS, K. P.; QIAN, L.; GABUR, I.; OBERMEIER, C.; HICKEY, L. T.; WERNER, C. R.; KONTOWSKI, S.; FRISCH, M.; FRIEDT, W.; SNOWDON, R. J.; GOTTWALD, S. Genetic insights into underground responses to *Fusarium graminearum* infection in wheat. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, 1 dez. 2018. doi: 10.1038/s41598-018-31544-w.

YANG, X.; YAN, S.; LI, Y.; LI, G.; SUN, S.; LI, J.; CUI, Z.; HUO, J.; SUN, Y.; WANG, X.; LIU, F. Comparison of Transcriptome between Tolerant and Susceptible Rice Cultivar Reveals Positive and Negative Regulators of Response to *Rhizoctonia solani* in Rice. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 18, 1 set. 2023. doi: 10.3390/ijms241814310.

YANG, Y.; AL-BAIDHANI, H. H. J.; HARRIS, J.; RIBONI, M.; LI, Y.; MAZONKA, I.; BAZANOVA, N.; CHIRKOVA, L.; SARFRAZ HUSSAIN, S.; HRMOVA, M.; HAEFELE, S.; LOPATO, S.; KOVALCHUK, N. DREB/CBF expression in wheat and barley using the stress-inducible promoters of HD-Zip I genes: impact on plant development, stress tolerance and yield. *Plant Biotechnology Journal*, v. 18, n. 3, p. 829–844, 1 mar. 2020. doi: 10.1111/pbi.13252.

ANEXO**Tabela S1.** Análise Multivariada para os efeitos Genótipo, Inoculação e Interação.

Efeito	Teste de Pillai	Wilks	Hotelling-Lawley	Roy	p-valor
Genótipo	0.61057	0.38943	1.5679	1.5679	< 0.001
Inoculação	0.53067	0.46933	1.1307	1.1307	< 0.001
Genótipo:Inoculação	0.53137	0.46863	1.1339	1.1339	< 0.001

Fonte: Do Autor (2024).