

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**ANÁLISE DE RESPOSTA IMUNE DE PLANTA INDUZIDA POR VESÍCULAS
EXTRACELULARES DE RALSTONIA PSEUDOSOLANACEARUM**

Phedra Gusmão da Silva de Oliveira
Magister Scientiae

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2024**

PHEDRA GUSMÃO DA SILVA DE OLIVEIRA

**ANÁLISE DE RESPOSTA IMUNE DE PLANTA INDUZIDA POR VESÍCULAS
EXTRACELULARES DE RALSTONIA PSEUDOSOLANACEARUM**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Poliane Alfenas Zerbini

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2024**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

O48a
2024

Oliveira, Phedra Gusmão da Silva de, 1996-

Análise de resposta imune de planta induzida por vesículas extracelulares de *Ralstonia pseudosolanacearum* / Phedra Gusmão da Silva de Oliveira. – Viçosa, MG, 2024.

1 dissertação eletrônica (57 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Poliane Alfenas Zerbini.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Microbiologia, 2024.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.744>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Plantas - Resistência a doenças e pragas. 2. Vesículas extracelulares. 3. *Ralstonia pseudosolanacearum*. I. Zerbini, Poliane Alfenas, 1977-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Microbiologia. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola. III. Título.

CDD 22. ed. 632.32

PHEDRA GUSMÃO DA SILVA DE OLIVEIRA

**ANÁLISE DE RESPOSTA IMUNE DE PLANTA INDUZIDA POR VESÍCULAS
EXTRACELULARES DE RALSTONIA PSEUDOSOLANACEARUM**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister*

APROVADA: 30 de agosto de 2024.

Assentimento:

Phedra Gusmão da Silva de Oliveira
Autora

Poliane Alfenas Zerbini
Orientadora

Essa dissertação foi assinada digitalmente pela autora em 11/11/2024 às 15:51:43 e pela orientadora em 11/11/2024 às 16:10:54. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **YH9E.K7AV.OG90** e clique no botão 'Validar documento'.

Dedicado a Gersonita Gusmão, que onde estiver, estará orgulhosa.

AGRADECIMENTOS

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

Primeiramente, um agradecimento especial a Deus e todos os Orixás por me guiar até o presente momento, que veio de uma longa e difícil caminhada, mas que no final me deu frutos pra vida toda. Minha mãe Sandra, minha rainha, o agradecimento não são só para esse momento, mas para a vida toda, por ser meu suporte e alicerce em absolutamente tudo. A Ian, um obrigada especial, que desde o começo segura as pontas comigo, e deixa tudo mais leve, até as barras mais pesadas, sem seu companheirismo grandes chances de ter desistido no meio do processo.

Agradeço a professora Poliane, pela orientação, apoio, incentivo, suporte e pela oportunidade de concluir esse trabalho e a realização do sonho de mestrado, foram muitos aprendizados tanto no aspecto profissional tanto no pessoal, que serão de grande utilidade para o resto da vida. Aos meus colegas do Laboratório de Vírus, por todo incentivo, conversas, e ajuda e principalmente risadas que me foram dadas, em especial a Rafael e Giarlã, meus “padrastos” que fizeram de tudo e mais um pouco para que tudo desse certo na medida do possível.

Ao professor Leandro Licursi, por toda ajuda e paciência e ensinamentos durante momentos importantes do projeto, ao Núcleo de Microscopia e Macromolécula pela disponibilização do espaço e equipamentos.

Aos professores Tiago Mendes e Cynthia Silva, pela generosidade ao uso do espaço e equipamentos dos seus respectivos laboratórios, Laboratório de Biotecnologia Molecular e Laboratório Microbiologia Ambiental Aplicada.

Agradeço muito a professora Denise Bazzolli, pelos conselhos e ensinamentos nas aulas durante a graduação e pós-graduação, em especial a disciplina sobre Vesículas, na qual me proporcionou conhecimento o suficiente para desenvolver e concluir o trabalho, com certeza a melhor disciplina cursada no mestrado.

Agradeço aos projetos de extensão Coral Voix-lá e CARREIRAS, nas pessoas que conheci e levo comigo, especificamente as minhas “contralters” do coral, por todas os momentos e conversas que deixaram o caminho árduo do mestrado mais leve, e que me curaram das dificuldades que enfrentei e me possibilitou concluir mais essa etapa da minha vida

com alegria.

Um agradecimento especial a todos os meus amigos, dentro e fora da universidade, dentro e fora do âmbito profissional, dentro e fora de Viçosa, os de “rolê” e os “veganos”, a cada um que passou pela minha trajetória, na graduação e na pós-graduação, os que passaram e os que permaneceram até o momento, saibam que fizeram toda a diferença para a conquista não só desse título, mas também de toda a minha evolução e maturidade para seguir esse caminho caótico e doido chamado vida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio técnico financeiro, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

*"Lili is a girl, almost twenty-five
Her black skin is gold, wears no makeup when she cries
With her intuition, she crossed her soul
Jumped in the water, looking at the world
Lili goes, Lili goes, Lili goes on
Dreaming
Lili goes, Lili goes, Lili goes on
Flying
Lili goes, Lili goes, Lili goes on*

.

.

.

*When you take care of your heart, when you love your
soul*

*Maybe you can find Lili
She isn't hiding anymore
She just wants to live"*

(Liniker)

RESUMO

OLIVEIRA, Phedra Gusmão da Silva de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2024. **ANÁLISE DE RESPOSTA IMUNE DE PLANTA INDUZIDA POR VESÍCULAS EXTRACELULARES DE *Ralstonia pseudosolanacearum***. Orientadora: Poliane Alfenas Zerbini.

O Complexo de Espécies *Ralstonia solanacearum* (CERS) é composto por bactérias Gram-negativas fitopatogênicas, causadoras da murcha bacteriana, de grande importância no setor agrícola. Esse complexo é formado por três espécies (*R. solanacearum*, *R. pseudosolanacearum* e *R. syzygii*), classificadas em quatro filotipos distribuídos em diferentes regiões geográficas no mundo. A alta diversidade genética, combinada com ampla gama de hospedeiros e alta taxa de sobrevivência da bactéria na ausência de uma planta hospedeira torna a doença de difícil controle. Neste contexto, a utilização de bacteriófagos tem se mostrado uma estratégia promissora para o controle da murcha bacteriana causada pelas bactérias do CERS. Os vírus que infectam bactérias podem se multiplicar de várias maneiras, resultando em diferentes consequências para o hospedeiro, desde a lise celular até infecções crônicas. As infecções crônicas, por sua vez, podem induzir alterações fenotípicas significativas no hospedeiro, afetando características como patogenicidade, crescimento, formação de biofilme entre outras. Vírus classificados na família *Inoviridae* são vírus que infectam bactérias de forma crônica, e, como consequência desta estratégia de multiplicação, causam diversas modificações fenotípicas nas células infectadas, incluindo alteração da agressividade em bactérias patogênicas. Uma das alterações já descritas é afetar a produção e composição das vesículas extracelulares bacterianas (VEBs). VEBs são nanopartículas complexas de composição e estrutura variável de acordo com o momento fisiológico e interação com o ambiente em que a bactéria está inserida. Com diversas funções, as VEBs podem ser carreadoras de fatores de virulência bastante eficientes, e induzir a resposta imune em plantas ativando mecanismos de resposta de defesa e necrose. Entretanto a resposta imune da planta em resposta à presença de vesículas extracelulares produzidas por bactérias fitopatogênicas tem sido pouco explorada. O objetivo deste trabalho foi caracterizar VEBs produzidas por *Ralstonia pseudosolanacearum*, infectadas pelo *Ralstonia solanacearum* inovirus brazil 1 (RSIBR1), analisar a resposta imune de plantas e

possibilidade de imunização contra a murcha bacteriana por VEBs no processo de infecção por *R. pseudosolanacearum*. O tamanho das vesículas de bactérias não infectadas foi homogêneo, em contraste com bactérias infectadas, onde o tamanho das vesículas produzidas foi bastante heterogêneo. A produção de VEBs também foi afetada em bactérias infectadas pelo inovírus, com dez vezes menos vesículas produzidas quando comparadas com bactérias não infectadas. As vesículas purificadas a partir de culturas de bactérias infectadas e não infectadas causaram reação de hipersensibilidade e necrose tecidual em folhas de tomate, sendo possível observar um perfil fenotípico de resposta mais intensa em plantas infiltradas com VEBs purificadas, a partir da bactéria infectada. A expressão relativa dos genes das proteínas de patogênese classe 1a (*pr1A*), e semelhante a osmotina (*oIP*) do sistema imune de plantas, obteve um aumento significativo para VEBs purificadas a partir de bactérias infectadas em relação as VEBs de bactérias não infectadas, nos dois períodos de avaliação. A infiltração de plantas com vesículas causou proteção parcial em plantas de tomate contra a murcha bacteriana, com sintomas brandos e reduzida taxa de mortalidade. Esse foi o primeiro relato de VEBs de *R. pseudosolanacearum* causarem proteção e contra efeitos graves da murcha bacteriana, sendo necessário maior investigação do conteúdo presente nas vesículas.

Palavras-chave: vesículas extracelulares; *ralstonia spp.*; sistema imune de planta

ABSTRACT

OLIVEIRA, Phedra Gusmão da Silva de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2024. **ANALYSIS OF PLANT IMMUNE RESPONSE INDUCED BY EXTRACELLULAR VESICLES OF *Ralstonia solanacearum***. Adviser: Poliane Alfenas Zerbini.

The *Ralstonia solanacearum* Species Complex (RSSC) comprises Gram-negative phytopathogenic bacteria responsible for bacterial wilt, a disease of great importance in agriculture. This complex consists of three species (*R. solanacearum*, *R. pseudosolanacearum*, and *R. syzygii*), classified into four phylogenetic groups distributed across different geographical regions worldwide. The high genetic diversity, combined with a wide range of hosts and a high survival rate of the bacteria in the absence of a host plant, makes the disease difficult to control. In this context, the use of bacteriophages has proven to be a promising strategy for managing bacterial wilt caused by RSSC bacteria. Viruses that infect bacteria can multiply in various ways, resulting in different consequences for the host, ranging from cell lysis to chronic infections. Chronic infections, in turn, can induce significant phenotypic alterations in the host, affecting characteristics such as pathogenicity, growth, and biofilm formation, among others. Viruses classified in the family *Inoviridae* are viruses that chronically infect bacteria. As a consequence of this multiplication strategy, they cause various phenotypic modifications in the infected cells, including changes in aggressiveness in pathogenic bacteria. One of the alterations already described is the effect on the production and composition of bacterial extracellular vesicles (EVs). EVs are complex nanoparticles with variable composition and structure depending on the physiological state and interaction with the environment in which the bacterium is situated. With various functions, EVs can carry highly efficient virulence factors and induce plant immune responses by activating defense response mechanisms and necrosis. However, the immune response of plants in response to the presence of extracellular vesicles produced by phytopathogenic bacteria has yet to be explored. The objective of this study was to characterize EVs produced by *Ralstonia pseudosolanacearum* infected by *Ralstonia solanacearum* inovirus brazil 1 (RSIBR1), analyze the immune response of plants, and investigate the possibility of immunization against bacterial wilt through EVs during the infection process by *R.*

pseudosolanacearum. The size of vesicles from uninfected bacteria was homogeneous, in contrast to infected bacteria, where the size of the produced vesicles was quite heterogeneous. The production of EVs was also affected in bacteria infected by the inovirus, with ten times fewer vesicles produced compared to uninfected bacteria. The purified vesicles from infected and uninfected bacteria cultures caused hypersensitivity reactions and tissue necrosis in tomato leaves, with a more intense phenotypic response observed in plants infiltrated with purified EVs from the infected bacteria. The relative expression of class 1a pathogenesis-related protein genes (*pr1A*) and osmotin-like protein (*oIP*) in the plant immune system showed a significant increase for purified EVs from infected bacteria compared to uninfected bacteria during both evaluation periods. The infiltration of plants with vesicles partially protected tomato plants against bacterial wilt, resulting in mild symptoms and reduced mortality rates. This is the first report of EVs from *R. pseudosolanacearum* providing protection against severe effects of bacterial wilt, warranting further investigation of the content present in the vesicles.

Keywords: extracellular vesicles; *ralstonia spp.*; plant's immune system

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	12
1.1. Vesículas Extracelulares Bacterianas (VEBs).....	12
1.2. Interação VEB-planta.....	15
1.3. <i>Ralstonia solanacearum</i>	20
1.4. Inovírus.....	23
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
2.1. Crescimento bacteriano.....	27
2.2. Isolamento de VEBs.....	27
2.3. Determinação de tamanho das VEBs.....	28
2.4. Quantificação da VEBs.....	28
2.5. Infiltração de plantas com VEBs.....	28
2.6. Análise da expressão gênica.....	29
2.7. Análise estatística.....	30
3. RESULTADOS.....	31
3.1. Caracterização de VEBs.....	31
3.2. Hipersensibilidade causada por VEBs.....	32
3.3. Expressão dos genes <i>pr1A</i> e <i>olP</i> em plantas infiltradas com VEBs.....	33
3.4. VEBs foram capazes de imunização.....	35
4. DISCUSSÃO.....	37
5. CONCLUSÕES.....	41
REFERÊNCIAS.....	42
ANEXO.....	54

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Vesículas Extracelulares Bacterianas (VEBs)

Vesículas extracelulares são produzidas por organismos de todos os domínios da vida, variando em origem, tamanho, composição e função (JUODEIKIS; CARDING, 2022), e desempenham um papel fundamental na interação dos organismos com o ambiente (GILMORE et al., 2021; XIAO; LI; YANG, 2023). As vesículas extracelulares bacterianas (VEBs) representam um exemplo dessas vesículas, com composição complexa e geralmente relacionadas aos componentes presentes nas células de origem. Elas são produzidas por diferentes mecanismos, e o tamanho pode variar entre 20 e 400 nm em diâmetro (TOYOFUKU et al., 2023).

O primeiro relato da ocorrência das VEBs foi na década de 1960, quando foi demonstrada a existência de uma relação entre nanopartículas lipopolissacarídicas derivadas de *Escherichia coli* e lisinas presentes no meio de cultivo, que estimulavam a produção das VEBs. A evidência foi documentada por meio de observações realizadas com microscopia eletrônica, o que demonstrou a relevância das VEBs e suas funções no contexto bacteriano (KNOX; VESK; WORK, 1966).

Nas bactérias Gram-negativas, as VEBs podem ser formadas a partir de bolhas na membrana externa (OM) resultantes da alteração de sua flexibilidade. Uma das evidências para tais distúrbios é o desequilíbrio na biossíntese de peptidoglicano, o acúmulo de proteínas mal dobradas, em processo de degradação, ou de moléculas hidrofóbicas de importância para a manutenção do equilíbrio físico-químico da OM e do espaço intermembrana durante o crescimento celular. Todas essas alterações levam à produção de vesículas de membrana externa (OMVs) (BITTO et al., 2017; SCHWECHHEIMER; KUEHN, 2015; TOYOFUKU; NOMURA; EBERL, 2019).

Há também a síntese de vesículas extracelulares com membrana interna e externa (OIMVs) em bactérias Gram-negativas, que ocorre por meio do enfraquecimento da camada de peptidoglicano bacteriano por endolisinas. Geralmente, essas enzimas são produzidas por fagos ou pelos mecanismos de estresse devido a danos no DNA bacteriano (BAUWENS et al., 2017; TURNBULL et al., 2016). Como consequência, ocorre a projeção da membrana interna no periplasma (TOYOFUKU et al., 2023).

Para bactérias Gram-positivas, ainda não está bem elucidada a biossíntese e os tipos de VEBs, com até então a classificação de vesículas extracelulares de membrana citoplasmática (CMVs). As VEBs dessas bactérias podem ser de origem explosiva (ECMV), denominadas “morte celular borbulhante”, que são derivadas da indução de substâncias que danificam o DNA ou a membrana citoplasmática e desestruturam os peptidoglicanos, como a ciprofloxacina (ANDREONI et al., 2019; WANG et al., 2018). O mecanismo das ECMVs geralmente ocorre com a membrana interna sendo extrusada para o citoplasma periférico, permitindo que materiais citoplasmáticos entrem nas vesículas. Por fim, as VEBs são liberadas do citoplasma interno bacteriano para o espaço extracelular, com a membrana externa circundante; conseqüentemente, essas vesículas possuem maior conteúdo genômico do que as de origem não explosiva (XIAO; LI; YANG, 2023).

A composição molecular das VEBs é majoritariamente fosfolipídica e enriquecida com proteínas integrais de membrana, lipoproteínas e uma pequena parcela de proteínas solúveis, íons e metabólitos (PATHIRANA; KAPARAKIS-LIASKOS, 2016; ROIER et al., 2016). Além disso, eventualmente, moléculas hidrofóbicas e de origem citosólica podem estar presentes no lúmen, assim como ácidos nucleicos, tanto no lúmen quanto na superfície, em VEBs de dupla camada ou de origem explosiva (LEE et al., 2009; LIAO et al., 2014; RESCH et al., 2016; TARTAGLIA et al., 2020). A composição das VEBs está intimamente relacionada às funções nas quais estão envolvidas, como em vários processos de adaptação e sobrevivência das bactérias, incluindo comunicação intra e interespecíes, transporte de biomoléculas, formação de biofilme, tolerância e resposta ao estresse, transferência horizontal de genes e propagação de fatores de virulência (LI et al., 1998; SCHOOLING E BEVERIDGE, 2006; ELLIS E KUEHN, 2010; BERLEMAN E AUER, 2013; KOEPPEN et al., 2016; BAHAR et al., 2016).

Algumas funções podem ser mais específicas para um determinado tipo de VEB. De acordo com estudos proteômicos em Gram-negativas, foram observadas diferenças de composição relacionadas à função/tipo (LEE et al., 2009; MCMILLAN; KUEHN, 2021a). Por exemplo, as vesículas de membrana externa-interna e do tipo E geralmente têm a função de transferir DNA, sendo consideradas um quarto mecanismo de transferência horizontal de genes, a vesidução (DORWARD; GARON; JUDD, 1989; FULSUNDAR et al., 2014; TASHIRO et al., 2017; TRAN; BOEDICKER, 2017). Da mesma forma, como em muitas bactérias, a resposta de

reparo SOS pode ser coordenada por vesículas por meio da liberação de toxinas (TOYOFUKU et al., 2023), ou até mesmo pela captação de nutrientes com o transporte de receptores que se ligam a eles e fazem a entrega a células-alvo, como o exemplo de sideróforos para aquisição de ferro (WANG; NIE; WU, 2021). Além disso, foi demonstrado que as VEBs servem como iscas para a proteção da célula, inativando e/ou neutralizando bacteriófagos ou bactérias competidoras, sendo as VEBs classificadas como um fator de defesa (MANNING; KUEHN, 2011).

Outra função das vesículas está relacionada às interações bactéria-hospedeiro, que podem trazer vantagens ecológicas e contribuir para a virulência de bactérias patogênicas (JEONG et al., 2024). Padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) são geralmente encontrados em vesículas de micro-organismos patogênicos (FURUYAMA; SIRCILI, 2021; GILMORE et al., 2021; XIAO; LI; YANG, 2023), sendo esses PAMPs moléculas fundamentais para o sucesso da colonização e invasão do hospedeiro. No entanto, a interação por meio de vesículas nem sempre traz essas vantagens ao patógeno, uma vez que o sistema imunológico do hospedeiro detecta os PAMPs presentes nas VEBs. Isso ocasiona a ativação do sistema imunológico do hospedeiro, por meio de transdução de sinal, que desencadeia uma cascata de sinalização celular. Com isso, há a síntese de proteínas e metabólitos que oferecem condições e capacidade ao hospedeiro para superar a infecção (CARUANA; WALPER, 2020; MCMILLAN; KUEHN, 2021; JEONG et al., 2024).

1.2. Interação VEB-planta

A maioria dos estudos envolvendo VEBs e sua interação com o ambiente está relacionada a patógenos cujo hospedeiro possui origem animal (CHOI et al., 2017; LI et al., 2022). Entretanto, a interação entre vesículas derivadas de bactérias fitopatogênicas e plantas é bastante complexa, na qual as VEBs podem representar uma forma de suporte adaptativo na patogênese da bactéria e no gerenciamento do estresse do hospedeiro (MCMILLAN et al., 2021b; RUDNICKA et al., 2022).

No contexto da célula bacteriana, as vesículas liberadas facilitam as interações com o ambiente circundante sem que a bactéria gaste energia para se mover, permitindo acesso a longas distâncias em locais que a célula não consegue alcançar devido à resposta de defesa do hospedeiro ou ao seu tamanho (RUDNICKA et al., 2022). No

momento da vesiculação, componentes ativos pertencentes à membrana externa e ao espaço periplasmático, como o LPS das bactérias Gram-negativas e os peptidoglicanos das Gram-positivas, se ancoram ou são armazenados no lúmen, sendo protegidos da degradação por enzimas de outras bactérias ou do ambiente (CARUANA; WALPER, 2020; VOLGERS; SAVELKOUL; STASSEN, 2018).

O reconhecimento do patógeno por meio das VEBs na célula vegetal é fundamental para a montagem de uma resposta imune eficaz (KATSIR; BAHAR, 2017), mediada pelos principais PAMPs contidos nas vesículas. O LPS já citado, a flagelina e o fator de alongamento Tu (EF-Tu) são alguns dos PAMPs reconhecidos na parede celular vegetal pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRR) para a ativação da resposta inata (BAHAR et al., 2016). As respostas imunes das plantas são divididas em dois tipos: o primeiro, já citado, ocorre por meio do reconhecimento de PAMPs, geralmente feito por receptores ricos em motivos de lisina (LRR) na porção extracelular (ZIPFEL, 2014). O segundo tipo é denominado imunidade desencadeada por dano, mediada também por LRRs na porção intracelular, geralmente induzida por nucleotídeos exógenos ou enzimas hidrolíticas que provocam estabilização estrutural da célula (BAHAR et al., 2016).

Exemplos de receptores específicos para os principais PAMPs presentes nas VEBs são o FLS2, que reconhece a flagelina, o EFR, relacionado ao fator de alongamento Tu, e receptores da família LYM, que interagem com peptidoglicanos (KATSIR; BAHAR, 2017; MA et al., 2022; SCHWECHHEIMER; KUEHN, 2015). Outras proteínas transmembrana de importância no desencadeamento da resposta são a SOBIR1 e a BAK1, um correceptor de proteínas LRR-RLPs e um correceptor e regulador da sinalização de PRR, respectivamente (LIEBRAND; VAN DEN BURG; JOOSTEN, 2014; VAN DER BURGH et al., 2019; WEI et al., 2022). Ambos, com caráter de quinase, servem como sinalização inicial da resposta (BAHAR et al., 2016; KATSIR; BAHAR, 2017).

Existem alguns modelos de mecanismos de interação entre VEBs e plantas que possibilitam a resposta imunológica do hospedeiro (Figura 1). O primeiro modelo envolve a ligação de PAMPs, ancorados na superfície das VEBs, a PRRs na parede celular da célula vegetal, associados a RLKs e RLPs intermembrana, o que desencadeia um processo de fosforilação para transdução de sinal. Em seguida, é ativada uma NADPH oxidase relacionada ao estresse respiratório, resultando em um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e liberação de íons.

Como consequência, diversos fatores de transcrição são ativados por fosforilação por meio das proteínas MAPK/CDPK, levando ao aumento da expressão de genes envolvidos na realocação de nutrientes, liberação de metabólitos antimicrobianos e hormônios de defesa (RUDNICKA et al., 2022).

No segundo mecanismo, está relacionado ao dano da parede celular do hospedeiro, em que os padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) de interesse estão contidos no interior das VEBs. A interação ocorre quando as vesículas bacterianas são degradadas sob condições ácidas do ambiente, liberando o conteúdo presente no lúmen. Esse conteúdo geralmente consiste em proteases e lipases, que afetam a integridade da parede celular vegetal, ativando receptores vegetais que iniciam a resposta imune, com a liberação de ROS e íons no ambiente externo da célula, culminando na ativação de fatores de transcrição para genes responsivos, semelhante ao primeiro mecanismo (RUDNICKA et al., 2022).

Outra interação assemelha-se ao sistema de secreção tipo III (TSS3), em que as VEBs entram nas células vegetais de forma passiva ou ativa, dependente de clatrininas ou rafts lipídicos da membrana (Figura 1) (KATSIR; BAHAR, 2017; KIM et al., 2023; RUDNICKA et al., 2022). Após a chegada das VEBs ao ambiente citoplasmático, os PAMPs da superfície interagem com proteínas NLR de reconhecimento e sinalização celular para a expressão de genes relacionados ao sistema imune vegetal (Figura 1). Um outro mecanismo envolve a modulação dos genes por meio da epigenética, em que sRNAs são transportados pelas VEBs e atuam no genoma do hospedeiro. Após serem incorporadas, as VEBs liberam essas biomoléculas que interferem no sistema de defesa do complexo RISC, que contém proteínas argonautas. Os sRNAs podem regular a expressão e tradução de genes responsivos do sistema imune (JEONG et al., 2024).

Em uma perspectiva evolutiva, a bactéria sai em vantagem com o uso das vesículas; entretanto, a montagem rápida de uma resposta imune do hospedeiro pode levar a algo benéfico e até se tornar prejudicial para a bactéria (MCMILLAN; KUEHN, 2021). Com o reconhecimento dos PAMPs e a cascata de ativação do sistema imune, diversos hormônios e metabólitos protegem a planta do patógeno bacteriano, como o ácido salicílico e o ácido jasmônico, que têm como consequência a reação de hipersensibilidade e podem se assemelhar à resposta de resistência sistêmica à bactéria (BASHIR et al., 2020; CHAUDHARY; SINGH; SHARMA, 2021; CONRATH et al., 2015; MANGHWAR; HUSSAIN, 2022; VLOT et al., 2021).

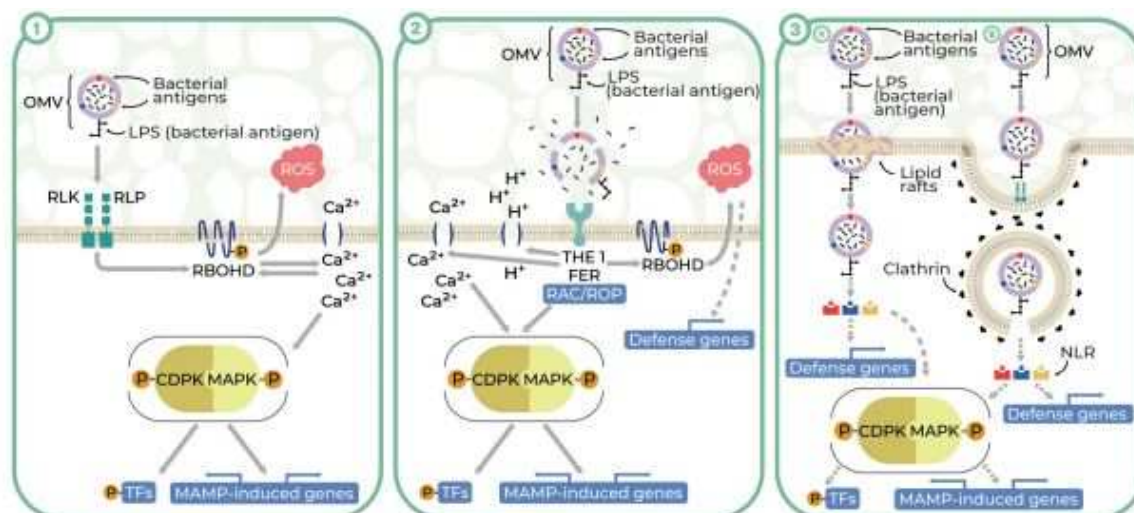


Figura 1: Mecanismos de interação VEB-célula vegetal. A) PAMPs da superfície da VEBs interagem com os PRR da célula vegetal, que desencadeia fosforilação na subunidade intermembrana do receptor, que induz a fosforilação de proteínas de ativação a síntese de espécies reativas de oxigênio (RBOHD), além de induzir liberação de ions Ca^{2+} , fundamentais na sinalização celular de transcrição de genes do sistema imune vegetal. B) VEBs são lisadas e liberam padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), que degradam a parede vegetal e assim ativam receptores de membrana que podem induzir fosforilação de proteínas de síntese de ROS, liberação de ions no ambiente, e desencadear sinalização celular para transcrição de genes responsivos. C) Entrada de VEBs na célula de plantas por clatrin ou *rafts* lipídicos, que no interior celular interagem com proteínas que ativam a transcrição de genes que fazem parte do sistema imune vegetal (RUDNICKA et al., 2022).

Além de metabólitos e fitohormônios, genes responsivos comuns ao combate de estresses bióticos, como fitopatógenos, são de proteínas relacionadas à patogênese (PR) (ISLAM et al., 2023). Essas proteínas são classificadas em 19 famílias e têm baixo peso molecular (VAN LOON et al., 1994), estando associadas a um conjunto coordenado e integrado de alterações metabólicas (DAS et al., 2011), minimizando a presença do patógeno ou o início da doença em tecidos não infectados (KAUR et al., 2023). Essas alterações podem levar à indução de resistência sistêmica adquirida (SAR) ou resistência sistêmica induzida (ISR) por meio da ativação de vias de sinalização de defesa, como ácido salicílico (SA) e etileno (ET) (ALI et al., 2018). Geralmente, as PRs podem se acumular em diferentes locais, no meio extracelular com caráter ácido, como nos vacúolos com

caráter básico, e também predominantemente nos apoplastos (VAN LOON et al., 1994).

As proteínas da classe PR variam suas funções de acordo com cada situação de estresse e o agente causador, como proteases, glucanases, quitinases, defensinas, dentre outras biomoléculas que podem servir como antimicrobianos (ALI et al., 2018; EGOROV et al., 2005). Esses agentes causadores se diferenciam em dois grupos na ativação das proteínas: os biotróficos e os necrotróficos (ISLAM et al., 2023). O grupo dos biotróficos está relacionado à via do ácido salicílico, que induz a transcrição de NPR1, que posteriormente ativa as classes PR1, PR2 e PR5, estando relacionado com resistência adquirida sistêmica (ALI et al., 2017; MANGHWAR; HUSSAIN, 2022; SONAH et al., 2016). Já os necrotróficos induzem a ativação das vias do ácido jasmônico e do etileno por meio das proteínas das classes PR3, PR4 e PR12, gerando resistência adquirida local (ALI et al., 2018). Um dos exemplos dessas proteínas que causam resistência é PR1, que, ao ser superexpressa, aumenta a tolerância de plantas em relação a fitopatógenos (ALEXANDER et al., 1993; SAROWAR et al., 2005).

Em patógenos biotróficos, a PR1 é o grupo de PRs predominante, possuindo tanto estruturas ácidas quanto básicas (VIDHYASEKARAN, 2014). Além disso, é bem conhecida por reduzir o crescimento do patógeno; ao se ligar a ele, realiza o sequestro de esteróis presentes na superfície celular do microrganismo (ISLAM et al., 2023). Outra característica marcante dessa proteína é a inibição da morte celular programada, com a subsequente liberação do peptídeo CAPE1 (ISLAM et al., 2023). A PR1 possui diversas isoformas, a maioria das quais apresenta caráter antifúngico e atua no xilema vegetal (GORDON-WEEKS et al., 1997; NIDERMAN et al., 1995).

Sobre as PRs ativadas pelas vias do ácido jasmônico e do etileno, destaca-se a PR5, especificamente a osmotina (ALI et al., 2018; BASHIR et al., 2020a; ISLAM et al., 2023). Essa proteína multifuncional, responsiva ao estresse, está envolvida na indução da osmotolerância em plantas (BASHIR et al., 2020a; HWANG; OH; OH, 2020). Em um cenário de superexpressão dessa proteína na presença do patógeno, ocorre redução na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (WAN et al., 2017), limitando a peroxidação lipídica, iniciando a morte celular programada (PCD) e aumentando o conteúdo de prolina, bem como a atividade da enzima de eliminação (BASHIR et al., 2020; VIKTOROVA et al., 2019). As osmotinas e proteínas semelhantes à osmotina (OLP) têm como função principal diminuir o

potencial osmótico sob estresse, apresentando atividades específicas em resposta a NaCl, etileno e ácido abscísico (DAS, Subhashree; CHAKRABORTY, 2016; SADAT NOORI; SOKHANSANJ, 2008). Seu acúmulo ocorre principalmente em regiões dormentes do ápice da raiz e nas regiões meristemáticas do ápice do broto (DAS, Subhashree; CHAKRABORTY, 2016; MANGHWAR; HUSSAIN, 2022; SADAT NOORI; SOKHANSANJ, 2008), sendo sua superexpressão fundamental para plantas jovens e suas respectivas raízes, além de atuar como um regulador transcricional para outras proteínas do sistema imune vegetal (KUMAR et al., 2015; BASHIR et al., 2020).

1.3. *Ralstonia solanacearum*

As bactérias do complexo de espécies *Ralstonia solanacearum* (RSSC), composto por *Ralstonia solanacearum*, *Ralstonia pseudosolanacearum* e *Ralstonia syzygii*, são Gram-negativas habitantes naturais do solo e pertencentes à classe Betaproteobacteria (PRIOR et al., 2016; WICKER et al., 2012). Até meados da década de 1990, eram conhecidas como *Pseudomonas solanacearum* (PAUDEL et al., 2020), mas esse grupo foi reclassificado filogeneticamente e subdividido em filotipos taxonômicos que refletem sua origem geográfica (PAUDEL et al., 2020; VAILLEAU; GENIN, 2023). O filotipo I é de origem asiática, o filotipo II está presente nas Américas, o filotipo III na África, e o filotipo IV no sudeste asiático (PAUDEL et al., 2020; SAFNI et al., 2014; VAILLEAU; GENIN, 2023).

As três espécies dentro do complexo foram classificadas nos filotipos com base na análise de sequência de regiões dos genes *its* (16S-23S), endoglucanase (*egl*) ou reparo de DNA (*mutS*) (FEGAN; PRIOR, 2005; GENIN; DENNY, 2012; PAUDEL et al., 2020). *R. solanacearum* foi atribuída ao filotipo II, *R. pseudosolanacearum* aos filotipos I e III, e *R. syzygii* ao filotipo IV, que foi subdividido em três subespécies: *R. syzygii* subsp. *syzygii*, *R. syzygii* subsp. *indonesiensis* e *R. syzygii* subsp. *celebesensis* (SAFNI et al., 2014).

Essas bactérias são os agentes causadores da murcha bacteriana, uma doença que afeta diversas culturas de grande importância econômica no setor agrícola (GENIN; DENNY, 2012; MORAIS et al., 2015). Com uma ampla gama de hospedeiros, estima-se que cerca de 200 espécies sejam afetadas globalmente (GENIN; DENNY, 2012; GREENROD et al., 2022; SANTIAGO et al., 2020). A

justificativa para essa vasta gama de hospedeiros reside na versatilidade metabólica dos diferentes filotipos, que são capazes de se adaptar a variadas condições ambientais, incluindo diferentes temperaturas, níveis de umidade, salinidade e outros estresses abióticos (LOWE-POWER; KHOKHANI; ALLEN, 2018; VIEIRA et al., 2024).

No Brasil, a murcha bacteriana tem sido um problema importante, afetando principalmente culturas como tomate, batata, banana e eucalipto (IBGE, 2022; LOPES, 2009; SANTIAGO et al., 2017; WICKER et al., 2007). O país é considerado um dos principais centros emergentes da doença devido às suas condições climáticas tropicais e subtropicais, que incluem altas temperaturas e umidade do solo (LOPES; ROSSATO, 2018). As espécies *R. solanacearum* e *R. pseudosolanacearum* são as principais responsáveis pela doença no Brasil, causando prejuízos estimados em cerca de 1 bilhão de reais por ano e podendo resultar em perdas de até 100% no rendimento de algumas culturas (MIZUBUTI et al., 2022; SILVA et al., 2024).

Nas regiões central e sul do Brasil, a murcha bacteriana é a principal doença que afeta as plantações de tomate (FREITAS et al., 2021). A espécie do filotipo II tem sido a mais prevalente nos campos agrícolas brasileiros (ALBUQUERQUE et al., 2021; MIZUBUTI et al., 2022; SANTIAGO et al., 2017), possivelmente devido à sua maior competitividade ecológica em comparação com as espécies dos filotipos I e III. Essa vantagem competitiva pode estar relacionada à sua versatilidade na aquisição de nutrientes químicos do ambiente, o que confere maior plasticidade em sua virulência (VIEIRA et al., 2024).

Os principais fatores de virulência do complexo *Ralstonia solanacearum* (CERS) incluem a capacidade de formar biofilmes, a motilidade via flagelo (swimming), associada à colonização, e via pili (twitching), associada ao biofilme, além da presença dos sistemas de secreção do tipo II e III (CORRAL et al., 2020a; GENIN; DENNY, 2012; LOWE-POWER; KHOKHANI; ALLEN, 2018; MENG, 2013). O processo de invasão se inicia nas raízes da planta, onde a bactéria se adere e entra no sistema vascular por meio de quimiotaxia durante o período de alongamento das raízes (CALDWELL; KIM; IYER-PASCUZZI, 2017). Em seguida, a bactéria migra para o xilema e utiliza o pili IV para iniciar a colonização (CORRAL et al., 2020). Uma vez estabelecidas condições favoráveis, a formação do biofilme é

iniciada, proporcionando proteção física contra o sistema imunológico do hospedeiro.

A produção de biofilme é acompanhada pela síntese de moléculas que inibem sua degradação, como exopolissacarídeos (EPS), DNA extracelular, estruturas pili e lectinas, que mantêm a resistência da estrutura frente ao hospedeiro (GENIN; DENNY, 2012; MORI et al., 2018; TONDO et al., 2020; TRAN et al., 2016). A consequência desse processo é a interrupção do fluxo de água e nutrientes no xilema, levando a um desequilíbrio osmótico nos tecidos e, conseqüentemente, ao adoecimento da planta (LOWE-POWER; KHOKHANI; ALLEN, 2018). Esse sequestro nutricional pelo entupimento do xilema resulta em múltiplos benefícios metabólicos para a bactéria, como a obtenção de carboidratos e aminoácidos do xilema, essenciais para sua alta multiplicação e impacto negativo no hospedeiro (BAROUKH; ZEMOURI; GENIN, 2022; GERLIN et al., 2021).

Além disso, os sistemas de secreção do tipo II e III (TSS3) estão envolvidos na liberação de efetores cruciais para o sucesso da infecção, colonização e estabelecimento da doença (ÁLVAREZ; BIOSCA; LÓPEZ, 2010; GENIN; DENNY, 2012; MENG, 2013). Esse sistema complexo, composto por cerca de 50 a 70 proteínas (LANDRY et al., 2020; SABBAGH et al., 2019), muitas delas classificadas como chaperonas, tem como principal função a supressão da resposta imunológica do hospedeiro (XIAN et al., 2020). Os efetores translocados pelo TSS3 exercem funções variadas, dependendo do hospedeiro infectado (QI et al., 2022; ZHENG et al., 2019). No entanto, os mecanismos de interação entre esses sistemas de secreção e a virulência bacteriana nas plantas ainda não são completamente compreendidos (VAILLEAU; GENIN, 2023).

Até o momento, não foram identificados genes de resistência universais para todas as espécies de *Ralstonia* (PRUITT; GUST; NÜRNBERGER, 2021). Entretanto, as plantas desenvolvem um sistema de defesa que inclui barreiras físicas, como a formação de tilos — estruturas adjacentes ao xilema que criam ductos alternativos para transportar nutrientes do solo para a planta, bloqueando a propagação bacteriana ao longo do sistema vascular (KASHYAP et al., 2021; SHI et al., 2023). Além disso, a produção de géis e calose reforça a parede celular vegetal, criando uma defesa adicional contra a bactéria (KASHYAP et al., 2021; WANG et al., 2021). A resposta inata da planta também envolve a produção de metabólitos secundários e hormônios, que reduzem a comunicação bacteriana por quorum-sensing, a

produção de EPS e a formação de biofilmes, além de suprimir genes relacionados à divisão celular e síntese de flagelos (QAIS et al., 2021; YANG et al., 2022), apontando para possíveis fatores de resistência em plantas contra *R. solanacearum*.

1.4. Inovírus

Os vírus da ordem *Tubulavirales* (Domínio: *Monodnaviridae*, Reino: *Loebvirae*, Filo: *Hofneiviricota*, Classe: *Faserviricetes*) estão distribuídos em três famílias: *Inoviridae*, *Plectroviridae* e *Paulinoviridae*. Esses vírus possuem um genoma de DNA de fita simples circular, variando de 5 a 15 kb, e suas partículas virais apresentam uma estrutura filamentosa flexível com cerca de 1 µm de comprimento (MAI-PROCHNOW et al., 2015; ROUX et al., 2019).

Desde as décadas de 1960 e 1970, os inovírus, em particular, ganharam destaque na ciência, tornando-se modelos importantes para estudos de transferência de material genético (SALMOND; FINERAN, 2015; SANGER et al., 1977). Um exemplo notável é o inovírus M13, isolado da bactéria *Escherichia coli* em águas residuais (PARR, 1961). A partir da década de 1990, o interesse por esses vírus se intensificou devido à crescente demanda biotecnológica, com a aplicação dos inovírus no desenvolvimento dos primeiros vetores de clonagem em *E. coli* (CALENDAR, 2006; LETAROV, 2020; RAKONJAC et al., 2017; ROUX et al., 2019).

Infectam procariotos presentes em diversos nichos ecológicos de forma crônica, em outras palavras, não levam o hospedeiro à morte. Isso ocorre devido à capacidade desses vírus de liberarem suas partículas para fora da célula por um processo no qual utiliza os sistemas de secreções tipo II e III de bactérias (HAY; LITHGOW, 2019; KRUPOVIC et al., 2021), sem causar lise. O fato desse bacteriófago não provocar a lise, exige que sua identificação técnica mais rebuscadas, pois antes dos avanços do sequenciamento de segunda geração, foi possível apenas isolamento e caracterização de aproximadamente 50 inovírus em bactérias no mundo (BURCKHARDT; TROPINI, 2023). O cenário atual se utiliza mais técnicas computacionais como metagenômica, que possibilitaram a visualização da grande diversidade de inovírus em diferentes ambientes e amostras, permeando em quase todos os filos que podem ser encontrados (BURCKHARDT; TROPINI, 2023; LETAROV, 2020).

Durante a infecção, os tubulavírus podem integrar seu genoma no cromossomo do hospedeiro ou permanecerem na forma episomal. No último caso, o genoma é replicado por círculo rolante, e novas partículas virais são produzidas (HAY; LITHGOW, 2019; RAKONJAC et al., 2017). As partículas então são transportadas através da membrana e da parede celular sem gerar lise, mantendo assim a célula como fábrica viral em uma infecção crônica (HAY; LITHGOW, 2019).

As alterações de fenótipos específicos em hospedeiros, como o aumento ou redução da virulência em bactérias fitopatogênicas (ADDY et al., 2012; ILYINA, 2015; MAI-PROCHNOW et al., 2015; SHAPIRO; TURNER, 2018), sugerem um potencial promissor no uso de fagos para biocontrole. No entanto, esse campo ainda é pouco explorado para fitopatógenos de grande importância econômica. No caso dos inovírus que infectam o gênero *Ralstonia*, eles podem ser classificados em dois grupos principais: RSS e RMS (ASKORA; YAMADA, 2015). Os inovírus do grupo RSS aumentam a virulência da bactéria, enquanto os do grupo RMS reduzem a virulência, agindo como repressores de determinados genes virais na forma episomal. Este último grupo é o de maior interesse econômico devido ao seu potencial para controle biológico (AHMAD; STULBERG; HUANG, 2017; GONÇALVES et al., 2021; YAMADA, 2013).

Um estudo recente sobre a identificação e caracterização de um tubulavírus que infecta bactérias do gênero *Ralstonia* revelou o potencial deste bacteriófago para biocontrole. O *Ralstonia Solanacearum* Inovirus Brazil 1 (RSIBR1), isolado de *R. solanacearum* em plantas de berinjela com sintomas leves de murcha bacteriana, foi identificado como uma nova espécie de inovírus após análise molecular e genômica. Testes biológicos indicaram que a infecção pelo RSIBR1 provocou uma redução significativa na patogenicidade de *R. solanacearum* em plantas de tomate, o que foi associado a alterações morfológicas na bactéria, incluindo a produção e maturação do biofilme e sua adesão, posicionando o RSIBR1 como um candidato promissor para o controle da murcha bacteriana (DE ALMEIDA et al., 2022; REZENDE, 2022; TASAKA; KAWASAKI; YAMADA, 2020).

As modificações fenotípicas observadas em isolados de *R. solanacearum* infectados pelo RSIBR1 levantaram a necessidade de investigar melhor as interações entre vesículas extracelulares bacterianas (VEBs) e os hospedeiros vegetais da bactéria. A hipótese é que as VEBs derivadas de bactérias

infectadas pelo RSIBR1 apresentam alterações morfológicas e de produção, o que poderia influenciar a interação VEB-planta, particularmente no que diz respeito à resposta imunológica. Os objetivos principais incluem a análise da variação de tamanho e produção de VEBs infectadas e não infectadas, bem como a observação da resposta imunológica das plantas em contato com essas VEBs, tanto em nível biológico quanto molecular, para compreender melhor essa interação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Crescimento bacteriano

Foram utilizados os isolados *Ralstonia Solanacearum* Inovirus Brazil 1 (RSIBR1), *Ralstonia pseudosolanacearum* selvagem (GMI1000) e infectado artificialmente pelo inovírus RSIBR1 (G7), obtido por ALMEIDA et al., 2022. As bactérias foram cultivadas em meio CPG sólido (1% casaminoácido, 10% peptona, 5% glicose e 1% extrato de levedura), incubadas a 28 °C por 48 horas.

2.2. Isolamento de VEBs

Para o preparo do pré-inóculo, as bactérias foram cultivadas em 5 mL de meio CPG líquido a 28 °C, com agitação a 150 rpm, por 24 horas. Após o crescimento, a densidade óptica (D.O.) da cultura foi medida a 600 nm, ajustada para 0,1 em um volume final de 600 mL, e incubada nas mesmas condições de temperatura e agitação por 20 horas.

Após esse período, a cultura foi centrifugada a 12.000 g por 20 minutos a 4 °C para precipitar as células. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e novamente centrifugado nas mesmas condições para uma segunda recuperação do sobrenadante. Em seguida, o sobrenadante foi filtrado utilizando uma membrana de Polietersulfona (PES) com porosidade de 0,45 µm, em sistema de filtração a vácuo, sob condições estéreis.

Foram realizadas duas ultracentrifugações consecutivas da amostra filtrada, a 150.000 g por 2 horas cada, a 4 °C. A primeira ultracentrifugação visou a precipitação das VEBs (Vesículas Extracelulares Bacterianas) e o descarte do sobrenadante. Na segunda, os tubos foram lavados com tampão PBS 1X (13,7 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 10 mM de Na₂HPO₄ e 2 mM de KH₂PO₄, pH = 7,4, ajustado com H₂O até 1 L) para limpar o precipitado de VEBs. Por fim, as vesículas foram concentradas e purificadas através de ultrafiltração em membranas Amicon® Ultra 10 MWCO (Merck), utilizando centrifugação a 4.000 g por 15 minutos a 4 °C.

2.3. Determinação de tamanho das VEBs

O diâmetro das vesículas foi determinado por meio da técnica espalhamento dinâmico de luz pelo equipamento Zetasizer. Foram adicionados 200µL das

amostras de VEBs purificadas a partir de culturas de GMI1000 e G7 em placa de 96 poços, em 3 replicatas, para leitura por aproximadamente 2 horas no índice de refração de 1,332 e viscosidade ajustada para 0,9043 mPaix.

2.4. Quantificação da VEBs

As vesículas purificadas a partir das culturas de GMI1000 e G7 foram quantificadas utilizando um citômetro de fluxo BD Accuri C6, localizado no Núcleo de Microscopia e Macromoléculas da UFV. Para o processo de quantificação, 2 µL das vesículas purificadas foram coradas com 200 µL de uma solução de vermelho do Nilo a 1 µg/mL, completando-se o volume final para 500 µL com PBS 1X. Foram utilizadas 15 µL das vesículas coradas para as leituras, com índices de absorção e emissão ajustados para 636 nm e 552 nm, respectivamente.

A quantificação foi realizada com base na população de eventos isolados e bem definidos pelo equipamento, considerando os fatores de diluição aplicados ao volume inicial das vesículas purificadas, para obter a concentração final de VEBs por mL.

2.5. Infiltração de plantas com VEBs

Foram realizadas três diluições (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) das amostras de VEBs purificadas e não quantificadas, provenientes das culturas de bactérias infectadas (G7) e não infectadas (GMI1000) pelo RSIBR1. As plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*), variedade Santa Clara, com aproximadamente 21 dias após a germinação, foram infiltradas com essas diferentes diluições de vesículas purificadas. A infiltração foi realizada utilizando seringas de 1 mL sem agulha, infiltrando três folhas por planta, com aproximadamente 50 µL de solução em cada folha, na superfície inferior. Plantas também foram infiltradas com as VEBs não diluídas. Como controle negativo, foram infiltradas plantas apenas com o tampão PBS 1X (utilizado para a resuspensão das vesículas). Cada tratamento contou com três replicatas biológicas, e as observações da reação de hipersensibilidade foram documentadas por um período de sete dias após a infiltração.

Para a avaliação da expressão de genes relacionados à resposta imune das plantas, foram utilizadas as mesmas condições descritas anteriormente. As VEBs purificadas a partir das culturas de GMI1000 e G7 foram quantificadas e ajustadas

em PBS 1X para uma concentração de 1.000 VEBs/ μ L. Três folhas por planta foram infiltradas com aproximadamente 50 μ L dessa preparação de vesículas, utilizando seringas de 1 mL sem agulha. Adicionalmente, folhas foram infiltradas com os isolados bacterianos GMI1000 e G7, com a densidade ótica ajustada para 0,1 a 600 nm. Cada tratamento incluiu cinco replicatas biológicas. Plantas infiltradas com PBS 1X serviram como controle negativo. As folhas infiltradas foram coletadas em dois tempos de análise: 6 e 48 horas após a infiltração, para a avaliação da resposta imune.

Para investigar a capacidade imunizadora das VEBs, três folhas de plantas de tomate foram infiltradas com 50 μ L de VEBs ajustadas para uma concentração de 1.000 VEBs/ μ L. As plantas foram infiltradas com VEBs purificadas de culturas de bactérias infectadas e não infectadas pelo inovírus. Cada tratamento contou com cinco replicatas biológicas, e o controle consistiu em plantas infiltradas com PBS 1X. Cinco dias após a infiltração das VEBs, um inóculo de GMI1000 ajustado para D.O. 0,1 foi infiltrado em uma folha não previamente infiltrada por VEBs de cada planta tratada, e no controle infiltrado com PBS 1X. O desenvolvimento da doença foi monitorado e registrado ao longo de 15 dias.

2.6. Análise da expressão gênica

Para a análise de expressão gênica, o RNA total foi extraído utilizando o reagente TRIzol™ (Invitrogen), conforme as recomendações do fabricante. Um total de 1.000 ng de RNA foi tratado com DNase I (RQ1 RNase-Free, Promega) para remover qualquer contaminação de DNA genômico, de acordo com as instruções do fabricante. A síntese de cDNA foi realizada a partir do RNA tratado, utilizando o kit FIREScript RT (Solis BioDyne), seguindo as instruções do fabricante.

Dois genes foram selecionados para análise de expressão gênica: o gene da proteína de patogênese da classe 1a (pr1A), relacionado à via do ácido salicílico, e o gene de uma proteína semelhante à osmotina (oIP), relacionado à via do etileno. Estes genes estão envolvidos nas principais vias de resposta imunológica inata das plantas em resposta à presença de vesículas extracelulares bacterianas (VEBs) (Tabela 1).

A análise de expressão foi realizada por PCR quantitativa (qPCR) utilizando o kit GoTaq® qPCR Systems - qPCR Master Mix (Promega), em um volume final de

reação de 10 µL. Para determinar a eficiência ideal de amplificação, foram testadas três concentrações de primers (100 nM, 200 nM e 400 nM) e três quantidades de cDNA (5 ng, 15 ng e 45 ng). A curva padrão de normalização foi feita com oito diluições de cDNA, utilizando um fator de diluição de 2,5x, partindo de uma concentração inicial de 45 ng de cDNA, com a concentração de primer já definida como 200 nM.

A eficiência de amplificação foi calculada pela equação $E = 10^{-1} \div S - 1$. O valor da expressão relativa das amostras experimentais foi calculado usando a quantidade de 18 ng de cDNA, com base na fórmula $2^{(-\Delta\Delta CT)}$, conforme descrito por Livak e Schmittgen (2001). Como referência de amplificação (gene de controle endógeno), foi utilizado o gene adenina fosforibosiltransferase 1 (APT1), um gene constitutivamente expresso em tomate (Alfenas-Zerbini et al., 2009).

Genes	Nome dos genes	Nome dos primers	Sequências 5'-3'	Tamanho de amplicons (pb)	Anelamento (° C)	Referência
<i>pr1A</i>	Proteína de patogênese da classe 1a	pr1a-502F pr1a-503R	ACTTGGCATCCCGAGCACAA CTCGGACACCCACAATTGCA	140	62,8	HWANG et al., 2020
<i>olP</i>	Proteína semelhante a osmotina	ol-510F ol-511R	TGTACCACGTTTGGAGGACA ACCAGGGCAAGTAAATGTGC	144	60,2	HWANG et al., 2020
<i>apt1</i>	Adenina fosfotransferase 1	apt1-223F apt1-224R	GAACAGACAAGATTGAGATGCATGTA CCACGAGGGCACGTTCA	60	60	ALFENAS-ZERBINI et al., 2009

Tabela 1: Sequências de oligonucleotídeos usados para análise de RT-qPCR.

2.7. Análise estatística

Todos os experimentos foram analisados no programa GraphPad Prism 10. Para as análises de significância estatística, foi utilizado o software Minitab, aplicando o teste t nas análises de quantificação de VEBs e nos tratamentos das análises de expressão gênica. Além disso, o método estatístico de log-rank (KLEINBAUM; KLEIN, 2012) foi utilizado para o índice de sobrevivência, considerando resultados significativos com $P < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Caracterização de VEBs

A quantificação realizada por citometria de fluxo demonstrou significativa diferença de produção entre as culturas de bactérias. A cultura de GMI1000 produziu uma média de 22600 VEB/ μ L, enquanto a cultura de G7 produziu aproximadamente 2200 VEB/ μ L (Figura 2A), de acordo com a população definida na região de fluorescência do Vermelho de Nilo, utilizado como corante.

Também foi possível observar uma diferença no tamanho das VEBs isoladas a partir das duas culturas de bactérias analisadas. As VEBs de GMI1000 apresentaram tamanhos predominantes em média de 40nm (Figura 2B), na qual representa 14% da população. Isso demonstrou um perfil de tamanho mais homogêneo para GMI1000, diferente das VEBs isoladas de G7 nas quais apresentaram 2 grupos de tamanhos variados entre 50 e 100nm (Figura 2B), com maior diversidade com distribuição populacional de 2 a 4%.

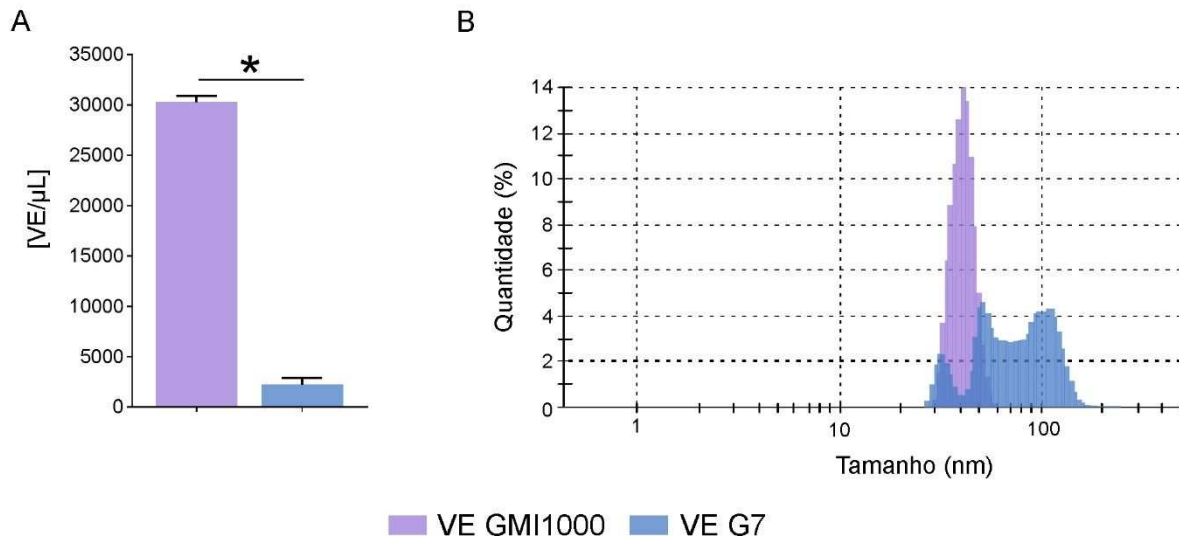


Figura 2: Produção de VEBs de *R. pseudosolanacearum* GMI1000 e G7, distribuição de tamanho. (A) A quantificação de VEBs de GMI1000 (lilás) e G7 (azul) foi feita por meio de citometria de fluxo utilizando Vermelho de Nilo 1 μ g/mL com diferenças significativas entre as amostras indicada por “*” conforme o teste T ($P < 0,05$). (B) Os tamanhos das VEBs de GMI1000 (lilás) e G7 (azul), foi feito por

espalhamento dinâmico de luz, com as porcentagens de abundância de tamanhos no eixo Y, medidas das amostras no eixo X.

3.2. Reação de hipersensibilidade causada por VEBs

As plantas inoculadas com vesículas extracelulares bacterianas (VEBs), purificadas a partir das cepas GMI1000 e G7, apresentaram uma reação de hipersensibilidade restrita ao local de inoculação, sem evidência de sintomas típicos de murcha bacteriana durante o período de observação de sete dias. A partir de 24 horas após a inoculação, as diluições das VEBs derivadas de GMI1000 exibiram um efeito dose-dependente (Figura 3). A severidade e a extensão das lesões nas folhas aumentaram proporcionalmente com a concentração de vesículas aplicadas, evidenciando um padrão de necrose progressiva ao longo dos dias.

Por outro lado, as amostras purificadas de vesículas da cepa G7 não demonstraram uma relação dose-dependente clara entre as diluições (Figura 3). Todas as concentrações testadas resultaram em lesões severas desde o primeiro dia pós-inoculação, com variações mínimas entre as diluições e uma reação de hipersensibilidade mais pronunciada em comparação com as VEBs de GMI1000. Estes resultados sugerem que as VEBs induziram a ativação do sistema imunológico do hospedeiro, porém com variações dependendo da origem das VEBs. Essas diferenças fornecem suporte adicional para a hipótese de que a infecção viral pode alterar o fenótipo das VEBs, levando a modificações na interação entre as vesículas e a planta.

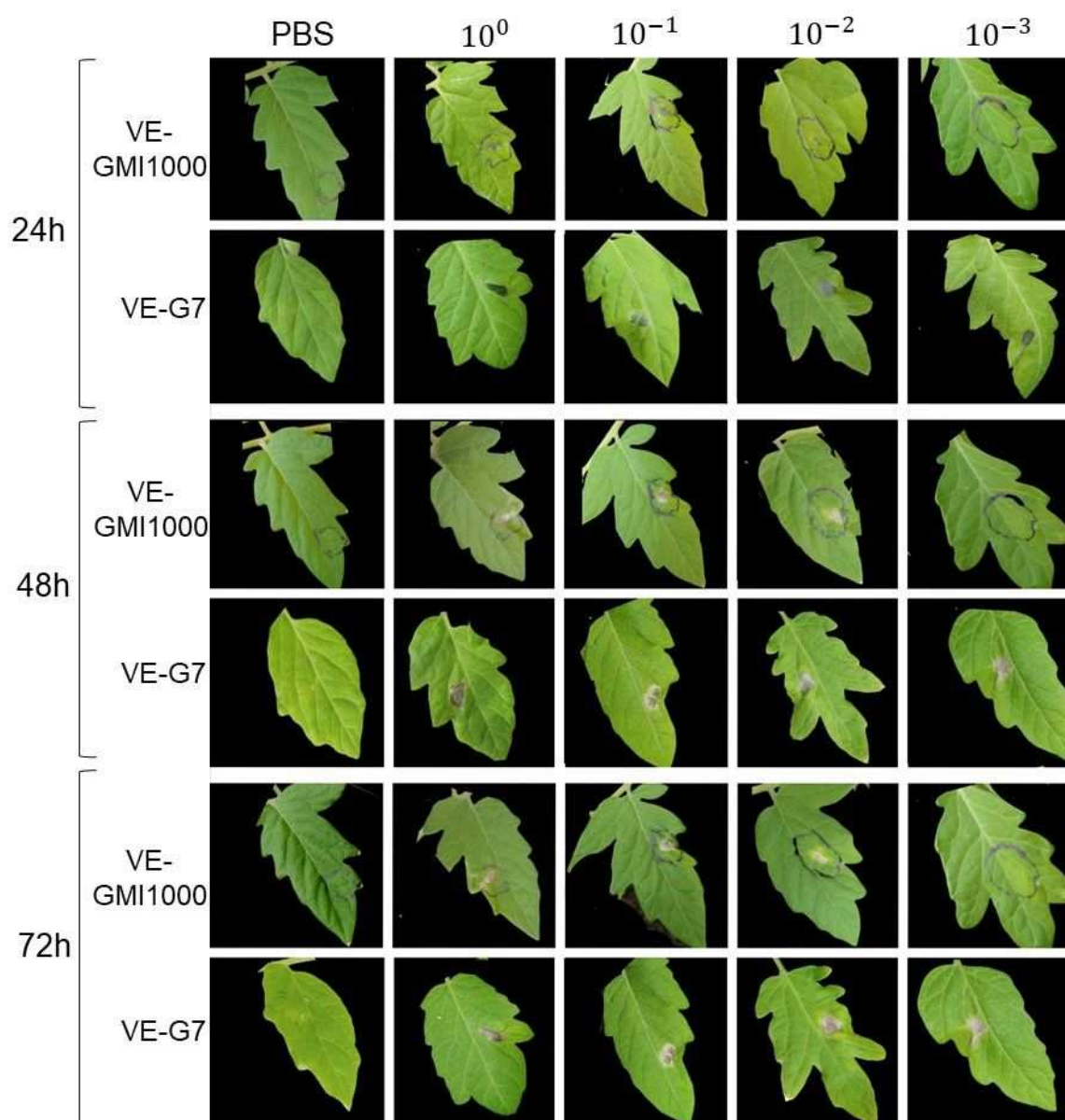


Figura 3: Ensaio de reação de hipersensibilidade induzida por VEBs de GMI1000, e VEBs de G7 em folhas jovens de tomateiro. Os tempos observados foram de 24 horas, 48 horas e 72 horas após infiltração das VEBs, e infiltrações com PBS 1x como controle negativo.

3.3. Expressão dos genes *pr1A* e *oIP* em plantas infiltradas com VEBs

A avaliação da expressão dos genes relacionados ao sistema imunológico, genes da proteína de patogênese da classe 1a (*pr1A*) e da proteína semelhante à osmotina (*oIP*) em plantas, revelou uma resposta mais pronunciada às células bacterianas em comparação com as VEBs durante ambos os períodos de análise. Especificamente, no período de 48 horas, observou-se uma expressão induzida de

ambos os genes em resposta às células de GMI1000, sendo o gene *pr1A* o mais fortemente expresso em relação ao oIP (Figura 4). No entanto, no período de 6 horas, não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas na expressão desses genes quando se comparou GMI1000 com o controle experimental.

Embora a linhagem G7 não demonstre patogenicidade ao hospedeiro e, conseqüentemente, não cause murcha bacteriana, induziu uma maior expressão dos genes analisados em ambos os períodos experimentais em comparação com o controle. No tempo inicial de 6 horas, observou-se uma indução de expressão considerável no gene *pr1A*, superando não apenas o controle negativo, mas também a linhagem virulenta GMI1000 (Tabela 2). No período de 48 horas, apesar do aumento na expressão do *pr1A* em comparação com o controle, as bactérias G7 não apresentaram valores significativamente superiores aos de GMI1000. Além disso, não houve diferença significativa entre os tempos na expressão de ambos os genes para plantas tratadas com G7, e não houve indução de expressão para o gene oIP em comparação com o controle negativo (Figura 4).

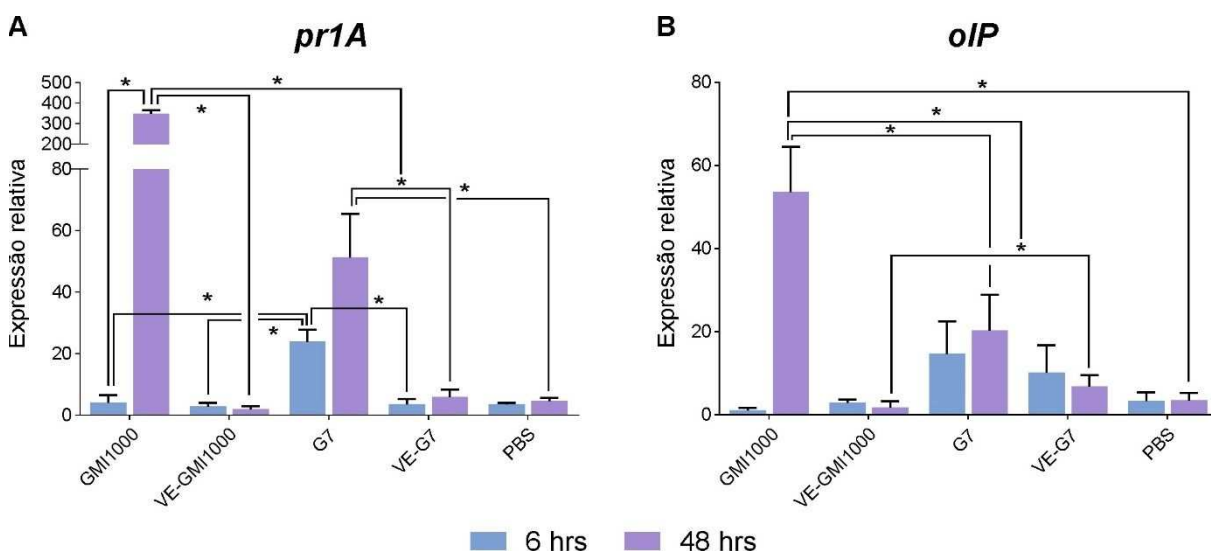


Figura 4: Expressão relativa dos genes do sistema imune *pr1A* e *oIP* em tomateiros jovens sob efeito de *R. pseudosolanacearum* GMI1000 e G7, e VEBs das respectivas bactérias nos tempos de 6 horas e 48 horas após infiltração. (A) Análise de expressão do gene *pr1A* nos tempos 6 horas (azul) e 48 horas (lilás). (B) Análise de expressão do gene *oIP* nos tempos 6 horas (azul) e 48 horas (lilás). Significâncias estatísticas entre os tratamentos estão indicadas por “*” por meio do teste t com $P < 0,05$.

Em relação às respostas induzidas pelas VEBs derivadas de GMI1000 e G7 nas plantas, a expressão relativa do gene pr1A não apresentou diferenças estatisticamente significativas em comparação com o controle negativo no período de 6 horas (Tabela 2). Entretanto, as VEBs de GMI1000 apresentaram menor indução de expressão do gene pr1A em relação ao controle negativo no período de 48 horas. Por outro lado, a expressão de ambos os genes foi significativamente mais elevada para as VEBs derivadas de G7 em comparação com as VEBs de GMI1000 no período de 48 horas (Tabela 2). No entanto, entre os intervalos de tempo nos tratamentos com VEBs de G7 e na comparação entre controle negativo e VEBs de G7, a expressão de pr1A e oIP não foi significativa (Figura 4).

Nas comparações entre células bacterianas e VEBs, observou-se que, no período de 6 horas, a indução dos genes avaliados não foi significativa para GMI1000 e suas respectivas VEBs (Figura 4A). Em contraste, no período de 48 horas, a expressão dos dois genes foi mais acentuada para plantas tratadas com células de GMI1000 em relação a todos os tratamentos. As células de G7 e suas VEBs exibiram diferenças mais intensas no gene pr1A, com as VEBs apresentando uma expressão menor do que as células nos períodos de 6 e 48 horas de análise. Para o gene oIP, as induções de expressão entre células de G7 e suas VEBs foram equivalentes nos períodos experimentais (Figura 4B).

3.4. VEBs foram capazes de imunização

Todas as plantas tratadas com VEBs das duas bactérias seguida de inoculação com o isolado GMI1000 apresentaram sintomas de murcha bacteriana, inicialmente restritos ao local de infiltração da bactéria durante o período de 10 dias, com uma lenta progressão para o restante da planta (Figura 5A).

Ao longo de 15 dias após a inoculação do isolado virulento GMI1000 em plantas previamente infiltradas com VEBs purificadas, observou-se um índice de mortalidade de 20% no tratamento com VEBs de GMI1000. A mortalidade foi observada no 7º dia pós-inoculação da bactéria (dpi). Em contraste, o controle positivo, que recebeu apenas tampão PBS 1x e a cultura de GMI1000, apresentou uma mortalidade de 100%, com 40% dos indivíduos levando à morte no 5º dpi e os 60% restantes no 6º dpi (Figura 5B).

As plantas tratadas anteriormente com VEBs de G7 e posteriormente inoculadas com GMI1000 apresentaram o mesmo índice de mortalidade de 20% observado nas plantas tratadas com VEBs de GMI1000 ao longo dos 15 dias experimentais, porém com a ocorrência de mortalidade no oitavo dia após a inoculação do patógeno. Além disso, os efeitos fenotípicos nas plantas tratadas com VEBs de G7 foram mais severos, de acordo com as observações ao longo do experimento, com a região de infiltração da cultura patogênica apresentando sintomas de murcha mais intensos do que nas plantas tratadas com VEBs de GMI1000.

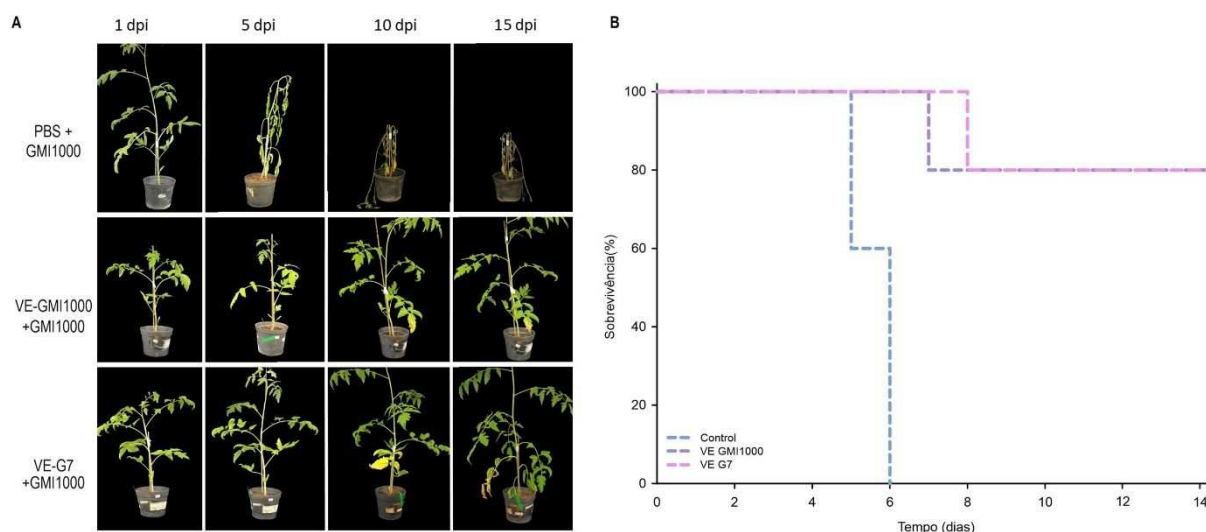


Figura 5: Análise em tomateiros submetidos a tratamento prévio de 5 dias por meio das 1000VEs/μL de GMI1000 e G7 contra a murcha bacteriana. (B) Curva de sobrevivência de tomateiros, linha azul: controle positivo com inoculação de PBS 1x e GMI1000, linha lilás: inoculação de VEBs de GM1000 e bactéria GMI1000, linha rosa: VEBs de G7 com inoculo de GMI1000, registradas no dia 1, 5 e 10 dias após inoculação bacteriana (dpi). As diferenças estatísticas foram calculadas por meio do método de log rank com $P < 0,05$.

4. DISCUSSÃO

Os tubulavírus exigem grande parte da maquinaria de membrana da célula para seu sucesso, e, por sua infecção ser crônica, provocam diversas alterações fenotípicas que podem implicar de forma negativa na virulência de bactérias patogênicas (HAY; LITHGOW, 2019; SHAPIRO; TURNER, 2018). Uma das possibilidades de virulência dessas bactérias é a liberação de VEBs, que possuem diversas funções e tipos e são sintetizadas de acordo com a sua interação com o ambiente (JEONG et al., 2024; KIM et al., 2023; TOYOFUKU et al., 2023). Diante da possibilidade de que as VEBs sejam um dos fatores de virulência, isso também oferece uma margem para a resposta do hospedeiro em combater tal patógeno.

No estudo, foram observadas diversas alterações nas vesículas da bactéria fitopatogênica (GMI1000) em relação à bactéria infectada pelo inovírus *Ralstonia solanacearum* Inovírus Brazil 1 (RSIBR1), que se tornou não patogênica (G7). Houve uma homogeneidade no tamanho encontrado nas VEBs de GMI1000, com cerca de 40 nm, enquanto as vesículas da *R. pseudosolanacearum* sob infecção apresentaram uma maior diversidade no diâmetro, variando entre 50 e 100 nm, além de menor distribuição populacional em relação à bactéria não infectada. Isso pode estar relacionado à maior capacidade de agregação das vesículas derivadas de bactérias infectadas devido às suas modificações.

Alguns exemplos de modificações são principalmente a produção de EPS e o envolvimento das vesículas no processo de produção de biofilme, além de reforçar a associação entre vesículas e partículas virais como um método de defesa bacteriana contra a infecção viral (REZENDE, 2022; SCHWECHHEIMER; KUEHN, 2015). Diante dos resultados, há necessidade de um maior aprofundamento na caracterização do conteúdo das VEBs de *R. pseudosolanacearum*, principalmente nas modificações provocadas nas mesmas quando estão em contexto viral em estudos futuros.

A menor produção significativa observada no estudo atual, em que houve uma diferença de dez vezes na menor quantidade de VEBs derivadas da bactéria infectada G7, em comparação com a bactéria GMI1000, demonstra o quanto a membrana é afetada pela infecção e, conseqüentemente, a vesiculação, em que um dos mecanismos mais observados é a perturbação na biossíntese de peptidoglicanos e em outras moléculas hidrofóbicas, resultando em mudanças na

flexibilidade da membrana externa bacteriana (BITTO; KAPARAKIS-LIASKOS, 2017; SCHWECHHEIMER; KUEHN, 2015; TOYOFUKU; NOMURA; EBERL, 2019).

Além disso, a menor produção de vesículas provocada pelo tubulavírus de interesse na bactéria favorece sua ação no sentido de maior eficiência na liberação de novos virions e, assim, no sucesso em infecções posteriores (REZENDE, 2022). Isso converge com os resultados encontrados, tanto na menor produção quanto na maior diversidade de tamanhos vesiculares. Apesar de a bactéria estar em contexto de estresse celular devido à infecção viral, o que induziria maior vesiculação, a atenuação da produção se configura como um processo de defesa da bactéria contra a disseminação viral, evitando maiores danos à célula.

A interação entre VEBs e plantas já demonstrou ser recorrente no cenário de bactérias fitopatogênicas, muitas vezes favorecendo o estabelecimento de colonização por meio de vários mecanismos de patogenicidade, como estresse celular, hipersensibilidade, supressão gênica e sequestro de nutrientes (JEONG et al., 2024; RUDNICKA et al., 2022). Os principais responsáveis pelo momento inicial da interação são a presença de PAMPs, que são reconhecidos pelo hospedeiro, desencadeando uma resposta que pode ou não favorecer o hospedeiro no combate ao fitopatógeno. Isso já foi demonstrado para *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, em que VEBs induzem a resposta imune em *Arabidopsis* (BAHAR et al., 2016).

Os resultados obtidos apresentaram algo semelhante para as VEBs de *R. pseudosolanacearum*, em que plantas de tomate mostraram reação de hipersensibilidade nessa interação, com comportamento diretamente proporcional à quantidade aplicada. As vesículas derivadas de bactérias não infectadas induziram uma reação de hipersensibilidade no hospedeiro de forma dependente da dose, em que a quantidade aplicada em plantas foi diretamente proporcional ao nível de necrose tecidual. Esse tipo de reação é comum em vegetais, com aumento na produção de metabólitos secundários e de espécies reativas de oxigênio (ROS), que desencadeiam sinalização celular para genes responsivos contra patógenos e, conseqüentemente, podem induzir apoptose celular.

Provavelmente, há uma grande contribuição dessa resposta por conta do LPS, componente presente na membrana externa e nas VEBs de Gram-negativas, que é um dos principais padrões moleculares associados ao patógeno e, em maiores concentrações, pode causar respostas inflamatórias e reações do sistema

inato do hospedeiro (KIM et al., 2023; MCMILLAN et al., 2021), observadas nas características fenotípicas da resposta imune de plantas induzida pelas VEBs.

Entretanto, essa resposta pode ser exacerbada pela ação do bacteriófago nas bactérias, o que pode provocar modificações na composição vesicular (MOGENSEN, 2009; SILVA, 2018). Nos resultados, foi visualizado esse comportamento nas plantas tratadas com VEBs de G7, que apresentaram uma reação mais agressiva, não sendo possível observar a proporção entre a quantidade aplicada e a necrose foliar provocada. Todas as plantas apresentaram o mesmo nível de lesão entre as amostras e mantiveram a progressão da gravidade da lesão ao longo do tempo experimental. Portanto, deverão ser investigados os PAMPs presentes nas VEBs para um melhor entendimento das possíveis causas da maior resposta imunológica em plantas no momento da interação e, assim, identificar o papel do inovírus dentro da bactéria.

Com várias vias sendo ativadas para o combate aos fitopatógenos, já foi observada a possível proteção induzida por VEBs em plantas, como ocorreu com *X. campestris* em *A. thaliana*, principalmente por meio das vias do ácido salicílico e pela integração de componentes hidrofóbicos na membrana plasmática vegetal (MCMILLAN et al., 2021; TRAN et al., 2022). Os resultados presentes na análise de expressão gênica demonstraram que as VEBs tiveram uma ativação significativa ao longo do tempo dos genes da proteína de patogênese de classe 1a (pr1A), presente na via do ácido salicílico, e da proteína semelhante à osmotina (olP) da via do etileno.

O gene mais induzido em plantas na interação com as células bacterianas e suas respectivas VEBs foi o pr1A. O tratamento com as células de GM11000 resultou em maior indução da expressão de pr1A, devido à bactéria ser patogênica e, ao longo do tempo, ter a capacidade de multiplicação e colonização, exigindo maior resposta do hospedeiro para combater a doença. Como a proteína derivada do gene pr1A tem a capacidade de reduzir o crescimento do patógeno na planta, sua superexpressão é justificada pela necessidade do hospedeiro em combater o fitopatógeno, visando reduzir a infecção.

Esse resultado também foi observado para a bactéria G7, porém em menor proporção, pois a infecção do RSIBR1, além de promover modificações fenotípicas, também provoca modificações metabólicas, o que causa redução no crescimento. Além disso, devido a essas modificações, a superfície celular possivelmente altera a

exposição de esteróis, alvo principal da proteína responsiva, refletindo na diferença de expressão entre as bactérias. Em relação às VEBs, a indução da resposta imunológica, a partir da expressão de genes, foi variável, sendo que o gene pr1A não foi induzido entre os tratamentos em relação ao controle nas primeiras 6 horas. Diferentemente dos resultados obtidos a partir de 48 horas, em que a expressão foi aumentada com as vesículas de bactérias infectadas.

Para o gene oIP, relacionado à osmotina, uma proteína multifuncional responsiva ao estresse causado por espécies reativas de oxigênio e principal sinal de resposta e indutor de apoptose celular (BASHIR et al., 2020), novamente as VEBs de G7 induziram maior expressão do que as VEBs de GMI1000 a partir de 48 horas. Os resultados convergem com o observado na reação de hipersensibilidade e na necrose foliar em plantas, que foi mais agressiva para as plantas tratadas com essas vesículas. Um ponto que exige atenção é o favorecimento da resistência adquirida, em que a osmotina é uma proteína responsável pela osmotolerância, regulando a salinidade. Isso, em condições de estresse na planta, é importante para a regulação do fluxo do xilema, componente esse severamente afetado pela murcha bacteriana.

Os resultados refletem a proteção induzida por vesículas purificadas, em que houve baixa taxa de mortalidade nos indivíduos submetidos ao pré-tratamento com vesículas antes de entrarem em contato com *R. pseudosolanacearum*. Especificamente, as VEBs de bactérias infectadas por RSIBR1, que apresentaram o mesmo número de óbitos que as VEBs de GMI1000, mostraram um tempo maior de resistência ao patógeno. Isso condiz com os resultados da análise de expressão dos genes, com a maior ativação do gene relacionado à osmotina, em comparação às vesículas de bactérias não infectadas, que apresentaram indução de expressão diminuída. Portanto, o pré-tratamento com VEBs de G7 forneceu melhor suporte na resposta imunológica contra a murcha bacteriana, resultando na diminuição do agravamento da doença.

Relatos de componentes relacionados à osmotina com propriedades antifúngicas de forma direta em plantas já estão bastante consolidados (SRIPRIYA; PARAMESWARI; VELUTHAMBI, 2017). Entretanto, propriedades antibactericidas para *Ralstonia* relacionadas à osmotina são algo novo, conforme observado nos resultados deste trabalho. A ação indireta dessa proteína em relação à propriedade antibacteriana foi observada em *A. tumefaciens*, com o suposto gene induzindo a

produção de citocininas, o que evitou a síntese de tumores causados por este patógeno (BASHIR et al., 2020).

A indução de apoptose celular por meio da sinalização e regulação da produção de ROS, que, conseqüentemente, induz a expressão desses genes responsivos, evita a proliferação do fitopatógeno, favorecendo o hospedeiro (CHOI; HONG; HWANG, 2013). Isso também é visualizado com a necrose local e a perda tecidual em plantas previamente tratadas com VEBs, evitando a colonização no xilema por *R. pseudosolanacearum*, diminuindo, assim, os efeitos da murcha bacteriana.

Outros componentes fazem parte da ativação do sistema imunológico vegetal, além de vias alternativas que podem ser afetadas por biomoléculas presentes nas VEBs, como a ação de ácidos nucleicos na regulação gênica dos hospedeiros (JEONG et al., 2024; SILVA, 2018), além de outras proteínas que fazem parte do mecanismo de entrada celular das VEBs, sendo, portanto, necessário um maior aprofundamento na investigação dos mecanismos de interação.

5. CONCLUSÕES

As VEBs produzidas por *R. pseudosolanacearum* induziram uma reação de hipersensibilidade e resistência consideráveis em plantas de tomate, principalmente as vesículas sob o efeito da infecção do inovírus RSIBR1, o qual causa alterações fenotípicas. Isso foi observado nas divergências entre as VEBs: com maior diversidade de tamanhos, maior tamanho e menor produção, as vesículas de bactérias infectadas também geraram uma maior resposta imunológica a nível tecidual e molecular, em comparação com as vesículas produzidas pela linhagem selvagem. As VEBs de bactérias não infectadas não induziram significativamente a expressão dos genes analisados *pr1A* e *oIP* em plantas, os quais estão envolvidos na montagem das respostas de defesa na via do ácido salicílico e na via do etileno em tomate, respectivamente. Esses genes estão relacionados com a apoptose celular e com as espécies reativas de oxigênio (ROS), que são respostas inatas que contribuem para a necrose foliar observada em ensaios *in vivo*. Este foi o primeiro relato de VEBs do complexo de espécies de *R. solanacearum* (CERS) servindo como imunizante contra a morte causada pela murcha bacteriana, em que a infecção viral não gerou uma influência significativa no processo de resistência adquirida pelas plantas. Sendo assim, faz-se necessário realizar estudos mais aprofundados sobre as alterações proteicas e outros componentes moleculares inseridos nas VEBs, visando a elucidação dos possíveis mecanismos de ativação do sistema imunológico do hospedeiro contra a murcha bacteriana por meio das vesículas bacterianas.

REFERÊNCIAS

- ADDY, H. S. et al. Loss of Virulence of the Phytopathogen *Ralstonia solanacearum* Through Infection by ϕ RSM Filamentous Phages. v. 102, n. 5, p. 469, 2012.
- AHMAD, A. A.; STULBERG, M. J.; HUANG, Qi. Prophage Rs551 and Its Repressor Gene orf14 Reduce Virulence and Increase Competitive Fitness of Its *Ralstonia solanacearum* Carrier Strain UW551. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, 22 Dec. 2017.
- ALBUQUERQUE, G. M. R. et al. Sequevar distribution of *Ralstonia spp.* in Solanaceae in the semiarid climate of the Pernambuco state, Brazil. *European Journal of Plant Pathology*, v. 159, n. 1, p. 13–25, 1 jan. 2021.
- ÁLVAREZ, B.; BIOSCA, E. G.; LÓPEZ, M. M. On the life of *Ralstonia solanacearum*, a destructive bacterial plant pathogen. *Technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology*, p. 267–279, 2010
- ALEXANDER, D; GOODMAN, R M; GUT-RELLA, M; GLASCOCK, C; WEYMANN, K; FRIEDRICH, L; MADDOX, D; AHL-GOY, P; LUNTZ, T; WARD, E. Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 90, n. 15, p. 7327–7331, Aug. 1993.
- ALFENAS-ZERBINI, P.; MAIA, I. G.; FÁVARO, R. D.; CASCARDO, J. C. M.; BROMMONSCHENKEL, S. H.; ZERBINI, F. M. Genome-Wide Analysis of Differentially Expressed Genes During the Early Stages of Tomato Infection by a Potyvirus. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, v. 22, n. 3, p. 352–361, Mar. 2009..
- ALI, S.; GANAI, B. A.; KAMILI, A. N.; BHAT, A. A.; MIR, Z. A.; BHAT, J. A.; TYAGI, A.; ISLAM, S. T.; MUSHTAQ, M.; YADAV, P.; RAWAT, S.; GROVER, A.. Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. *Microbiological Research*, v. 212–213, p. 29–37, Jul. 2018.
- ALI, S.; MIR, Z. A.; TYAGI, A.; BHAT, J. A.; CHANDRASHEKAR, N.; PAPOLU, P. K.; RAWAT, S.; GROVER, A. Identification and comparative analysis of *Brassica juncea* pathogenesis-related genes in response to hormonal, biotic and abiotic stresses. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 39, n. 12, p. 268, 8 Dec. 2017.
- KUMAR, A. S.; KUMARI, H. P.; KUMAR, S. G.; MOHANALATHA, C.; KAVI KISHOR, P. B. Osmotin: a plant sentinel and a possible agonist of mammalian adiponectin. *Frontiers in Plant Science*, v. 6, 16 Mar. 2015.
- ANDREONI, F. et al. Antibiotics stimulate formation of vesicles in *Staphylococcus aureus* in both phage-dependent and -independent fashions and via different routes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 63, n. 2, 1 fev. 2019.
- ASKORA, A.; YAMADA, T. Two different evolutionary lines of filamentous phages in *Ralstonia solanacearum*: their effects on bacterial virulence. *Frontiers in Genetics*, v.

6, 18 Jun. 2015.

AVILA-CALDERÓN, E. D. et al. Outer Membrane Vesicles of Gram-Negative Bacteria: An Outlook on Biogenesis. *Frontiers in Microbiology*, v. 12, p. 557902, 4 mar. 2021.

BAHAR, O. et al. Bacterial Outer Membrane Vesicles Induce Plant Immune Responses. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, v. 29, n. 5, p. 374–384, 1 maio 2016.

BAROUKH, C.; ZEMOURI, M.; GENIN, S. Trophic preferences of the pathogen *Ralstonia solanacearum* and consequences on its growth in xylem sap. *MicrobiologyOpen*, v. 11, n. 1, 19 Feb. 2022.

BASHIR, M. A. et al. Osmotin: A Cationic Protein Leads to Improve Biotic and Abiotic Stress Tolerance in Plants. *Plants*, v. 9, n. 8, p. 992, 4 ago. 2020.

BAUWENS, A. et al. Antibiotic-Mediated Modulations of Outer Membrane Vesicles in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 and O157:H7. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 61, n. 9, set. 2017.

BITTO, N. J. et al. Bacterial membrane vesicles transport their DNA cargo into host cells. *Scientific reports*, v. 7, n. 1, 1 dez. 2017.

BITTO, N.; KAPARAKIS-LIASKOS, M. The Therapeutic Benefit of Bacterial Membrane Vesicles. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, n. 6, p. 1287, 16 jun. 2017.

BURCKHARDT, J. C.; TROPINI, C. Inoviruses. *Current biology : CB*, v. 33, n. 24, p. R1272–R1274, 18 dez. 2023.

CALDWELL, D.; KIM, B. S.; IYER-PASCUZZI, A. S. *Ralstonia solanacearum* differentially colonizes roots of resistant and susceptible tomato plants. *Phytopathology*, v. 107, n. 5, p. 528–536, 1 maio 2017.

CALENDAR, R. *The Bacteriophages*. ed. 2, Oxford University Press, 2006

CARUANA, J. C.; WALPER, S. A. Bacterial Membrane Vesicles as Mediators of Microbe – Microbe and Microbe – Host Community Interactions. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, p. 516984, 24 mar. 2020.

CHATTERJEE, S. N.; DAS, J. Electron Microscopic Observations on the Excretion of Cell-wall Material by *Vibrio cholerae*. *Journal of General Microbiology*, v. 49, n. 1, p. 1–11, 1 out. 1967.

CHAUDHARY, G.; SINGH, D.; SHARMA, M. Effect of chemical elicitors on the differential expression pattern of PR genes in susceptible and resistant cultivars of tomato against bacterial wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 116, p. 101689, dez. 2021.

CHOI, D. S.; HONG, J. K.; HWANG, B. K. Pepper osmotin-like protein 1 (CaOSM1) is an essential component for defense response, cell death, and oxidative burst in plants. *Planta*, v. 238, n. 6, p. 1113–1124, 1 dez. 2013.

CHOI, J.-W. et al. Secretable Small RNAs via Outer Membrane Vesicles in Periodontal Pathogens. *Journal of Dental Research*, v. 96, n. 4, p. 458–466, 9 abr. 2017.

CONRATH, U. et al. Priming for Enhanced Defense. *Annual Review of Phytopathology*, v. 53, n. 1, p. 97–119, 4 ago. 2015.

CORRAL, J. et al. Twitching and Swimming Motility Play a Role in *Ralstonia solanacearum* Pathogenicity. *mSphere*, v. 5, n. 2, 29 abr. 2020.

DAS, M.; CHAUHAN, H.; CHHIBBAR, A.; RIZWANUL, H. Q. M.; KHURANA, P. High-efficiency transformation and selective tolerance against biotic and abiotic stress in mulberry, *Morus indica* cv. K2, by constitutive and inducible expression of tobacco osmotin. *Transgenic Research*, v. 20, n. 2, p. 231–246, 15 Apr. 2011.

DAS, S.; CHAKRABORTY, S. The role of Osmotin Protein Tolerance to Biotic and Abiotic Stress in Plants. *International Journal of Bioinformatics and Biological Science*, v. 4, n. 1, p. 35, 2016.

DE ALMEIDA, J. C. F. et al. Genomic and Biological Characterization of *Ralstonia solanacearum* Inovirus Brazil 1, an Inovirus that Alters the Pathogenicity of the Phytopathogen *Ralstonia pseudosolanacearum*. *Microbial ecology*, v. 84, n. 2, p. 527–538, 1 ago. 2022.

DORWARD, D. W.; GARON, C. F.; JUDD, R. C. Export and intercellular transfer of DNA via membrane blebs of *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of Bacteriology*, v. 171, n. 5, p. 2499, 1989.

EGOROV, T. A.; ODINTSOVA, T. I.; PUKHALSKY, V. A.; GRISHIN, E. V. Diversity of wheat anti-microbial peptides. *Peptides*, v. 26, n. 11, p. 2064–2073, Nov. 2005.

FEGAN, M.; PRIOR, P. How Complex is the “*Ralstonia Solanacearum* Species Complex. Em: Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia Solanacearum* Species Complex. v. 1, p. 449–461. 2005

FREITAS, R. G. et al. Validation and use of a qPCR protocol to quantify the spread of *Ralstonia solanacearum* in susceptible and resistant eucalypt plants. *Plant Pathology*, v. 70, n. 7, p. 1708–1718, 1 set. 2021.

FULSUNDAR, S. et al. Gene transfer potential of outer membrane vesicles of *Acinetobacter baylyi* and effects of stress on vesiculation. *Applied and environmental microbiology*, v. 80, n. 11, p. 3469–3483, 2014.

FURUYAMA, N.; SIRCILI, M. P. Outer membrane vesicles (OMVs) produced by gram-negative bacteria: Structure, functions, biogenesis, and vaccine application. *BioMed Research International*, 2021.

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

GERLIN, L.; ESCOURROU, A.; CASSAN, C.; MAVIANE, M. F.; PEETERS, N.; GENIN, S.; BAROUKH, C. Unravelling physiological signatures of tomato bacterial wilt and xylem metabolites exploited by *Ralstonia solanacearum*. Environmental Microbiology, v. 23, n. 10, p. 5962–5978, 1 Oct. 2021.

GILMORE, W. J. et al. Immunomodulatory roles and novel applications of bacterial membrane vesicles. Molecular Immunology, v. 134, p. 72–85, jun. 2021.

GONÇALVES, O. S.; SOUZA, F. O.; BRUCKNER, F. P.; SANTANA, M. F.; ALFENAS-ZERBINI, P. Widespread distribution of prophages signaling the potential for adaptability and pathogenicity evolution of *Ralstonia solanacearum* species complex. Genomics, v. 113, n. 3, p. 992–1000, May 2021.

GORDON-WEEKS, R; SUGARS, J.M; ANTONIW, J.F; WHITE, R.F. Accumulation of a novel PR1 protein in *Nicotiana langsdorffii* leaves in response to virus infection or treatment with salicylic acid. Physiological and Molecular Plant Pathology, v. 50, n. 4, p. 263–273, Apr. 1997.

GREENROD, S. T. E. et al. Global diversity and distribution of prophages are lineage-specific within the *Ralstonia solanacearum* species complex. BMC Genomics 2022 23:1, v. 23, n. 1, p. 1–19, 6 out. 2022.

HAY, I. D.; LITHGOW, T. Filamentous phages: masters of a microbial sharing economy. EMBO reports, v. 20, n. 6, jun. 2019.

HWANG, I. S.; OH, E.; OH, C. Transcriptional Changes of Plant Defense-Related Genes in Response to *Clavibacter* Infection in Pepper and Tomato. The Plant Pathology Journal, v. 36, n. 5, p. 450–458, 1 Oct. 2020.

ILYINA, T. S. Filamentous bacteriophages and their role in the virulence and evolution of pathogenic bacteria. Molecular Genetics, Microbiology and Virology, v. 30, n. 1, 2015.

ISLAM, M. M.; EL-SAPPAH, A. H.; ALI, H. M.; ZANDI, P.; HUANG, Q.; SOAUD, S. A.; ALAZIZI, E. M.Y.; Wafa, H. A.; HOSSAIN, M. A.; LIANG, Y. Pathogenesis-related proteins (PRs) countering environmental stress in plants: A review. South African Journal of Botany, v. 160, p. 414–427, Sep. 2023.

JAN, A. T. Outer Membrane Vesicles (OMVs) of gram-negative bacteria: A perspective update. Frontiers in Microbiology, v. 8, n. JUN, p. 254572, 9 jun. 2017.

JEONG, G. J. et al. Bacterial extracellular vesicles: Modulation of biofilm and virulence properties. Acta Biomaterialia, v. 178, p. 13–23, 1 abr. 2024.

JIANG, M. et al. Reductions in bacterial viability stimulate the production of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) cytoplasm-carrying Extracellular Vesicles (EVs). *PLoS pathogens*, v. 18, n. 10, 1 out. 2022.

JUODEIKIS, R.; CARDING, S. R. Outer Membrane Vesicles: Biogenesis, Functions, and Issues. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, v. 86, n. 4, 21 dez. 2022.

KASHYAP, A. et al. Induced ligno-suberin vascular coating and tyramine-derived hydroxycinnamic acid amides restrict *Ralstonia solanacearum* colonization in resistant tomato roots. *bioRxiv*, p. 2021.06.15.448549, 17 jun. 2021.

KATSIR, L.; BAHAR, O. Bacterial outer membrane vesicles at the plant–pathogen interface. *PLOS Pathogens*, v. 13, n. 6, p. e1006306, 2017.

KAUR, A.; KAUR, S.; KAUR, A.; KAUR, S. N.; SHARMA, D. Pathogenesis-Related Proteins and Their Transgenic Expression for Developing Disease-Resistant Crops: Strategies Progress and Challenges. *Case Studies of Breeding Strategies in Major Plant Species*, 2023.

KIM, J. Y. et al. Gram-Negative Bacteria's Outer Membrane Vesicles. *Infection & Chemotherapy*, v. 55, n. 1, p. 1, 2023.

KLEINBAUM, David G.; KLEIN, Mitchel. Kaplan-Meier Survival Curves and the Log-Rank Test.. p. 55–96, 2012.

KNOX, K. W.; VESK, M.; WORK, E. Relation Between Excreted Lipopolysaccharide Complexes and Surface Structures of a Lysine-Limited Culture of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, v. 92, n. 4, p. 1206–1217, out. 1966.

KRUPOVIC, M. et al. Bacterial Viruses Subcommittee and Archaeal Viruses Subcommittee of the ICTV: update of taxonomy changes in 2021. *Archives of virology*, v. 166, n. 11, p. 3239–3244, 1 nov. 2021.

LANDRY, D. et al. The large, diverse, and robust arsenal of *Ralstonia solanacearum* type III effectors and their in planta functions. *Molecular Plant Pathology*, v. 21, n. 10, p. 1377–1388, 1 out. 2020.

LETAROV, A. V. History of Early Bacteriophage Research and Emergence of Key Concepts in Virology. *Biochemistry (Moscow)*, v. 85, n. 9, p. 1093–1112, 22 Sep. 2020.

LEE, E. Y. et al. Gram-positive bacteria produce membrane vesicles: proteomics-based characterization of *Staphylococcus aureus*-derived membrane vesicles. *Proteomics*, v. 9, n. 24, p. 5425–5436, dez. 2009.

LIAO, S. et al. *Streptococcus mutans* extracellular DNA is upregulated during growth in biofilms, actively released via membrane vesicles, and influenced by components of the protein secretion machinery. *Journal of bacteriology*, v. 196, n. 13, p. 2355–2366, 2014.

LI, C. et al. Outer Membrane Vesicles of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Mediate the Horizontal Transmission of blaCTX-M-55. *Pathogens*, v. 11, n. 4, p. 481, 18 abr. 2022.

LIEBRAND, T. W. H.; VAN DEN BURG, H. A.; JOOSTEN, M. H.A.J. Two for all: receptor-associated kinases SOBIR1 and BAK1. *Trends in Plant Science*, v. 19, n. 2, p. 123–132, Feb. 2014.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LOPES, C. A. Comunicado Técnico 67 Murcha Bacteriana ou Murchadeira-Uma Inimiga do Tomateiro em Climas Quentes Importância da Doença. Emprapa, 2009.

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, n. JUN, p. 286550, 13 jun. 2018.

LOWE-POWER, T. M.; KHOKHANI, D.; ALLEN, C. How *Ralstonia solanacearum* Exploits and Thrives in the Flowing Plant Xylem Environment. *Trends in microbiology*, v. 26, n. 11, p. 929–942, 1 nov. 2018.

MAI-PROCHNOW, A. et al. “Big things in small packages: the genetics of filamentous phage and effects on fitness of their host”. *FEMS microbiology reviews*, v. 39, n. 4, p. 465–487, 1 jul. 2015.

MANGHWAR, H.; HUSSAIN, A. Mechanism of tobacco osmotin gene in plant responses to biotic and abiotic stress tolerance: A brief history. *BIOCELL*, v. 46, n. 3, p. 623–632, 2022.

MANNING, A. J.; KUEHN, M. J. Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense. *BMC Microbiology*, v. 11, n. 1, p. 1–15, 1 dez. 2011.

MANSFIELD, J. et al. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, v. 13, n. 6, p. 614–629, 1 ago. 2012.

MA, Q. et al. The novel leucine-rich repeat receptor-like kinase MRK1 regulates resistance to multiple stresses in tomato. *Horticulture Research*, v. 9, 5 jan. 2022.

MCMILLAN, H. M. et al. Protective plant immune responses are elicited by bacterial outer membrane vesicles. *Cell Reports*, v. 34, n. 3, p. 108645, 19 jan. 2021b.

MCMILLAN, H. M.; KUEHN, M. J. The extracellular vesicle generation paradox: a bacterial point of view. *The EMBO journal*, v. 40, n. 21, 2 nov. 2021a.

MENG, F. *Ralstonia Solanacearum* Species Complex and Bacterial Wilt Disease. *J Bacteriol Parasitol*, v. 4, p. 19, 2013.

MIZUBUTI, E. S. G. et al. On the assessment of the sources of inoculum of bacterial wilt in Brazil. *Tropical Plant pathology*, v. 47, p.685-691. 29 jun. 2022.

MOGENSEN, T. H. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clinical microbiology reviews*, v. 22, n. 2, p. 240–273, abr. 2009.

MORAIS, T. P. et al. Occurrence and diversity of *Ralstonia solanacearum* populations in Brazil. *Review Article Biosci. J*, n. 6, p. 1722–1737, dez. 2015.

MORDUKHOVICH, G.; BAHAR, O. Isolation of Outer Membrane Vesicles from Phytopathogenic *Xanthomonas campestris pv. campestris*. *Bio-protocol*, v. 7, n. 5, p. 5, 3 mar. 2017.

MORI, Y. et al. Ralfuranones contribute to mushroom-type biofilm formation by *Ralstonia solanacearum* strain OE1-1. *Molecular Plant Pathology*, v. 19, n. 4, p. 975–985, 1 abr. 2018.

NIDERMAN, T.; GENETET, I.; BRUYERE, T.; GEES, R.; STINTZI, A.; LEGRAND, M.; FRITIG, B.; MOSINGER, E. Pathogenesis-Related PR-1 Proteins Are Antifungal (Isolation and Characterization of Three 14-Kilodalton Proteins of Tomato and of a Basic PR-1 of Tobacco with Inhibitory Activity against *Phytophthora infestans*). *Plant Physiology*, v. 108, n. 1, p. 17–27, 1 May 1995.

PARR, Leland W. Bacterial Genes and Viruses: Papers on Bacterial Genetics . Illu. *Science*, v. 134, n. 3471, p. 44–45, 7 Jul. 1961

PATHIRANA, R. D.; KAPARAKIS-LIASKOS, M. Bacterial membrane vesicles: Biogenesis, immune regulation and pathogenesis. *Cellular Microbiology*, v. 18, n. 11, p. 1518–1524, nov. 2016.

PAUDEL, S. et al. Taxonomy and Phylogenetic Research on *Ralstonia solanacearum* Species Complex: A Complex Pathogen with Extraordinary Economic Consequences. *Pathogens*, v. 9, n. 11, p. 886, 25 out. 2020.

PRIOR, P. et al. Genomic and proteomic evidence supporting the division of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* into three species. *BMC Genomics*, v. 17, n. 1, p. 1–11, 1 fev. 2016.

Produção de Banana no Brasil | IBGE. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/banana/br>>. Acesso em: 31 jul. 2024.

PRUITT, R. N.; GUST, A. A.; NÜRNBERGER, T. Plant immunity unified. *Nature Plants* 2021 7:4, v. 7, n. 4, p. 382–383, 30 mar. 2021.

QAIS, F. A. et al. Coumarin Exhibits Broad-Spectrum Antibiofilm and Antiquorum Sensing Activity against Gram-Negative Bacteria: In Vitro and in Silico Investigation. *ACS Omega*, v. 6, n. 29, p. 18823–18835, 27 jul. 2021.

QI, P. et al. A *Ralstonia solanacearum* effector targets TGA transcription factors to subvert salicylic acid signaling. *The Plant Cell*, v. 34, n. 5, p. 1666–1683, 26 abr. 2022.

RAKONJAC, J. et al. Filamentous Phage: Structure and Biology. *Advances in experimental medicine and biology*, v. 1053, p. 1–20, 2017.

RESCH, U. et al. A Two-Component Regulatory System Impacts Extracellular Membrane-Derived Vesicle Production in Group A Streptococcus. *mBio*, v. 7, n. 6, 2016.

REZENDE, R. R. Tubulavírus: evolução, taxonomia e interação com seu hospedeiro. Tese de doutorado, Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, 2022.

ROIER, S. et al. A novel mechanism for the biogenesis of outer membrane vesicles in Gram-negative bacteria. *Nature Communications*, v. 7, n. 1, p. 10515, 25 jan. 2016.

ROUX, S. et al. Cryptic inoviruses revealed as pervasive in bacteria and archaea across Earth's biomes. *Nature Microbiology* 2019 4:11, v. 4, n. 11, p. 1895–1906, 22 jul. 2019.

RUDNICKA, M. et al. Outer Membrane Vesicles as Mediators of Plant–Bacterial Interactions. *Frontiers in Microbiology*, v. 13, p. 902181, 1 jun. 2022.

SABBAGH, C. R. R. et al. Pangenomic type III effector database of the plant pathogenic *Ralstonia spp.* *PeerJ*, v. 2019, n. 8, p. e7346, 6 ago. 2019.

SADAT NOORI, S. A.; SOKHANSANJ, A. Wheat plants containing an Osmotin gene show enhanced ability to produce roots at high NaCl concentration. *Russian Journal of Plant Physiology*, v. 55, n. 2, p. 256–258, 20 Mar. 2008.

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 *R. syzygii subsp. syzygii subsp. nov.*, *R. solanacearum* phylotype IV strains as *R. syzygii subsp. indonesiensis subsp. nov.*, banana blood disease bacterium strains as *R. syzygii subsp. celebesensis subsp. nov.* and *R. solanacearum* phylotype I and III strains as *R. pseudosolanacearum sp. nov.* *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 64, n. Pt_9, p. 3087–3103, 1 set. 2014.

SALMOND, G. P. C.; FINERAN, P. C. A century of the phage: past, present and future. *Nature Reviews Microbiology*, v. 13, n. 12, p. 777–786, 9 Dec. 2015.

SANGER, F.; AIR, G. M.; BARRELL, B. G.; BROWN, N. L.; COULSON, A. R.; FIDDES, J. C.; HUTCHISON, C. A.; SLOCOMBE, P. M.; SMITH, M. Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174 DNA. *Nature*, v. 265, n. 5596, p. 687–695, Feb. 1977.

SANTIAGO, T. R. et al. Phylotype and sequevar variability of *Ralstonia solanacearum* in Brazil, an ancient centre of diversity of the pathogen. *Plant Pathology*, v. 66, n. 3, p. 383–392, 1 abr. 2017.

SANTIAGO, T. R. et al. Genetic Structure of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia pseudosolanacearum* in Brazil. *Plant disease*, v. 104, n. 4, p. 1019–1025, 2020.

SAROWAR, S.; KIM, Y. J.; KIM, E. N.; KIM, K. D.; HWANG, B. K.; ISLAM, R.; SHIN, J. S. Overexpression of a pepper basic pathogenesis-related protein 1 gene in tobacco plants enhances resistance to heavy metal and pathogen stresses. *Plant Cell Reports*, v. 24, n. 4, p. 216–224, 18 Jun. 2005.

SCHWECHHEIMER, C.; KUEHN, M. J. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nature reviews. Microbiology*, v. 13, n. 10, p. 605–619, 16 set. 2015.

SHAPIRO, J. W.; TURNER, P. E. Evolution of mutualism from parasitism in experimental virus populations. *Evolution; international journal of organic evolution*, v. 72, n. 3, p. 707–712, 1 mar. 2018.

SHI, H. et al. Induced defense strategies of plants against *Ralstonia solanacearum*. *Frontiers in Microbiology*, v. 14, p. 1059799, 26 jan. 2023.

SILVA, G. C. Efeito da proteína hfq em vesículas de membrana externa produzidas por *Actinobacillus pleuropneumoniae* SOROTIPO 8. Dissertação—Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2018.

SILVA, P. H. R. et al. Exploring the competitive potential of *Ralstonia pseudosolanacearum* and *Ralstonia solanacearum*: Insights from a comparative adaptability study. *Plant Pathology*, v. 73, n. 4, p. 898–914, 1 maio 2024.

SONAH, H.; ZHANG, X.; DESHMUKH, R. K.; BORHAN, M. H.; FERNANDO, W. G. D.; BÉLANGER, R. R. Comparative Transcriptomic Analysis of Virulence Factors in *Leptosphaeria maculans* during Compatible and Incompatible Interactions with Canola. *Frontiers in Plant Science*, v. 7, 1 Dec. 2016.

SRIPRIYA, R.; PARAMESWARI, C.; VELUTHAMBI, K. Enhancement of sheath blight tolerance in transgenic rice by combined expression of tobacco osmotin (ap24) and rice chitinase (chi11) genes. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, v. 53, n. 1, p. 12–21, 1 fev. 2017.

TARTAGLIA, N. R. et al. Extracellular vesicles produced by human and animal *Staphylococcus aureus* strains share a highly conserved core proteome. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, 1 dez. 2020.

TASAKA, Y.; KAWASAKI, T.; YAMADA, T. Filamentous phages affect virulence of the phytopathogen *Ralstonia solanacearum*. *Biocommunication of Phages*, p. 221–237, 1 jan. 2020.

TASHIRO, Y. et al. Interaction of bacterial membrane vesicles with specific species and their potential for delivery to target cells. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, n. APR, p. 251053, 7 abr. 2017.

TONDO, M. L. et al. KatE From the Bacterial Plant Pathogen *Ralstonia solanacearum* Is a Monofunctional Catalase Controlled by HrpG That Plays a Major Role in Bacterial Survival to Hydrogen Peroxide. *Frontiers in Plant Science*, v. 11, p. 564371, 31 jul. 2020.

TOYOFUKU, M. et al. Membrane vesicle formation is associated with pyocin production under denitrifying conditions in *Pseudomonas aeruginosa*. *PAO 1. Environmental Microbiology*, v. 16, n. 9, p. 2927–2938, 24 set. 2014.

TOYOFUKU, M. et al. Prophage-triggered membrane vesicle formation through peptidoglycan damage in *Bacillus subtilis*. *Nature Communications* 2017 8:1, v. 8, n. 1, p. 1–10, 7 set. 2017.

TOYOFUKU, M. et al. Composition and functions of bacterial membrane vesicles. *Nature reviews. Microbiology*, v. 21, n. 7, p. 415–430, 1 jul. 2023.

TOYOFUKU, M.; NOMURA, N.; EBERL, L. Types and origins of bacterial membrane vesicles. *Nature reviews. Microbiology*, v. 17, n. 1, p. 13–24, 1 jan. 2019.

TRAN, F.; BOEDICKER, J. Q. Genetic cargo and bacterial species set the rate of vesicle-mediated horizontal gene transfer. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, 1 dez. 2017.

TRAN, T. M. et al. Extracellular DNases of *Ralstonia solanacearum* modulate biofilms and facilitate bacterial wilt virulence. *Environmental Microbiology*, v. 18, n. 11, p. 4103–4117, 1 nov. 2016.

TRAN, T. M. et al. Potentiation of plant defense by bacterial outer membrane vesicles is mediated by membrane nanodomains. *The Plant Cell*, v. 34, n. 1, p. 395–417, 20 jan. 2022.

TURNBULL, L. et al. Explosive cell lysis as a mechanism for the biogenesis of bacterial membrane vesicles and biofilms. *Nature communications*, v. 7, 14 abr. 2016.

VAILLEAU, F.; GENIN, S. *Ralstonia solanacearum*: An Arsenal of Virulence Strategies and Prospects for Resistance. *Annual Review of Phytopathology*, v. 61, n. 1, p. 25–47, 5 set. 2023.

VAN DER BURGH, A. M.; POSTMA, J.; ROBATZEK, S.; JOOSTEN, M. H. A. J. Kinase activity of SOBIR1 and BAK1 is required for immune signalling. *Molecular Plant Pathology*, v. 20, n. 3, p. 410–422, 2 Mar. 2019.

VAN LOON, L. C.; PIERPOINT, W. S.; BOLLER, Th.; CONEJERO, V. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 12, n. 3, p. 245–264, Sep. 1994.

VIDHYASEKARAN, P. PAMP Signals in Plant Innate Immunity. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014. v. 21, (Signaling and Communication in Plants).

VIEIRA, W. O. et al. Comparative adaptability of *Ralstonia solanacearum* Moko ecotype isolates associated with wilt and Sergipe facies in Brazil. Tropical Plant Pathology, p. 1–12, 11 jun. 2024.

VIKTOROVA, J.; KLCOVA, B.; REHOROVA, K.; VLCKO, T.; STANKOVA, L.; JELENOVA, N.; CEJNAR, P.; KUNDU, J. K.; OHNOUTKOVA, L.; MACEK, T. Recombinant expression of osmotin in barley improves stress resistance and food safety during adverse growing conditions. PLOS ONE, v. 14, n. 5, p. e0212718, 10 May 2019.

VLOT, A. C. et al. Systemic propagation of immunity in plants. New Phytologist, v. 229, n. 3, p. 1234–1250, 24 fev. 2021.

VOLGERS, C.; SAVELKOUL, P. H. M.; STASSEN, F. R. M. Gram-negative bacterial membrane vesicle release in response to the host-environment: different threats, same trick? Critical Reviews in Microbiology, v. 44, n. 3, p. 258–273, 4 maio 2018.

WAN, Q.; HONGBO, S.; ZHAOLONG, X.; JIA, L.; DAYONG, Z.; YIHONG, H. Salinity Tolerance Mechanism of Osmotin and Osmotin-like Proteins: A Promising Candidate for Enhancing Plant Salt Tolerance. Current Genomics, v. 18, n. 6, 29 Sep. 2017.

WANG, M.; NIE, Y.; WU, X. L. Extracellular heme recycling and sharing across species by novel mycomembrane vesicles of a Gram-positive bacterium. The ISME journal, v. 15, n. 2, p. 605–617, 1 fev. 2021.

WANG, X. et al. Release of *Staphylococcus aureus* extracellular vesicles and their application as a vaccine platform. Nature communications, v. 9, n. 1, 1 dez. 2018.

WANG, Y. et al. Regulation and Function of Defense-Related Callose Deposition in Plants. International Journal of Molecular Sciences 2021, V. 22, Page 2393, v. 22, n. 5, p. 2393, 27 fev. 2021.

WEI, X.; WANG, Y.; ZHANG, S.; GU, T.; STEINMETZ, G.; YU, H.; GUO, G.; LIU, X.; FAN, S.; WANG, F.; GU, Y.; XIN, F. Structural analysis of receptor-like kinase SOBIR1 reveals mechanisms that regulate its phosphorylation-dependent activation. Plant Communications, v. 3, n. 2, p. 100301, Mar. 2022.

WICKER, E. et al. *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. Applied and Environmental Microbiology, v. 73, n. 21, p. 6790–6801, nov. 2007.

WICKER, E. et al. Contrasting recombination patterns and demographic histories of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from MLSA. The ISME Journal, v. 6, n. 5, p. 961, maio 2012.

XIAN, L. et al. A Bacterial Effector Protein Hijacks Plant Metabolism to Support Pathogen Nutrition. Cell Host and Microbe, v. 28, n. 4, p. 548- 557.e7, 7 out. 2020.

XIAO, M.; LI, G.; YANG, H. Microbe-host interactions: structure and functions of Gram-negative bacterial membrane vesicles. *Frontiers in Microbiology*, v. 14, 31 ago. 2023.

YAMADA, T. Filamentous phages of *Ralstonia solanacearum*: double-edged swords for pathogenic bacteria. *Frontiers in Microbiology*, v. 4, 2013.

YANG, L. et al. Metabolic Profiling of Resistant and Susceptible Tobaccos Response Incited by *Ralstonia pseudosolanacearum* Causing Bacterial Wilt. *Frontiers in Plant Science*, v. 12, p. 780429, 7 jan. 2022.

ZHENG, X. et al. A systematic screen of conserved *Ralstonia solanacearum* effectors reveals the role of RipAB, a nuclear-localized effector that suppresses immune responses in potato. *Molecular Plant Pathology*, v. 20, n. 4, p. 547–561, 1 abr. 2019.

ZIPFEL, C. Plant pattern-recognition receptors. *Trends in Immunology*, v. 35, n. 7, p. 345–351, jul. 2014.

ANEXO

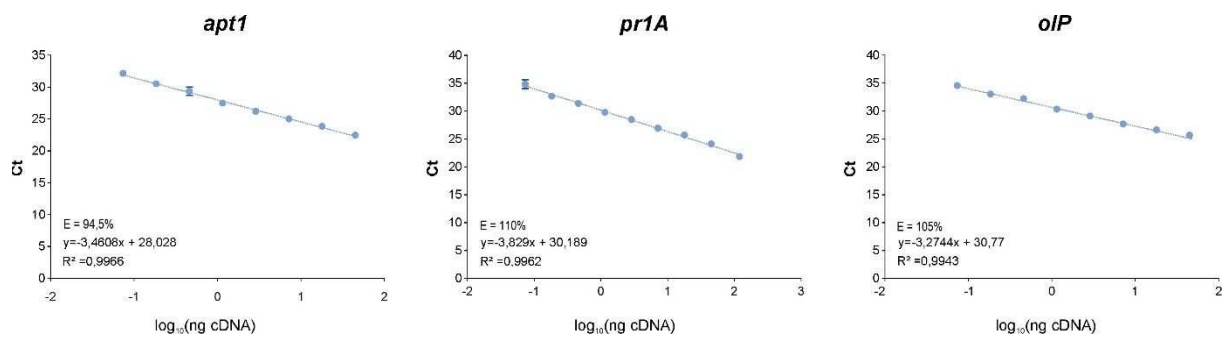


Figura 1: Curvas padrão dos genes analisados e o endógeno para normalização da expressão gênica.

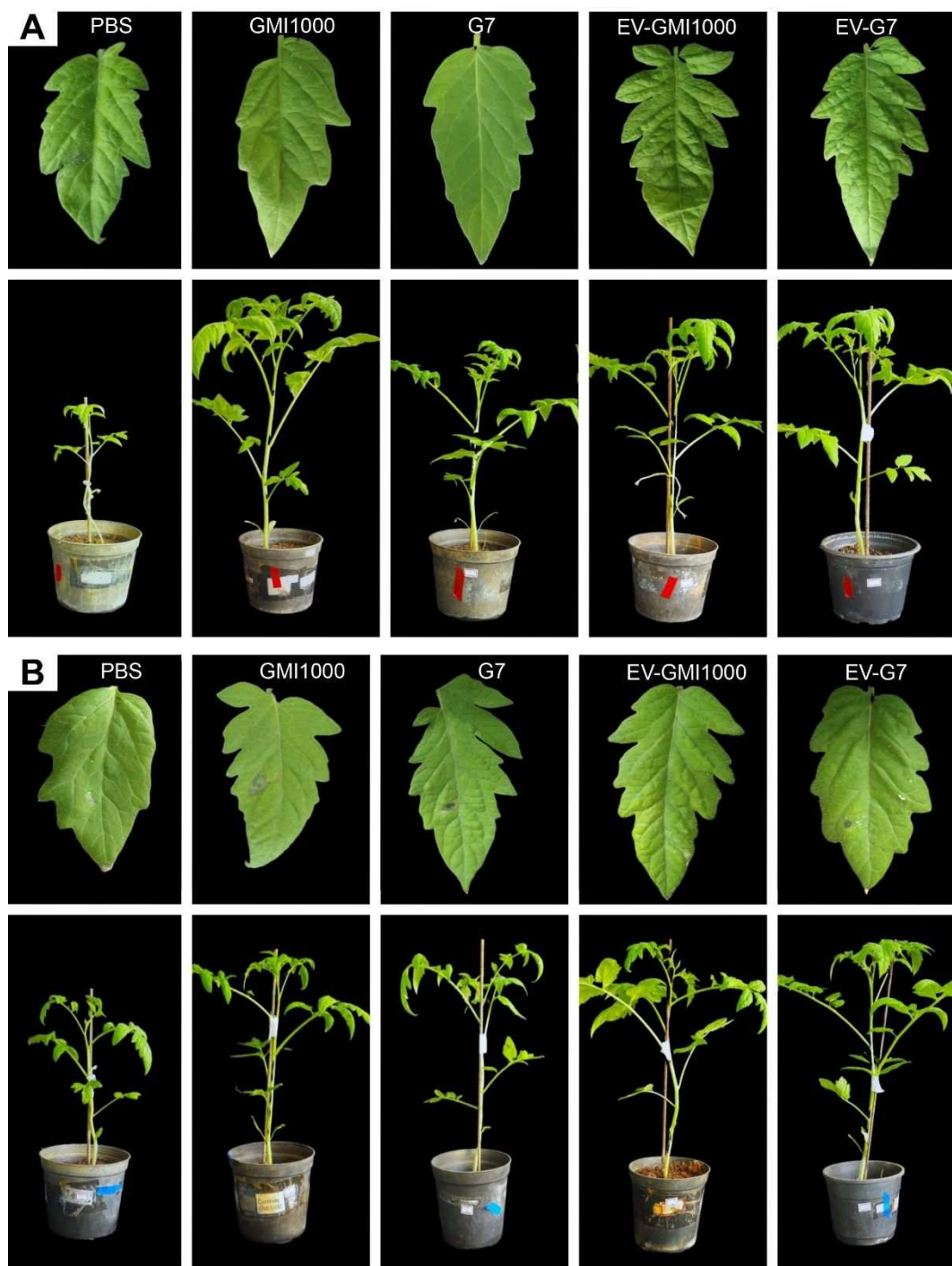


Figura 2: Análise fenotípica do experimento de expressão relativa de genes de defesa em plantas no período de 6 horas (A) e no período de 48 horas (B) pós-inoculação.

<i>pr1A</i>			<i>oIP</i>		
Comparações	p-valor	Significativo	Comparações	p-valor	Significativo
GMI1000 6h x GMI1000 48h	0,026	sim	GMI1000 6h x GMI1000 48h	0,014	sim
G7 6h x G7 48h	0,085	não	G7 6h x G7 48h	0,458	não
VE-G7 6h x VE- G7 48h	0,141	não	VE-G7 6h x VE- G7 48h	0,28	não
VE-GMI1000 6h x VE-GMI1000 48h	0,245	não	VE-GMI1000 6h x VE-GMI1000 48h	0,409	não
PBS 6h x PBS 48h	0,196	não	PBS 6h x PBS 48h	0,954	não
GMI1000 6h x VE-GMI1000 6h	0,366	não	GMI1000 6h x VE-GMI1000 6h	0,051	não
GMI1000 6h x G7 6h	0,005	sim	GMI1000 6h x G7 6h	0,096	não
GMI1000 6h x VE-G7 6h	0,671	não	GMI1000 6h x VE-G7 6h	0,069	não
GMI1000 6h x PBS 6h	0,689	não	GMI1000 6h x PBS 6h	0,205	não
VE-GMI1000 6h x G7 6h	0,012	sim	VE-GMI1000 6h x G7 6h	0,124	não
VE-GMI1000 6h x VE-G7 6h	0,528	não	VE-GMI1000 6h x VE-G7 6h	0,115	não
VE-GMI1000 6h x PBS 6h	0,221	não	VE-GMI1000 6h x PBS 6h	0,752	não
G7 6h x VE-G7 6h	0,014	sim	G7 6h x VE-G7 6h	0,488	não
G7 6h x PBS 6h	0,013	sim	G7 6h x PBS 6h	0,139	não
VE-G7 6h x PBS 6hr	0,898	não	VE-G7 6h x PBS 6hr	0,146	não
GMI1000 48h x VE-GMI1000 48h	0,025	sim	GMI1000 48h x VE-GMI1000 48h	0,015	sim
GMI1000 48h x G7 48h	0,034	sim	GMI1000 48h x G7 48h	0,025	sim
GMI1000 48h x VE-G7 48h	0,026	sim	GMI1000 48h x VE-G7 48h	0,018	sim
GMI1000 48h x PBS 48h	0,025	sim	GMI1000 48h x PBS 48h	0,016	sim
VE-GMI1000 48h x G7 48h	0,027	sim	VE-GMI1000 48h x G7 48h	0,066	não
VE-GMI1000 48h x VE-G7 48h	0,046	sim	VE-GMI1000 48h x VE-G7 48h	0,032	sim
VE-GMI1000 48h x PBS 48h	0,014	sim	VE-GMI1000 48h x PBS 48h	0,255	não
G7 48h x VE-G7 48h	0,032	sim	G7 48h x VE-G7 48h	0,119	não
G7 48h x PBS 48h	0,03	sim	G7 48h x PBS 48h	0,079	não
VE-G7 48h x PBS 48h	0,322	não	VE-G7 48h x PBS 48h	0,122	não

Tabela 1: Análise de significância para análise de expressão gênica de todos os tratamentos e controle negativo, com os genes *pr1A* e *oIP* para os tempos de 6 horas e 48 horas por teste T com $P < 0,05$.