UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS
CURSO DE MESTRADO

GENE DE SUSCETIBILIDADE EM BANANEIRA (*MUSA SP.*) PARA EDIÇÃO GÊNICA VIA CRISPR

Márcio Leandro da Silveira Fonseca

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA

2026

Gene de suscetibilidade em Bananeira (Musa sp.) para edição gênica via CRISPR

Márcio Leandro da Silveira Fonseca

Bacharel em Biologia

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2023

Projeto de dissertação apresentado ao colegiado do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientadora: Dra. Claudia Fortes Ferreira

Coorientadora: Dra. Fernanda dos Santos Nascimento

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA

2026

FICHA CATALOGRÁFICA

Fonseca, Márcio Leandro da Silveira

Gene de suscetibilidade em bananeira (Musa sp.) para edição gênica via CRISPR, 2024.
92 f. il.; 30 cm.

Orientador: Prof. Dra. Claudia Fortes Ferreira
Coorientador: Prof. Dr. Fernanda dos Santos Nascimento

Dissertação (em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2026.

1. Banana 2. Doença de planta. 3. Melhoramento genético I. Ferreira, Claudia Fortes II. Nascimento Fernanda dos Santos III. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia IV. Título.

CDD: 634.772

Ficha catalográfica elaborada por Lucidalva R. G. Pinheiro Perrone- Bibliotecária CRB51161 –Embrapa Mandioca e Fruticultura

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS
CURSO DE MESTRADO

Gene de suscetibilidade em Bananeira (Musa sp.) para edição gênica via CRISPR

Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação de

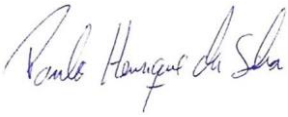
Márcio Leandro da Silveira Fonseca

Aprovado em: 25 de fevereiro de 2026



Dra. Claudia Fortes Ferreira - Embrapa

(Orientadora)



Dr. Paulo Henrique da Silva -- Embrapa.

(Examinador Externo)



Dr. Ricardo Franco Cunha Moreira - UFRB
(Examinador Interno)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais (RGV) e à Embrapa Mandioca e Fruticultura.
À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.
O presente trabalho foi realizado com apoio da CAPES – Código de Financiamento 001.

À minha orientadora, Dra. Claudia Fortes, expresso minha profunda gratidão por toda a orientação e pela constante disponibilidade em contribuir com este trabalho da melhor forma possível.

À minha coorientadora, Dra. Fernanda dos Santos Nascimento, deixo um agradecimento especial. Este trabalho não seria o mesmo sem a sua ajuda. Sou muito grato pelas correções, pelas dicas e, principalmente, por estar sempre disponível para auxiliar. Sua colaboração foi essencial para a finalização deste trabalho.

Aos meus pais, David e Lisineide, por todo o cuidado e por sempre acreditarem em mim.
À minha namorada, Milena, pelo companheirismo. Sua presença constante e seu apoio em todos os aspectos foram essenciais para que eu mantivesse a motivação necessária para concluir este ciclo. Muito obrigado por caminhar ao meu lado.

Ao meu amigo Luiz, pela parceria constante e por dividir comigo cada etapa deste trabalho. Sua ajuda direta em todas as fases da pesquisa foi fundamental para a conclusão desta jornada.

Agradeço a Anelita e Marcelly, que me auxiliaram na fase inicial deste projeto. O apoio de vocês garantiu que o projeto começasse da maneira correta e que eu tivesse a base necessária para iniciar este trabalho.
À Andresa, agradeço por todo o suporte e pelas soluções que trouxe para o trabalho. Sua prontidão em ajudar e em resolver os problemas que surgiram

foram indispensáveis. Ter contado com você foi importante para que os experimentos dessem certo e o trabalho chegasse ao resultado esperado.A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho, o meu muito obrigado.

Gene de suscetibilidade em Bananeira (Musa sp.) para edição gênica via CRISPR

RESUMO: A bananicultura desempenha um papel central na segurança alimentar e na economia de países em desenvolvimento. No entanto, a sustentabilidade da cultura é ameaçada por estresses bióticos severos, como a murcha de *Fusarium*, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc). Diante das limitações do melhoramento genético convencional, impostas pela esterilidade e poliploidia da cultura, a edição gênica via CRISPR/Cas apresenta-se como uma ferramenta estratégica para o desenvolvimento de resistência. Esta dissertação estruturou-se em dois capítulos complementares. O primeiro capítulo sintetizou o progresso global na edição de genes de suscetibilidade (S-genes). A revisão sistemática (PRISMA, 2019–2026) analisou 118 estudos, revelando a concentração de pesquisas na Ásia e o foco em culturas como arroz e tomate. Os genes *MLO, DMR6 e SWEET* consolidaram-se como alvos principais, embora a ocorrência de efeitos pleiotrópicos em alguns casos ressalte a necessidade de validação criteriosa. No segundo capítulo, avaliou-se o perfil transcricional do gene MusaDMR6 na cultivar 'Prata-Anã' (AAB) sob infecção pelo Foc. A metodologia envolveu a inoculação controlada e o monitoramento temporal via RT-qPCR e histoquímica. Os resultados demonstraram uma regulação dinâmica, com repressão inicial seguida de indução significativa às 72 horas após a inoculação, coincidindo com a colonização vascular e a severidade dos sintomas. A integração dos dados aponta o DMR6 como um gene fortemente associado à suscetibilidade nessa cultivar. Este estudo preliminar fornece a base molecular para futuras etapas de validação funcional via nocaute e testes agronômicos, requisitos indispensáveis para confirmar a durabilidade da resistência e compreender o papel fisiológico deste gene na sustentabilidade da bananicultura.

Palavras-chave: *Musa* spp. Melhoramento genético, CRISPR/Cas, Revisão sistemática, *DMR6*, Marcadores moleculares.

Susceptibility gene in banana (Musa spp.) for gene editing via CRISPR

ABSTRACT: Banana cultivation plays a pivotal role in food security and the economy of developing countries. However, crop sustainability is threatened by severe biotic stresses, such as *Fusarium* wilt, caused by the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*). Given the limitations of conventional breeding imposed by sterility and polyploidy, CRISPR/Cas-mediated gene editing emerges as a strategic tool for developing resistance. This thesis was structured into two complementary chapters. The first chapter synthesized global progress in editing susceptibility genes (*S-genes*). A systematic review (PRISMA, 2019–2026) analyzed 118 studies, revealing a concentration of research in Asia and a focus on crops such as rice and tomato. The *MLO*, *DMR6*, and *SWEET* genes were consolidated as primary targets, although the occurrence of pleiotropic effects in some instances underscores the need for rigorous validation. In the second chapter, the transcriptional profile of the *MusaDMR6* gene was evaluated in the 'Prata-Anã' (AAB) cultivar under *Foc* infection. The methodology involved controlled inoculation and temporal monitoring via RT-qPCR and histochemistry. Results demonstrated dynamic regulation, characterized by initial repression followed by significant induction at 72 hours post-inoculation, coinciding with vascular colonization and symptom severity. Data integration points to *DMR6* as a gene strongly associated with susceptibility in this cultivar. This preliminary study provides the molecular basis for future steps of functional validation via knockout and agronomic trials, which are indispensable requirements to confirm resistance durability and understand the physiological role of this gene in banana sustainability.

Key-Words: *Musa spp*. Genetic improvement, CRISPR/Cas, Systematic review, *DMR6*, Molecular markers.

SUMÁRIO

Introdução Geral.....1

Referências 5

CAPÍTULO 1 7

CRISPR Gene Editing for Knockout of Susceptibility Genes in Plant-Pathogen Interactions: A Systematic Review.....8

Introduction.....9

Materials and Methods..... 11

Results..... 15

Discussion 26

CAPÍTULO 2 46

Validação de gene de suscetibilidade em bananeira para estudos de edição gênica no controle de *Fusarium oxysporum f. sp. cubense*..... 46

Material e Métodos 51

Resultados..... 57

Discussão..... 64

Considerações Finais e Perspectivas Futuras..... 74

Referências 75

Conclusão Geral..... 83

Introdução Geral

A banana é uma das frutas mais consumidas no mundo, destacando-se pelo valor nutricional e importância econômica, especialmente em países em desenvolvimento. Sua ampla difusão deve-se à adaptação a diferentes condições climáticas, o que possibilita o cultivo em diversas regiões do planeta (FAOSTAT, 2026).

Em escala global, a banana se configura entre as frutas mais produzidas, com destaque para países da Ásia, África e América Latina, onde exerce papel estratégico tanto na alimentação quanto na economia agrícola, com produção de 135 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2026). O Brasil figura entre os principais produtores mundiais, com safra anual estimada em 7,2 milhões de toneladas destinadas majoritariamente ao abastecimento do mercado interno (Campo et al., 2023; IBGE, 2026).

A cultura da bananeira enfrenta diversos desafios que comprometem a produção e a qualidade dos frutos, principalmente em função de pragas e doenças. Entre as doenças de origem fúngica, a murcha de Fusarium, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), destaca-se como uma das mais destrutivas, representando uma séria ameaça à produção mundial de banana (Velame et al., 2024).

O processo de infecção inicia-se nas raízes, geralmente por meio de ferimentos ou regiões de crescimento ativo. Após a penetração, o fungo coloniza os tecidos vasculares, especialmente os vasos do xilema, onde se multiplica e produz estruturas que obstruem o transporte de água e nutrientes. Como consequência, as plantas apresentam sintomas de amarelecimento, murcha progressiva das folhas e, em casos severos, morte total (Dita et al., 2018).

O ciclo é caracterizado como monocíclico e inicia-se com a germinação de clamidósporos no solo, estimulada por exsudatos radiculares do hospedeiro. Após a penetração nas raízes, o fungo coloniza o xilema e produz microconídios que são transportados passivamente pela corrente transpiratória, causando a obstrução vascular que leva à murcha e clorose (Ploetz, 2015; Warman; Aitken, 2018). Com a morte e necrose dos tecidos da planta, o patógeno reverte para a fase saprofítica, produzindo novas estruturas de resistência que retornam ao solo e garantem sua persistência por décadas, fechando o ciclo epidemiológico (Dita et al., 2018).

Uma das principais características do Foc é a sua capacidade de persistir no solo por longos períodos, mesmo na ausência do hospedeiro. Os clamidósporos podem

permanecer viáveis por décadas, o que dificulta o manejo da doença e favorece sua disseminação em áreas de cultivo (Ploetz, 2015).

O impacto do patógeno é severo em cultivares suscetíveis, podendo levar à perda total da produção em determinadas áreas. Além disso, o Foc apresenta elevada variabilidade genética, sendo classificado em diferentes raças fisiológicas com base na especificidade a determinados genótipos de bananeira. Essa variabilidade dificulta o desenvolvimento de cultivares com resistência ampla e durável, tornando o melhoramento genético um dos principais desafios no manejo da doença (Ordoñez et al., 2015).

O manejo do Foc apresenta limitações significativas, tornando o controle da doença complexo. Estratégias tradicionais, como o uso de fungicidas e práticas culturais, têm eficiência limitada, principalmente devido à colonização vascular do patógeno e à sua elevada capacidade de sobrevivência no solo (Ploetz, 2015).

Assim, medidas como a erradicação de plantas doentes e o uso de mudas sadias contribuem apenas para reduzir a disseminação, sem eliminar o patógeno das áreas infestadas. Nesse contexto, o desenvolvimento de cultivares resistentes é considerado a estratégia mais promissora para o controle ao Foc (Dita, 2018).

No cenário nacional, avanços estratégicos do programa de melhoramento da Embrapa Mandioca e Fruticultura resultaram na identificação de genótipos com alto nível de proteção. Recentemente, as cultivares ‘BRS Princesa’ e ‘BRS Platina’ foram oficialmente classificadas como resistentes à raça 4 de *Foc* (ST4 e TR4) após testes em condições de alta pressão de inóculo na Colombia, onde a doença já se encontra desde 2019, consolidando-se como as principais alternativas tecnológicas para garantir a sustentabilidade da bananicultura frente à ameaça global deste patógeno (EMBRAPA, 2025).

O melhoramento genético convencional da bananeira, por exemplo, enfrenta diversas barreiras biológicas. A maioria das cultivares comerciais apresenta elevado grau de esterilidade, o que restringe a produção de sementes e dificulta a realização de cruzamentos controlados para a introgressão de genes de resistência (Justine et al., 2022).

Além disso, a cultura possui genoma complexo, frequentemente poliploide, o que dificulta a seleção e a fixação de características desejáveis ao longo das gerações devido a irregularidades meióticas e à esterilidade associada à triploidia, que impedem a segregação mendeliana padrão e dificultam a introgressão de alelos de interesse. O ciclo longo da bananeira também representa um entrave, pois prolonga o tempo necessário para

a avaliação agronômica, fitossanitária e de qualidade dos frutos, tornando o processo de melhoramento lento e oneroso (Ortiz; Swennen, 2014).

Outro desafio é a dificuldade de manter características agronômicas desejadas, como produtividade, qualidade dos frutos e aceitação pelo mercado, ao se introduzir resistência a doenças por meio do melhoramento convencional. Muitas vezes, genótipos resistentes apresentam desempenho agronômico inferior ou características indesejáveis para o consumo e a comercialização, o que limita sua adoção pelos produtores. Dessa forma, torna-se necessária a adoção de estratégias alternativas e mais precisas, como as ferramentas biotecnológicas, para o desenvolvimento de bananeiras resistentes à murcha de Fusarium (Justine et al., 2022).

Entre as abordagens biotecnológicas, destaca-se a edição gênica baseada no sistema CRISPR/Cas (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), que permite modificações específicas no genoma de forma precisa e eficiente. Essa tecnologia tem sido aplicada com sucesso na obtenção de resistência a patógenos por meio da inativação de genes de suscetibilidade, sem a necessidade de introdução de DNA exógeno (Li et al., 2022).

O sistema CRISPR foi inicialmente identificado em bactérias como parte de um mecanismo de defesa adaptativo contra vírus, quando sequências repetitivas foram observadas no genoma de *Escherichia coli* (Jinek et al., 2012; Ishino et al., 2018). Estudos posteriores demonstraram que essas sequências estavam associadas à incorporação de fragmentos de DNA de patógenos, formando um sistema imunológico capaz de reconhecer e neutralizar infecções subsequentes (Jansen et al., 2002; Mojica et al., 2005; Barrangou et al., 2007).

A adaptação desse mecanismo para a edição genética ocorreu quando se demonstrou que a nucleasse Cas9 poderia ser programada para clivar sequências específicas de DNA por meio de um RNA guia (gRNA), derivado da fusão entre crRNA e tracrRNA (Jinek et al., 2012).

No sistema CRISPR/Cas9, o gRNA direciona a enzima Cas9 até a região alvo do genoma, onde é realizado um corte de dupla fita no DNA. Esse corte é reparado pelos mecanismos celulares, podendo resultar na inativação do gene ou na introdução de modificações desejadas. Posteriormente, o sistema foi adaptado para edição em células eucarióticas, ampliando suas aplicações na biomedicina e no melhoramento de plantas (Cong et al., 2013; Hsu et al., 2014; Wang et al., 2016).

A tecnologia CRISPR pode ser utilizada para editar os genes de suscetibilidade (genes S) das plantas, contribuindo para aumentar sua resistência a doenças. Essa técnica tem sido aplicada em pesquisas agronômicas, abrangendo desde a investigação da função genética e localização de proteínas até a introdução de características desejáveis, como tolerância à seca e aumento da produtividade (Chen et al., 2019).

Os genes de suscetibilidade correspondem a genes do hospedeiro que são explorados pelos patógenos para completar o processo de infecção. Diferentemente dos genes de resistência, que atuam no reconhecimento específico do patógeno, a inativação de genes S pode resultar em resistência mais ampla e durável, pois elimina fatores essenciais para o sucesso da colonização. Ao perderem a função, esses genes deixam de fornecer nutrientes ou suprimir a defesa basal que o patógeno necessita, criando uma barreira fisiológica que é evolutivamente mais difícil de ser superada do que a **resistência** baseada em genes R (Van Schie e Takken, 2014).

Exemplos clássicos de genes de suscetibilidade incluem o *MLO* em cevada (Büschges et al., 1997), os transportadores *SWEET* em arroz (Oliva et al., 2019), o *DMR6* em *Arabidopsis* e tomate (Zeilmaker et al., 2015; Thomazella et al., 2021).

A tecnologia CRISPR/Cas tem possibilitado a edição dirigida desses genes, promovendo resistência sem a introdução de sequências de outras espécies e mantendo as características agronômicas das cultivares comerciais. Essa abordagem tem sido aplicada com sucesso em diversas culturas agrícolas, reforçando o potencial da edição de genes de suscetibilidade como estratégia para o desenvolvimento de resistência genética (Zhang et al., 2021).

Apesar dos avanços observados em outras culturas, ainda são escassos os estudos funcionais envolvendo genes de suscetibilidade em bananeira. A maioria das pesquisas concentra-se em análises transcriptômicas ou descritivas, sem validação funcional dos genes candidatos. Além disso, muitos trabalhos são realizados em genótipos modelo ou híbridos experimentais, havendo uma carência de informações em cultivares comerciais amplamente cultivadas, como a ‘Prata-Anã’ (Tripathi et al., 2024).

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi identificar, por meio de uma revisão sistemática, genes de suscetibilidade para fatores bióticos em plantas e, de forma complementar, realizar a validação funcional de um gene candidato na cultivar de bananeira ‘Prata-Anã’, visando ao desenvolvimento de estratégias de resistência baseadas em edição gênica e ao manejo sustentável do *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

Referências

BARRANGOU, R. et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. **Science (New York, N.Y.)**, v. 315, n. 5819, p. 1709–1712, 2007.

CAMPO, T. M. et al. Agronomic Performance of Banana Cultivars: A Case Study in Brazilian Savannah. **Revista de Gestão Social e Ambiental**, v. 18, n. 3, p. e04497, 22 dez. 2023.

CONG, L. et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. **Science (New York, N.Y.)**, v. 339, n. 6121, p. 819–823, 2013.

DITA, M. et al. Fusarium Wilt of Banana: Current Knowledge on Epidemiology and Research Needs Toward Sustainable Disease Management. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n. 1468, 19 out. 2018.

FAOSTAT (2026) The State of Food Security and Nutrition in the World 2024. FAOSTAT, Rome.

FAOSTAT (2026). Base de dados online da FAOSTAT. Disponível em http://faostat.fao.org/ (acessado em 29 de janeiro de 2026).

FENG, Z. et al. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. **Cell Research**, v. 23, n. 10, p. 1229–1232, 20 ago. 2013.

HSU, P. D.; LANDER, E. S.; ZHANG, F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. **Cell**, v. 157, n. 6, p. 1262–1278, 2014.

JANSEN, R. et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. **Molecular microbiology**, v. 43, n. 6, p. 1565–1575, 2002.

JUSTINE, A. K. et al. Biotechnological interventions in banana: current knowledge and future prospects. **Heliyon**, v. 8, n. 11, p. e11636, 16 nov. 2022.

ISHINO GAO, C. The future of CRISPR technologies in agriculture. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 19, n. 5, p. 275–276, 2018

LI, Y. et al. CRISPR/Cas genome editing improves abiotic and biotic stress tolerance of crops. **Frontiers in Genome Editing**, v. 4, 7 set. 2022.

OLIVA, R. et al. Broad-spectrum resistance to bacterial blight in rice using genome editing. **Nature Biotechnology**, v. 37, n. 11, p. 1344–1350, 1 nov. 2019.

ORDONEZ, N. et al. Worse Comes to Worst: Bananas and Panama Disease—When Plant and Pathogen Clones Meet. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 11, p. e1005197, 19 nov. 2015.

ORTIZ, R.; SWENNEN, R. From crossbreeding to biotechnology-facilitated improvement of banana and plantain. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 1, p. 158–169, jan. 2014.

PLOETZ, R. C. Fusarium Wilt of Banana. **Phytopathology®**, v. 105, n. 12, p. 1512–1521, dez. 2015.

THOMAZELLA, D. P. DE T. et al. Loss of function of a DMR6 ortholog in tomato confers broad-spectrum disease resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 27, 2 jul. 2021.

TRIPATHI, L.; NTUI, V. O.; TRIPATHI, J. N. Application of CRISPR/Cas-based gene-editing for developing better banana. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 12, 16 ago. 2024.

VAN SCHIE, C. C. N.; TAKKEN, F. L. W. Susceptibility Genes 101: How to Be a Good Host. **Annual Review of Phytopathology**, v. 52, n. 1, p. 551–581, 4 ago. 2014.

VELAME, K. V. C. et al. Evidence of Correlation between Pathogenicity, Avirulence Genes, and Aggressiveness of Fusarium oxysporum f. sp. cubense in Banana "Cavendish" and "Prata" Subgroups. **Horticulturae**, v. 10, n. 3, p. 228, 1 mar. 2024.

ZEILMAKER, T. et al. DOWNY MILDEW RESISTANT 6 and DMR6-LIKE OXYGENASE 1 are partially redundant but distinct suppressors of immunity in Arabidopsis. **The Plant Journal**, v. 81, n. 2, p. 210–222, 9 dez. 2014.

ZHANG, D. et al. CRISPR/Cas: a powerful tool for gene function study and crop improvement. **Journal of Advanced Research**, v. 29, n. 1, out. 2020.

CAPÍTULO 1

CRISPR Gene Editing for Knockout of Susceptibility Genes in Plant-Pathogen Interactions: A Systematic Review

Revisão sistemática - CRISPR Gene Editing for Knockout of Susceptibility Genes in Plant-Pathogen Interactions: A Systematic Review. Submetido à revista Molecular Biology Reports em 18 de março de 2026: Ref: Submission ID 4a1b575e-4ad8-4e10-a633-7294c1b16be6

CRISPR Gene Editing for Knockout of Susceptibility Genes in Plant-Pathogen Interactions: A Systematic Review

Márcio Leandro da Silveira Fonseca[1], Luiz Carlos de Souza Júnior[1], Fernanda dos Santos Nascimento[2], Anelita de Jesus Rocha Cabral[2], Marcelly Santana Mascarenhas[2], Andresa Priscila de Souza Ramos[2], Edson Perito Amorim[2], Claudia Fortes Ferreira[2]*

[1] Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 44380-000, BA, Brazil.

[2] Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, 44380-000, BA, Brazil

Corresponding author: Claudia Fortes Ferreira

Email address: claudia.ferreira@embrapa.br

ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5476-2236

Abstract

Agricultural crops are continuously exposed to biotic stresses caused by fungi, bacteria, viruses, oomycetes, and nematodes, which compromise productivity and threaten global food security. To address these challenges, plant breeding programs have incorporated innovative approaches capable of promoting durable and broad-spectrum resistance. Genome editing using Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats associated with the Cas protein (CRISPR/Cas) stands out as a precise and versatile tool for plant genome modification. This systematic review synthesizes recent advances in the use of CRISPR/Cas for editing susceptibility genes (S-genes) to enhance disease resistance in plants. Studies indexed in multiple databases were selected through a structured search strategy, with predefined inclusion and exclusion criteria. A total of 1,443 publications were identified, of which 118 met the criteria for detailed analysis. The technology was applied to several agricultural crops, with emphasis on rice, tomato, and wheat, and a concentration of research in Asia, particularly in China. The main molecular targets included *MLO*, *DMR6*, and members of the *SWEET* gene family, which are associated with susceptibility to fungal, bacterial, and viral pathogens. *Agrobacterium tumefaciens*–mediated transformation was the predominant delivery method, while sequencing and PCR-based techniques were used to validate editing events. Most studies reported increased resistance, although pleiotropic effects, were observed in some cases. Overall, the evidence demonstrates that CRISPR/Cas is a promising strategy to accelerate the development of more resistant and sustainable cultivars for plant breeding programs.

Key words: CRISPR/Cas9, Susceptibility genes, disease resistance, genome editing, Biotic stress

Abbreviations
CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
Cas9: CRISPR-associated protein 9
S-genes: Susceptibility genes
MLO: Mildew Resistance Locus O
DMR6: Downy Mildew Resistance 6
SWEET: Sugars Will Eventually be Exported Transporters
PRISMA: Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses
PICOS: Population, Intervention, Comparison, Outcome, and Study
DNA: Deoxyribonucleic acid
RNA: Ribonucleic acid

PCR: Polymerase Chain Reaction
qPCR: Quantitative Real-Time PCR
ROS: Reactive Oxygen Species
RNPs: Ribonucleoproteins
PEG: Polyethylene glycol
PVY: Potato virus Y
WYMV: Wheat yellow mosaic virus
ToBRFV: Tomato brown rugose fruit virus
TYLCCNV: Tomato yellow leaf curl China virus
TALE: Transcription Activator-Like Effector
ZFNs: Zinc finger nucleases
TALENs: Transcription activator-like effector nucleases

Acknowledgments

The authors would like to thank the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) – Brazil (Finance Code 001) for the financial support and scholarship. We also thank the Federal University of the Recôncavo of Bahia (UFRB) and Embrapa Mandioca e Fruticultura for the institutional support and technical facilities provided for the development of this research.

Introduction

Agriculture is fundamental to the global economy and to the food security of an ever-growing population. However, agricultural production faces ongoing challenges, among which biotic stresses caused by pests and pathogens stand out, resulting in significant productivity losses across various crops [1-2]. It is estimated that diseases caused by fungi, bacteria, and viruses result in average annual global losses of 10%-28% of agricultural production [3]. The complexity of plant-pathogen interactions, coupled with the continuous emergence of new pests and pathogenic races, represents a constant and evolving challenge for agricultural sustainability [4].

Genetic improvement remains an effective and long-lasting approach to crop enhancement; however, traditional disease management strategies, such as conventional breeding focused on resistance genes (R-genes), cultural practices, and the use of agrochemicals, have significant limitations [5-6]. Although chemical control acts quickly, its excessive use raises environmental and health concerns, such as the development of pathogen resistance, environmental contamination, effects on non-target organisms, and risks to human health [7-8]. In turn, classical breeding and cultural methods often have limited effectiveness under high inoculum pressure or on a large scale [9-11]. These limitations highlight the need for innovative and sustainable strategies for plant disease control.

Early approaches to precise genome editing, such as zinc finger nucleases (ZFNs) and transcription activator-like effector nucleases (TALENs), played a key role in enabling targeted modifications in plant DNA [12-13]. However, the need to design and construct complex proteins for each new genomic target made these systems costly, limiting their large-scale application and encouraging the search for simpler, more programmable editing technologies [14].

Among these technologies, the CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) system stands out, originally described as a bacterial defense mechanism [15-16]. Guided by an RNA molecule (guide RNA), the CRISPR system allows precise cleavage of DNA at specific regions, enabling the introduction of nucleotide deletions, insertions, or substitutions with high specificity [16-17]. Applied to S-genes, this ability to target gene knockout offers an effective and precise strategy for disrupting plant-pathogen compatibility, resulting in the development of plants with improved or newly acquired resistance to various threats [18].

The efficiency, specificity, and versatility of CRISPR-Cas technology have driven its rapid expansion in agricultural research, resulting in recent years a growing volume of studies dedicated to exploring its potential for gene editing in various plant species against attack by multiple pathogens, demonstrating not only the applicability of the approach in a wide range of plant-pathogen interactions, but also the successes already achieved in generating durable and broad-spectrum resistance [19, 20].

In this context, editing susceptibility genes (S-genes) has emerged as a promising alternative [21]. These genes encode host factors exploited by the pathogen to establish a compatible interaction, for example, by assisting in pathogen recognition and entry, providing nutrients, reducing plant defense pathways, and promoting structures that facilitate the invader's development.

The inactivation of an S-gene can confer recessive resistance. This occurs because the plant ceases to express the susceptibility factor necessary for compatible interaction, depriving the pathogen of an essential element for its virulence or for establishing infection [22]. This type of resistance, due to loss of susceptibility, tends to be more durable and broad-spectrum compared to R-gene-mediated resistance, as it poses a more difficult evolutionary challenge for the pathogen to overcome [23].

Highly accurate genome-editing tools are necessary for effective modulation of S-genes. In this context, genome editing technologies have emerged as transformative approaches in plant biotechnology, capable of overcoming the limitations of conventional genetic engineering techniques [24, 25]

The effectiveness of susceptibility gene editing via CRISPR-Cas is well documented in several crops. Studies have shown, for example, that knocking out the *MLO* gene confers durable resistance to powdery mildew in wheat and tomato [26, 27]. Similarly, editing *SWEET* genes in rice increased resistance to bacterial pests (*Xanthomonas oryzae*) [28], while modifying the *DMR6* gene in tomatoes enhanced defense against different pathogens [29]. These studies reinforce the potential of S-gene editing as an effective and promising strategy in plant breeding.

Given the expansion of this area, it is necessary to consolidate available knowledge through a systematic, critical analysis that maps recent progress, identifies the most explored S-genes, the most effective editing strategies, and the challenges that remain, and indicates perspectives for future investigations. Thus, this systematic review aims to synthesize recent advances in the use of CRISPR-Cas technology to edit susceptibility genes, with a view to developing resistance to biotic factors in plants and strengthening sustainable approaches in plant breeding.

Materials and Methods

This systematic review was prepared with the support of StArt (State of the Art through Systematic Review) software, Beta version 3.0.3 (http://lapes.dc.ufscar.br/tools/start_tool), developed by the Federal University of São Carlos (UFSCar). The tool assists researchers in all stages of the systematic review process, from planning to data summarization.

The guidelines used to structure this review followed the PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) framework, a set of evidence-based recommendations that aim to ensure transparency and standardization in the conduct and reporting of systematic reviews.

Thus, the review process using StArt took place in three stages: planning, execution, and summarization.

Planning

The review protocol was developed within the StArt platform itself, containing the following elements: title, researchers, objective, keywords, inclusion and exclusion criteria, research question, data sources, and definition of the type of study. The protocol is registered and publicly available via the link: https://doi.org/10.5281/zenodo.18377801 (Accessed 26 Jan 2026). The questions that guided this review are described in Table 1:

Table 1 Questions raised about susceptibility genes and gene editing in plants using CRISPR technology in the last five years.

Secondary questions:
1. Which countries use the CRISPR/Cas technique for resistance to biotic factors?
2. Which crops have been edited using the CRISPR/Cas technique?
3. What was the biotic stress target for which resistance/tolerance was sought through CRISPR/Cas editing?
4. Which susceptibility gene is identified, characterized, or modified via CRISPR/Cas in the study?
5. What delivery method was used to introduce the CRISPR/Cas system components into plant cells?
6. What methods are used to confirm the efficiency of the CRISPR/Cas technique?
8. Which explants are most commonly used for genetic editing with CRISPR/Cas?
9. Which vectors were used to express Cas9 and/or gRNA?
10. Were any pleiotropic effects or unwanted changes in the development and agronomic characteristics of the edited plants observed? If so, which ones?
11. Did gene editing result in increased disease resistance? If so, how was it described?

Execution

Using the strategy based on the four PICOS inclusion components Population, Intervention, Comparison, Outcome, and Study [30] (Table 2) the following research question was developed: “What are the susceptibility genes in plants that can be targeted for genetic editing using CRISPR?” The use of PICOS provides greater specificity and clarity of the problems, promoting more complex search strategies and allowing for more accurate results.

Table 2- PICOS terms for the research “question” used in a systematic review on susceptibility genes and gene editing in plants using CRISPR technology in the last five years.

Description	Abbreviation	Components of the question
Population/Condition	P	Susceptibility genes (S-genes) in plants
Interest/Intervention	I	Application of the CRISPR technique in gene editing
Comparison	C	Edited versus unedited plants
Outcome	O	Increased resistance to biotic factors and stability of mutations
Type of study	S	Published scientific articles

A total of seven electronic databases were used: *Scopus*, *Web of Science*, *PubMed Central Science Direct*, *Springer*, the CAPES journal portal and *Google Scholar* (accessed on January 20, 2026). For the Scopus and Web of Science databases, the following search *string* was used: ("CRISPR/Cas9" OR "CRISPR-Cas9" OR "CRISPR-Cas in plants") AND ("susceptibility genes" OR "genes for susceptibility" OR "susceptibility-associated genes" OR "genes s") AND (Knockout OR "gene knockout" OR "gene inactivation" OR "genetic knockdown" OR "CRISPR knockout").

For the Springer, PubMed Central and Web of Science databases, the following search *string* was used: ("CRISPR/Cas9" OR "CRISPR-Cas9" OR "CRISPR-Cas in plants") AND (crops OR "plant breeding") AND ("susceptibility genes" OR "genes for susceptibility" OR "susceptibility-associated genes" OR "genes s") AND (Knockout OR "gene knockout" OR "gene inactivation" OR "genetic knockdown" OR "CRISPR knockout") NOT (review OR "systematic review" OR "meta-analysis").

For Google Scholar, the following search *string* was used: ("CRISPR/Cas9" OR "CRISPR-Cas9" OR "CRISPR-Cas in plants") AND ("susceptibility genes" OR "genes for susceptibility" OR "susceptibility-associated genes" OR "S gene") AND (Knockout OR "gene knockout" OR "gene inactivation" OR "genetic knockdown" OR "CRISPR knockout") AND ("plant breeding" OR "plant improvement") AND ("plant disease" OR "biotic factors" OR "disease resistance" OR "plant pathogens").

And for the Science Direct database, the search string used was: ("CRISPR/Cas9" OR "CRISPR-Cas9") AND (crops OR "plant breeding") AND ("susceptibility genes" OR "susceptibility-associated genes") AND (Knockout OR "gene knockout" OR "gene inactivation")

The initial search in broad databases such as Springer and Google Scholar returned a significant number of articles outside the agronomic scope, including animal studies and cancer research. To correct this problem and increase specificity, the search was refined by adding terms related to plant crops ("crops," "plant breeding") and plant diseases ("plant disease," "biotic factors"). The Boolean operator "NOT" was applied in some searches to exclude reviews and meta-analyses in the initial phase. The connectives "AND" and "OR" were used to combine conceptual blocks and group synonymous terms, respectively. The results of each search were exported in compatible formats (BIBTEX, RIS) for management in StArt.

In the selection phase, articles containing the search *string* terms in the title, abstract, or keywords were accepted. Articles that met these terms and did not deviate from the proposed theme were accepted and submitted to the extraction stage. In the stage (full reading), the eligibility of the articles was determined by strict inclusion and exclusion criteria to ensure the focus of this review. The main inclusion criterion was that it was an original research article addressing the editing or identification of susceptibility genes via CRISPR for disease resistance in plants. The exclusion criteria were: theses, dissertations, and manuals; review articles; abstracts and articles not in English; and studies that did not use CRISPR and S-genes in editing.

Summarization

The summarization stage included the organization of the extracted data using tables, graphs, bibliometric maps, and word clouds to synthesize the results found. In addition, qualitative and quantitative analyses were considered, focusing on the frequency of the S-genes studied, the CRISPR strategies adopted, the target species, and the phenotypic evaluation methods.

To ensure transparency and reduce bias in conducting the review, the PRISMA [31] was used, available at: https://doi.org/10.5281/zenodo.18378758 (accessed on 01.26.2026).

Risk of bias analysis

To assess the risk of bias in individual studies, an adaptation of the Cochrane [32] bias risk tool protocol was performed. FONSECA, M. L. S., and SOUZA JUNIOR, L. C. evaluated the methodological quality of the included studies. The instrument for assessing bias risk included three questions:

1- Does the study report the methods used to validate the occurrence of editing in the target genes?
2- Did the study evaluate and report the overall phenotype of the plant after genetic transformation?

3- Does the article provide sufficient information to answer at least 50% of the guiding questions predefined in the protocol of this review?

Results

The initial search of the selected electronic databases identified a total of 1,443 publications. The *Google Academic* database contributed the most, with 1,088 articles, representing 75% of the total followed by *PubMed* (11%) and Springer (4%). The *Web of Science*, *Scopus*, and *Science Direct* databases contributed (4%), (3%), and (2%) articles, respectively (Figure 1).

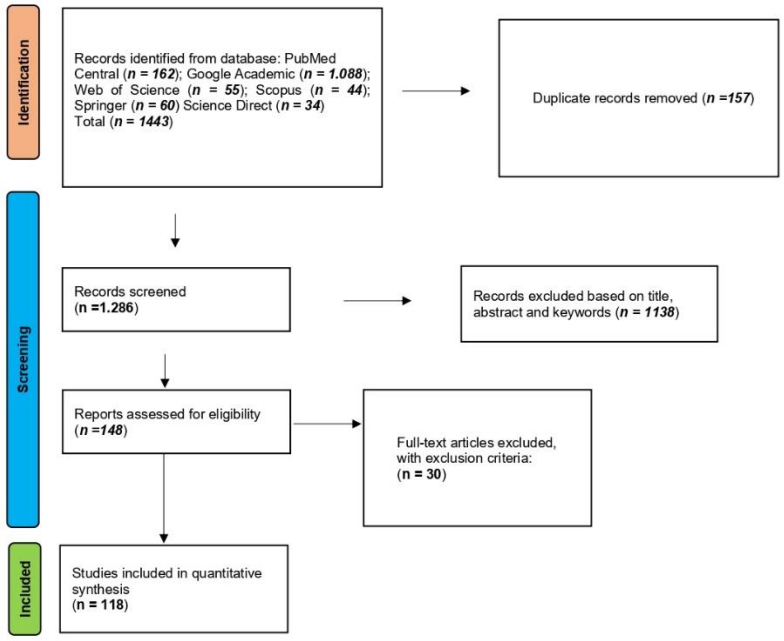


Fig. 1 PRISMA Flow diagram of studies included in the systematic review of CRISPR/CAS technology used to edit susceptibility genes

The initial bibliographic survey resulted in the identification of 1,443 publications. After removing 157 duplicate articles, 1,286 studies were submitted to the selection phase. At this stage, based on the analysis of titles, abstracts, and keywords, 1,138 articles were excluded. Of this total, 148 studies advanced to the execution analysis, which consisted of reading the full text. After this analysis, 30 articles were excluded for not meeting the inclusion criteria, resulting in a final selection of 118 studies for the qualitative and quantitative synthesis of this systematic review (Figure 1). For reference purposes, the manuscripts were stored in an open-access digital library at: https://doi.org/10.5281/zenodo.18381557 (Accessed 26 Jan 2026).

The analysis of keywords, visualized in the bibliometric map (Figure 2), demonstrates the structure and main research fronts in the area. The most frequently occurring keywords, represented by the size of the nodes, such as "*resistance*," "*crispr*," "*rice*," and *"wheat*," show that research is focused on achieving resistance in these key crops using CRISPR technology.

The colors on the map group keywords into different themes. The word *"resistance*," highlighted in green, is connected to application terms such as "crispr cas9 mediated mutagenesis" and "bacterial blight," indicating that research focuses on the application of different techniques to achieve resistance (Figure 2).

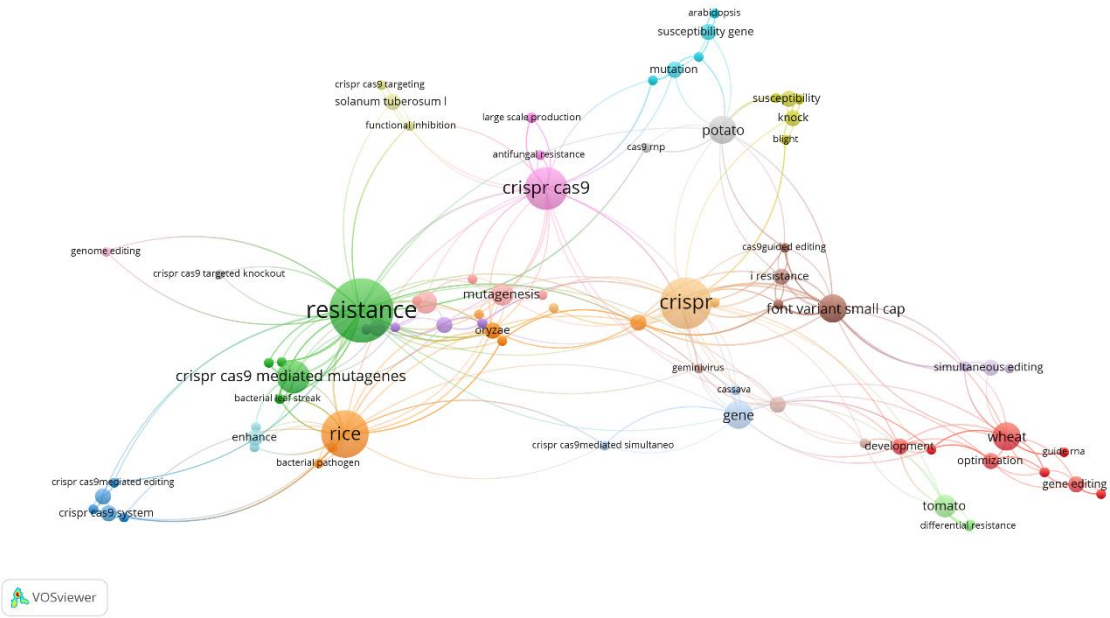


Fig. 2 Bibliometric map of keywords in selected articles on CRISPR/Cas technology used to edit susceptibility genes in plants during the extraction phase of this systematic review

This review analyzed publications from 2019 to 2026 on the use of CRISPR/Cas to edit susceptibility genes in plants. The distribution of 118 articles by scientific journal was analyzed, and the results are visualized in a word cloud (Figure 3). The *Plant Biotechnology Journal* stood out as the main publication vehicle, with 16% of the publications. Next were *Frontiers in Plant Science*, with 14%, and *BMC Plant Biology*, with 6%. The other journals individually contributed less than 5% of the total articles analyzed.

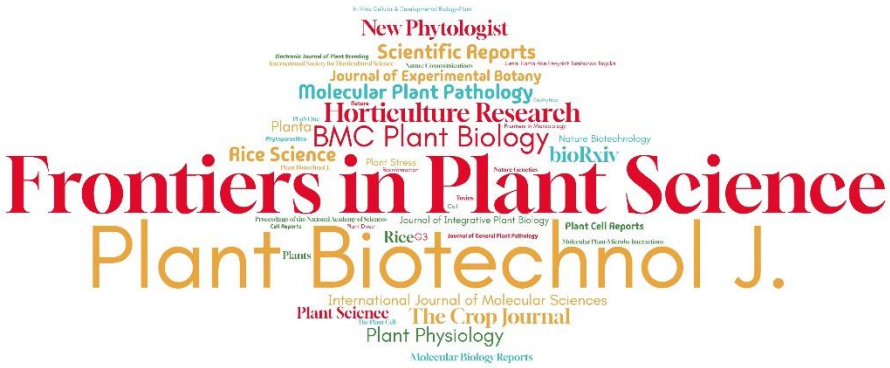


Fig. 3 Word cloud of the journals that published most on the editing of susceptibility genes in plants via CRISPR/Cas (2019-2026)

The analysis of the co-authorship network, visualized in the bibliometric map (Figure 4), demonstrates the structure of collaboration between the researchers of the selected articles. In the map, the nodes represent the authors, and the lines indicate joint publications. Analysis of the network structure shows the existence of multiple collaboration clusters, many of which are disconnected from a central component. This fragmented structure suggests the existence of several research groups acting relatively independently, with little collaboration between them within the scope of the studies analyzed.

Some authors stand out for occupying central positions in the network, such as Pompili, Valerio, and Malnoy, Mickael, acting as the main connectors of the networks, linking different research fronts and bridging these groups. The network is formed by distinct collaboration hubs, led by researchers such as Kim, Jin-soo (green cluster), Lanteri, Sergio, and Bai, Yuling (red), and Moglia, Andrea (blue). This structure demonstrates that research on the topic is advancing on parallel fronts, with initial collaboration between groups, mediated by a limited number of key authors.

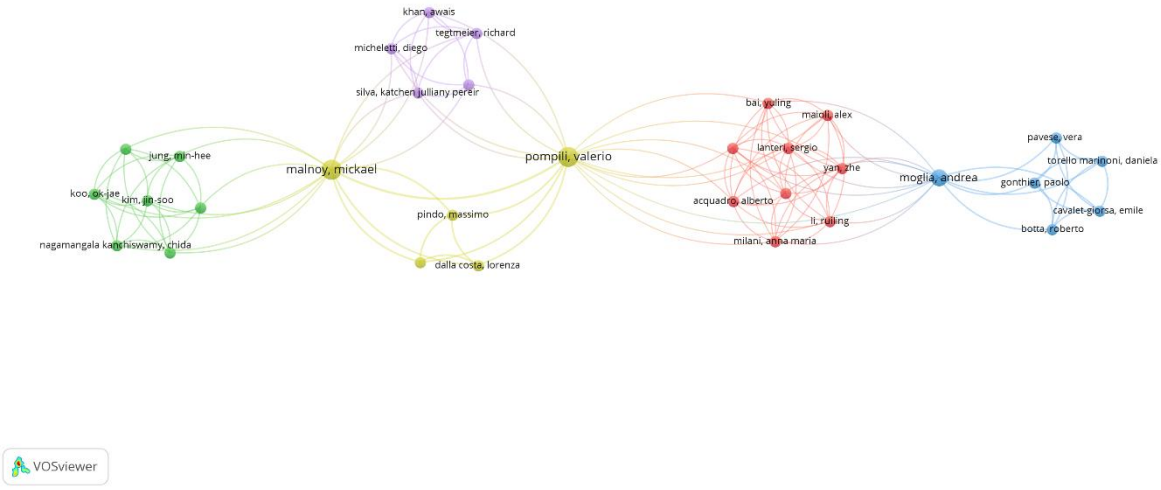
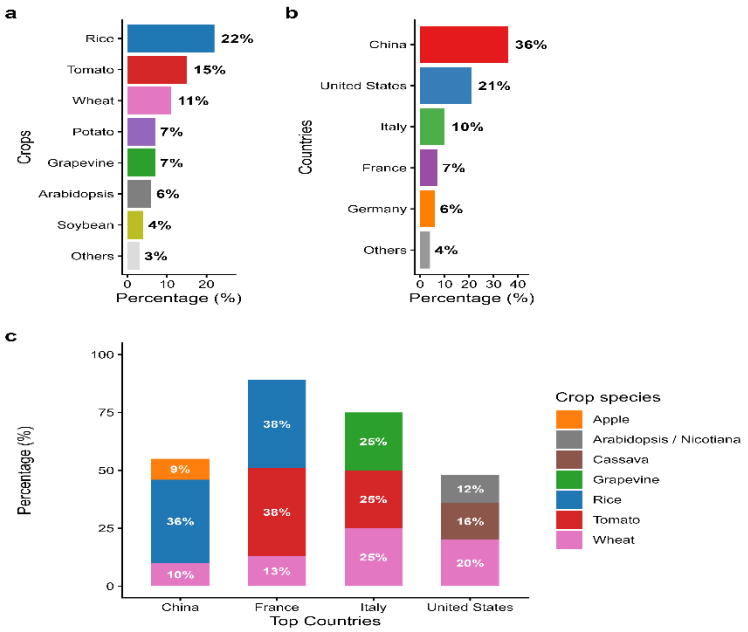


Fig. 4 Map of the co-authorship network among researchers who have published the most on CRISPR/Cas gene editing in plants over the last six years (2019-2026) The visualization was generated using VOSviewer software

Among the crops edited via CRISPR/Cas, rice (*Oryza sativa*) was the most studied (22%), followed by tomato (*Solanum lycopersicum*) (15%) and wheat (*Triticum aestivum*) (11%), as illustrated in Figure 5A. Analysis of the geographical distribution of scientific production reveals China's leadership, accounting for 36% of publications, followed by the United States with 21%. European participation is also significant, with Italy (10%), France (7%), and Germany (6%) standing out, while the other nations combined account for 4% (Figure 5B).

Figure 5C details the percentage distribution of the main target crops, demonstrating distinct agricultural focuses among the countries analyzed. In China, rice is the predominant crop, representing 36% of the total followed by wheat (10%). In the US, wheat leads with 20%, followed by cassava (16%). European countries show a strong inclination toward horticultural crops: Italy exhibits a diversified profile, with a balance between tomatoes and grapes (25% each), in addition to a significant share of apples (17%). France stands out for its concentration on rice and tomatoes, which together account for 76% (38% each).



a **Fig. 5** Global and strategic overview of susceptibility gene editing via CRISPR/Cas (N=118). (A) Ranking of the most edited plant species worldwide (B) Geographic distribution of scientific production (C) Priority target crops in the four countries with the highest volume of publications

Biotic Agent

Analysis of the 118 studies revealed that CRISPR/Cas technology was applied to a variety of biotic agents, including fungi, viruses, bacteria, oomycetes, and nematodes. Fungi were the most investigated group, present in 50% of the total Next were bacteria, addressed in (23%), and viruses, in (19%). Oomycetes and nematodes (12%) and (2%) respectively (Figure 6). Some studies investigated multiple types of pathogens, resulting in the sum of occurrences exceeding the total number of articles.

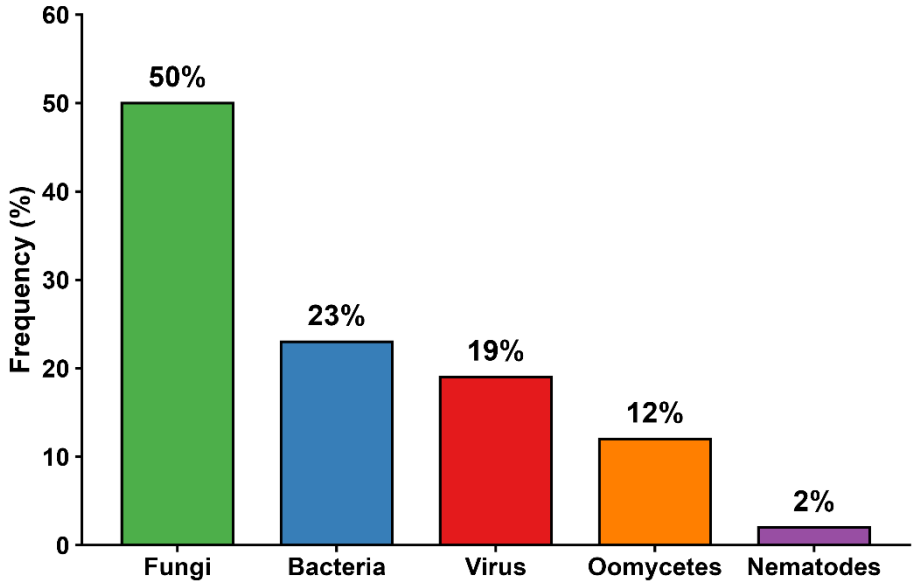


Fig. 6 Percentage distribution of target biotic agent classes in selected studies on CRISPR/Cas over the last six years (2019-2026)

Among bacterial pathogens, the research focused on three genera of high agricultural relevance (Figure 7). The genus *Xanthomonas* was the main target, dominating 81% of the studies, with emphasis on the species *Xanthomonas oryzae*, the causal agent of bacterial blight and bacterial spot in rice. The genera *Pseudomonas* and *Erwinia* were studied to a lesser extent, being reported in 11% and 7% of the studies, respectively.

Among fungal pathogens and oomycetes, *Phytophthora* leads as the most frequent target, corresponding to 19% of the studies. Next are *Magnaporthe oryzae*, which causes brusone, with 14%, and the genus Fusarium, with 11%. Other relevant genera include Erysiphe (9%), Puccinia (6%), and *Plasmopara* (5%), with a diverse set of other pathogens comprising the remaining 4% of studies. In the virus group, Potyvirus Y (PVY) was the most frequently targeted pathogen, appearing in 19% of studies, followed by Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV), Wheat yellow mosaic virus (WYMV), and the Geminivirus group, each accounting for 8%. Among nematodes, the genus Meloidogyne was the target of 67% of the studies, followed by Heterodera, with 33%.

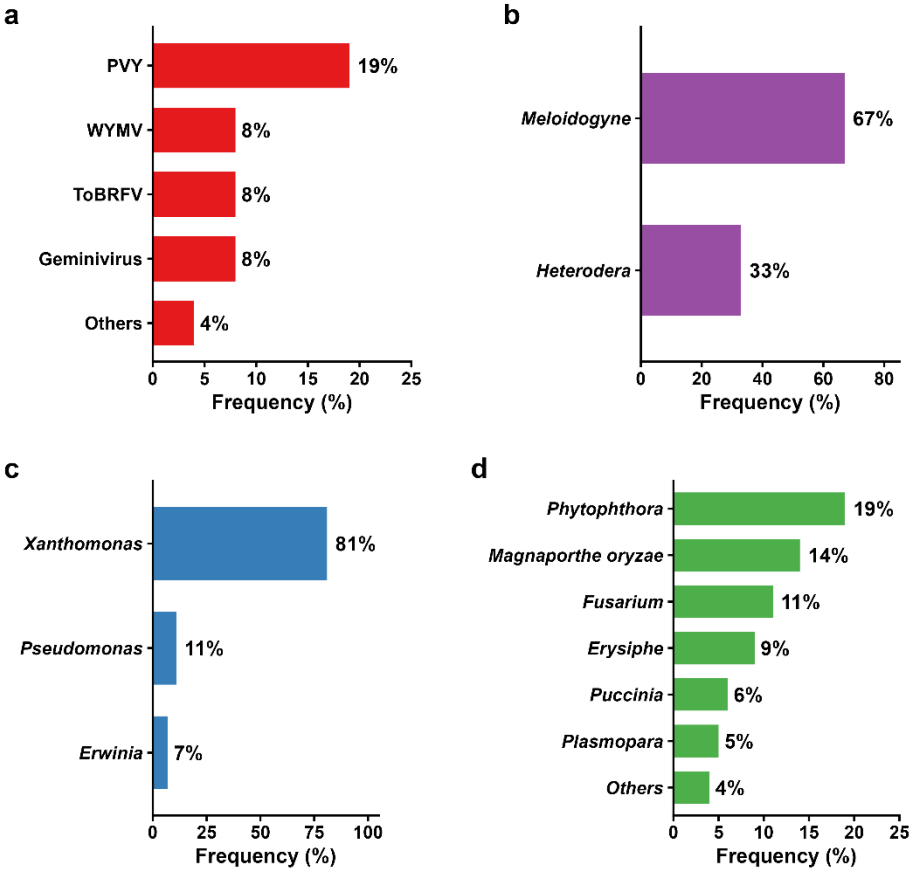


Fig. 7 Percentage distribution of the main target pathogen genera in gene editing studies (A) Viruses (B) Nematodes (C) Bacteria and (D) Fungi and Oomycetes

Types of explants used for genetic transformation

Figure 8 shows the explants most commonly used for gene editing. Calluses were most commonly used in rice cultivation (43%), followed by grapevines (22%), cassava (17%), and potatoes (9%). The use of cotyledons was significant in tomatoes (56%) and soybeans (17%). For embryos, there was a concentration in cereals. Wheat was the most frequent crop in this group, corresponding to 56%, followed by barley (19%) and corn (13%) (Figure 8).

For the model plant, *Arabidopsis thaliana*, a distinct methodological pattern was observed, where inflorescence was the predominant target. In these cases, transformation usually occurs via floral dip, a technique that circumvents the need for tissue culture and in vitro regeneration, differing substantially from callus- or cotyledon-based protocols used in commercial crops.

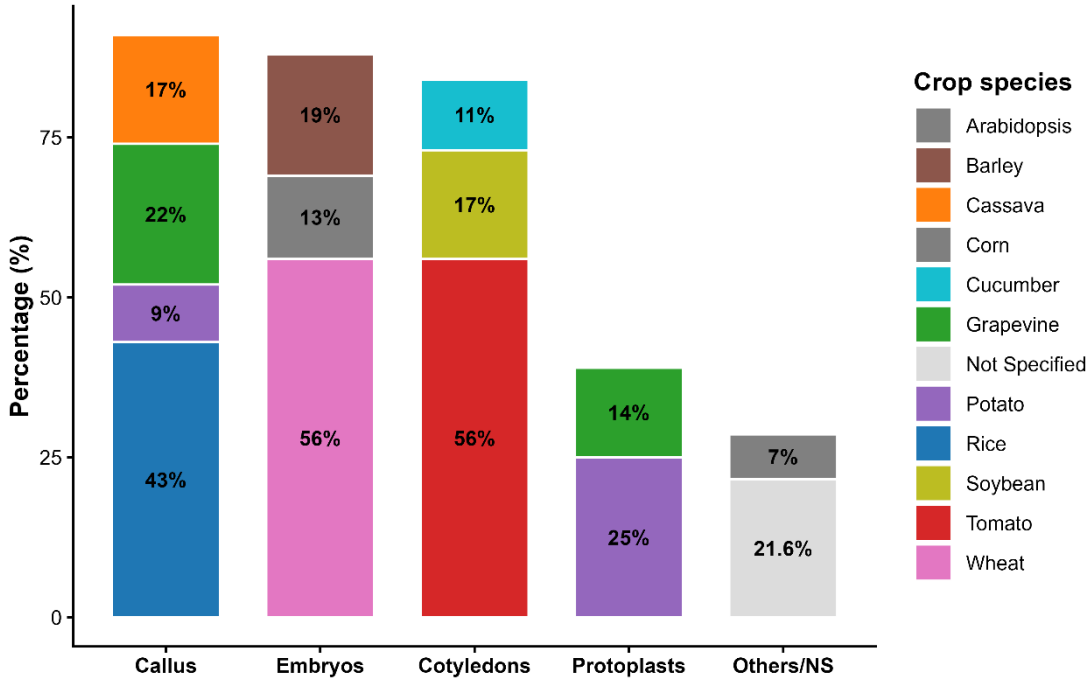


Fig. 8 Percentage distribution of the types of explants used for CRISPR/Cas9 transformation in major agricultural crops

Suscetibility Genes Targeted by CRISPR/Cas Editing

Analysis of the target genes for editing in the 118 studies revealed that, although a broad spectrum of S-genes has been investigated, the research is dominated by a small group of well-characterized genes (Figure 9). The *MLO* (*Mildew Resistance Locus O*) gene was the most frequent target, being reported in 18% of the studies. Next was the *DMR6* (*Downy Mildew Resistance 6*) gene, with 13%, and the *SWEET* family transporters, with 12%. Together, these three targets represent about 45% of the total studies. Other genes such as the translation initiation factor *eIF4E* and *ERF* transcription factors were also extensively studied.



Fig. 9 Percentage frequency of genome editing target genes reported in the studies evaluated

Transformation Methods

Analysis of the methods used to deliver CRISPR-Cas system components into plant cells showed a predominance of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (Figure 10), used in 74% of cases. Less frequently, direct transformation methods, such as particle bombardment (bioballistics) (6.0%) and protoplast transformation using Polyethylene Glycol (PEG) (4.3%), were used.

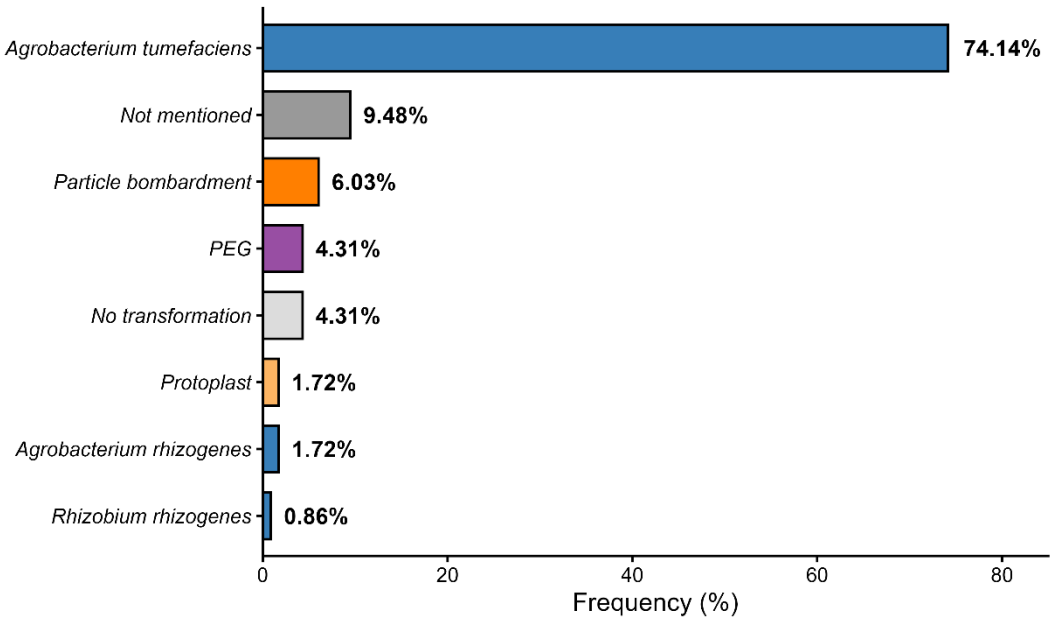


Fig. 10 Frequency of genetic transformation methods used in the studies analyzed

Auxiliary methods for CRISPR/Cas and Phenotypic analysis and characteristics obtained after mutation

To validate genome editing and its molecular effects, the selected studies employed a diverse set of auxiliary methodologies. Confirmation of DNA alterations was predominantly performed by sequencing (59.5%), Quantitative Real-Time PCR (qPCR) (57.8%), and conventional Polymerase Chain Reaction (PCR) (33.6%). The set of molecular analyses was complemented by techniques such as Western blot (8.6%), Southern blot (2.6%), Northern blot (0.9%), and Ribonucleic Acid Sequencing (RNA-seq) (0.9%). For the evaluation of phenotypic and physiological outcomes, the most frequent approaches included biomass measurement (13.8%), microscopy analyses (12.1%), infection assays (8.6%), and other methods with a frequency ≤ 4.3% (Figure 11A).

The analysis of the studies assessed whether S-gene editing resulted in unwanted phenotypic changes, a crucial factor for agronomic viability. The most frequent category, with 54 studies (46%), reported no unusual phenotypic characteristics, with the edited plants being indistinguishable from the wild type. In contrast, 25 studies (21%) observed negative pleiotropic effects, such as reduced growth, late flowering, and reproductive defects. In the remaining 37 (31%), phenotypic information was not reported or was not applicable to the scope of the work (Figure 11B).

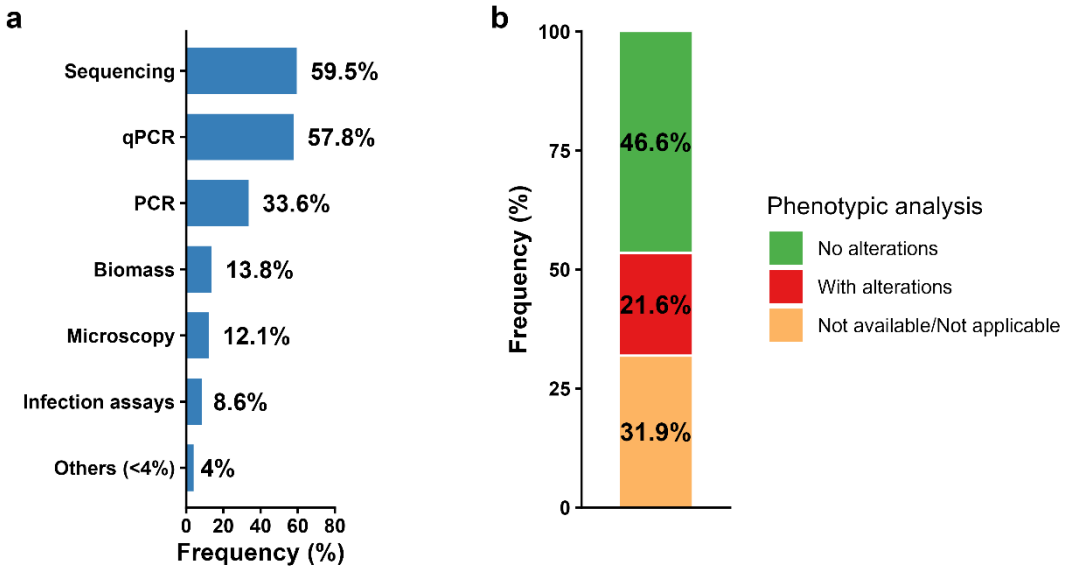


Fig. 11 (A) Percentage distribution of auxiliary methodologies used for CRISPR/Cas editing validation and phenotypic analysis in the selected studies (B) Frequency of auxiliary methodologies used to validate CRISPR/Cas genome editing and its phenotypic effects

Risk of bias

Based on three questions specifically chosen to characterize the risk of bias, 84 studies had a low risk of bias and 34 had a moderate risk. Six studies indicated that question one was not applicable. Another 31 articles answered negatively, and seven indicated that question two did not apply. Six articles classified question three as not applicable. The questions classified as not applicable referred to studies that identified or investigated a susceptibility gene without involving editing in the plant (Figure 12).

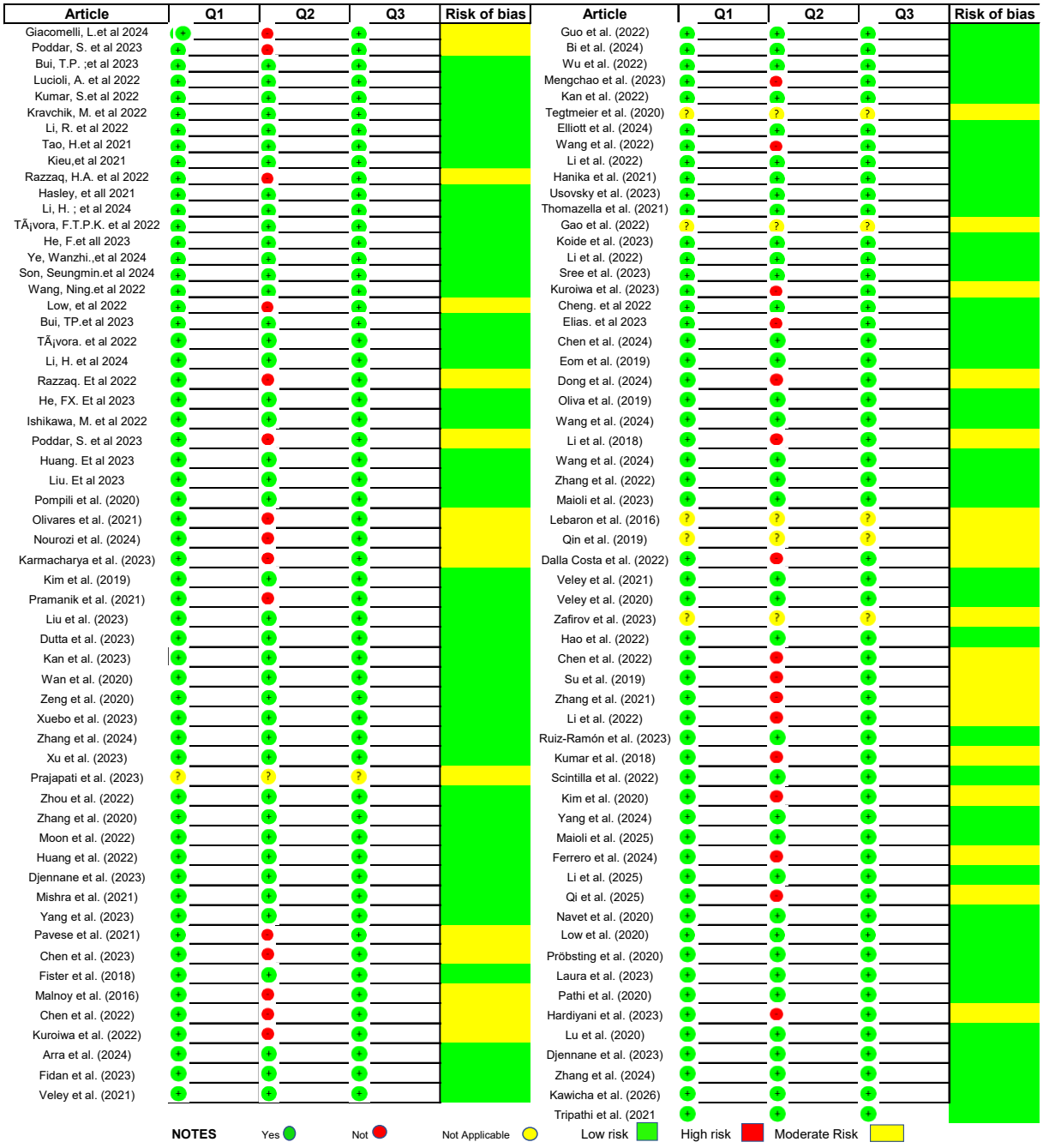


Fig. 12 Summary of the risk of bias assessment of selected articles on the use of CRISPR/Cas9 technology in susceptibility genes

Discussion

Bibliometric data

This systematic review analyzed publications from 2019 to 2026, aiming to capture the expansion and application phase of CRISPR-Cas technology for S-gene editing. This phase follows the initial "proof of concept" studies that dominated the early years after the publication of pioneering work with plants [27, 33].

The number of publications initially identified (n=1,443) highlights the scientific community's vast interest in CRISPR technology in plants. However, the rigorous selection process, which resulted in 118 studies eligible for the final synthesis (Figure 1), demonstrates that the specific application for editing S-genes focused on pathogen resistance represents a more specialized niche, albeit one that is rapidly and continuously expanding within plant biotechnology.

The prominence of keywords such as "resistance," "rice," and "wheat" (Figure 2) indicates that the research is motivated by field application objectives, focusing on crops that are important for global food security [34]. This focus is clear in the impact studies of this review.

Of the 118 analyzed, they focused on diseases such as rice blast, caused by *Magnaporthe oryzae*. For example, Kieu [35] used CRISPR/Cas9 to edit specific susceptibility genes, demonstrating significant increases in resistance to rice blast. Similarly, the focus on wheat was exemplified by studies such as those by [36], which sought to confer resistance to *Wheat Yellow Mosaic Virus* and stripe rust of wheat, caused by the fungus *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* (Pst).

The analysis of the co-authorship network (Figure 4) shows a research field divided into several groups that seem to work separately. This structure indicates that the research is specialized, with groups not connecting much because they are focused on different crops and agronomic problems. This specialization is clear when looking at the articles by the leaders of each group. The central core, connected by Pompili [37]., focuses on fruits and vegetables, as seen in the work of Giacomelli [38].

Geographic distribution and crops

Analysis of geographic distribution reveals a polarization of scientific production, with China (36%) and the United States (21%) leading the development of the technology. China's leadership is not accidental but a reflection of a state policy that integrates food security and biotechnological innovation. China's recent regulatory guidelines, which have simplified the approval of edited crops [39], have created

a favorable environment that contrasts with more restrictive scenarios globally. This incentive explains the direct correlation between Chinese production and the focus on rice and wheat (Figure 5B), crops that are important for the subsistence of its population and fundamental to its food security [34].

In the United States, the second place ranking is sustained by a consolidated intellectual property and biotechnology ecosystem [40]. Unlike China, which focuses on subsistence cereals, US research tends to be more diversified, covering both export *commodities* and biological models. The presence of countries with fewer publications is significant, as it demonstrates the growing accessibility and global dissemination of *CRISPR/Cas* technology.

The correlation between the geographical origin of studies and crops of regional importance (Figure 5A-C) is also evident in Europe. Scientific production in Italy and France focuses on grapes and tomatoes (Figure 5A-B). This strategic choice reflects the urgent need to reduce the use of agrochemicals in crops with high added value and great cultural appeal [41].

This trend is exemplified by the work of Djennane [42], who edited the *DMR6-1* gene in grapevines for resistance to downy mildew, and Li [43], who knocked out the *PMR4* gene in tomatoes to reduce susceptibility to late blight. Both studies exemplify this effort to ensure the sustainability of viticulture and tomatoes in a scenario of rigorous environmental and regulatory pressure from the European Union.

Analysis of the distribution of plant species (Figure 5B) reveals a concentration of research on a limited number of crops, which is not a random phenomenon but rather a reflection of strategic priorities. The leadership of rice (22%), tomato (15%), and wheat (11%) is consistent with their importance for food security and the global economy [34]. In addition, these species have well-established research communities and more developed genomic resources, making them preferred platforms for the validation and application of cutting-edge technologies such as CRISPR/Cas [25].

The overall analysis of species (Figure 5B) confirms that the choice of targets is not random. The leadership of rice (22%) and tomato (15%) is due to a double factor: their economic importance and their status as model plants for monocots and dicots, respectively. These species have well-established in vitro transformation and regeneration protocols, which facilitates the obtaining of mutants compared to other crops [44-45]. Combined with this, the availability of high-quality genomic resources makes these crops the preferred platforms for initial validation and proof of concept of S-gene edits before application in more complex species [46].

The presence of *Arabidopsis thaliana (*7%) in the analysis highlights its role as a key model organism for fundamental research and functional validation of S-genes, as exemplified by *DMR6*, which was initially characterized in this species before its application in crops [47]. The application of CRISPR/Cas technology in a diverse range of other species, including soybean, apple, and grapevine, demonstrates the versatility of the tool. This indicates that the application of the tool is successfully expanding beyond model systems, confirming the great versatility of the technology beyond the main species [25].

Biotical stresses in plants

Analysis of biotic agents reveals a significant predominance of studies focused on fungi (50%), followed by bacteria (23%) and viruses (19%). This scenario reflects not only the devastating economic impact of fungal diseases on global agriculture [2], but also the consolidation of well-established genetic targets, such as the *MLO* gene. The inactivation of this gene, which negatively regulates cell death and pathogen entry, has become a paradigm of success in conferring durable resistance against biotrophs, which has stimulated much research in this area [48].

The frequency of pathogens such as *Magnaporthe oryzae and Xanthomonas* oryzae reflects the position of rice as the most investigated crop, as demonstrated by Eom [49], who developed a diagnostic kit and used *SWEET* susceptibility gene editing to generate rice lines resistant to bacterial blight caused by this pathogen. *M. oryzae*, the causal agent of brusone, is a hemibiotrophic fungus considered the greatest threat to global rice cultivation due to its ability to spread rapidly and destroy leaves [50]. *X. oryzae*, on the other hand, is a bacterium that colonizes the plant's vascular system, causing bacterial blight, characterized by necrotic lesions and wilting [51], strategies that justify the representativeness of these pathogens in the literature.

Similarly, the recurrence of viruses such as Potato virus Y *(PVY)* and Tomato Yellow Leaf Curl China Virus (*TYLCCNV)* is in line with the frequency of studies on potatoes and tomatoes, as seen in the study by Lucioli [52], which resulted in increased resistance of the Desirée potato cultivar to PVY through genetic editing of the *eIF4E1* susceptibility gene using CRISPR/Cas9. These results demonstrate how S-gene editing can cut off virus supply routes, conferring recessive immunity that is difficult to break evolutionarily.

The representation of oomycetes (12.5%) and nematodes (2.6%) highlights a gap in research. The lower frequency of studies with nematodes, in particular, may reflect the greater complexity of parasite-

host interactions, which establish complex interactions involving hormonal manipulation and the development of feeding structures (giant cells). This makes it difficult to identify S-genes that can be inactivated without causing severe pleiotropy or plant unviability, keeping this group as a critical challenge for future CRISPR/Cas applications [53].

Types of explants

The choice of explant for CRISPR/Cas9 transformation is not random, but intrinsically dependent on established tissue culture protocols for each species [54]. For monocotyledons, such as rice and wheat, the predominance of embryogenic callus (40%) and immature embryos (58%) (Figure 8) reflects the efficiency of the somatic embryogenesis route. This preference is strategic for gene editing: as somatic embryos usually originate from a single cell, this route minimizes the occurrence of chimerism (plants with a mixture of edited and unedited cells), ensuring solid and heritable mutants [45].

In contrast, dicotyledonous crops use different regeneration strategies, often prioritizing the organogenesis pathway. This is reflected in the choice of explants, such as the use of cotyledons, which is predominant in crops such as soybeans (75%) and tomatoes (44%). This preference is justified by the fact that cotyledons are juvenile tissues with high totipotency, allowing the formation of new shoots efficiently and, often, directly, without the need for the intensive callus phase observed in cereals [44].

Grapevines presented a profile more similar to cereals, with callus being the explant of choice in 71% of the studies. This material allows the establishment of stable cultures that retain high regenerative capacity for long periods and is also the fundamental target tissue for genetic transformation [55].

Potatoes showed greater methodological diversity, standing out for the balanced use of protoplasts (25%) and callus (25%). This choice to use protoplasts is also present in grapevines (14%). The use of protoplasts allows for the efficient genetic editing of multiple alleles simultaneously, which is crucial for a tetraploid species such as potatoes [56]. The use of protoplasts, in particular, is often associated with approaches to overcome challenges in recalcitrant species or to develop T-DNA-free editing systems through the direct delivery of CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes (RNPs) [57].

In studies with *Arabidopsis thaliana* (6%), the inflorescence was mainly used as an explant, following the floral dip technique. This method allows the plant to be genetically modified without the need for laboratory cultivation, accelerating the production of transformed seeds. For this reason, it is widely used in basic research, but its application in large-scale agricultural crops is still limited [58-59].

Among the studies analyzed, 21.6% did not specify the explant used. The omission of fundamental details such as this compromises the reproducibility of protocols and hinders the collective advancement of knowledge, especially for species considered recalcitrant [25].

Susceptibility genes targeted by CRISPR/Cas editing

In the analysis of the frequency of target S-genes (Figure 9), it is observed that a small group of well-characterized genes, *MLO, DMR6, and SWEET*, account for more than 45% of the total results. The prominence of the *Mildew Resistance Locus (MLO*) gene as the most recurrent target (N = 22) is due to its status as a "model S-gene" [22]. The deletion of *MLO* confers broad-spectrum resistance to powdery mildew in several species, making it one of the first susceptibility genes to be successfully edited by CRISPR/Cas9 [48].

The studies analyzed in this review reinforce the central role of *MLO* editing, showing its efficiency without compromising essential agronomic characteristics. This approach has been successful in several crops, such as tomatoes, where editing the *SlMlo1* gene by *CRISPR/Cas9* generated plants with complete resistance to powdery mildew without negatively affecting their agronomic characteristics [60], in grapevines, in which the mutation induced in the *VvMLO3* and *VvMLO4* genes conferred improved disease resistance associated with plant defense responses, such as programmed cell death at the site of infection [61], in soybeans and wheat, as demonstrated by Li [20].

Studies such as those by Pramanik [60], Wan [61] and Li [20] indicate that the choice of this gene as an initial target reflects a low-risk methodological strategy, especially against powdery mildew. As conceptualized by Kusch [48], its knockout produces predictable and measurable phenotypes, serving as proof of concept for the application of gene editing in new crops. This shows that the predominance of *MLO* is not only a matter of experimental convenience, but also a consequence of its evolutionary conservation among species and its economic relevance in key crops.

The *DMR6* (*Downy Mildew Resistance 6*) gene, with 16 occurrences, represents another S-gene of great relevance in disease resistance engineering. Its popularity as an editing target was driven by the discovery of its function as a 2-oxoglutarate (2OG)- and Fe (II)-dependent oxygenase involved in the hydroxylation and degradation of salicylic acid, a key plant defense hormone [62]. Inactivation of *DMR6* removes a negative regulatory point of immunity, resulting in an efficient, broad-spectrum defense response against various pathogens, including oomycetes, bacteria, and fungi [29].

In tomatoes, Thomazella [29] demonstrated that knocking out the *SlDMR6-1* gene conferred remarkable broad-spectrum resistance against multiple pathogens, including the bacterium that causes bacterial spot (*Xanthomonas perforans*) and the oomycete *Phytophthora capsici*. Crucially, this resistance was achieved without significant growth penalties under laboratory conditions.

The study by Djennane [42] with grapevines showed that editing the ortholog *VvDMR6-1* conferred reduced susceptibility to downy mildew, caused by the oomycete *Plasmopara viticola*. However, resistance was accompanied by reduced plant growth. In both studies, improved resistance was associated with elevated levels of salicylic acid, confirming the central role of *DMR6* in regulating immunity, but showing that the balance between defense and growth may be species-dependent.

In a validation study, Low [63] confirmed the function of the *DMR6* ortholog in barley (*Hv2OGO*) in susceptibility to Gibberella. Using Arabidopsis as a model system, they showed that knocking out the gene conferred resistance, while introducing the barley gene restored susceptibility, validating *Hv2OGO* as a promising target.

Broadening target validation to vegetatively propagated tropical crops, Tripathi [64], utilized CRISPR/Cas9 to manipulate the *MusaDMR6* ortholog. This precision knockout effectively conferred heightened resistance to *Banana Xanthomonas Wilt* (BXW), a devastating bacterial pathogen. Critically, the edited lines maintained a wild-type morphology, indicating that in complex polyploid species such as banana, *DMR6* editing is a viable strategy for incorporating disease resistance without incurring the growth penalties frequently observed in other species.

Kawicha [65] recently established a high-efficiency CRISPR/Cas9 protocol tailored for the 'Hin' (ABB) and 'Hom Thong' (AAA) cultivars. Aiming to confer resistance against Banana Blood Disease (*Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis*), the study deployed a novel methodological pipeline based on vacuum infiltration-mediated transformation of multiple bud clumps (MBCs). This approach yielded unprecedented mutation frequencies at the *DMR6* locus, reaching up to 70.15%, thereby consolidating the use of MBCs as a robust alternative for gene editing in diverse *Musa* genomic backgrounds.

This study establishes the viability of this technique in diverse genomic groups (AAA and ABB), consolidating *DMR6* as a highly responsive susceptibility target for the strategic management of vascular pathogens in *Musa* spp.

More directly, Hasley [66] knocked out the *ObDMR6* gene in *SWEET* basil, generating transgene-free lines with improved resistance to downy mildew (up to 93% reduction in pathogen biomass). Gene inactivation did not cause agronomic penalties, proving the viability of the approach even in an allotetraploid species with multiple copies of the target gene.

The frequency of the *SWEET* family, in turn, reflects advances in understanding how bacterial pathogens, via TALE effectors, manipulate host sugar transporters to obtain nutrients, making their editing a direct and effective strategy for bacterial resistance [28].

Seeking to apply the editing of this and other susceptibility gene families in grapevine, Olivares [67] used a geminivirus-derived replicon (BeYDV) strategy to facilitate the delivery of the CRISPR/Cas9 system into somatic embryos. The study targeted four genes to induce large deletions, including *VviSWEET4* and *VviDEL1*. In preliminary phytopathological trials, although lines edited for *VviSWEET4* did not show significant resistance, a line edited for VviDEL1 demonstrated a remarkable reduction of more than 90% in powdery mildew (*Erysiphe necator*) symptoms.

Complementarily, Zeng [68] focused on the *OsSWEET14* gene, and by inactivating it, they obtained effective resistance even against the African strain AXO1947. The editing not only avoided yield penalties but also resulted in taller plants. These studies demonstrate that knocking out different *SWEET* genes in different rice varieties confers resistance to bacterial blight without imposing the agronomic costs previously associated with manipulating these targets, validating the use of these genes as promising for rice breeding.

The translation initiation factor *eIF4E* (N=10) exemplifies an S-gene essential for the replication of a specific group of pathogens, potyviruses, making its editing a validated antiviral strategy [69]. The diversity of other genes with lower occurrence indicates that the field is expanding beyond classic targets. Among these new targets, important gene families stand out, such as the *ERF* transcription factors (N=8), and other genes such as *TAP* and *PMR4* (N=4 each).

Editing the translation initiation factor *eIF4E* to confer virus resistance has been successfully explored in different crops, with contrasting results in terms of agronomic effects. In a study with hexaploid wheat, Kan [36] inactivated the three homologs of the *TaeIF4E* gene via CRISPR/Cas9. Only the triple mutant showed complete resistance to *wheat yellow mosaic virus* (*WYMV*), highlighting the functional redundancy between genes and the need for multiple knockouts to achieve the desired resistance in this

polyploid species. This resistance was achieved without any phenotypic or yield effects, although the mutant plants were slightly taller and matured later.

The study by Kumar [70] with tomatoes showed opposite results. In this case, inactivation of *SleIF4E1* alone was sufficient to confer resistance to *potato virus Y* (*PVY*) without affecting plant development. However, simultaneous inactivation of both genes in the double mutant (*sleif4e1/e2*) resulted in negative effects on growth.

Pavese [71] compared the European chestnut tree (susceptible) with the Asian chestnut tree (tolerant) after infection by two different pathogens. They found that the *PMR4* susceptibility gene was strongly and rapidly activated in the susceptible species (C. sativa) early in the infection. This activation did not occur in the tolerant species (*C. crenata*) indicating that overexpression of *PMR4* facilitates infection, making the European chestnut tree susceptible. Diversity extends to other genes investigated one to three times, such as those belonging to the *WRKY* (N=3) and Pi21 (N=3) families. This exploration demonstrates the dual role of CRISPR/Cas technology not only as a tool for resistance engineering but also as a fundamental research tool for the functional validation of new S-genes [16].

The observed trend suggests a maturing field, transitioning from technology validation to more strategic applications. A key future challenge is to mitigate the negative pleiotropic effects occasionally associated with S-gene knockout. To overcome this, more refined editing strategies, such as modulation of gene expression via promoter editing or multiplex editing to create broad-spectrum resistance, represent promising approaches for the future of plant breeding [72].

Transformation methods in crops

Analysis of CRISPR/Cas component delivery methods showed a preference for *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (74%). This predominance is consistent with *Agrobacterium's* status as the "gold standard" method for plant genetic engineering, not only because of the existence of well-established protocols for a wide range of species [74], but also because of its technical superiority in transformation quality.

Unlike direct methods such as bioballistics, which often result in complex rearrangements and DNA fragmentation, *Agrobacterium* tends to generate precise integrations with a low number of copies (single-copy) [73]. This feature is strategic for CRISPR editing, as it simplifies Mendelian segregation in subsequent generations, facilitating the production of transgene-free edited plants [18], a fundamental requirement for regulatory and commercial approval.

Direct transformation methods play strategic roles. Particle bombardment (biopallistics) remains an indispensable tool for the transformation of *Agrobacterium-recalcitrant* species, such as cereals and wheat [75]. Protoplast transformation occupies an important position for rapid validation trials and, crucially, for the delivery of ribonucleoproteins (RNPs), enabling the generation of edited plants free of exogenous DNA, which offers a significant advantage from many regulatory perspectives [57].

A significant methodological gap was the finding that 6.9% of the studies analyzed did not specify the transformation method used. Additionally, in five studies (4%), plant transformation was classified as 'not applicable' because the scope of these studies was limited to in silico analyses, in vitro validation of system components, or other approaches that did not involve the generation of edited plants. This omission of a fundamental experimental detail represents a direct barrier to reproducibility, as it prevents replication and validation, regardless of the results. This gap reinforces the importance of adhering to transparent and comprehensive reporting guidelines, such as those recommended by PRISMA, to ensure the rigor and reliability of scientific research [31].

Auxiliary methods for CRISPR/Cas

The analysis of auxiliary methodologies demonstrates a well-established and standardized validation workflow. The predominance of DNA sequencing (59.5%) reaffirms its status as the fundamental and confirmatory step to verify the occurrence and nature of editing at the target site. In addition, qPCR (57.8%) and conventional PCR (33.6%) emerge as crucial tools for genotyping and functional analysis, being used both to quantify target gene expression and to measure pathogen biomass as a quantitative indicator of phenotypic resistance.

The use of Western blot (8.6%), although less frequent, provides final proof of gene inactivation at the protein level, confirming that the genotypic change resulted in the absence of the functional product. The application of RNA-seq (0.9%) indicates a more exploratory and mechanistic research approach. This technique allows the exploration of transcriptomic changes resulting from resistance, providing information on the defense mechanisms that are activated or inhibited by S gene editing [76].

The frequency of infection assays (4.0%), biomass measurement (6%), and microscopy analyses (5%) demonstrates the researchers' focus on direct validation of the agronomic phenotype of interest. These techniques are employed to answer whether gene editing has, in fact, resulted in a measurable increase in plant resistance to disease.

The use of more specific analyses, such as the detection of reactive oxygen species (ROS) and histochemical assays, although less common, indicates a more in-depth investigation of defense processes. These assays are used to elucidate how resistance manifests at the cellular and physiological levels, such as the activation of plant defense pathways, a process in which ROS play a central role as signaling molecules [77-78].

Phenotypic analysis and characteristics obtained after mutation

The most frequent categories of reported studies (46%) did not observe negative pleiotropic effects in edited plants (Figure 11B). This is a significant result, as it suggests that the susceptibility function can be inactivated without affecting other essential plant functions, resulting in resistance without an apparent adaptive cost. Obtaining agronomically normal plants, indistinguishable from their counterparts, is the main goal of genetic improvement and validates S-gene editing as a promising strategy for agriculture [72].

In contrast, 21.6% of studies that reported negative pleiotropic effects, such as reduced growth and reproductive defects, serve as a critical reminder that not all S-genes are ideal targets for knockout. Many S-genes play dual or pleiotropic roles, being essential for normal plant development as well as being co-opted by pathogens [47]. These results underscore the importance of detailed functional characterization and target S-gene selection to minimize adaptive costs and ensure agronomic success.

Of the studies analyzed, 31.9% did not report the overall phenotype of the plants. The evaluation of agronomic traits is as important as the evaluation of disease resistance itself. The absence of this information prevents a complete assessment of the viability of an S-gene as a breeding target and limits the community's knowledge of potential adaptive costs. For the efficient advancement of the field, detailed phenotypic characterization must become a standard component in the reporting of genome editing studies, ensuring the transparency and reproducibility of results [31].

Analysis of risk of bias

The risk of bias analysis was essential to verify the reliability of the data compiled in this review. Most studies classified as having a low risk of bias (70%) demonstrate that the majority of the selected studies adopted adequate methodological rigor, clearly reporting the editing validation techniques and expected outcomes. The portion classified as moderate risk (29%) refers mainly to studies that focused on the molecular validation of the CRISPR/Cas tool without expanding to a detailed phenotypic characterization of the entire plant. However, as the validation of gene editing was confirmed in these

studies, they contribute vital molecular data. Therefore, the high methodological quality of the selected articles ensures that the conclusions presented in this systematic review are reliable and representative of the current scenario in agricultural biotechnology.

Final considerations and perspectives

The growing demand for food and the continuous pressure of biotic stresses on global agriculture require approaches that overcome the limitations of conventional breeding. This systematic review confirmed that editing susceptibility genes (S-genes) via CRISPR/Cas has established itself as a viable and efficient strategy for developing disease resistance. Unlike classical transgenics, the precise inactivation or modification of host factors, notably the *MLO*, *SWEET*, and *DMR6* genes, has proven effective in generating broad-spectrum and durable resistance against a variety of pathogens, without, in most cases, causing significant phenotypic penalties.

Analysis of 118 studies published between 2019 and 2026 demonstrated China's significant leadership in scientific production, reflecting strategic food security policies focused on major crops such as rice (*Oryza sativa*). Methodologically, the review demonstrated that transformation by *Agrobacterium tumefaciens* was predominant. However, there is a notable growing strategic movement towards obtaining plants that are completely free of exogenous DNA (transgene-free), as exemplified by recent reviews [79-80]. This advance is fundamental as it meets requirements that can facilitate regulatory approval and the commercialization of new varieties. The reliability of these results, reinforced by bias risk analysis, attests that the technology has surpassed the "proof of concept" phase, establishing itself as an effective solution to the challenges in the field.

Despite its evident success, advances in this field pose challenges that shape future prospects. It is essential that the knowledge accumulated on model species and major commodities be transferred to other crops that are important for regional food security but still underrepresented in the literature. At the same time, the durability of resistance will depend on the implementation of multiplex strategies, aiming at the simultaneous editing of gene families, and the exploration of modifications in promoters, refining resistance to dissociate it from possible adaptive costs and ensure the productivity of cultivars.

Bibliographic References

1. Pandey P, Irulappan V, Bagavathiannan MV, Senthil-Kumar M (2017) Impact of combined abiotic and biotic stresses on plant growth and avenues for crop improvement by exploiting physio-morphological traits. Front Plant Sci 8. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00537
2. Savary S, Willocquet L, Pethybridge SJ, Esker P, McRoberts N, Nelson A (2019) The global burden of pathogens and pests on major food crops. Nat Ecol Evol 3:430–439. https://doi.org/10.1038/s41559-018-0793-y
3. FAO (2026) FAOSTAT. FAO, Rome. http://faostat.fao.org/
4. Fones HN, Bebber DP, Chaloner TM, Kay WT, Steinberg G, Gurr SJ (2020) Threats to global food security from emerging fungal and oomycete crop pathogens. Nat Food 1:332–342. https://doi.org/10.1038/s43016-020-0075-0
5. Chowdhuri I, Pal SC (2025) Challenges and potential pathways towards sustainable agriculture crop production: A systematic review to achieve sustainable development goals (SDGs). Soil Tillage Res 248:106442. https://doi.org/10.1016/j.still.2024.106442
6. Thakur S, Kaur S, Adhikari S, Sabharwal P, Fu Y, Meru G (2025) Turning susceptibility into strength: A new era of durable resistance in plants through genome editing. Plants 14:3080. https://doi.org/10.3390/plants14193080
7. Thakur R, Sharma S (2024) Impact of pesticides used in agriculture: Their benefits and hazards. AIP Conf Proc. https://doi.org/10.1063/5.0193979
8. Fenibo EO, Ijoma GN, Matambo T (2021) Biopesticides in sustainable agriculture: A critical sustainable development driver governed by green chemistry principles. Front Sustain Food Syst 5. https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.619058
9. Pal KK, McSpadden Gardener B (2006) Biological control of plant pathogens. Plant Health Instr. https://doi.org/10.1094/phi-a-2006-1117-02
10. Gururani MA, Venkatesh J, Upadhyaya CP, Nookaraju A, Pandey SK, Park SW (2012) Plant disease resistance genes: Current status and future directions. Physiol Mol Plant Pathol 78:51–65. https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2012.01.002
11. O'Brien PA (2017) Biological control of plant diseases. Australas Plant Pathol 46:293–304. https://doi.org/10.1007/s13313-017-0481-4
12. Carroll D (2011) Genome engineering with zinc-finger nucleases. Genetics 188:773–782. https://doi.org/10.1534/genetics.111.131433

13. Bogdanove AJ, Voytas DF (2011) TAL effectors: customizable proteins for DNA targeting. Science 333:1843–1846. https://doi.org/10.1126/science.1204094
14. Bortesi L, Fischer R (2015) The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. Biotechnol Adv 33:41–52. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.006
15. Wang H, La Russa M, Qi LS (2016) CRISPR/Cas9 in genome editing and beyond. Annu Rev Biochem 85:227–264. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014607
16. Zhang D, Zhang Z, Unver T, Zhang B (2021) CRISPR/Cas: A powerful tool for gene function study and crop improvement. J Adv Res 29. https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.10.003
17. Khatodia S, Bhatotia K, Passricha N, Khurana SMP, Tuteja N (2016) The CRISPR/Cas genome-editing tool: Application in improvement of crops. Front Plant Sci 7. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00506
18. Chen K, Wang Y, Zhang R, Zhang H, Gao C (2019) CRISPR/Cas genome editing and precision plant breeding in agriculture. Annu Rev Plant Biol 70:667–697. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-100049
19. Zaynab M, Sharif Y, Fatima M, Afzal MZ, Aslam MM, Raza MF, Anwar M, Raza MA, Sajjad N, Yang X, Li S (2020) CRISPR/Cas9 to generate plant immunity against pathogen. Microb Pathog 141:103996. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.103996
20. Li Y, Wu X, Zhang Y, Zhang Q (2022) CRISPR/Cas genome editing improves abiotic and biotic stress tolerance of crops. Front Genome Ed 4. https://doi.org/10.3389/fgeed.2022.987817
21. Rani LU, Shelke M, Sandhya M, Senthilraja G (2024) Targeted editing of susceptibility genes for plant disease resistance: Current state and future hopes. Plant Gene 40:100471. https://doi.org/10.1016/j.plgene.2024.100471
22. Van Schie CCN, Takken FLW (2014) Susceptibility genes 101: How to be a good host. Annu Rev Phytopathol 52:551–581. https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-045854
23. Pavan S, Jacobsen E, Visser RGF, Bai Y (2010) Loss of susceptibility as a novel breeding strategy for durable and broad-spectrum resistance. Mol Breed 25:1–12. https://doi.org/10.1007/s11032-009-9323-6
24. Voytas DF (2013) Plant genome engineering with sequence-specific nucleases. Annu Rev Plant Biol 64:327–350. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105552

25. Gao C (2021) Genome engineering for crop improvement and future agriculture. Cell 184. https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.005

26. Wang Y, Cheng X, Shan Q, Zhang Y, Liu J, Gao C, Qiu J-L (2014) Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. Nat Biotechnol 32:947–951. https://doi.org/10.1038/nbt.2969

27. Nekrasov V, Wang C, Win J, Lanz C, Weigel D, Kamoun S (2017) Rapid generation of a transgene-free powdery mildew resistant tomato by genome deletion. Sci Rep 7. https://doi.org/10.1038/s41598-017-00578-x

28. Oliva R, Ji C, Atienza-Grande G, Huguet-Tapia JC, Perez-Quintero A, Li T, Eom J-S, Li C, Nguyen H, Liu B, Auguy F, Sciallano C, Luu VT, Dossa GS, Cunnac S, Schmidt SM, Slamet-Loedin IH, Vera Cruz C, Szurek B, Frommer WB (2019) Broad-spectrum resistance to bacterial blight in rice using genome editing. Nat Biotechnol 37:1344–1350. https://doi.org/10.1038/s41587-019-0267-z

29. Thomazella DPT, Seong K, Mackelprang R, Dahlbeck D, Geng Y, Gill US, Qi T, Pham J, Giuseppe P, Lee CY, Ortega A, Cho M-J, Hutton SF, Staskawicz B (2021) Loss of function of a *DMR6* ortholog in tomato confers broad-spectrum disease resistance. Proc Natl Acad Sci U S A 118. https://doi.org/10.1073/pnas.2026152118

30. Mamédio C, Santos C, Andrucioli De Mattos Pimenta C, Roberto M, Nobre C (2007) A estratégia PICO para a construção da pergunta de pesquisa e busca de evidências. https://www.scielo.br/j/rlae/a/CfKNnz8mvSqVjZ37Z77pFsy/?format=pdf&lang=pt

31. Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, Shamseer L, Tetzlaff JM, Akl EA, Brennan SE, Chou R, Glanville J, Grimshaw JM, Hróbjartsson A, Lalu MM, Li T, Loder EW, Mayo-Wilson E, McDonald S, McGuinness LA (2021) The PRISMA 2020 statement: An updated guideline for reporting systematic reviews. BMJ 372:n71. https://doi.org/10.1136/bmj.n71

32. Higgins JPT, Altman DG, Gotzsche PC, Juni P, Moher D, Oxman AD, Savovic J, Schulz KF, Weeks L, Sterne JAC (2011) The Cochrane Collaboration's tool for assessing risk of bias in randomised trials. BMJ 343:d5928. https://doi.org/10.1136/bmj.d5928

33. Feng Z, Zhang B, Ding W, Liu X, Yang D-L, Wei P, Cao F, Zhu S, Zhang F, Mao Y, Zhu J-K (2013) Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. Cell Res 23:1229–1232. https://doi.org/10.1038/cr.2013.114
34. FAO (2024) The State of Food Security and Nutrition in the World 2023. FAO, Rome. https://doi.org/10.4060/cc3017en
35. Kieu NP, Lenman M, Wang ES, Petersen BL, Andreasson E (2021) Mutations introduced in susceptibility genes through CRISPR/Cas9 genome editing confer increased late blight resistance in potatoes. Sci Rep 11. https://doi.org/10.1038/s41598-021-83972-w
36. Kan J, Cai Y, Cheng C-Y, Chen S, Jiang C, He Z, Yang P (2023) CRISPR/Cas9-guided knockout of *eIF4E* improves wheat yellow mosaic virus resistance without yield penalty. Plant Biotechnol J 21:893–895. https://doi.org/10.1111/pbi.14002
37. Pompili V, Dalla Costa L, Piazza S, Pindo M, Malnoy M (2019) Reduced fire blight susceptibility in apple cultivars using a high-efficiency CRISPR/Cas9-FLP/FRT-based gene editing system. Plant Biotechnol J 18:845–858. https://doi.org/10.1111/pbi.13253
38. Giacomelli L, Scintilla S, Salvagnin U, Zeilmaker T, Dalla Costa L, Malnoy M, Rouppe van der Voort J, Moser C (2024) Generation of non-transgenic mildew-resistant grapevine clones via gene-editing: Potentials and hurdles. Acta Hortic 1390:329–334. https://doi.org/10.17660/actahortic.2024.1390.40
39. Jin, Yan; Kristkova, Zuzana Smeets; Wesseler, Justus. Welfare impacts of China's regulatory change toward genome-edited crops. Trends in Biotechnology, Amsterdam, 2025. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2025.04.010
40. Ncses - National Center For Science And Engineering Statistics. The State of U.S. Science and Engineering 2024. Alexandria, VA: National Science Foundation, 2024. (Science and Engineering Indicators). https://ncses.nsf.gov/pubs/nsb20241.
41. OIV (2024) Reduction of chemical treatments in the vineyard. https://www.oiv.int/node/4045
42. Djennane S, Gersch S, Le-Bohec F, Piron M-C, Baltenweck R, Lemaire O, Merdinoglu D, Hugueney P, Nogué F, Mestre P (2023) CRISPR/Cas9 editing of downy mildew resistant 6 (*DMR6-1*) in grapevine leads to reduced susceptibility to *Plasmopara viticola*. J Exp Bot 75:2100–2112. https://doi.org/10.1093/jxb/erad487

43. Li R, Maioli A, Yan Z, Bai Y, Valentino D, Milani, Anna M, Pompili, V, Comino C; Lanteri S, Moglia, A, Acquadro, Alberto. CRISPR/Cas9-based knock-out of the PMR4 gene reduces susceptibility to late blight in two tomato cultivars. Int J Mol Sci, Basel, v. 23, n. 23, p. 14542, 2022. https://doi.org/10.3390/ijms232314542.

44. McCormick S (1991) Transformation of tomato with *Agrobacterium tumefaciens*. In: Plant tissue culture manual, pp 311–319. https://doi.org/10.1007/978-94-009-0103-2_17

45. Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. Plant J 6:271–282. https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1994.6020271.x

46. Meng X, Yu H, Zhang Y, Zhuang F, Song X, Gao S, Gao C, Li J (2017) Construction of a genome-wide mutant library in rice using CRISPR/Cas9. Mol Plant 10:1238–1241. https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.06.006

47. Zeilmaker T, Ludwig NR, Elberse J, Seidl MF, Berke L, Van Doorn A, Schuurink RC, Snel B, Van den Ackerveken G (2014) DOWNY MILDEW RESISTANT 6 and DMR6-LIKE OXYGENASE 1 are partially redundant but distinct suppressors of immunity in *Arabidopsis*. Plant J 81:210–222. https://doi.org/10.1111/tpj.12719

48. Kusch S, Panstruga R (2017) mlo-based resistance: An apparently universal "weapon" to defeat powdery mildew disease. Mol Plant Microbe Interact 30:179–189. https://doi.org/10.1094/mpmi-12-16-0255-cr

49. Eom J-S, Luo D, Atienza-Grande G, Yang J, Ji C, Thi Luu V, Huguet-Tapia JC, Char SN, Liu B, Nguyen H, Schmidt SM, Szurek B, Vera Cruz C, White FF, Oliva R, Yang B, Frommer WB (2019) Diagnostic kit for rice blight resistance. Nat Biotechnol 37:1372–1379. https://doi.org/10.1038/s41587-019-0268-y

50. Wei Y-Y, Liang S, Zhu X-M, Liu X-H, Lin F-C (2023) Recent advances in effector research of *Magnaporthe oryzae*. Biomolecules 13:1650. https://doi.org/10.3390/biom13111650

51. Ryan RP, Vorhölter F-J, Potnis N, Jones JB, Van Sluys M-A, Bogdanove AJ, Dow JM (2011) Pathogenomics of *Xanthomonas*: Understanding bacterium–plant interactions. Nat Rev Microbiol 9:344–355. https://doi.org/10.1038/nrmicro2558

52. Ucioli, Alessandra; Tavazza, Roberto; Baima, Sara; Fatyol, Katalin; Burgyán, József; Tavazza, Mario. CRISPR–Cas9 targeting of the eIF4E1 gene extends the Potato virus Y resistance spectrum

of the Solanum tuberosum L. cv. Desirée. Frontiers in Microbiology, Lausanne, v. 13, p. 873930, 2022. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.873930

53. Ali MA, Anjam MS, Nawaz MA, Lam H-M, Chung G (2018) Signal transduction in plant–nematode interactions. Int J Mol Sci 19:1648. https://doi.org/10.3390/ijms19061648
54. Zhu H, Li C, Gao C (2020) Applications of CRISPR–Cas in agriculture and plant biotechnology. Nat Rev Mol Cell Biol 21:661–677. https://doi.org/10.1038/s41580-020-00288-9
55. Li ZT, Kim K-H, Dhekney SA, Jasinski JR, Creech MR, Gray DJ (2014) An optimized procedure for plant recovery from somatic embryos significantly facilitates the genetic improvement of *Vitis*. Hortic Res 1. https://doi.org/10.1038/hortres.2014.27
56. Andersson M, Turesson H, Nicolia A, Fält A-S, Samuelsson M, Hofvander P (2016) Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (Solanum tuberosum) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts. Plant Cell Rep 36:117–128. https://doi.org/10.1007/s00299-016-2062-3
57. Lin C-S, Hsu C-T, Yang L-H, Lee L-Y, Fu J-Y, Cheng Q-W, Wu F-H, Hsiao HC-W, Zhang Y, Zhang R, Chang W-J, Yu C-T, Wang W, Liao L-J, Gelvin SB, Shih M-C (2018) Application of protoplast technology to CRISPR/Cas9 mutagenesis: From single-cell mutation detection to mutant plant regeneration. Plant Biotechnol J 16:1295–1310. https://doi.org/10.1111/pbi.12870
58. Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. Plant J 16:735–743. https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1998.00343.x
59. Altpeter F, Springer NM, Bartley LE, Blechl A, Brutnell TP, Citovsky V, Conrad L, Gelvin SB, Jackson D, Kausch AP, Lemaux PG, Medford JI, Orozo-Cardenas M, Tricoli D, VanEck J, Voytas DF, Walbot V, Wang K, Zhang ZJ, Stewart CN (2016) Advancing crop transformation in the era of genome editing. Plant Cell 28:1510–1529. https://doi.org/10.1105/tpc.16.00196
60. Pramanik D, Shelake RM, Park J, Kim MJ, Hwang I, Park Y, Kim J-Y (2021) CRISPR/Cas9-mediated generation of pathogen-resistant tomato against tomato yellow leaf curl virus and powdery mildew. Int J Mol Sci 22:1878. https://doi.org/10.3390/ijms22041878
61. Wan D-Y, Guo Y, Cheng Y, Hu Y, Xiao S, Wang Y, Wen Y-Q (2020) CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of *VvMLO3* results in enhanced resistance to powdery mildew in grapevine (*Vitis vinifera*). Hortic Res 7. https://doi.org/10.1038/s41438-020-0339-8

62. Zhang Y, Bai Y, Wu G, Zou S, Chen Y, Gao C, Tang D (2017) Simultaneous modification of three homoeologs of *TaEDR1* by genome editing enhances powdery mildew resistance in wheat. Plant J 91:714–724. https://doi.org/10.1111/tpj.13599

63. Low YC, Lawton MA, Di R (2020) Validation of barley 2OGO gene as a functional orthologue of *Arabidopsis DMR6* gene in *Fusarium* head blight susceptibility. Sci Rep 10. https://doi.org/10.1038/s41598-020-67006-5

64. Tripathi L, Ntui VO, Tripathi J (2020) CRISPR/Cas9-based genome editing of banana for disease resistance. Curr Opin Plant Biol 56:118–126. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2020.05.003

65. Kawicha P, Sangdee A, Rattanapolsan L, Boonruangrod R, Theanhom A, Tongyoo P, Dechkrong P, Thanyasiriwat T (2026) *DMR6* gene editing in bananas: Protocol development using CRISPR/Cas9 and multiple bud clump transformation. Int J Hortic Sci Technol 13:609–624. https://doi.org/10.22059/ijhst.2025.392412.1050

66. Hasley AR, Navet N, Tian M (2021) CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of sweet basil candidate susceptibility gene *ObDMR6* enhances downy mildew resistance. PLoS One 16:e0253245. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253245

67. Olivares F, Loyola R, Olmedo B, Miccono MA, Aguirre C, Vergara R, Riquelme D, Madrid G, Plantat P, Mora R, Espinoza D, Prieto H (2021) CRISPR/Cas9 targeted editing of genes associated with fungal susceptibility in *Vitis vinifera* L. cv. Thompson Seedless using geminivirus-derived replicons. Front Plant Sci 12:791030. https://doi.org/10.3389/fpls.2021.791030

68. Zeng X, Luo Y, Vu NTQ, Shen S, Xia K, Zhang M (2020) CRISPR/Cas9-mediated mutation of *OsSWEET14* in rice cv. Zhonghua11 confers resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* without yield penalty. BMC Plant Biol 20. https://doi.org/10.1186/s12870-020-02524-y

69. Sanfaçon H (2015) Plant translation factors and virus resistance. Viruses 7:3392–3419. https://doi.org/10.3390/v7072778

70. Kumar S, Abebie B, Kumari R, Kravchik M, Shnaider Y, Leibman D, Bornstein M, Gaba V, Gal-On A (2022) Development of PVY resistance in tomato by knockout of host eukaryotic initiation factors by CRISPR-Cas9. Phytoparasitica 50:743–756. https://doi.org/10.1007/s12600-022-00991-7

71. Pavese V, Moglia A, Gonthier P, Daniela T, Cavalet-Giorsa E, & Botta, R. (2021). Identification of Susceptibility Genes in Castanea sativa and Their Transcription Dynamics following Pathogen Infection. *Plants*, *10*(5), 913–913. https://doi.org/10.3390/plants10050913
72. Zaidi SS-A, Mukhtar MS, Mansoor S (2018) Genome editing: Targeting susceptibility genes for plant disease resistance. Trends Biotechnol 36:898–906. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.04.005
73. Travella S, Ross SM, Harden J, Everett C, Snape JW, Harwood WA (2004) A comparison of transgenic barley lines produced by particle bombardment and *Agrobacterium*-mediated techniques. Plant Cell Rep 23:780–789. https://doi.org/10.1007/s00299-004-0892-x
74. Gelvin SB (2003) Agrobacterium-mediated plant transformation: The biology behind the "gene-jockeying" tool. **Microbiol Mol Biol Rev** 67:16–37. https://doi.org/10.1128/mmbr.67.1.16-37.2003
75. Levengood H, Zhou Y, Zhang C (2024) Advancements in plant transformation: From traditional methods to cutting-edge techniques and emerging model species. Plant Cell Rep 43:11. https://doi.org/10.1007/s00299-024-03359-9
76. Wang H, Xu Y, Zhang Z, Zhang G, Tan C, Ye L (2024) Development and application of transcriptomics technologies in plant science. Crop Des 3:100057. https://doi.org/10.1016/j.cropd.2024.100057
77. Waszczak C, Carmody M, Kangasjärvi J (2018) Reactive oxygen species in plant signaling. Annu Rev Plant Biol 69:209–236. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040322
78. Qi J, Wang J, Gong Z, Zhou J-M (2017) Apoplastic ROS signaling in plant immunity. Curr Opin Plant Biol 38:92–100. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.04.022
79. Cai R, Chai N, Zhang J, Tan J, Liu Y-G, Zhu Q, Zeng D (2025) CRISPR/Cas system-mediated transgene-free or DNA-free genome editing in plants. Theor Appl Genet 138. https://doi.org/10.1007/s00122-025-04990-0
80. Ramakrishnan M, Kaul R, Sharma A, Ahmad Z, Vijayakanth V, Keerthana K, Gao Z, Zhou M, Wei Q (2025) CRISPR RNP-mediated transgene-free genome editing in plants: Advances, challenges and future directions for tree species. Plant Cell Environ. https://doi.org/10.1111/pce.70176

Statements & Declarations

Funding

The authors acknowledge financial support from the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Brazil – Finance Code 001.

Competing Interests

The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.

Author Contributions

C.F.F, E.P.A and M.L.S.F. conceptualized the theme for the systematic review. M.L.S.F, A.J.R., F.S.N, L.C.S.J, A.P.S.R and M.S.M were responsible for using the softwares for gathering the information in this systematic review. All authors contributed to the original draft and participated in reviewing and editing the manuscript.

Data Availability

The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request

Ethics Approval

Not applicable. This study is a systematic review and does not involve direct research with human or animal subjects.

Consent to Participate

Not applicable.

Consent to Publish

Not applicable.

CAPÍTULO 2

Validação de gene de suscetibilidade em bananeira para estudos de edição gênica no controle de *Fusarium oxysporum f. sp. cubense*

Validação de gene de suscetibilidade em bananeira para estudos de edição gênica no controle de *Fusarium oxysporum f. sp. cubense*

RESUMO: A murcha de Fusarium, causada pelo fungo de solo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), representa o principal desafio para a produção de bananas, especialmente em variedades muito consumidas no Brasil, como a 'Prata-Anã' (AAB). Devido à grande dificuldade em combater, essa doença, pelos métodos de manejo tradicionais, a desativação de genes de suscetibilidade (*S-genes*) via tecnologia *CRISPR/Cas9* surge como uma estratégia de interesse melhoramento. O objetivo deste trabalho foi analisar o comportamento do gene *DMR6* durante a infecção entre a bananeira e o patógeno. A metodologia contou com a inoculação controlada de mudas, o acompanhamento da expressão do gene via RT-qPCR associada a caracterizações histoquímicas das respostas de defesa da planta. Os resultados demonstraram regulação diferencial do *DMR6*, caracterizada por repressão inicial seguida de indução significativa (6,5 vezes superior ao controle) às 72 horas após inoculação (hpi). Esse pico de expressão coincidiu com a observação no microscópio da formação inicial de esporos e o avanço da colonização nos tecidos vasculares. pesar da deposição de calose e do acúmulo de compostos fenólicos nas raízes infectadas, tais barreiras mostraram-se insuficientes para conter o progresso do patógeno, resultando em elevada severidade da doença aos 90 dias após inoculação (índice de severidade de 80%). Os dados indicam que o *DMR6* atua como um regulador negativo da imunidade, estando diretamente ligado à sensibilidade da planta no estudo realizado. Este estudo fornece a base molecular necessária para futuras etapas de validação funcional via nocaute gênico, assegurando o desenvolvimento de variedades resistentes de forma mais rápida e segura.

ABSTRACT: Fusarium wilt, caused by the soil-borne fungus Fusarium oxysporum f. sp. cubense (Foc), represents the main challenge for banana production, especially in widely consumed varieties in Brazil such as 'Prata-Anã' (AAB). Due to the great difficulty in controlling this disease through traditional management methods, the

inactivation of susceptibility genes (S-genes) using CRISPR/Cas9 technology has emerged as a promising breeding strategy. The objective of this study was to analyze the behavior of the DMR6 gene during the infection process between banana plants and the pathogen. The methodology included controlled inoculation of plantlets, monitoring gene expression through RT-qPCR, and histochemical characterization of plant defense responses. The results demonstrated differential regulation of DMR6, characterized by initial repression followed by significant induction (6.5-fold higher than the control) at 72 hours post-inoculation (hpi). This peak of expression coincided with the initial observation of spore formation and the progression of colonization within vascular tissues under microscopy. Despite callose deposition and the accumulation of phenolic compounds in infected roots, these defense barriers were insufficient to halt pathogen progression, resulting in high disease severity at 90 days after inoculation (severity index of 80%). The data indicate that DMR6 acts as a negative regulator of immunity and is directly associated with plant susceptibility in the present study. This work provides the molecular foundation for future functional validation through gene knockout approaches, supporting the faster and safer development of resistant banana varieties.

Introdução

A bananeira (Musa spp.) é uma das culturas mais importantes do mundo, com produção superior a 139 milhões de toneladas em 2024, cultivadas em cerca de 5,9 milhões de hectares (FAOSTAT, 2026). Sua ampla adaptabilidade permite o cultivo em diversas regiões tropicais e subtropicais, porém, a produtividade é severamente limitada por desafios fitossanitários. Entre as principais ameaças globais destacam-se as Sigatokas amarela e negra, a murcha bacteriana e, de forma mais crítica, a Murcha de Fusarium (Calberto et al. .2015; Dita et al., 2018; Oliveira et al., 2025).

A murcha de Fusarium, causada pelo fungo de solo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), é a doença mais destrutiva da bananicultura mundial (Velame et al., 2024). Como um patógeno hemibiotrófico, o Foc inicia sua infecção colonizando tecidos vivos antes de transitar para uma fase necrotrófica agressiva, que induz a obstrução vascular, o amarelecimento foliar e a morte da planta (Dita et al., 2018). A persistência do fungo no solo por meio de clamidósporos torna as áreas afetadas inviáveis para o cultivo por décadas, evidenciando a agressividade e a rápida disseminação desta fitopatologia (Ploetz, 2006).

O desenvolvimento de cultivares resistentes é a estratégia mais eficaz e sustentável para o manejo da Murcha de Fusarium, reduzindo perdas e o impacto ambiental (Dita et al., 2018). No Brasil, o Programa de Melhoramento Genético da Embrapa Mandioca e Fruticultura desempenha um papel central nesse cenário, obtendo sucesso no desenvolvimento de híbridos, especialmente do subgrupo Prata, através do cruzamento de diploides melhorados com cultivares comerciais visando a introgressão de genes de resistência (Amorim et al., 2024).

O melhoramento convencional da bananeira é limitado pela poliploidia e esterilidade das cultivares, o que torna os cruzamentos lentos e arrisca as características do fruto. Ante a rápida evolução de patógenos, é essencial integrar ferramentas biotecnológicas para acelerar a obtenção de variedades resistentes, preservando as qualidades agronômicas e organolépticas originais (Soares et al., 2021; Justine et al., 2022).

A tecnologia CRISPR/Cas9 consolidou-se como uma ferramenta de edição genômica de precisão (Jinek et al., 2012), permitindo mutações sítio-específicas. Em bananeira, essa técnica é estratégica por possibilitar a melhoria direta de clones comerciais poliploides, inserindo características de interesse, como a resistência a doenças, sem a necessidade de cruzamentos e mantendo a integridade do genótipo original (Tripathi et al., 2020; Ntui et al., 2020).

A inativação de genes de suscetibilidade (*S-genes*) via nocaute (*NHEJ*) (*Non Homologous End-Joining – nocaute*) surge como uma abordagem estratégica para gerar resistência de amplo espectro e durável, superando a especificidade dos genes de resistência (*R-genes*). Em bananeira, o sucesso do CRISPR/Cas9 contra patógenos virais e bacterianos fundamenta sua aplicação no manejo de doenças fúngicas complexas, como a murcha de Fusarium (Hu et al., 2017; Feng et al., 2018; Tripathi et al., 2019; 2020; Zaidi et al., 2018).

Aliados à edição gênica, a prospecção genômica e marcadores moleculares são fundamentais para identificar alvos em bananeira (Silva et al., 2017; Ferreira et al., 2024). Entre estes, destaca-se o gene de suscetibilidade *DMR6* (*Downy Mildew Resistant 6*), que atua na rota do ácido salicílico. Em *Musa* spp., a indução do ortólogo *MusaDMR6* durante infecções sugere que sua inativação pode restaurar a defesa basal, tornando a análise de sua expressão uma etapa indispensável para validar estratégias de nocaute (Zeilmaker et al., 2015; Tripathi et al., 2021).

A manipulação de *S-genes* evoluiu de plantas-modelo para grandes commodities, focando em alvos que modulam a imunidade basal (Thakur et al., 2025; Wang et al., 2025). O nocaute do gene *DMR6* via CRISPR/Cas9 conferiu resistência eficiente a fitopatógenos hemibiotróficos em culturas como batata e tomate, sem acarretar penalidades significativas ao vigor vegetativo (Kieu et al., 2021; Thomazella et al., 2021).

Em bananeira (*Musa* spp.), o nocaute do *MusaDMR6* conferiu resistência à *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* (Tripathi et al., 2021) e à *Ralstonia syzygii* (Kawicha et al., 2026). Tais avanços consolidam esse gene como um alvo de suscetibilidade versátil, fundamentando sua exploração para o controle de patógenos vasculares como o Foc.

Tripathi et al. (2021) validaram o *MusaDMR6* como gene de suscetibilidade na interação com *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* (Xcm). O nocaute via CRISPR/Cas9 gerou plantas resistentes à murcha bacteriana (BXW) sem efeitos pleiotrópicos negativos, consolidando o alvo para edição gênica em *Musa* spp.

Embora o nocaute do *MusaDMR6* valide a resistência à murcha bacteriana (BXW), sua aplicação contra o Foc em cultivares 'Prata' permanece uma lacuna no Brasil (Tripathi et al., 2021). Portanto, este trabalho visou caracterizar o perfil transcricional do *MusaDMR6* na 'Prata-Anã' (AAB) durante a interação com o Foc.

Por meio da análise de expressão gênica via RT-qPCR em diferentes estágios da infecção radicular, buscou-se confirmar a ativação do *MusaDMR6* como um fator de suscetibilidade. Os resultados obtidos visam fornecer o embasamento molecular indispensável para futuras estratégias de melhoramento de precisão via CRISPR/Cas9 direcionadas ao desenvolvimento de variedades de bananeira com resistência durável à Murcha de Fusarium.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido na área experimental da Embrapa Mandioca e Fruticultura, localizada em Cruz das Almas, Bahia, Brasil. Para o experimento, foram selecionadas 35 mudas de bananeira (*Musa* spp.) da cultivar `Prata-Anã' (AAB), com 3 réplicas biológicas para cada tratamento e o excedente de plantas foi destinado à avaliação da severidade da doença aos 90 dias. As mudas foram previamente aclimatadas (Figura 1A) e transferidas para vasos plásticos contendo substrato constituído por casca de pinheiro (Tecnomax®) e fibra de coco (5:1; v:v) (Figura 2A). As plantas permaneceram em cultivo por cerca de 30 dias (Figura 1). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) (Figura 1C).

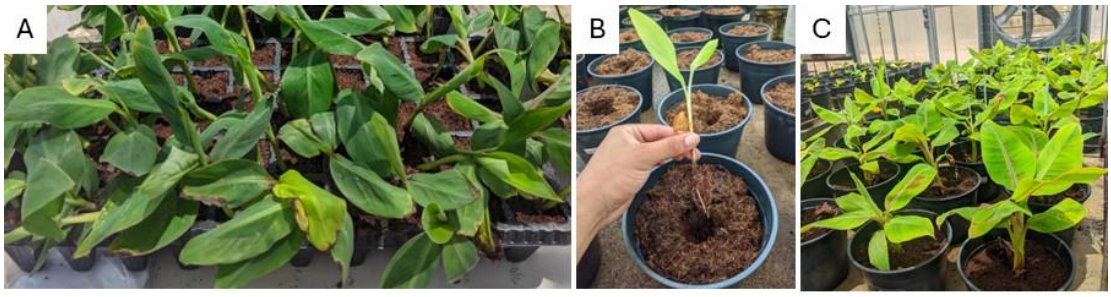


Figura 1. Etapas de condução e estabelecimento do experimento com bananeira 'Prata-Anã' (AAB) em casa de vegetação. (A) Mudas selecionadas durante o processo de aclimatização inicial. (B) Procedimento de transferência (transplante) das mudas para os vasos plásticos contendo o substrato experimental. (C) Organização e distribuição das plantas na bancada sob delineamento inteiramente casualizado (DIC).

Identificação e seleção de genes de suscetibilidade

A escolha do gene DMR6 como gene alvo nesse estudo**,** baseia-se em evidências genéticas, transcricionais e funcionais robustas, demonstrando seu papel conservado na modulação negativa da imunidade e seu potencial como alvo estratégico para intervenções genéticas em plantas (Chelliah et al. 2023, Pavese et al. 2021 e Tripathi et al. 2021). Em nosso trabalho, o gene *DMR6* foi selecionado devido ao seu papel na suscetibilidade a estresses bióticos em bananeira demonstrado por Tripathi et al. (2021).

Preparo do inóculo e infestação do substrato.

O inóculo foi preparado com o fungo *Fusarium oxysporum f. sp. cubense*, isolado CNPMF 218, raça 4 subtropical (ST4), pertencente à Coleção Biológica de Microrganismos do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura, garantindo pureza e viabilidade. Cruz das Almas-BA. Esse isolado foi escolhido por ser considerado virulento em bananeira (Costa et al. 2015). Para a reativação do fungo, foram utilizadas placas de Petri contendo o meio de cultura BDA (200 g L-1 batata; 20 g L-1 dextrose e 20 g L-1 ágar), onde o fungo foi repicado e incubado em BOD por sete dias a 25°C com fotoperíodo de 12 horas de luz.

Para a coleta do inóculo, foi realizada a raspagem das placas utilizando água deionizada autoclavada com auxílio de uma escova estéril, raspando-a de forma delicada para liberar os esporos, formando uma suspensão (Figura 2A). Desta suspensão, 10 mL foram

distribuídos em sacos contendo 500 g de arroz (previamente lavado e autoclavado a 120 °C por 20 min) (Figura 2: B). Os sacos foram incubados em BOD a 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas, por 15 dias.

Para o preparo da suspensão de infestação, o inóculo fúngico foi quantificado por meio da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC). Foi retirada uma amostra de 1g do arroz infestado e acrescido de 9 *mL* de água deionizada esterilizada em tubo de ensaio e homogeneizado. Em seguida, realizada uma diluição seriada, alcançando a concentração 106 UFC/grama de arroz. Após a confirmação da diluição necessária, a quantidade de inóculo calculada foi misturada ao substrato, infestando a planta, foi misturado ao substrato cerca de 40 gramas do arroz inoculado uniformemente em cada amostra (Figura 2C).



Figura 2: A-C: Preparo do inoculo do substrato para produção do inóculo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* isolado CNPMF 218 e aplicação. A) Coleta do inóculo por raspagem das colônias em meio BDA; B) Aplicação do inóculo no arroz e C) inoculação das mudas de bananeira 'Prata Anã' com a aplicação de 40g de arroz colonizados por *FOC* ao substrato.

Coleta de material inoculado

As coletas foram realizadas nos intervalos de 0, 24, 48 e 72 horas após a inoculação (hpi). Em cada ponto temporal, foram utilizadas três plantas inoculadas e três plantas não inoculadas (controle), totalizando três réplicas biológicas por tratamento em cada tempo. De cada planta, foram coletados fragmentos de folhas e raízes (~1 cm) para as análises subsequentes (Figura 3: A-C).

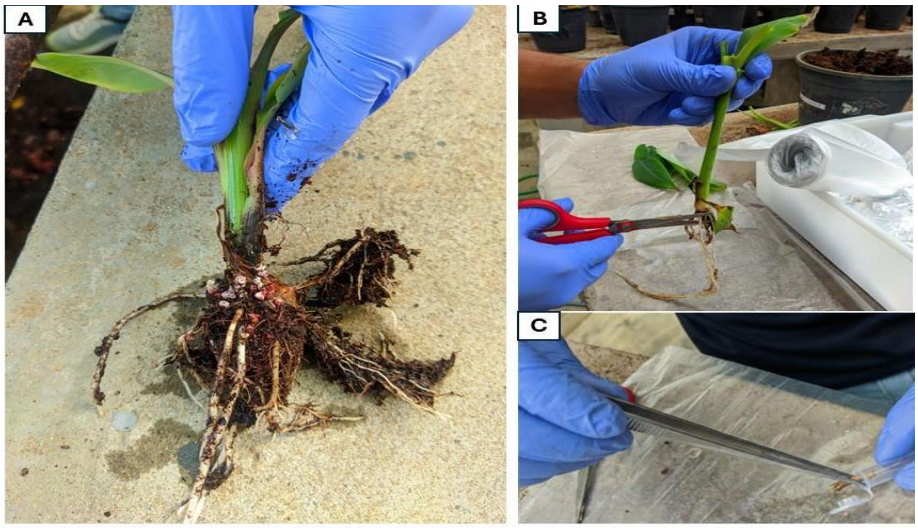


Figura 3. Coleta das amostras pós-inoculação. **A)** Exposição do sistema radicular; **B)** Coleta de fragmentos de raíz (~1 cm); e **C)** Acondicionamento das raízes em microtubos para histologia.

As amostras destinadas aos estudos histológicos foram fixadas em solução de Karnovsky (Karnovsky,1965), acondicionadas em microtubos de 2 *mL* e mantidas sob refrigeração. Já o material destinado à análise de expressão gênica foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido (N_2), envolto em papel alumínio e armazenado em ultrafreezer a -80 ºC até o momento da extração do RNA.

Análise histoquímica

Para as análises histoquímicas, as amostras radiculares passaram por um processo de 48 horas de fixação em solução de *Karnovsky* (Karnovsky, 1965). A desidratação foi realizada em uma série crescente de etanol (50-100%) por 1 hora para concentração. Em seguida, o material foi infiltrado e emblocado com o kit Historesin (*hidroxietilmetacrilato; Leica Heldelberg, Alemanha*). A resina foi polimerizada à temperatura ambiente por 72 horas.

Foram realizados cortes histológicos seriados com 8 µm de espessura, em um micrótomo rotativo Leica (Modelo 1516) e dispostos em lâminas de vidro, para as análises histoquímicas. A visualização e a documentação fotográfica das lâminas foram realizadas com o auxílio de um microscópio de fluorescência B x S1 (*Olympus* Latin America Inc., Tóquio, Japão).

A colonização dos tecidos radiculares por Foc, isolado CNPMF 218, foi avaliada com base no protocolo adaptado de Phillips e Hayman (1970) e Brundrett et al. (1996). Fragmentos de raiz foram submetidos a um clareamento em solução de hidróxido de potássio (KOH) a 10% por um período de 48 horas. Posteriormente, o material foi lavado em água para a remoção completa do KOH.

Em seguida, as raízes foram imersas em solução de ácido clorídrico (HCl) a 1% por 5 minutos, depois coradas com azul de Tripan em solução de lactoglicerol a 0,05% (2:1:1; v:v:v - ácido lático, glicerina e água) em temperatura ambiente durante 1 hora. Após a coloração, as amostras foram imersas em solução de lactoglicerol e em seguida visualizadas em microscópio de campo claro.

A detecção de compostos fenólicos nos cortes histológicos foi realizada através da coloração com uma solução de cloreto férrico, conforme a metodologia descrita por Johansen (1940). A análise e o registro fotográfico das lâminas foram conduzidos em um microscópio Olympus BX51, operando em modo de campo claro.

Extração do RNA e Síntese de cDNA

A extração de RNA foi realizada no Centro de Biologia Avançada da Embrapa Mandioca e Fruticultura. O RNA total foi extraído das amostras radiculares previamente maceradas em nitrogênio líquido. O protocolo de extração utilizado seguiu o método CTAB, com modificações de Ferreira et al. (2019). A avaliação da quantidade e qualidade do RNA foi realizada por análise comparativa das amostras em gel de agarose a 1% em tampão TAE 1X e por espectrofotometria utilizando um dispositivo *NanoDrop*™ ND-ONE (*Thermo Scientific*,) e confirmada em fotodocumentador.

As amostras de RNA total foram tratadas com o kit *DNase TURBOFREE* (Ambion®), seguindo as recomendações do fabricante. Foram utilizados 15µl de RNA total de cada amostra, 1 µl de água *DNAse free*, 1 *µl* do Inibidor (*RNAse out*), 2 µl de Tampão (10x turbo *DNAse buffer*) e *1µl DNAse* (turbo *DNAse*). A reação foi incubada em termociclador Veriti (*Applied Biosystems*©) a 37°C por 25 min. Em seguida, foi acrescentado 2 *µl* de *DNAse Inativation*, seguida de incubação por 2 minutos em temperatura ambiente, e a amostra centrifugada por 1,5 minutos a 10000 *rpm*. O sobrenadante foi armazenado em ultrafreezer a -80°C. A integridade do RNA purificado

foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1%. A qualidade do RNA tratado foi conferida em gel de agarose a 0.8% com TAE 1 x (Tris; ácido acético glacial; água MQ) utilizando 3 µl de cada amostra e fotodocumentado. O RNA tratado foi padronizado e seguiu-se para a síntese do cDNA.

O cDNA foi sintetizado a partir de 5 µL de RNA utilizando o kit *High-Capacity* RNA-to-cDNA™. A mistura da reação foi preparada em um volume de 20 µL, contendo 10 *µl* de 2x RT Buffer, 1 *µl* de 20x *enzyme* mix e 4 *µl* de água livre de nuclease. Em seguida, a reação foi incubada em um termociclador Veriti (*Applied Biosystems*©) (37°C/60 min; 95°C/5 min; 4°C/hold), e o material sintetizado foi armazenado a -20°C.

Avaliação da expressão gênica RT-qPCR

Para a análise de expressão gênica, foram selecionados iniciadores específicos para genes-chave na interação planta-patógeno (Tabela 1). Foi incluído iniciador para o gene *MusaDMR6*, com base no estudo de Tripathi et al. (2021), que demonstrou a relevância deste gene na modulação da imunidade em bananeira.

Tabela 1- Primers utilizados para avaliação da expressão gênica na interação Musa spp. x *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

ID	Sequência (5′-3′)	Amplicon	Referência
MusaDMR6	F:TTATTGATGAAATGGTGAGCGTGG R:ATGCAGGCGCAGATAATCGCGCCA	164 bp	Desenhado com base no gene MusaDMR6
25s	F:ACATTGTCAGGTGGGGAGTT R:CCTTTTGTTCCACACGAGATT	106	Podevin et al. (2012)
RPS2	F:TAGGGATTCCGACGATTTGTTT R:TAGCGTCATCATTGGCTGGGA	84	Zhang et al., 2017

A expressão relativa dos genes de interesse foi quantificada por PCR em tempo real (RT-qPCR) no equipamento ABI 7500 *Fast Real Time PCR System* (*Applied*

Biosystems). As reações foram preparadas em triplicata técnica para cada réplica biológica, utilizando o kit SYBR® *Select Master Mixer*. A reação consistiu em 1 µL de cDNA (100 ng/µL), 0,3 µL de cada primer (RF) (3 µM), 5 µL de SYBR® Green mix e 3,4 µL de água livre de nuclease, para um volume total de 10 µL em cada reação.

As condições de amplificação das reações foram as seguintes: holding inicial 50 °C por 2 min, 95 °C por 2 min e seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 30 s, com detecção do sinal da fluorescência ao final de cada etapa de extensão. A curva de *melting* foi determinada após o término dos ciclos de reações, no intervalo entre 72 e 95°C, para confirmar a especificidade dos produtos de amplificação pela presença de um único pico de dissociação.

A eficiência de amplificação foi avaliada por meio de curvas padrão geradas a partir de diluições seriadas do cDNA (1:5). Foram adotados como critérios de validação valores de eficiência situados no intervalo de 90% a 110%. A especificidade dos produtos de amplificação foi confirmada pela análise da curva de dissociação (melting curve). O gene 25S foi utilizado como gene de referência endógeno para a normalização dos dados, conforme validado anteriormente para estudos em Musa spp. (Podevin et al., 2012).

Resultados

Respostas histológicas e histoquímicas

Para verificar a penetração do fungo e de suas estruturas nos tecidos radiculares do genótipo 'Prata Anã', as raízes foram submetidas a um estudo histopatológico utilizando as técnicas de clareamento e coloração com azul de Tripan. A colonização do Foc, isolado CNPMF 218, nos tecidos radiculares do 'Prata Anã', encontra-se na Figura 4 (A-F).

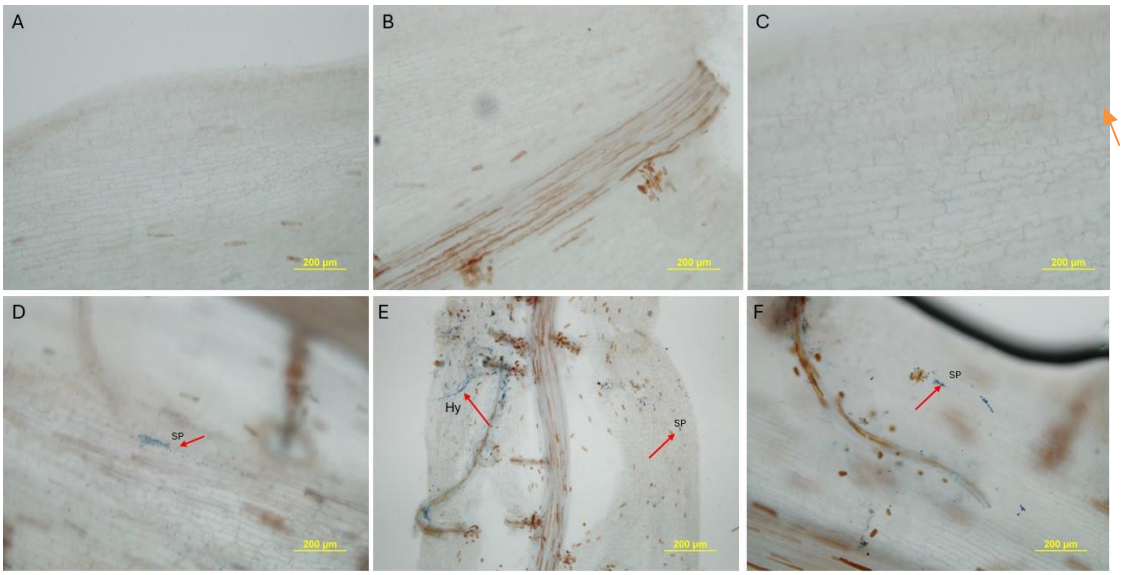


Figura 4. Análise da colonização de *Foc* em raízes do genótipo 'Prata Anã' submetidas à técnica de clareamento e coloração com azul de Tripan. Controle (A) 24 HAI (não-inoculado); Controle (B) 48 HAI (não-inoculado); Controle (C) 72 HAI (não-inoculado); (D) 24 HAI (inoculado); (E) 48 HAI (inoculado); (F) 72 HAI (inoculado). Hy: hifas; SP: esporos. Barras = 200 µm.

A resposta de defesa estrutural foi avaliada através da deposição de calose. A calose é um polissacarídeo importante no reforço da parede celular e no bloqueio da penetração fúngica, especialmente nos vasos do floema. A Figura 5 (A-D) ilustra a intensidade e a localização destas barreiras físicas formadas ao longo do tempo.

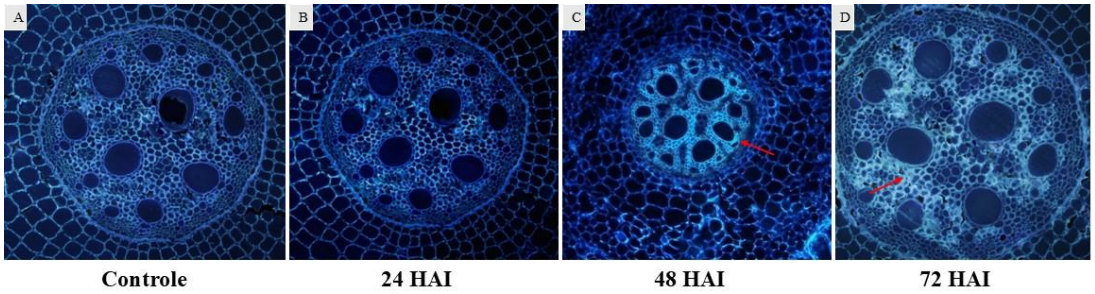


Figura 5 (A-D). Análise histoquímica por microscopia de fluorescência (coloração com azul de anilina) de cortes transversais de raízes de bananeira 'Prata-Anã' evidenciando a resposta de defesa estrutural. (A) Tratamento controle (não inoculado). (B, C e D) Amostras inoculadas com *Foc* coletadas nos tempos de 24, 48 e 72 horas após a inoculação (HAI), respectivamente. As setas vermelhas indicam pontos de fluorescência, correspondentes à deposição de calose nas paredes celulares do parênquima cortical e vasos do xilema

A análise histoquímica com cloreto férrico revelou a presença de compostos fenólicos, identificados como pontuações ou depósitos de coloração castanho-escuro a preta no tecido radicular (Figura 7: A-D).

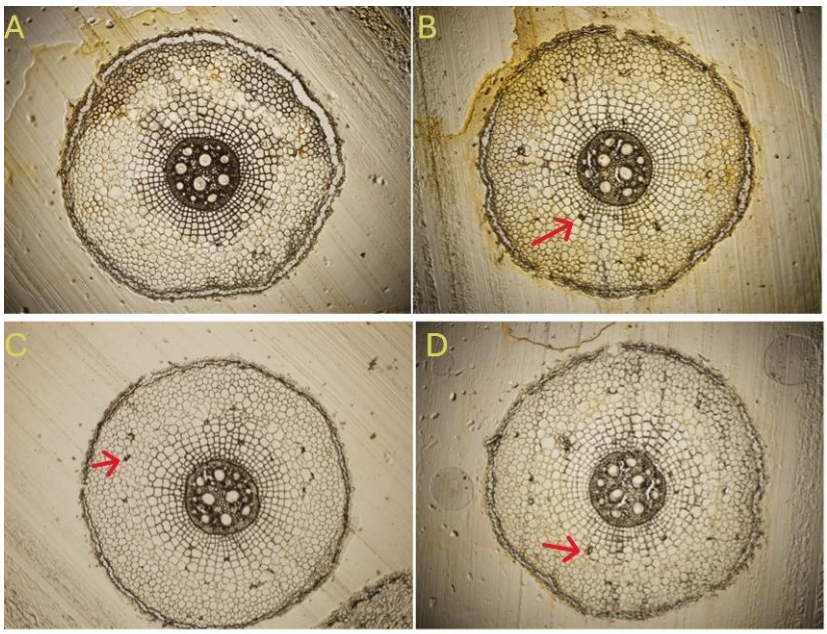


Figura 6(A-D) Teste histoquímico utilizando cloreto férrico para detecção de compostos fenólicos em cortes transversais de raízes de bananeira (Musa spp.) após inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. A) Controle não inoculado; B) 24 horas após a inoculação (HAI); C) 48 HAI e D) 72 HAI. As setas vermelhas indicam pontos de coloração escura associados à concentração de compostos fenólicos nas células do parênquima cortical.

Sintomas de Foc

A avaliação realizada aos 90 dias após a inoculação (DAI) confirmou a severidade da infecção na cultivar avaliada. As plantas inoculadas exibiram os sintomas clássicos do *Foc*, caracterizados por clorose foliar, necrose e murcha (Figura 7: A-H).

A análise interna, realizada através de cortes transversais do rizoma, apresenta descoloração vascular de tonalidade marrom-escura a negra, concentrada no cilindro central e progredindo para o córtex, evidenciando a necrose dos feixes vasculares e a colonização sistêmica pelo patógeno. A severidade da doença foi quantificada atribuindo-se notas de 1 a 5 para a descoloração interna das réplicas biológicas, resultando em uma nota média de 4,0.

O Índice de Dano Interno (IDI) calculado para o genótipo foi de 80%, o que caracteriza uma interação compatível de alta severidade. Em contrapartida, as plantas do tratamento controle permaneceram totalmente assintomáticas, apresentando rizomas sadios com nota 1,0 (IDI = 0%), evidenciando a eficácia do método de inoculação e a integridade do experimento. (Figura 7: A-H).

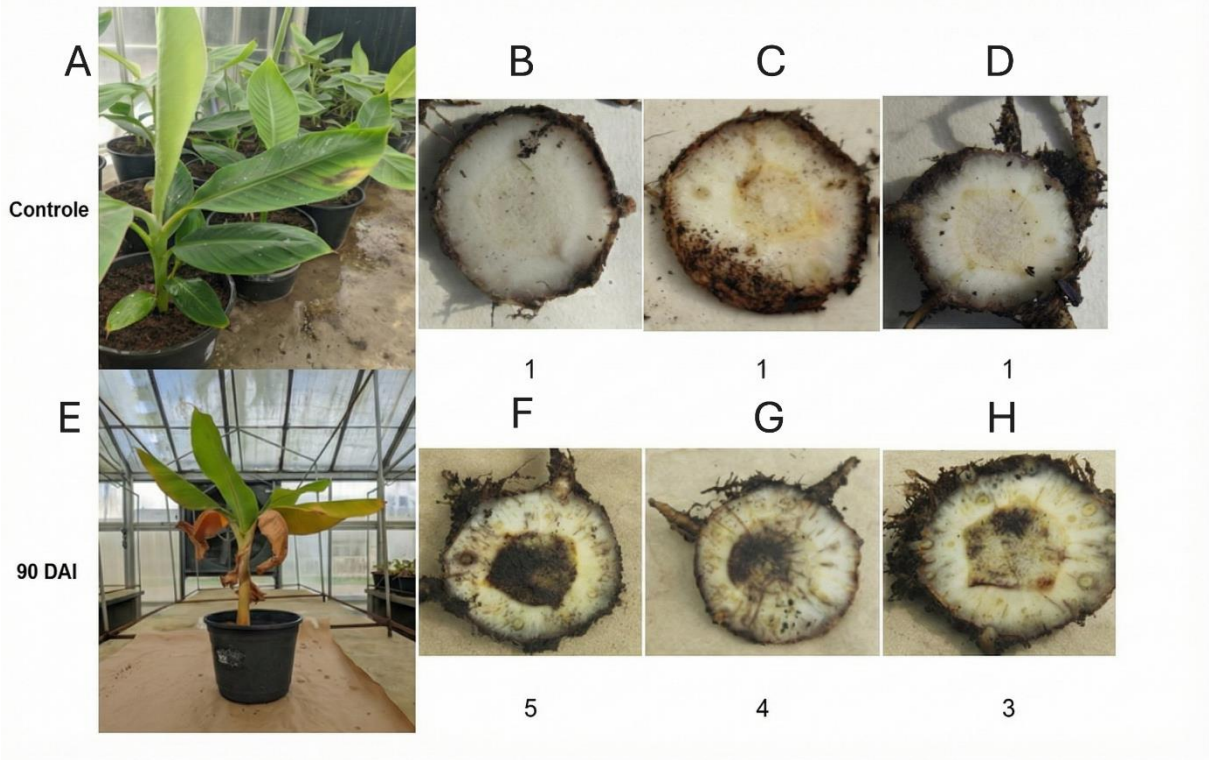


Figura 7 (A_H). Avaliação da severidade dos sintomas externos e internos da murcha de Fusarium em bananeira 'Prata-Anã' aos 90 dias após a inoculação (DAI). (A-D) Tratamento Controle (não inoculado): (A) Aspecto geral de planta sadia; (B, C e D) seções transversais do rizoma apresentando tecidos livres de infecção (nota 1). (E-H) Plantas inoculadas com *Foc*: (E) Planta exibindo sintomas externos típicos de murcha e clorose; (F, G e H) cortes transversais do rizoma demonstrando diferentes níveis de progressão da necrose vascular, classificados com as notas 5, 4 e 3, respectivamente.

Validação dos Iniciadores e Parâmetros de PCR

A integridade do material biológico e a qualidade da síntese de cDNA foram inicialmente testadas pela amplificação dos genes de referências endógenos 25S e RPS2. As reações de qPCR produziram curvas de dissociação (*Melting Curves*) com um único

pico bem definido (Figura 8A-B), confirmando a ausência de inibidores e a especificidade do produto amplificado. Da mesma forma, para o gene alvo *MusaDMR6*, obteve-se um perfil de dissociação com pico único acentuado (Figura 8C), atestando a especificidade dos iniciadores e a ausência de dímeros de primer.

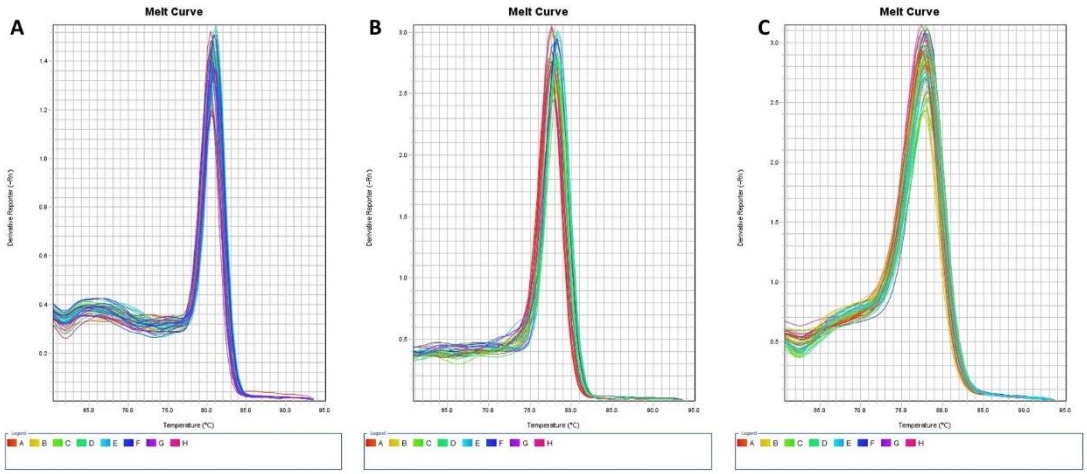


Figura 8 (A-B-C). Curvas de dissociação (*Melt Curves*) obtidas via RT-qPCR para validação da especificidade dos iniciadores em amostras de raízes de bananeira 'Prata-Anã' (*Musa* spp.). A) Gene de referência endógeno *25S*; B) Gene de referência endógeno RPS2 C) Gene alvo *MusaDMR6*.

As eficiências de amplificação foram de 118,6% para o gene de referência (25S) e 121,1% para o gene MusaDMR6 (Figura 9). As eficiências foram semelhantes entre os genes, permitindo a utilização do método 2^-ΔΔCt para análise de expressão relativa.

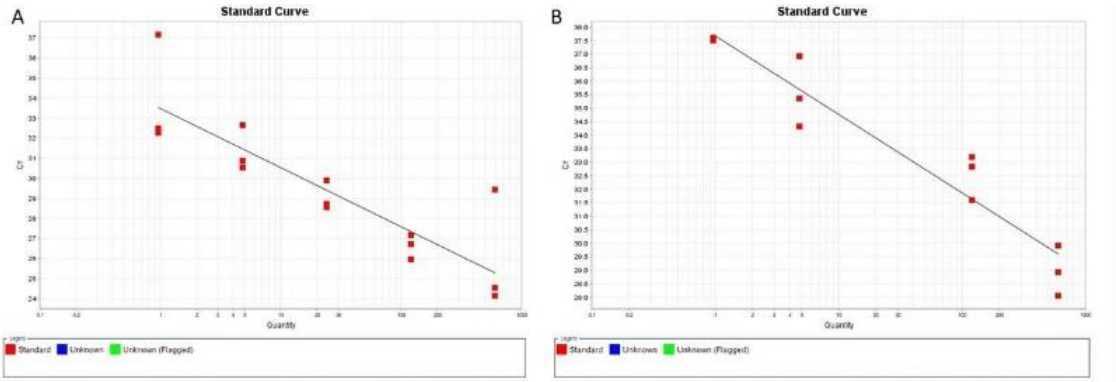


Figura 9. Curvas padrão (*Standard Curves*) utilizadas para a determinação da eficiência de amplificação dos iniciadores via RT-qPCR. (A) Gene de referência endógeno *25S*. (B) Gene alvo *MusaDMR6*.

Análise da Expressão Gênica

A quantificação dos níveis de transcritos do gene MusaDMR6 foi realizada por PCR em tempo real (RT-qPCR) utilizando o método comparativo **2^-ΔΔCt**. Para cada tempo analisado, a expressão relativa foi calculada comparando as amostras inoculadas com Foc aos respectivos controles não inoculados (água), utilizando o gene RPS2 como controle endógeno.

A expressão relativa foi determinada a partir das seguintes equações:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{MusaDMR6}} - Ct_{\text{RPS2}}$$
$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{amostra}} - \Delta Ct_{\text{controle basal (0h)}}$$
$$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Os valores médios de ciclo limiar (Ct) para o gene MusaDMR6 em cada tratamento estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Valores médios de Ciclo Limiar (Ct) para o gene *MusaDMR6* em raízes de bananeira 'Prata-Anã' submetidas à inoculação com *Foc* e tratamento controle (água).

Tempo (hpi)	Condição	Ct Mean (MusaDMR)
Tempo 0	Controle	26.254
24h	Inoculado (Foc)	26.40
24h	Controle (Água)	29.37
48h	Inoculado (Foc)	32.46
48h	Controle (Água)	30.96
72h	Inoculado (Foc)	28.33
72h	Controle (Água)	30.92

Para facilitar a visualização das variações de expressão, os valores de RQ foram transformados em escala logarítmica na base 2 (Figura 10), conforme a relação:

$$\log_2(RQ) = -\Delta\Delta Ct$$

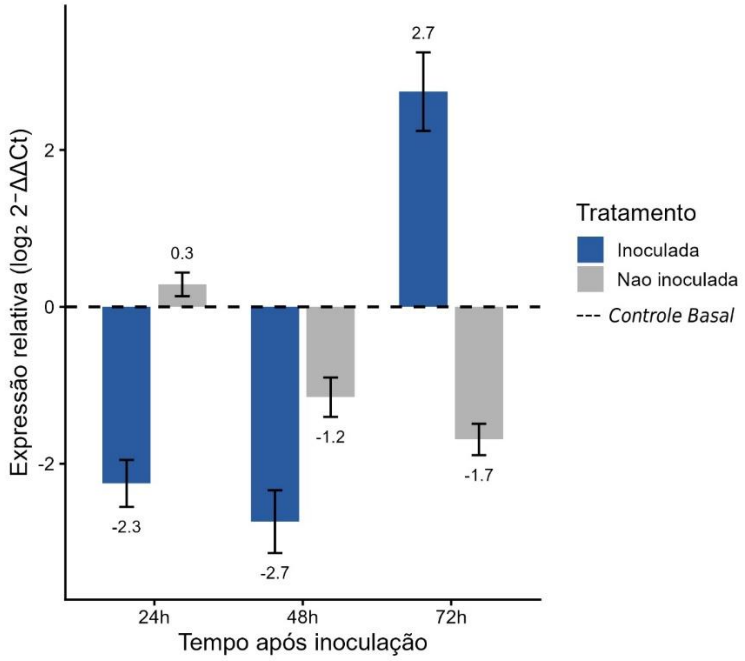


Figura 10. Perfil de expressão relativa (log_2(RQ)) do gene *MusaDMR6* em raízes de bananeira 'Prata-Anã' inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*) e em controles não inoculados (água).

Observou-se uma repressão significativa do gene *MusaDMR6* nas primeiras 48 horas após a inoculação, com valores de log_2(RQ) de –2,3 (24 h) e –2,7 (48 h) nas plantas inoculadas. Entretanto, 72 h após a inoculação, ocorreu uma forte indução do gene, com valor de log_2(RQ) = 2,7, correspondente a aproximadamente 6,5 vezes mais expressão em relação ao controle basal.

Nas plantas controle não inoculadas, a expressão permaneceu próxima à linha de base ou levemente reprimida ao longo do tempo, indicando que a modulação observada está associada especificamente à interação com o patógeno.

Os valores médios de ciclo limiar (Ct) para o gene MusaDMR6 variaram entre 26,40 e 32,46 nas amostras inoculadas e entre 29,37 e 30,96 nas amostras controle, conforme apresentado na Tabela 2.

Discussão

As estratégias de melhoramento genético da bananeira (Musa spp.) visando o controle da Murcha de Fusarium têm se fundamentado na identificação e introgressão de genes de resistência dominantes (R-genes) (Dita et al., 2018). Embora essa abordagem clássica tenha gerado resultados importantes, ela enfrenta limitações biológicas e técnicas inerentes à cultura (Ploetz, 2015; Gabe; Ganapathi., 2017).

A dependência da introgressão via cruzamentos de um único gene de resistência é considerada uma estratégia de alto risco devido ao potencial de o patógeno evoluir e superá-la. Ademais, a esterilidade, a natureza poliploide e o longo ciclo de vida da bananeira tornam o melhoramento convencional um processo notoriamente difícil, demorado e caro, resultando, muitas vezes, em híbridos que não atendem às exigências e preferências de mercado (Justine, 2022).

Essa especificidade torna a resistência vulnerável à rápida pressão de seleção e evolução do fungo, como evidenciado pela emergência e disseminação global da raça Tropical 4 (TR4), capaz de superar a resistência de cultivares anteriormente imunes (García et al., 2020).

Nesse contexto, a análise dos genes alvo desse estudo insere-se estrategicamente na busca por mecanismos de compatibilidade que possam ser interrompidos por meio do nocaute. A premissa discutida na literatura recente sugere que a ativação desses genes não representa uma falha na defesa, mas sim uma manipulação ativa da maquinaria do hospedeiro pelo patógeno para suprimir a imunidade basal e facilitar a infecção (Van Schie; Takken, 2014; (Thakur et al., 2025).

Portanto, investigar o perfil transcricional desses locos em genótipos de *Musa* spp. permite verificar se a suscetibilidade a Foc é mediada pela cooperação inadvertida da planta, validando esse gene como candidato ideal para a geração de resistência via perda de função em bananeira Prata Anã.

Embora a análise transcricional tenha se restringido ao gene de suscetibilidade (*S-gene*), a ativação das rotas de defesa basal foi monitorada através de marcadores histoquímicos. A detecção de deposição de calose e a oxidação de compostos fenólicos

nos tecidos radiculares confirmam que a planta iniciou uma resposta imune estrutural e bioquímica frente à infecção.

No entanto, a superexpressão de *MusaDMR6* (72 hpi) correlaciona-se com a insuficiência dessas barreiras em conter a colonização vascular, sugerindo que a atividade hidroxilase da enzima *DMR6* pode ter atenuado a sinalização mediada por ácido salicílico necessária para uma resposta eficaz, tornando a defesa tardia ou suprimida (Zeilmaker et al. 2015).

Análises histológicas

As plantas mobilizam diferentes mecanismos de defesa redirecionando recursos dos carboidratos do metabolismo primário para a produção de compostos secundários, como os fenólicos, que atuam na proteção contra insetos, microrganismos e herbívoros (Huot et al., 2014). Conforme destacado na literatura, substâncias como os flavonoides desempenham um papel dual na interação planta-microrganismo, podendo atuar tanto na sinalização quanto na resistência direta em plantas (Kumar et al. 2025; Tingting et al., 2025).

O acúmulo desses compostos nas raízes inoculadas, visualizada nas Figuras 6 B-D, sugere a ativação da via dos fenilpropanoides como uma resposta primária à infecção por Foc. Na interação *Musa* spp. x Foc, a oxidação rápida de fenóis é determinante, atuando pela toxicidade direta e como precursores para a lignificação da parede celular (De Ascensao; Dubery, 2000; DONG et al., 2019). Esta deposição indica uma tentativa da planta de estabelecer barreiras histoquímicas para restringir o crescimento radial das hifas e impedir o acesso ao cilindro vascular (Ninkuu, et al., 2025).

Contudo, é fundamental ressaltar que a diferença entre suscetibilidade e resistência reside frequentemente na velocidade e na magnitude dessa deposição, e não apenas na sua ocorrência (Warman; Aitken, 2018). Portanto, a presença desses metabólitos, embora indique reconhecimento do patógeno, deve ser interpretada à luz da regulação genética, uma vez que isolados virulentos de Foc possuem mecanismos para tolerar ou inativar esses compostos, ou ainda suprimir a resposta imune antes que a barreira se torne impenetrável (Guo et al., 2014; Sánchez et al., 2023).

A deposição de calose observada nas raízes inoculadas representa uma das primeiras linhas de defesa estrutural induzível. A calose é sintetizada e depositada entre a membrana plasmática e a parede celular, formando papilas nos locais de tentativa de penetração fúngica, além de bloquear os plasmodesmos para impedir a comunicação célula-a-célula (Chen et al., 2024).

Esse duplo mecanismo, portanto, não só cria uma barreira física contra as hifas, como também isola a área infectada, restringindo a propagação de toxinas e efetores fúngicos para os tecidos sadios (Wu et al., 2018). Estudos mais recentes continuam a detalhar esse sofisticado sistema de contenção (Wang et al., 2022). A detecção de fluorescência nos tempos avaliados (24, 48 e 72 HAI) confirma que o sistema de vigilância da planta reconheceu a presença de *Foc* e ativou a síntese de calose.

Contudo, a eficácia dessa resposta de defesa é uma questão de tempo A deposição da barreira de calose precisa ser suficientemente rápida para impedir a penetração fúngica antes que o patógeno consiga estabelecer suas hifas no lúmen celular ou no xilema (Voigt, 2014). A rapidez desse processo é, portanto, um determinante crítico para o sucesso ou fracasso da resistência (Riseh et al., 2025).

Além disso, a persistência dessa barreira é desafiada pela capacidade enzimática do patógeno, fungos hemibiotróficos como o *Foc* secretam um arsenal de enzimas degradadoras de parede celular, capazes de hidrolisar a calose e romper a barreira física (WARMAN; AITKEN, 2018).

Portanto, a visualização da calose, isoladamente, não garante resistência, ela deve ser analisada em conjunto com a regulação genética subjacente. É neste ponto que a expressão de genes de suscetibilidade (S-genes) se torna crítica, pois a indução destes genes pelo patógeno pode atuar justamente suprimindo ou retardando o reforço da parede celular, facilitando a ação enzimática do fungo.

Sintomas de Foc

A severidade dos sintomas aos 90 DAI observada na Figura 7E-H, com clorose e murcha generalizada, é resultado do bloqueio no sistema de transporte de água da planta. Isso ocorre porque o fungo, ao se espalhar pelos vasos do xilema, desencadeia obstruções pela própria planta na tentativa de isolá-lo. Em cultivares suscetíveis, essa defesa é

ineficaz para conter o patógeno, mas é suficiente para impedir a circulação de água, o que leva à morte das folhas (Ploetz, 2015; Dita et al., 2018).

A coloração vascular marrom-avermelhada a negra, evidente nos cortes transversais do rizoma, não representa apenas a presença do fungo, mas sim a oxidação de compostos fenólicos e a polimerização de substâncias de defesa acumuladas nos vasos infectados. Essa necrose resulta da oxidação de polifenóis por enzimas como polifenoloxidases (PPO) e peroxidases (POD), liberadas tanto pela planta quanto pelo patógeno durante a interação (DE Ascensao; Dubery, 2000; Dong et al., 2019).

Essa resposta tem sido documentada como um marcador de resistência em genótipos de *Musa*. Por exemplo, Oliveira et al. (2025) observaram que somaclones de bananeira com maior nível de resistência à *Foc* apresentam uma ativação mais rápida e intensa dessas enzimas, resultando em uma barreira fenólica mais eficiente do que a observada em cultivares suscetíveis. No caso da Prata-Anã, a necrose vascular severa observada aos 90 DAI sugere que, embora a planta tenha ativado a via dos fenilpropanoides, essa resposta foi tardia ou insuficiente para deter o avanço sistêmico de isolados agressivos, como discutido por Velame et al. (2024) ao analisarem a agressividade de isolados de *Foc* em cultivares do subgrupo Prata.

A intensidade e a profundidade dessa descoloração no cilindro central (Figura 7F-H demonstram que o isolado de Foc foi capaz de superar as barreiras físicas iniciais da raiz (córtex e endoderme) e estabelecer uma colonização longitudinal bem-sucedida, característica de interações compatíveis de alta virulência (Warman; Aitken, 2018).

A progressão dos sintomas para o rizoma central aos 90 DAI corrobora a natureza hemibiotrófica do *Foc*, marcando a transição definitiva da fase biotrófica inicial para a fase necrotrófica sistêmica. Essa colonização profunda demonstra que o patógeno foi capaz de superar as barreiras físicas e químicas de contenção do hospedeiro. Após esse estabelecimento, o fungo secreta toxinas e enzimas degradadoras de parede celular que matam o tecido do hospedeiro para extrair nutrientes (Guo et al., 2014; Dong et al., 2019).

A necrose interna observada é, portanto, a manifestação visual direta dessa destruição tecidual. Esse quadro valida a alta suscetibilidade do genótipo e fornece o contexto biológico essencial para interpretar a regulação de genes associados à morte celular programada e à supressão das defesas da planta nos dados de expressão gênica.

Validação Metodológica da Análise de Expressão Gênica

A análise diferencial dos valores de Ct demonstra uma indução transcricional nítida de *MusaDMR6* em resposta à infecção. A observação de que as amostras inoculadas apresentaram valores de Ct consistentemente menores indica, pela escala logarítmica da PCR, uma diferença de transcritos cerca de 8 vezes superior no tecido infectado. Essa manutenção de níveis de expressão elevados no tratamento inoculado caracteriza o *MusaDMR6* como um potencial gene de suscetibilidade ativamente recrutado pelo patógeno.

Os dados de expressão gênica fundamentam-se na validação dos parâmetros cinéticos da reação. Embora as eficiências de amplificação (118,6% e 121,1%) tenham superado o intervalo teórico ideal (90-110%), a integridade dos resultados foi assegurada pela similaridade entre os resultados.

Conforme discutido por Taylor et al. (2010), valores de eficiência acima de 100% são indicadores clássicos de inibição nas amostras iniciais da curva padrão. No entanto, a variação absoluta inferior a 2,5% entre o gene alvo (*MusaDMR6*) e o normalizador (*25S*), demonstra que esse efeito foi homogêneo em ambos os alvos.

No caso da bananeira, esse fenômeno pode ser atribuído à natureza do tecido radicular, que é rico em polifenóis e polissacarídeos. Esses compostos agem como inibidores da polimerase, sendo diluídos ao longo da curva e resultando em uma eficiência aparente superior ao limite teórico, porém validada pela similaridade entre os genes alvo e referência (Porebski et al., 1997).

Estes dados cumprem a premissa fundamental estabelecida por Livak e Schmittgen (2001) para a aplicação do método comparativo $2-\Delta\Delta Ct2-\Delta\Delta Ct$, que assume que as eficiências de amplificação do alvo e do controle endógeno devem ser aproximadamente iguais para garantir a precisão do cálculo. Portanto, a similaridade confirmada válida a eficácia do ensaio.

Observou-se uma repressão inicial dos transcritos nos tempos de 24 e 48 hpi, seguida por uma indução em 72 hpi, atingindo níveis 6,5 vezes superiores ao controle basal (Figura 10). A repressão observada nas primeiras 48 horas pode estar associada a uma resposta defensiva primária da planta.

Ao reduzir a expressão de um regulador negativo da imunidade (*S-gene*), a 'Prata-Anã' possivelmente tenta manter os níveis de ácido salicílico (SA) ativos para conter a invasão inicial das hifas. Padrões similares de oscilação transcricional em estádios precoces da infecção por *Foc* foram relatados por Zhang et al. (2019), indicando que a planta mobiliza uma rede complexa de sinalização hormonal na tentativa de evitar o estabelecimento do patógeno nos tecidos radiculares.

Contudo, a inversão desse padrão em 72 hpi, com o expressivo aumento dos transcritos de *MusaDMR6*, marca o ponto de inflexão para a interação compatível (suscetibilidade). O gene *DMR6* codifica uma oxigenase que atua na degradação catabólica do ácido salicílico (Zeilmaker et al., 2015). Embora a análise metabólica direta não tenha sido realizada, esse perfil transcricional do *MusaDMR6* serve como um indicativo molecular da provável redução dos níveis de SA, uma vez que a função desta enzima já está validada para a cultura (Tripathi et al., 2021).

Tal interpretação é reforçada pela transição definitiva para a fase necrotrófica sistêmica (Figura 7), estágio em que a supressão das rotas de defesa mediadas por SA é um requisito biológico para o avanço do patógeno. Assim, a forte indução verificada no terceiro dia após a inoculação sugere que o Foc obteve sucesso em manipular a maquinaria da hospedeira, induzindo a superexpressão do *MusaDMR6* para promover a exaustão hormonal e, consequentemente, silenciar a imunidade basal da planta.

Portanto, a forte indução verificada no terceiro dia após a inoculação sugere que o *Foc* obteve sucesso em manipular a maquinaria da hospedeira, induzindo a superexpressão do *MusaDMR6* para promover a exaustão dos níveis de SA e, consequentemente, silenciar a defesa basal da planta.

Esses resultados são corroborados por Chelliah et al. (2023), que, ao caracterizarem a superfamília 2OGD em bananeira, à qual o gene *DMR6* pertence, identificaram sua expressão diferencial em resposta à infecção por *Foc*. Os achados desses autores sugerem que o *DMR6* atua como um determinante fator de suscetibilidade, dada sua forte regulação sob condições de estresses bióticos.

Em um estudo pioneiro em banana, Tripathi et al. (2021) identificaram e caracterizaram ortólogos de *DMR6* em *Musa acuminata* e *Musa balbisiana*, demonstrando que um dos ortólogos, Ma04_p20880.1, é fortemente induzido em cultivares suscetíveis durante a infecção por *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum*,

enquanto essa indução não ocorre em genótipos resistentes. Esse padrão de expressão restrito à interação compatível indica que *DMR6* atua como um regulador negativo da defesa em bananeira.

Essa conservação funcional do papel de *DMR6* na imunidade vegetal é reforçada por estudos em outras espécies perenes e complexas. Pavese et al. (2021) investigaram a dinâmica transcricional de *DMR6* em *Castanea sativa* após a infecção pelo patógeno hemibiotrófico *Phytophthora cinnamomi*, fornecendo dados comparativos que reforçam seu potencial como alvo estratégico para o desenvolvimento de resistência também em bananeira.

Essa manutenção de níveis de expressão mais elevados no tratamento inoculado, em contraste com a tendência de aumento de Ct (redução de transcritos) observada nos controles, caracteriza uma resposta específica ao estresse biótico. Esse padrão de superexpressão em genótipos suscetíveis durante a colonização inicial, corrobora o papel do *MusaDMR6* como um gene de suscetibilidade ativamente recrutado pelo patógeno.

Interpretação biológica e contexto da interação *Musa spp.* x *Foc*

O perfil de expressão observado, com aumento significativo de transcritos a partir de 24 hai, alinha-se funcionalmente com o papel descrito para membros da família *DMR6* (*Downy Mildew Resistant 6*). Este gene codifica uma oxigenase da superfamília *2OGD* responsável por catabolizar o ácido salicílico (SA), convertendo-o em formas inativas (Zeilmaker et al., 2015).

Em Arabidopsis, a indução de *DMR6* atua como um mecanismo de "freio" fisiológico para prevenir respostas imunes excessivas. No contexto da interação *Musa* spp. x Foc, a elevada expressão detectada sugere que o fungo induz a maquinaria da planta a produzir altos níveis de transcritos do *DMR6*, resultando na degradação do SA e, consequentemente, no amortecimento da defesa basal (Tripathi et al. 2021).

A correlação positiva entre o aumento da expressão de *Musa*DMR6 e a presença do patógeno, reforça o conceito de que este é um gene de suscetibilidade (*S-gene*) vital para o sucesso da infecção, conforme revisado por Van Schie e Takken (2014). Resultados similares foram reportados por Tripathi et al. (2021), que demonstraram que a superexpressão de ortólogos de *DMR6* em bananeira, favorece a colonização por patógenos vasculares.

Kawicha et al. (2026) também comprovaram a relação direta do gene *DMR6* com a suscetibilidade em diferentes cultivares de bananeira, demonstrando a alta eficácia do sistema CRISPR/Cas9 para o nocaute desse alvo com frequências de mutação de até 70%.

Embora a função do gene DMR6 tenha sido primeiramente identificada em interações com oomicetos, seu papel na suscetibilidade a fungos do gênero Fusarium foi confirmado por Low et al. (2020). Os autores mostraram que mutantes nocaute de DMR6 em Arabidopsis tornam-se resistentes a *Fusarium graminearum*, e que essa função é conservada em monocotiledôneas (cevada). Nossos resultados estendem essa conservação funcional para *Musa* spp., indicando que a superexpressão de *DMR6* é um fator essencial para a patogênese de *Fusarium*.

A viabilidade da edição de genes de suscetibilidade via CRISPR/Cas9 é sustentada por uma crescente base de evidências em diversas famílias botânicas, demonstrando que o nocaute de alvos conservados é uma rota eficaz para a resistência durável. Para o gene *DMR6*, além dos resultados em espécies-modelo, o nocaute bem-sucedido do ortólogo *StDMR6-1* em batata (*Solanum tuberosum*) conferiu resistência à requeima (*Phytophthora infestans*) sem afetar o desenvolvimento dos tubérculos, comprovando a eficiência da técnica em espécies de propagação vegetativa e poliploides (Kieu et al., 2021). Adicionalmente, estudos recentes indicam que o silenciamento de *DMR6* confere resistência de amplo espectro, inclusive contra bactérias como *Xanthomonas* e *Pseudomonas* em Solanaceas (Thomazella et al., 2021). Isso sugere que a manipulação deste gene em bananeira pode oferecer proteção simultânea contra múltiplas doenças.

O uso de CRISPR/Cas9 para gerar resistência em plantas aromáticas, como o nocaute do gene *ObDMR6* em manjericão, evidenciou reduções de até 93% na biomassa do patógeno (Hasley et al., 2021). Esses avanços, somados à recente validação da edição de *DMR6* em videira para o controle de míldio (Djennane et al., 2024), fortalecem a premissa deste trabalho. A identificação da superexpressão de *MusaDMR6* na interação com *Foc* em Prata-Anã alinha este genótipo ao padrão global de suscetibilidade mediada por este gene, posicionando-o como o candidato prioritário para o desenvolvimento de variedades editadas com resistência à *Murcha de Fusarium.*

É importante destacar a necessidade da validação de outros genes de suscetibilidade (S-genes) para expandir o arsenal biotecnológico contra o Foc. Fatores de transcrição da família *WRKY* têm sido descritos como moduladores centrais de respostas

imunes, capazes de atuar tanto como ativadores quanto como repressores de mecanismos de defesa contra fungos e outros patógenos em diversas espécies de plantas (Li et al., 2024; Wang et al., 2026). Estudos mostram mudanças de expressão de *WRKY*, em Musa ssp., durante infecção por Fusarium, sugerindo sua participação funcional na resposta a este patógeno (Jia et al., 2022).

Uma classe de genes de suscetibilidade com crescente relevância no melhoramento genético é a família de transportadores de sacarose SWEET (*Sugars Will Eventually be Exported Transporters*). Esses genes representam uma fronteira promissora para a manipulação da interação planta-patógeno, uma vez que regulam o efluxo de açúcares para os tecidos infectados. A edição gênica desses transportadores pode bloquear o fornecimento de nutrientes no sítio de infecção, restringindo severamente a proliferação de patógenos vasculares, como o Foc, e ampliando assim o espectro de resistência de forma durável (Oliva et al., 2019; Chen et al., 2022).

Em bananeira (*Musa acuminata*), foram identificados ao menos 25 genes da família *SWEET*, muitos com expressão alterada sob estresses bióticos e abióticos (Miao et al., 2017). Essa regulação diferencial sugere um papel ativo desses transportadores na resposta da planta a infecções fúngicas, incluindo o Foc, reforçando seu potencial como alvos para uma edição eficiente.

Adicionalmente, a inativação de genes relacionados à sinalização do etileno, como o *ERF922*, e de fatores de iniciação de tradução, como o *eIF4E*, tem se mostrado eficaz na geração de resistência sem comprometer o vigor vegetativo em diversas espécies vegetais (WANG et al., 2016; Li et al., 2024).

Estudos funcionais recentes demonstraram que o gene *eIF4E* na bananeira (Musa spp.) interage com proteínas virais como VPg durante infecções por potyvírus, destacando seu papel potencial como alvo para estratégias de melhoramento genético voltadas à resistência a vírus em banana, sem efeitos aparentes sobre características vegetativas (Wang et al., 2016; Pandiaraj et al., 2025). Essa abordagem sugere que a edição ou modulação de genes susceptíveis à promoção de doenças, como eIF4E, combinada com ajustes na sinalização de etileno, pode representar uma via promissora para aumentar a resistência de bananeiras a fitopatógenos sem comprometer o crescimento vegetativo.

Nesse contexto, os dados obtidos em nosso trabalho, somados às evidências recentes da literatura, sugerem uma mudança de estratégia necessária para o melhoramento da bananeira. Enquanto a busca tradicional por genes de resistência (R-genes) enfrenta a contínua e rápida evolução de novas raças de *Foc*, a manipulação da suscetibilidade (*S-genes*) oferece uma rota mais promissora e potencialmente durável.

Os resultados obtidos validam o gene *MusaDMR6* como um alvo promissor para intervenções biotecnológicas. A estratégia de editar esse gene já demonstrou sucesso em bananeira para o controle de patógenos vasculares bacterianos, como *Xanthomonas campestris* pv. m*usacearum* e *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* (Tripathi et al., 2021; Kawicha et al., 2026).

A indução observada neste estudo frente ao *Fusarium* sugere que o mecanismo de suscetibilidade é compartilhado, indicando que a inativação deste gene pode conferir resistência também a fungos hemibiotróficos. Portanto, a caracterização deste perfil de expressão fundamenta a realização de etapas futuras de edição gênica, visando o desenvolvimento de cultivares resistentes sem comprometer suas características agronômicas.

É importante salientar que, embora a caracterização transcricional do *MusaDMR6* na cultivar ‘Prata-Anã’ forneça evidências consistentes de sua associação com a suscetibilidade ao Foc, este trabalho representa uma etapa inicial de triagem molecular. A validação funcional definitiva do gene, bem como a confirmação da durabilidade da resistência e a avaliação de possíveis efeitos pleiotrópicos, dependem da realização do nocaute gênico e de testes fenotípicos em campo, etapas previstas para a continuidade da pesquisa.

A opção por restringir o estudo a este genótipo triploide (AAB) foi uma decisão estratégica devido à sua hegemonia no mercado nacional, visando validar o alvo diretamente no material genético de maior interesse agronômico. Portanto, os dados aqui apresentados consolidam o *MusaDMR6* como um candidato prioritário e fornecem o embasamento biológico necessário para o avanço seguro de programas de edição genômica na bananicultura.

Considerações Finais e Perspectivas Futuras

No cenário nacional, a bananicultura desempenha um papel socioeconômico fundamental. Segundo dados recentes da FAOSTAT (2026), o Brasil posiciona-se como o quinto maior produtor mundial, com uma produção voltada majoritariamente para o consumo *in natura*.

Diferentemente do mercado global, hegemonizado pelo subgrupo Cavendish, a preferência do consumidor brasileiro recai sobre as bananas do subgrupo Prata (AAB), que representam uma boa parcela de comercialização no país (Napoleão et al., 2021). Contudo, a produtividade dessa cultivar é severamente ameaçada por estresses bióticos, em especial à Murcha de *Fusarium*, que impõe perdas significativas e restringe a expansão das áreas de cultivo (Velame et al., 2024).

Além do locus *DMR6*, outros genes de suscetibilidade como o *MLO* (*Mildew Locus O*) e o *PMR4* (*Powdery Mildew Resistant 4*) têm se mostrado como alvos de interesse para a engenharia de resistência em diversas culturas. O gene *PMR4*, que atua como uma calose sintase e regulador negativo da via do ácido salicílico, teve sua funcionalidade validada em tomate por Li et al. (2022), onde o nocaute via CRISPR/Cas9 reduziu significativamente a suscetibilidade à requeima (*Phytophthora infestans*).

De forma análoga, a mutação direcionada múltiplas cópias do gene *MLO* demonstrou conferir resistência eficiente ao oídio em espécies poliploides como soja (Bui et al., 2023) e tabaco (Wang et al., 2023), comprovando que a interrupção desses reguladores negativos é uma estratégia eficaz para restaurar a imunidade basal.

Diante desses avanços em diferentes espécies cultivadas, torna-se evidente a importância da identificação e validação funcional de outros genes de suscetibilidade na bananeira. A exploração de genes conservados entre espécies, como reguladores negativos da imunidade basal e fatores do hospedeiro explorados por patógenos, representa uma estratégia promissora para o desenvolvimento de resistência durável na cultura da banana (Van Schie & Takken, 2014).

Os resultados obtidos neste estudo atendem ao objetivo proposto ao validar o perfil transcricional do gene *MusaDMR6* como um marcador molecular de suscetibilidade na interação entre a bananeira ‘Prata-Anã’ e o Foc. A confirmação, por meio do

clareamento das raízes, da formação inicial de esporos nos tempos de 24, 48 e 72 horas após a inoculação (HAI) fornece evidências de que o patógeno estava ativamente estabelecido no tecido durante a indução do gene, corroborando a hipótese de que *MusaDMR6* atua como regulador negativo da imunidade, sendo explorado pelo patógeno para suprimir as defesas basais da planta.

Diante das barreiras biológicas, como esterilidade e poliploidia, que restringem o melhoramento convencional da cultura, a identificação precisa desse alvo molecular fundamenta a aplicação de estratégias biotecnológicas de precisão. Para a implementação da edição genética, a sequência do gene *MusaDMR6* caracterizada neste trabalho poderá ser utilizada em etapas subsequentes para o desenho de RNAs-guia específicos, visando o nocaute mediado pelo sistema CRISPR/Cas9. Essa abordagem tem como objetivo a regeneração de linhagens com a homeostase do ácido salicílico restabelecida e resistência durável à murcha de Fusarium, oferecendo um caminho promissor para proteger a produção da 'Prata-Anã' e preservar suas características agronômicas.

Referências

ANGÉLICA GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ et al. Virulence factors of the genus Fusarium with targets in plants. **Microbiological Research**, v. 277, p. 127506–127506, 1 dez. 2023.

BECKMAN, C. H. Host responses to the pathogen. **The AmericanPhytopathological Society**, v. 63, n. 2, p. 107–114, 1990.

BRUNDETT, M. *et al.* **Working with mycorrhizas in forestry and agriculture**. Camberra, Australia: Australian Centre for International Agricultural Research, 1996.

CALBERTO, G.; STAVER, C.; SILES, P. **An assessment of global banana production and suitability under climate change scenarios**. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/320356735_An_assessment_of_global_banana_production_and_suitability_under_climate_change_scenarios>.

CHELLIAH, A. et al. Genome-wide characterization of 2OGD superfamily for mining of susceptibility factors responding to various biotic stresses in Musa spp. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 29, n. 9, p. 1319–1338, set. 2023.

CHEN, J. et al. Plasmodesmata Function and Callose Deposition in Plant Disease Defense. **Plants**, v. 13, n. 16, p. 2242–2242, 13 ago. 2024.

CHENG, L. et al. Genome analyses and breeding of polyploid crops. **Nature Plants**, v. 11, n. 9, p. 1714–1728, 28 ago. 2025.

COSTA, S. et al. Genetic structure of*Fusarium oxysporum*f. sp.*cubense*in different regions from Brazil. v. 64, n. 1, p. 137–146, 1 fev. 2015.

D'HONT, A. et al. The banana (Musa acuminata) genome and the evolution of monocotyledonous plants. **Nature**, v. 488, n. 7410, p. 213–217, 2012.

DE ASCENSAO, A. R.; DUBERY, I. A. Panama Disease: Cell Wall Reinforcement in Banana Roots in Response to Elicitors from Fusarium oxysporum f. sp. cubense Race Four. **Phytopathology**, v. 90, n. 10, p. 1173–1180, 2000.

DITA, M. et al. Fusarium Wilt of Banana: Current Knowledge on Epidemiology and Research Needs Toward Sustainable Disease Management. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n. 1468, 19 out. 2018.

DONG, H. et al. Histological and Gene Expression Analyses in Banana Reveals the Pathogenic Differences between Races 1 and 4 of Banana Fusarium Wilt Pathogen. **Phytopathology**, v. 109, n. 6, p. 1029–1042, jun. 2019.

DOS SANTOS OLIVEIRA, W. D. et al. Molecular and histochemical characterization of Grande Naine somaclones resistant to Fusarium oxysporum f. sp. cubense subtropical race 4. **Euphytica**, v. 221, n. 12, 4 nov. 2025.

EDUARDO SÁNCHEZ TIMM et al. Identification of Differentially Expressed Genes in Response to Mycosphaerella fijiensis in the Resistant Musa Accession "Calcutta-4" Using Suppression Subtractive Hybridization. **PLOS ONE**, v. 11, n. 8, p. e0160083–e0160083, 3 ago. 2016.

Embrapa. **Duas cultivares da Embrapa são resistentes à mais grave doença mundial das bananeiras**. Portal Embrapa, Brasília, DF, 04 nov. 2024. Notícias. Disponível em: https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/102605261/duas-cultivares-da-embrapa-sao-resistentes-a-mais-grave-doenca-mundial-das-bananeiras. Acesso em: 02 mar. 2026.

FAO Knowledge Repository. Disponível em: <https://openknowledge.fao.org/items/c7945a89-43db-409e-bb4f-5ded056f1434>. Acesso em: 1 dez. 2026. FAO Knowledge Repository. Disponível em: <https://openknowledge.fao.org/items/c7945a89-43db-409e-bb4f-5ded056f1434>. Acesso em: 1 dez. 2026.

FAOSTAT (2026). Base de dados online da FAOSTAT. Disponível em http://faostat.fao.org/ (acessado em 29 de janeiro de 2026).

FENG, C. et al. High-efficiency genome editing using a *dmc1* promoter-controlled CRISPR/Cas9 system in maize. **Plant Biotechnology Journal**, v. 16, n. 11, p. 1848–1857, 30 abr. 2018.

FERREIRA, C. F. et al. Toward Marker-Assisted Selection in Breeding for Fusarium Wilt Tropical Race-4 Type Resistant Bananas. **Journal of Fungi**, v. 10, n. 12, p. 839–839, 4 dez. 2024.

Ferreira, C. F. et al. **Extração de RNA e DNA de tecidos de bananeira: protocolos otimizados**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2019.

GARCÍA-BASTIDAS, F. A. *et al.* First report of Fusarium wilt tropical race 4 in Cavendish bananas caused by Fusarium odoratissimum in Colombia. **Plant disease**, v. 104, n. 3, p. 994–994, 2020.

GHAG, S. B.; GANAPATHI, T. R. Genetically modified bananas: To mitigate food security concerns. **Scientia Horticulturae**, v. 214, p. 91–98, 5 jan. 2017.

GUO, Lijia *et al.* Genome and transcriptome analysis of the fungal pathogen Fusarium oxysporum f. sp. cubense causing banana vascular wilt disease. **PloS one**, v. 9, n. 4, p. e95543, 2014.

HASLEY, A. R.; NAVET, N.; TIAN, M. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of sweet basil candidate susceptibility gene ObDMR6 enhances downy mildew resistance. **PLOS ONE**, v. 16, n. 6, p. e0253245–e0253245, 10 jun. 2021.

HUOT, Bethany *et al.* Growth-defense tradeoffs in plants: a balancing act to optimize fitness. **Molecular plant**, v. 7, n. 8, p. 1267–1287, 2014.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento sistemático da produção agrícola. Rio de Janeiro, 2026. Disponível em: https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9201-levantamento-sistematico-da-producao-agricola.html.. Acesso em: 03 mar. 2026.

JIA, C. et al. Genome-Wide Analysis of the Banana WRKY Transcription Factor Gene Family Closely Related to Fruit Ripening and Stress. **Plants**, v. 11, n. 5, p. 662, 28 fev. 2022.

JINEK, M. et al. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. **Science**, v. 337, n. 6096, p. 816–821, 28 jun. 2012.

JOHANSEN, D.A. **Plant Microtechnique**; McGraw-Hill Book Company: New York, NY, USA; London, UK, 1940; p. 530. ISBN 19410700679.

JUSTINE, A. K. et al. Biotechnological interventions in banana: current knowledge and future prospects. **Heliyon**, v. 8, n. 11, p. e11636, 16 nov. 2022.

KAN, J. et al. CRISPR /Cas9-guided knockoutnocaute of *eIF4E* improves *Wheat yellow mosaic virus* resistance without yield penalty. v. 21, n. 5, p. 893–895, 24 jan. 2023.

Karnovsky, M.J. (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron-microscopy. **Journal of Cell Biology**, 27, 137-138A.

KAWICHA, P. et al. DMR6 Gene Editing in Bananas: Protocol Development using CRISPR/Cas9 and Multiple Bud Clump Transformation. **International Journal of Horticultural Science and Technology**, v. 13, n. 3, p. 609-624, 2026.

KIEU, N. P. et al. Mutations introduced in susceptibility genes through CRISPR/Cas9 genome editing confer increased late blight resistance in potatoes. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 24 fev. 2021.

KUMAR, P. et al. Plant secondary metabolites in defense against phytopathogens: Mechanisms, biosynthesis, and applications. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 138, p. 102639, 1 mar. 2025.

LI, M. et al. Editing eIF4E in the Watermelon Genome Using CRISPR/Cas9 Technology Confers Resistance to ZYMV. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 21, p. 11468–11468, 25 out. 2024.

LI, R. et al. CRISPR/Cas9-Based Knock-Out of the PMR4 Gene Reduces Susceptibility to Late Blight in Two Tomato Cultivars. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 23, p. 14542, 1 jan. 2022.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2−ΔΔCT Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.

MIAO, H. et al. Genome-wide analyses of SWEET family proteins reveal involvement in fruit development and abiotic/biotic stress responses in banana. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 14 jun. 2017.

MOJICA, F. J. M. et al. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. **Journal of molecular evolution**, v. 60, n. 2, p. 174–182, 2005.

NAPOLEÃO, G. M.; JESUS, P. R. R.; LEONEL, S. Cultivar diversification of banana production in Brazil. **Agronomy Science and Biotechnology**, v. 7, p. 1–14, 10 maio 2021.

NINKUU, V. et al. Phenylpropanoids metabolism: recent insight into stress tolerance and plant development cues. **Frontiers in Plant Science**, v. 16, 26 jun. 2025.

NTUI, V. O.; TRIPATHI, J. N.; TRIPATHI, L. Robust CRISPR/Cas9 mediated genome editing tool for banana and plantain (Musa spp.). **Current plant biology**, v. 21, n. 100128, p. 100128, 2020.

OLIVA, R. et al. Broad-spectrum resistance to bacterial blight in rice using genome editing. **Nature Biotechnology**, v. 37, n. 11, p. 1344–1350, 1 nov. 2019.

PANDIARAJ, S. et al. Interaction Between Translation Initiation Factor eIF4E in Banana and the VPg Protein of Banana Bract Mosaic Virus Reveals Potential Targets for Genome Editing. **Molecular biotechnology**, v. 67, n. 12, p. 4563–4573, dez. 2025.

PAVESE, V. et al. Identification of Susceptibility Genes in Castanea sativa and Their Transcription Dynamics following Pathogen Infection. **Plants**, v. 10, n. 5, p. 913–913, 2 maio 2021.

PHILLIPS, J. M.; HAYMAN, D. S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 55, n. 1, p. 158-IN18, 1970.

PLOETZ, R. C. Panama disease: An old nemesis rears its ugly: Head part 2. The Cavendish era and beyond. **Plant health progress**, v. 7, n. 1, p. 36, 2006.

PLOETZ, Randy C. Fusarium wilt of banana. **Phytopathology**, v. 105, n. 12, p. 1512–1521, 2015.

PODEVIN, N. et al. Selection and validation of reference genes for quantitative RT-PCR expression studies of the non-model crop Musa. **Molecular Breeding**, v. 30, n. 3, p. 1237–1252, 8 jun. 2012.

POREBSKI, S.; Bailey, L. G.; Baum, B. R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 15, n. 1, p. 8-15, 1997.

SABERI RISEH, Roohallah *et al.* Defense-related callose deposition in plants against pathogens: A review. **International journal of biological macromolecules**, v. 320, n. Pt 4, p. 146005, 2025.

SEENIVASAN, N. Identification of burrowing nematode (Radopholus similis) resistance in banana (Musa spp) genotypes for natural and challenge inoculated populations.

Archives of Phytopathology and Plant Protection, v. 50, n. 9-10, p. 415–437, 25 abr. 2017.

SHAN, Q. et al. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. **Nature biotechnology**, v. 31, n. 8, p. 686–688, 2013.

SILVA, A. V. C. et al. Diversity and genetic stability in banana genotypes in a breeding program using inter simple sequence repeats (ISSR) markers. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 16, n. 1, 2017.

SOARES, J. M. S. et al. Genetic Improvement for Resistance to Black Sigatoka in Bananas: A Systematic Review. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 657916, 21 abr. 2021.

TAYLOR, S. et al. A practical approach to RT-qPCR—Publishing data that conform to the MIQE guidelines. **Methods**, v. 50, n. 4, p. S1-S5, 2010.

THAKUR, S. et al. Turning Susceptibility into Strength: A New Era of Durable Resistance in Plants Through Genome Editing. **Plants**, v. 14, n. 19, p. 3080–3080, 5 out. 2025.

THAO PHUONG BUI et al. Enhancing powdery mildew resistance in soybean by targeted mutation of MLO genes using the CRISPR/Cas9 system. **BMC Plant Biology**, v. 23, n. 1, 3 nov. 2023.

THOMAZELLA, D. P. DE T. et al. Loss of function of a DMR6 ortholog in tomato confers broad-spectrum disease resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 27, 2 jul. 2021.

TINGTING, P. et al. Phenolic acids: An emerging player in Plant–Microbe interactions. **Journal of Plant Physiology**, v. 315, p. 154640, 28 out. 2025.

TRIPATHI, J. N. et al. CRISPR/Cas9 editing of endogenous banana streak virus in the B genome of Musa spp. overcomes a major challenge in banana breeding. **Communications Biology**, v. 2, n. 1, 31 jan. 2019.

TRIPATHI, L.; NTUI, V. O.; TRIPATHI, J. N. CRISPR/Cas9-based genome editing of banana for disease resistance. **Current opinion in plant biology**, v. 56, p. 118–126, 2020.

VAN SCHIE, C. C. N.; TAKKEN, F. L. W. Susceptibility genes 101: how to be a good host. **Annual review of phytopathology**, v. 52, n. 1, p. 551–581, 2014.

VELAME, K. V. C. et al. Evidence of Correlation between Pathogenicity, Avirulence Genes, and Aggressiveness of Fusarium oxysporum f. sp. cubense in Banana "Cavendish" and "Prata" Subgroups. **Horticulturae**, v. 10, n. 3, p. 228, 1 mar. 2024.

VOIGT, Christian A. Callose-mediated resistance to pathogenic intruders in plant defense-related papillae. **Frontiers in plant science**, v. 5, p. 168, 2014.

WANG, Bin; ANDARGIE, Mebeaselassie; FANG, Ruiqiu. The function and biosynthesis of callose in high plants. **Heliyon**, v. 8, n. 4, p. e09248, 2022.

WANG, D. et al. Recent advances in innovative strategies for plant disease resistance breeding. **Frontiers in Plant Science**, v. 16, 21 maio 2025.

WANG, D. et al. WRKY Transcription Factors: Integral Regulators of Defence Responses to Biotic Stress in Crops. **Plant biotechnology journal**, p. 10.1111/pbi.70542, dez. 2026.

WANG, F. et al. Enhanced Rice Blast Resistance by CRISPR/Cas9-Targeted Mutagenesis of the ERF Transcription Factor Gene OsERF922. **PloS one**, v. 11, n. 4, p. e0154027, 2016.

WANG, H.; LA RUSSA, M.; QI, L. S. CRISPR/Cas9 in genome editing and beyond. **Annual review of biochemistry**, v. 85, n. 1, p. 227–264, 2016.

WARMAN, N. M.; AITKEN, E. A. B. The Movement of Fusarium oxysporum f.sp. cubense (Sub-Tropical Race 4) in Susceptible Cultivars of Banana. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, 27 nov. 2018.

WU, Shu-Wei *et al.* Callose balancing at plasmodesmata. **Journal of experimental botany**, v. 69, n. 22, p. 5325–5339, 2018.

ZAIDI, S. S.-A.; MUKHTAR, M. S.; MANSOOR, S. Genome Editing: Targeting Susceptibility Genes for Plant Disease Resistance. **Trends in Biotechnology**, v. 36, n. 9, p. 898–906, set. 2018.

ZEILMAKER, Tieme *et al.* DOWNY MILDEW RESISTANT 6 and DMR6-LIKE OXYGENASE 1 are partially redundant but distinct suppressors of immunity in Arabidopsis. **The Plant journal: for cell and molecular biology**, v. 81, n. 2, p. 210–222, 2015.

ZHANG, L. et al. Identification and validation of reference genes for RT-qPCR analysis in banana (*Musa* spp.) under Fusarium wilt resistance induction conditions. **Journal of Phytopathology**, v. 165, n. 11-12, p. 746–754, 30 ago. 2017.

Conclusão Geral

Este trabalho permitiu mapear o avanço global da edição gênica em plantas e validar um alvo estratégico com potencial aplicação na bananicultura. Por meio de uma Revisão Sistemática (RS) de 118 artigos publicados entre 2019 a 2026, demonstrou-se que a inativação de genes de suscetibilidade (S-genes) via CRISPR/Cas9 constitui uma estratégia eficiente para a obtenção de resistência durável, especialmente contra patógenos fúngicos, que representaram 50% dos estudos analisados. A RS demonstra ainda que arroz e tomate são os principais modelos experimentais para essa tecnologia, enquanto os genes *MLO* e *DMR6* se destacam como os alvos biotecnológicos mais recorrentes.

Adicionalmente, a análise do perfil de segurança indicou que, em 46% dos estudos, o nocaute dos genes de suscetibilidade não comprometeu o vigor vegetativo, evidenciando o potencial de aplicação dessa abordagem diretamente em cultivares de interesse agronômico.

Na etapa experimental, o gene *MusaDMR6* foi validado na cultivar ‘Prata-Anã’. O monitoramento por RT-qPCR demonstrou uma regulação dinâmica do gene sob infecção pelo Foc, com repressão inicial seguida de uma indução de 6,5 vezes na expressão às 72 horas após a inoculação. Esse pico transcricional sugere que o *MusaDMR6* atua como um facilitador da interação compatível planta-patógeno. O padrão

de resposta observado em bananeira foi consistente com o descrito em arroz, tomate e outras culturas identificadas na RS, demonstrando uma convergência funcional desse gene em diferentes espécies.

A integração entre a RS e os dados experimentais posiciona o *DMR6* como um alvo estratégico para o melhoramento de precisão, indicando que sua modulação pode representar uma via promissora para reduzir a vulnerabilidade da banana ‘Prata’ ao Foc. Dessa forma, os resultados obtidos fornecem uma base para as etapas subsequentes de edição gênica.

Além da validação do gene *DMR6*, este estudo abre caminho para a análise funcional de outros genes de suscetibilidade identificados na revisão sistemática, como membros da família WRKY e genes do tipo SWEET, associados à suscetibilidade a diferentes patógenos em diversas culturas. A investigação desses alvos, aliada às estratégias de edição gênica, poderá contribuir para o desenvolvimento de cultivares com resistência mais ampla e durável, fortalecendo o melhoramento genético de precisão e o manejo sustentável da bananicultura.