



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO**

RAFAEL LARA REZENDE CABRAL

**TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO E RESISTÊNCIA A MURCHA BACTERIANA
(*Ralstonia solanacearum*): GENÔMICA FUNCIONAL E ASPECTOS FISIOLÓGICOS EM
PLANTAS HOSPEDEIRAS**

ALEGRE, ES

2023

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

C117t Cabral, Rafael Lara Rezende, 1996-
Tolerância ao déficit hídrico e resistência a murcha bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) : Genômica funcional e aspectos fisiológicos em plantas hospedeiras / Rafael Lara Rezende Cabral. - 2023.
75 p. : il.

Orientador: André da Silva Xavier.

Coorientadores: Fernanda Prieto Bruckner, Taís Cristina Bastos Soares.

Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramentos) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Engenharia genética vegetal. 2. Doenças bacterianas das plantas. 3. Genética Molecular. 4. Plantas - Efeito da seca. I. Xavier, André da Silva. II. Bruckner, Fernanda Prieto. III. Soares, Taís Cristina Bastos. IV. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. V. Título.

CDU: 631.523



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO
Caixa Postal 16 – 29.500-000 – Alegre/ ES – Brasil
Telefone: (28) 3552-8933 – Email: ppggmufes@gmail.com



71ª ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO

Ata da sessão de defesa pública da 71ª Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, do discente **Rafael Lara Rezende Cabral** candidato ao grau de Mestre em Genética e Melhoramento. Às treze horas e trinta minutos do dia vinte e nove de agosto do ano de dois mil e vinte e três (29/08/2023) no auditório do prédio central, o presidente da Comissão Examinadora o professor doutor **André da Silva Xavier** (Universidade Federal do Espírito Santo - UFES) iniciou a sessão apresentando a Comissão constituída, além dele próprio que é Orientador, pelo professor doutor **Adésio Ferreira** (Examinador interno – UFES), pelo professor doutor **Paulo César Cavatte** (Examinador Externo –UFES) e pela doutora **Laiane Silva Maciel** (Examinadora Externa - UFES) . A seguir, o presidente passou a palavra ao candidato, que, em trinta minutos, apresentou sua dissertação, intitulada **“TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO E RESISTÊNCIA A MURCHA BACTERIANA (*Ralstonia solanacearum*): GENÔMICA FUNCIONAL E ASPECTOS FISIOLÓGICOS EM PLANTAS HOSPEDEIRAS”**. Finda a arguição, o presidente convidou a Comissão para dirigir-se a uma sala reservada, para deliberação. Após a deliberação, a Comissão retornou, e o presidente informou aos presentes que a dissertação fora APROVADA, informando ao candidato que só terá direito ao título após apresentar a versão final corrigida com as alterações recomendadas. Logo após, a presidente declarou encerrada a sessão, e eu, Fernanda Sobreira Cossate, lavrei a presente Ata, que é assinada pelos membros da Comissão Examinadora. Alegre, 29 de agosto de 2023.*****

Prof. Dr. **André da Silva Xavier** (UFES) – Orientador:

Prof. Dr. **Adésio Ferreira** (Membro Interno – UFES) –1º Examinadora:

Prof. Dr. **Paulo César Cavatte** (Examinador Externo – UFES) – 2º Examinador:

Doutora **Laiane Silva Maciel** (Examinadora Externa - UFES) – 3ª Examinadora:





Ata 71 - Rafael Lara Rezende Cabral2

Data e Hora de Criação: 20/12/2023 às 15:13:12

Documentos que originaram esse envelope:

- Ata 71 - Rafael Lara Rezende Cabral2.pdf (Arquivo PDF) - 1 página(s)



Hashs únicas referente à esse envelope de documentos

[SHA256]: 795bd1c433a1ddf3060dd42a428c61243a62e91dde30d3cf2facc7c47702d101

[SHA512]: 2e08a34b54bfd93f4b761cf3101bb60d666dc73a9bedddc281508c13e42706af87d79fcc85b2019a409c7d2beb36ae28194438cb6ac4724b0ab843fa4be0a17

Lista de assinaturas solicitadas e associadas à esse envelope



ASSINADO - andre.s.xavier@ufes.br

Data/Hora: 20/12/2023 - 15:29:09, IP: 200.137.72.202, Geolocalização: [-20.761980, -41.536561]

[SHA256]: 88f80be00f3f6278fbbd5cbda1458c0a1481ebd4682ed5b180a56953cdae2c8e



ASSINADO - Adésio Ferreira (adesio.ferreira@ufes.br)

Data/Hora: 21/12/2023 - 08:17:46, IP: 186.193.18.175, Geolocalização: [-20.756826, -41.532586]

[SHA256]: 1d0bb63f7d0f3b496025cac55d90581e371d4b057c53b209876ad5521c22d17b

Adésio Ferreira



ASSINADO - Paulo Cezar Cavatte (paulo.cavatte@ufes.br)

Data/Hora: 21/12/2023 - 09:53:35, IP: 201.140.235.24

[SHA256]: 272f80edde039b1f48dbdfd326d1e26fbbb07974557991321300605197bba469



ASSINADO - laianesm@gmail.com

Data/Hora: 21/12/2023 - 10:32:29, IP: 179.109.143.83, Geolocalização: [-20.756389, -41.532803]

[SHA256]: 7f1263a617feafdd0de6c279de01a6715d261e8e411af81f25573761b7b2d13c

Histórico de eventos registrados neste envelope

21/12/2023 10:32:29 - Envelope finalizado por laianesm@gmail.com, IP 179.109.143.83

21/12/2023 10:32:29 - Assinatura realizada por laianesm@gmail.com, IP 179.109.143.83

21/12/2023 10:32:13 - Envelope visualizado por laianesm@gmail.com, IP 179.109.143.83

21/12/2023 09:53:35 - Assinatura realizada por paulo.cavatte@ufes.br, IP 201.140.235.24

21/12/2023 09:53:33 - Envelope visualizado por paulo.cavatte@ufes.br, IP 201.140.235.24

21/12/2023 08:17:46 - Assinatura realizada por adesio.ferreira@ufes.br, IP 186.193.18.175

21/12/2023 08:17:43 - Envelope visualizado por adesio.ferreira@ufes.br, IP 186.193.18.175

20/12/2023 15:29:09 - Assinatura realizada por andre.s.xavier@ufes.br, IP 200.137.72.202

20/12/2023 15:29:02 - Envelope visualizado por andre.s.xavier@ufes.br, IP 200.137.72.202

20/12/2023 15:19:57 - Envelope registrado na Blockchain por fernanda.koken@ufes.br, IP 200.137.72.202

20/12/2023 15:19:56 - Envelope encaminhado para assinaturas por fernanda.koken@ufes.br, IP 200.137.72.202

20/12/2023 15:13:13 - Envelope criado por fernanda.koken@ufes.br, IP 200.137.72.202

RAFAEL LARA REZENDE CABRAL

**TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO E RESISTÊNCIA A MURCHA BACTERIANA
(*Ralstonia solanacearum*): GENÔMICA FUNCIONAL E ASPECTOS FISIOLÓGICOS EM
PLANTAS HOSPEDEIRAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento.

Orientador: Prof. Dr. André da Silva Xavier

Coorientadora: Dra. Fernanda Prieto Bruckner

Coorientadora: Dra. Taís Cristina Bastos Soares

ALEGRE, ES

2023

**TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO E RESISTÊNCIA A MURCHA
BACTERIANA (*Ralstonia solanacearum*): GENÔMICA FUNCIONAL E
ASPECTOS FISIOLÓGICOS EM PLANTAS HOSPEDEIRAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Genética e Melhoramento.

29 de agosto de 2023

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. André da Silva Xavier (UFES)

Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Adésio Ferreira (UFES)

Examinador Interno

Prof. Dr. Paulo César Cavatte (UFES)

Examinador Externo

Dra. Laiane Silva Maciel

Examinadora Externa

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos pelo sucesso e conclusão desse trabalho, entre eles:

À Deus por todo resguardo e apoio nos momentos mais difíceis;

À minha família, toda a minha base, toda minha paixão, amor, consideração e apoio. Meus irmãos Tiago Lara, Gabriel Lara e Anna Lara, vocês são incríveis e penso muito em vocês;

Especialmente à Symone Garcia Lara, minha mãe que admiro mais que tudo nessa vida e à João Paulo Lara, meu tio, que sempre me apoiou e nunca me deixou desistir. Muito obrigado pela força sempre, amo-lhes!

Achou que ia esquecer de você cunha? À Marina Feres, por sempre me defender e ouvir minhas conversas aleatórias. Muito obrigado por fazer parte da minha família;

Ao programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento e a Universidade Federal do Espírito Santo por toda confiança em meu trabalho e apoio no desenvolvimento da pesquisa;

Ao meu grande amigo e orientador André da Silva Xavier, meu chefe e conselheiro de trabalho, muito obrigado por todo apoio, ensinamentos e investimento em mim e na minha vida profissional;

Aos meus amigos, Mateus Rodrigues, Rafael Tassan, Fernando Fernandes, Bruno Ferraz, Ricardo Vale, Alexandre Noronha e Cláudio. Muito obrigado pelo grande apoio e pelos momentos descontraídos, engraçados e conselhos;

À Embrapa Milho e Sorgo – Sete Lagoas / MG, incluindo todos os membros participantes, por todo investimento e colaboração intelectual e prático a minha formação.

A todos os meus colegas e amigos de trabalho, especialmente à Serli Cabral, Fernanda Silva, Vanessa Dian, Marcella Falci e Vinícius Fioresi, por toda ajuda e conhecimentos compartilhados no desenvolvimento desse trabalho;

Aos meus professores de mestrado, por todos os ensinamentos e conhecimentos compartilhados de forma revigorante; especialmente a minha coorientadora Fernanda Prieto Bruckner.

À CAPES especialmente, mas também a FAPES e CNPq por financiar e apoiar essa pesquisa colaborando para o crescimento pessoal, profissional e científico.

RESUMO

As plantas são organismos sésseis e frequentemente enfrentam diferentes tipos de estresses abióticos e bióticos, incluindo patógenos, pragas e mudanças climáticas. Esses fatores podem ter um impacto considerável na produtividade de espécies vegetais, particularmente aquelas de importância econômica. Visando melhorar a resistência das culturas a esses estresses, é fundamental entender as estratégias de resposta das plantas. Neste estudo, utilizando plantas de tabaco e tomate, investigamos a resposta das plantas ao estresse biótico da murchabacteriana (*Ralstonia solanacearum*) e ao estresse abiótico de déficit hídrico. Para entender o fator de transcrição da família MYB (*Phantastica*) associado a tolerância ao déficit hídrico em *Nicotiana benthamiana* também influenciaria a resistência à murcha bacteriana, usamos vetores TRV (*Tobacco rattle virus*) para silenciamento gênico por VIGS (silenciamento pós-transcricional induzido por vírus), desenvolvendo um patossistema em plantas de tabaco. Os resultados revelaram um *cross-talk* entre as vias de resposta a esses estresses, sendo que a supressão do gene *NbPHAN* em plantas de tabaco afetou negativamente a resistência à murcha bacteriana. De outra maneira, genótipos de tomate contrastantes para resistência a *R. solanacearum* foram submetidos à seca pelo tratamento com solução nutritiva com polietileno glicol (PEG). Nossos dados mostraram que o déficit hídrico reduziu o crescimento, a atividade fotossintética e a eficiência de conversão de água em biomassa em ambos genótipos, causando efeitos no rearranjo da arquitetura radicular e na distribuição de biomassa, concluindo que o genótipo suscetível Heinz 1706 tolerou mais o déficit hídrico quando comparado ao genótipo resistente Hawaii 7996. Em síntese, constatamos que plantas que apresentam características de tolerância ao déficit hídrico também respondem positivamente a infecção por *R. solanacearum*, contudo, plantas que exibem traços de resistência ao fitopatógeno não respondem ao déficit hídrico. Esses resultados destacam a complexidade das interações entre estresses abióticos e bióticos em plantas e fornecem *insights* importantes para o desenvolvimento de culturas mais resistentes a múltiplos estresses. Estudos futuros nesse sentido são essenciais para uma compreensão mais aprofundada desses processos.

PALAVRAS-CHAVE: VIGS, *Nicotiana benthamiana*, Hawaii 7996, estresse biótico, estresse abiótico.

ABSTRACT

Plants are sessile organisms and often face several types of abiotic and biotic stresses, including pathogens, pests, and climate changes. These factors can have a significant impact on the productivity of plant species, especially crops. In order to enhance crop resilience to these stresses, it is essential to understand plant response strategies. In this study, using tobacco and tomato plants, we investigated plant responses to the biotic stress (bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*) and the abiotic stress (drought). To understand whether the MYB transcription factor (*Phantastica*) associated with drought tolerance in *Nicotiana benthamiana* also influenced resistance to bacterial wilt, we used TRV (*Tobacco rattle virus*) vectors for gene silencing by VIGS (Virus-Induced Gene Silencing), developing a pathosystem in tobacco plants. The results revealed a cross-talk between the response pathways to these stresses, with the suppression of the *NbPHAN* gene in tobacco plants negatively affecting resistance to bacterial wilt. Alternatively, contrasting tomato genotypes for *R. solanacearum* resistance were subjected to drought stress by treatment with a nutrient solution containing polyethylene glycol (PEG). Our data showed that water deficit reduced growth, photosynthetic activity, and water-to-biomass conversion efficiency in both genotypes, causing effects on root architecture rearrangement and biomass distribution. We concluded that the susceptible genotype Heinz 1706 tolerated water deficit more when compared to the resistant genotype Hawaii 7996. In summary, we found that plants displaying characteristics of water deficit tolerance also responded positively to *R. solanacearum* infection. However, plants exhibiting resistance traits to the phytopathogen did not respond to water deficit. These results highlight the complexity of interactions between abiotic and biotic stresses in plants and provide valuable insights for the development of crops resistant to multiple stresses. Further studies in this direction are essential for a deeper understanding of these processes.

KEYWORDS: VIGS, *Nicotiana benthamiana*, Hawaii 7996, biotic stress, abiotic stress.

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Sequência de oligonucleotídeos desenvolvidos e usados em PCR, RT-PCR e RT-PCR quantitativo | 29 |
|---|----|

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Análise <i>in silico</i> , seleção de região-alvo e clonagem do gene <i>Phantastica</i> em <i>Nicotiana benthamiana</i> (<i>NbPHAN</i>) para indução do silenciamento gênico. (A) Localização genômica e estrutura do gene <i>NbPHAN</i> e região-alvo selecionada. (B) Confirmação da clonagem e subclonagem de <i>NbPHAN</i> em pGEM-Teasy e em pTRV2, respectivamente. Plasmídeo circular (PC), linear (PL) e enovelado (PE) também são representadas..... | 38 |
|--|----|

| | |
|---|----|
| Figura 2. Vetores virais indutores de silenciamento e fenótipo de fotobranqueamento estabilizado em <i>N. benthamiana</i> . (A) Mapa linear dos cassetes gênicos pTRV1::Empty (6.791 pb), pTRV2::Empty (9.663 pb), pTRV2:: <i>NbPHAN</i> (10.063 pb), pTRV2:: <i>GFP</i> (10.377 pb) e pTRV2:: <i>NbPDS</i> (9.904 pb). Promotor duplo 2x35S do <i>Cauliflower mosaic virus</i> (CaMV) em amarelo, em pTRV1 versões moleculares das proteínas de replicação RdRp (134 e 194 kDa) em vermelho, proteína de movimento MP (29 kDa) e proteína rica em cisteína CR-16kDa em verde, em pTRV2, a proteína capsidial CP (22,3 kDa) em laranja, sítio múltiplo de clonagem (MCS) em cinza, ribozima de auto-clivagem R e terminador nos (Nopalina sintase) em azul. O LB representa o bordo esquerdo e o RB o bordo direito do T-DNA. (B) Imagem ilustrativa do fenótipo de silenciamento PTGS de <i>NbPDS</i> , perceptível visualmente (fotobranqueamento) e estabilizado em plantas de <i>N. benthamiana</i> . Plantas de <i>N. benthamiana</i> não silenciadas (pTRV2:: <i>GFP</i>) e silenciadas para <i>NbPHAN</i> , respectivamente, sem detecção visual de alterações fenotípicas nas plantas silenciadas para <i>NbPHAN</i> com 10 dias pós-agroinfiltração. (Faixa da escala = 2cm) | 39 |
|---|----|

| | |
|--|----|
| Figura 3. Plantas adultas de <i>N. benthamiana</i> manifestando alterações fenotípicas associadas ao silenciamento gênico de <i>NbPHAN</i> e confirmação do silenciamento por RT-qPCR (50 dias pós-agroinfiltração). (A) Imagem ilustrativa de uma planta controle, <i>NbPHAN</i> não silenciado (pTRV2:: <i>GFP</i>), exibindo fenótipo idêntico a planta não agroinfiltrada e planta <i>NbPHAN</i> -silenciada (pTRV2:: <i>NbPHAN</i>) com distúrbios no desenvolvimento de folhas e flores (perda da dorsoventralidade). As setas indicam as porções adaxial e abaxial das folhas, nessa mesma ordem. Folhas estreitas (FE), folhas agulhas (FA) e folhas mosaico (FM) também são representadas. (B) Expressão relativa do gene <i>NbPHAN</i> em plantas de <i>N. benthamiana</i> agroinfiltradas com as construções pTRV2:: <i>GFP</i> e pTRV2:: <i>NbPHAN</i> , respectivamente. Gene normalizador <i>NbGAPDH</i> ($p \leq 0,05$) em reação de RT-qPCR | 40 |
|--|----|

Figura 4. Gráfico do índice da murcha bacteriana calculado a partir da avaliação diária de plantas de *N. benthamiana* silenciadas (pTRV2::*NbPHAN*) e não silenciadas (pTRV2::*GFP*) para *NbPHAN* durante 10 dias pós-inoculação usando a escala de notas descrita por Nakano et al., 2017.....42

Figura 5. Severidade da murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* (isolado B73, Fílotipo II) em plantas de *N. benthamiana* não silenciadas (pTRV2::*GFP*) e silenciadas (pTRV2::*NbPHAN*) para *NbPHAN*. Plantas de *N. benthamiana* pTRV2::*GFP* não inoculadas com *R. solanacearum* são representadas como controle negativo.....43

Figura 6. Interações putativas do fator de transcrição AS1-Like de *Nicotiana tabacum* homólogo de *Phantastica* de *N. benthamiana* (*NbPHAN*). As redes de interação proteína-proteína foram geradas com duas ferramentas de bioinformática independentes, a plataforma online STRING (SZKLARCZYK et al., 2023) e o software livre Cytoscape (SHANNON et al., 2003) e as interações foram pertinentes em ambos. Destacam-se as interações (linhas em rosa – determinado experimentalmente, dados disponíveis na plataforma) entre AS1-Like e proteínas contendo domínios conservados de *Lateral Organ Boundaries* (LOB), reguladores-chave no desenvolvimento de órgãos laterais e envolvidos com respostas à patógenos44

Figura 7. Comparação do crescimento e arquitetura radicular dos genótipos de *S. lycopersicum* Hawaii 7996 (A) e Heinz 1706 (B), respectivamente resistente e suscetível a *R. solanacearum* sob diferentes manejos hídricos. Um irrigado com solução nutritiva regularmente (controle) e outro com solução nutritiva + PEG (10%) (seca) durante 26 dias de experimentação. (Faixa de escala = 1 cm).....46

Figura 8. Avaliação qualitativa e comparação do desenvolvimento da parte aérea dos genótipos de *S. lycopersicum* Hawaii 7996 (A) e Heinz 1706 (B) resistente e suscetível a *R. solanacearum*, respectivamente, sob diferentes manejos hídricos. As plantas foram submetidas a irrigação (controle) ou mantidas em condição de seca por PEG (10%) durante 26 dias de experimentação. (Faixa de escala = 6 cm). 47

Figura 9. Análise dos parâmetros fotossintéticos: eficiência quântica do fotossistema II (PhiPSII) e taxa transportadora de elétrons nos genótipos de *S. lycopersicum* Hawaii 7996 (HA) e Heinz 1706 (HE), respectivamente resistente e suscetível a *R. solanacearum*, submetidos ou não ao déficit hídrico. (A) eficiência quântica do fotossistema II (PhiPSII) e (B) Taxa aparente de transporte de elétrons (ETR). As diferenças estatísticas entre as médias foram consideradas pelos valores significativos até 5% de probabilidade ($p < 0,05$). *, ** e ***, representam

diferença significativa a 5, 1 e 0,1%, respectivamente, após uma análise de variância (anova) e teste de média (t de Student)49

Figura 10. Análise dos parâmetros de trocas gasosas e metabolismo da respiração nos genótipos de *S. lycopersicum* Hawaii 7996 (HA) e Heinz 1706 (HE), respectivamente resistente e suscetível a *R. solanacearum*, submetidos ou não ao déficit hídrico. Incluem, (A) condutância estomática, (B) taxa de transpiração e (C) CO₂ intracelular. As diferenças estatísticas entre as médias foram consideradas pelos valores significativos até 5% de probabilidade (p<0,05). *, ** e *** representam diferença significativa a 5, 1 e 0,1%, respectivamente, após uma análise de variância (anova) e teste de média (t de Student)50

Figura 11. Análise das relações de eficiência hídrica e status hídricos genótipos de *S. lycopersicum* Hawaii 7996 (HA) e Heinz 1706 (HE), respectivamente resistente e suscetível a *R. solanacearum*, submetidos ou não ao déficit hídrico. Incluem, (A) relação da fotossíntese por transpiração, (B) relação da fotossíntese por taxa de transporte aparente de elétrons (ETR), (C) eficiência do uso da água e (D) teor relativo de água. As diferenças estatísticas entre as médias foram consideradas pelos valores significativos até 5% de probabilidade (p<0,05). * e ** representam diferença significativa a 5 e 1%, respectivamente, após uma análise de variância (anova) e teste de média (t de Student)51

Figura 12. Análises dos parâmetros de crescimento dos genótipos de *S. lycopersicum* Hawaii 7996 (HA) e Heinz 1706 (HE), respectivamente resistente e suscetível a *R. solanacearum*, submetidos ou não ao déficit hídrico. Incluem, (A) massa seca total, (B) fração de massa de raiz (FMR), (C) fração de massa de caule (FMC), (D) fração de massa de folha (FMF), (E) diâmetro do caule e (F) altura das plantas. As diferenças estatísticas entre as médias foram consideradas pelos valores significativos até 5% de probabilidade (p<0,05). *, **, ***, **** representam diferença significativa a 5, 1, 0,1 e 0,01%, respectivamente, após uma análise de variância (anova) e teste de média (t de Student) 53

Figura Suplementar 1. Perfil de amplificação de bandas de ± 500 pares de bases (*primers* para pTRV2) usando como molde as construções pTRV2::*NbPHAN*, pTRV2::*PDS* e pTRV2::*GFP* extraídas de *Agrobacterium tumefaciens* C58CI transformadas por choque térmico. Para controle negativo utilizou-se bactérias *A. tumefaciens* não transformadas.....73

Figura Suplementar 2. Perfil de amplificação da reação de RT-PCR para validar o movimento sistêmico do RNA2 e infecção do *Tobacco rattle virus* (TRV) em plantas de *N. benthamiana* não silenciadas (pTRV2::*GFP*) e silenciadas para *NbPHAN* (pTRV2::*NbPHAN*). No total, foram analisadas 6 amostras experimentais de pTRV2::*NbPHAN* e 5 amostras experimentais de pTRV2::*GFP*..... 73

Figura Suplementar 3. Avaliação qualitativa e comparação do dano oxidativo da segunda folha verdadeira entre os genótipos de *S. lycopersicum* Hawaii 7996 (resistente) e Heinz 1706

(suscetível) a *R. solanacearum*, submetidos ou não ao déficit hídrico durante 25 dias de experimentação. (Faixa de escala = 1 cm).....74

Figura Suplementar 4. Análise da fotossíntese e relação Fv/Fm do fotossistema II nos genótipos de *S. lycopersicum* Hawaii 7996 (HA) e Heinz 1706 (HE), respectivamente resistente e suscetível a *R. solanacearum*, submetidos ou não ao déficit hídrico. (A) taxa de fotossíntese e (B) relação fluorescência variável (Fv) por fluorescência máxima (Fm) (Fv/Fm). As diferenças estatísticas entre as médias foram consideradas pelos valores significativos até 5% de probabilidade ($p < 0,05$). *, ** e *** representam diferença significativa a 5, 1 e 0,1%, respectivamente, após uma análise de variância (anova) e teste de média (t de Student).....74

Figura Suplementar 5. Análise dos parâmetros complementares de trocas gasosas nos genótipos de *S. lycopersicum* Hawaii 7996 (HA) e Heinz 1706 (HE), respectivamente resistente e suscetível a *R. solanacearum*, submetidos ou não ao déficit hídrico. (A) relação fotossíntese por condutância estomática e (B) taxa de respiração. As diferenças estatísticas entre as médias foram consideradas pelos valores significativos até 5% de probabilidade ($p < 0,05$). *, ** e *** representam diferença significativa a 5, 1 e 0,1%, respectivamente, após uma análise de variância (anova) e teste de média (t de Student)75

Sumário

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO GERAL | 13 |
| 2. OBJETIVO GERAL | 16 |
| 2.1. Objetivos Específicos | 16 |
| 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 17 |
| 1. INTRODUÇÃO | 23 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS..... | 27 |
| 2.1. Local dos experimentos e análises | 27 |
| 2.2. Análise de genômica funcional: plantas de <i>N. benthamiana</i> silenciadas para o gene <i>NbPHAN</i> e infectadas com <i>R. solanacearum</i> | 27 |
| 2.2.1 Material vegetal, linhagens bacterianas e condições de crescimento..... | 27 |
| 2.2.2 Análise <i>in silico</i> e desenho de oligonucleotídeos..... | 28 |
| 2.2.3 Amplificação do fragmento parcial de <i>Phantastica</i> | 30 |
| 2.2.4 Vetores TRV, clonagem e cassetes gênicos..... | 30 |
| 2.2.5 Silenciamento gênico de <i>Phantastica</i> mediado por <i>A. tumefaciens</i> pelo método de VIGS | 31 |
| 2.2.6 Severidade da murcha bacteriana em plantas de <i>N. benthamiana</i> silenciadas e não silenciadas para <i>NbPHAN</i> | 32 |
| 2.2.7 RT-PCR e RT-PCR quantitativo..... | 32 |
| 2.2.8 Similaridade de sequências e análise de redes complexas das interações proteicas | 33 |
| 2.3. Análise fisiológica: genótipos de tomateiro contrastantes para a resistência a <i>R. solanacearum</i> submetidos ao déficit hídrico | 33 |
| 2.3.1. Genótipos e condições de crescimento vegetal..... | 33 |
| 2.3.2. Capacidade de campo, experimentação e indução ao déficit hídrico..... | 34 |
| 2.3.3. Avaliação dos fenótipos e parâmetros fisiológicos | 35 |
| 2.3.4. Análises estatísticas | 36 |
| 3. RESULTADOS | 37 |
| 3.1. Análise <i>in silico</i> e Clonagem parcial do gene <i>Phantastica</i> de <i>N. benthamiana</i> | 37 |
| 3.2. Silenciamento gênico de <i>Phantastica</i> utilizando VIGS em <i>N. benthamiana</i> | 38 |
| 3.3. Efeito do silenciamento de <i>NbPHAN</i> na interação <i>R. solanacearum</i> - <i>N. benthamiana</i> | 41 |
| 3.4. Análise de redes complexas da interação do fator de transcrição <i>ASI-Like</i> | 44 |
| 3.5. Avaliação de tolerância a seca em genótipos de <i>S. lycopersicum</i> contrastantes para resistência a murcha bacteriana | 45 |
| 3.5.1. Parâmetros morfológicos, crescimento e arquitetura radicular..... | 45 |
| 3.5.2. Crescimento aéreo e sintomas de déficit hídrico | 46 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 3.5.3. | Parâmetros fotossintéticos: eficiência quântica do fotossistema II e taxa de transporte de elétrons | 48 |
| 3.5.4. | Trocas gasosas: fechamento de estômatos e taxa de transpiração. | 49 |
| 3.5.5. | Eficiência hídrica: perda de água intracelular e produção de biomassa..... | 50 |
| 3.5.6. | Elementos de desenvolvimento: realocação de biomassa e taxa de crescimento. | 52 |
| 4. | DISCUSSÃO | 54 |
| 5. | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 62 |
| 6. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 63 |

1. INTRODUÇÃO GERAL

Nas próximas décadas, espera-se uma alta demanda global por alimentos devido ao aumento desenfreado da população (GU et al., 2021; MOLOTOKS et al., 2021). A terra é importante fornecedor de alimentos para o ser humano (KOPITTKKE et al., 2019), e atualmente, a urbanização, desmatamento, empobrecimento dos solos e mal uso de recursos naturais (principalmente não renováveis) desempenham pressões excessivas ao ambiente, e assim, exercem limitações na expansão de áreas de cultivos (OLAGUNKU, 2015; BODO et al., 2021; GIRASE, 2021; GOULART et al., 2023), sobretudo nos países em desenvolvimento (HATAB et al., 2019).

As projeções futuras apontam um cenário pouco propício para a implementação sustentável do uso da terra e água, proporcionando muitos desafios para a agricultura e produção de alimentos. Tendo em vista essas dificuldades, múltiplas alternativas são estudadas e testadas com a proposta de atenuar esses efeitos (JAT et al., 2016; LENAERTS et al., 2019; VERMA et al., 2022).

Em função dos últimos avanços, novas ferramentas têm sido descobertas, possibilitando criar estratégias e aprofundar os conhecimentos fundamentais dos aspectos genéticos, moleculares e bioquímicos de plantas que frequentemente sofrem perdas e são ameaçadas por estresses ambientais e biológicos (FIRE et al., 1998; MARTIN et al., 2012). Liu et al. (2002) desenvolveram um sistema de silenciamento pós transcricional induzido por vírus (VIGS) baseado na incorporação estável de DNA plasmidial de bactérias *Agrobacterium tumefaciens* e no vírus de genoma bi-partido Tobacco rattle virus (TRV), que é dividido em RNA 1, responsáveis por codificar proteínas replicase, proteínas de movimento, RNAs subgenômicos e RNA 2, codificantes de proteínas de revestimento e proteínas não estruturais. Esse sistema é valioso nas áreas da engenharia genética e genômica funcional, pois permite o silenciamento específico de genes-alvo por meio da genética reversa, possibilitando a análise das funções do gene-alvo em um curto período de tempo.

No contexto das estratégias adotadas, o melhoramento de plantas é uma das mais promissoras, frente aos desafios impostos a produção de alimentos visando o uso sustentável, a conservação do meio ambiente e de sua biodiversidade (BRADSHAW, 2017; QAIM, 2022; SMITH et al., 2021). A chave para o desenvolvimento de novas cultivares refere-se, mas não se limita, a uma abordagem mais aprofundada que contempla os mecanismos moleculares,

celulares e de desenvolvimento pelos quais as plantas adaptam-se de maneira dinâmica e interagem com o meio ambiente e fatores bióticos, como fitopatógenos garantindo o contínuo crescimento, a otimização na utilização de nutrientes e a sua aptidão (BAILEY-SERRES et al., 2019).

Devido à sua natureza fixa, as plantas enfrentam de maneira contínua estresses ambientais, infecção por patógenos e infestações por pragas. Os principais estresses abióticos que impactam plantas e cultivos no campo têm sido objeto de extensas investigações, que incluem situações de seca, salinidade, calor, frio e escassez de nutrientes (CHOUDHARY et al., 2019; NANSAMBA et al., 2020; WANI et al., 2020; CHEN et al., 2021; JOSE, 2023). Além disso, os ecossistemas abrangem de modo intrínseco os estresses de origem biótica, uma ameaça representada pela infecção por patógenos, como bactérias, fungos, vírus e nematoides, e ainda, ataques de pragas herbívoras (GULL et al., 2019).

Adicionalmente, as mudanças climáticas têm o potencial de afetar a variedade de ambientes onde essas pragas e patógenos se estabelecem (PANDEY; SENTHIL-KUMAR, 2019). Nnadi & Carter (2021) citam a influência das mudanças climáticas no surgimento de novos fitopatógenos e a correlação com sua disseminação. Efeitos intensos como o aumento da temperatura global, colabora diretamente para maior proliferação de patógenos que se estabelecem no solo, como por exemplo *Fusarium oxysporum* (DELGADO-BAQUERIZO et al., 2020). Evidentemente, o contínuo aumento da temperatura global contribui para elevar as taxas de seca, com maiores e mais frequentes períodos de estiagem (DE NATALE et al., 2023) e é categorizado como um dos mais preocupantes.

O estresse hídrico exerce ação redutora sobre o crescimento e a produtividade das plantas. Tal estresse, pode manifestar-se por distúrbios metabólicos internos ou por inibição do crescimento, resultando em morte parcial ou total da planta, principalmente por oxidação do tecido, sendo que a magnitude do estresse hídrico possui impacto expressivo sobre os processos fisiológicos e bioquímicos (HE et al., 2020). A reação das plantas a esse estresse é habitualmente abordada com base em métricas fisiológicas, tais como potencial hídrico, teor de água relativo, resposta estomática, fotossíntese ou mecanismos de ajuste osmótico (JAFARI et al., 2019).

As plantas são desafiadas por ampla gama de fitopatógenos, dentre os quais, podemos citar a murcha bacteriana, provocada pelo complexo de espécies *Ralstonia solanacearum* (RSSC)

que chama a atenção de muitos especialistas, em função de sua ampla distribuição e letalidade. Caracterizadas por alta diversidade genética e fenotípica, essas bactérias fitopatogênicas Gram-negativas estão presentes em várias áreas geográficas do planeta infectando mais de 250 espécies de plantas, sendo intensivamente estudadas devido as perdas significativas em importantes culturas agrícolas, principalmente as pertencentes a família *Solanaceae*, como batata, pimenta, beringela, gengibre, tabaco e tomate (GENIN; DENNY, 2012; MAMPHOGORO et al., 2020; AHMED et al., 2022). Na Etiópia, a doença prevalece em até 90 % de áreas de cultivo de batata (TESSEMA et al., 2023).

Inicialmente, a infecção ocorre por ferimentos nas raízes e rapidamente as células atingem os tecidos do xilema produzindo quantidades significativas de exopolissacarídeos (EPS – macromoléculas viscosas localizadas na camada mais externa das células bacterianas) que formam biofilmes nas paredes desses tecidos, e conseqüentemente obstruem fisicamente o movimento da água, resultando em sintomas de murcha (BAE et al., 2015). A obstrução dos vasos condutores que conduz a murcha no quadro da murcha bacteriana mimetiza a condição de perda da turgência e murcha associada ao déficit hídrico. Estudos recentes demonstraram que em *Solanum lycopersicum*, existe uma possível correlação entre ambos os estresses correspondendo a um possível mimetismo fisiológico (MACLNTYRE et al., 2022).

Considerando que as condições reais de campo diferem das condições controladas em laboratório, realizar pesquisas mais aprofundadas para compreender melhor as relações entre as plantas e seus ambientes quando enfrentam situações de estresses tanto abióticos quanto bióticos é fundamental em pesquisas voltadas para o melhoramento de plantas. Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar experimentalmente a possível sobreposição das vias de resposta em plantas hospedeiras submetidas ao *R. solanacearum* e ao déficit hídrico.

2. OBJETIVO GERAL

Investigar uma possível associação positiva (*cross-talk*) entre as respostas de resistência a murcha bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) e tolerância ao déficit hídrico em plantas de *Nicotiana benthamiana* e tomateiro (*Solanum lycopersicum*).

2.1. Objetivos Específicos

- I. Desenvolver uma construção indutora de silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) baseada no genoma do *Tobacco rattle virus* (TRV) para o silenciamento do gene *Phantastica* (*NbPHAN*), que codifica um fator de transcrição da família MYB envolvido com respostas ao déficit hídrico em *N. benthamiana*;
- II. Investigar as implicações do silenciamento de *NbPHAN*, envolvido positivamente na resposta ao déficit hídrico, na interação entre *R. solanacearum* e *N. benthamiana*;
- III. Avaliar parâmetros fisiológicos de tolerância ao déficit hídrico em genótipos de *S. lycopersicum* contrastantes para a resistência a murcha bacteriana (*R. solanacearum*).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, W. et al. *Ralstonia solanacearum*, a deadly pathogen: Revisiting the bacterial wilt biocontrol practices in tobacco and other Solanaceae. **Rhizosphere**, v. 21, p. 100-479, 2022.

BAE, C. et al. Infection processes of xylem-colonizing pathogenic bacteria: possible explanations for the scarcity of qualitative disease resistance genes against them in crops. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 128, p. 1219-1229, 2015.

BAILEY-SERRES, J. et al. Genetic strategies for improving crop yields. **Nature**, v. 575, n. 7781, p. 109-118, 2019.

BODO, T.; GIMAH, B. G.; SEOMONI, K. J. Deforestation and habitat loss: Human causes, consequences and possible solutions. **Journal of Geographical Research**, v. 4, n. 2, p. 22-30, 2021.

BRADSHAW, J. E. Plant breeding: past, present and future. **Euphytica**, v. 213, p. 1-12, 2017.

CHEN, X. et al. Protein kinases in plant responses to drought, salt, and cold stress. **Journal of integrative plant biology**, v. 63, n. 1, p. 53-78, 2021.

CHOUDHARY, M. et al. QTLian breeding for climate resilience in cereals: progress and prospects. **Functional & integrative genomics**, v. 19, p. 685-701, 2019.

DE NATALE, F. et al. A bibliometric analysis on drought and heat indices in agriculture. **Agricultural and Forest Meteorology**, v. 341, p. 109-626, 2023.

DELGADO-BAQUERIZO, M. et al. The proportion of soil-borne pathogens increases with warming at the global scale. **Nature Climate Change**, v. 10, n. 6, p. 550-554, 2020.

FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, p. 806–811, 1998.

GENIN, S.; DENNY, T. P. Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* species complex. **Annual review of phytopathology**, v. 50, p. 67-89, 2012.

GIRASE, S. D. Deforestation: Main cause for global warming in current scenario. **EPRA International Journal of Climate and Resource Economic Review (CRER)**, v. 10, n. 4, p. 1-4, 2022.

GOULART, F. F. et al. Sparing or expanding? The effects of agricultural yields on farm expansion and deforestation in the tropics. **Biodiversity and Conservation**, v. 32, n. 3, p. 1089-1104, 2023.

GU, D.; ANDREEV, K.; DUPRE, M. E. Major trends in population growth around the world. **China CDC weekly**, v. 3, n. 28, p. 604, 2021.

GULL, A.; LONE, A. A.; WANI, N. U. I. Biotic and abiotic stresses in plants. **Abiotic and biotic stress in plants**, p. 1-19, 2019.

HATAB, A. et al. Urbanization, livestock systems and food security in developing countries: A systematic review of the literature. **Food Sec.**, v. 11, p. 279–299, 2019.

HE, X. et al. Drought resistance of *Camellia oleifera* under drought stress: Changes in physiology and growth characteristics. **PLOS One**, v. 15, n. 7, p. 235-795, 2020.

JAFARI, S.; GARMDAREH, S. E. H.; AZADEGAN, B. Effects of drought stress on morphological, physiological, and biochemical characteristics of stock plant (*Matthiola incana* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 253, p. 128-133, 2019.

JAT, M. L. et al. Climate change and agriculture: adaptation strategies and mitigation opportunities for food security in South Asia and Latin America. **Advances in agronomy**, v. 137, p. 127-235, 2016.

JOSE, J. V. Physiological and molecular aspects of macronutrient uptake by higher plants. **Sustainable plant nutrition**. Academic Press, p. 1-21, 2023.

KOPITTKE, P. M. et al. Soil and the intensification of agriculture for global food security. **Environment international**, v. 132, p. 105078, 2019.

LENAERTS, B.; COLLARD, B. C. Y.; DEMONT, M. Improving global food security through accelerated plant breeding. **Plant Science**, v. 287, p. 110-207, 2019.

LIU, Y.; SCHIFF, M.; MARATHE, R.; DINESH-KUMAR, S. P. Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. **Plant J.** v. 30, n. 4, p. 415-429, 2002.

MACLNTYRE, A. M. et al. Trehalose increases tomato drought tolerance, induces defenses, and increases resistance to bacterial wilt disease. **PLOS One**, v. 17, n. 4, p. e0266254, 2022.

MAMPHOGORO, T. P.; BABALOLA, O. O.; AIYEGORO, O. A. Sustainable management strategies for bacterial wilt of sweet peppers (*Capsicum annuum*) and other Solanaceous crops. **Journal of Applied Microbiology**, v. 129, n. 3, p. 496-508, 2020.

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

MOLOTOKS, A.; SMITH, P.; DAWSON, T. P. Impacts of land use, population, and climate change on global food security. **Food and Energy Security**, v. 10, n. 1, p. e261, 2021.

NANSAMBA, M. et al. Breeding banana (*Musa* spp.) for drought tolerance: A review. **Plant Breeding**, v. 139, n. 4, p. 685-696, 2020.

NNADI, N. E.; CARTER, D. A. Climate change and the emergence of fungal pathogens. **PLoS Pathogens**, v. 17, n. 4, p. e1009503, 2021.

OLAGUNJU, T. E. Impacts of human-induced deforestation, forest degradation and fragmentation on food security. **New York Science Journal**, v. 8, n. 1, p. 10, 2015.

PANDEY, P.; SENTHIL-KUMAR, M. Plant-pathogen interaction in the presence of abiotic stress: What do we know about plant responses?. **Plant Physiology Reports**, v. 24, n. 4, p. 541-549, 2019.

QAIM, M. Role of new plant breeding technologies for food security and sustainable agricultural development. **Applied Economic Perspectives and Policy**, v. 42, n. 2, p. 129-150, 2020.

SMITH, V.; WESSELER, J. H. H.; ZILBERMAN, D. New plant breeding technologies: An assessment of the political economy of the regulatory environment and implications for sustainability. **Sustainability**, v. 13, n. 7, p. 36-87, 2021.

TESSEMA, G. L.; SEID, H. E. Potato bacterial wilt in Ethiopia: history, current status, and future perspectives. **PeerJ**, v. 11, p. e14661, 2023.

VERMA, K. K. et al. Recent trends in nano-fertilizers for sustainable agriculture under climate change for global food security. **Nanomaterials**, v. 12, n. 1, p. 173, 2022.

WANI, S. H. et al. Engineering salinity tolerance in plants: progress and prospects. **Planta**, v. 251, p. 1-29, 2020.

Artigo a ser submetido para publicação no periódico *Physiology and Molecular Biology of Plants* (PMBP).

O silenciamento do gene PHANTASTICA (*NbPHAN*) ligado a resposta ao déficit hídrico aumenta a susceptibilidade de *Nicotiana benthamiana* à *Ralstonia solanacearum*

Rafael L. R. Cabral¹; Marcela A. F. Demarque¹; Vinícius S. Fioresi¹; Bruno Regis L. Ferraz², Paulo Cezar Cavatte², Fernanda P. Bruckner³; Laiane S. Maciel¹; Márcia F. Ferreira¹; Newton Portilho Carneiro⁴, André da S. Xavier¹†.

¹Departamento de Agronomia, Universidade Federal do Espírito Santo/CCAEE, Alto Universitário, S/N, Guararema, Alegre, ES, 29500-000.

²Departamento de Biologia, Universidade Federal do Espírito Santo/CCAEE, Alto Universitário, S/N, Guararema, Alegre, ES, 29500-000.

³Departamento de Ciências Biológicas, Universidade do Estado de Minas Gerais/Unidade Ibiturite. Av. São Paulo, 3996, Vila Rosário, Ibiturite, MG. 32415-250.

⁴Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Milho e Sorgo. Rod MG 424 Km 45, Zona Rural - Sete Lagoas, MG, 35701-970.

† Autor correspondente: André da Silva Xavier

E-mail: andre.s.xavier@ufes.br

Título em inglês: Silencing of the PHANTASTICA (*NbPHAN*) gene associated to the responses to drought increases the susceptibility of *Nicotiana benthamiana* to *Ralstonia solanacearum*

RESUMO

As plantas estão sujeitas a inúmeros estresses abióticos e bióticos em virtude da evolução de patógenos, pragas e mudanças climáticas. Essas pressões podem ter um impacto considerável na produtividade de muitas espécies vegetais, sobretudo as cultivadas. Por essa razão, é vital aumentar a capacidade das culturas visando tolerância e resistência aos estresses. Na presente pesquisa, buscou-se aprofundar os conhecimentos pertinentes às interações entre as vias de respostas ao estresse biótico (murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum*) e abiótico (déficit hídrico). Inicialmente, afim de entender se um fator de transcrição (TF) Myb (*Phantastica*, gene *NbPHAN*) associado a resposta de tolerância ao déficit hídrico em *Nicotiana benthamiana* também teria contribuições nas respostas de resistência à fitobactéria *R. solanacearum*, desenvolvemos um sistema de genética reversa para induzir o silenciamento do gene-alvo através de VIGS (silenciamento pós-transcricional induzido por vírus). Validamos a função do gene *NbPHAN* em plantas de *N. benthamiana* no contexto da infecção por *R. solanacearum* utilizando a escala de notas para calcular o índice da murcha bacteriana. Ao final do experimento, identificamos que plantas não silenciadas (pTRV2::*GFP*) exibiram nota 3 da escala e todas as plantas silenciadas para *NbPHAN* foram consideradas mais suscetíveis a *R. solanacearum*, apresentando nota 4. Sabe-se que plantas silenciadas para *NbPHAN* são mais suscetíveis ao déficit hídrico e coerentemente em nossos achados observamos que o silenciamento do gene *NbPHAN* também aumentou a suscetibilidade das plantas a murcha bacteriana. Os estudos *in silico* sugerem que o efeito de maior susceptibilidade da doença em plantas silenciadas para o gene *NbPHAN* pode estar relacionado a regulação de genes relacionados à patogênese (*PR*), genes codificadores de proteínas com domínios conservados de *Lateral Organ Boundaries Domain* (LBD), genes das rotas do fitormônio ácido salicílico (SA) e do ácido jasmônico (JA). Paralelamente, em um segundo experimento, dois genótipos de tomate contrastantes para resistência a *R. solanacearum*, Hawaii 7996 (resistente) e Heinz 1706 (suscetível), foram submetidos à seca pelo tratamento com solução nutritiva contendo polietileno glicol (PEG) a 10% por um período de 28 dias, e ao final, foram avaliados quanto aos parâmetros fisiológicos indicativos de tolerância ao déficit hídrico. Nossos dados mostraram que o déficit hídrico reduziu o crescimento, a atividade fotossintética e a eficiência de conversão de água em biomassa em ambos genótipos, causando efeitos no rearranjo da arquitetura radicular e na distribuição de biomassa, sendo que o genótipo suscetível Heinz 1706 tolerou mais o déficit hídrico quando comparado ao genótipo resistente Hawaii 7996. Em resumo, nossa pesquisa revela uma associação significativa entre a presença de características de tolerância ao déficit hídrico e uma resposta positiva à infecção por *R. solanacearum* em plantas, no entanto, observamos que plantas com traços de resistência ao fitopatógeno não apresentam uma reação ao estresse hídrico. A realização de novas pesquisas relacionando os estresses de modo não individualizados são cruciais para melhor compreensão das suas interações, pois pouco se sabe sobre a complexidade dos elementos intermediários envolvidos, visando contribuir na formulação de novos cultivares simultaneamente resistentes e tolerantes aos estresses abióticos e bióticos de forma eficiente e duradoura.

PALAVRAS-CHAVE: Murcha bacteriana, Estresse abiótico, Estresse biótico, Déficit hídrico.

ABSTRACT

Plants are subject to many abiotic and biotic stresses due to the evolution of pathogens, climatic influences and climate change. These pressures have a specific impact on the productivity of many plant species, especially cultivated ones. For this reason, it is vital to increase crop capacity, tolerance and resistance to stress. In this research, we sought to deepen the knowledge pertinent to the interactions between the response pathways to biotic (bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*) and abiotic stress (drought). Initially, in order to understand whether a transcription factor (TF) Myb (*Phantastica*, *NbPHAN* gene) associated with the tolerance response to drought in *Nicotiana benthamiana* would also have contributions to resistance responses to the phyto bacterium *R. solanacearum*, we developed a reverse genetics system to induce silencing of the target gene through VIGS (virus-induced post-transcriptional silencing). We validated the function of the *NbPHAN* gene in *N. benthamiana* plants in the context of *R. solanacearum* infection using a rating scale to calculate the bacterial wilt index. At the end of the experiment, we identified that non-silenced plants (pTRV2::*GFP*) showed score 3 on the scale and all plants silenced for *NbPHAN* were considered more susceptible to *R. solanacearum*, showing score 4. It is known that plants silenced for *NbPHAN* are more susceptible to drought and consistently in our findings we observed that silencing the *NbPHAN* gene also increased the susceptibility of plants to bacterial wilt. In silico studies suggest that the effect of greater disease susceptibility in plants silenced for the *NbPHAN* gene may be related to the regulation of pathogenesis-related (PR) genes, protein-coding genes with conserved Lateral Organ Boundaries Domain (LBD), genes of the phytohormone salicylic acid (SA) and jasmonic acid (JA) pathways. In parallel, in a second experiment, two tomato genotypes contrasting for resistance to *R. solanacearum*, Hawaii 7996 (resistant) and Heinz 1706 (susceptible), were subjected to drought by treatment with a nutrient solution containing 10% polyethylene glycol (PEG) for over a period of 28 days, and at the end, they were evaluated for physiological parameters indicative of tolerance to water deficit. Our data showed that water deficit impairs growth, photosynthetic activity and water-to-biomass conversion efficiency in both genotypes, causing effects on the rearrangement of root architecture and biomass distribution, with the susceptible genotype Heinz 1706 tolerating more water deficit when compared to the resistant genotype Hawaii 7996. In summary, our research reveals a significant association between the presence of drought tolerance traits and a positive response to *R. solanacearum* infection in plants, however, we observed that plants with characteristics of resistance to the phytopathogen does not present an occurrence of water stress. Carrying out new research relating stresses in a non-individualized way is crucial for better understanding their interactions, as little is known about the complexity of the intermediate elements involved, contributing to the formulation of new cultivars that are simultaneously resistant and tolerant to abiotic and biotic stresses. efficiently and rigidly.

KEYWORDS: Bacterial wilt, Abiotic stress, Biotic stress, Drought.

1. INTRODUÇÃO

As mudanças climáticas e a evolução de fitopatógenos amplificam e potencializam as fontes dos estresses bióticos e abióticos afetando diretamente plantas susceptíveis e hospedeiras, causando barreiras em seu crescimento e rendimento resultando em grandes perdas em cultivos agrícolas (KURABACHEW; AYANA, 2016; FERREIRA et al., 2018; GUJI et al., 2019). Os estresses abióticos podem influenciar as interações planta-patógeno, alterando os níveis da resistência a organismos patogênicos, planta-praga e a competição com outras plantas, e ao inversamente, fitopatógenos também podem influenciar nas vias de resposta das plantas contra fatores abióticos (PANDEY et al., 2017).

As plantas adotam diversas estratégias para resistir e tolerar aos estresses simultâneos. Contra a déficit hídrico, regulam a condutância e fechamento estomático, equilibram a fotossíntese, reduzem o tamanho foliar e aumentam o tamanho radicular visando maior eficiência no uso da água (COHEN; LEACH, 2019). Em contrapartida, a infecção por patógenos geram a produção de complexos químicos e ativação de vias de sinalização como padrões moleculares associadas à patógenos (PAMP's), à danos (DAMP's), e imunidade desencadeada por efetores (ETI) (MOUSTAFA-FARAG et al., 2020).

Inúmeras espécies cultivadas frente ao cenário de mudanças climáticas têm apresentado uma queda produtiva relativa ao seu potencial total devido aos impactos ocasionados pelos estresses abióticos, como déficit hídrico, altas temperaturas e baixa qualidade de solo (SELEIMAN et al., 2021). O aumento nas emissões de CO₂ eleva as taxas de temperatura e resulta em aumento da evapotranspiração das plantas, intensificando a desidratação e debilitação nos episódios de seca (KISSOUDIS et al., 2014; FOYER et al., 2016). Em busca de mitigar esses cenários, novas técnicas e aprimoramento de genótipos conhecidos por serem resistentes aos estresses bióticos e/ou tolerantes a condições ambientais desfavoráveis são amplamente estudados (FULLANA-PERICÀS et al., 2018; GOWTHAM et al., 2020; MUTHONI et al., 2020; CONTI et al., 2022; LOPES et al., 2022; KRISHNA et al., 2022).

Assim como a seca, os estresses bióticos resultam em reduções significativas nas produções agrícolas. Olowe et al. (2022) relatam perdas superiores a 50% das culturas de tomate na África causado por fitopatógenos veiculados pelo solo como *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani*, *Sclerotium rolfsii* e algumas espécies de *Phytophthora*. Em culturas de gengibre no sudoeste da Etiópia, *R. solanacearum* foi responsável por gerar perdas de rendimento de até 100% nas lavouras, prejudicando diretamente os agricultores e afetando a

segurança alimentar (BENTI, 2023). Na Índia, apenas nas ilhas Andaman, a murcha bacteriana causa entorpecimento de 20 a 50% das perdas em cultivos agrícolas em solanáceas (SAKTHIVEL et al., 2016).

Nesse contexto, algumas doenças de plantas se destacam, incluindo a murcha bacteriana, causada por fitobactérias do complexo de espécies *Ralstonia solanacearum* (RSSC) que abrangem uma imensa variedade de isolados geneticamente distintos provocando doenças em mais de 250 hospedeiros pertencentes a 54 famílias botânicas (PRIOR et al. 2016). Com ampla distribuição geográfica, são patógenos de longa persistência em solo que infectam as plantas principalmente por ferimentos nas raízes, colonizando o tecido do xilema dos sistemas vasculares e provocando obstrução seguida de murcha, redução do crescimento e morte (LOWE-POWER et al., 2018). Desse modo, diversas pesquisas visam apoiar o desenvolvimento de táticas para gerenciar os impactos provocados por *R. solanacearum*.

O RSSC compreende uma vasta diversidade de ecótipos, classificados em quatro clados filogenéticos denominados como filotipos I, II (sub-clados IIA e IIB), III e IV, ocorrendo na Ásia, nas Américas, na África e Japão, respectivamente (POUSSIÉRE et al., 2000; SHARMA et al., 2022). Os pesquisadores separaram formalmente o complexo RSSC em três principais espécies: *R. pseudosolanacearum* – filotipos I e III; *R. solanacearum* – filotipo II e *R. syzygii* – filotipo IV (SAFNI et al., 2014). No Brasil, *R. solanacearum* é a espécie mais comum e supõe-se que o país é o centro de origem, mas além de *R. solanacearum*, também se encontra *R. pseudosolanacearum* do filotipo I (WICKER et al., 2012; SANTIAGO et al., 2017; LOPES; ROSSATO, 2018).

As descobertas de novos isolados do complexo RSSC crescem constantemente em todo o mundo. A infecção por *R. solanacearum* em plantas hospedeiras conduz a grandes perdas econômicas, sendo regiões quentes e úmidas as mais propícias para o desenvolvimento da doença. Em 2012, essa fitobactéria foi listada em segundo lugar como um dos agentes causais de uma das doenças mais destrutivas (MANSFIELD et al., 2012). Dentre a variedade de plantas hospedeiras afetadas, destacam-se as espécies da família *Solanaceae* que possuem grande importância nutricional e econômica, incluindo batata, pimentão, tomate, tabaco, berinjela, gengibre (GARCÍA et al., 2019; PAUDEL et al., 2020).

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) pertence à família *Solanaceae* e está entre uma das hortaliças mais cultivadas em todo o mundo. Em 2021, atingiu uma produção mundial de

aproximadamente 189 milhões de toneladas (FAO, 2021). Recentemente, a cultura do tomate alcançou nível histórico de comercialização e exportação, em 2016, avaliado em uma movimentação total de US\$ 8,5 bilhões, e ainda, é considerada um dos alimentos mais nutritivos, rico em vitamina A, vitamina C, vitamina E, potássio, fibra dietética, β -caroteno e licopeno (CAPOBIANCO-URIARTE et al., 2021). É uma planta cultivada em todo o planeta devido a sua característica de adaptabilidade a diversos tipos de ambientes, crescendo bem em temperaturas que variam entre 15-27°C, solos de diferentes composições, suportando também solos salinos e ácidos (KRISHNA et al., 2022), entretanto, são rigorosas quanto a irrigação e sensíveis à seca.

Em pesquisa com tomateiro, MacIntyre et al. (2022) investigaram e constataram que existe correlação entre a resposta a infecção por *R. solanacearum* e o estresse de déficit hídrico, destacando que as plantas possuem a assinatura de expressão gênica semelhante quando submetidas aos estresses, apontando possível mimetismo fisiológico entre estes. É plausível, uma vez que a obstrução causada por substâncias poliméricas extracelulares (EPS) causa obstrução nos vasos do xilema de plantas infectadas e impossibilitam a distribuição normal de água. Ainda, evidenciaram que diversos genes expressos em condições de déficit hídrico também eram induzidos pela infecção de *R. solanacearum* em plantas.

Dentre milhares de genes que mediam a resposta aos estresses bióticos e abióticos, muitas famílias de fatores de transcrição (TF) são reguladores centrais da expressão gênica, modulando uma série de funções e produtos proteicos a jusante, incluindo a produção de hormônios, respostas a fatores ambientais, diferenciação celular e desenvolvimento de órgãos em plantas (NATH et al., 2019). Além disso, fatores de transcrição das famílias WRKY, MYB, NAC e bZIP por exemplo, estão associados a tolerância aos estresses bióticos e abióticos em plantas modelo e cultivadas (BAILLO et al., 2019).

O fator de transcrição *Phantastica* (PHAN) está presente em homologia em mais de 50 espécies e 22 famílias de plantas diferentes, incluindo solanáceas (KAZEMIAN et al., 2020). Localizado no núcleo celular, este gene de éxon único pertence à família de fatores de transcrição de domínio MYB altamente conservados que codificam uma proteína de 51 a 53 aminoácidos contendo de uma a quatro repetições imperfeitas, sendo *NbPHAN* classificada com duas repetições MYB tipo R2R3 (DUBOS et al., 2010). Essa subfamília R2R3-MYB participa do metabolismo primário e secundário, crescimento, diferenciação celular e respostas aos estresses bióticos e abióticos em plantas (STRACKE et al. 2001; MATUS et al., 2008).

Huang et al. (2013) identificaram um novo órtologo de *Phantastica* em plantas de *Nicotiana benthamiana*. Ainda, aplicando o método de VIGS, descobriram que a supressão deste fator de transcrição desencadeava suscetibilidade em relação ao déficit hídrico independente de ácido abscísico (ABA), estabelecendo pela primeira vez essa função entre genes da família MYB.

Além de estudos a nível gênico, novos estudos visando a compreensão dos mecanismos pelos quais as plantas regulam as respostas fisiológicas mediante aos estresses são ferramentas importantes. Por exemplo, linhagens contrastantes para a resistência a murcha bacteriana, o tomateiro Heinz 1706 e Hawaii 7996 usados neste trabalho, permite investigar a presença ou não de *cross-talk* entre as vias de respostas mediante a ambos tipos de estresses.

Atualmente, busca-se compreender mais a fundo sobre as interações genéticas e fisiológicas que desencadeiam as vias de respostas aos estresses bióticos e abióticos, desta vez, investigando as semelhanças e diferenças entre as respostas aos diferentes estresses, tanto déficit hídrico quanto infecção por *R. solanacearum*. Portanto, este trabalho teve como objetivo identificar a correlação entre o estresse abiótico de déficit hídrico e biótico de murcha bacteriana por meio de plantas hospedeiras de *N. benthamiana* infectadas com *R. solanacearum* e suprimidas para o gene *Phantastica* que opera em cascata de sinalização de modo ABA-dependente, a fim de investigar possível sobreposição de vias de resposta e identificar e caracterizar os impactos decorrentes do déficit hídrico em genótipos de características contrastantes em relação à resistência à murcha bacteriana, com objetivo subjacente de determinar se existe um possível *cross-talk* entre vias de respostas frente a esses estresses em plantas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local dos experimentos e análises

A presente pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Biotecnologia Agrícola e Ambiental (BIOTA), Laboratório de Tecnologia do DNA recombinante (TDR) e Laboratório de Botânica (LaBot) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), localizado no município de Alegre-ES em parceria com o Núcleo de Biologia Aplicada (NBA) da Embrapa Milho e Sorgo, localizado no município de Sete Lagoas-MG.

2.2. Análise de genômica funcional: plantas de *N. benthamiana* silenciadas para o gene *NbPHAN* e infectadas com *R. solanacearum*

2.2.1 Material vegetal, linhagens bacterianas e condições de crescimento

Plantas de *Nicotiana benthamiana* foram semeadas para germinação em vasos plásticos (430 cm³) com mistura de substratos comerciais Carolina Soil (Turfa de sphagnum, vermiculita, calcário e fertilizante NPK) e Terral Solo (Turfa, esterco, superfosfato e calcário) na proporção 1:1. O transplântio sucedeu-se com plantas de três semanas de idade com uma planta por vaso. O material vegetal foi mantido em câmaras de crescimento com temperatura, umidade e foto período controlados, 25°C ±3°C, 65% ±5% e 16 horas claro/8 horas escuro, respectivamente. Plantas submetidas à 22°C após atingir 5 semanas de idade, cinco dias antes de realizar a agroinfiltração.

Nesta investigação foram utilizadas as linhagens bacterianas de *Escherichia coli* DH5α e *Agrobacterium tumefaciens* C58CI procedente da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e *Ralstonia solanacearum* B73 (fitopatogênica) coletada no município de Afonso Cláudio/ES (20°12'27" S 41°7'29" O) a partir de plantas de tomate com sintomas de murcha bacteriana mantida na coleção do Laboratório de Biotecnologia Agrícola e Ambiental (BIOTA) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES – Campus de Alegre). Os isolados bacterianos de *E. coli*, *A. tumefaciens* e *R. solanacearum* foram cultivados em placas de Petri com meio de cultura sólido Luria Bertani (LB), YEP (Extrato de Levedura Peptona) + agentes de seleção: Rifampicina (25 µg/mL) + Gentamicina (30 µg/mL) e CPG (Caseína Peptona Glucose) + agente de seleção: TTC 1% (Cloroeto Trifenil Tetrazólico), respectivamente e mantidas em estufas à 28°C. Cultivos bacterianos em meio contendo TTC permitem a identificação visual das colônias com alta taxa de produção exopolissacarídeos (EPS). O isolado de *R. solanacearum* B73 também foi confirmado molecularmente.

2.2.2 Análise *in silico* e desenho de oligonucleotídeos

A sequência gênica de *NbPHAN* (FR878011) de éxon único e tamanho de 1.086 pares de bases (pb) foi obtida com auxílio do programa BLASTn (ALTSCHUL et al., 1990) e a busca por regiões candidatas (400 pb) consideradas ideais para o silenciamento gênico foi concluída utilizando o programa SGN VIGS Tool (FERNANDES-POZO et al., 2015), evidenciando-se o nível de especificidade do silenciamento e evitando genes não-alvos. Os oligonucleotídeos foram desenhados e selecionados com auxílio do software *Primer's Tools* da plataforma online NCBI e *OligoAnalyzer Tool* da *Integrated DNA Technologies* (IDT) de acordo com os parâmetros descritos por Huang et al. (2013). Ainda, nos oligonucleotídeos foram inseridos sítios das enzimas de restrição *Bam*HI e *Xho*I selecionados com auxílio da ferramenta online WebCutter 2.0 (MAX HEIMAN, 1997), acrescentando os nucleotídeos (nt) âncora para integral eficiência de clivagem: 3nt e 4nt, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1: Sequências de oligonucleotídeos desenvolvidos e usados em PCR, RT-PCR e RT-PCR quantitativo.

| <i>Primers</i> | Sequência | Início | Fim | Tamanho (pb) | Amplicon (pb) | Tm(°C) | Reação | Autor |
|----------------|--|---------------|------------|---------------------|----------------------|---------------|---------------|---------------------|
| NbPHANS | F: TCTAGAACTACCTCAAACCAGGGAT | 152 | 171 | 19 | 345 | 56 | PCR | Huang et al. (2013) |
| | R: GGATCCAGGAAGAAGAGTTTGTGG | 479 | 497 | 18 | | 60 | | |
| NbPHAN-VIGS | F: GTAGGATCCTGGCGATCTGAAGAGGATGC | 19 | 39 | 20 | 367 | 65 | PCR | Esse artigo |
| | R: GTCGCTCGAGTGTGGTCGTATTTCCCTCGT | 365 | 386 | 21 | | 66 | | |
| RT-qNbPHAN1 | F: GGCTACTTCTAACGGAGGTTTC | 444 | 466 | 22 | 122 | 58 | RT-qPCR | Esse artigo |
| | R: CAGATGGAGATGGTGATCTGAC | 544 | 566 | 22 | | 58 | | |
| RT-qNbPHAN2 | F: CAGATCACCATCTCCATCTGTG | 546 | 568 | 22 | 103 | 58 | RT-qPCR | Esse artigo |
| | R: TTCAGGTCCTCTATCTGTCTGT | 627 | 649 | 22 | | 56 | | |
| RT-qNbPHAN3 | F: AAGTTAGGGAGAAGATGGAGGA | 845 | 867 | 22 | 109 | 56 | RT-qPCR | Esse artigo |
| | R: CCTGCTAGTTGCTCCTTGTATT | 932 | 954 | 22 | | 56 | | |
| pTRV2P1 | F: GGTCCTGCTGACTTGATGGA | 600 | 620 | 20 | 316 | 57 | RT-PCR | Esse artigo |
| | R: CCGTTGTGTTTGGATTCGCA | 896 | 916 | 20 | | 55 | | |
| pTRV2P2 | F: CGCTTCAGCGTTCAAGAGAC | 833 | 853 | 20 | 331 | 57 | RT-PCR | Esse artigo |
| | R: ACGTATCGGACCTCCACTCG | 1.144 | 1.164 | 20 | | 60 | | |

Fonte: elaborado pelo autor (2023)

2.2.3 Amplificação do fragmento parcial de *Phantastica*

Inicialmente, coletou-se amostras de tecido vegetal de folhas de *Nicotiana benthamiana* para extração de RNA total e obtenção do DNA complementar (cDNA) molde seguida da amplificação da sequência alvo em *NbPHAN* por reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa (RT-PCR). O RNA total foi extraído com kit SV Total RNA Isolation System (incluindo tratamento com DNase) e as bibliotecas de cDNA sintetizadas com uso do kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription, de acordo com as respectivas recomendações dos fabricantes (Promega® e Invitrogen®). O rendimento de RNA foi calculado com base em absorbância a 260nm (A260) e as razões de A260/A280 e A260/A230 foram medidas com objetivo de avaliar a pureza de RNA com NanoDrop™₂₀₀₀. Avaliou-se a integridade do RNA a partir das bandas de rRNA 26S e 16S em gel de formaldeído-agarose (1,0%) após eletroforese, coloração com 1: 20.000 GelRed®.

Um fragmento parcial de *NbPHAN*, de tamanho igual a 367 pb foi amplificado por meio de RT-PCR, para tal procedimento utilizou-se um volume de reação de 20 µl contendo 2 µl de cDNA molde [50ng/µl], 4 µl do kit *5x HOT FIREPol Master Mix*® (Solis Biodyne), 250 nM do *primer* direto NbPHANF e reverso NbPHANR. Os oligonucleotídeos desenhados neste estudo foram validados quanto a amplificação aplicando-se gradiente de temperatura de anelamento (Ta) entre 50~60 °C ± 2 °C.

Parâmetros da reação otimizada: desnaturação a 95 °C por quinze minutos (*HOT Started*); ciclo: desnaturação de 95 °C por 30 segundos, seguido de anelamento de 58 °C por 30 segundos e extensão 72 °C por 30 segundos, no total de 35 ciclos; extensão final 72 °C por dez minutos e 4 °C. Uso do termociclador TC-9639 (Loccus®). Os fragmentos foram visualizados em gel de agarose a 1,5%, com intercalante GelRed® (1x por amostra) e marcador de peso molecular (Ladder) de 1kpb após eletroforese, a 100 volts. Ao fim do processo, observou-se os resultados com uso do fotodocumentador (L-Pix Touch 20×20 – Loccus®) fotografados sob luz UV.

2.2.4 Vetores TRV, clonagem e cassetes gênicos

Vetores virais baseados no genoma bipartido do *Tobacco rattle virus* (pTRV1 e pTRV2) foram utilizados nesse estudo para indução do silenciamento através do método de VIGS. A princípio, efetuamos a ligação entre a sequência-alvo de *NbPHAN* e o vetor de entrada pGEM-Teasy com uso do kit pGEM-Teasy Easy Vectors Systems, seguindo as recomendações do fabricante (Promega®). Em seguida, células competentes de *Escherichia coli* linhagem DH5α

obtidas de acordo com Sambrook & Russell (2001) foram transformadas com a construção pGEMT::*NbPHAN* por choque térmico (CALVETE, et al. 2015), cultivadas em meio LB com antibiótico ampicilina [100 ug/mL], solução seletora (X-GAL [5,33 mg/mL] + IPTG [0,66mM]) e incubadas a 37°C por 24 horas.

As colônias transformadas de *E. coli* carregando a construção pGEMT::*NbPHAN*, foram selecionadas e indicadas pela coloração branca foram repicadas em meio LB líquido com antibiótico seletor e colocadas em agitador (180 rpm) durante a noite. A construção gênica foi extraída foi conduzido por meio do kit de purificação de DNA plasmidial, de acordo com as recomendações do fabricante (Ludwig®). O fragmento-alvo (inserto)foi liberado da construção gênica pGEMT::*NbPHAN* através da clivagem dupla com as endonucleases *BamHI/XhoI* e subclonado em pTRV2::Empty com uso do kit Anza™ T4 DNA Ligase Master Mix (Invitrogen®).

A transformação com as construções pTRV2::*NbPHAN*, pTRV2::*PDS* e pTRV2::*GFP* (BRUCKNER et al., 2017) sucedeu-se em células competentes de *A. tumefaciens* C58CI por choque térmico (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Em seguida, realizou-se o plaqueamento em meio de cultura YEP (Extrato de Levedura + Peptona) acrescido dos antibióticos canamicina [50 ug/mL] / rifampicina [25 ug/mL] e incubadas a 30°C em estufas por 48 horas. Após o crescimento, colônias transformadas foram repicadas em meio YEP líquido e colocadas em agitador a 180 rpm por 48 horas para posterior agroinfiltração.

A validação do cassete gênico pTRV2::*NbPHAN* foi realizada por análise de restrição com endonucleases, PCR utilizando oligonucleotídeos específicos e sequenciamento. Os derivados de pTRV2 com os genes *PDS* e *GFP* já tinham sido confirmados por análises de restrição, PCR e sequenciamento e são provenientes da Universidade Federal de Viçosa (UFV/MG). Todos os procedimentos supradescritos foram realizados na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas/MG.

2.2.5 Silenciamento gênico de *Phantastica* mediado por *A. tumefaciens* pelo método de VIGS

Mediante o método de infiltração foliar descrito por Li (2011) e adaptado por Yu & Macho (2021) conduzimos as agroinfiltrações para a indução de silenciamento gênico pós-transcricional pelo método de VIGS. Cepas de *A. tumefaciens* C58CI transformadas com pTRV1 ou pTRV2-Empty e suas variações (pTRV2::*NbPHAN*, pTRV2::*GFP* e pTRV2::*PDS*)

foram ressuspensos em solução de infiltração (10mM de MgCl₂, 100mM de MES e 200µM de acetoseringona, pH 5,5). Posteriormente, a solução de infiltração com agrobactérias contendo pTRV1 foi misturado na proporção de 1:1 com as diferentes soluções de infiltração com agrobactérias contendo pTRV2 e suas variações supracitadas. Logo, as suspensões foram inoculadas nas folhas de base de plantas de *N. benthamiana* com 5 semanas de idade por infiltração foliar usando seringa sem agulha. As plantas permaneceram em B.O.D para crescimento e disseminação viral e foram avaliadas a partir de uma semana pós-agroinfiltração quanto ao silenciamento gênico.

2.2.6 Severidade da murcha bacteriana em plantas de *N. benthamiana* silenciadas e não silenciadas para *NbPHAN*

Em ensaio de patogenicidade, raízes de *N. benthamiana* com 45 dias de idade agroinfiltradas com as construções contendo o gene exógeno *GFP* (não silenciadas) e silenciadas para o gene-alvo *NbPHAN* foram feridas em 4 pontos com distância média de 3 centímetros do caule com auxílio de uma espátula. Em seguida, uma suspensão bacteriana com densidade ótica ajustada para OD₆₀₀ = 0,15 (concentração aproximada de 1x10⁸ UFC/mL⁻¹) de *R. solanacearum* B73 foi inoculada nos pontos feridos (3ml/ponto) por imersão e a severidade da doença avaliada todos os dias durante 10 dias totais.

Então, empregamos os índices de escala de notas entre 0 e 4: 0 – sem murcha; 1 – 1~33% de folhas murchas; 2 – 34~66% de folhas murchas; 3 – 67~99% de folhas murchas; 4 – completamente murchas (NAKANO et al., 2017). Os valores de severidade da murcha bacteriana obtidos pela escala de notas foram usados no cálculo de índice da doença (%), submetidos à análise de variância e teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando o programa R.

2.2.7 RT-PCR e RT-PCR quantitativo.

O RNA total foi extraído de plantas infectadas com TRV (RNA1 e RNA2), agroinfiltradas com as construções contendo o gene exógeno *GFP* (não silenciadas) e silenciadas para o gene-alvo *NbPHAN*, para posterior síntese de moléculas de cDNA, conforme descrito no item 2.3. O cDNA molde foi utilizado para confirmar a infecção sistêmica em folhas não-infiltradas de *N. benthamiana*, utilizando os oligonucleotídeos pTRV2F1 (5' GGTCCCTGCTGACTTGATGGA 3') e pTRV2R1 (5' CCGTTGTGTTTGGATTCGCA 3') em reações de RT-PCR seguindo os parâmetros de reação supracitados também no item 2.3.

Em análise de expressão por qRT-PCR, reações com 10 µL totais (2 µl – cDNA, 5µl PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix – Applied Biosystems™ e 400 nM do *primer* direto qPCR-NbPHANF2 e reverso qPCR-NbPHANR2) foram elaboradas em equipamento LightCycler® 96 (Roche). Parâmetros reação: incubação a 50°C por 2 minutos, 95°C por 2 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos seguidos de 60°C por 1 minuto. Ao final, foi realizado Melt-curve com 50-95°C incrementando 0,5°C for 10 segundos. Para gene referência utilizou-se GAPDH de acordo com Huang et al. (2013) e as análises de expressão diferencial foram feitas pela norma de $2^{-\Delta\Delta ct}$.

2.2.8 Similaridade de sequências e análise de redes complexas das interações proteicas

Usamos a sequência de *NbPHAN* descrito por Huang et al. (2013) em consultas na plataforma NCBI e com auxílio do programa BLASTn (ALTSCHUL et al., 1990) buscamos sequências semelhantes. Avaliamos as taxas de identidade da sequência (I) e os valores do E-value (E), assumindo potenciais sequências-alvo com os valores de $I \geq 98\%$ e $E \leq 0$, respectivamente.

Utilizando os dados fornecidos pela plataforma online STRING referente a sequência mais próxima em similaridade selecionada *ASI-Like – Nicotiana tabacum* (NCBI ID: 107829769) e com a assistência do software Cytoscape, foi realizada uma investigação mais completa sobre as interações putativas com outras proteínas e redes complexas foram esboçadas. O primeiro grupo de interações putativas com conexões mais próximas foram usadas em nossas análises.

2.3. Análise fisiológica: genótipos de tomateiro contrastantes para a resistência a *R. solanacearum* submetidos ao déficit hídrico

2.3.1. Genótipos e condições de crescimento vegetal

Mudas inteiras dos genótipos de tomate (*Solanum lycopersicum*) Hawaii 7996 e Heinz 1706 resistente e suscetível a murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum*, respectivamente, foram utilizadas nos bioensaios. As sementes dos genótipos utilizados nesse estudo foram fornecidas pela Embrapa-Cenargen. As plantas foram cultivadas em bandejas de poliestireno (7ml/célula) com substrato comercial Carolina Soil® (Turfa de sphagnum, vermiculita, calcário e fertilizante NPK). Após atingirem o estágio da primeira folha verdadeira

(aproximadamente 10 dias pós-germinação), os tomateiros foram transplantados em vasos de plástico de volume igual a 430ml, na proporção 1 planta/vaso com o mesmo substrato.

A irrigação foi feita utilizando-se solução nutritiva kit flex diluída em água destilada de acordo com as recomendações do fabricante (PLANTPAR[®]), composta pelas seguintes substâncias (valores de solubilização em água): 8% – N; 8% – P; 30% – K; 3% – S; 1% – Mg; 0,14% – Fe; 0,04% – B; 0,04% – Mn; 0,03% – Cu; 0,019% – Zn; 0,009% – Mo; 0,006% – Ni; 0,002% – Co; 12% – Mg (NO₃)₂ e 20% – Ca(NO₃)₂. As plantas foram mantidas em sala de crescimento, sob as condições controladas: temperatura igual a 25°C ± 4°C, umidade 60% ± 5% e fotoperíodo de 18 horas claro/8 horas escuro. Um total de 18 mudas de cada genótipo com 16 dias de idade foram selecionadas e padronizadas de acordo com o tamanho e desenvolvimento, visando a homogeneidade.

2.3.2. Capacidade de campo, experimentação e indução ao déficit hídrico

Para mensurar a capacidade de campo, o solo de um total de 36 plantas foi irrigado até a saturação com água de torneira. Em seguida, o peso de todas as plantas foi medido com balança de precisão (modelo SHI-UX-6200H) a cada 12 horas até terminar o extravasamento por gravidade, e assim, foi definido o valor referência do solo na capacidade de campo máxima, definida pelo peso de 250 gramas por amostra.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), e cada genótipo foi dividido em três tratamentos com seis repetições: primeiro tratamento foi colhido para realizar a medida de massa seca ao início do experimento; segundo foi definido como grupo controle, sendo irrigado a cada 24 horas com solução nutritiva normalmente; e terceiro foi definido como grupo seca, permanecendo irrigado a cada 24 horas com solução nutritiva com potencial hídrico reduzido para induzir ao déficit hídrico. É importante ressaltar que a irrigação obedeceu a perda do peso durante as 24 horas subjacentes, tendo como referência o peso inicial na capacidade de campo máxima (250g). Por exemplo, quando uma repetição experimental perdia 40 gramas em 24 horas, adicionava-se 40 ml de solução de irrigação.

Para indução ao déficit hídrico, utilizamos a mesma solução nutritiva com adição de 10% de polietilenoglicol (PEG) 6000 ppm (partes por milhão), uma vez que PEG diminui drasticamente o potencial hídrico da água e dificulta a absorção das plantas pelas raízes. A aplicação de PEG em experimentos de indução a seca são bem relatados (NAVEED et al.,

2019; ABDEL-GHANY et al., 2020; BASAL et al., 2020; MAHPARA et al., 2022).

2.3.3. Avaliação dos fenótipos e parâmetros fisiológicos

As plantas foram avaliadas quanto ao fenótipo todos os dias a partir do início da irrigação controlada com solução nutritiva somado a PEG, visando observar e quantificar quaisquer alterações informativas. Todos os valores brutos obtidos individualmente para cada repetição experimental foram usados para gerar um valor de média e em seguida no cálculo das estimativas estatísticas para os parâmetros fisiológicos estudados.

Com a finalidade de medir o teor relativo de água (TRV), após 25 dias de experimentação, foi coletada a segunda folha verdadeira de todas as plantas as 6 horas da manhã. Logo, foram pesadas (com desconto do pecíolo) para obter o peso fresco (PF) seguido de imersão em água durante 12 horas em câmara escura para mensurar o peso máximo (PM). Posteriormente, as amostras secaram em estufa a 65°C e o valor do peso seco (PS) foi obtido. O TRV foi calculado a partir da fórmula $TRA = (PF-PS) / (PM-PS)$.

Os dados foram obtidos a partir do bioensaio após 26 dias corridos, sendo estimados entre 9h e 12h da manhã. Com auxílio do sistema de fotossíntese portátil LI-6400/XT (LI-COR®), avaliamos 11 dentre um total de 19 parâmetros fisiológicos estudados, considerando os seguintes: fotossíntese (A) ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática (GS) ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), CO_2 intracelular ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ ar}$), relação fluorescência variável (Fv) por fluorescência máxima (Fm) (Fv/Fm), eficiência fotoquímica real do fotossistema II (PhiPS2), taxa aparente de transporte de elétrons (ETR) ($\mu\text{mol e}^- \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), respiração ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e taxa de transpiração (E) ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$). A partir desses dados coletados também foi calculado as relações A/E, A/GS e A/ETR.

Ao fim do bioensaio (42 dias pós-germinação), todas as plantas foram colhidas e a altura (cm) e diâmetro do caule (mm) foram aferidas anteriormente a divisão em raiz, caule e folha. Em sacos de papel, todas as amostras secaram em estufa a 65°C. Em seguida, obteve-se os valores dos parâmetros restantes, como: a massa seca total (g), o incremento de biomassa (massa seca final - massa seca inicial do experimento) (g), fração de massa da raiz (FMR = massa da raiz/massa total da planta) (g), caule (FMC = massa do caule/massa total da planta) (g), folhas (FMF = massa das folhas/massa total da planta) (g) e eficiência do uso da água (EUH = incremento da biomassa / (soma total de água perdida da planta/1000) (g / L).

2.3.4. Análises estatísticas

Para melhor análises dos dados, foram realizados *outliers* eliminando os valores destoantes (mínimo e máximo) dentro de cada parâmetro medido em cada tratamento. De um total de 6 amostras experimentais, os valores de 4 amostras de cada tratamento foram adotados para as análises estatísticas. Então, os dados foram submetidos aos testes de média (teste-t de Student) e a análise de variância (ANOVA) a 5% de probabilidade, com o objetivo de comparar os efeitos do déficit hídrico nos dois genótipos (Hawaii 7996 e Heinz 1706) contrastantes para a resistência a *R. solanacearum*.

3. RESULTADOS

3.1. Análise *in silico* e Clonagem parcial do gene *Phantastica* de *N. benthamiana*

O gene *Phantastica* (*NbPHAN*) em *N. benthamiana* está localizado no cromossomo 12, possui éxon único e codifica um fator de transcrição de 361 aminoácidos. Exibe domínio C-Terminal e domínio principal MYB de ligação ao DNA com duas repetições (R2R3-MYB) na porção N-Terminal, responsável por participar de redes regulatórias que controlam o desenvolvimento, metabolismo e as respostas a estresses bióticos e abióticos (Figura 1A).

Estudos do gene *NbPHAN* em *N. benthamiana* são recentes, sendo importante definir novas regiões parciais que aumentem a eficiência do silenciamento gênico pelo método de VIGS eliminando regiões com potencial de silenciamento de genes não-alvo (*off-targets*), otimizando o processo. Diante disso, um novo *target* de 367 pb foi definido para *Phantastica* em *N. benthamiana* para uso na metodologia de VIGS.

A sequência parcial foi amplificada por PCR e visualizada nitidamente em gel de agarose. Em seguida, a região-alvo clonada em pGEM-T e subclonada em pTRV2 para obtenção do cassete gênico destinado ao silenciamento de *NbPHAN* foram avaliadas e confirmadas em reações de PCR tendo como DNA-molde os plasmídeos introduzidos em *E. coli* e *A. tumefaciens* (Figura 1B). Ainda, reações de clivagem e sequenciamento também foram utilizadas para confirmação.

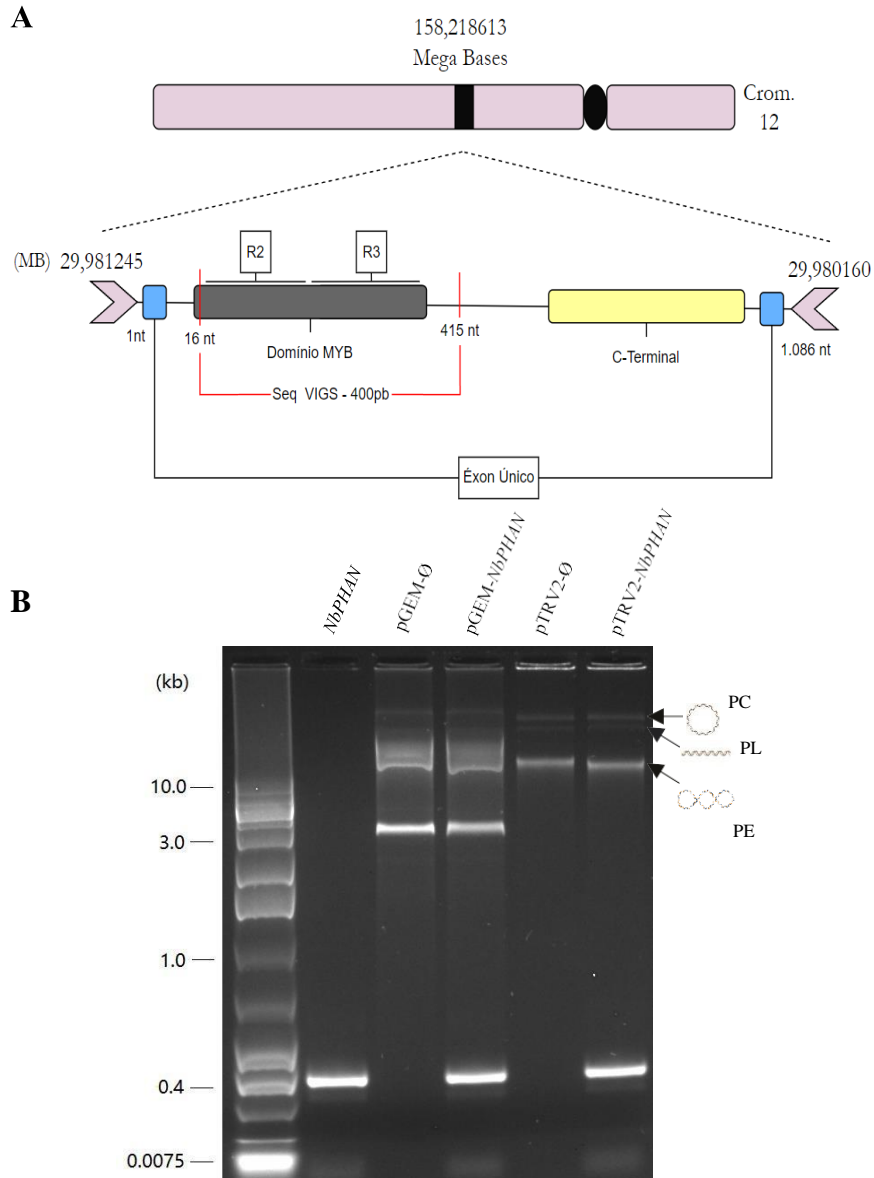


Figura 1. Análise *in silico*, seleção de região-alvo e clonagem do gene *Phantastica* em *Nicotiana benthamiana* (*NbPHAN*) para indução do silenciamento gênico. (A) Localização genômica e estrutura do gene *NbPHAN* e região-alvo selecionada. (B) Confirmação da clonagem e subclonagem de *NbPHAN* em pGEM-Teasy e em pTRV2, respectivamente. Plasmídeo circular (PC), linear (PL) e enovelado (PE) também são representadas. Fonte: elaborado pelo autor (2023)

3.2. Silenciamento gênico de *Phantastica* utilizando VIGS em *N.benthamiana*

Todas as construções usadas no bioensaio foram confirmadas por meio da PCR amplificando um fragmento de aproximadamente 367 pb usando como *template* os plasmídeos extraídos de *A. tumefaciens* antes da agroinfiltração (Figura S1). Após a co-agroinfiltração de suspensões bacterianas de C58CI contendo pTRV1 e os cassetes de silenciamento pTRV2

(Figura 2A), as plantas foram avaliadas diariamente a partir de uma semana pós-agroinfiltração e os primeiros sintomas do fotobranqueamento de folhas induzidos pelo início do silenciamento do controle fenotípico *PDS* foi observado. A indução do silenciamento do gene *PDS* foi constatada duas semanas pós-agroinfiltração para todas as plantas silenciadas, e com isso, assumiu-se que todas as plantas também estavam efetivamente silenciadas para o gene *NbPHAN* (Figura 2B).

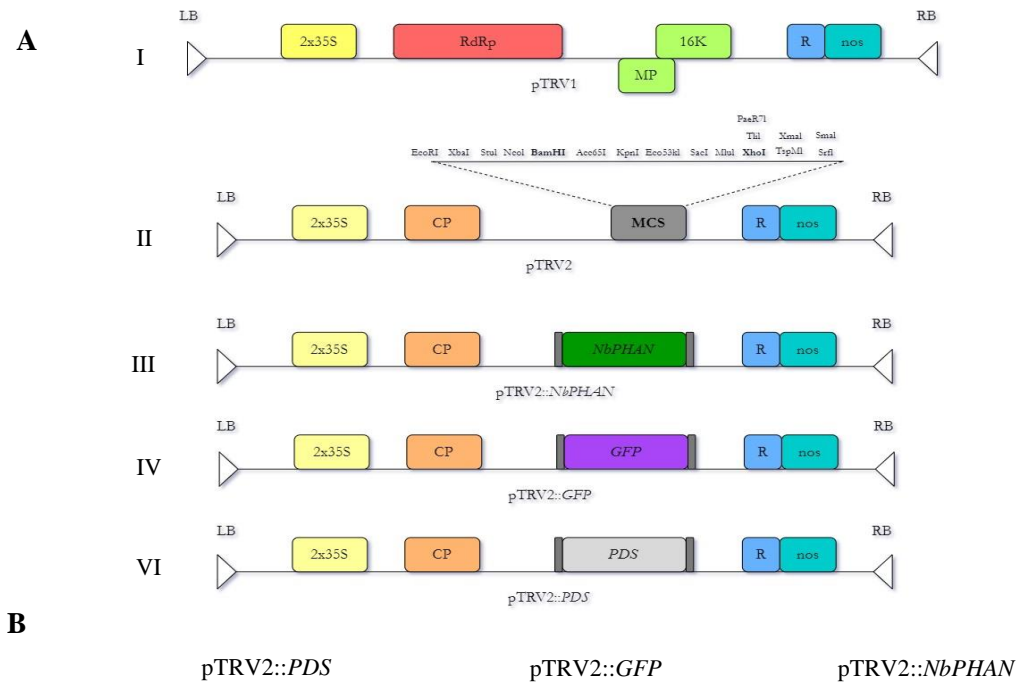


Figura 2. Vetores virais indutores de silenciamento e fenótipo de fotobranqueamento estabilizado em *N. benthamiana*. (A) Mapa linear dos cassetes gênicos pTRV1::*Empty* (I - 6.791 pb), pTRV2::*Empty* (II - 9.663 pb), pTRV2::*NbPHAN* (III - 10.063 pb), pTRV2::*GFP* (IV - 10.377 pb) e pTRV2::*NbPDS* (VI - 9.904 pb). Promotor duplo 2x35S do *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) em amarelo, em pTRV1 versões moleculares das proteínas de replicação RdRp (134 e 194 kDa) em vermelho, proteína de movimento MP (29 kDa) e proteína rica em cisteína CR-16kDa em verde, em pTRV2, a proteína capsidial CP (22,3 kDa) em laranja, sítio múltiplo de clonagem (MCS)

em cinza, ribozima de auto-clivagem R e terminador nos (Nopalina sintase) em azul. O LB representa o bordo esquerdo e o RB o bordo direito do T-DNA. (B) Imagem ilustrativa do fenótipo de silenciamento PTGS de *NbPDS*, perceptível visualmente (fotobranqueamento) e estabilizado em plantas de *N. benthamiana*. Plantas de *N. benthamiana* não silenciadas (pTRV2::*GFP*) e silenciadas para *NbPHAN*, respectivamente, sem detecção visual de alterações fenotípicas nas plantas silenciadas para *NbPHAN* com 10 dias pós-agroinfiltração. (Faixa da escala =2cm).

Fonte: elaborado pelo autor (2023).

Plantas com sete semanas de idade começaram a expressar o fenótipo de silenciamento gênico para *NbPHAN* quando comparado a plantas controle, ao detectar folhas exibindo má formação foliar e floral (Figura 3A) e conseqüentemente menor taxa de crescimento e desenvolvimento. Devido a característica dessa má formação no sentido dorso-ventral, denomina-se dorsoventralidade. A análise de RT-qPCR confirmou o silenciamento gênico de aproximadamente 60% do gene *Phantastica* em *N. benthamiana* quando comparado com a planta controle, momento anterior à inoculação de *R. solanacearum* (Figura 3B).

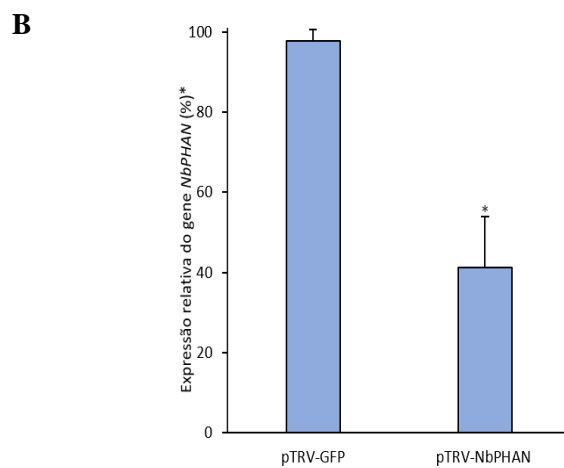
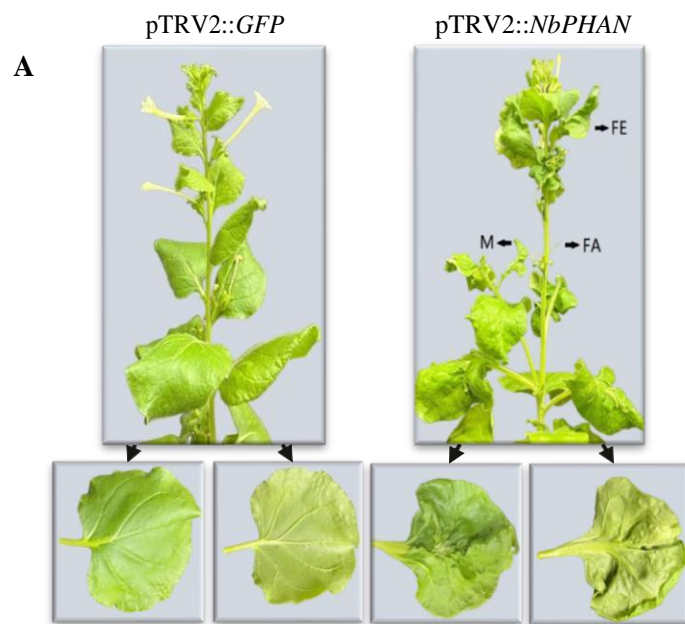


Figura 3. Plantas adultas de *N. benthamiana* manifestando alterações fenotípicas associadas ao silenciamento gênico de *NbPHAN* e confirmação do silenciamento por RT-qPCR (50 dias pós-agroinfiltração). (A) Imagem ilustrativa de uma planta controle (C-), *NbPHAN* não silenciado (pTRV2::*GFP*), exibindo fenótipo idêntico a planta não agroinfiltrada e planta *NbPHAN*-silenciada (pTRV2::*NbPHAN*) com distúrbios no desenvolvimento de folhas e flores (perda da dorsoventralidade). As setas indicam as porções adaxial e abaxial das folhas, nessa mesma ordem. Folhas estreitas (FE), folhas agulhas (FA) e folhas mosaico (FM) também são representadas. (B) Expressão relativa do gene *NbPHAN* em plantas de *N. benthamiana* agroinfiltradas com as construções pTRV2::*GFP* e pTRV2::*NbPHAN*, respectivamente. Gene normalizador *NbGAPDH* ($p \leq 0,05$) em reação de RT-qPCR pelo método $2^{-\Delta\Delta ct}$.

Fonte: elaborado pelo autor (2023).

Esse nível de silenciamento é justificado pela idade das plantas no momento da coleta, visto que o método de VIGS é caracterizado por ser transiente, ou seja, aos poucos a planta recupera sua taxa normal de transcritos e o gene-alvo volta a ser expresso em níveis naturais. Entretanto, foi possível observar uma diferença significativa na expressão gênica entre plantas controle (pTRV2::*GFP*) e plantas tratamento, sendo assim, inoculou-se *R. solanacearum* após confirmação molecular do isolado.

A infecção pelo *Tobacco rattle virus* (TRV) também foi confirmada por RT-PCR semi-quantitativa, utilizando oligonucleotídeos específicos para sequência do RNA2 do TRV (Tabela 1) e cDNA de plantas que foram co-inoculadas com pTRV1 e pTRV2 (Figura S. 2). O RNA 1 do vírus possui uma ORF denominada MP que codifica uma proteína de movimento essencial para disseminação viral de forma sistêmica e ainda codifica a polimerase viral, essencial para replicação do genoma e acúmulo dos RNAs virais. Por isso, consideramos que o acúmulo e movimento do RNA2 detectado através da amplificação da sequência de pTRV2 corrobora com a co-existência pTRV1 em plantas co-inoculadas de *N. benthamiana*.

3.3. Efeito do silenciamento de *NbPHAN* na interação *R. solanacearum*-*N. benthamiana*

Durante a infecção bacteriana, em comparação ao grupo de plantas silenciadas não inoculadas, as plantas silenciadas para *NbPHAN* e inoculadas com *R. solanacearum* exibiram diferenças morfológicas foliares e em relação ao padrão de ramificações caulinares. Ainda que o silenciamento do alvo afete a morfologia dos órgãos foliares e florais, outros fatores como o número de ramificações, crescimento da planta e redução do número de folhas expandidas foram constatados apenas em plantas silenciadas para *NbPHAN* e inoculadas com *R. solanacearum*. Mesmo antes do sexto dia pós inoculação, foi percebido que plantas pTRV2::*NbPHAN* infectadas tiveram uma maior sensibilidade foliar, com folhas mais frágeis e finas quando expandidas.

Para avaliar a severidade da murcha bacteriana em plantas de *N. benthamiana* silenciadas bem como definir a relação entre *NbPHAN* e a doença, foram realizadas análises diárias desde o primeiro dia pós-inoculação (dpi) até o tratamento controle exibir murcha irreversível nos estágios finais da doença. A progressão da doença foi observada de forma similar em amostras com expressão suprimida do gene *NbPHAN* e para as plantas controle, contudo, uma diferença da agressividade de *R. solanacearum* foi notada principalmente ao final da experimentação. Indicado pelos valores dos testes de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey (probabilidade de 5%), em 10 dpi houve a maior diferença significativa para o índice da doença (Figura 4) entre plantas silenciadas (pTRV2::*NbPHAN*) e não silenciadas (pTRV2::*GFP*) comparado aos dias anteriores.

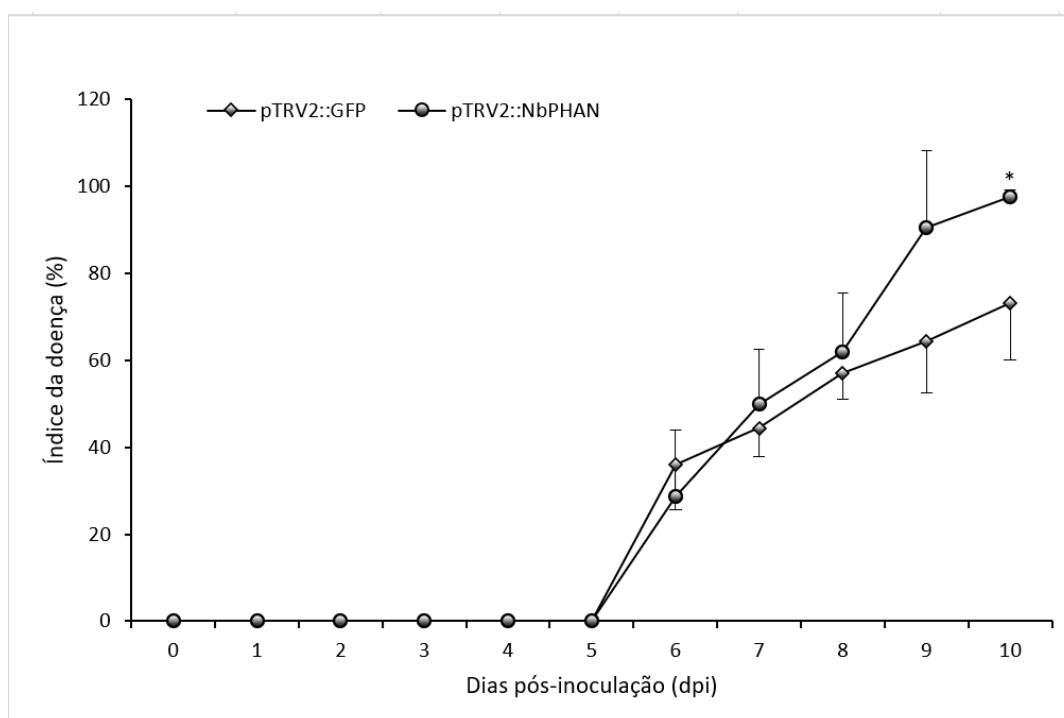


Figura 4. Gráfico do índice da murcha bacteriana calculado a partir da avaliação diária de plantas de *N. benthamiana* silenciadas (pTRV2::*NbPHAN*) e não silenciadas (pTRV2::*GFP*) para *NbPHAN* durante 10 dias pós-inoculação usando a escala de notas descrita por Nakano et al., 2017.

Fonte: elaborado pelo autor (2023).

Aos 6 dpi surgiram os primeiros sintomas da doença, onde plantas não silenciadas (pTRV2::*GFP*) apresentavam nota 2 na escala de notas e plantas silenciadas para *NbPHAN*, a nota 1. Entretanto, no tempo 10 dpi as plantas não silenciadas (pTRV2::*GFP*) refletiam a nota 3 da escala e todas as plantas silenciadas para *NbPHAN* foram consideradas tomadas pela doença com nota 4 (Figura 5).



Figura 5. Severidade da murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* (isolado B73, Filotipo II) em plantas de *N. benthamiana* não silenciadas (pTRV2::GFP) e silenciadas (pTRV2::NbPHAN) para NbPHAN. Plantas de *N. benthamiana* pTRV2::GFP não inoculadas com *R. solanacearum* são representadas como controle negativo (Faixa de escala = 6 cm).

Fonte: elaborado pelo autor (2023).

3.4. Análise de redes complexas da interação do fator de transcrição *ASI-Like* homólogo ao gene *NbPHAN* de *N. benthamiana*

O fator de transcrição *ASI-Like* (NCBI ID: 107829769) descrito inicialmente em *Nicotiana tabacum* apresenta altas taxas de similaridade (97,7% de identidade e E-value = 0) com mRNA de *Phantastica* em *N. benthamiana*, confirmado em estudos de filogenia por Huang et al. (2013), portanto, estabelecemos que as interações putativas dessa proteína são efetivamente compartilhadas com as interações proteicas de *NbPHAN*. A partir da leitura das interações putativas, traçamos as mais próximas desse fator de transcrição com outras proteínas e descobrimos que proteínas de domínios de ligação ao DNA são mais evidentes, indicando maior complexidade nas diversas vias de regulação da expressão gênica (Figura 6).

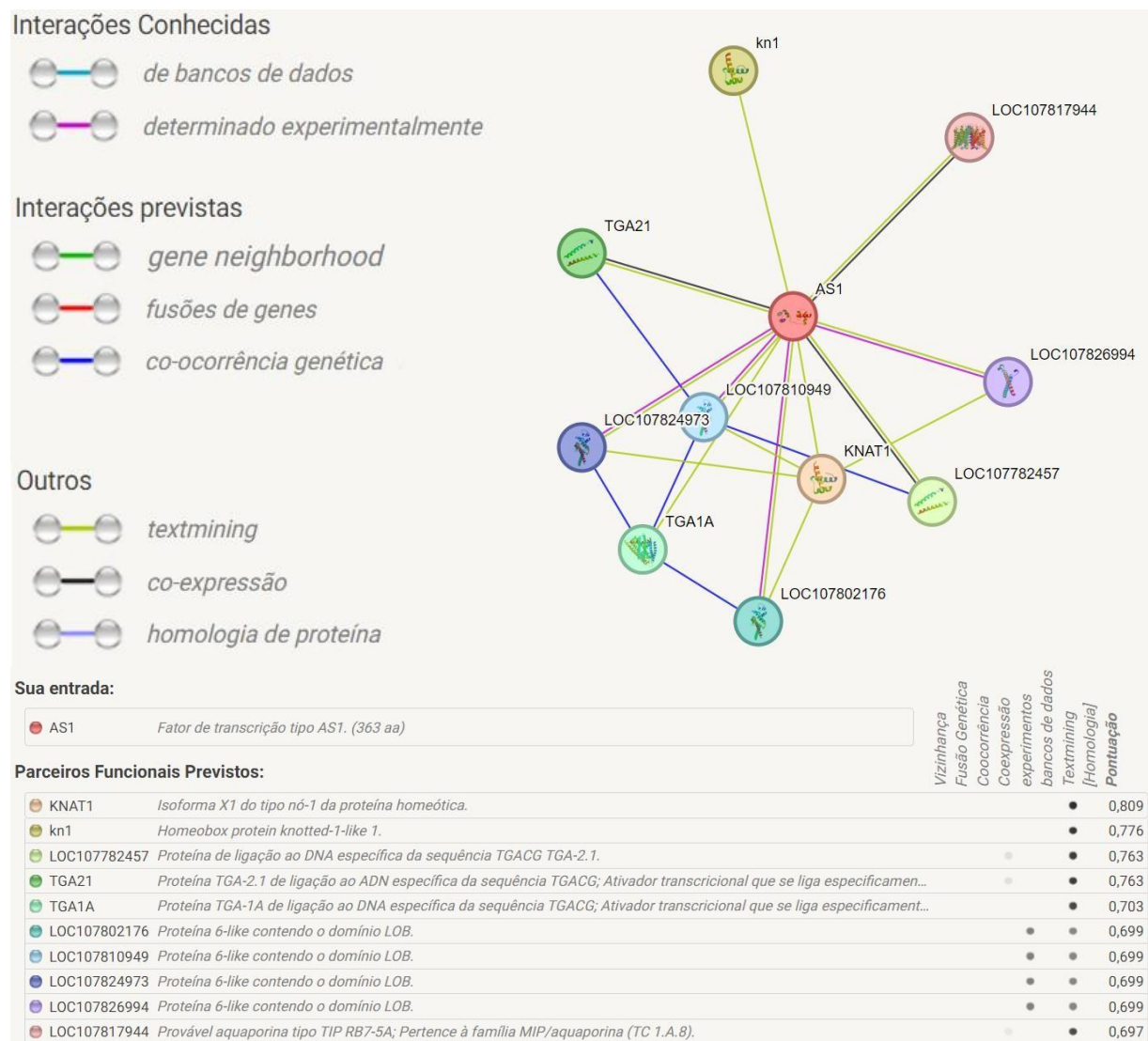


Figura 6. Interações putativas do fator de transcrição *ASI-Like* de *Nicotiana tabacum* homólogo a *Phantastica* de *N. benthamiana* (*NbPHAN*). As redes de interação proteína-proteína foram geradas com duas ferramentas de

bioinformática independentes, a plataforma online STRING (SZKLARCZYK et al., 2023) e o software livre Cytoscape (SHANNON et al., 2003) e as interações foram pertinentes em ambos. Destacam-se as interações (linhas em rosa – determinado experimentalmente, dados disponíveis na plataforma) entre ASI-Like e proteínas contendo domínios conservados de *Lateral Organ Boundaries* (LOB), reguladores-chave no desenvolvimento de órgãos laterais e envolvidos com respostas à patógenos.

Fonte: Plataforma STRING (2023).

Vale destacar que as interações putativas de maior impacto foram com proteínas que codificam outros fatores de transcrição contendo domínios LOB (*Lateral organ boundaries*), genes pertencentes a família LBD. Esses genes são conservados em uma ampla gama de espécies vegetais, responsáveis as vias de regulação do desenvolvimento e crescimento das plantas, incluindo fotomorfogênese, arquitetura de inflorescência e polaridade adaxial-abaxial das folhas, corroborando com os resultados representados neste estudo.

3.5. Avaliação de tolerância a seca em genótipos de *S. lycopersicum* contrastantes para resistência a murcha bacteriana

3.5.1. Parâmetros morfológicos, crescimento e arquitetura radicular

As raízes são partes vitais para as plantas, exercendo papéis essenciais como a fixação, captação de água e nutrientes, condução, síntese de substâncias químicas e interações simbióticas. A sua arquitetura, robustez e ramificações são características que influenciam diretamente suas funções em plantas.

Em condição de déficit hídrico, analisamos os tomates Hawaii 7996 quanto a sua estrutura radicular, e detectamos um rearranjo de sua arquitetura, com redução da densidade, menor número de ramificações, raízes mais extensas e profundas (Figura 7A). Em contrapartida, foram observadas diferenças sutis em relação as características da raiz do genótipo Heinz 1706 em ambos os tratamentos (Figura 7B). Apesar de mais robustas sob irrigação, plantas submetidas ao déficit hídrico não apresentavam um crescimento amplificado e a arquitetura seguiu os mesmos padrões.

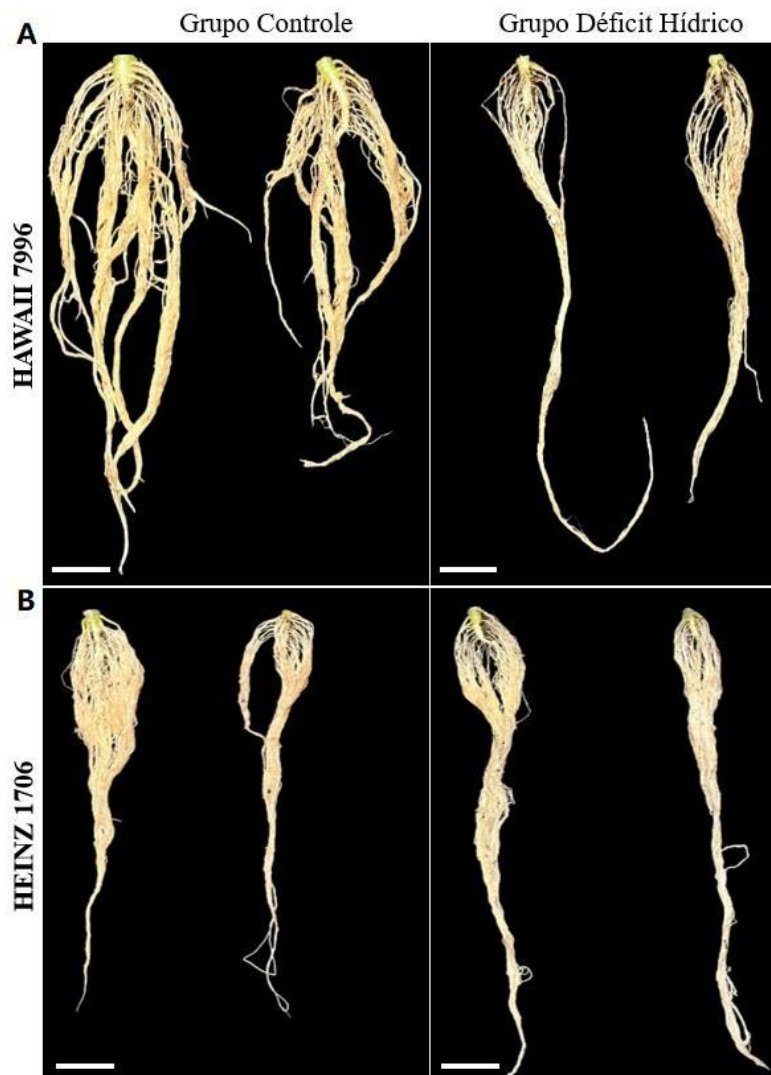


Figura 7. Comparação do crescimento e arquitetura radicular dos genótipos de *S. lycopersicum* Hawaii 7996 (A) e Heinz 1706 (B), respectivamente resistente e suscetível a *R. solanacearum* sob diferentes manejos hídricos. Um irrigado com solução nutritiva regularmente (controle) e outro com solução nutritiva + PEG (10%) (seca) durante 26 dias de experimentação. (Faixa de escala = 1 cm).

Fonte: elaborado pelo autor (2023).

Esses dados chamam a atenção quanto a modulação da resposta frente ao estresse de déficit hídrico, já que genótipos Hawaii 7996 são conhecidos mundialmente por sua resistência estável a *R. solanacearum*, um fitopatógeno que infecta as plantas principalmente pelas raízes e obstrui os vasos do xilema impedindo a distribuição normal de água na planta.

3.5.2. Crescimento aéreo e sintomas de déficit hídrico

Qualquer tipo de perturbação no qual as plantas são submetidas, quando não letais, podem gerar perdas de rendimento. Os dois genótipos estudados foram submetidos ao déficit hídrico

e sofreram perdas significativas quanto ao crescimento e desenvolvimento da planta de maneira completa, principalmente quanto ao número de ramificações e número de folhas (Figura 8). No entanto, em proporção, foi percebido que a modulação negativa deste crescimento em resposta ao déficit hídrico ocorreu de maneira acentuada em plantas Heinz 1706.

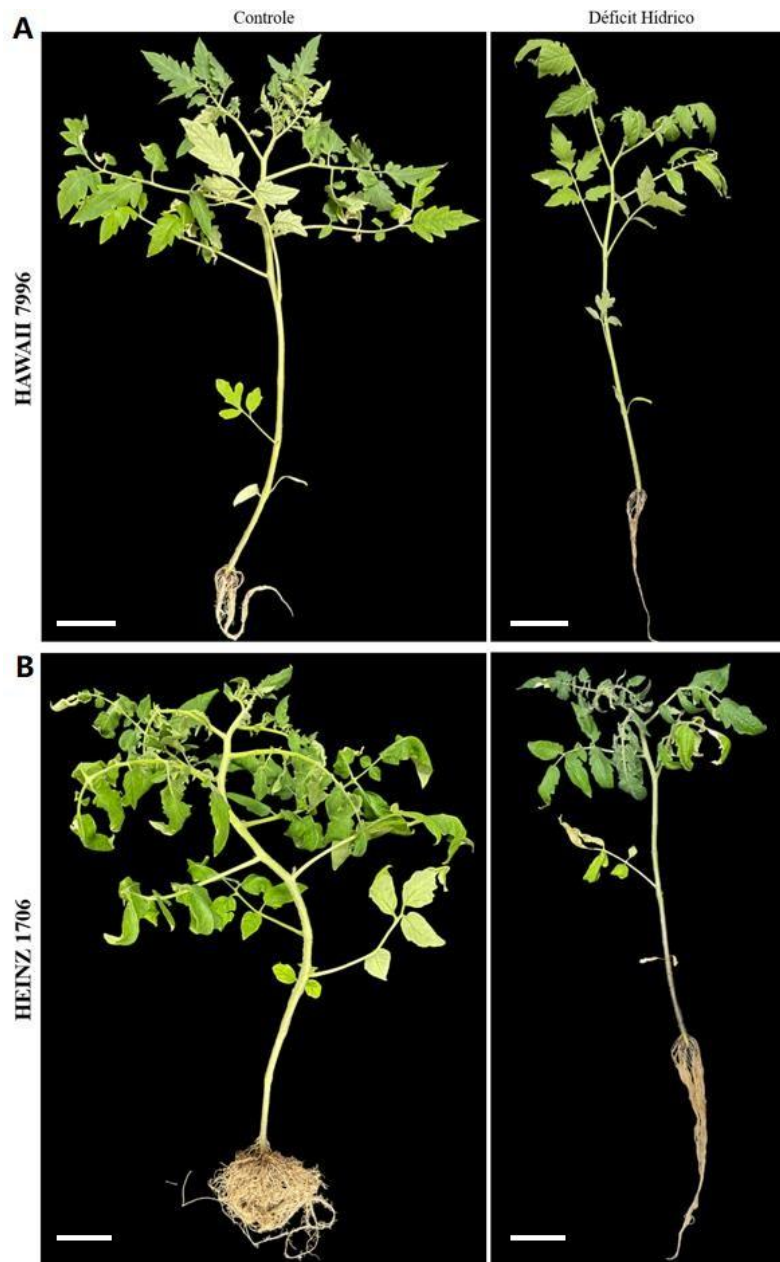


Figura 8. Avaliação qualitativa e comparação do desenvolvimento da parte aérea dos genótipos de *S. lycopersicum* Hawaii 7996 (A) e Heinz 1706 (B) resistente e suscetível a *R. solanacearum*, respectivamente, sob diferentes manejos hídricos. As plantas foram submetidas a irrigação (controle) ou mantidas em condição de seca por PEG (10%) durante 26 dias de experimentação. (Faixa de escala = 6 cm).

Fonte: elaborado pelo autor (2023).

Além disso, ao mesmo tempo que o genótipo Hawaii 7996 conteve o dano oxidativo de forma mais efetiva, notaram-se sintomas emergentes do déficit hídrico em plantas Heinz 1706, com maior presença de folhas amareladas e pequenas áreas necróticas (Figura S3). Esses resultados indicam que os genótipos contrastantes para a resistência a *R. solanacearum*, Heinz 1706 e Hawaii 7996, podem se adaptar de maneiras diferentes e modular sua resposta por vias alternativas frente ao estresse abiótico de escassez hídrica.

3.5.3. Parâmetros fotossintéticos: eficiência quântica do fotossistema II e taxa de transporte de elétrons

A fotossíntese é um processo fundamental pelo qual as plantas convertem energia luminosa em energia química em forma orgânica, primordial para base de toda a vida na terra. As plantas, quando submetidas a situações desfavoráveis, são capazes de regular a fotossíntese de variadas formas.

Nos termos esperados desta pesquisa, as taxas fotossintéticas foram afetadas negativamente pelo déficit hídrico, com uma queda de mesmo valor significativo deste parâmetro em ambos genótipos. Porém, cabe citar que as taxas fotossintéticas são maiores em genótipos Hawaii 7996. Os valores da relação de fluorescência variável pela fluorescência máxima (F_v/F_m) indicou que não houve foto-inibição do fotossistema II em nenhum dos tratamentos nos dois grupos estudados (Figura Suplementar 4), sendo interpretado como uma adaptação positiva das plantas em manter a integridade das suas estruturas fotossintéticas, mesmo com queda de fotossíntese líquida e baixas energéticas.

Apesar da seca não influenciar na foto-inibição, apenas em plantas Hawaii 7996, o estresse diminuiu as taxas de eficiência quântica do fotossistema II e as taxas de transporte de elétrons (Figura 9), dificultando a transformação de energia luminosa em energia química. Mesmo com taxas maiores, essas informações revelam que o processo de fotossíntese em genótipos Hawaii 7996 é mais sensível ao déficit hídrico. Em contraponto, regular a taxa de produção e dissipar energia em outras vias alternativas permite conservar energia e recursos sob condições adversas.

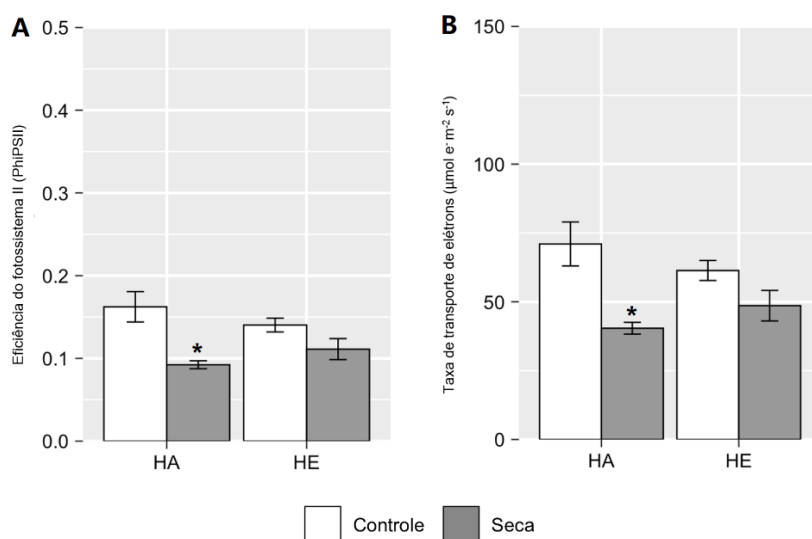


Figura 9. Análise dos parâmetros fotossintéticos: eficiência quântica do fotossistema II (PhiPSII) e taxa transportadora de elétrons nos genótipos de *S. lycopersicum* Hawaii 7996 (HA) e Heinz 1706 (HE), respectivamente resistente e suscetível a *R. solanacearum*, submetidos ou não ao déficit hídrico. (A) eficiência quântica do fotossistema II (PhiPSII) e (B) Taxa aparente de transporte de elétrons (ETR). As diferenças estatísticas entre as médias foram consideradas pelos valores significativos até 5% de probabilidade ($p < 0,05$). *, ** e ***, representam diferença significativa a 5, 1 e 0,1%, respectivamente, após uma análise de variância (anova) e teste de média (t de Student).

Fonte: elaborado pelo autor (2023).

3.5.4. Trocas gasosas: fechamento de estômatos e taxa de transpiração.

Os estômatos exercem fundamentos primordiais quanto as trocas gasosas (principalmente CO_2 e O_2) e regulam diretamente as taxas de transpiração em plantas. Nossas análises mostraram que genótipos Hawaii 7996 diminuem expressivamente a condutância estomática (Figura 10A) e conseqüentemente, reduzem significativamente sua perda de água pela transpiração (Figura 10B) em resposta ao déficit hídrico. Vale citar que o genótipo Heinz 1706, em dados brutos, também apresenta fechamento estomático e menor taxa de transpiração devido ao déficit hídrico, contudo, não possui diferença significativa em relação ao controle, evidenciando que as vias de regulação da resposta frente a esse estresse são diferentes. Embora a condutância estomática tenha diminuído, é interessante notar que os níveis de CO_2 internos não decaíram (Figura 10C) em ambos os genótipos, opondo-se ao esperado, visto que a principal via de captação de CO_2 é pelos estômatos.

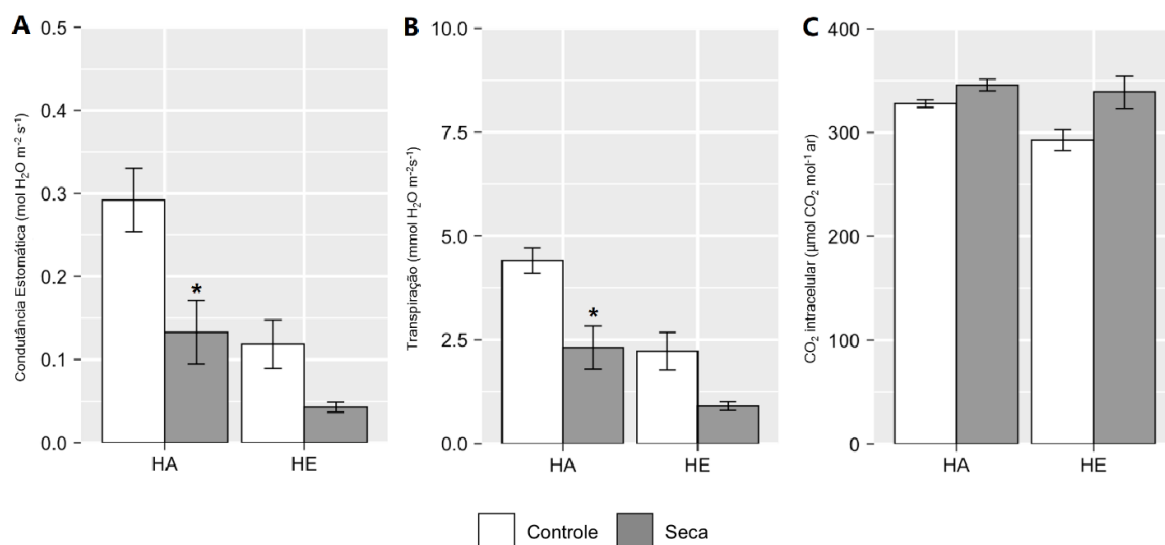


Figura 10. Análise dos parâmetros de trocas gasosas e metabolismo da respiração nos genótipos de *S. lycopersicum* Hawaii 7996 (HA) e Heinz 1706 (HE), respectivamente resistente e suscetível a *R. solanacearum*, submetidos ou não ao déficit hídrico. Incluem, (A) condutância estomática, (B) taxa de transpiração e (C) CO₂ intracelular. As diferenças estatísticas entre as médias foram consideradas pelos valores significativos até 5% de probabilidade ($p < 0,05$). *, ** e *** representam diferença significativa a 5, 1 e 0,1%, respectivamente, após uma análise de variância (anova) e teste de média (t de Student).

Fonte: elaborado pelo autor (2023).

Conformemente, os dois grupos exibiram equilíbrio na relação fotossíntese e condutância estomática, pois o déficit hídrico influenciou negativamente os dois processos fisiológicos. As taxas de respiração também não tiveram diferenças significativas entre os grupos e entre os tratamentos (Figura S5).

3.5.5. Eficiência hídrica: perda de água intracelular e produção de biomassa.

Em períodos de estiagem, as plantas adotam mecanismos que buscam aumentar a eficiência do uso da água, convertendo o máximo da água que é absorvida em energia química, minimizando as perdas por transpiração. Avaliamos um total de quatro parâmetros que indicam as taxas de uso eficiente da água. De modo geral, o genótipo Heinz 1706 se sobressaiu.

A relação da taxa fotossintética dividida pela taxa de transpiração foi menor em ambos os genótipos, entretanto, em Hawaii 7996 as diferenças foram mais significativas ($p < 0,01$) do que em Heinz 1706 ($p < 0,05$) (Figura 11A), logo, Hawaii 7996 ajusta severamente sua fotossíntese para evitar maiores perdas de água por transpiração. As análises da relação fotossíntese e taxa de transporte de elétrons tiveram redução sem distinções destoantes (Figura 11B), denotando que o déficit hídrico causou impacto negativo no mecanismo de conversão de energia das células em ambos os grupos.

Em outras análises, a relação entre o consumo de água e o incremento de biomassa, precisamente o parâmetro de uso eficiente da água e o teor relativo de água também foram medidos. Somente plantas Hawaii 7996 mostraram decréscimo significativos para esses parâmetros (Figura 11C e D). Nossos resultados sinalizam que o genótipo Hawaii 7996 gerencia rigorosamente o seu crescimento quando submetido a escassez hídrica se comparado ao Heinz 1706.

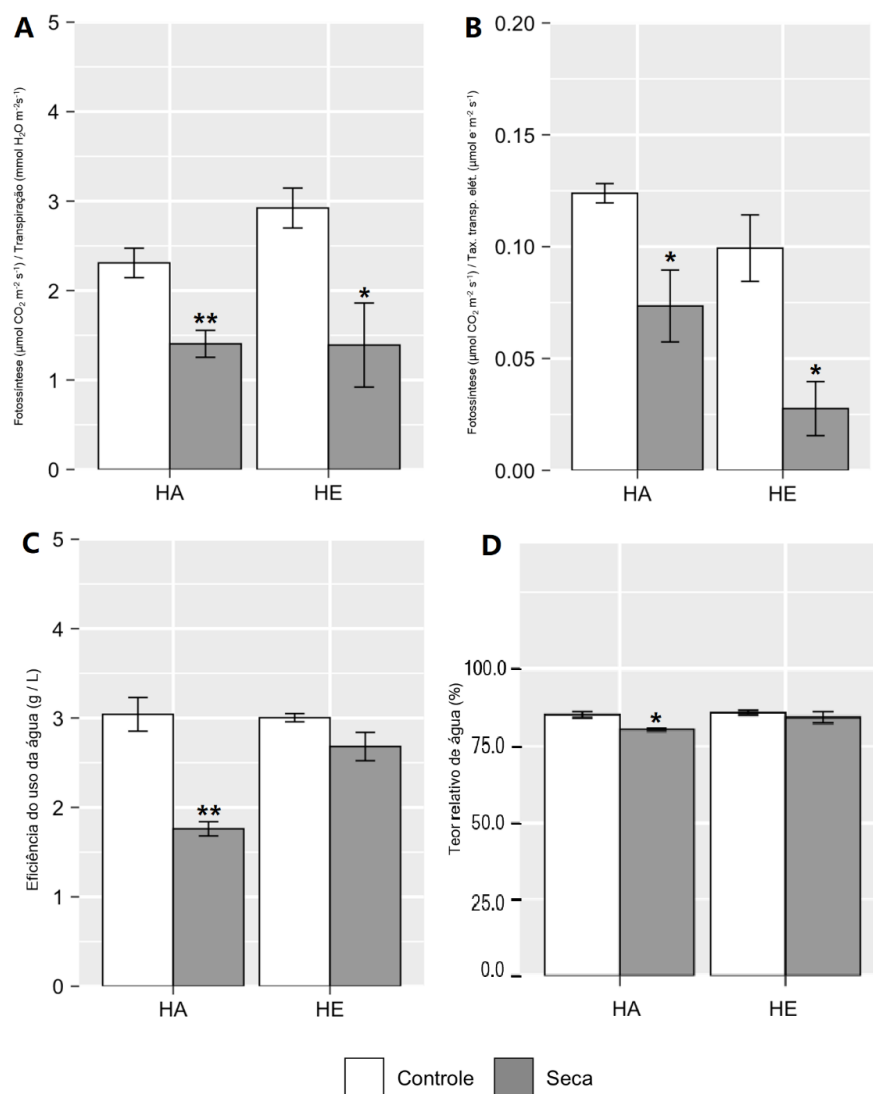


Figura 11. Análise das relações de eficiência hídrica e status hídricos genótipos de *S. lycopersicum* Hawaii 7996 (HA) e Heinz 1706 (HE), respectivamente resistente e suscetível a *R. solanacearum*, submetidos ou não ao déficit hídrico. Incluem, (A) relação da fotossíntese por transpiração, (B) relação da fotossíntese por taxa de transporte aparente de elétrons (ETR), (C) eficiência do uso da água e (D) teor relativo de água. As diferenças estatísticas entre as médias foram consideradas pelos valores significativos até 5% de probabilidade ($p < 0,05$). * e ** representam diferença significativa a 5 e 1%, respectivamente, após uma análise de variância (anova) e teste de média (t de Student).

Fonte: elaborado pelo autor (2023).

É importante enfatizar que já se sabe que o genótipo Heinz 1706 naturalmente investe mais em produção de biomassa e que são plantas mais sensíveis aos estresses equiparadas ao Hawaii 7996, todavia, busca-se entender melhor como essa modulação de resistência a *R. solanacearum* de Hawaii 7996 interage com a resposta frente ao déficit hídrico. Entretanto, descobrimos que o genótipo Heinz 1706 tolera mais a o déficit hídrico quando comparados com genótipos Hawaii 7996.

3.5.6. Elementos de desenvolvimento: realocação de biomassa e taxa de crescimento.

O desenvolvimento vegetal é um sistema muito complexo que envolve diretamente a diferenciação celular, crescimento, desenvolvimento de órgãos, fotossíntese maturação e reprodução. De acordo com as circunstâncias ambientais, as plantas optam por redistribuir seus recursos orgânicos para melhor atender as demandas em que estão sujeitas, alterando seus padrões de crescimento. Diante disso, analisamos a realocação de biomassa e os índices de crescimento como massa seca total (subtraída da massa seca total inicial), diâmetro do caule e altura da planta.

Identificamos que as perdas na produção de biomassa foram drásticas em todas as plantas e mais significativo em Heinz 1706 (Figura 12A). Além disso, não houve realocação de biomassa em plantas Hawaii 7996 e Heinz 1706, ainda que plantas no tratamento de seca tenham incrementado biomassa nas raízes, no caule (Figura 12B e C) e atenuado em folhas (Figura 12 – D), o investimento dos dois genótipos seguiram o mesmo padrão. Não surpreendente, percebeu-se também diferenças enormes no crescimento relativo na análise do diâmetro do caule (Figura 12E) e a altura (Figura 12F) de todas as plantas, sendo plantas Heinz 1706 as mais afetadas. Esses resultados refletem vias distintas relacionando os processos intrínsecos que mediam as respostas dessas plantas ao déficit hídrico.

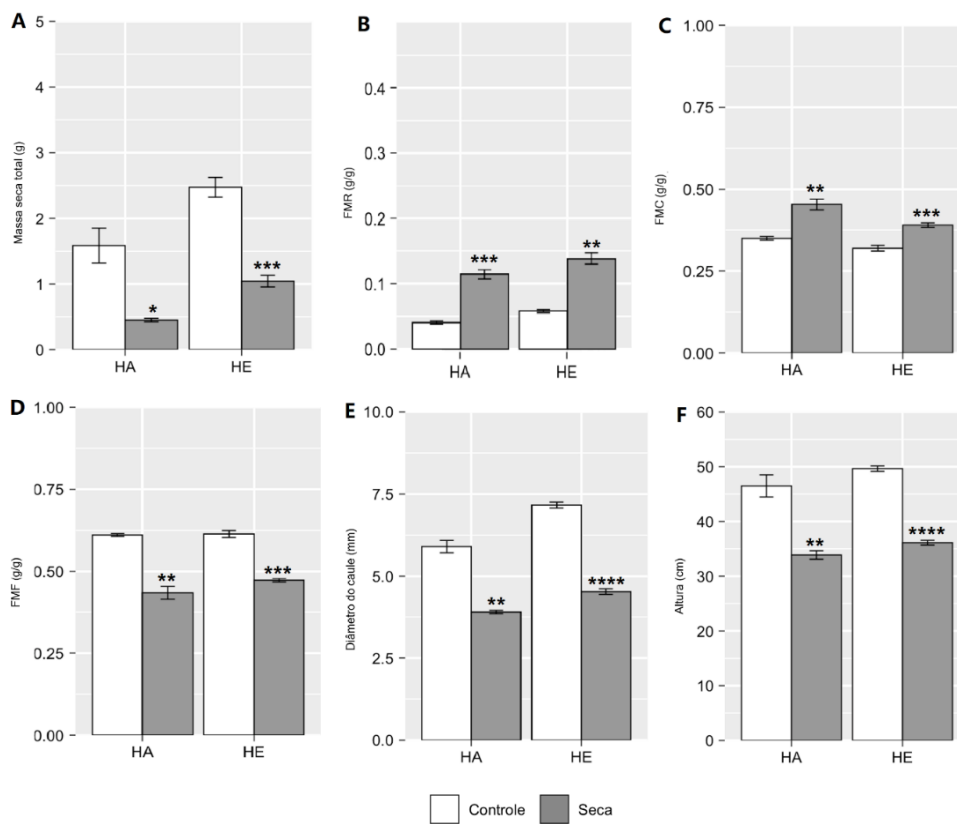


Figura 12. Análises dos parâmetros de crescimento dos genótipos de *S. lycopersicum* Hawaii 7996 (HA) e Heinz 1706 (HE), respectivamente resistente e suscetível a *R. solanacearum*, submetidos ou não ao déficit hídrico. Incluem, (A) massa seca total, (B) fração de massa de raiz (FMR), (C) fração de massa de caule (FMC), (D) fração de massa de folha (FMF), (E) diâmetro do caule e (F) altura das plantas. As diferenças estatísticas entre as médias foram consideradas pelos valores significativos até 5% de probabilidade ($p < 0,05$). *, **, ***, **** representam diferença significativa a 5, 1, 0,1 e 0,01%, respectivamente, após uma análise de variância (anova) e teste de média (t de Student).

Fonte: elaborado pelo autor (2023).

4. DISCUSSÃO

Embora *N. benthamiana* não seja uma planta cultivada de interesse comercial, diversos estudos usufruem do seu amplo espectro de aplicações, disponibilidade de dados genômicos, facilidade de cultivo, tornou-se um vegetal modelo, ficando atrás apenas de *Arabidopsis thaliana*. Em *N. benthamiana* tem sido aprimorados alguns métodos de indução de silenciamento gênico visando a caracterização funcional de homólogos de várias espécies de importância econômica, como é o caso do sistema VIGS, um sistema-modelo de pesquisa que contribui na obtenção de informações cruciais para o desenvolvimento de culturas resistentes e tolerantes, como por exemplo em solanáceas (HASHIMOTO et al., 2019; VENTIMILLA et al., 2021; HELDERMAN et al., 2022).

De outro modo, o tomate é uma das hortaliças mais cultivadas nos campos e comercializadas em considerável volume no mundo (IBARROLA-RIVAS et al., 2020). Nos últimos 50 anos, a produção de tomates aumentou cerca de seis vezes, a comercialização internacionalmente cerca de dez vezes e o consumo triplicou (FAO, 2018). Os estresses bióticos e abióticos incidem, não individualizados, sobre o desenvolvimento e a produtividade dessas culturas, e em segundo plano, comprometem a agricultura sustentável e segurança alimentar.

A regulação da resposta das plantas em vias fisiológicas e bioquímicas são semelhantes em condições de estresse (FANG; XIONG, 2015; ILYAS et al., 2021). Em primeira instância, as condições ambientais desfavoráveis e/ou contato com patógenos/predadores são detectadas por sensores presentes nas membranas celulares seguido de reações primárias e secundárias a jusante, disparando cascatas quinases e fosforilação/desfosforilação, ativação de fatores de transcrição (TFs) e regulação da expressão gênica (PAES DE MELO et al., 2022; ZHANG et al., 2022).

Até o momento, genes que codificam TF's tem sido extensivamente estudada devido a sua atuação na regulação da expressão gênica de vários genes responsivos aos estresses bióticos e abióticos em plantas, sendo excelentes candidatos para o melhoramento de culturas de interesse (NURUZZAM et al., 2013; ANZHU et al., 2013; BAILLO et al., 2019). Por exemplo, alguns TF's como WRKY, NAC, bZIP, ERF, ARF, e MYB são muito bem documentados em plantas por suas respostas a ambos estresses (DAS et al., 2019; TALOSA; ZHANG, 2020). A participação específica dos fatores de transcrição da família MYB frente as respostas aos estresses simultâneos em plantas também são amplamente descritas (AMBAWAT et al., 2013;

SUJIT, 2016; WU et al., 2022). Em pesquisas com algodão, Liu et al. (2022) descobriu que a regulação negativa do gene *GhMYB36* aumentava a susceptibilidade das plantas ao estresse hídrico e a infecção pelo fungo *Verticillium dahliae*.

Do ponto de vista fisiológico, as implicações predominantes do déficit hídrico compreendem a diminuição das trocas gasosas em virtude da inibição da abertura estomática, a desaceleração concomitante da atividade fotossintética (TOSCANO et al., 2019), redução da biomassa geral (ANSARI et al., 2019), culminando no fenômeno de murchamento das folhas e do hipocótilo (CORNEJO-RÍOS et al., 2021). As adaptações aos estresses podem apresentar diferenças sutis planta a planta dependendo da variedade e da espécie. Em estudo comparativo entre dois genótipos comuns de batata sob déficit hídrico, Nasir & Toth (2021) revelam que as plantas reduzem de forma semelhante a produção de biomassa, entretanto, modulam suas respostas em vias distintas. Em avaliação com genótipos contrastantes de tomates, Moles et al. (2018) chegaram as mesmas conclusões. A compreensão dos mecanismos pelos quais as plantas se adaptam a situações de estresse, quando analisada de maneira comparativa, é uma abordagem eficaz para esclarecer as vias potenciais de regulação (YOU et al., 2019; BALDONI, 2022).

Pesquisas recentes apontaram para uma possível ligação entre a murcha bacteriana e o estresse hídrico decorrente do déficit hídrico, MacIntyre et al. (2022) esclareceram que as taxas de expressão de vários genes responsivos à escassez de água, principalmente via ABA-dependente, também aumentaram em plantas infectadas pela *R. solanacearum*. Este estudo revela pela primeira vez a ligação entre o fator de transcrição *Phantastica* (proteínas de domínio MYB – tipo R2R3) responsivo à déficit hídrico (HUANG et al., 2013) com os efeitos provocados pela doença de murcha bacteriana desencadeada pela infecção por *R. solanacearum* do filotipo II em plantas de *N. benthamiana* e por meio da análise de parâmetros fisiológicos, os efeitos do déficit hídrico em plantas de tomate (*S. lycopersicum*) contrastantes para a resistência a murcha bacteriana (*R. solanacearum*), Hawaii 7996 (resistente) e Heinz 1706 (susceptível), com o propósito de investigar potenciais *cross-talk* entre as vias de resposta das plantas aos fatores bióticos e abióticos.

Neste trabalho, atestamos que os primeiros sintomas de murcha bacteriana mediada por *R. solanacearum* foram visualizados em plantas de *N. benthamiana* controle não silenciadas para *NbPHAN* (pTRV2::*GFP*), no entanto, a infecção progrediu de forma mais severa em

exemplares silenciados para o gene *NbPHAN*. Logo, quando a fitobactéria alcança o xilema de plantas suprimidas transientemente para *NbPHAN*, a doença avança de forma rápida e as plantas morrem precocemente quando comparada a plantas não silenciadas. Em trigo, um outro TF MYB (*TaPIMP1*) que regula positivamente a resposta ao déficit hídrico e a infecção por *R. solanacearum* também foi relatado (LIU et al., 2011).

A interação entre os sintomas da doença e o fenótipo originado do silenciamento de *NbPHAN* pode gerar conflitos quanto a vitalidade das plantas. Isso acontece porque o fenótipo de má-formação dorsoventral nas folhas provoca rigidez nos pecíolos, e mesmo que a folha perca a turgescência integral, sendo caracterizada como murcha, sua visualização nessa categoria, torna-se mais difícil. Todavia, a expressão diferencial relativa do gene no momento da infecção por *R. solanacearum* era 60%. Assim, supõe-se que a susceptibilidade seja amplificada em plantas com maiores níveis de supressão do gene-alvo, e nesse sentido, propõe-se que *Phantastica*, que foi atribuído a resistência ao déficit hídrico também esteja envolvido na resposta de resistência à murcha bacteriana.

É possível que este resultado esteja relacionado a expressão de proteínas *PR* (relacionadas a patogênese), dado que a superexpressão de alguns TFs da classe R2R3-MYB em *Arabidopsis thaliana* transgênicas ativam a expressão de *PR* e desencadeiam a resposta contra os agentes patogênicos, principalmente pela sinalização dos fitormônios ácido jasmônico (JA) e ácido salicílico (SA) (ERPEN et al., 2018). Curiosamente, *NbPHAN* faz parte da cascata de sinalização ao estresse de déficit hídrico independente de ácido abscísico (ABA) (HUANG et al., 2013), um fitormônio muito participativo principalmente nas vias de respostas a estresses abióticos, como por exemplo déficit hídrico e salinidade (LIU et al., 2018; HUSSAIN et al., 2021; ASLAM et al., 2022).

As respostas das plantas ao estresse biótico podem ser alteradas em episódios de déficit hídrico, uma vez que ABA interage com SA principalmente de forma antagônica (MUÑOZ-ESPINOZA et al., 2015; GUO et al., 2016; SZCZEPANIEC; FINKE, 2019). Huang et al. (2020) também especulam que as relações ABA-SA e ABA-JA são antagônicas perante as interações hemibiotróficas (típicas interações planta – *R. solanacearum*), enfatizando que a característica ABA-independente de *NbPHAN* seja fundamental na resposta à doença demurcha bacteriana. Em exemplo suplementar, também em *A. thaliana*, a expressão de *AtMYB44* foi modulada positivamente logo após a infecção por fitopatógenos e manejo com fitormônios, e plantas que foram superexpressas para esse mesmo gene, demonstraram níveis mais elevados

da expressão de genes *PR* seguido de maior resistência a *Pseudomonas syringae* (ZOU et al., 2013).

De outro modo, a resistência a murcha bacteriana pode estar ligada à estrutura e arquitetura da raiz (GRIMAULT et al., 1994; NAKAHO et al., 2000; LOPES et al., 2022). Sabe-se que Hawaii 7996 restringe a colonização radicular por *R. solanacearum*, limitando o movimento vertical bacteriano da raiz ao caule, induzindo morte celular por meio da imunidade desencadeada por efetores (ETI) e regulando a expressão de genes relacionados a patógenos (PR) (XU et al., 2023). As plantas também modificam o crescimento e a arquitetura das raízes para se adaptar aos gradientes de umidade no solo (GUPTA et al., 2020). Como as raízes são os principais meios de infecção de *R. solanacearum* (XUE et al., 2020), é muito atrativo notar que estritamente plantas do genótipo Hawaii 7996, resistentes a murcha bacteriana, efetuam um rearranjo de sua arquitetura radicular sob déficit hídrico, reduzindo a densidade e o número de ramificações, o que indiretamente minimizaria a disponibilidade de trajetos alternativos durante o processo de infecção. Certamente, as raízes são partes vitais que participam diretamente frente aos dois fatores estressantes.

Do mesmo modo, identificamos que plantas *NbPHAN* silenciadas inoculadas com *R. solanacearum* se diferenciaram de plantas silenciadas não inoculadas. A arquitetura, quantidade de ramificações, expansão foliar, número total de folhas e a altura foram reduzidos em plantas suprimidas para *NbPHAN* e infectadas com *R. solanacearum*. Esses resultados fortalecem a conexão entre *R. solanacearum* e o gene *NbPHAN*. Isso porque é provável que *NbPHAN* regula a expressão de outros genes a jusante (como por exemplo genes LBD) e por isso observamos a infecção a *R. solanacearum* modulando de forma negativa o desenvolvimento e crescimento dos órgãos em plantas silenciadas. Com isso, é tentador especular que existe possível participação de *NbPHAN* na regulação positiva de genes que expressam proteínas *PR*, envolvendo vias de sinalização que interagem com os fitormônios SA e JA.

Analisando interações putativas da proteína *ASI-Like* de *N. tabacum* similar a *NbPHAN* de *N. benthamiana*, descobrimos conexões próximas entre *NbPHAN* e quatro proteínas da família LBD, corroborando com o fenótipo de má-formação de folhas e flores visualizados nos tratamentos pTRV2::*NbPHAN*, pois uma das principais funções dos genes da família MYB e LBD é o desenvolvimento dos órgãos em plantas (ZHANG et al., 2020). Proteínas LBD eram reconhecidas por regular o desenvolvimento de órgãos vegetais, entretanto, estudos recentes comprovam a conexão dessa família de genes com funções versáteis no crescimento

(THATCHER et al., 2012; XU et al., 2016), desenvolvimento do pecíolo (CHEN et al., 2012; ZHOU et al., 2012; GE et al., 2014), fotomorfogênese (MANGEON et al., 2011), regulação do metabolismo (ALBINSKY et al., 2010), fitormônios e resistência a patógenos (HU et al., 2014; CABRERA et al., 2014). Em tomate, Liu et al. (2020) revelaram que um gene *SILBD40* de domínio LOB também contribui para tolerância ao déficit hídrico, assim como *NbPHAN* (HUANG et al., 2013), e está igualmente associada ao fitormônio JA, bem como TF's R2R3-MYB (ERPEN et al., 2018).

Em relação ao déficit hídrico, o menor desenvolvimento e crescimento de plantas submetidas a essa condição é bem caracterizado em tomate (JANGID; DWIVEDI, 2016), batata (GERVAIS et al., 2021) e pimenta (MASOUMI et al., 2021). Em tratamento de seca, os dois genótipos apresentaram realocação de biomassa para as raízes e caule seguindo o mesmo padrão, no entanto, a massa seca total das plantas Heinz 1706 foi duas vezes maior e seu crescimento mais severamente prejudicado em número de folhas, altura e diâmetro do caule quando comparadas a plantas Hawaii 7996. De modo interessante, em estudo comparativo entre genótipos contrastantes para resistência a murcha bacteriana, Fan et al. (2018) descobriram que Hawaii 7996 restringiu ainda mais seu crescimento (34,4 – 59,1%) em resposta a infecção a *R. solanacearum* em relação ao genótipo suscetível HYT (26,9 – 38,2%).

Adicionalmente, em folhas infectadas com *R. solanacearum*, análises anteriores provaram que (em comparação a genótipo suscetível Marmande) Hawaii 7996 tolera mais a necrose e o estresse oxidativo em folhas, modulando intensamente a expressão de proteínas específicas responsivas a infecção pelo fitopatógeno e que não há mudanças significativas em redes de interações proteicas, principalmente peroxidases (PLANAS-MARQUES et al., 2018). Surpreendentemente, danos oxidativos foram identificados exclusivamente nas folhas de plantas Heinz 1706, evidenciando que Hawaii 7996 investe no equilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a capacidade de neutralizá-los sob déficit hídrico, corroborando com Planas-Marques et al. (2018) e com estudos anteriores, onde Sánchez-Rodríguez et al. (2010) verificaram que o tomateiro apresenta diferenças genotípicas diante do estresse oxidativo desencadeado pelo déficit hídrico.

Estudos avaliando genótipos contrastantes quanto a resistência a murcha bacteriana e os parâmetros fisiológicos das plantas sob efeito de déficit hídrico são recentes, e conseqüentemente poucos. A planta reduz sua atividade fotossintética para preservar água, mas essa adaptação também pode limitar a produção de energia e biomassa (HINSERMU,

2020; MACHADO et al., 2022;). Como esperado, as taxas fotossintéticas foram significativamente baixas em todas as plantas tratadas com PEG (10%), corroborando com outros estudos (FAN et al., 2022; WANG et al., 2022;). Mesmo detendo de um menor número de folhas comparativamente com Heinz 1706 em todos os tratamentos, o genótipo Hawaii 7996 apontou maior taxa fotossintética e menor taxa significativa de transporte de elétrons. À primeira vista, plantas Hawaii 7996 controlam a produção de ROS inibindo a cadeia ETR de modo precoce, concluindo que parte de sua energia produzida é dissipada em vias de defesa e homeostase, equivalente a estudos em trigo (YANG; LUO, 2021). Nossos dados sustentam os primeiros passos para novas investigações sobre vias responsivas aos estresses aqui estudados.

Com baixa disponibilidade de água no ambiente, as plantas têm a capacidade de ajustar a condutância estomática através do fechamento parcial dos estômatos reduzindo a perda de água na transpiração (MILLONES-CHANAMÉ et al., 2019). Analisando os parâmetros de trocas gasosas, ambos genótipos fecharam os estômatos e minimizaram as perdas de água pela transpiração, entretanto, somente plantas Hawaii 7996 exibiram redução significativa quando comparadas a plantas bem irrigadas, não constatado em Heinz 1706. Gerlin et al. (2021) inferem que a transpiração foi intensamente reduzida pela infecção por *R. solanacearum* em tomates suscetíveis para esse fitopatógeno, coerente com nossos resultados.

O déficit hídrico também reduz o carbono interno (Ci) (LIANG et al., 2020). Esse parâmetro não demonstrou diferenças significativas em ambos genótipos, entretanto, identificamos acréscimos discretos nas taxas de ambos genótipos submetidos a seca. Esse fato é intrigante, pois a déficit hídrico proporciona baixa fotossíntese e maior fechamento estomático (MINGCHI et al., 2010), dificultando a entrada de CO₂ pelos estômatos seguidos de baixas concentrações de Ci. Com isso, presume-se que os genótipos podem ter uma capacidade semelhante de manter os níveis internos de carbono em resposta ao estresse hídrico. A respiração também não apresentou diferenças significativas entre as cultivares, porém, observamos que em plantas Hawaii 7996 as taxas foram levemente menores. Essas tendências sutis podem estar relacionadas a adaptações que não foram capturadas pela nossa análise, sendo necessário investigar mais profundamente em pesquisas futuras.

Uma das alternativas para tolerar a déficit hídrico é elevar as taxas de eficiência do uso da água, medida pelo consumo de água e a produção de biomassa (NEMESKÈRI; HELYES, 2019). Outros parâmetros como a taxa de A/E, A/ETR e o teor relativo de água (TRA) também são informativos quanto ao uso da água disponível (GIORDANO et al., 2021). Entre os

genótipos aqui estudados, foi percebido que Heinz 1706 (resistente a *R. solanacearum*) teve a capacidade de manter suas células hidratadas e de converter a água consumida em biomassa de modo estável mesmo na presença de seca. Vale notar que as taxas de TRA podem ter sido influenciadas pelo tempo experimental, uma vez que as quantificações foram feitas um dia pós-hidratação. De acordo com descobertas anteriores (HAO et al., 2019; TU et al., 2022;), menores taxas das relações A/E e A/ETR são comuns sob déficit hídrico em plantas e foram análogos para ambos genótipos.

O efeito significativo do tratamento com PEG simulando o déficit hídrico em genótipos contrastantes e as análises dos parâmetros fisiológicos demonstraram que Heinz 1706 fez uso mais eficiente da água disponível investindo extensivamente em biomassa, enquanto Hawaii 7996 administrou de forma mais criteriosa, principalmente pelo processo fotossintético, ajuste da abertura estomática e limitação da perda de água por transpiração. Tais conclusões sugerem que as vias de modulação e expressões dos genótipos não são estáticas e não sensíveis, mas sim adaptáveis de múltiplas formas.

A complexidade das vias de interações gene a gene, metabolismo e cascatas de sinalização mediadas por fitormônios podem trazer complicações quanto a compreensão desses mecanismos. Por exemplo, em estudos com tomate, Qamar et al. (2009) identificaram que o silenciamento de TF's *SlAIM1* aumentavam a vulnerabilidade das plantas aos estresses salino, oxidativo e a infecção pelo fungo *Botrytis cinerea*, porém, surpreendentemente a superexpressão do mesmo gene não conferiu resistência ao patógeno.

Considerando o ambiente nativo, em síntese, as interações complexas entre estresses bióticos e abióticos em plantas cultiváveis têm implicações diretas na agricultura sustentável e consequentemente na segurança alimentar. O entendimento mais profundo das vias de regulação abrangendo pesquisas futuras sobre esses mecanismos são fundamentais para melhor compreender o funcionamento das vias de respostas ao estresse de déficit hídrico e inferir melhor a relação com os atributos da resistência a *R. solanacearum*. Nossos estudos comprovam que a existe uma relação direta entre a resposta ao déficit hídrico e a infecção por *R. solanacearum*, ou seja, plantas que toleram ambientes secos tendem resistir a infecção pelo fitopatógeno, todavia, o inverso não foi observado, logo, plantas que possuem características de resistência a murcha bacteriana não são capazes de tolerar ambientes com baixa disponibilidade de água. Portanto, avanços nas pesquisas englobando os mecanismos de defesa aos estresses simultâneos em plantas são essenciais para expandir os saberes e traçar estratégias

afim de mitigar os seus efeitos em cultivos valiosos, e assim, fornecer informações que favoreça os programas de melhoramento genético de plantas no desenvolvimento de novas cultivares contra os desafios frente a esses estresses.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Efetivamente, os estresses abióticos e bióticos são fatores críticos que influenciam negativamente as culturas agrícolas. Mais ainda, o déficit hídrico e a murcha bacteriana (*R. solanacearum*) recebem destaque internacionalmente devido as suas consequências graves, principalmente na produção. Todavia, a conexão dos efeitos da falta de água e o patossistema aqui estudados ainda não foram objeto de muitas pesquisas anteriores. Em primeira instância, analisamos os aspectos fenotípicos dos efeitos causados por *R. solanacearum* em plantas de *N. benthamiana* silenciadas para o gene *NbPHAN* que regula positivamente a resistência ao déficit hídrico, com ênfase nas respostas tanto ao estresse biótico de murcha bacteriana quanto ao abiótico de déficit hídrico, ilustrando as interações potenciais dos elementos participativos frente a esses estresses. Em plantas silenciadas para *NbPHAN*, a murcha bacteriana mostrou-se mais severa, denotando que o gene-alvo que atua de modo independente de ABA, participa diretamente da resposta ao déficit hídrico e à infecção por *R. solanacearum*. Além de maior susceptibilidade, plantas silenciadas infectadas também manifestaram fenótipo de subdesenvolvimento que pode ser atribuído a *Phantastica* e a regulação da expressão de outros genes a jusante, como por exemplo TF's da família LBD, genes *PR* e genes associados a fitormônios SA e JA. Em segunda instância, nossas investigações exploraram parâmetros fisiológicos em resposta aos efeitos do déficit hídrico em culturas de *S. lycopersicum* contrastantes quanto a resistência a *R. solanacearum*, evidenciando que plantas resistentes ao fitopatógeno não apresentam tolerância ao déficit hídrico, apesar de demonstrar certo grau de similaridade quanto a sua modulação frente a ambos estresses individuais. Em conclusão, plantas que denotam características de tolerância ao déficit hídrico tendem a superar a infecção por *R. solanacearum*, sendo o inverso não verdadeiro, ou seja, plantas que possuem características de resistência ao fitopatógeno não estão vinculados com o estresse de déficit hídrico. Dessa forma, análises mais aprofundadas a nível molecular e fisiológico são essenciais para concluir associações intrínsecas entre o atributo de resistência a *R. solanacearum* e o déficit hídrico em plantas, a fim de expandir os conhecimentos e desenvolver métodos eficazes visando mitigar os seus efeitos e auxiliar programas de melhoramento genético de plantas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-GHANY, S.E.; ULLAH, F.; BEN-HUR, A.; REDDY, A.S.N. Transcriptome Analysis of Drought-Resistant and Drought-Sensitive Sorghum (*Sorghum bicolor*) Genotypes in Response to PEG-Induced Drought Stress. **Int. J. Mol. Sci.** 21, 772, 2020.
- ALBINSKY, D. et al. Metabolomic screening applied to rice FOX Arabidopsis lines leads to the identification of a gene-changing nitrogen metabolism. **Mol. Plant**, 3, 125–142, 2010.
- AMBAWAT, S.; SHARMA, P.; YADAV, N. R. et al. MYB transcription factor genes as regulators for plant responses: an overview. **Physiol Mol Biol Plants** 19, 307–321, 2013.
- ANSARI, W. A. et al. Influence of drought stress on morphological, physiological and biochemical attributes of plants: A review. **Biosciences Biotechnology Research Asia**, v. 16, n. 4, p. 697-709, 2019.
- ASLAM, M.; WASSEM, M.; JAKDA, B. H.; OKAL, E. J.; LEI, Z.; SAQIB, H. S. A.; YUAN, W.; XU, W.; ZHANG, Q. Mechanisms of Abscisic Acid-Mediated Drought Stress Responses in Plants. **Int. J. Mol. Sci.**, 23, 1084, 2022.
- BAILLO, E. H. et al. Transcription Factors Associated with Abiotic and Biotic Stress Tolerance and Their Potential for Crops Improvement. **Genes**, 10 , 771, 2019.
- BALDONI, E. Improving drought tolerance: Can comparative transcriptomics support strategic rice breeding?. **Plant Stress**, v. 3, p. 100058, 2022.
- BASAL, O.; ANDRÁS, S.; SZILVIA, V. Physiology of soybean as affected by PEG-induced drought stress. **Current Plant Biology**. Volume 22, 2020.
- BENTI, E. A. Control of Bacterial Wilt (*Ralstonia solanacearum*) and Reduction of Ginger Yield Loss through Integrated Management Methods in Southwestern Ethiopia. **The Open Agriculture Journal**, v. 17, n. 1, 2023.
- BRUCKNER, F. P. et al. Translationally controlled tumour protein (TCTP) from tomato and *Nicotiana benthamiana* is necessary for successful infection by a potyvirus. **Molecular plant pathology**, v. 18, n. 5, p. 672-683, 2017.
- BULUT, H.; GÜRKAN, H. Drought stress due to climate change and effects on plants. February. CIA,(2019). **The World Factbook-Central Intelligence Agency**, 2017.
- BUSTAMANTE, M.; MATUS, J.; RIECHMANN, J. L. Genome-wide analyses for dissecting gene regulatory networks in the shoot apical meristem. **Journal of Experimental Botany** 67 (6): 1639- 1648. 2016.
- CABRERA, J. et al. A role for LATERAL ORGAN BOUNDARIES-DOMAIN 16 during the interaction *Arabidopsis-Meloidogyne* spp. provides a molecular link between lateral root and root-knot nematode feeding site development. **New Phytol.** 203, 632–645, 2014.

CALVETE, C. L.; CASEIRO, M. M.; SOUZA, C. B. Biotecnologia: transformação bacteriana por método de choque térmico. **Revista UNILUS Ensino e Pesquisa**. v. 12, n. 26, jan./mar. 2015.

CAPOBIANCO-URIARTE, M. M. et al. The European tomato market. An approach by export competitiveness maps. **PLOS ONE**. 16(5), 2021.

CHEN, J.; MOREAU, C.; LIU, Y.; KAWAGUCHI, M.; HOFER, J.; ELLIS, N.; CHEN, R. Conserved genetic determinant of motor organ identity in *Medicago truncatula* and related legumes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 109, 11723–11728, 2012.

CONTI, V.; ROMI, M.; GUARNIERI, M.; CANTINI, C.; CAI, G. Italian Tomato Cultivars under Drought Stress Show Different Content of Bioactives in Pulp and Peel of Fruits. **Foods** 11, 270, 2022.

CORNEJO-RÍOS, K. et al. Impact of *Trichoderma asperellum* on chilling and drought stress in tomato (*Solanum lycopersicum*). **Horticulturae**, v. 7, n. 10, p. 385, 2021.

DAS, A.; PRAMANIK, K.; SHARMA, R.; GANTAIT, S.; BANERJEE, J. In-silico study of biotic and abiotic stress-related transcription factor binding sites in the promoter regions of rice germin-like protein genes. **PLOS ONE**, 14, 2, 2019.

DUBOS, C. et al. MYB transcription factors in Arabidopsis. **Trends in Plant Science**, v. 15, Issue 10, P. 573-581, 2010.

EL-MOGY, M. M. et al. Towards Better Grafting: SCoT and CDDP Analyses for Prediction of the Tomato Rootstocks Performance under Drought Stress. **Agronomy** 12, 153, 2022.

ERPEN, L.; DEVI, H. S.; GROSSER, J. W. et al. Potential use of the DREB/ERF, MYB, NAC and WRKY transcription factors to improve abiotic and biotic stress in transgenic plants. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, 132, 1–25, 2018.

FAN, S. et al. The salicylic acid mediates selenium-induced tolerance to drought stress in tomato plants. **Scientia Horticulturae**, v. 300, 2022.

FAN, X. et al. Physiological response and phenolic metabolism in tomato (*Solanum lycopersicum*) mediated by silicon under *Ralstonia solanacearum* infection. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 17, n. 10, p. 2160-2171, 2018.

FATHI, Amin et al. Effect of drought stress and its mechanism in plants. **International Journal of Life Sciences**, v. 10, n. 1, p. 1-6, 2016.

FERNANDES-POZO, N. et al. The Sol Genomics Network (SGN) - do genótipo ao fenótipo ao melhoramento. **Nucleic Acids Res**. Volume 43, 2015.

FERREIRA, M. A.; MÁFIA, R. G.; ALFENAS, A. C. *Ralstonia solanacearum* decreases volumetric growth of trees and yield of kraft cellulose of Eucalyptus spp. **For Path**. 2018.

Food and Agriculture Organization of the United Nations, **FAO**. Crops and livestock products. 2021. URL: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>

Food and Agriculture Organization of the United Nations, **FAO**. Crops and livestock products. 2018. URL: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/>

FOYER, C. H. et al. Cross-tolerance to biotic and abiotic stresses in plants: a focus on resistance to aphid infestation. **Journal of Experimental Botany**, Volume 67, Issue 7, March Páginas 2025–2037, 2016.

FULLANA-PERICÀS, M. et al. Changes in yield, growth and photosynthesis in a drought-adapted Mediterranean tomato landrace (*Solanum lycopersicum* ‘Ramellet’) when grafted onto commercial rootstocks and *Solanum pimpinellifolium*. **Scientia Horticulturae**, Volume 233, Pages 70-77, ISSN 0304-4238, 2018.

GARCÍA, R. O.; KERNS, J. P.; THIESSEN, L. *Ralstonia solanacearum* Species Complex: A Quick Diagnostic Guide. **Plant Health Progress**. 20:1, 7-13, 2019.

GE, L. et al. Regulation of compound leaf development by PHANTASTICA in *Medicago truncatula*. **Plant Physiol**. 164, 216–228, 2014.

GERLIN, L. et al. Unravelling physiological signatures of tomato bacterial wilt and xylem metabolites exploited by *Ralstonia solanacearum*. **Environmental Microbiology**, v. 23, n. 10, p. 5962-5978, 2021.

GERVAIS, T. et al. Potato response to drought stress: Physiological and growth basis. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, 2021.

GIORDANO, M.; PETROPOULOS, S. A.; ROUPHAEL, Y. Response and defence mechanisms of vegetable crops against drought, heat and salinity stress. **Agriculture**, v. 11, n. 5, p. 463, 2021.

GOWTHAM, H.G. et al. Induction of drought tolerance in tomato upon the application of ACC deaminase producing plant growth promoting rhizobacterium *Bacillus subtilis* Rhizo SF 48. **Microbiological Research**, Volume 234, ISSN 0944-5013, 2020.

GRIMAUULT, V. et al. Comparative histology of resistant and susceptible tomato cultivars infected by *Pseudomonas solanacearum*. **Physiological and molecular plant pathology**, v. 44, n. 2, p. 105-123, 1994.

GUJI, M. J.; YETAYEW, H. T.; KIDANU, E. D. Yield loss of ginger (*Zingiber officinale*) due to bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) in different wilt management systems in Ethiopia. **Agric & Food Secur**. 8, 5, 2019.

GUPTA, A.; RICO-MEDINA, A.; CAÑO-DELGADO, A. I. The physiology of plant responses to drought. **Science**, v. 368, n. 6488, p. 266-269, 2020.

HASHIMOTO, M.; YAMAJI, Y.; KOMATSU, K. Analysis of Antiviral Resistance Signaling Pathways by Virus-Induced Gene Silencing in *Nicotiana benthamiana*. In: Kobayashi, K., Nishiguchi, M. (eds) Antiviral Resistance in Plants. **Methods in Molecular Biology**, vol 2028. Humana, New York, NY, 2019.

HELDERMAN, T. A. et al. Members of the ribosomal protein S6 (RPS6) family act as proviral factor for tomato spotted wilt orthotospovirus infectivity in *Nicotiana benthamiana*. **Molecular Plant Pathology**, 23, 431–446, 2022.

HINSERMU, M. Response of Tomato (*Solanum lycopersicum* M.) to Water Stress on Physiology, Yield and Quality: A Review. **International Journal of Research in Agriculture and Forestry**, v. 7, n. 9, p. 32-35, 2020.

HU, Y. et al. Lateral organ boundaries 1 is a disease susceptibility gene for citrus bacterial canker disease. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 111, P. 521–529, 2014.

HUANG, C. et al. *NbPHAN*, a MYB transcriptional factor, regulates leaf development and affects drought tolerance in *Nicotiana benthamiana*. **Physiol Plantarum**, 149: 297-309. 2013.

HUANG, S.; ZHANG, X.; FERNANDO, W. G. D. Directing Trophic Divergence in Plant-Pathogen Interactions: Antagonistic Phytohormones With NO Doubt? **Front. Plant Sci.** 2020.

HUSSAIN, Q.; ASIM, M.; ZHANG, R.; KHAN, R.; FARROQ, S.; WU, J. Transcription Factors Interact with ABA through Gene Expression and Signaling Pathways to Mitigate Drought and Salinity Stress. **Biomolecules**, 2021.

IBARROLA-RIVAS, M. J. et al. Telecoupling through tomato trade: what consumers do not know about the tomato on their plate. **Global Sustainability**, v. 3, p. e7, 2020.

IBRAHIM, M. F. M.; ELBAR, O. H. A.; FARAG, R.; HIKAL, M.; EL-KELISH, A.; EL-YAZIED, A. A.; ALKAHTANI, J.; EL-GAWAD, H. G. A. Melatonin Counteracts Drought Induced Oxidative Damage and Stimulates Growth, Productivity and Fruit Quality Properties of Tomato Plants. **Plants**, 9, 1276, 2020.

ILYAS, M. et al. Drought tolerance strategies in plants: a mechanistic approach. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 40, p. 926-944, 2021.

KAZEMIAN, M.; KAZEMI, E. M.; KOLAHI, M.; OMRAN, V. G. Identification and in silico analysis of PHANTASTICA gene in *Saintpaulia ionantha* H. Wendl (Gesneriaceae). **Turkish Journal of Botany**: Vol. 44: No. 4, Article 4. 2020.

KISSOUDIS, C. et al. Enhancing crop resilience to combined abiotic and biotic stress through the dissection of physiological and molecular crosstalk. **Frontiers in Plant Science**, Volume 5, pages 207, ISSN=1664-462X, 2014.

KRISHNA, R.; ANSARI, W. A.; JAISWAL, D. K. et al. Overexpression of *AtDREB1* and *BcZAT12* genes confers drought tolerance by reducing oxidative stress in double transgenic tomato (*Solanum lycopersicum* L.). **Plant Cell Rep** 40, 2173–2190, 2021.

KRISHNA, R.; ANSARI, W. A.; SOUMIA, P. S.; YADAV, A.; JAISWAL, D. K.; KUMAR, S.; SINGH, A. K.; SINGH, M.; VERMA, J. P. Biotechnological Interventions in Tomato (*Solanum lycopersicum*) for Drought Stress Tolerance: Achievements and Future Prospects. **BioTech**, 11, 48, 2022.

KURABACHEW, H.; AYANA, G. Bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* in Ethiopia: status and management approaches: a review. **Int. J. Phytopathol.** 05 (03), 107-119, 2016.

LI, J. et al. Influence of drought stress on photosynthetic characteristics and protective enzymes of potato at seedling stage. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, Volume 16, Issue 1, P. 82-88, ISSN 1658-077X, 2017.

LI, X. Infiltration of *Nicotiana benthamiana* Protocol for Transient Expression via Agrobacterium. **Bio-101**: e95. 2011.

LIANG, G; LIU, J.; ZHANG, J; GUO, J. Effects of Drought Stress on Photosynthetic and Physiological Parameters of Tomato. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, 145(1), 12-17, 2020.

LIU, L. et al. CRISPR/Cas9 targeted mutagenesis of SILBD40, a lateral organ boundaries domain transcription factor, enhances drought tolerance in tomato. **Plant Science**, Volume 301, 2020.

LIU, S.; LV, Z.; LIU, Y.; LI, L.; ZHANG, L. Network analysis of ABA-dependent and ABA-independent drought responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. **Genetics and Molecular Biology**, 41(3), 624–637, 2018.

LIU, T.; CHEN, T. et al. The GhMYB36 transcription factor confers resistance to biotic and abiotic stress by enhancing PR1 gene expression in plants. **Plant Biotechnol. J.**, 2022.

LIU, Y.; SCHIFF, M.; MARATHE, R.; DINESH-KUMAR, S. P. Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. **Plant J.** May;30(4):415-29, 2002.

LOPES, C. A.; ROSSATO, M. History and Status of Selected Hosts of the *Ralstonia solanacearum* Species Complex Causing Bacterial Wilt in Brazil. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2018.

LOPES, G. L. et al. Combining ability of tomato inbred lines to bacterial wiltresistance. **Bragantia**, v. 81, 2022.

LOPES, G. L.; LOPES, C. A.; NOMURA, J. V.; NANDI, G.; PIOTTO, F. A. Combining ability of tomato inbred lines to bacterial wilt resistance. **Bragantia**, 81, 2022.

LOWE-POWER, T. M.; KHOKHANI, D.; ALLEN, C. How *Ralstonia solanacearum* exploits and thrives in the flowing plant xylem environment. **Trends Microbiol.** 26, 929–942, 2018.

MACLNTYRE, A. M. et al. Trehalose increases tomato drought tolerance, induces defenses, and increases resistance to bacterial wilt disease. **PLOS One**, v. 17, n. 4, 2022.

MACLNTYRE, A. M. et al. Trehalose increases tomato drought tolerance, induces defenses, and increases resistance to bacterial wilt disease. **PLOS One**, v. 17, n. 4, p. e0266254, 2022.

MAHPARA, S.; ZAINAB, A.; ULLAH, R.; KAUSAR, S.; BILAL, M. et al. The impact of PEG-induced drought stress on seed germination and seedling growth of different bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. **PLOS ONE** 17(2): 2022.

- MANGEON, A.; BELL, E. M.; LIN, W. C.; JABLONSKA, B.; SPRINGER, P. S. Misregulation of the LOB domain gene DDA1 suggests possible functions in auxin signalling and photomorphogenesis. **J. Exp. Bot.** 62, 221–233, 2011.
- MANSFIELD, J. et al. Top 10 plant pathogenic bacteria in plant molecular pathology. **Molecular Plant Pathology**, 13: 614-629, 2012.
- MARTIN, J. et al. A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. **Science**, 816-821, 2012.
- MASOUMI, Z.; HAGHIGHI, M.; JALALI, S. A. H. Flooding or drought which one is more offensive on pepper physiology and growth?. **Molecular Biology Reports**, v. 48, p. 4233-4245, 2021.
- MATUS, J. T.; AQUEA, F.; ARCE-JOHNSON, P. Analysis of the grape MYB R2R3 subfamily reveals expanded wine quality-related clades and conserved gene structure organization across *Vitis* and *Arabidopsis* genomes. **BMC Plant Biol.** 8: 83, 2008.
- MILLONES-CHANAMÉ, C. E. et al. Inheritance of blossom end rot resistance induced by drought stress and of associated stomatal densities in tomatoes. **Euphytica**, v. 215, p. 1-10, 2019.
- MINGCHI, L. et al. Effect of simulated drought stress on plant growth, yield and fruit properties of tomato. **Acta horticulturae**, v. 856, p. 193-202, 2010.
- MOLES, T. M. et al. Drought induced changes of leaf-to-root relationships in two tomato genotypes. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 128, p. 24-31, 2018.
- MUÑOZ-ESPINOZA, V. A. et al. Water Stress Responses of Tomato Mutants Impaired in Hormone Biosynthesis Reveal Abscisic Acid, Jasmonic Acid and Salicylic Acid Interactions. **Frontiers in Plant Science**, vol. 6, 2015.
- MUTHONI, J.; SHIMELIS, H.; MELIS, R. Conventional breeding of potatoes for resistance to bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*): any light in the horizon?. **Australian Journal of Crop Science**, v. 14, n. 3, p. 485-494, 2020.
- NAKANO, M.; ODA, K.; MUKAIHARA, T. *Ralstonia solanacearum* novel E3 ubiquitin ligase (NEL) effectors RipAW and RipAR suppress pattern-triggered immunity in plants. **Microbiology**, 163, 992 – 1002, 2017
- NASIR, M. W.; TOTH, Z. Response of different potato genotypes to drought stress. **Agriculture**, v. 11, n. 8, p. 763, 2021.
- NATH, V.S.; MISHRA, A.K.; KUMAR, A.; MATOUSEK, J.; JAKSE, J. Revisiting the role of transcription factor in coordinating the defense response against Citrus Bark Cracking Viroid infection in commercial hop (*Humulus lupulus* L.). **Viruses J.** 11, 419, 2019.
- NAVEED, M. S. et al. In-vitro screening of different tomato genotypes against peg induced water stress. **World Journal of Biology and Biotechnology**, [S.l.], v. 4, n. 3, p. 15-19, dec. 2019.

NEMESKÉRI, E.; HELYES, L. Physiological responses of selected vegetable crop species to water stress. **Agronomy**, v. 9, n. 8, p. 447, 2019.

NURUZZAMAN M.; SHARONI, A. M.; KIKUCHI, S. Roles of NAC transcription factors in the regulation of biotic and abiotic stress responses in plants. **Frontiers in Microbiology**, Vol.4, 2013.

OLWE, O. M. et al. Trichoderma: Potential bio-resource for the management of tomato root rot diseases in Africa. **Microbiological Research**, Volume 257, ISSN 0944-5013, 2022.

PAES DE MELO, B. et al. Abiotic stresses in plants and their markers: a practice view of plant stress responses and programmed cell death mechanisms. **Plants**, v. 11, n. 9, p. 1100, 2022.

PANDEY, P. et al. Impact of combined abiotic and biotic stresses on plant growth and avenues for crop improvement by exploiting physiomorphological traits. **Frontiers in Plant Science**, Volume 8, pages 537, ISSN=1664-462X, 2017.

PAUDEL, S.; DOBHAL, S.; ALVAREZ, A. M.; ARIF, M. Taxonomy and Phylogenetic Research on *Ralstonia solanacearum* Species Complex: A Complex Pathogen with Extraordinary Economic Consequences. **Pathogens**. 9, 886, 2020.

PLANAS-MARQUES, M. et al. Protease activities triggered by *Ralstonia solanacearum* infection in susceptible and tolerant tomato lines. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 17, n. 6, p. 1112-1125, 2018.

POUSSIER, S. et al. Partial sequencing of the *hrpB* and endoglucanase genes confirms and expands the known diversity within the *Ralstonia solanacearum* species complex. **Syst Appl Microbiol**. 23:479–486, 2000.

PRIOR, P. et al. Genomic and proteomic evidence supporting the division of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* into three species. **BMC Genomics**. 17 , 90, 2016.

RAZI, K.; MUNEER, S. Drought stress-induced physiological mechanisms, signaling pathways and molecular response of chloroplasts in common vegetable crops. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 41, n. 5, p. 669-691, 2021.

RAZI, K.; MUNEER, S. Drought stress-induced physiological mechanisms, signaling pathways and molecular response of chloroplasts in common vegetable crops, **Critical Reviews in Biotechnology**, 41:5, 669-691, 2021.

RIGANO, M. M. et al. Eco-physiological response to water stress of drought-tolerant and drought-sensitive tomato genotypes. **Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology**, v. 150, n. 4, p. 682-691, 2016.

SAFNI, I. et al. Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygi* subsp. *Indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov.

and *R. solanacearum* phylotype I and III strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. **Int J Syst Evol Microbiol.** 64:3087–3103, 2014.

SAKTHIVEL, K. et al. Diversity of *Ralstonia solanacearum* strains on the Andaman Islands in India. **Plant Dis** 100:732–738, 2016.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. The Hanahan Method for Preparation and Transformation of Competent *E. coli*: High-Efficiency Transformation. **Molecular cloning**. p. 9.16-9.17. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001.

SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, E. et al. Genotypic differences in some physiological parameters symptomatic for oxidative stress under moderate drought in tomato plants. **Plant science**, v. 178, n. 1, p. 30-40, 2010.

SANTIAGO, T. R. et al. Phylotype and sequevar variability of *Ralstonia solanacearum* in Brazil, an ancient centre of diversity of the pathogen. **Plant Pathol.** 66, 383–392, 2017.

SELEIMAN, M. F. et al. Drought Stress Impacts on Plants and Different Approaches to Alleviate Its Adverse Effects. **Plants** 10, no. 2:259, 2021.

SHARMA, P. et al. Meta-analysis of the *Ralstonia solanacearum* species complex (RSSC) based on comparative evolutionary genomics and reverse ecology. **Microb Genom.** 2022.

STRACKE R.; WERBER, M.; WEISSHAAR, B. The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. **Curr Opin Plant Biol.** 4: 447–456, 2001.

SUJIT, R. Function of MYB domain transcription factors in abiotic stress and epigenetic control of stress response in plant genome. **Plant Signaling & Behavior**, 11:1, 2016.

SZCZEPANIEC, A.; FINKE, D. Plant-Vector-Pathogen Interactions in the Context of Drought Stress. **Front. Ecol. Evol.** 7:262, 2019.

THATCHER, L. F.; KAZAN, K.; MANNERS, J. M. Lateral organ boundaries domain transcription factors: New roles in plant defense. **Plant Signal. Behav.**, 7, 1702–1704, 2012.

TOLOSA, L. N.; ZHANG, Z. The Role of Major Transcription Factors in Solanaceous Food Crops under Different Stress Conditions: Current and Future Perspectives. **Plants**, 9, 56, 2020.

TOSCANO, S.; FERRANTE, A.; ROMANO, D. Response of Mediterranean ornamental plants to drought stress. **Horticulturae**, v. 5, n. 1, p. 6, 2019.

TU, Y. K. et al. A 1D-SP-Net to determine early drought stress status of tomato (*Solanum lycopersicum*) with imbalanced Vis/NIR spectroscopy data. **Agriculture**, v. 12, n. 2, p. 259, 2022.

VENTIMILLA, D. et al. IDA (INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION)-like peptides and HAE (HAESA)-like receptors regulate corolla abscission in *Nicotiana benthamiana* flowers. **BMC Plant Biol** 21, 226, 2021.

WAITES, R.; HUDSON, A. *phantastica*: a gene required for dorsoventrality of leaves in *Antirrhinum majus*. **Development.** 121 (7): 2143–2154, 1995.

WANG, W. et al. Animal-derived plant biostimulant alleviates drought stress by regulating photosynthesis, osmotic adjustment, and antioxidant systems in tomato plants. **Scientia Horticulturae**, v. 305, p. 111365, 2022.

WICKER, E. et al. Contrasting recombination patterns and demographic histories of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from MLSA. **ISME J.** 6, 961–974, 2012.

WU, Y. et al. Evolution and functional diversification of R2R3-MYB transcription factors in plants. **Horticulture Research**, Volume 9, 2022.

XU, A. et al. ETI signaling nodes are involved in resistance of Hawaii 7996 to *Ralstonia solanacearum*-induced bacterial wilt disease in tomato. **Plant Signaling & Behavior**, v. 18, n. 1, 2023.

XU, C.; LUO, F.; HOCHHOLDINGER, F. LOB domain proteins: Beyond lateral organ boundaries. **Trends Plant Sci.** 21, 159–167, 2016.

XUE, H.; LOZANO-DURÁN, R.; MACHO, A. P. Insights into the root invasion by the plant pathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum*. **Plants**, v. 9, n. 4, p. 516, 2020. FANG, Yujie;

XIONG, Lizhong. General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. **Cellular and molecular life sciences**, v. 72, p. 673-689, 2015.

YANG, H.; LUO, P. Changes in photosynthesis could provide important insight into the interaction between wheat and fungal pathogens. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 16, p. 8865, 2021.

YANG, X.; LU, M.; WANG, Y.; WANG, Y.; LIU, Z.; CHEN, S. Response Mechanism of Plants to Drought Stress. **Horticulturae** 2021, 7, 50.

YOU, J. et al. Transcriptomic and metabolomic profiling of drought-tolerant and susceptible sesame genotypes in response to drought stress. **BMC plant biology**, v. 19, n. 1, p. 1-16, 2019. **iculture, Environment and Biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 53-61, 2016.

YU, W.; MACHO, A.P. A Fast and Easy Method to Study *Ralstonia solanacearum* Virulence upon Transient Gene Expression or Gene Silencing in *Nicotiana benthamiana* Leaves. **Bio Protoc.** Aug 5;11(15), 2021.

ZHANG, H. et al. Abiotic stress responses in plants. **Nature Reviews Genetics**, v. 23, n. 2, p. 104-119, 2022.

ZHOU, C.; HAN, L.; FU, C.; CHAI, M.; ZHANG, W.; LI, G.; TANG, Y.; WANG, Z. Y. Identification and characterization of petiolule-like pulvinus mutants with abolished nyctinastic leaf movement in the model legume *Medicago truncatula*. **New Phytol.** 196, 92– 100, 2012.

ZHU, X.; LIU, S.; MENG, C. et al. WRKY Transcription Factors in Wheat and Their Induction by Biotic and Abiotic Stress. **Plant Mol Biol Rep** 31, 1053–1067, 2013.

ZOU, B. et al. AtMYB44 positively modulates disease resistance to *Pseudomonassyringae* through the salicylic acid signalling pathway in *Arabidopsis*. **Functional Plant Biology** 40, 304-313, 2013.

MATERIAL SUPLEMENTAR

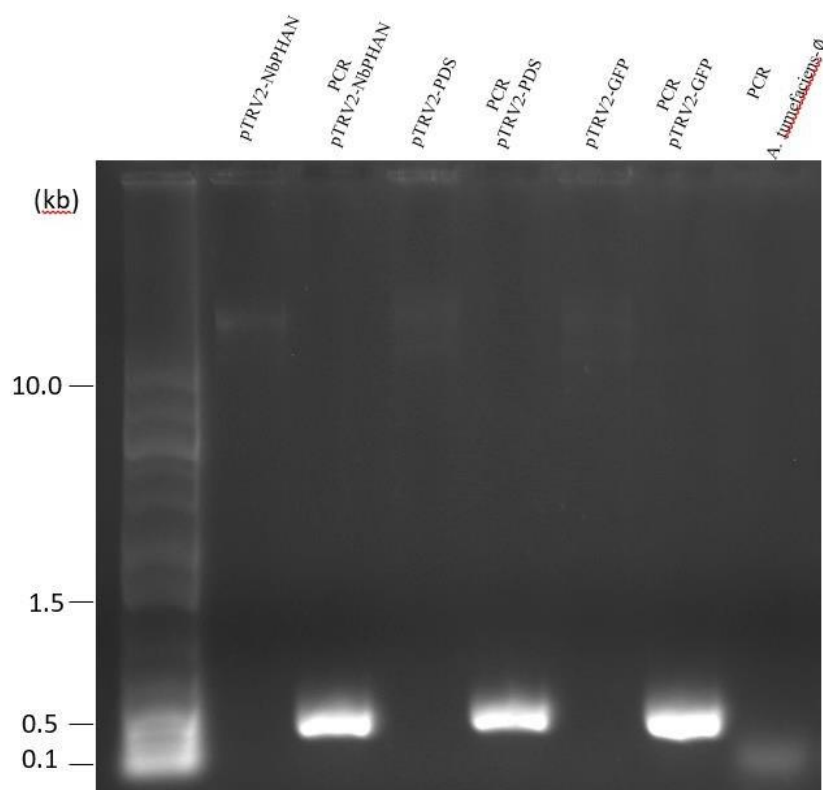


Figura Suplementar 1. Perfil de amplificação de bandas de 367 pares de bases (utilizando oligonucleotídeos específicos para o pTRV2) usando como molde as construções pTRV2::*NbPHAN*, pTRV2::*NbPDS* e pTRV2::*GFP* extraídas de *Agrobacterium tumefaciens* C58CI transformadas por choque térmico visando a validação da transformação de *A. tumefaciens*. Para controle negativo utilizou-se *A. tumefaciens* não transformada.

Fonte: elaborado pelo autor (2023).

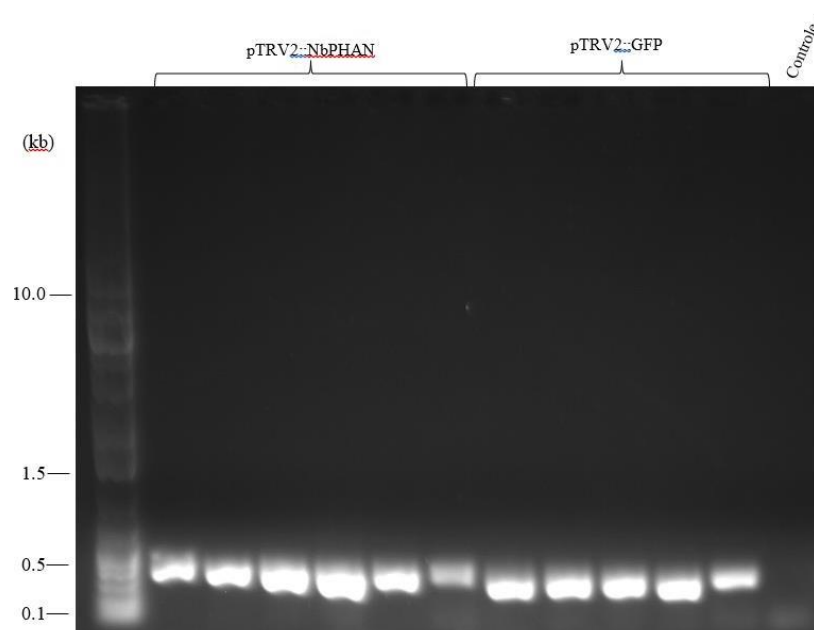


Figura Suplementar 2. Perfil de amplificação da reação de RT-PCR para validar o movimento sistêmico do RNA2 e infecção do *Tobacco rattle virus* (TRV) viral em plantas de *N. benthamiana* não silenciadas (pTRV2::*GFP*) e silenciadas para *NbPHAN* (pTRV2::*NbPHAN*). No total, foram analisadas 6 amostras experimentais de pTRV2::*NbPHAN* e 5 amostras experimentais de pTRV2::*GFP*.

Fonte: elaborado pelo autor (2023).

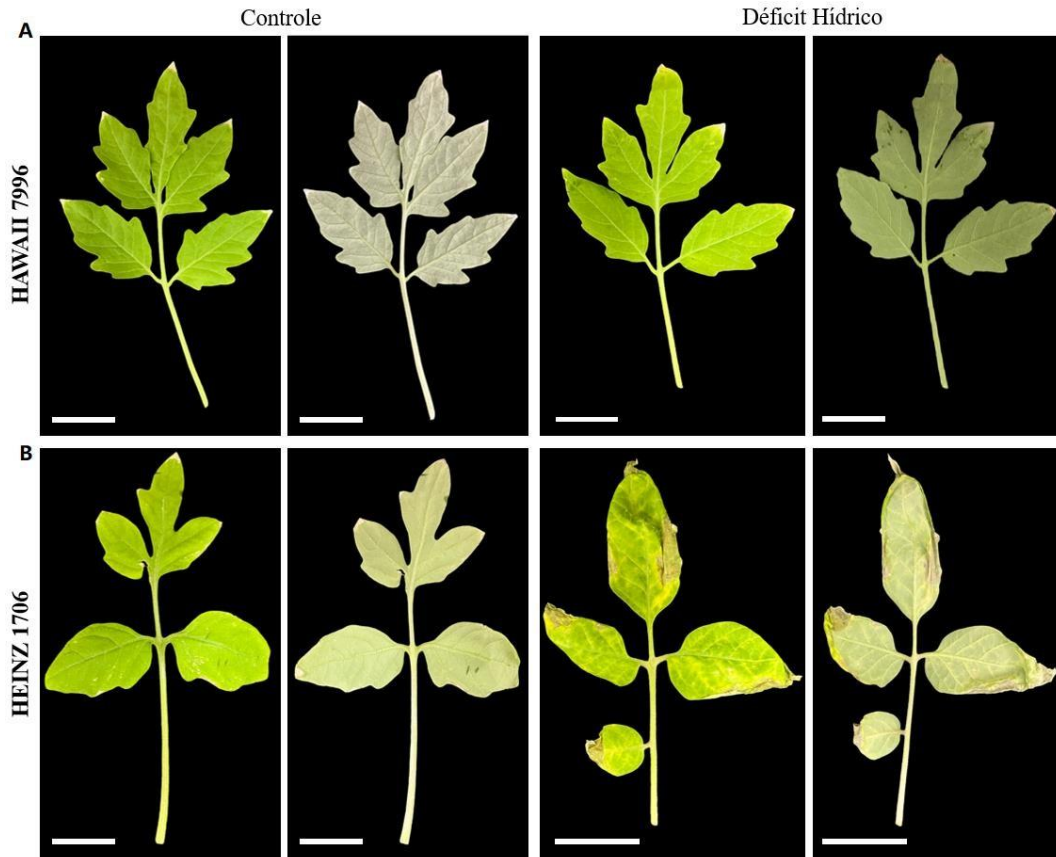


Figura Suplementar 3. Avaliação qualitativa e comparação do dano oxidativo da segunda folha verdadeira entre os genótipos de *S. lycopersicum* Hawaii 7996 (resistente) e Heinz 1706 (suscetível) a *R. solanacearum*, submetidos ou não ao déficit hídrico após 25 dias de experimentação. No tratamento de seca induzida, o genótipo Hawaii 7996 não apresentou danos oxidativos no tecido foliar, ao contrário, o genótipo Heinz 1706 exibiu, clorose, amarelecimento e necrose nas folhas. (Faixa de escala = 1 cm).

Fonte: elaborado pelo autor (2023).

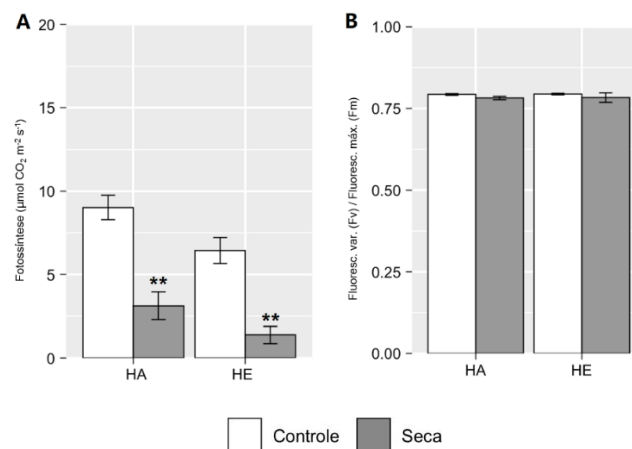


Figura Suplementar 4. Análise da fotossíntese e relação Fv/Fm do fotossistema II nos genótipos de *S. lycopersicum* Hawaii 7996 (HA) e Heinz 1706 (HE), respectivamente resistente e suscetível a *R. solanacearum*, submetidos ou não ao déficit hídrico. (A) taxa de fotossíntese e (B) relação fluorescência variável (Fv) por fluorescência máxima (Fm) (Fv/Fm). As diferenças estatísticas entre as médias foram consideradas pelos valores significativos até 5% de probabilidade ($p < 0,05$). *, ** e *** representam diferença significativa a 5, 1 e 0,1%, respectivamente, após uma análise de variância (anova) e teste de média (t de Student).

Fonte: elaborado pelo autor (2023).

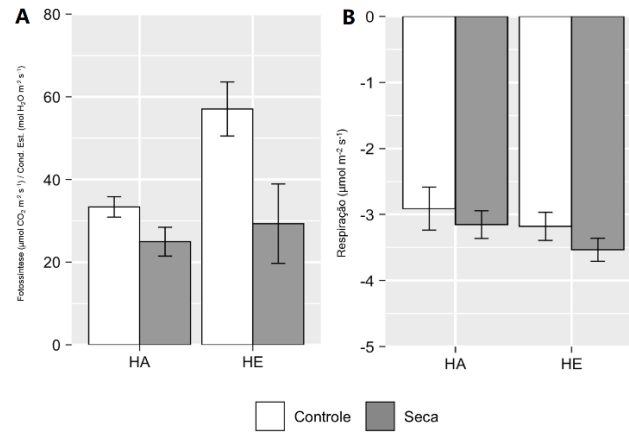


Figura Suplementar 5. Análise dos parâmetros complementares de trocas gasosas nos genótipos de *S. lycopersicum* Hawaii 7996 (HA) e Heinz 1706 (HE), respectivamente resistente e suscetível a *R. solanacearum*, submetidos ou não ao déficit hídrico. (A) relação fotossíntese por condutância estomática e (B) taxa de respiração. As diferenças estatísticas entre as médias foram consideradas pelos valores significativos até 5% de probabilidade ($p < 0,05$). *, ** e *** representam diferença significativa a 5, 1 e 0,1%, respectivamente, após uma análise de variância (anova) e teste de média (t de Student).

Fonte: elaborado pelo autor (2023).