

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
IMUNOLOGIA E DIP/GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA

Mariana Rocha Maximiano

**UTILIZAÇÃO DO SILENCIAMENTO GÊNICO E NANOTECNOLOGIA
PARA O CONTROLE DO MOFO BRANCO E DA PODRIDÃO NEGRA**

Tese de Doutorado

Juiz de Fora, MG

2019

MARIANA ROCHA MAXIMIANO

**UTILIZAÇÃO DO SILENCIAMENTO GÊNICO E NANOTECNOLOGIA
PARA O CONTROLE DO MOFO BRANCO E DA PODRIDÃO NEGRA**

“Tese de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia, para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia”.

Orientador: Octávio Luiz Franco

Co-Orientador: Angela Mehta

Juiz de Fora, MG

2019

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Rocha Maximiano, Mariana.

Utilização do Silenciamento Gênico e Nanotecnologia para o controle do mofo branco e da podridão negra / Mariana Rocha Maximiano. – 2019.

149 f.

Orientador: Octávio Luiz Franco

Coorientadora: Angela Mehta

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2019.

1. Silenciamento gênico induzido pelo hospedeiro. 2. Expressão gênica. 3. *Sclerotinia sclerotiorum*. 4. *Xanthomonas campestris*. 5. *Arabidopsis thaliana*. I. Franco, Octávio Luiz, orient. II. Mehta, Angela, coorient. III. Título.

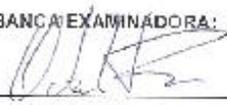
MARIANA ROCHA MAXIMIANO

UTILIZAÇÃO DO SILENCIAMENTO GÊNICO E NANOTECNOLOGIA PARA CONTROLE DO MOFO BRANCO E DA PODRIDÃO NEGRA

Tese de Doutorado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Ênfase em Genética e Biotecnologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Biológicas.

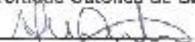
Aprovada em: 17 / 05 / 2019

BANCA EXAMINADORA:



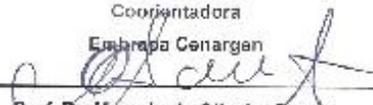
Prof. Dr. Octávio Luiz Franco
Orientador

Universidade Católica de Brasília



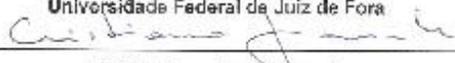
Dr.ª Angela Michta dos Reis
Coorientadora

Embrapa Cenargen



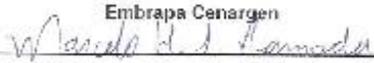
Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Santos

Universidade Federal de Juiz de Fora



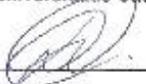
Dr. Cristiano Castro Lacorte

Embrapa Cenargen



Prof. Dr. Marcelo Henrique Soller Ramada

Universidade Católica de Brasília



Prof.ª Dr.ª Priscila Vanessa Zabala Capriles Goliatt

Universidade Federal de Juiz de Fora

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me conduziu e deu força nesta jornada.

Aos meus orientadores, professor Octávio Luiz Franco e Dr^a Angela Mehta, pela dedicação e pelos valiosos ensinamentos.

A toda a equipe do programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas da UFJF, que contribuíram para a minha formação.

A todas as colaborações que contribuíram para a realização do meu trabalho.

Aos meus pais, Francisco e Edinalva que me ensinaram a lutar pelos meus objetivos e me deram todo apoio ao longo desses anos.

Aos meus irmãos, Muriel, Michelle e Joamir que sempre foram meus companheiros, em especial minha irmã, que me animou e esteve comigo em muitas madrugadas em claro.

Ao meu marido, Laércio que desde o início dessa jornada esteve comigo de maneira incondicional.

Aos meus queridos companheiros do Laboratório de Genômica e Proteômica (LGP), que sempre me deram apoio profissional e pessoal, desde o início.

A Cristiane companheira de laboratório, de disciplinas, de congressos e claro de aventuras, e ao Lucas uma das pessoas mais brilhantes e divertidas que conheço que sempre partilhou conhecimento e opiniões, sem eles não teria conduzido este trabalho, juntos criamos um laço que rompeu as paredes do laboratório.

Aos meus queridos amigos, Dayse, Léo, Diego e Victor que sempre estiveram comigo, me animaram nas horas complicadas e acreditaram que é possível mudar o mundo, mesmo que só um pouquinho, através do conhecimento.

A todos os meus professores que passaram pela minha vida, pois todos eles contribuíram para a minha construção como pessoa.

Ao Dr. Francisco Aragão, coordenador do laboratório de Engenharia Genética Aplicada à Agricultura Tropical, Embrapa Cenargen, pela parceria no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Maxuel Andrade do Laboratório Nacional de Biociências-LNBio, pela parceria no desenvolvimento do trabalho.

Ao Dr. Luciano Paulino do Laboratório de nanotecnologia (LNANO), Embrapa Cenargen, pela parceria no desenvolvimento da parte de nanobiotecnologia deste trabalho.

Em especial a Maria Laine Tinoco (*in memoriam*), por toda ajuda e parceria, que foi essencial no desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores que aceitaram participar da banca de defesa, por todas as contribuições.

A Universidade Federal de Juiz de Fora, Embrapa, FAPDF, CNPq e CAPES pelo suporte financeiro.

RESUMO

Brassica oleracea consiste em uma cultura de grande importância econômica e alimentícia, sendo a brássica mais cultivada no Brasil. Dentre as doenças que afetam esta cultura destacam-se a podridão negra e o mofo branco. Neste trabalho foram desenvolvidas estratégias para o controle dessas doenças utilizando silenciamento gênico associado ou não a nanoestruturas. Para o controle da podridão negra foi realizada a avaliação da expressão de genes envolvidos na patogenicidade de Xcc em sistema *in vitro* e *in vivo*. Foi observado que a presença de extrato vegetal no sistema *in vitro* resultou em um perfil de expressão similar ao *in vivo*, sendo eficaz no estudo de mecanismos de patogenicidade em *Xanthomonas*. Cinco dos genes avaliados foram selecionados como alvos para o silenciamento gênico. Para avaliar a ocorrência do silenciamento de genes de *Xanthomonas* por HIGS, bactérias foram transformadas com o gene *uidA* e inoculadas em plantas transgênicas capazes de silenciar esse gene. Os resultados indicaram a ocorrência do silenciamento gênico nas bactérias. Visando obter um método para o carregamento de ácidos nucleicos para a célula bacteriana, foi desenvolvida uma nanoestrutura avaliada em *Escherichia coli*. O vetor pPM7g contendo o gene *gfp* foi complexado com lipossomos. Os ensaios mostraram que houve carregamento de ácidos nucleicos ao interior da célula bacteriana por meio das nanoestruturas desenvolvidas. A metodologia de HIGS também foi utilizada para o controle do mofo branco. Foram selecionados três genes efetores como alvos para o silenciamento gênico. Plantas de *Arabidopsis thaliana* foram transformadas e foram obtidas três linhagens transgênicas para cada gene. Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que as estratégias utilizadas tem grande potencial para o controle de fitopatógenos, podendo gerar produtos biotecnológicos eficientes no controle de doenças em plantas.

Palavras chave: Silenciamento gênico induzido pelo hospedeiro, Expressão gênica, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Xanthomonas campestris*, *Arabidopsis thaliana*.

ABSTRACT

Brassica oleracea consists in a culture of high economic and food importance, being the most cultivated brassica in Brazil. Among diseases that affect this culture, we can highlight black rot and the white mold. In this work, strategies for the control of these diseases were developed using gene silencing associated or not with nanostructures. In order to control black rot, the expression of genes involved in Xcc pathogenicity using *in vitro* and *in vivo* systems was evaluated. The presence of plant extract in the *in vitro* system resulted in an expression profile similar to that observed *in vivo*, being effective in the study of pathogenicity mechanisms in *Xanthomonas*. Five of these genes were selected as targets for gene silencing. To evaluate the occurrence of gene silencing by HIGS in *Xanthomonas*, bacteria were transformed with the *uidA* gene and inoculated into transgenic plants able to silence this gene. The results indicated the occurrence of gene silencing in bacteria. Furthermore, aiming to obtain a method for the nucleic acid delivery into the bacterial cell, we developed a nanostructure evaluated in *Escherichia coli*. The pPM7g vector containing the *gfp* gene was complexed with liposomes. The assays showed the occurrence of transport of nucleic acids into the bacterial cell through the nanostructures developed. In order to control white mold, three effector genes were selected as targets using HIGS. *Arabidopsis thaliana* plants were transformed by floral dip and 3 transgenic lines were obtained for each gene. The results obtained in this work showed that the strategies used have a high potential to control phytopathogens, and can generate biotechnological products efficient in the control of plant diseases.

Keywords: Host induced gene silencing, Gene expression, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Xanthomonas campestris*, *Arabidopsis thaliana*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da diversidade da família Brassicaceae, também conhecida como crucíferas.....	20
Figura 2. Variedades de Brassica oleracea cultivadas para produção de alimento e fins ornamentais.....	22
Figura 3. Ciclo da podridão negra em culturas de brássicas.....	26
Figura 4. Sintomas típicos da podridão negra..	27
Figura 5. Sintomas característicos do mofo branco.....	29
Figura 6. Ciclo de vida de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> . Formas de infecção e germinação micelogênica e carpogênica.....	30
Figura 7. Mecanismo de RNA interferente. Reconhecimento e processamento do dsRNA pela enzima Dicer, gerando siRNAs que associados ao complexo RISC promovem o silenciamento de mRNA específico.	34
Figura 8. Visão geral do vetor pPM7g.	53
Figura 9. Mapa do vetor pRNAi-psiUK.....	56
Figura 10. Dinâmica de populações.	62
Figura 11. Expressão relativa dos genes de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> envolvidos na patogenicidade, durante o crescimento <i>in vitro</i> e <i>in vitro</i>	64
Figura 12. Confirmação da transformação de <i>Xanthomonas</i>	70
Figura 13. Avaliação de sintomas em <i>Nicotiana tabacum</i> cv. <i>xanthi</i> transgênica durante interação com o <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> (Xcc) e <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>raphani</i> , expressando o gene <i>uidA</i> durante 96 h.....	71
Figura 14. Folhas destacadas de duas linhagens transgênicas de <i>Nicotiana tabacum</i> cv. <i>xanthi</i> (GUS-RNAi #12 e #70) e planta não transgênica (Controle), após 48 h de interação com <i>Xanthomonas campestris</i>	73
Figura 15. Avaliação da dinâmica de crescimento populacional das células bacterianas em plantas controle (não transgênica) e plantas transgênicas (GUS_RNAi #12 e #70).	74
Figura 16. Avaliação de coloração <i>in planta</i>	76

Figura 17. Avaliação das nanoestruturas geradas e aplicadas em gel de agarose 1%. M.M - Marcador molecular (1kb ladder – Invitrogen).....	80
Figura 18. Caracterização dos lipossomos sintetizados quanto ao tamanho hidrodinâmico.....	81
Figura 19. Avaliação da entrega do vetor pPM7g no interior de células bacterianas. ..	83
Figura 20. Avaliação da entrada do vetor pPM7g no interior de células bacterianas. ..	84
Figura 21. Confirmação da transformação com vetores específicos em <i>Escherichia coli</i> e <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	87
Figura 22. Análise da transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> por sequenciamento gênico.	88
Figura 23. Etapas da transformação de <i>Arabidopsis thaliana</i> via <i>Agrobacterium tumefaciens</i> por imersão dos botões florais, “floral dip”.	89
Figura 24. Seleção da primeira geração de plantas transgênicas (T1) utilizando herbicida glufosinato de amônio.....	90
Figura 25. Análise da progênie.....	91
Figura 26. Caracterização dos sintomas do mofo branco em <i>Arabidopsis thaliana</i> de acordo com a escala de notas estabelecida.....	94
Figura 27. Avaliação da severidade do mofo branco em linhagens de <i>Arabidopsis thaliana</i> transgênicas e não transgênicas (WT).	95
Figura 28. Severidade relativa da doença em comparação ao controle. As barras indicam o tempo após inoculação de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Informações gerais dos “ <i>primers</i> ” selecionados para avaliação da expressão gênica.....	46
Tabela 2. <i>Primers</i> específicos para genes efetores de <i>S. sclerotiorum</i> utilizados neste estudo.	59
Tabela 3. Caracterização das nanopartículas por espalhamento de luz dinâmico.....	81
Tabela 4. Escala de notas para os sintomas do mofo branco em <i>Arabidopsis thaliana</i> . 93	

LISTA DE ABREVIATURAS

Avr – Avirulência.

BDA – Batata dextrose ágar.

Blast – “*Basic local alignment search tool*”, ferramenta básica de busca de alinhamento local.

CaMV35S – “*Cauliflower mosaic virus promoter*”, promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor.

cDNA – DNA complementar.

CFU – “*Colony-forming unit*”, unidades formadoras de colônias.

CRISPR – “*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*”, repetições palindrômicas curtas clameadas regularmente interspostas.

DH – Diâmetro hidrodinâmico.

DLS – “*Dynamic light scattering*”, espalhamento de luz dinâmico.

DNA – “*Deoxyribonucleic acid*”, ácido desoxirribonucleico.

DNase – Desoxirribonuclease.

DSF – “*Diffusible Signal Factor*”, fator de difusão de sinal.

dsRBD – Domínio de ligação ao dsRNA.

dsRNA – RNA dupla fita.

EPS – “*Extracellular polymeric substances*”, substâncias poliméricas extracelulares.

ETI – “*Effector-triggered immune*”, imunidade desencadeada por efetores.

ETS – “*Effector-triggered response*”, susceptibilidade desencadeada por efetores.

GA - Glufosinato de amônia.

HAI – Horas após a inoculação.

HIGS – “*Host-induced gene silencing*”, silenciamento gênico induzido pelo hospedeiro.

HR – Resposta de hipersensibilidade.

hpRNA – “*Hairpin RNA*”, grampo de RNA.

mRNA – RNA mensageiro

NPs – Nanopartículas.

NYG – “*Nutrient Yeast Glycerol*”.

OD – “*Optical density*”, densidade óptica.

PAMPs – “*Pathogen-associated molecular pattern*”, padrões moleculares associados a patógenos.

PAT – “*Phosphinothricin acetyltransferase*”, fosfinotricina acetiltransferase.

Pdl – “*Polydispersity index*”, índice de polidispersão.

PEG – Polietilenoglicol.

PGs – Endopoligalacturanase.

PKSs – Policetídeos

PNRs – Peptídeos não ribossomais.

PPT – “*Phosphopantetheinyl transferase*”, fosfopantetínil transferase.

PTasRNA – RNA antisense com terminação pareada.

PTGS – “*Post-transcriptional gene silencing*”, silenciamento gênico pós transcricional.

PTI – “*Pattern-Triggered Immunity*”, imunidade desencadeada por padrões moleculares associados a patógenos.

REST – “*Relative Expression Software Tool*”, Ferramenta de Software para Expressão Relativa.

RISC – “*RNA-induced silencing complex*”, complexo de silenciamento induzido por RNA – “*Ribonucleic acid*”, ácido ribonucleico.

RNAi – RNA interferente.

RNAse – Ribonuclease.

siRNAs – pequenos RNAs interferentes.

T3SS – Sistema de secreção tipo III.

Xcc – *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

Xcr – *Xanthomonas campestris* pv. *raphani*.

X-Gluc – Ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-Beta-D-glucurônico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 Brássicas	20
2.2 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> e a podridão negra.....	24
2.3 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e o mofo branco.....	28
2.4 Silenciamento gênico.....	32
2.5 Nanobiotecnologia	38
3 OBJETIVOS.....	42
3.1 Objetivo geral	42
3.2 Objetivos específicos	42
4 MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 Avaliação da expressão de genes de Xcc envolvidos na interação com <i>B. oleracea</i> e validação de um método de cultivo <i>in vitro</i> , que mimetiza o ambiente celular da planta hospedeira.....	43
4.1.1 Sistema <i>in vivo</i> – Infiltração de Xcc em folhas de <i>B. oleracea</i>	43
4.1.2 Sistema <i>in vitro</i> – Xcc cultivada em diferentes meios de cultura.....	44
4.1.3 Purificação de RNA e síntese de cDNA	45
4.1.4 Desenho de “ <i>primers</i> ” para análise da expressão gênica	45
4.1.5 qRT-PCR e análises dos dados	48
4.2 Avaliação da eficiência da metodologia HIGS para o silenciamento de genes em <i>X. campestris</i>	50
4.2.1 Obtenção de plantas transgênicas.....	50
4.2.2 Transformação de <i>Xanthomonas</i>	50
4.2.3 Avaliação da ocorrência do silenciamento gênico em <i>Xanthomonas campestris</i>	51
4.3 Desenvolvimento de nanoestrutura para o carregamento de ácidos nucleicos para o interior de células bacterianas Gram negativas.	52
4.3.1 Síntese de nanopartículas e nanoencapsulamento.....	52
4.3.2 Caracterização da nanopartícula por espalhamento de luz dinâmico e potencial zeta.....	53
4.3.3 Avaliação do carregamento do vetor pPM7G ao interior da célula bacteriana	54

4.4 Utilização da metodologia HIGS para o controle do mofo branco através do silenciamento de genes efetores específicos de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	55
4.4.1 Seleção de genes alvo para o silenciamento em <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .	55
4.4.2 Construção de vetores	55
4.4.3 Multiplicação de vetores via <i>Escherichia coli</i>	57
4.4.4 Avaliação de transformantes por reação de PCR e sequenciamento.....	58
4.4.5 Transformação de planta modelo via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	58
4.4.6 Análise da progênie.....	59
4.4.7 Bioensaio.....	60
5 RESULTADOS	61
5.1 Avaliação da expressão de genes de Xcc envolvidos na interação com <i>B. oleracea</i> e validação de um método de cultivo <i>in vitro</i> , que mimetiza o ambiente celular da planta hospedeira.	61
5.1.1 Cultivo de Xcc em sistema <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	61
5.1.2 Avaliação da expressão gênica	62
5.2 Avaliação da eficiência da metodologia HIGS para o silenciamento de genes em <i>X. campestris</i>	69
5.2.1 Transformação de <i>Xanthomonas</i> e avaliação da ocorrência do silenciamento gênico em <i>Xanthomonas campestris</i>	70
5.3 Desenvolvimento de nanoestrutura para o carregamento de ácidos nucleicos para o interior de células bacterianas Gram negativas	79
5.3.1 Síntese e caracterização de nanopartículas.....	79
5.3.2 Avaliação do carregamento do vetor pPM7G ao interior da célula bacteriana	82
5.4 Utilização da metodologia HIGS para o controle do mofo branco através do silenciamento de genes efetores específicos de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	86
5.4.1 Seleção de genes alvo, multiplicação dos vetores e avaliação de transformantes	86
5.4.2 Transformação de planta modelo via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	89
5.4.3 Bioensaio.....	92
6 DISCUSSÃO GERAL	101
7 CONCLUSÕES GERAIS	105
REFERÊNCIAS.....	112
APÊNDICE A – “Validation of an <i>in vitro</i> system for studies of pathogenicity mechanisms in <i>Xanthomonas campestris</i> ”	134
APÊNDICE B – Análise da transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	142
APÊNDICE C – Caracterização dos lipossomos.....	144

ANEXO A – ARTIGOS PUBLICADOS	145
ANEXO B – TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS	146
ANEXO C – ARTIGOS PUBLICADOS RELACIONADOS A OUTROS PROJETOS.....	147
ANEXO D – TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS RELACIONADOS A OUTROS PROJETOS	148

1 INTRODUÇÃO

A família Brassicaceae possui mais de 3600 espécies e desempenha importante papel no âmbito científico e econômico. *Arabidopsis thaliana* representa essa família no meio científico e possui grande destaque como organismo modelo em diversos estudos e no desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas. Outras espécies como *Brassica nigra*, *B. rapa*, *B. juncea*, *B. napus* e *B. oleracea* possuem grande importância econômica, destacando-se como plantas ornamentais e alimentícias (WARWICK, 2011). No Brasil, a produção do repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*) destaca-se dentre as brássicas no âmbito econômico (CAMARGO FILHO e CAMARGO, 2017).

A podridão negra, causada pela bactéria Gram negativa *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) e o mofo branco, causado pelo fungo necrotrófico *Sclerotinia sclerotiorum*, são doenças que podem causar importantes perdas econômicas. Ambos os patógenos podem ser encontrados no solo, sendo que Xcc pode sobreviver por até 40 dias, enquanto que *S. sclerotiorum* produz escleródios, estruturas de resistência capazes de sobreviver por até 10 anos. Essa capacidade de sobrevivência no solo sem o hospedeiro dificulta o controle dessas doenças em campo (WHARTON e KIRK, 2007; FRENCH e SCHULTZ, 2009; VICENTE e HOLUB, 2013).

O controle de ambas as doenças ocorre principalmente por medidas preventivas, utilizando práticas de manejo integrado, como o uso de cultivares resistentes e sementes saudáveis, entretanto, após a infecção, os patógenos são controlados com a utilização de agentes químicos, que oferecem riscos de contaminação ao meio ambiente e elevam o custo da produção (WYENANDT, 2008; HARVESON *et al.*, 2010). Uma das estratégias utilizadas para o controle de patógenos consiste no silenciamento gênico induzido pelo hospedeiro, “*host-induced gene silencing*”- HIGS (HUANG *et al.*, 2006; YIN e HULBERT, 2015).

Esta metodologia é baseada na capacidade de eucariotos em suprimir os transcritos gênicos, processo conhecido como silenciamento gênico pós transcricional, “*post-transcriptional gene silencing*” – PTGS (KOCH e KOGEL, 2014; YIN e HULBERT,

2015). Vários estudos relatam a utilização da metodologia HIGS para o silenciamento gênico em insetos (IBRAHIM *et al.*, 2017), nematoides (HUANG *et al.*, 2006), fungos (ANDRADE *et al.*, 2016), vírus (ARAGAO e FARIA, 2009), e plantas parasitas (TOMILOV *et al.*, 2008), entretanto não foi relatada a utilização de HIGS para silenciar genes em bactérias. O silenciamento de genes em bactérias utilizando RNA foi demonstrado em alguns estudos, como para *E. coli* no estudo realizado por Nakashima e Tamura (2009), em *Agrobacterium tumefaciens*, em estudo realizado por Escobar *et al.*, 2001.

O silenciamento gênico em bactéria utilizando a metodologia HIGS consiste em um grande desafio, visto a ausência do sistema RISC nesses organismos. Uma alternativa consiste na associação de ácidos nucleicos, como os RNAs utilizados para o silenciamento de genes bacterianos *in vitro* (NAKASHIMA e TAMURA, 2009) com nanoestruturas, para que as mesmas promovam a entrega desses ácidos nucleicos no interior da célula bacteriana. Estratégias similares são utilizadas para a entrega de peptídeos, proteínas, fármacos e outras moléculas, no interior de células eucariotas (PATEL *et al.*, 2014; PATIL *et al.*, 2015; BIRHANU *et al.*, 2017; HUGHES, 2017; LIU *et al.*, 2019).

O silenciamento de genes constitutivos de *S. sclerotiorum* (ANDRADE *et al.*, 2016) apresentou a possibilidade de selecionar genes alvo, específicos envolvidos nos processos de interação *S. sclerotiorum*-hospedeiros, aumentando a especificidade e eficiência do controle deste fitopatógeno em diversas culturas, sem afetar outros organismos, que possuam genes similares ao da quitina sintase por exemplo. Existem diversos mecanismos moleculares envolvidos na interação planta-fungos necrotróficos que mostram alta complexidade no reconhecimento e na sinalização entre hospedeiro e patógeno (DODDS e RATHJEN, 2010). Os efetores de patógenos consistem em moléculas de virulência que atuam na modulação da célula hospedeira promovendo a suscetibilidade ao patógeno (JONES e DANGL, 2006; DODDS e RATHJEN, 2010; FRANCESCHETTI *et al.*, 2017).

Patógenos necrotróficos possuem efetores que podem abranger várias formas moleculares, como peptídeos não ribossomais (PNRs), policetídeos (PKSs), proteínas, alcaloides, terpenos, ou outros metabólitos (VLEESHOUWERS e OLIVER,

2014; WANG *et al.*, 2014). Devido à importância dos efetores na interação planta-fungo, os mesmos podem ser candidatos eficientes no controle do mofo branco.

Neste trabalho foi realizada inicialmente uma avaliação da expressão de genes envolvidos na patogenicidade de Xcc buscando alvos para o controle da doença e avaliada a eficiência da utilização da metodologia HIGS para o silenciamento de um gene repórter em *Xanthomonas campestris*, sendo considerada uma prova de conceito, para uma futura aplicação no controle da podridão negra. Foi proposto também o desenvolvimento e síntese de lipossomos específicos para o carregamento e entrega de ácidos nucleicos no interior de células bacterianas Gram negativas. Além disso, foi proposta também, o controle do mofo branco, a partir do silenciamento de genes que codificam efetores específicos de *S. sclerotiorum* promovido pelo hospedeiro (HIGS).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BRÁSSICAS

A família Brassicaceae pode ser em geral constituída por espécies herbáceas com flores, que possuem quatro pétalas cruciformes, motivo pelo qual a família também pode ser chamada de Cruciferae (ŠAMEC e SALOPEK-SONDI, 2019). Esta família possui mais de 3600 espécies organizadas em aproximadamente 321 gêneros (Figura 1).



Figura 1. Representação da diversidade da família Brassicaceae, também conhecida como crucíferas. **A.** *Arabidopsis thaliana*. **B.** *Alliaria petiolata*. **C.** *Alyssum serpyllifolium*. **D.** *Barbarea vulgaris*. **E.** *Biscutella auriculata*. **F.** *Cardaria draba* subesp. *draba*. **G.** *Matthiola parviflora*. **H.** *Cardamine heptaphylla*. **I.** *Erysimum lagascae*. **J.** *Teesdalia nudicaulis*. **K.** *Iberis pectinata*. **L.** *Sinapis arvensis*. **M.** *Isatis tinctoria*. **N.** *Lunaria annua* subesp. *annua*. **O.** *Lepidium didymum*. Imagens disponíveis em: < <https://jb.utad.pt/familia/Brassicaceae>>).

Dentre esses gêneros destaca-se a espécie *Arabidopsis thaliana* pela grande importância na área científica utilizada como “organismo modelo” (ARABIDOPSIS GENOME, 2000; KOENIG e WEIGEL, 2015). Além disso, as espécies *Brassica nigra* (mostarda preta), *B. rapa* (colza), *B. juncea* (mostarda marrom), *B. carinata* (mostarda amarela), *B. napus* (canola) e *B. oleracea* (couve selvagem) tem sido consideradas por sua importância econômica (WARWICK, 2011; CAMARGO FILHO e CAMARGO, 2017).

B. oleracea possui grande relevância econômica, devido seu importante papel na alimentação humana. Essa espécie possui grande diversidade de morfotipos ou variedades (Figura 2), incluindo *B. oleracea* var. *acephala* (couve), *B. oleracea* var. *capitata* (repolho), *B. oleracea* var. *botrytis* (couve-flor), *B. oleracea* var. *italica*, (brócolis), *B. oleracea* var. *gemmifera* (couve de Bruxelas), *B. oleracea* var. *gongylodes* (rabanete) e a *B. oleracea* var. *alboglabra* (couve chinesa kairan). Essas variedades podem ser cultivadas para a produção de alimento bem como para fins ornamentais (WARWICK, 2011; ŠAMEC e SALOPEK-SONDI, 2019).



Figura 2. Variedades de *Brassica oleracea* cultivadas para produção de alimento e fins ornamentais. **A.** *Brassica oleracea*. **B.** *Brassica oleracea* var. *capitata*. **C.** *Brassica oleracea* var. *italica*. **D.** *Brassica oleracea* var. *acephala*. **E.** *Brassica oleracea* var. *alboglabra*. **F.** *Brassica oleracea* var. *gemmifera*. **G.** *Brassica oleracea* var. *gongylodes*. **H.** *Brassica oleracea* var. *botrytis*. Adaptado de Cheng et al., 2014 .
 Imagens disponíveis em: < <https://pfaf.org/User/Plant.aspx?LatinName=Brassica+oleracea>>.

No Brasil, o repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*), tem sido apontado como a brássica mais cultivada, uma vez que há híbridos adaptados a climas diversos, sobretudo a temperaturas elevadas e também devido à sua importância nutricional na dieta humana (REDDY, 2016; CAMARGO FILHO e CAMARGO, 2017). A produção de

repolho no Brasil está concentrada próxima das capitais e em regiões serranas, sendo o cultivo realizado tanto no âmbito da agricultura familiar quanto por grandes produtores. O ciclo de produção desta espécie varia de 90 a 110 dias (SOUZA e RESENDE, 2006; REIS FILGUEIRA, 2008). O cultivo ocorre normalmente de forma contínua, ou seja, durante todo o ano, favorecendo assim o surgimento de doenças que acometem essa hortaliça (REIS FILGUEIRA, 2008). Dentre essas doenças destacam-se a podridão negra, que tem como agente causal a bactéria Gram negativa *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, e o mofo branco, também conhecido como podridão da cabeça do repolho ou podridão de esclerotinia, tendo como agente causal o fungo necrotrófico *Sclerotinia sclerotiorum* (HUDYNCIA *et al.*, 2000; REIS e LOPES, 2007; VICENTE e HOLUB, 2013).

2.2 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* E A PODRIDÃO NEGRA

A bactéria Gram-negativa *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc), pertence ao gênero *Xanthomonas*, sendo que a *Xanthomonas campestris* pode ser considerada uma espécie bastante complexa, formada por mais de 140 patovares, variantes patogênicas dentro de uma espécie, definidos por um grupo de plantas hospedeiras e/ou especificidade de tecido (SCHAAD *et al.*, 2005; VORHOLTER *et al.*, 2008; RYAN *et al.*, 2011). *X. campestris* pode ser considerada também patógeno oportunista humano, com um caso clínico relatado até o momento, onde essa bactéria foi isolada a partir do sangue de uma paciente imunocomprometida (LI *et al.*, 1990). Xcc possui especificidade para brássicas, colonizando o sistema vascular desses hospedeiros através de ferimentos na superfície da folha ou através dos estômatos. Essa bactéria apresenta como característica a produção de um pigmento amarelo, associado à produção de um polissacarídeo denominado goma xantana (VICENTE e HOLUB, 2013).

Nos últimos anos, três isolados de Xcc tiveram seu genoma sequenciado. Os dados obtidos revelaram a existência de quatro grupos gênicos de grande importância para a patogenicidade desse organismo (RYAN *et al.*, 2011). Esses grupos gênicos são o cluster gênico xps, responsável pela codificação do sistema de secreção tipo II (T2SS), o cluster gum responsável pela síntese de xantana, o cluster rpf responsável pela regulação de fatores de patogenicidade e o cluster hrp, responsável pela codificação do sistema de secreção tipo III (T3SS), envolvido na indução da resposta de sensibilidade pela planta (ARLAT *et al.*, 1991; ALFANO e COLLMER, 1997; DA SILVA *et al.*, 2002; VORHOLTER *et al.*, 2003; QIAN *et al.*, 2005; KAKKAR *et al.*, 2015).

Alguns estudos acerca da interação de Xcc com o hospedeiro revelaram que a patogenicidade (capacidade do patógeno em causar a doença) e a virulência (intensidade da infecção causada pelo patógeno) estão relacionadas aos sistemas de secreção (RYAN *et al.*, 2011). O envolvimento dos sistemas de secreção na patogenicidade e virulência de Xcc podem ser evidenciados pela capacidade de Xcc em burlar a resposta desencadeada por padrões moleculares associados a patógenos - PTI

e a imunidade desencadeada por efetores (ETI) da planta, secretando fatores capazes de suprimir tais respostas de defesa do hospedeiro, desencadeando assim, a susceptibilidade desencadeada por efector (ETS). Esses efetores são secretados por meio dos sistemas de secreção de Xcc, sobretudo o sistema de secreção tipo III (T3SS) e transportados para o citoplasma do hospedeiro (BÜTTNER e HE, 2009).

A podridão negra foi inicialmente relatada nos Estados Unidos no final do século XIX (PAMMEL, 1895), sendo reportada posteriormente em vários países. O ciclo de vida de Xcc (Figura 3) relaciona-se à transmissão da doença que pode ocorrer através de sementes infectadas por células bacterianas, dos resíduos de culturas infectadas no solo, as células bacterianas podem sobreviver por até 4 meses de maneira saprofítica no solo, pode ser transmitida também pelo vento, por insetos, ou mesmo pela água de irrigação ou da chuva, e por equipamentos contaminados (VICENTE e HOLUB, 2013).

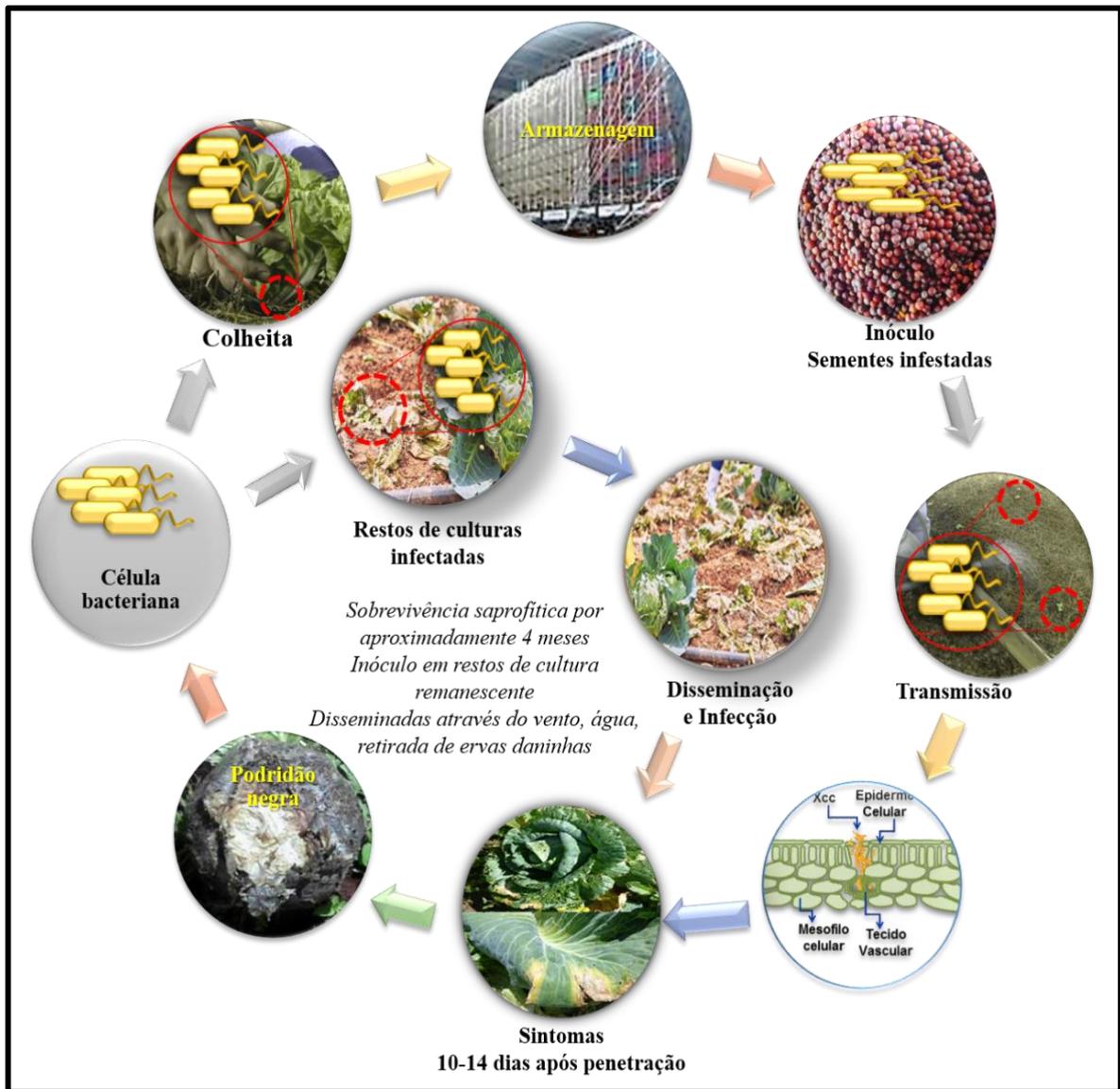


Figura 3. Ciclo da podridão negra em culturas de brássicas. Adaptado de Santos (2015).

Os sintomas típicos da doença (Figura 4) são a formação de lesões em forma de V nas folhas e clorose, formação de necrose em tecidos infectados, queda precoce das folhas e a infecção sistêmica causando a morte da planta. Após a morte do hospedeiro, *Xcc* pode sobreviver no solo por até 120 dias, podendo iniciar um novo ciclo da doença em novos hospedeiros quando houverem condições adequadas (ALVAREZ *et al.*, 1994; SO *et al.*, 2002; WILLIAMS, 2007; VICENTE e HOLUB, 2013).

Lesão em forma
de “V” e clorose



Necrose



Perda de folhas e
morte da planta



Figura 4. Sintomas típicos da podridão negra. 1. Formação de lesões em forma de V nas folhas e clorose. 2. Necrose em tecidos infectados. 3. Queda precoce das folhas e infecção sistêmica levando à morte da planta.

2.3 *Sclerotinia sclerotiorum* E O MOFO BRANCO

S. sclerotiorum consiste em um fungo filamentosso fitopatogênico necrotrófico que causa grandes prejuízos econômicos, devido sua vasta gama de hospedeiros (PURDY, 1979; FRENCH e SCHULTZ, 2009). Este fitopatógeno possui ampla distribuição geográfica, devido à sua capacidade em adaptar-se às condições ambientais ocorrendo assim, em todo o mundo. Este pode ser capaz de infectar várias espécies de hospedeiros, desde culturas agrícolas, plantas de interesse econômico, como as brássicas até plantas daninhas encontradas no campo (STEADMAN, 1983; REIS FILGUEIRA, 2008; ITO e PARISI, 2010).

Não há relatos de infecções de *S. sclerotiorum* em humanos, entretanto, o processo de interação com os hospedeiros, pode desencadear a produção de micotoxinas por parte do patógeno, bem como a produção de fitoalexinas por parte do hospedeiro, esses compostos podem afetar a saúde humana. Por exemplo, reportada a produção de compostos fototóxicos 5-metoxipsoraleno, 8-metoxipsoraleno e 4,5,8-trimetilpsoralen, em vegetais acometidos pela podridão do aipo (*S.sclerotiorum* - *Apium graveolens*, aipo), esses compostos podem causar formação de bolhas e doença cutânea em pessoas que manipularam vegetais, especificamente o aipo contaminado com *S. sclerotiorum* (BIRMINGHAM *et al.*, 1961; SCHEEL *et al.*, 1963; TOURNAS, 2005).

S. sclerotiorum tem como características marcantes, a produção de micélio claro e cotonoso, e a produção de escleródios. Os escleródios são estruturas de resistência que conferem uma vantagem relativa à sobrevivência, pois são resistentes à degradação e atuam também no processo de propagação do fitopatógeno. Essas estruturas podem ser formadas em grandes quantidades nos tecidos vegetais infectados a partir do micélio produzido na fase inicial da infecção, podendo permanecer viáveis no solo por até 10 anos, sendo possível iniciar um novo ciclo de infecção em novos hospedeiros quando as condições adequadas ocorrerem (BOLTON *et al.*, 2006).

Os sintomas característicos do mofo branco (Figura 5) incluem a formação de micélio branco e cotonoso no tecido vegetal afetado, a presença de escleródios na superfície ou no interior do hospedeiro, presença de manchas foliares encharcadas e necrose, murcha e tombamento. A partir destes sintomas, pode ocorrer o espalhamento das lesões pela planta de forma sistêmica, podendo ocasionar a sua morte (ITO e PARISI, 2010).

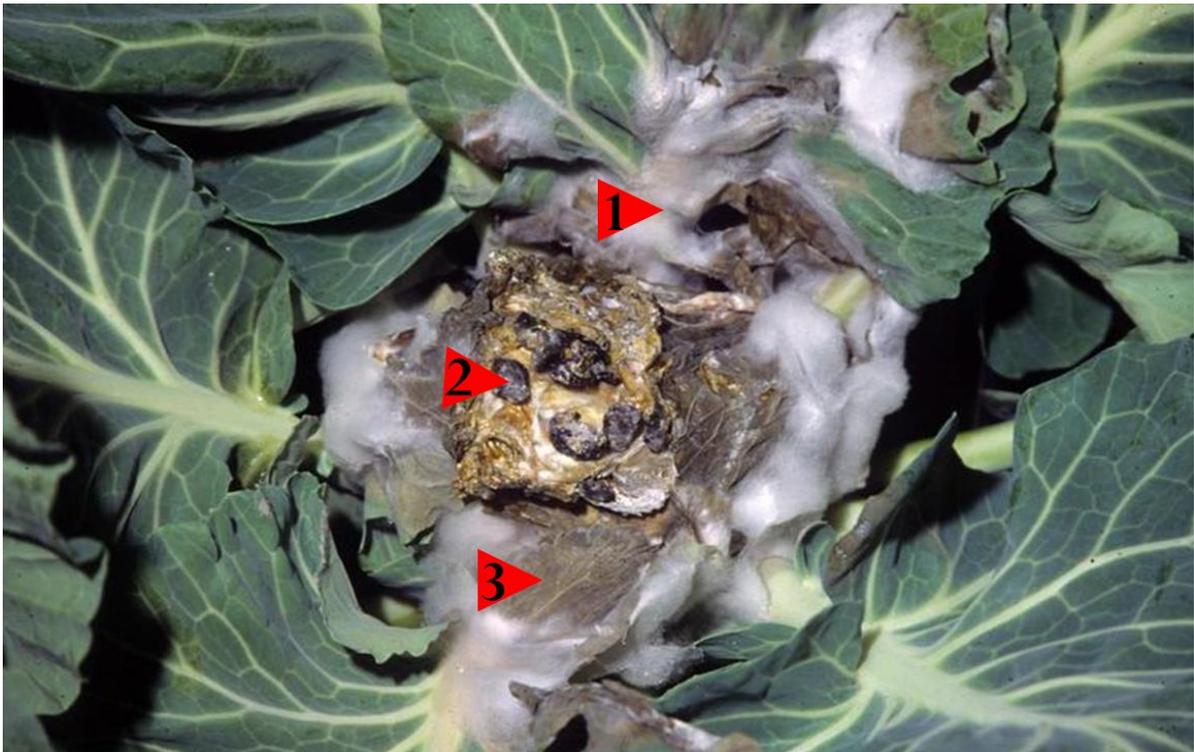


Figura 5. Sintomas característicos do mofo branco. Setas vermelhas enumeradas indicam sintomas que incluem. **1.** micélio branco e cotonoso no tecido vegetal afetado; **2.** formação de escleródios; **3.** mancha foliar encharcada e necrose nos tecidos acometidos pela doença.

Os sintomas dessa doença podem ser relacionados com a forma da infecção. Por exemplo, a murcha e o tombamento da planta podem comumente estar associados à germinação micelogênica do escleródio (presente no solo ou em restos de culturas já afetadas pelo fitopatógeno), pois afetam as raízes e as partes inferiores da haste, enquanto que, as manchas foliares e necrose de tecidos (folhas e haste), podem ser associadas à germinação carpogênica (Figura 6). Os ascos disseminados pelo vento ou pela água proveniente da chuva ou irrigação iniciam o processo de infecção

geralmente por flores ou tecidos senescentes, infectando assim partes aéreas da planta (ADAMS e TATE, 1976; STEADMAN, 1983; BOLAND e HALL, 1987; WHARTON e KIRK, 2007).

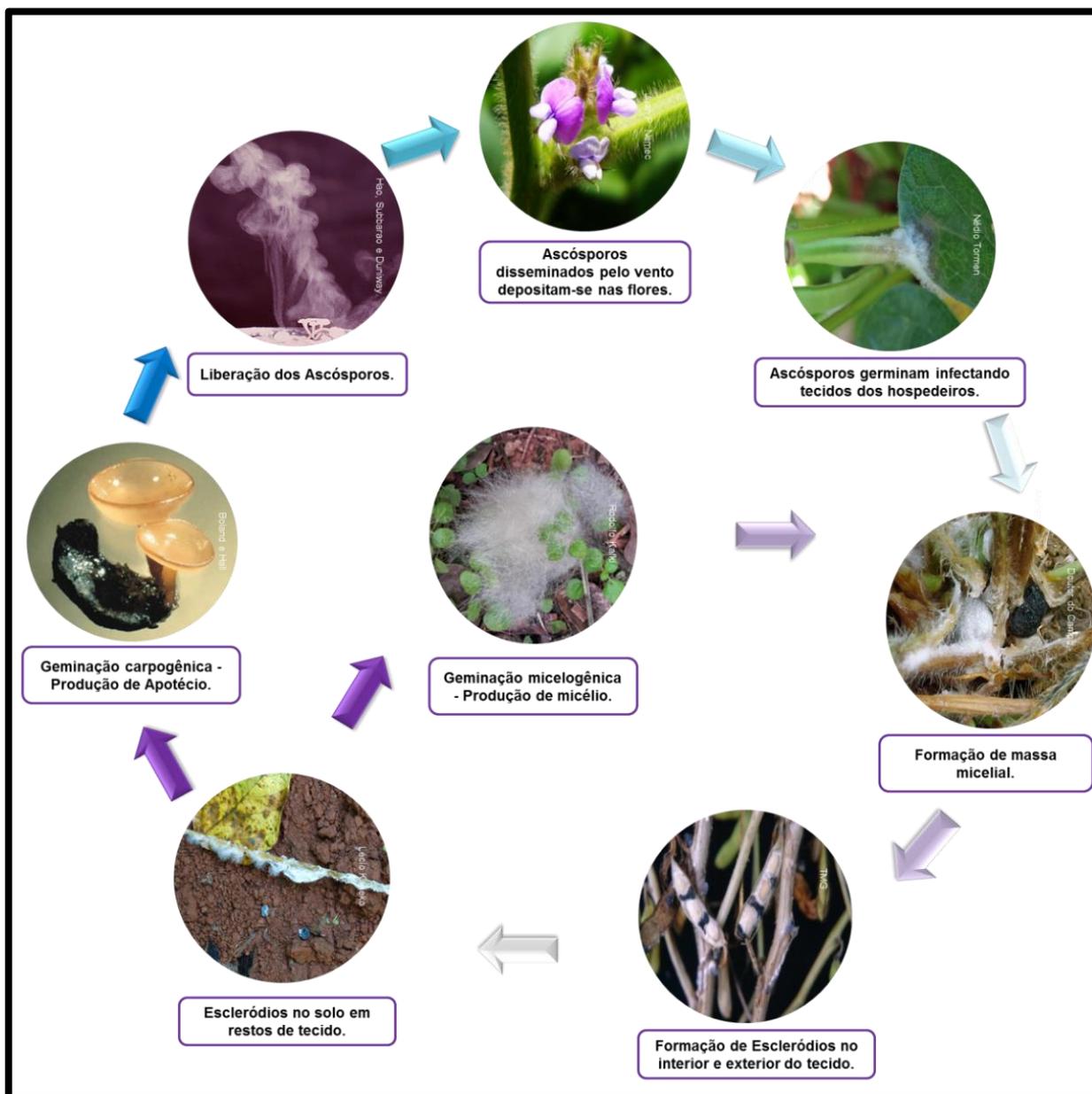


Figura 6. Ciclo de vida de *Sclerotinia sclerotiorum*. Formas de infecção e germinação micelogênica e carpogênica. Adaptado de Wharton e Kirk (2007).

Os mecanismos moleculares envolvidos no processo de infecção de plantas por fungos, especificamente fungos necrotróficos, mostram bastante complexidade no que diz respeito ao reconhecimento e à sinalização (JONES e DANGL, 2006). Os efetores de patógenos consistem em moléculas de virulência que atuam na modulação da célula hospedeira promovendo a suscetibilidade ao patógeno (FRANCESCHETTI *et al.*, 2017). O hospedeiro reconhece o patógeno desencadeando uma resposta PTI – Imunidade desencadeada por padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Para suprimir essa resposta, o patógeno libera efetores que podem ser reconhecidos pelo produto de genes R presentes na planta, promovendo a resposta conhecida como ETI - Imunidade desencadeada por efetores (JONES e DANGL, 2006; DODDS e RATHJEN, 2010).

Os efetores de patógenos necrotróficos incluem moléculas específicas para determinados hospedeiros, que podem abranger várias formas moleculares, como peptídeos não ribossomais (PNRs), policetídeos (PKSs), proteínas, alcaloides, terpenos, ou outros metabólitos. Os detalhes da interação molecular entre fungos necrotróficos e plantas ainda não estão bem elucidados, mas o resultado final da interação causa a morte da célula hospedeira (VLEESHOUWERS e OLIVER, 2014; WANG *et al.*, 2014).

S. sclerotiorum possui alguns efetores conhecidos, como SsiTL, uma integrina (ZHU *et al.*, 2013), Ss-caf1, uma proteína putativa de ligação Ca⁺ (WANG *et al.*, 2009; XIAO *et al.*, 2014), SSV263, uma proteína hipotética (LIANG *et al.*, 2013), SsPG1, uma endopoligalacturonase (ZUPPINI *et al.*, 2005) e SsSSVP1, uma proteína ainda não caracterizada (LYU *et al.*, 2016). Os alvos desses efetores na planta não estão claros, exceto para o efector SsPG,1 que tem como alvo o iPG-1, que atua no processo de sinalização envolvendo o ionóforo de Ca²⁺ na célula vegetal (WANG *et al.*, 2009) e para o efector SsSSVP1, que tem como alvo QCR8, uma subunidade do complexo citocromo b-c1, localizado nas mitocôndrias, capaz de desativar sua função biológica e causar a morte das células vegetais (LYU *et al.*, 2016).

2.4 SILENCIAMENTO GÊNICO

A podridão negra e o mofo branco possuem um relevante e negativo impacto econômico na produção das brássicas, podendo ocasionar a perda de até 100% da produção (PURDY, 1979; WILLIAMS, 2007). O controle da podridão negra e do mofo branco é realizado de formas similares, utilizando inicialmente práticas de manejo integrado, como a utilização de sementes saudáveis, a eliminação dos restos de culturas e plantas daninhas do campo, rotação de culturas e híbridos mais tolerantes. Embora não haja nenhum relato de híbridos de *B. oleracea var. capitata* resistentes ou tolerantes ao mofo branco, existem híbridos tolerantes a podridão negra, o controle biológico também pode ser utilizado (REIS e LOPES, 2007; WILLIAMS, 2007; WYENANDT, 2008).

O controle biológico pode ser realizado contra fitopatógenos, utilizando microrganismo antagonista que limite o crescimento do fitopatógeno, atue como predador ou competidor por recursos, ou ainda bioprodutos (PAL e GARDENER, 2006; TJAMOS *et al.*, 2010). A utilização de *Trichoderma spp.* como um antagonista de *Sclerotinia sclerotiorum* (BOAT *et al.*, 2018; SUMIDA *et al.*, 2018), assim como a utilização de *Bacillus spp.* e *Pseudomonas spp.* (DA SILVA *et al.*, 2018; NUÑEZ *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2018) vem sendo avaliados e utilizados como alternativa para o controle do mofo branco e da podridão negra respectivamente.

Entretanto, após o estabelecimento de ambas as doenças, compostos químicos são utilizados, aumentando o custo da produção, além de oferecer o risco de contaminação ao meio ambiente (GORGEN, 2009; HARVESON *et al.*, 2010; GILL e GARG, 2014; ÖZKARA *et al.*, 2016). Nos últimos anos vem surgindo uma grande demanda por um controle eficiente, livre de efeitos negativos, como a contaminação ambiental, danos a espécies não alvos, assim como, o aumento do custo na produção.

Na era pós genômica, as interações planta patógeno tem sido amplamente estudadas, buscando uma maior compreensão dos processos atuantes durante essa interação. Neste contexto há, sobretudo, um grande interesse nos genes envolvidos nos processos de defesa das plantas frente ao patógeno, assim como nas estratégias

de patogenicidade utilizadas pelos organismos patogênicos, pois esses genes podem ser utilizados como alvos para um controle molecular (IMAM *et al.*, 2016).

O controle de patógenos utilizando alvos moleculares pode ser obtido de forma eficaz por meio de métodos como a superexpressão ou o silenciamento de genes do hospedeiro ou do fitopatógeno (LI *et al.*, 2018; NIEHL *et al.*, 2018; ROBERTSON *et al.*, 2018; ROSA *et al.*, 2018; WEI *et al.*, 2018). A superexpressão gênica é usualmente utilizada na investigação funcional dos genes, mas nos últimos anos essa técnica vem se mostrando uma alternativa para o controle de patógenos (PRELICH, 2012; MARCO *et al.*, 2014; ALAM *et al.*, 2015).

O silenciamento gênico pode ser explicado como uma modificação epigenética na expressão de genes podendo causar sua inativação. Esse mecanismo pode ocorrer naturalmente durante a regulação gênica, atuando para inativar produtos gênicos em diversos tipos celulares e/ou em tecidos. O silenciamento gênico pode ocorrer no nível transcricional, “*transcriptional gene silencing*” (TGS) ou no nível pós transcricional, “*post-transcriptional gene silencing*” (PTGS), este último também conhecido como RNA interferente (RNAi). Em PTGS ou RNAi, o transcrito é produzido, mas rapidamente degradado, sendo que a ligação do RNAi com o mRNA alvo resulta em um RNA dupla fita (dsRNAs) que é degradado. Os dsRNAs são processados e originam RNAs interferentes curtos (siRNAs), que podem induzir a degradação do RNA mensageiro a ser silenciado. O silenciamento gênico pode ser utilizado como uma técnica que explora a interação entre sequências homólogas de DNA ou RNA (FIRE *et al.*, 1998; FILIPOWICZ e PASZKOWSKI, 2001; MEISTER e TUSCHL, 2004).

O processamento das moléculas de dsRNA (Figura 7) no citoplasma ocorre de maneira gradual e é catalisado por uma enzima denominada Dicer, uma endonuclease do tipo RNase III específica para dsRNA. Essa enzima apresenta como principal característica a presença de dois domínios, o dsRBD domínio de ligação ao dsRNA, e RNase III com atividade catalítica. A enzima Dicer associa-se ao dsRNA no citoplasma e o processa em fragmentos de 19-24 pares de base (siRNAs). Esses fragmentos podem associar-se a um complexo ribonucleoproteico denominado Complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC). O complexo RISC conta com uma proteína da família Argonauta. Proteínas da família Argonauta possuem um

domínio de ligação ao RNA e um domínio com atividade nuclease. Neste complexo, uma das fitas do dsRNA é eliminada e a fita remanescente promove o reconhecimento para degradação ou inibição da sequência específica do mRNA (FILIPOWICZ e PASZKOWSKI, 2001; KETTING *et al.*, 2001; MEISTER e TUSCHL, 2004).

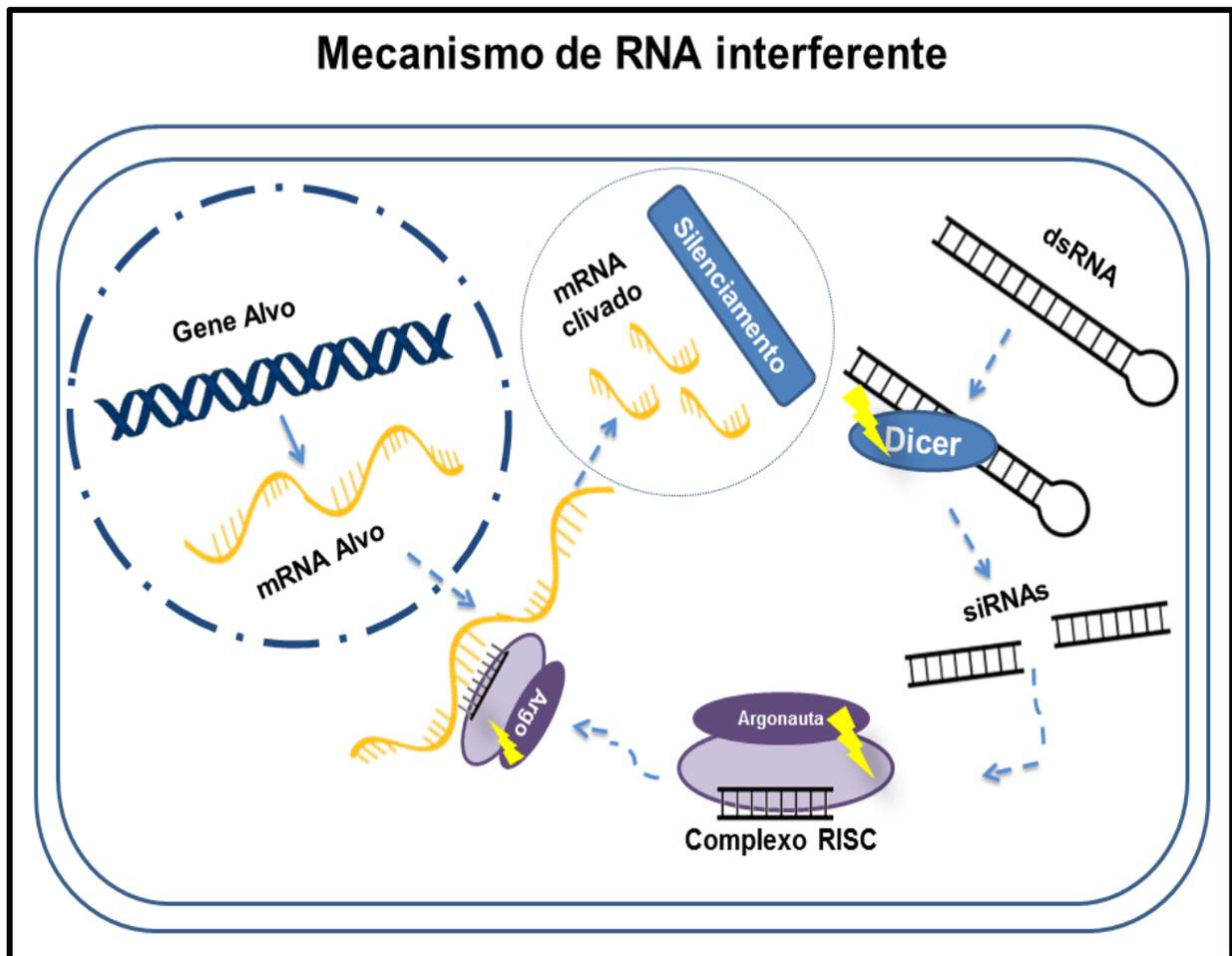


Figura 7. Mecanismo de RNA interferente. Reconhecimento e processamento do dsRNA pela enzima Dicer, gerando siRNAs que associados ao complexo RISC promovem o silenciamento de mRNA específico. Adaptado de Majumdar *et al.*(2017).

Em plantas vascularizadas, os siRNAs gerados após o processamento pela enzima Dicer podem não ser restritos ao seu local de origem, podendo se deslocar para outras células e de forma sistêmica, alcançando todos os tecidos da planta (YOO *et al.*, 2004; DING e WANG, 2009; PEÑA *et al.*, 2015). Essa característica pode acarretar o silenciamento *in trans*, ou seja, siRNAs de um organismo podem ser transportados para

outro organismo, podendo silenciar genes específicos em parasitas e/ou patógenos (WATERHOUSE *et al.*, 1998; FAGARD e VAUCHERET, 2000).

Esse mecanismo foi elucidado por Cai *et al.* (2018), onde avaliaram plantas de *A. thaliana* durante interação com o fungo *Botrytis cinera*. Foi observado que as plantas transportam pequenos RNAs (sRNAs) utilizando vesículas extracelulares similares a exossomos. Essas estruturas contendo sRNA se acumulam nos locais de infecção e são absorvidas pelas células do patógeno. Esses RNAs transportados pelo hospedeiro induzem o silenciamento de genes do patógeno envolvidos na patogenicidade.

O silenciamento gênico induzido pelo hospedeiro (HIGS) surge a partir do fenômeno de silenciamento pós transcricional e de sua ocorrência *in trans* associado a ferramentas biotecnológicas, como a transformação de plantas, utilizando vetores específicos como a construção de vetores capazes de expressarem dsRNAs específicos na planta (hospedeiro).

Os vetores são produzidos com uma estrutura “*intron hairpin*”, essas estruturas são obtidas a partir da sequência intrônica flanqueada pela sequência de DNA específica (mRNA alvo) no sentido senso e antisenso. A partir da transcrição dessas sequências é formado o RNA de dupla fita, grampo de RNA (hpRNA). O grampo de RNA produzido pelo hospedeiro é capaz de promover o silenciamento de genes do parasita/patógeno. Nesse cenário, HIGS torna-se uma poderosa ferramenta no controle de doenças (WESLEY *et al.*, 2001; EAMENS *et al.*, 2008; NOWARA *et al.*, 2010; TINOCO *et al.*, 2010; ANDRADE *et al.*, 2016; PANWAR *et al.*, 2018; QI *et al.*, 2018; SONG e THOMMA, 2018).

Atualmente há vários estudos relatando o silenciamento gênico por meio de HIGS e a obtenção de plantas transgênicas resistentes a plantas daninhas (TOMILOV *et al.*, 2008; ALY *et al.*, 2009; ALAKONYA *et al.*, 2012), insetos (BAUM *et al.*, 2007; IBRAHIM *et al.*, 2017), vírus (ARAGAO e FARIA, 2009), nematoides (FIRE *et al.*, 1998; HUANG *et al.*, 2006), fungos (TINOCO *et al.*, 2010; GOVINDARAJULU *et al.*, 2015; ANDRADE *et al.*, 2016; QI *et al.*, 2018; SONG e THOMMA, 2018), entretanto, não foi reportado o silenciamento de genes em bactérias utilizando HIGS.

HIGS surge como uma alternativa promissora para o controle de doenças que acometem as plantas, uma vez que combina alta seletividade para o organismo alvo, com efeitos colaterais mínimos ou até nulos, como a contaminação ao meio ambiente, quando comparado a abordagens como a utilização de produtos químicos, (KOCH e KOGEL, 2014; ÖZKARA *et al.*, 2016). Para a utilização desta técnica é importante a observação de alguns critérios, sobretudo na escolha do gene alvo, pois não é desejada a ocorrência de “*off target*”, ou seja, o silenciamento em genes não alvos, no hospedeiro ou em outros organismos que tenham alguma interação com o hospedeiro. Além disso, o fenótipo a ser suprimido deve ser importante para a infecção/interação do patógeno com o hospedeiro e o silenciamento esperado deve impedir o sucesso da infecção/interação (JACKSON *et al.*, 2006; RUAL *et al.*, 2007).

O controle de bactérias utilizando técnicas de silenciamento gênico como HIGS consiste em um grande desafio, uma vez que bactérias não possuem o complexo RISC, logo não possuem o mecanismo de RNAi. Apesar disso, é possível induzir o silenciamento gênico em bactérias, utilizando métodos como o “*knock out*” para deleção ou inativação de genes, comumente usados para o estudo da função gênica, o método “*knock down*” que promove o silenciamento ou repressão da expressão de um gene ou ainda utilizando o sistema CRISPR (JASIN e SCHIMMEL, 1984; STACH e GOOD, 2011; DOUDNA e CHARPENTIER, 2014; NAKASHIMA e MIYAZAKI, 2014). A utilização do sistema CRISPR/Cas para o desenvolvimento de resistência em hospedeiros frente à fitopatógenos tem demonstrado sucesso (ARORA e NARULA, 2017), inclusive na resistência de hospedeiros de *Xanthomonas* (WANG *et al.*, 2014; PENG *et al.*, 2017), além disso, alguns estudos identificaram sistemas CRISPR em *Xanthomonas oryzae* e *Xanthomonas albilineans* (SEMENOVA *et al.*, 2009; HONG *et al.*, 2018), entretanto até o momento não há trabalhos utilizando o sistema CRISPR relacionados à *Xanthomonas campestris*.

O método “*knock down*” pode ser promissor para o controle de bactérias, atualmente existem algumas abordagens comumente utilizadas neste método, a primeira abordagem é a expressão de RNA antisense por meio de vetores, enquanto que a segunda é baseada na produção e adição de RNAs antisense sintéticos adicionados em meio de cultura. Ambas as abordagens inibem o mRNA por

hibridização dos antisense, impedindo a ação do ribossomo e conseqüentemente facilitando a degradação de mRNA (NAKASHIMA *et al.*, 2012). Foi demonstrado em *Escherichia coli* o silenciamento gênico, sem transformação com vetores (GRUEGELSIEPE *et al.*, 2006; BISTUÉ *et al.*, 2009) utilizando oligonucleotídeos antisense sintéticos e utilizando um vetor capaz de expressar o RNA antisense com terminação pareada (PTasRNA) (NAKASHIMA e TAMURA, 2009). O PTasRNA aumenta a eficiência de silenciamento, uma vez que aumenta a estabilidade do RNA antisense aumentando a quantidade do mesmo nas células (NAKASHIMA e TAMURA, 2009; NAKASHIMA *et al.*, 2012; NAKASHIMA e TAMURA, 2013; NAKASHIMA e MIYAZAKI, 2014).

O silenciamento utilizando antisense sintéticos possui duas grandes vantagens, a primeira é a não utilização de transformação bacteriana por meio de vetores, a segunda é a facilidade de aplicação, bastando a inserção direta dos RNAs antisense em meio de cultura (GRUEGELSIEPE *et al.*, 2006), por outro lado, esse método se limita a aplicações *in vitro*, devido à baixa eficiência da aquisição dos RNAs antisense pela bactéria, dessa forma, atualmente essa metodologia é utilizada principalmente em avaliações de bactérias clinicamente relevantes (WANG *et al.*, 2010; MCLEOD e SIMMONDS, 2013).

2.5 NANOBIOTECNOLOGIA

Nos últimos anos, o termo agro nanotecnologia tem sido utilizado para referir-se a utilização de nanomateriais na agricultura e produção de alimentos. A agro nanotecnologia é frequentemente descrita por alguns autores como “tecnologia verde ecologicamente correta para a agricultura sustentável” (AHMED *et al.*, 2013; WANI e KOTHARI, 2018). A utilização de nanopartículas (NPs) na agricultura tem aumentado, NPs podem ser utilizadas na composição de produtos como nanofertilizantes, nanoherbicidas e nanopesticidas (KAUR *et al.*, 2012; AGRAWAL e RATHORE, 2014; FRACETO *et al.*, 2016; AMBIKA, 2018; TRIPATHI *et al.*, 2018). Nanopartículas de prata, por exemplo, estão sendo amplamente estudadas e podem atuar no controle de fungos *in vitro* e *in vivo*, como *Colletotrichum* sp., *Sphaerotheca pannosa*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sarracenia minor*, *Rhizoctonia solani*, dentre outros (LAMSAL *et al.*, 2011; PATEL *et al.*, 2014; WANI e KOTHARI, 2018).

O controle de bactérias, como Xcc pode ser realizado por meio de práticas de manejo integrado para a prevenção da doença associado à utilização de insumos químicos, para o combate do agente patogênico quando o mesmo infesta a lavoura, porém, essas medidas nem sempre mostram-se eficientes, exigindo assim um controle alternativo (STEADMAN, 1983; ITO e PARISI, 2010; VICENTE e HOLUB, 2013; IMAM *et al.*, 2016). Metodologias de silenciamento gênico tem se mostrado uma alternativa promissora para o controle de fitopatógenos (RUAL *et al.*, 2007; TOMILOV *et al.*, 2008; ARAGAO e FARIA, 2009; NOWARA *et al.*, 2010; YIN e HULBERT, 2015; ANDRADE *et al.*, 2016), entretanto, a utilização desta metodologia para o controle específico de bactérias ainda encontra grandes desafios, como a ausência do sistema RISC em bactérias, baixa eficiência do silenciamento gênico utilizando RNAs sintéticos (GRUEGELSIEPE *et al.*, 2006; BISTUÉ *et al.*, 2009) e a limitação de seu uso *in vitro* utilizando vetores de expressão (NAKASHIMA e TAMURA, 2009).

A entrega bem sucedida de ácidos nucleicos em células bacterianas pode ser bastante complexa e mais difícil que a entrada em células eucariontes. Células bacterianas podem ser estruturalmente complexas podendo ser necessário a quebra de

diversas barreiras, como as camadas de peptidoglicanos e membrana externa contendo lipopolissacarídeos e fosfolípidios. Existem alguns métodos para promover a entrega de ácidos nucleicos no interior de células bacterianas, que podem ser eficientes, como por exemplo, a utilização de fagos (DURYMANOV e REINEKE, 2018; LAM e STEINMETZ, 2018; NAMDEE *et al.*, 2018), ou a associação de ácidos nucleicos com a nanobiotecnologia (XUE *et al.*, 2018).

A nanobiotecnologia, neste cenário, pode oferecer alternativas para a solução desses desafios, com a associação de oligonucleotídeos antisense sintéticos ou mesmo vetores de expressão à nanopartículas. As nanopartículas podem ser definidas como materiais de até 100 nm, capazes de transportar e entregar produtos. É possível associar essas estruturas com macromoléculas solúveis, como anticorpos, polímeros, polissacarídeos, ácidos nucleicos dentre outros. Entre essas nanoestruturas estão, as micelas, dendrímeros, nanopartículas poliméricas, metálicas e magnéticas e os lipossomos (CHRISTIAN *et al.*, 2008; RAI e INGLE, 2012; CHENG *et al.*, 2016).

Os lipossomos são vesículas esféricas, constituídos por uma ou mais bicamadas lipídicas que separam um ou vários compartimentos aquosos internos, do meio exterior. Essas nanopartículas podem armazenar bioativos e transportar compostos hidrofóbicos ou hidrofílicos. Essas nanoestruturas são dotadas de carga de superfície, permeabilidade e hidrofobicidade, além disso, podem ser naturais ou sintéticas, dependendo da origem dos fosfolípidios que a constitui, sendo geralmente biocompatíveis (TORCHILIN, 2005; BOZZUTO e MOLINARI, 2015). A utilização de lipossomos como carreadores tem sido amplamente estudada e avaliada, sobretudo na área clínica tendo como alvo células eucariontes (MACLACHLAN, 2007; SUN *et al.*, 2014; TAN *et al.*, 2016; ABU LILA e ISHIDA, 2017).

A utilização de ácidos nucleicos na área clínica, para o tratamento de doenças como o câncer, infecções virais e doenças genéticas hereditárias, pode ser uma abordagem médica promissora, mas os ácidos nucleicos são instáveis em ambientes como o soro e mesmo no interior celular, sendo facilmente degradados por endonucleases (EWERT *et al.*, 2010; XUE *et al.*, 2018). Neste contexto, existem esforços para desenvolver carreadores de ácidos nucleicos, que incluem o

desenvolvimento e a busca pelo entendimento dos mecanismos envolvidos no carregamento e entrega desses polímeros (EWERT *et al.*, 2010; SAFFARI *et al.*, 2016).

Lipossomos têm sido desenvolvidos e avaliados para carrear ácidos nucleicos. Esses polímeros geralmente são aniônicos, e esta característica pode desfavorecer a sua entrada na célula, pois a superfície celular também é aniônica, dificultando tal interação. Assim, gerar lipossomos catiônicos pode oferecer vantagens, pois essas estruturas aderem à célula através de interações eletrostáticas não específicas com a superfície celular. A endocitose e/ou fusões diretas com a célula são os principais mecanismos apontados para a entrada de lipossomos catiônicos no interior das células (ZHAO e HUANG, 2014; RUKAVINA e VANIC, 2016; SAFFARI *et al.*, 2016; DURYMANOV e REINEKE, 2018).

As estratégias utilizadas na associação de ácidos nucleicos com lipossomos envolvem a síntese dessas nanopartículas utilizando fosfolipídios, ou lipídios catiônicos sintéticos, análogos aos naturais, tendo como objetivo o controle de doenças (MACLACHLAN, 2007; LONEZ *et al.*, 2008; RAO, 2010; YANG *et al.*, 2014). Diversos estudos mostram que existem diversas barreiras para a entrega de ácidos nucleicos a seu destino no interior das células alvo, como por exemplo, o escape endossomal e a liberação dessas moléculas no núcleo celular (TORCHILIN, 2005; MACLACHLAN, 2007; CHRISTIAN *et al.*, 2008; SUN *et al.*, 2014; ZHAO e HUANG, 2014; BOZZUTO e MOLINARI, 2015; SANTOS *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2019). Para vencer tais barreiras foram elencados alguns parâmetros que podem ser observados, como a densidade de carga da membrana dos lipossomos, a razão entre a carga dos lipídios catiônicos e o ácido nucleico, além da estrutura interna dos complexos, que é afetada pela escolha dos lipídios que irão compor a estrutura (EWERT *et al.*, 2010).

Existe, por exemplo, a necessidade da presença do colesterol na síntese de lipossomos a serem avaliados em células animais, *in vivo*, a eficiência da transfecção de lipossomos catiônicos aumenta exponencialmente com a adição do colesterol. Assim, para a síntese de complexos lipídicos associados a ácidos nucleicos para a transfecção *in vivo*, e/ou ensaios clínicos, o colesterol é comumente adicionado no momento da síntese dessas nanopartículas (ILIES *et al.*, 2005; EWERT *et al.*, 2010). Além disso, modificações como a utilização de polietilenoglicol (PEG), podem conferir

maior estabilidade e alta solubilidade à nanopartícula e dificultar a ligação do complexo com o endossomo, podendo facilitar o escape endossomal e conseqüentemente a entrega do ácido nucleico ao núcleo celular (EWERT *et al.*, 2010; SAFFARI *et al.*, 2016).

A utilização de ácidos nucleicos, como oligonucleotídeos antisense para o controle ou combate de infecções causadas por bactérias, resistentes ou não, apresenta grande potencial, devido alta especificidade dos oligonucleotídeos e baixo risco à saúde humana. Entretanto, a entrega eficiente dessas moléculas à bactérias, continua a ser um grande obstáculo, o que dificulta sua aplicação clínica. Os nanomateriais surgem novamente como alternativa para o transporte dessas moléculas até células bacterianas que causam doenças em seres humanos (SANTOS *et al.*, 2018; XUE *et al.*, 2018).

A associação de ácidos nucleicos com lipossomos gera a possibilidade de transporte e entrega desses polímeros ao alvo desejado *in vivo* ou *in vitro* de maneira eficiente, devido às características dos lipossomos (TAN *et al.*, 2016; ABU LILA e ISHIDA, 2017). Essas associações geram a possibilidade do carreamento e entrega de DNA e/ou RNA ao interior de células bacterianas, causadoras de doenças em plantas. A utilização de nanopartículas lipídicas como lipossomos, compostos de uma mistura de um lipídio catiônico ou aniônico, colesterol, lipídio auxiliar DSPC e lipídio modificado com PEG, pode ser uma alternativa eficiente (LAKSHMINARAYANAN *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2018; XUE *et al.*, 2018). A utilização de lipossomos como carreadores possibilita a geração de um produto eficiente para o controle de bactérias como a Xcc, utilizando estratégias similares às utilizadas na área clínica/médica.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver estratégias para o controle da podridão negra e do mofo branco das brássicas utilizando silenciamento gênico associado ou não a nanoestruturas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a expressão de genes de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) envolvidos na interação Xcc-*B. oleracea*.
- Validar um método de cultivo *in vitro*, que mimetiza o ambiente celular da planta hospedeira (*B. oleracea*).
- Avaliar a eficiência da metodologia HIGS para o silenciamento de genes em *X. campestris*.
- Desenvolver uma nanoestrutura para o carregamento de ácidos nucleicos para o interior de células bacterianas Gram negativas.
- Utilização da metodologia HIGS para o controle do mofo branco através do silenciamento de genes efetores específicos de *S. sclerotiorum*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DE XCC ENVOLVIDOS NA INTERAÇÃO COM *B. oleracea* E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO DE CULTIVO *in vitro*, QUE MIMETIZA O AMBIENTE CELULAR DA PLANTA HOSPEDEIRA.

4.1.1 Sistema *in vivo* – Infiltração de Xcc em folhas de *B. oleracea*

O isolado de Xcc, 51, obtido a partir da coleção de culturas da Embrapa Hortaliças, foi cultivado em meio de glicerol levedura nutriente (NYG) (DANIELS *et al.*, 1984). A cultivar suscetível de *Brassica oleracea* var *capitata*, Veloce (comercializado por Agristar do Brasil, Santo Antônio de Posse, SP, Brasil) foi mantida em casa de vegetação e folhas jovens foram utilizadas neste estudo. Cinquenta plantas foram semeadas e após 45 dias de semeadura, nove plantas com crescimento similar foram selecionadas para ensaio *in vivo* (recuperação bacteriana). Xcc 51 foi cultivado em 5 mL de NYG e 500 µL dessa pré-cultura foi adicionado a 50mL de meio NYG em frascos Erlenmeyer de 250 mL. As células foram centrifugadas e suspensas em solução salina (NaCl 0,85%) e ajustado para OD₆₀₀ = 0,6 (cerca de 3 x 10⁸ CFU / mL). Esta solução bacteriana foi usada para infiltrar as folhas de *B. oleracea* com uma seringa sem agulha.

Inicialmente, foi realizado um estudo de dinâmica populacional na planta a fim de verificar o crescimento bacteriano. A infiltração foi feita em um ponto de inoculação na lâmina foliar abaxial. Um total de cinco repetições biológicas foi realizado. As plantas foram inoculadas com células independentemente cultivadas a partir de um estoque de células. Discos foliares de 0,8 cm de diâmetro foram retirados em 0, 24, 48, 72 e 120 h após a inoculação (hai), macerados em 1 mL de água e semeada em placas

de Petri em diluições apropriadas. Foi realizado um total de três repetições técnicas por diluição e as unidades formadoras de colônias (CFU) foram contabilizadas.

Para a análise de expressão *in planta*, a recuperação de bactéria da planta foi realizada de acordo com Mehta e Rosato (2003) , com algumas modificações. Em 48 horas após inoculação (hai), momento com a maior quantidade de células bacterianas, 15 folhas de três plantas (cinco folhas de cada planta) foram coletadas. As áreas infiltradas foram cortadas usando uma lâmina estéril lâmina em placas de Petri contendo 25 mL de água deionizada e mantido à temperatura ambiente por 25 min. A água contendo as células bacterianas foram filtradas sob vácuo usando filtro papel (Millipore, Bedford, MA, EUA) e novamente em filtros de 5 µm (Minisart®, Sartorius, Goettingen, Germany). A suspensão bacteriana recuperada foi centrifugada, e o pellet bacteriano foi congelado em nitrogênio líquido e mantido a -80°C para RNA purificação.

4.1.2 Sistema *in vitro* – Xcc cultivada em diferentes meios de cultura

Diferentes sistemas *in vitro* foram utilizados neste estudo e comparados com a condição de crescimento *in vivo*. O meio rico NYG foi utilizado, assim como o meio mínimo XVM1 (SCHULTE e BONAS, 1992). Para avaliar a indução efetora em Xcc 51, utilizou-se XVM1, XVM1 modificado (NaCl XVM1 100 mM) para inibir a indução efetora (SCHULTE e BONAS, 1992), utilizado como controle, e XVM1 suplementado com extrato vegetal, preparado a partir de folhas do hospedeiro suscetível Veloce (*B. oleracea*). O extrato vegetal foi preparado a partir de plantas cultivadas em casa de vegetação por 45 dias. As folhas foram coletadas, lavadas várias vezes com água destilada estéril e 10 g de folhas frescas, sem a nervura central, foram cortadas em pequenos pedaços e trituradas em 100 mL de água destilada, utilizando um triturador manual (*Philips*). A mistura homogeneizada foi filtrada em membranas de 0,45 e 0,22 µm (Millipore, Bedford, MA, EUA) e armazenado a -20°C. O extrato foi adicionado a XVM1 modificado (daqui por diante chamado XVM1*), para obter uma concentração final de 1 mg de folhas (peso fresco)/ mL de meio (MEHTA e ROSATO, 2001; MEHTA

e ROSATO, 2003; TAHARA *et al.*, 2003). Assim, foi analisada a indução de efetores em Xcc 51 sob quatro condições *in vitro*. Uma curva de crescimento foi determinada para todos os quatro meios. Um total de três experimentos independentes foram realizados a partir de células preparadas independentemente, cultivadas a partir de um estoque de células.

4.1.3 Purificação de RNA e síntese de cDNA

O RNA total foi extraído pelo método do fenol do ácido a quente (AIBA *et al.*, 1981). A quantificação de RNA foi realizada utilizando o espectrofotômetro NanoDrop® (ND-1000 UV-Vis -*Thermo Fisher*, Waltham, MA, EUA). A integridade de RNA total foi confirmada por eletroforese. Antes da síntese de cDNA, o RNA foi tratado com Turbo DNase (*Applied Biosystems/Ambion*, Foster City, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante para eliminar qualquer possível contaminação com DNA genômico. O cDNA foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA total usando o kit *Go Script* sistema de transcrição reversa (*Promega*, Madison, WI, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de cDNA foram armazenadas a -20°C para análises posteriores.

4.1.4 Desenho de “*primers*” para análise da expressão gênica

Os primers específicos para genes codificadores de efetores e proteínas envolvidos na patogenicidade do Xcc foram selecionados de acordo com os resultados obtidos em nosso grupo de pesquisa (SANTOS *et al.*, 2017) e demais trabalhos da literatura (tabela 1).

Tabela 1. Informações gerais dos “primers” selecionados para avaliação da expressão gênica.

Símbolo do gene	Anotação	Primer Foward (5' to 3')	Tm °C	Primer Reverse (5' to 3')	Tm °C	Amplicon
acpP*	ProteAcyl carrier protein	GAAGAGGAAGTCACCACCAG	57,25	GCACTCGAACTCTTCTTCCA	58,16	102
adK*	Adenylate kinase	GGTGCGGTGGAATCGGTAT	59,85	ATTGCTGGTTGAGCGGATCG	61,09	108
argD	Acetylornithine transaminase protein	GGATCTGCGCAAACACA	57,7	AGATTGCCGAGAATGTGG	57,1	90
avrBs2	Avirulence protein	ACCCGCAGAACAGATTG	53,81	CGGTCTTGATGAAGTTGC	54,27	99
avrXccCFm	Avirulence protein	CTACTCTGTCTTGCCTGTTG	55,80	GGAGAAACTATCCCGATGAC	55,05	110
carB	Carbamoyl-phosphate synthase large chain	TCGTCTACATCGTCAACACC	57,1	GACAGTGGTCGAATAGGTCA	56	104
Clp	cAMP-regulatory protein	GCTTTCCTTGTGGTATCGAG	56,24	GTTTCAGACGAGTTTGTCCG	57,72	93
clpX	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX	ATGTACGAACTGCCGTAC	57,1	GCCTGGTAGATCAGATACGG	57,2	95
fabH	3-oxoacyl-ACP synthase	GTGTTCAAGTACGCCGTC	59,76	GATCAACCAGTCCAGGTCGT	59,97	93
fabV	Trans-2-enoyl-CoA reductase	CACCAACAAGGACACCAT	55,47	ATCCACAGTTCCCAATCC	54,90	105
hrpA	ATP dependent RNA helicase	ATGCGATCCAGATACCAG	53,44	TAACCTCAAGGTGCTGGA	54,91	105
hrpG	Regulator-HrpG protein-type III secretion protein HrpG	AAAAGATGGTGACCTCTGGG	57,11	AAGGATCGGCATTTCGTACTG	57,77	93

hrpX	Regulator ara-C	GGCTTGTA AAAAGTGCTAGGG	56,7	GATCTCAAGCGTGGTGATTC	58,2	100
ilvC	ketol-acid reductoisomerase	ATCTATGCGGTCTACCAGGAC	58,16	CCTTGAACGTGGTCTTGATG	59,13	109
iroN	TonB-dependent receptor	GTGGACAACGACTTCGATAC	55,57	GCTGAAGGTGTAGTTCTTGG	55,02	102
purC	Phosphoribosylaminoi midazole- succinocarboxamide synthase	CACGAACTGCTTGTCGTAG	55,48	GTACATCATGGACGAGATGC	57,46	103
rpfB	Long-chain fatty acyl CoA ligase	AATACCCGATTGCCACCTTC	57,98	GAGTCGATCAACTGGTGCTT	57,98	103
rpfC	Response regulator	CGCTATGGCAGCAACTATCT	58,17	AGATAGGGATTGGCTTTCCA	58,60	101
rpfG	Response regulator	CGGAGTTGAAGGTCTACGAT	56,9	GGTAATCGAGCAGCAACAG	57	90
rpfH	Response regulator	ACGACGCTTTCCAATAGCAC	58,92	TAGCGTACGCAACAATGACA	57,93	102
Ssb	Single-stranded DNA- binding protein	G TTCCTGGTTATTGCCTTCG	59,57	GATCCCGACACCAAGTACAC	57,84	100
xopAc	Type III effector protein with a Leucine- Rich Repeat Domain AvrACXcc8004	ACCTGGACGATGTAGCTGT	55,60	GACAACCTCTGTCTGGTCTC	54,56	103

* Genes de referência.

Esses oligonucleotídeos foram desenhados para atender aos seguintes parâmetros, tamanho do “*primer*” até 21 nucleotídeos, tamanho do “*amplicon*” entre 90 e 110 pb, temperatura de anelamento de 58 °C - 60°C para cada “*primer*”, ausência de grampos e ausência de amplificação inespecífica (SRIVASTAVA *et al.*, 2011). O software Primer 3 (UNTERGASSER *et al.*, 2012) foi usado para projetar todos os “*primers*”, e a ausência de amplificação inespecífica e “*hairpin*” foi avaliada usando o software OligoAnalyzer 3.1 (OWCZARZY *et al.*, 2008).

4.1.5 qRT-PCR e análises dos dados

Durante a realização do bioensaio foi coletado micélio de *S. sclerotiorum* em cinco tempos 6 h após inoculação (hai), 12 hai , 24 hai , 48 hai e 72 hai , em seguida o RNA foi purificado utilizando o método Trizol® (CHOMCZYNSKI e SACCHI, 2006), de acordo com as recomendações do fabricante. O RNA purificado foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop® (ND-1000 UV-Vis-*Thermo Fisher*) e avaliado por meio de gel de agarose 1%. O RNA foi tratado com a enzima DNase (DNase turbo *Ambion*®) e em seguida realizada a síntese de cDNA utilizando o kit SuperScript™ III *First-Strand Synthesis SuperMix for qPCR (Invitrogen)* de acordo com as recomendações do fabricante. Os experimentos de qPCR foram realizados em termociclador 7300 *Real-Time PCR System (Applied Biosystems)*. A reação será composta por *Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems)*, 0,2 µM de cada *primer (Forward e Reverse)* e 2 µL de cDNA referente a cada amostra analisada. O programa de PCR utilizado foi realizado em um passo a 95°C por 10 min para ativação da enzima Taq DNA polimerase (*hot start*), 95°C por 15 s, 60°C por 60 s repetidos por 40 ciclos. A curva de desnaturação “*melting curve*” foi realizada após o término da amplificação para verificar a presença de produtos inespecíficos ou dímeros de *primers*. Todos os experimentos foram realizados em triplicata biológica. Três réplicas técnicas foram realizadas para cada réplica biológica.

As reações de qRT-PCR foram realizadas em placas de 96 poços e em cada placa foi incluído um controle negativo sem cDNA para garantir a ausência de contaminação. Reações com RNA tratado com DNase também foram realizadas para confirmar a ausência de contaminação por DNA. Os dados brutos de fluorescência de todas as corridas foram importados para o *software Real time PCR Miner* (ZHAO e FERNALD, 2005), para determinar o valor Cq e a eficiência de cada amostra/gene. As análises de expressão e estatística serão realizadas utilizando o *software REST* (PFAFFL *et al.*, 2002). Para comparar as diferenças de expressão entre os grupos, foi utilizado o teste t com quatro graus de liberdade, $n = 9$ (três biológicos e três replicados técnicos para cada réplica biológica) e 95% de confiança.

4.2 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA METODOLOGIA HIGGS PARA O SILENCIAMENTO DE GENES EM *X. campestris*.

4.2.1 Obtenção de plantas transgênicas

Sementes de *Nicotiana tabacum* cv. *xanthi* transgênicas capazes de silenciar o gene *uidA* no patógeno, foram gentilmente cedidas pelo Dr. Francisco Aragão, (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF). As linhagens foram transformadas para expressar o gene *uidA*, em seguida re-transformadas com a construção *Intron-hairpin* que expressam dsRNAs para o silenciamento do gene *uidA*. Essas plantas foram utilizadas para silenciar o gene *uidA* expresso pelo fungo filamentoso *Fusarium verticillioides* (TINOCO *et al.*, 2010). Essas plantas foram cultivadas em casa de vegetação, em vasos de 750 mL em substrato (80% solo e 20% vermiculita).

4.2.2 Transformação de *Xanthomonas*

O vetor pBR5-Tac-Gus, gentilmente cedido pelo Dr. Maxuel Andrade (Laboratório Nacional de Biociências-LNBio), foi isolado e utilizado na transformação de Xcc e Xcr, obtidas a partir da coleção de cultura da Embrapa Hortaliças. Células competentes de Xcc e Xcr foram submetidas ao processo de eletrocompetência e em seguida transformadas por eletroporação segundo Amaral *et al.* (2005). A confirmação da transformação das células foi realizada por cultivo em meio seletivo contendo o antibiótico Gentamicina ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e por meio de PCR convencional utilizando primers específicos, GUSF (5' GCAAAGTGTGGGTCAATAAT 3') e GUSR (5'TCAGACTCTGTCTGGCTTTT 3'), para a detecção do gene GUS em colônias

isoladas, e ensaio colorimétrico utilizando o substrato ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-Beta-D-glucurônico (X-gluc) de acordo com (JEFFERSON *et al.*, 1987).

4.2.3 Avaliação da ocorrência do silenciamento gênico em *Xanthomonas campestris*

Células transformadas de *X. campestris*, capazes de expressar o gene repórter *uidA* (GUS), foram cultivadas em meio NYG sólido a 28°C por 48h. Em seguida, uma colônia foi coletada e cultivada em 5 mL de meio NYG líquido e incubada a 28°C sob agitação (220 rpm) por 16h e 500 µL desse cultivo foram transferidos para 50 mL de meio NYG líquido em frascos de 250 mL e mantidos por 12 h a 28°C. As células foram centrifugadas, suspensas em solução salina (NaCl 0,85%) e a concentração foi ajustada para uma OD₆₀₀ = 0,3 (aproximadamente 3x10⁸ CFU/mL). Essa solução foi infiltrada em folhas de seis plantas de *N. tabacum* cv. *xanthi*, sendo três da linhagem #12, três da linhagem #70, capazes de silenciar o gene *uidA*, no patógeno, além de três plantas não transformadas (WT). Três plantas transformadas foram infiltradas apenas com solução salina e foram utilizadas como controle dos sintomas causados pelas bactérias. As infiltrações foram realizadas de acordo com Mehta e Rosato (2003).

As plantas foram avaliadas quanto aos sintomas causados pela infecção de *X. campestris*, e discos foliares foram coletados nos tempos 0, 12, 24, 48 e 96 h após inoculação (hai), para a realização de dinâmica populacional e teste de coloração. Para a dinâmica populacional, discos foliares de 0,6 cm de diâmetro foram macerados em 1 mL de água destilada autoclavada e diluições apropriadas foram plaqueadas e as unidades formadoras de colônia, “*colony forming unit*” (UFC) foram contabilizadas. Para a detecção da coloração azul resultante da atividade da enzima GUS, foram utilizados discos de 0,4 cm de diâmetro e o substrato X-gluc, de acordo com Jefferson *et al.* (1987). A avaliação da coloração foi realizada por análise de imagem utilizando o software *ImageJ* versão 1.8.0 (SCHNEIDER *et al.*, 2012).

4.3 DESENVOLVIMENTO DE NANOESTRUTURA PARA O CARREAMENTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS PARA O INTERIOR DE CÉLULAS BACTERIANAS GRAM NEGATIVAS.

4.3.1 Síntese de nanopartículas e nanoencapsulamento

Nanopartículas foram produzidos com base em uma adaptação de uma metodologia previamente patenteada (DA SILVA *et al.*, 2015). Foram utilizadas baixas concentrações de polietilenoglicol para conferir maior estabilidade e solubilidade a nanoestrutura. Para o nanoencapsulamento foi adicionado aos lipossomos o vetor pPM7g (MARTINS *et al.*, 2010), que possui em sua construção o gene repórter *gfp*. Este vetor foi gerado sob o controle do promotor induzível de xilose (*pxyl*) e possui como marcador de seleção o gene de resistência a kanamicina (Figura 8). O vetor foi diluído em água ultrapura a uma concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e levado à agitação em vórtex para a formação das nanopartículas.

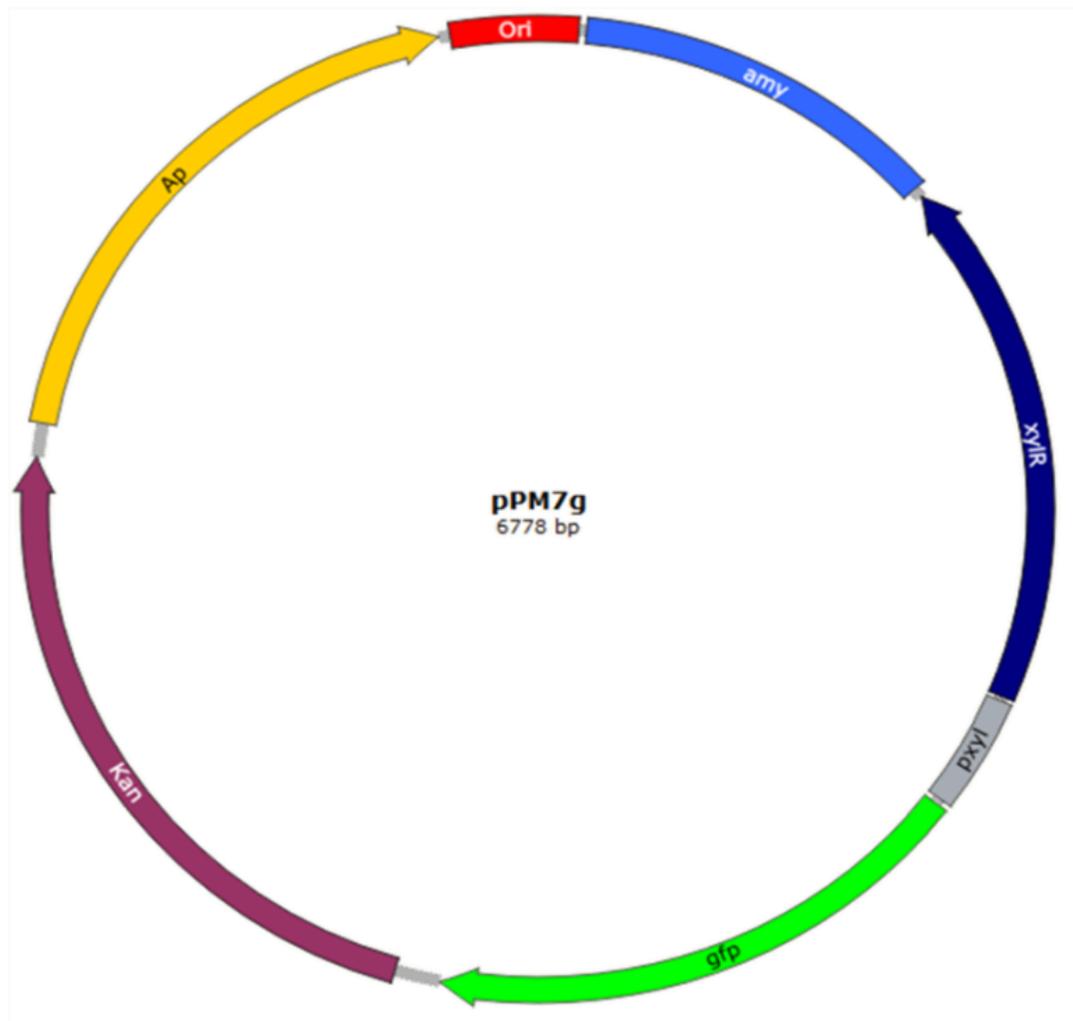


Figura 8. Visão geral do vetor pPM7g. O vetor conta com a origem de replicação (ori) com o fragmento do gene de alfa amilase(amy), o gene repórter que codifica a proteína verde fluorescente), os genes de resistência ao antibiótico kanamicina(kan) e ampicilina (Ap). O vetor conta também com o promotor induzível de xilose (pxyl) e com o operon regulador de xilose (xyIR). Adaptado de MARTINS *et al.* (2010).

4.3.2 Caracterização da nanopartícula por espalhamento de luz dinâmico e potencial zeta

As nanoestruturas contendo o vetor de expressão pPM7g e os controles (lipossomo vazio e vetor livre) foram analisadas por espalhamento de luz dinâmico, “dynamic light scattering” – DLS (ZetaSizer Nano ZS. Malvern, UK). Estas avaliações

forneceram informações referentes ao diâmetro hidrodinâmico (DH), obtidas por meio da análise do movimento Browniano de partículas dispersas em meio líquido. O tamanho pode ser obtido de acordo com a distribuição em intensidade. A partir dessa informação, as distribuições em número e em volume são geradas considerando uma solução contendo duas populações de partículas de tamanho diferente em igual proporção. O índice de Polidispersão, “*Polydispersity index*” – Pdl, é um dado importante e corresponde à variação do tamanho dentro de uma amostra relativa à sua distribuição em intensidade. O seu valor varia de 0 a 1, sendo que quanto menor o valor, mais monodispersa é a amostra. Além disso, por meio da mobilidade eletroforética das nanoestruturas nas suspensões foi determinado o potencial zeta de superfície, referente à estabilidade da nanoestrutura em solução, quanto maior o potencial zeta de superfície, maior a estabilidade da nanoestrutura (CLOGSTON e PATRI, 2011; HACKLEY e CLOGSTON, 2011).

4.3.3 Avaliação do carregamento do vetor pPM7G ao interior da célula bacteriana

A bactéria foi cultivada em meio líquido e temperatura adequados sob agitação de 220 rpm até atingir $OD_{600nm} = 0,5$, e em seguida 500 μ L do cultivo foi transferido para 4,90 mL de meio líquido, suplementado com 500 μ L de lipossomos contendo o vetor pPM7g. A bactéria foi cultivada até atingir $OD_{600nm} = 0,8$, em seguida as células foram avaliadas em microscópio de epifluorescência (Axiophot, Zeiss USA) e cultivadas em placa de Petri contendo meio Luria Broth (LB) suplementado com xilose (1%) com e sem antibiótico (kanamicina 50 μ g.mL⁻¹), as colônias foram contabilizadas e avaliadas quanto à fluorescência em lupa (Lupa, Leica, USA).

4.4 UTILIZAÇÃO DA METODOLOGIA HIGS PARA O CONTROLE DO MOFO BRANCO ATRAVÉS DO SILENCIAMENTO DE GENES EFETORES ESPECÍFICOS DE *Sclerotinia sclerotiorum*.

4.4.1 Seleção de genes alvo para o silenciamento em *Sclerotinia sclerotiorum*

Para o desenvolvimento desse estudo foi realizada a seleção de três genes efetores de *S. sclerotiorum*, *SsPG1*, *SsiTL* e *Ss-caf1* já conhecidos e descritos na literatura. Para a seleção desses genes foi levado em consideração o referencial teórico disponível, além de resultados obtidos em estudo prévio, ainda não publicado, no qual a expressão de efetores de *S. sclerotiorum* foi avaliada durante a interação *in vitro* com alguns hospedeiros. Desta forma, foram selecionados como alvos de silenciamento os efetores.

4.4.2 Construção de vetores

A síntese e clonagem dos fragmentos dos genes *SsiTL*, *Ss-caf1* e *SsPG1*, foi realizada pela empresa Epoch, no sentido senso e antisenso, no vetor pRNAi-psiuk (Figura 9), gentilmente cedido pelo Dr. Francisco Aragão (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF). Os fragmentos para a clonagem não excederam 400 pares de base para favorecer a formação do *hairpin*-dsRNA. Cada fragmento foi selecionado a partir do gene alvo e avaliado no *software* Mfold, disponível no site: <http://unafold.rna.albany.edu/> (ZUKER, 2003). Esse *software* calcula a diferença de energia livre de Gibb's (ΔG ; -Kcal/mol) de cada sequência; quanto mais negativo é o ΔG , maior a estabilidade da sequência avaliada.

Após a seleção dos fragmentos, foram gerados três vetores, pRNAi-psiuk-Efector-SsiTL, pRNAi-psiuk-Efector-SscaF1 e pRNAi-psiuk-Efector-SsPG1. Os

fragmentos selecionados foram clonados no sentido 5' → 3' (senso) entre os sítios de restrição SacI e EcoRI e no sentido 3' → 5' (antisenso) entre os sítios de restrição BstBI e HindIII. Entre os fragmentos está presente a sequência intrônica do gene Piruvato Ortofosfato Diquinase (PDK) de *Flaveria trinervia*, constituindo a sequência aqui referida como *íntron-hairpin*.

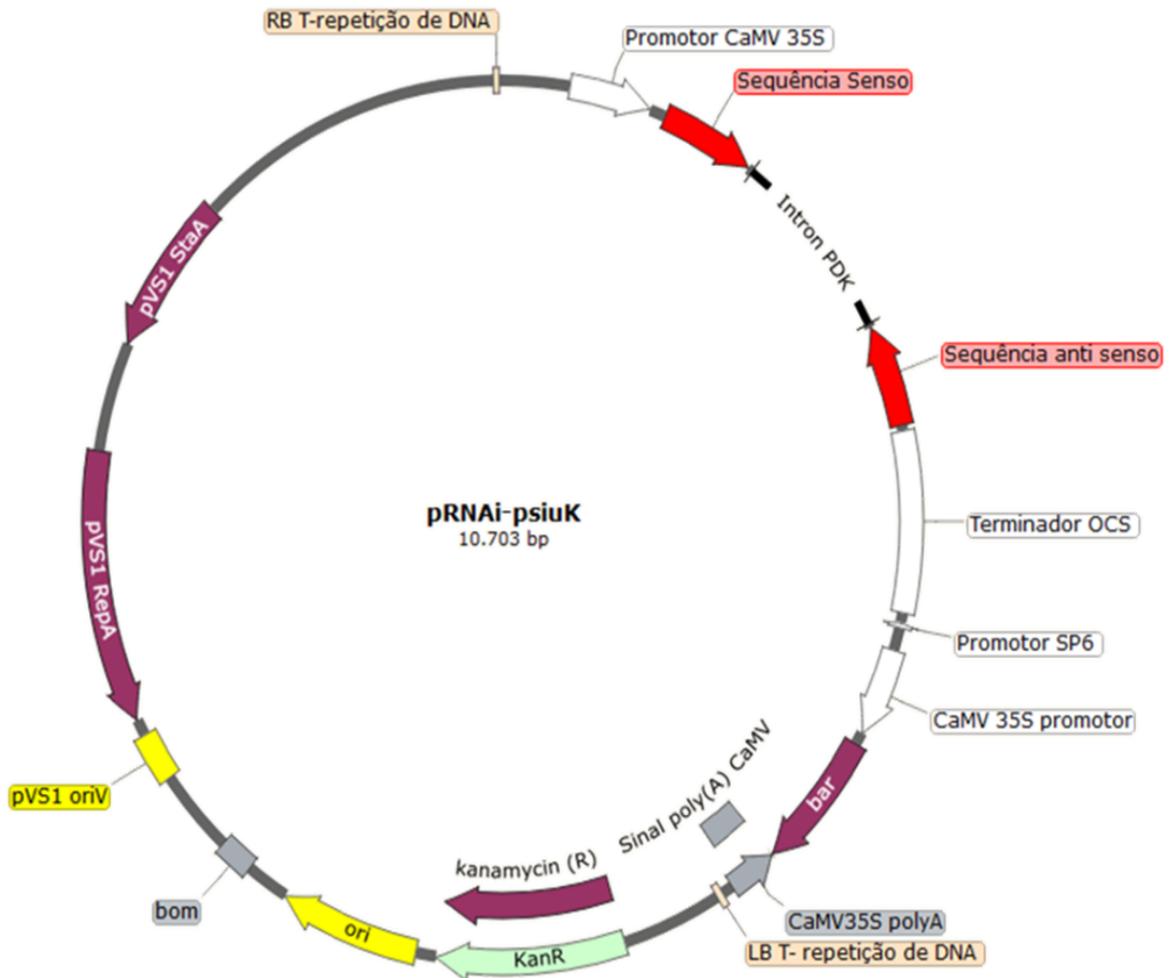


Figura 9. Mapa do vetor pRNAi-psiuk. O vetor contém a sequência *íntron-hairpin* (Sequência senso-intron do gene Piruvato Ortofosfato Diquinase (PDK) de *Flaveria trinervia*-Sequência anti senso); os genes de resistência à fosfotricina (*bar*) e à kanamicina (*kanR*), essas sequências são controladas pelo promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CAMV35S), promotor para bacteriófagos SP6 RNA polimerase e pelo terminador Octopine sintase (OCS), o vetor conta também com origens de replicação (*ori* e *pVS1 oriV*), com a sequência da proteína de replicação e estabilidade *pVS1* do plasmídeo de *Pseudomonas* (*PVS1 RepA* e *PVS1 staA* respectivamente), com a sequência de base da região de mobilidade do pBR322 (*bom*). O vetor conta com a sequência de repetição da borda direita e esquerda de nopalina C58 T-DNA (RB e LB – T repetição de DNA respectivamente).

A sequencia *íntron-hairpin* foi gerada sob o controle do promotor constitutivo CaMV35S, do vírus do mosaico da couve-flor. Os vetores gerados possuem como marcador de seleção o gene *bar*, que codifica a enzima fosfinotricina acetiltransferase (PAT) que confere resistência a fosfinotricina ou PPT, princípio ativo de herbicidas como o glufosinato de amônia.

4.4.3 Multiplicação de vetores via *Escherichia coli*

Vetores sintetizados e entregues pela empresa Epoch, foram multiplicados em *E. coli*. células da linhagem comercial XL1blue, foram submetidas ao processo de eletrocompetência e transformação (SAMBROOK *et al.*, 1989). As colônias crescidas em meio seletivo (kanamicina 50 µg.mL⁻¹, rifampicina 50 µg.mL⁻¹) foram individualizadas em uma nova placa contendo meio seletivo e cultivadas a 37° C por 16h. A transformação foi verificada pela presença dos genes alvo por meio de PCR utilizando como molde colônias isoladas que cresceram em meio seletivo e primers específicos para cada fragmento presente em cada vetor, SsiTL 5' TACAAGACACGGACTGTTGA 3'(SsiTL_F) e 5' TTAGCGCTATAAGGTCCAAG 3' (SsiTL _R), *Ss-caF1* 5' AGAAACCTTTAACCGTGGAT 3' (*Ss-caF1_F*) e 5' TCTCCTTCAGCAAATCAACT 3' (*Ss-caF1_R*) e para o fragmento SsPG1 o primer 5' TCTCCTTCAGCAAATCAACT 3' (SsPG1_F) e 5' GTTGGAGAGAGTGACACC AG 3'. Após a confirmação da transformação de *E. coli* foi realizado o isolamento do plasmídeo (SAMBROOK *et al.*, 1989). O DNA plasmidial foi quantificado utilizando espectrofotômetro NanoDrop® (ND-1000 UV-Vis-*Thermo Fisher*).

4.4.4 Avaliação de transformantes por reação de PCR e sequenciamento

Visando a confirmação das transformações das bactérias utilizadas neste trabalho, foram realizadas reações de PCR convencional, utilizando 100 ng de DNA genômico, 1 U de DNA polimerase (Taq DNA polimerase® GE Healthcare Life Sciences), tampão de reação 1X (PCR buffer GE Healthcare Life Sciences), 1 µM de cada primer, 250 µM de dNTPs e 2,5 mM de MgCl₂. A reação ocorreu em termociclador (*Veriti 96 Well Thermal Cycler – Applied Biosystems*) sob as seguintes condições: um passo de 95°C por 3 min; 30 ciclos de 95°C por 30 s, 55°C por 30 s e 72°C por 40 s; um passo de 72°C por 5 min. Os produtos de amplificação foram visualizados em gel agarose 1% corado com brometo de etídio. As colônias bacterianas contendo insertos de tamanho esperado foram submetidas ao sequenciamento de DNA na plataforma de Sequenciamento da Universidade Católica de Brasília (UcB) utilizando o equipamento Sanger Abi 3130 (*Applied Biosystems*). As sequencias obtidas foram alinhadas no software ClustalW Ômega (SIEVERS *et al.*, 2011) e submetidas a ferramenta blast – “*basic local alignment search tool*” (Ferramenta de busca por alinhamento local) disponível em <<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>, especificamente o blastn, que busca sequencias nucleotídicas (DÉVELOPPEUR, 1990; JOHNSON *et al.*, 2008), para avaliar se as sequencias apresentavam similaridade com os genes efetores de *S. sclerotiorum* selecionados.

4.4.5 Transformação de planta modelo via *Agrobacterium tumefaciens*

Células de *A. tumefaciens* da linhagem GV3101 foram submetidas ao processo de eletrocompetência. Em seguida três alíquotas contendo células eletrocompetentes foram selecionadas para a transformação (MCCORMAC *et al.*, 1998), utilizando 100 ng de cada vetor isolado de *E.coli*, para cada transformação, após a transformação as células foram cultivadas em meio seletivo (kanamicina 50 µg.mL⁻¹,

rifampicina 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e gentamicina 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), foi realizado o isolamento do plasmídeo a partir de colônias positivas (SAMBROOK *et al.*, 1989). O DNA plasmidial, foi quantificado utilizando espectrofotômetro NanoDrop® (ND-1000 UV-Vis-*Thermo Fisher*). Após a quantificação, foi verificado a transformação por reação de PCR utilizando primers específicos para cada fragmento presente em cada vetor (Tabela 2).

Tabela 2. *Primers* específicos para genes efetores de *S. sclerotiorum* utilizados neste estudo.

Gene	Primer foward	Primer reverse
<i>SsiTL</i>	5' TACAAGACACGGACTGTTGA 3'	5' TTAGCGCTATAAGGTCCAAG 3'
<i>Ss-caF1</i>	5' AGAAA CCTTTAACCGTGGAT 3'	5' TCTCCTTCAGCAAATCAACT 3'
<i>SspG1</i>	5' TCTCCTTCAGCAAATCAACT 3'	5' GTTGGAGAGAGTGACACCA 3'

Após a confirmação da presença dos vetores pRNAi-psiuk-Efector-SsiTL, pRNAi-psiuk-Efector-Sscaf1 e pRNAi-psiuk-Efector-SsPG1 em *A. tumefaciens* foi realizada a transformação de *A. thaliana* utilizando o método de imersão dos botões florais “*floral dip*” (CLOUGH e BENT, 1998).

4.4.6 Análise da progênie

Após a transformação dos botões florais, as plantas (T0) foram mantidas em ambiente controlado a 21°C com fotoperíodo de 12h, até a maturação e coleta das sementes T0. As sementes T0 foram germinadas em substrato (Substrato Carolina) e mantidas sob condições adequadas, gerando a planta T1, cada planta gerada nesta etapa foi denominada “linhagem”, o processo foi repetido para a obtenção da geração T2 e T3 de ao menos três eventos distintos. As plantas foram analisadas para a presença do *íntron-hairpin* específico por seleção utilizando glufosinato de amônio 20 mg.L^{-1} , durante 15 dias. Após a confirmação da transformação por seleção, foi realizada análise de Qui-quadrado (χ^2), utilizando o fator de correção de Yates para

determinar se a segregação observada corresponde ao padrão Mendeliano na razão de 3:1 ou 15:1, com 95% de nível de confiança (ANDRADE *et al.*, 2016).

4.4.7 Bioensaio

O bioensaio foi realizado utilizando plantas transformadas em homozigose. Foram utilizadas folhas totalmente expandidas de plantas com aproximadamente 30 dias após a germinação. Para a infecção foi utilizado o fungo *S. sclerotiorum*, proveniente de campos de feijão do estado de Goiás, Brasil, cultivado em meio BDA (Batata dextrose ágar) sintético. Após sete dias de cultivo do fungo, discos de 5 mm de micélio foram coletadas e transferidos para o meio líquido e cultivados durante três dias, após esse período 500 µL de meio de cultura foi inoculado de maneira perpendicular no meristema apical da planta *A. thaliana* transgênica. O bioensaio foi conduzido utilizando três eventos independentes, réplicas biológicas e 24 réplicas técnicas de cada evento, o experimento contou também com um grupo controle, composto por 24 plantas Col-0 não transformada (*wild type*). As plantas foram acondicionadas em câmara úmida, sob a temperatura de 24°C ±2°C no escuro. As plantas foram monitoradas e avaliadas a cada 24 h durante 7 dias com o objetivo de acompanhar a interação planta-patógeno estabelecida. Para avaliar os sintomas foi utilizado uma escala de notas para os sintomas, e para avaliar a severidade dos sintomas nos grupos avaliados foi utilizada a fórmula de Grau *et al.* (1982),

$$\sum (\text{nota} \times \text{n}^\circ \text{ de plantas}) * 100 / (\text{total de plantas avaliadas} * \text{quantidade de notas}).$$

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DE XCC ENVOLVIDOS NA INTERAÇÃO COM *B. oleracea* E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO DE CULTIVO *in vitro*, QUE MIMETIZA O AMBIENTE CELULAR DA PLANTA HOSPEDEIRA.

A partir desses resultados foi gerado o artigo científico, intitulado “*Validation of an in vitro system for studies of pathogenicity mechanisms in Xanthomonas campestris*” (Apêndice A), publicado na revista FEMS Letters em outubro de 2017 (MAXIMIANO *et al.*, 2017).

5.1.1 Cultivo de Xcc em sistema *in vivo* e *in vitro*

Na literatura foi relatado que diversos estudos relacionados a espécies de *Xanthomonas* foram realizados utilizando sistemas *in vitro*. Entretanto existe a dúvida se os meios de cultura são capazes de reproduzir o que ocorre *in vivo*. Neste trabalho, diferentes condições de crescimento foram comparadas, a fim de determinar se o meio de crescimento poderia ser melhorado para melhor corresponder às condições da planta, além daquelas oferecidas pelo meio mínimo definido XVM1. Os experimentos iniciais foram direcionados para avaliar o crescimento bacteriano nas diferentes condições. Para determinar o ponto de amostragem com o maior número de células Xcc *in planta*, foi realizada uma análise dinâmica populacional. Os resultados revelaram que em 48 h as células bacterianas atingiram o crescimento máximo, que foi de 1×10^7 UFC/cm² (Figura 10 A). Para o sistema *in vitro* utilizando meio mínimo, o crescimento de Xcc foi monitorado por 72 h e a densidade celular foi avaliada a cada 12 h durante esse período (Figura 10 B).

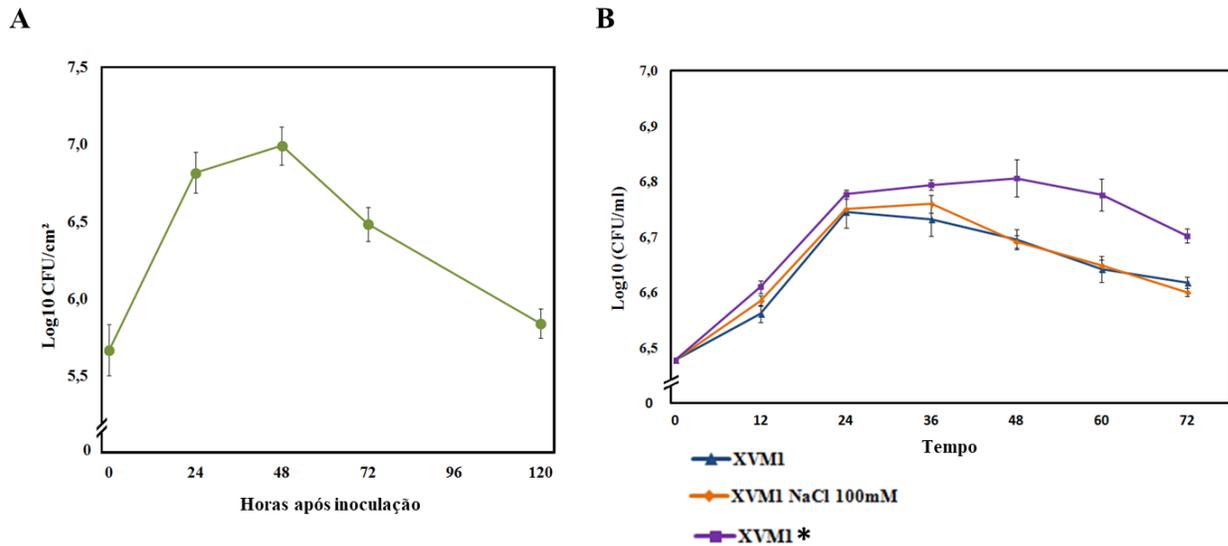


Figura 10. Dinâmica de populações. **A** - *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in planta . **B** – Curva de crescimento de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in vitro.

De acordo com os resultados obtidos, a fase exponencial média foi de $OD_{600nm} = 0,5$ durante o crescimento em meios XVM1, XVM1 modificado e XVM1 *. Em meio NYG, a fase exponencial média foi obtida em $OD_{600nm} = 0,8$. Os resultados obtidos corroboram com dados relatados na literatura para o crescimento de *Xanthomonas spp* nesses meios (MEHTA e ROSATO, 2003; TAHARA *et al.*, 2003; LIU *et al.*, 2015).

5.1.2 Avaliação da expressão gênica

De acordo com publicações anteriores do nosso grupo e outros dados da literatura, selecionamos 20 genes envolvidos na patogenicidade de Xcc para verificar sua expressão em condições de crescimento *in vitro* e *in vivo*. A análise de qRT-PCR e as análises estatísticas dos resultados foram realizados utilizando o “software” REST (PFAFFL *et al.*, 2002) utilizando como controle interno a combinação dos genes *adk* - adenilato quinase (DA SILVA *et al.*, 2002; LU *et al.*, 2009) e *acpP* proteína transportadora de acil (HUANG *et al.*, 2000; DA SILVA *et al.*, 2002), determinados com o auxílio do “software” geNorm (VANDESOMPELE *et al.*, 2002). As eficiências de

amplificação foram determinadas individualmente para cada amostra pelo “*software*” Miner (ZHAO e FERNALD, 2005) e estavam acima de 90% para todos os genes avaliados (90% -95%).

A expressão relativa dos genes de Xcc foi calculada em relação ao controle (Xcc cultivada em XVM1 modificado – suplementado com 100 mM NaCl), o que não induz os genes hrp (SCHULTE e BONAS, 1992). Após a determinação da expressão gênica relativa, foi realizada uma análise estatística para determinar a diferença na expressão relativa do Xcc crescido nos sistemas *in vitro* e *in planta*. Os genes foram considerados aumentados, diminuídos ou estatisticamente não significativos (Figura 11), de acordo com a análise estatística do “*software*” REST. Com o objetivo de validar o sistema de crescimento mais próximo de uma condição de infecção da planta hospedeira foi avaliada a expressão gênica de vários genes, incluindo genes do cluster hrp (*hrpA*, *hrpG* e *hrpX*), que foram selecionados como controles, uma vez que foram bem estudados *in vitro* e *in planta*.

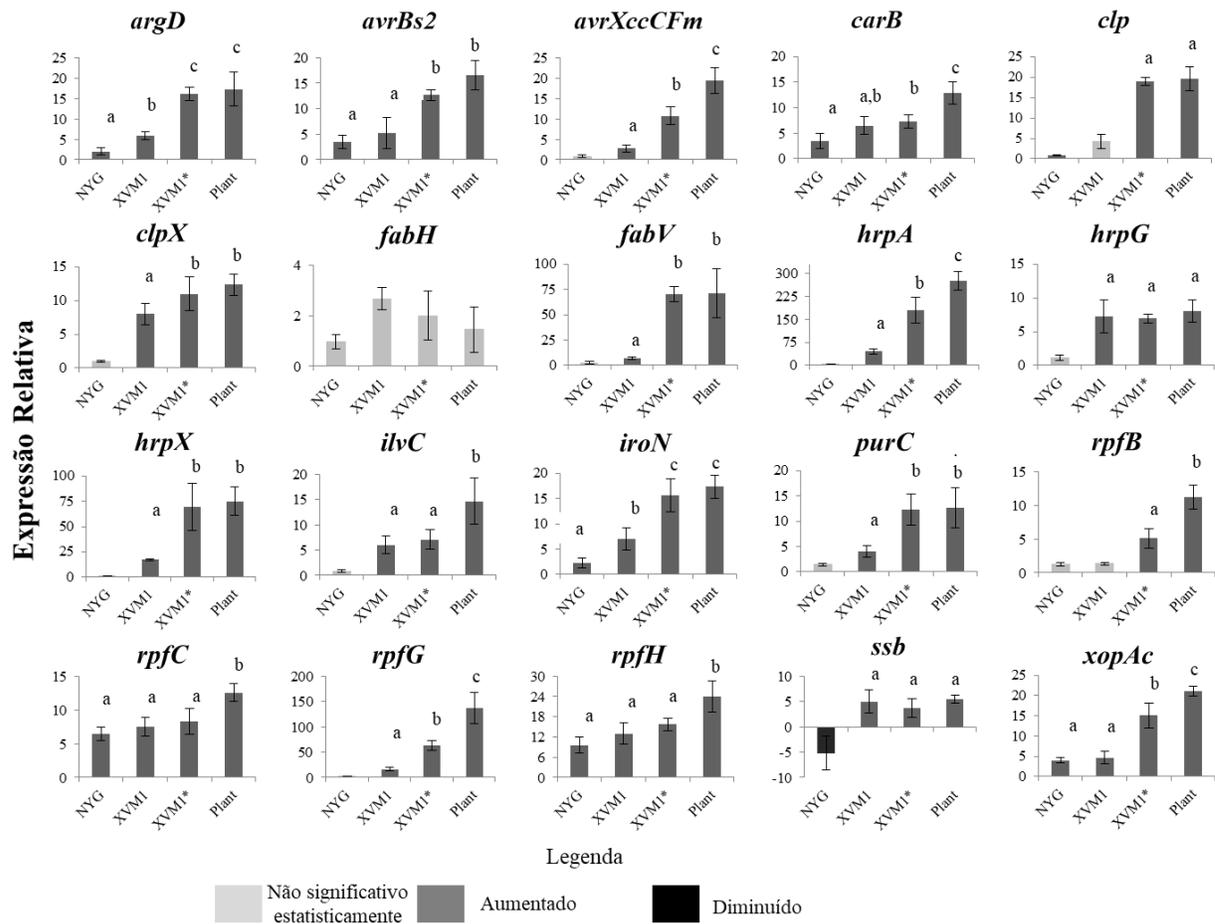


Figura 11. Expressão relativa dos genes de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* envolvidos na patogenicidade, durante o crescimento *in vitro* e *in vitro*. Cada valor representa a média \pm de três experimentos independentes. Letras diferentes representam diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre os grupos.

O gene *hrpA* (helicase dependente de adenosina trifosfato [ATP]) atua na síntese do pilus, enquanto *hrpG* e *hrpX* são reguladores de expressão deste cluster (ALFANO e COLLMER, 1997; SU *et al.*, 2016). O perfil de expressão desses genes mostrou-se, como esperado, aumentado em Xcc cultivado em XVM1, XVM1* e *in planta*, quando comparado com o controle. Curiosamente, o *fold change* de *hrpA* foi de 275 *in planta*, 180 em XVM1* e 46 em XVM1 (Figura 11), mostrando que a expressão *in planta* foi maior que nos sistemas *in vitro* e que o perfil XVM1 foi mais próximo do observado na planta. Os genes *hrpG* e *hrpX* também estavam aumentados quando

comparados ao controle, no entanto, a expressão de *hrpG* não foi estatisticamente diferente em XVM1, XVM1* e *in planta*, além disso a variação máxima do *fold change* foi de 8. Por outro lado, a expressão de *hrpX* apresentou uma alteração máxima de *fold change* de XVM1* e 75 *in planta* sem diferença estatística entre eles, enquanto o *fold change* em XVM1 foi 17. O trabalho realizado por Guo *et al.* (2011), mostraram que *hrpG* e *hrpX* desempenham papéis importantes na coordenação de diferentes categorias de genes. É sugerido também que esses genes interagem com uma rede de sinalização global e coordenam a expressão de múltiplos fatores de virulência para modificação e adaptação do ambiente hospedeiro durante a interação com *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Em *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, foi demonstrado que a expressão de *hrpA* e *hrpX* não é dependente de fonte de açúcar, diferentemente dos outros genes deste cluster (IKAWA e TSUGE, 2016), o que poderia explicar a expressão menor de *hrpX* em XVM1 e sua indução por compostos de plantas em XVM1* e *in planta*, mostrando a eficiência do XVM1*.

Os genes do cluster *rpf* também foram avaliados devido a foram avaliados devido ao seu papel no processo de infecção Xcc, atuando na sinalização célula-a-célula. Os genes selecionados deste cluster foram *rpfB* (cadeia longa de acil CoA ligase), *rpfC* (sensor quinase), *rpfG* (par de regulador de sensor de dois componentes) e *rpfH* (proteína de membrana putativa) (BARBER *et al.*, 1997; HE e ZHANG, 2008). Todos os quatro genes *rpf* analisados estão envolvidos em um sistema coordenado para a produção de fatores de virulência por comunicação célula-célula mediada por fator extracelular difusível, “*Diffusible Signal Factor*” – DSF, (WARWICK *et al.*, 2007). Neste mecanismo, *rpfB* é responsável por gerar um sinal para *rpfC* e *rpfG* atuando na percepção e transdução do sinal. Foi relatado que uma mutação em *rpfB* suprimiu a produção de DSF (HE e ZHANG, 2008), mas *rpfH* juntamente com *rpfC* (SLATER *et al.*, 2000) e *rpfG* atuaram como reguladores positivos de substâncias poliméricas extracelulares, “*extracellular polymeric substances*” - EPS (síntese de polissacarídeos extracelulares) e DSF (HE e ZHANG, 2008).

A expressão relativa desses genes mostrou uma mudança de *fold change* próximo a 15 para Xcc *in planta*, exceto para *rpfG*, que obteve um *fold change* aumentado de 137, enquanto a mudança *fold change* XVM1 foi 16 e em XVM1* foi 64.

O perfil de expressão desses genes (Figura 11) sugere que a ativação do *rpfG* é desencadeada por fatores ambientais (BARBER *et al.*, 1997), associados ao meio de crescimento XVM1 que mimetiza o ambiente intracelular da planta, XVM1* com extrato vegetal e no próprio hospedeiro, mostrando o papel das moléculas hospedeiras no aumento da expressão desse gene, especialmente na condição *in planta*.

As proteínas Avr são efetores bem conhecidos secretados pelo sistema de secreção tipo III (DA SILVA *et al.*, 2002; IGNATOV *et al.*, 2002; CASTAÑEDA *et al.*, 2005; XU *et al.*, 2008; HO *et al.*, 2013). Neste estudo, avaliamos a expressão relativa de *avrBs2*, *avrXccCFM* e *xopAc*. Estudos sugerem que esses três genes desempenham papéis importantes na patogenicidade/especificidade da raça de Xcc e que o gene *xopAc* poderia estar relacionado à capacidade do Xcc de colonizar o xilema hospedeiro (CASTAÑEDA *et al.*, 2005; VICENTE e HOLUB, 2013).

O perfil de expressão gênica mostrou uma regulação aumentada de *avrBs2* e *xopAc* em todas as condições, mas a expressão em NYG e XVM1 não diferiu estatisticamente do controle. Para *avrBs2*, a expressão em XVM1* e *in planta* não houve diferença estatística, enquanto que para *avrXccFm* e *xopAc* a variação do “*fold change*” na bactéria cultivada *in planta* foi maior que em XVM1*. Estes resultados corroboram com a hipótese de que o gene *xopAc* está ligado à capacidade de Xcc de colonizar o xilema hospedeiro, o que pode explicar a diferença entre a mudança de “*fold change*” desse gene em Xcc cultivada em XVM1* e *in planta*.

Também havia o interesse em avaliar outros genes previamente identificados em estudos proteômicos prévios (SANTOS *et al.*, 2017). Portanto, neste estudo avaliamos alguns genes que codificam proteínas envolvidas no metabolismo de Xcc, aumentados durante a interação Xcc-*B. oleracea*, uma vez que proteínas envolvidas na biossíntese de aminoácidos e metabolismo em geral têm papéis importantes na virulência do patógeno (LIMA *et al.*, 2008). Nós analisamos a interação entre Xcc e *B. oleracea* por cromatografia líquida-espectrometria de massa em tandem e proteínas únicas e aumentadas identificadas potencialmente envolvidas em patogenicidade, incluindo ArgD, CarB, Clp, ClpX, FabH, FabV, IlvC, IroN, PurC e Ssb. Os genes correspondentes foram previamente analisados por qRT-PCR *in planta* e mostraram

uma expressão aumentada quando comparados ao crescimento em NYG (SANTOS *et al.*, 2017).

Entre os genes analisados, destacam-se *argD*, *clp*, *iroN*, *fabV* e *purC*, que não apresentaram diferença estatística na expressão durante o crescimento em XVM1* e *in planta* e apresentaram alta variação de dobra quando comparados aos demais meios de crescimento (Figura 11). Todos esses genes foram relacionados com a virulência de Xcc. Por exemplo, Ramos *et al.* (2014) , revelaram que uma mutação no gene *argD* de *Erwinia amylovora* causou redução da virulência. Da mesma forma, uma mutação no gene *purC* afetou os níveis de expressão de diversas proteínas envolvidas na síntese de purinas e pirimidinas, metabolismo de carbono e energia, absorção de ferro, proteólise, secreção proteica e transdução de sinal (YUAN *et al.*, 2013). A proteína Clp (proteína tipo CRP) é um regulador global conservado que desempenha um papel importante na regulação da produção de fator de virulência (HE *et al.*, 2007; WARWICK *et al.*, 2007) e a proteína *iroN* é um receptor dependente de TonB, uma proteína de membrana que atua na sinalização celular (RYAN *et al.*, 2011).

Interessantemente, os resultados obtidos neste estudo mostraram que os perfis de expressão de todos os genes analisados apresentaram expressão aumentada sob condições *in planta* e, em vários casos, um perfil semelhante foi obtido na presença de extrato vegetal (XVM1*). Por outro lado, o perfil de expressão destes genes na condição XVM1 mostrou um nível de expressão mais baixo (Figura 11). Foi interessante observar que a expressão de *carB* não foi estatisticamente diferente em XVM1 e XVM1*, mas foi maior *in planta*. CarB, uma carbosil-fosfato sintase, atua na biossíntese de arginina (ZHUO *et al.*, 2015), que tem sido considerado como um fator envolvido na virulência de *Xanthomonas* (FICARRA *et al.*, 2015).

Estes resultados revelaram que o extrato vegetal nem sempre pode substituir as condições encontradas na planta. Vários estudos utilizaram meios sintéticos para mimetizar o ambiente apoplástico ou meio contendo moléculas do hospedeiro (extrato vegetal) para avaliar a expressão gênica e abundância de proteínas (MEHTA e ROSATO, 2001; MEHTA e ROSATO, 2003; TAHARA *et al.*, 2003; ASTUA-MONGE *et al.*, 2005; FICARRA *et al.*, 2015; KIM *et al.*, 2016), as condições *in vivo* devem ser priorizadas sempre que possível, uma vez que fornecem a complexidade bioquímica e

especial do ambiente apoplástico, e incluem as mudanças dinâmicas na composição do apoplasto (SOTO-SUÁREZ *et al.*, 2010; TSUGE *et al.*, 2014; CHATNAPARAT *et al.*, 2016; RASHID *et al.*, 2016). Entretanto, os resultados obtidos mostraram que o meio XVM1* (XVM1 suplementado com NaCl 100mM e extrato vegetal) apresentou um perfil de expressão gênica mais próximo ao perfil de expressão obtido *in planta* e, portanto, oferece um melhor modelo *in vitro* para interações bactéria-planta.

Atualmente, existem diversos estudos relacionados à Xcc, mas ainda há inúmeras dúvidas sobre os mecanismos de patogenicidade deste fitopatógeno. O sistema ideal para ser usado em estudos de interação planta-patógeno ainda é *in planta*; no entanto, existem algumas desvantagens, como a necessidade de crescimento de plantas e a pequena quantidade de células bacterianas recuperadas das folhas das plantas. Além disso, em nossos estudos proteômicos anteriores usando o sistema *in planta* (ANDRADE *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2017), várias proteínas vegetais foram identificadas, o que provavelmente interferiu na detecção de proteínas bacterianas, especialmente quando utilizadas técnicas de cromatografia líquida de associadas à espectrometria de massa.

Neste estudo, demonstramos que a expressão gênica de Xcc cultivada em meio XVM1* apresentou maior similaridade com o resultado observado em Xcc cultivada *in planta* do que com os outros meios testados. Os níveis de expressão de vários genes analisados foram semelhantes em XVM1* e *in planta*. Os resultados também mostraram que o meio NYG pode ser usado como condição de controle em estudos pós-genoma, uma vez que os genes de patogenicidade geralmente não são induzidos neste meio ou são induzidos em um nível muito baixo.

Embora o extrato de folhas não represente totalmente o ambiente da planta, a presença de componentes vegetais no meio de cultura parece induzir genes de patogenicidade, mimetizando as condições da planta. Portanto, o uso do extrato de folhas (XVM1*) pode ser uma alternativa interessante para estudos de interação planta-patógeno.

5.2 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA METODOLOGIA HIGGS PARA O SILENCIAMENTO DE GENES EM *X. campestris*.

A ocorrência do silenciamento de genes em *X. campestris* e a eficácia da utilização da metodologia HIGGS para alcançar esse objetivo foi avaliada neste estudo. Plantas capazes de promover o silenciamento do gene *uidA* foram inoculadas com *X. campestris* expressando o gene *uidA*. Após a inoculação, foi avaliada de forma qualitativa a presença ou ausência de coloração resultante do ensaio utilizando o substrato X-gluc, que ao ser degradado pela enzima GUS gera uma coloração azul de acordo com Jefferson *et al.* (1987). Esta estratégia foi considerada prova de conceito.

Na literatura, tabaco é reportado como uma planta resistente à Xcc, gerando assim uma interação incompatível. A planta de tabaco infectada pode apresentar a contenção da bactéria na área infiltrada, podendo ocorrer resposta de hipersensibilidade (HR) (BONAS *et al.*, 1991; MEYER *et al.*, 2001; GROSS *et al.*, 2005). Por outro lado, foi reportado por Vicente *et al.* (2006), a suscetibilidade do tabaco à *X. campestris* pv. *raphani* (Xcr) .

O silenciamento gênico promovido por HIGGS requer uma interação entre o patógeno e hospedeiro que permita a incorporação de nutrientes, em uma interação biotrófica ou hemibiotrófica. Nessas interações, células e tecidos vivos da planta são fontes para a nutrição do patógeno, que mantém o hospedeiro vivo (AGRIOS, 1997; GLAZEBROOK, 2005). Essa característica pode permitir a captação de siRNAs produzidos no hospedeiro.

O modelo Xcc-tabaco é não compatível, entretanto, estudos como os realizados por Meyer *et al.* (2001) e Gross *et al.* (2005), utilizaram esse modelo para avaliar a produção de lipopolissacarídeos do fitopatógeno, e observaram que, logo nas primeiras horas de interação, os lipopolissacarídeos de Xcc induziram uma alta reação oxidativa nas células de tabaco, devido ao aumento lento na produção de H₂O₂. Desta forma, no presente trabalho foram utilizadas Xcc e Xcr e as avaliações foram feitas no início da infecção para garantir a presença de células vivas no tecido vegetal.

5.2.1 Transformação de *Xanthomonas* e avaliação da ocorrência do silenciamento gênico em *Xanthomonas campestris*

As colônias de *X. campestris* (cultivadas em meio de cultura NYG seletivo, contendo gentamicina $10\mu\text{g.mL}^{-1}$) transformadas foram submetidas a PCR convencional. Foram utilizados como *template* colônias de Xcc (Figura 12 A) e Xcr (Figura 12 B). Além disso, foi realizado um ensaio de degradação do substrato X-Gluc para avaliar em Xcc (Figura 12 C) e em Xcr (Figura 12 D) a expressão do gene *uidA*.

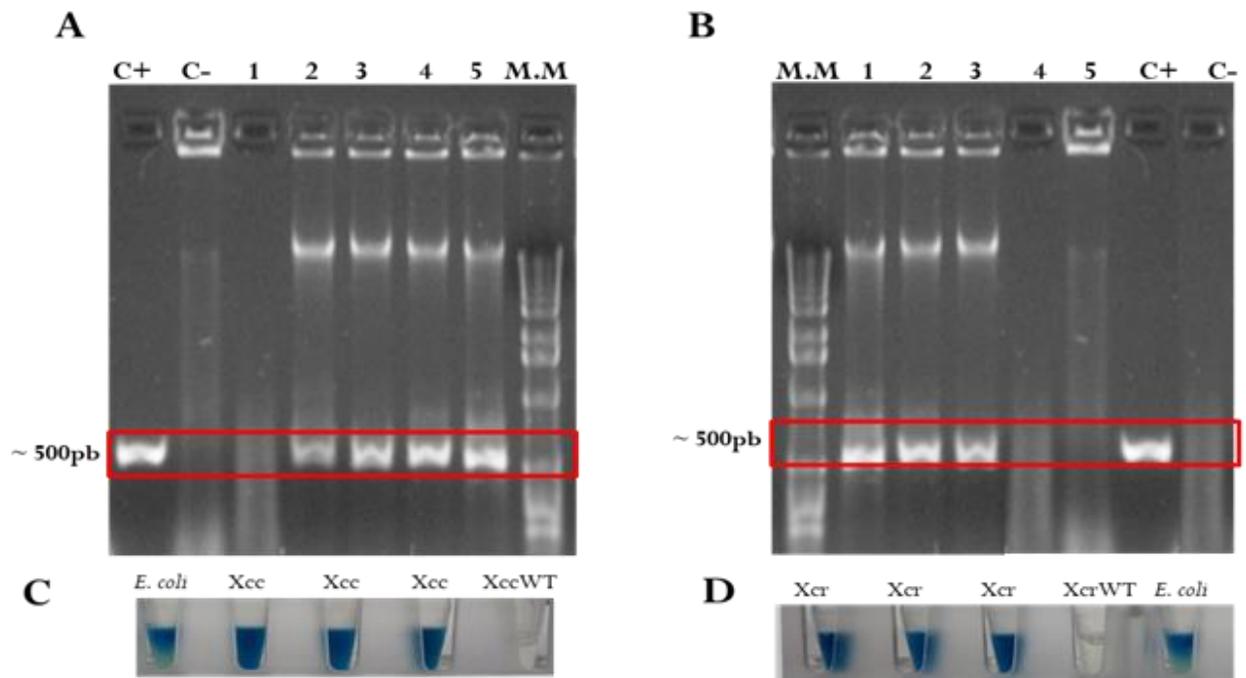


Figura 12. Confirmação da transformação de *Xanthomonas*. C+ - Controle positivo, amplificação do gene *uidA* a partir do vetor pBR5-Tac-Gus purificado (utilizado para transformação), resultando em uma banda de aproximadamente 500 pb. C- Controle negativo, bactéria não transformada “wild type”. M.M - Marcador molecular (1kb ladder – Invitrogen). 1-5 - Bactérias transformadas. **A-** Confirmação da presença do fragmento do gene *uidA* por PCR convencional utilizando como *template* colônias de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) **B-** Confirmação da presença do fragmento do gene *uidA* por PCR convencional utilizando como *template* colônias de *Xanthomonas campestris* pv. *raphani* (Xcr). **C-** Ensaio para avaliação da degradação do substrato X-gluc em Xcc, com o controle positivo (*Escherichia coli*) e controle negativo (XccWT não transformadas “Wild type”). **D-** Ensaio para avaliação da degradação do substrato X-gluc em em Xcr, com o controle positivo (*Escherichia coli*) e controle negativo (XcrWT não transformadas “Wild type”).

A PCR mostrou a presença do gene *uidA* nas bactérias transformadas, como esperado, e o ensaio de degradação do substrato X-gluc confirmou a atividade da enzima Gus nessas bactérias. Foi comprovada a transformação e expressão do gene *uidA* nas bactérias transformadas, bem como a ausência da expressão em *Xanthomonas campestris* não transformada (*wild type*-WT). Após a confirmação da transformação, foi realizado um ensaio para avaliar os sintomas causados por Xcc e Xcr transgênicas, expressando o gene *uidA*, durante 96 h (Figura 13).

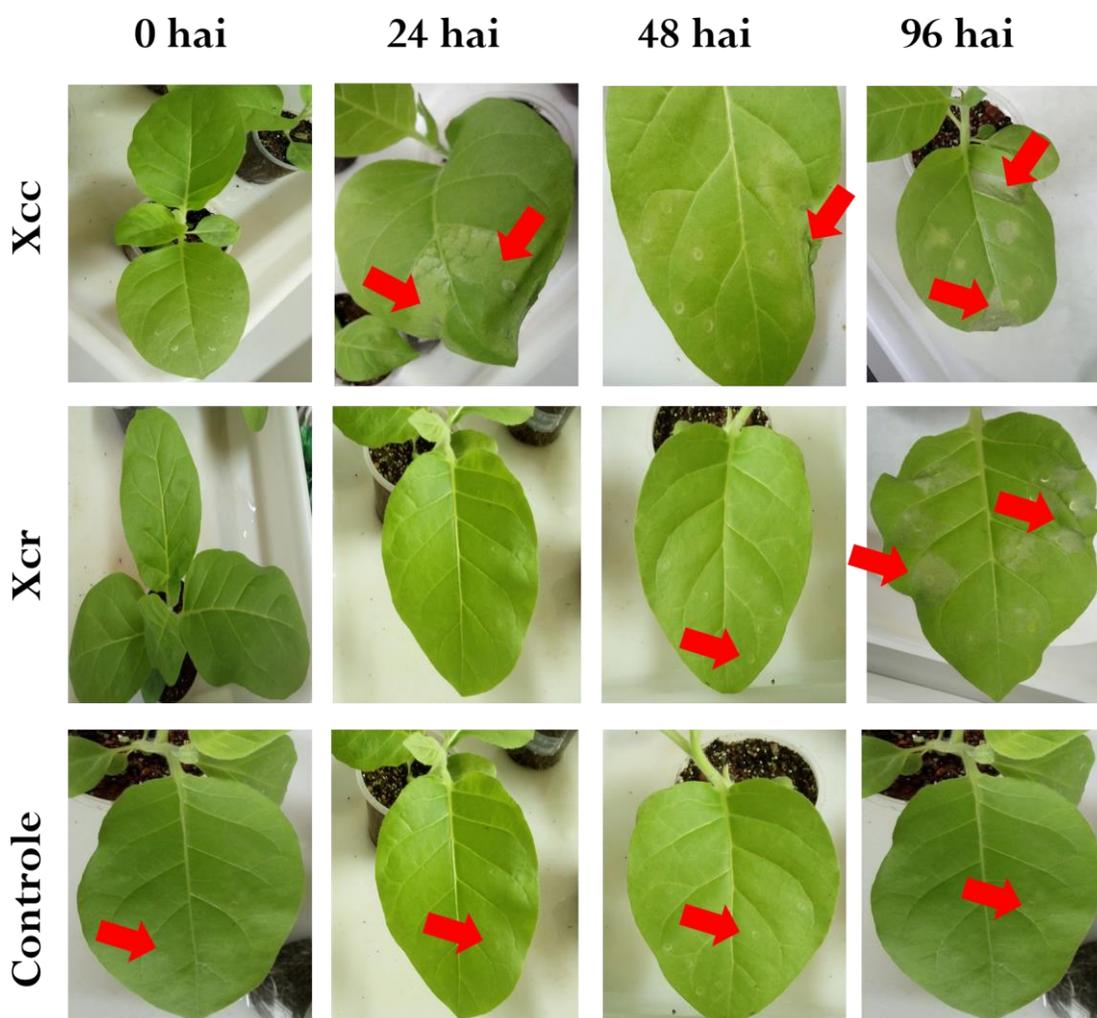


Figura 13. Avaliação de sintomas em *Nicotiana tabacum* cv. *xanthi* transgênica durante interação com o *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) e *Xanthomonas campestris* pv. *raphani*, expressando o gene *uidA* durante 96 h. Setas vermelhas indicam pontos de infiltração e a partir de 24 h indicam áreas com sintomas em Xcc e 96h em Xcr. Controle – plantas inoculadas com solução salina.

A avaliação fenotípica das plantas revelou que a inoculação de Xcc resultou em uma reação de resistência, o que era esperado uma vez que tabaco não é planta hospedeira de Xcc. Por outro lado, a inoculação com Xcr produziu sintomas esperados de mancha foliar durante esse período de avaliação (VICENTE *et al.*, 2006; FARGIER e MANCEAU, 2007). Foram realizados também ensaios de dinâmica de crescimento populacional bacteriano durante 96 h, com a finalidade de avaliar o número de células bacterianas viáveis na planta. Os resultados revelaram uma diminuição de células bacterianas de Xcc após as primeiras 48 h.

Uma vez determinado o crescimento bacteriano na planta, o ensaio para avaliar o silenciamento gênico foi realizado. Discos foliares infectados com ambas as bactérias foram coletados nos tempos 0, 12, 24 e 48 h e os sintomas foram também observados (Figura 14).

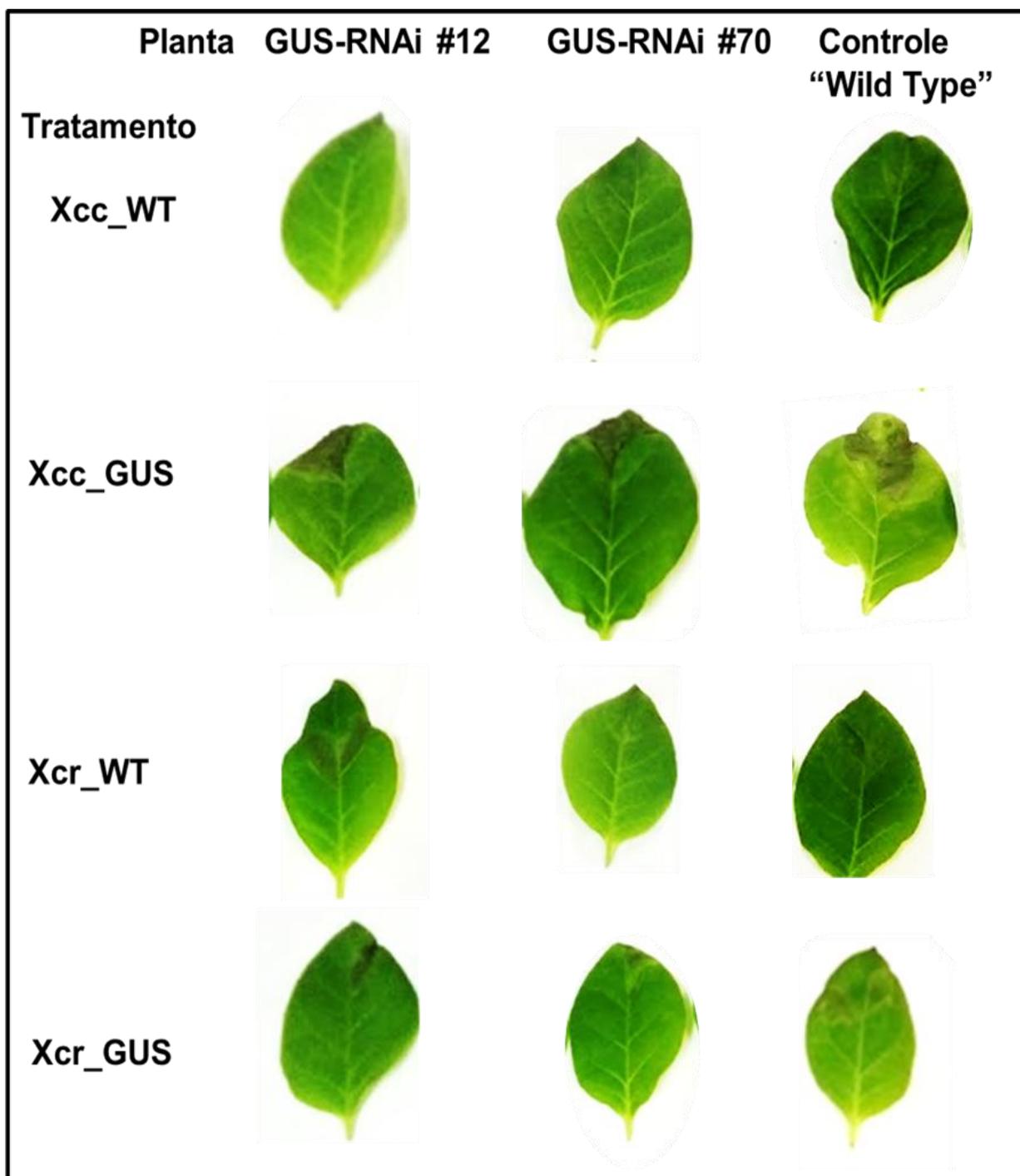


Figura 14. Folhas destacadas de duas linhagens transgênicas de *Nicotiana tabacum* cv. *xanthi* (GUS-RNAi #12 e #70) e planta não transgênica (Controle), após 48 h de interação com *Xanthomonas campestris*. Xcc_WT - *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* não transgênica. Xcc_GUS - *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* transgênica, capaz de expressar o gene *uidA*. Xcr_WT - *Xanthomonas campestris* pv. *raphani* não transgênica. Xcr_GUS - *Xanthomonas campestris* pv. *raphani* transgênica, capaz de expressar o gene *uidA*.

O ensaio mostrou sintomas similares aos observados anteriormente, como esperado. Além disso, foi realizado também, o monitoramento do crescimento populacional das bactérias (Figura15), nas diferentes plantas avaliadas (transgênicas GUS_RNAi#12 e #70 e plantas “wild type”).

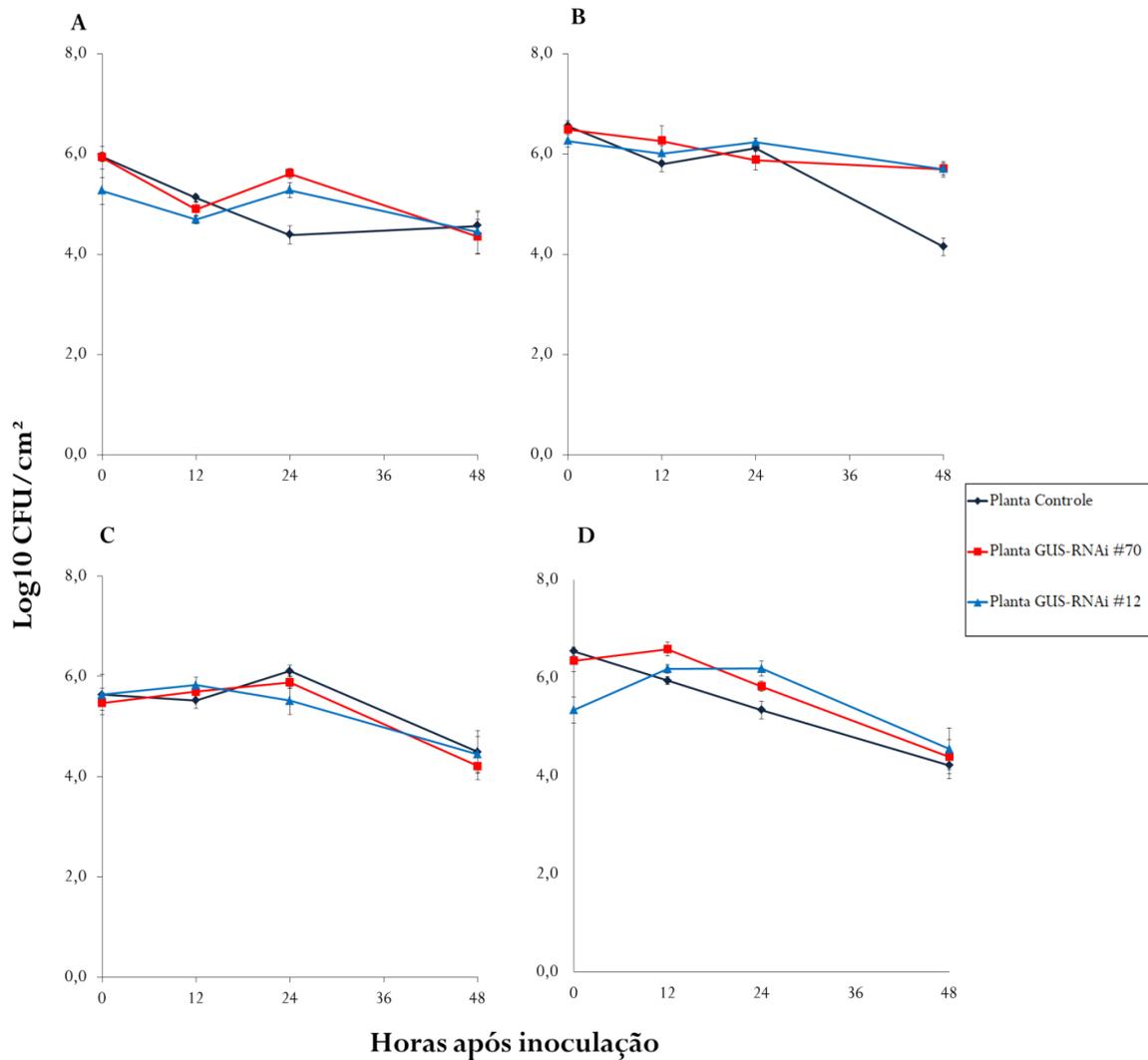


Figura 15. Avaliação da dinâmica de crescimento populacional das células bacterianas em plantas controle (não transgênica) e plantas transgênicas (GUS_RNAi #12 e #70). **A.** *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (não transformada). **B.** *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* transformada (expressando o gene uidA). **C.** *Xanthomonas campestris* pv. *raphani* (não transformada). **D.** *Xanthomonas campestris* pv. *raphani* transformada (expressando o gene uidA)

A dinâmica de crescimento populacional revelou a presença de células viáveis nas primeiras 24 horas após a inoculação. Este resultado pode indicar a ocorrência de interação entre as bactérias e o hospedeiro, mesmo no modelo de interação incompatível. Esta interação pode possibilitar que os RNAs interferentes, produzidos no hospedeiro e possivelmente acumulados em vesículas extracelulares (CAI *et al.*, 2018), possam ser adquiridos pelo patógeno, como ocorre em fungo, possibilitando a ocorrência do silenciamento gênico.

Para avaliar a ocorrência do silenciamento gênico, discos foliares contendo células bacterianas foram submetidos a um ensaio de coloração utilizando o substrato X-gluc (Figura 16 A e B). Os resultados obtidos no ensaio de coloração foram analisados qualitativamente, utilizando o “software” de imagem imageJ versão 1.8.0 (Figura 16 C e D) (SCHNEIDER *et al.*, 2012; MALAMBANE *et al.*, 2018). As análises qualitativas foram associadas aos testes estatísticos. Inicialmente foi realizado o teste Shapiro Wilk (SHAPIRO e WILK, 1965) para avaliar se os dados obtidos apresentavam distribuição “normal”. A escolha de um teste estatístico paramétrico ou não paramétrico (SILVERMAN, 2018), levou em consideração os resultados obtidos no teste Shapiro Wilk.

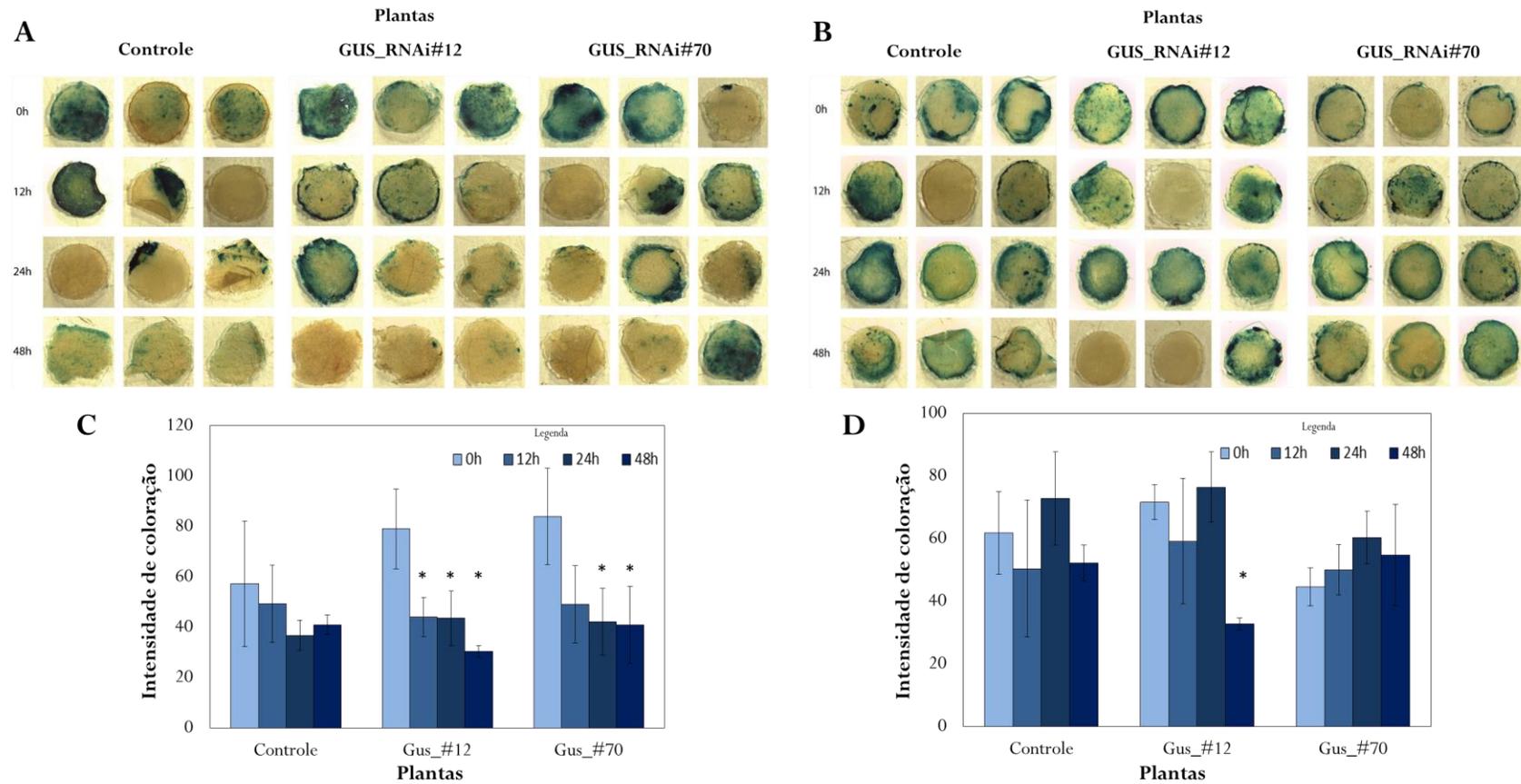


Figura 16. Avaliação de coloração *in planta* **A.** Discos foliares infectados com *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* expressando o gene *uidA* **B.** Discos foliares infectados com *Xanthomonas campestris* pv. *raphani*. Os discos foram submetidos a ensaio colorimétrico para avaliação da expressão de GUS na bactéria. Cada disco foliar representa uma réplica técnica. As plantas foram avaliadas em 0, 12, 24 e 48 hai. **C.** Avaliação quantitativa de coloração em discos foliares infectados com *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* expressando o gene *uidA*. **D.** Avaliação quantitativa de coloração em discos foliares infectados com *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* expressando o gene *uidA*. Avaliação da expressão de GUS *in planta* durante interação com duas linhagens transgênicas de *Nicotiana tabacum* cv. *xanthi*, capaz de produzir moléculas de RNAi que possuem como alvo o gene *uidA*. Cada coluna representa o tempo de coleta após a inoculação da bactéria na planta. (*) Diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tempos comparados ao tempo 0.

O teste Shapiro Wilk revelou que os dados apresentavam uma distribuição normal. O teste paramétrico *t student* (KIM, 2015), foi selecionado para avaliar a significância estatística da diferença observada na coloração dos discos (n=9), ao longo das 48h de observação.

Os resultados obtidos pela análise da coloração dos discos foliares utilizando o “software” imageJ indicaram a diminuição de coloração (comparada ao tempo 0), durante a interação de Xcr com as plantas Gus_RNAi#12, e em Xcc durante interação com as plantas Gus_RNAi#12 e Gus_RNAi#70. Essa diminuição pode estar relacionada à redução da atividade da enzima Gus (codificada pelo gene *uidA* expresso nas bactérias) nos discos foliares das plantas transgênicas infectados com ambas as bactérias.

Bactérias não possuem o sistema RISC, logo o mecanismo de RNAi conhecido em eucariotos não ocorre nesses organismos. Entretanto, existem mecanismos de regulação de expressão gênica em procariotos que podem envolver a degradação de mRNA. Pequenos RNAs estão presentes em todos os organismos, incluindo procarioto, e podem atuar na regulação da transcrição gênica (GOTTESMAN, 2004; HAO *et al.*, 2011). Nesses organismos o pareamento dos pequenos RNAs com mRNAs alvos pode ocasionar a degradação de ambos. Essa degradação pode ocorrer de maneira indireta, resultante do bloqueio do acesso ribossomal e posterior recrutamento de RNases para a degradação do pequeno RNA e do mRNA. De maneira geral, o mRNA degradado nesses processos tem sua transcrição inativada até que ocorra nova sinalização para sua ativação (MASSE *et al.*, 2003; GOTTESMAN, 2004; HAO *et al.*, 2011).

Alguns trabalhos reportam o silenciamento de genes em bactérias, Escobar *et al.* (2001), demonstrou em seu trabalho o silenciamento de genes do T-DNA de *A. tumefaciens* utilizando RNAi produzidos em plantas transgênicas. Genes do patógeno, transferidos para o genoma do hospedeiro para a indução da formação de tumores na planta, foram silenciados pela ação de siRNAs produzidos pelo hospedeiro, no entanto, neste caso o silenciamento ocorreu no próprio hospedeiro, ou seja, não agiu no genoma da bactéria. Na revisão realizada por Nakashima *et al.* (2012), foi destacado o sucesso da utilização de mecanismos de RNAi para silenciar genes em eucariotos,

entretanto foi ressaltado também o desafio em utilizar esse sistema em bactérias. Nesta revisão os autores destacam a possibilidade de silenciar genes em bactérias utilizando duas abordagens, a expressão de RNAs antisense usando vetores de expressão, ou a suplementação de meios de cultura com RNAs antisense sintéticos. Entretanto, esses métodos de silenciamento são limitados a aplicações *in vitro*, sendo essas metodologias utilizadas principalmente na área clínica. (WANG *et al.*, 2010; MCLEOD e SIMMONDS, 2013). Até o momento não há relatos de nenhuma dessas metodologias, aplicadas para o silenciamento de bactérias fitopatogênicas, como *X. campestris*.

Os resultados obtidos neste trabalho são promissores, entretanto, o ensaio de coloração não foi suficiente para sugerir o silenciamento gênico induzido pelo hospedeiro em *Xanthomonas campestris*. Tinoco *et al.* (2010), em seu trabalho expressou em plantas de tabaco um dsRNA para o silenciamento do gene *uidA*, expresso pelo fungo filamentoso *Fusarium verticillioides*, e para avaliar o silenciamento desse gene no fungo, realizou a quantificação da atividade enzimática de Gus, enquanto Huang *et al.* (2006), Andrade *et al.* (2016), e Yin e Hulbert (2018), avaliaram a ocorrência do silenciamento gênico pela quantificação da expressão do gene alvo por qRT-PCR. Desta forma, será necessário a realização de ensaios complementares como quantificação enzimática e/ou qRT-PCR para analisar quantitativamente o silenciamento do gene *uidA* na bactéria.

5.3 DESENVOLVIMENTO DE NANOESTRUTURA PARA O CARREAMENTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS PARA O INTERIOR DE CÉLULAS BACTERIANAS GRAM-NEGATIVAS

Neste trabalho, devido ao desafio em utilizar HIGS em bactérias, ou mesmo outras metodologias de silenciamento gênico que se limita a aplicações *in vitro*, (WANG *et al.*, 2010; MCLEOD e SIMMONDS, 2013), foi proposto o desenvolvimento de nanopartículas específicas para o carreamento e entrega de ácidos nucleicos no interior de células bacterianas Gram-negativas.

5.3.1 Síntese e caracterização de nanopartículas

Após avaliar os tipos de nanopartículas disponíveis, quanto à suas características (CHRISTIAN *et al.*, 2008; RAI e INGLE, 2012; CHENG *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2018), os lipossomos foram selecionados como carreadores de ácidos nucleicos neste estudo. Os lipossomos apresentam características como a capacidade de complexar moléculas carregadas negativamente, carrear e “entregar” ácidos nucleicos nas células, além de proteger os ácidos nucleicos frente a processos degradativos presentes em diversos ambientes (MACLACHLAN, 2007; LONEZ *et al.*, 2008; DARAEI *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2018). Desta forma, as nanopartículas selecionadas foram sintetizadas para a veiculação do vetor pPM7g em células de organismos modelo (*E. coli*). Além disso, foi adicionado à síntese baixas concentrações do polímero polietilenoglicol (PEG), a fim de aumentar a estabilidade e solubilidade à nanopartícula visando aumentar a eficiência na entrega do ácido nucleico no interior da célula bacteriana (EWERT *et al.*, 2010; SAFFARI *et al.*, 2016). A estrutura desenvolvida foi sintetizada de maneira que algumas regiões da parte externa fossem carregadas positivamente, facilitando assim, a ancoragem dessa estrutura à célula alvo (LONEZ *et al.*, 2008; EWERT *et al.*, 2010; RAO, 2010).

Após a síntese dos lipossomos, os mesmos foram submetidos a uma quantificação indireta para avaliar a quantidade de ácido nucleico ainda livre na solução. As amostras foram quantificadas utilizando o espectrofotômetro NanoDrop® (ND-1000 UV-Vis - *Thermo Fisher*, Waltham, MA, EUA). A quantificação indireta mostrou que aproximadamente 25% dos ácidos nucleicos não haviam sido complexados nos lipossomos, e estavam sendo detectados pelo espectrofotômetro. A fim de remover o vetor livre na solução, as amostras foram tratadas com DNase (*Ambion*, USA), ocasionando a degradação dos ácidos nucleicos não encapsulados. Assim como realizado por *Fillion et al.* (2001), para confirmar a degradação do vetor pPM7g livre, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose (Figura 17).

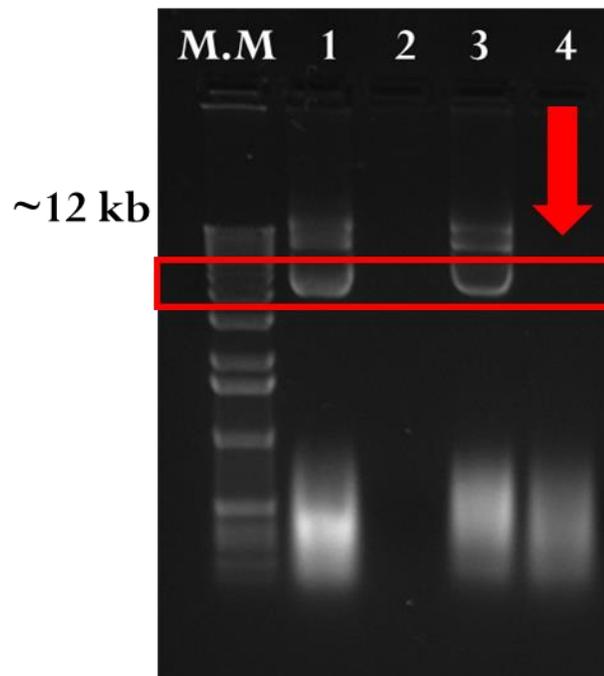


Figura 17. Avaliação das nanoestruturas geradas e aplicadas em gel de agarose 1%. M.M - Marcador molecular (1kb ladder – Invitrogen). 1. Controle: Vetor pPM7g. 2. Lipossomo vazio. 3. Lipossomo + pPM7g. 4. Lipossomo+pPM7g tratado com DNase. Seta vermelha indica a ausência de vetor livre na amostra. Avaliação das nanoestruturas geradas em gel de agarose 1%.

As nanopartículas geradas e tratadas com DNase foram caracterizados por DLS (Apendice C) quanto a seu tamanho hidrodinâmico (Figura 18), potencial zeta e Pdl (Tabela 3).

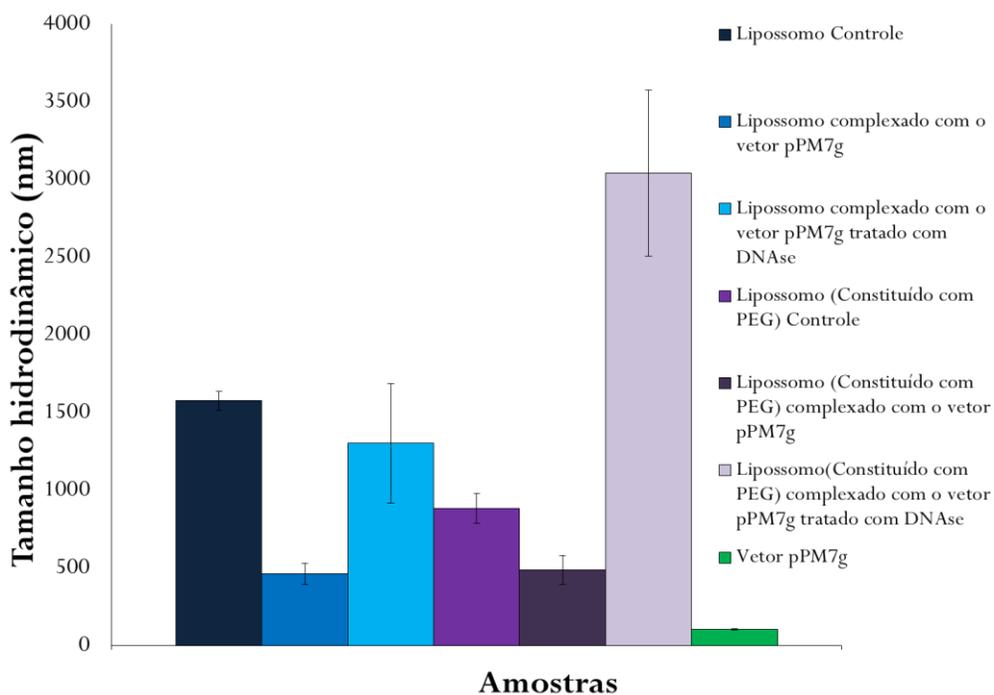


Figura 18. Caracterização dos lipossomos sintetizados quanto ao tamanho hidrodinâmico. Cada barra representa um dos lipossomos sintetizados, cada lipossomo foi analisado em triplicata técnica, as barras mostram o desvio padrão de cada amostra.

Tabela 3. Caracterização das nanopartículas por espalhamento de luz dinâmico

Amostras	Pdl	Potencial Zeta (mV)	Tamanho hidrodinâmico (nm)
Controle	0,882±0,27	-49,1±1,21	1575±63
Lipossomo + pPM7g	0,842±0,12	-62,5±4,73	461±66
Lipossomo + pPM7g tratado com DNase	0,912±0,07	-24,5±1,79	1301±384
Controle sintetizado com PEG	0,942±0,08	-70,1±1,08	882±98
Lipossomo sintetizado com PEG + pPM7g	0,628±0,09	-46,7±1,73	486±92
Lipossomo sintetizado com PEG + pPM7g tratado com DNase	0,899±0,11	-27,9±0,66	3042±534
Vetor pPM7g livre	0,316±0,05	-12,4±3,54	105±5

A caracterização dos lipossomos revelou a variação no tamanho das nanopartículas, resultado esperado, pois não foi utilizada nenhuma técnica como a extrusão (KHINAST *et al.*, 2013) ou sonicação (LAPINSKI *et al.*, 2007) para a padronização do tamanho das nanoestruturas. O Pdl de todas as nanopartículas mostraram-se próximos a 1, indicando que as amostras estavam polidispersas, ou seja, as nanopartículas apresentavam populações de com tamanhos variados, resultado condizente com a avaliação de tamanho.

Todas as nanoestruturas apresentaram um potencial zeta negativo, com um valor médio de -50mV, sugerindo que as nanopartículas geradas eram aniônicas. No trabalho realizado por Ewert *et al.* (2013) e na revisão realizada por Shim *et al.* (2013), foi sugerido que lipossomos catiônicos poderiam ser utilizados para carrear e entregar ácidos nucleicos de maneira eficiente. Além disso, esses estudos mostraram que essas nanopartículas são amplamente utilizados avisando a terapia gênica. Entretanto, Pensado *et al.* (2014), apontou que nanopartículas com potencial zeta próximo a +30 mV, ou seja, catiônicas, estavam associadas a uma maior toxicidade, relacionada à ruptura da parede celular. Trabalhos como o de Fillion *et al.* (2001) e Pensado *et al.* (2014), mostraram a eficácia na utilização de lipossomos aniônicos, para o carregamento e entrega de ácidos nucleicos. Na revisão realizada por Xue *et al.* (2018) os lipossomos aniônicos foram apontados como a melhor escolha para o carregamento e entrega de ácidos nucleicos.

5.3.2 Avaliação do carregamento do vetor pPM7G ao interior da célula bacteriana

Após a síntese e caracterização das nanopartículas, foi realizado um ensaio a fim de avaliar a eficácia na indução do gene *gfp* por xilose, e a entrega dos ácidos nucleicos carregados pelos lipossomos, as bactérias foram cultivadas em meio líquido suplementado com 500 µL de lipossomos contendo o vetor pPM7g. A avaliação foi realizada por microscopia de fluorescência em *E. coli* (Figura 19).

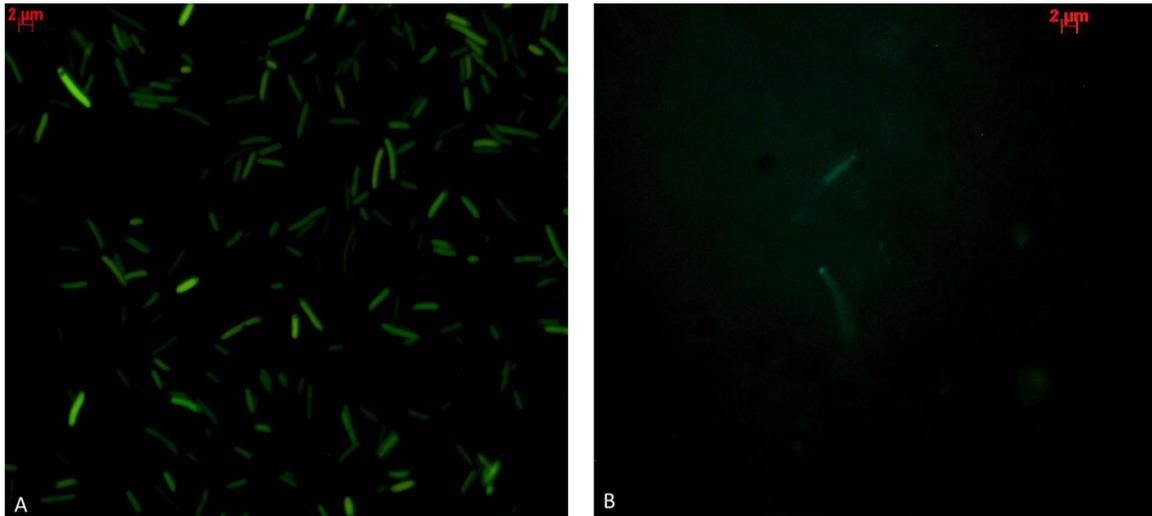


Figura 19. Avaliação da entrega do vetor pPM7g no interior de células bacterianas. Visualização de fluorescência em células de *Escherichia coli* cultivadas em meio Luria Broth (LB) suplementado com xilose 1%. **A.** Controle positivo – *Escherichia coli* transformada por eletroporação com o vetor pPM7g. **B.** *Escherichia coli* cultivada com lipossomos complexados com o vetor pPM7g. Barra vermelha – 2 μM .

Os resultados obtidos pela microscopia de fluorescência revelaram a eficácia na indução por xilose do gene repórter *gfp* nas células transformadas por eletroporação (controle) e nas células “*wild type*” submetidas ao ensaio. Entretanto, foi possível observar a diferença na intensidade de fluorescência, resultante da expressão do gene *gfp*, entre os dois grupos. As células submetidas à avaliação apresentaram fluorescência menos intensa que as células controle. Esse resultado pode ser explicado devido ao fato da amostra utilizada não ter sido sintetizada com adição de PEG, e não ter sido tratada com DNase. Baseado nesse resultado é possível sugerir que as nanopartículas não tenham realizado a entrega do vetor, e as células que apresentaram fluorescência podem ser resultado da entrada de pPM7g livre na solução.

O ensaio foi novamente realizado, entretanto, foram utilizadas nanopartículas complexadas com o vetor pPM7g adicionadas de PEG e tratadas com DNase. Após a realização do ensaio, cinco alíquotas de 100 μL foram cultivadas em meio sólido contendo o antibiótico kanamicina 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, a fim de estimar a eficiência de transformação pela entrada do lipossomo complexado com o vetor pPM7g na célula bacteriana (Figura 20).

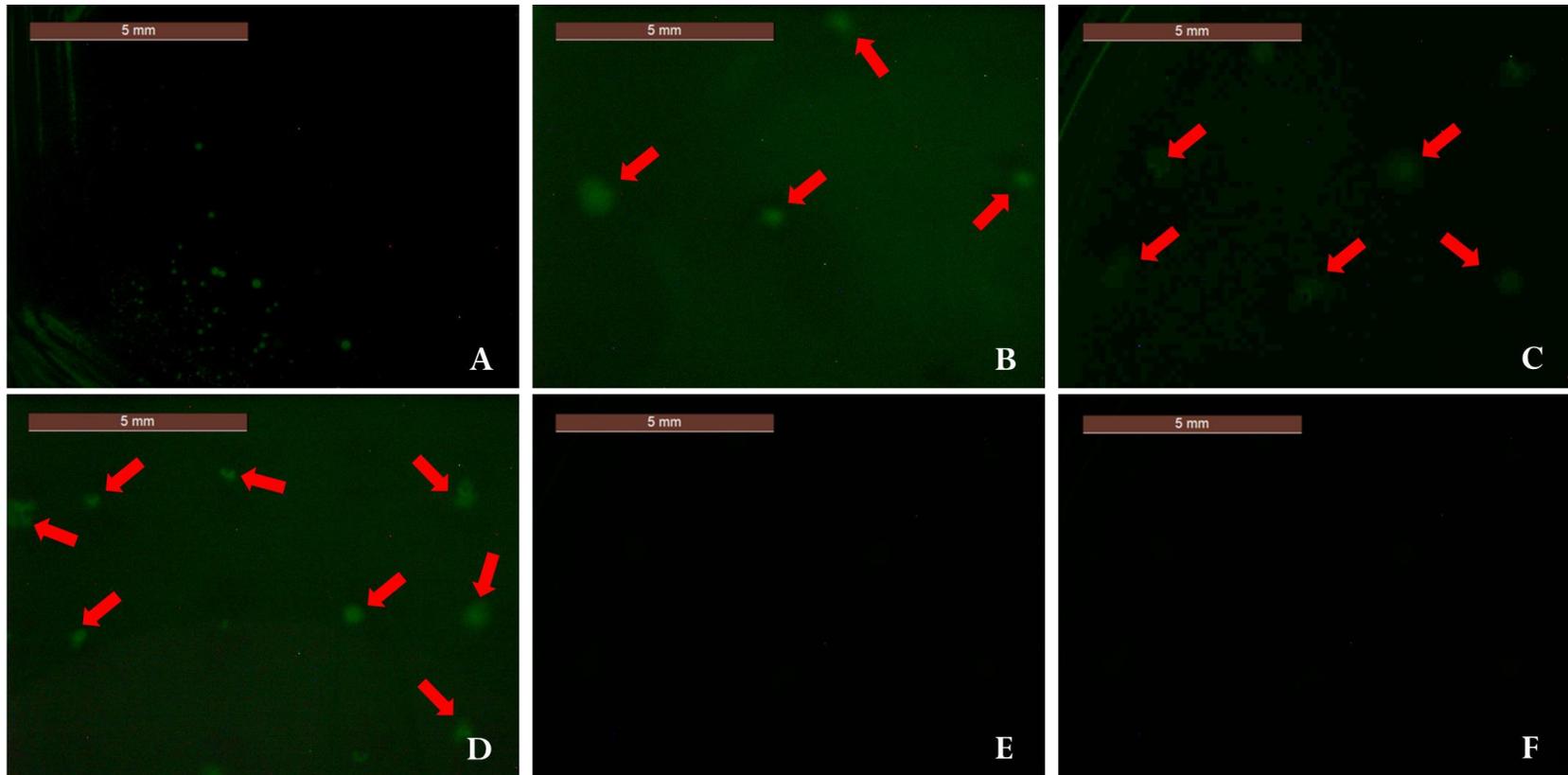


Figura 20. Avaliação da entrada do vetor pPM7g no interior de células bacterianas. Visualização de fluorescência em colônias de *Escherichia coli* cultivadas em meio seletivo, Luria Broth (LB) com kanamicina $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$ suplementado com xilose 1%, após bioensaio. A. Controle positivo – *Escherichia coli* transformada por eletroporação com o vetor pPM7g. B. *Escherichia coli* cultivada com o vetor pPM7g livre. C. *Escherichia coli* cultivada com lipossomo complexado com o vetor pPM7g e tratado com DNase. D. *Escherichia coli* cultivada com lipossomo constituído utilizando polietilenoglicol, complexado com o vetor pPM7g e tratado com DNase. E. Controle negativo *Escherichia coli* cultivada em meio LB sem adição de nanopartículas. F. Controle negativo - *Escherichia coli* cultivada com lipossomo vazio.

Após a avaliação das colônias foi observado que colônias cultivadas concomitantemente com o vetor pPM7g livre, cresceram em meio seletivo além de apresentarem fluorescência após indução com xilose. Estes resultados confirmam que as células bacterianas são capazes de adquirir o DNA livre no meio de cultivo, como descrito na literatura (GRUEGELSIEPE *et al.*, 2006; NAKASHIMA *et al.*, 2012). As colônias provenientes de cultivos suplementados com os lipossomos sintetizados com e sem PEG, complexados com o vetor e tratados com DNase, também apresentaram fluorescência. As colônias foram contabilizadas e então a eficiência de transformação foi estimada, visto que, só foi possível estimar a quantidade de ácido nucleico incorporado ao vetor e não a quantidade de vetor a ser entregue nas células.

As estimativas de eficiência de transformação, revelaram que bactérias cultivadas juntamente com o vetor pPM7g livre apresentaram eficiência de transformação de $1.10^{2.5}$ UFC/mL. As bactérias cultivadas com a suplementação do lipossomo complexado com o vetor (tratado com DNase) apresentaram uma eficiência de transformação de $1.10^{2.9}$ UFC/mL. Bactérias cultivadas com a suplementação do lipossomo sintetizado com adição de PEG, complexado com o vetor (tratado com DNase) apresentaram uma eficiência de transformação de $1.10^{3.6}$ UFC/mL.

A eficiência de entrega de ácidos nucleicos pode ser considerada baixa, quando comparada a eficiência de transformação bacteriana por técnicas como eletroporação ou choque térmico (ASIF *et al.*, 2017; LUO *et al.*, 2018). Entretanto, o desenvolvimento dessas nanopartículas é direcionado para o desenvolvimento de produtos a serem utilizados em campo, ou seja, local onde não é possível transformar células bacterianas de maneiras clássicas.

Os resultados obtidos sugerem a eficácia no carreamento, e entrega de ácidos nucleicos no interior de células bacterianas, utilizando os lipossomos sintetizados. A estimativa da eficiência revelou que o PEG pode desempenhar um importante papel no aumento da eficiência de entrega dessas moléculas, assim como previamente indicado nas revisões de Lakshminarayanan *et al.* (2018), Santos *et al.* (2018) e Xue *et al.* (2018). Esses trabalhos apontaram que o PEG pode proporcionar maior estabilidade e alta solubilidade à nanopartícula além de dificultar a ligação do complexo com estruturas da parede ou membrana celular, podendo facilitar o escape

dos ácidos nucleicos e conseqüentemente melhorando a entrega do ácido nucleico ao interior da célula.

5.4 UTILIZAÇÃO DA METODOLOGIA HIGS PARA O CONTROLE DO MOFO BRANCO ATRAVÉS DO SILENCIAMENTO DE GENES EFETORES ESPECÍFICOS DE *Sclerotinia sclerotiorum*.

5.4.1 Seleção de genes alvo, multiplicação dos vetores e avaliação de transformantes

Para este estudo foram selecionados três efetores para o silenciamento gênico em *S. sclerotiorum*, *SsPG1* gene que codifica uma endopoligalacturonase (ZUPPINI *et al.*, 2005), *SsiTL*, que codifica uma integrina (ZHU *et al.*, 2013) e *Ss-caF1*, que codifica uma proteína putativa de ligação ao Ca⁺ (WANG *et al.*, 2009; XIAO *et al.*, 2014). Os alvos desses efetores no hospedeiro ainda não foram elucidados, exceto para o efector *SsPG1*, que tem como alvo na planta o iPG-1, que atua no processo de sinalização envolvendo o ionóforo de Ca²⁺ na célula vegetal (WANG *et al.*, 2009).

Após a seleção desses genes, vetores foram sintetizados, de acordo com a estratégia utilizada por Andrade *et al.* (2016), como a seleção de uma região de até 400 pb do gene alvo disposta no sentido senso e antisense, flanqueada por uma sequência intrônica. Ao ser transcrita, essa sequência gera um dsRNA, que ao ser processada pelo sistema Dicer da planta gera RNAs de interferência.

As transformações bacterianas de *E. coli*, para multiplicação dos vetores construídos e *A. tumefaciens*, para a transformação de *A. thaliana* por floral dip, foram confirmadas pelo crescimento bacteriano em meio seletivo e por PCR (Figura 21).

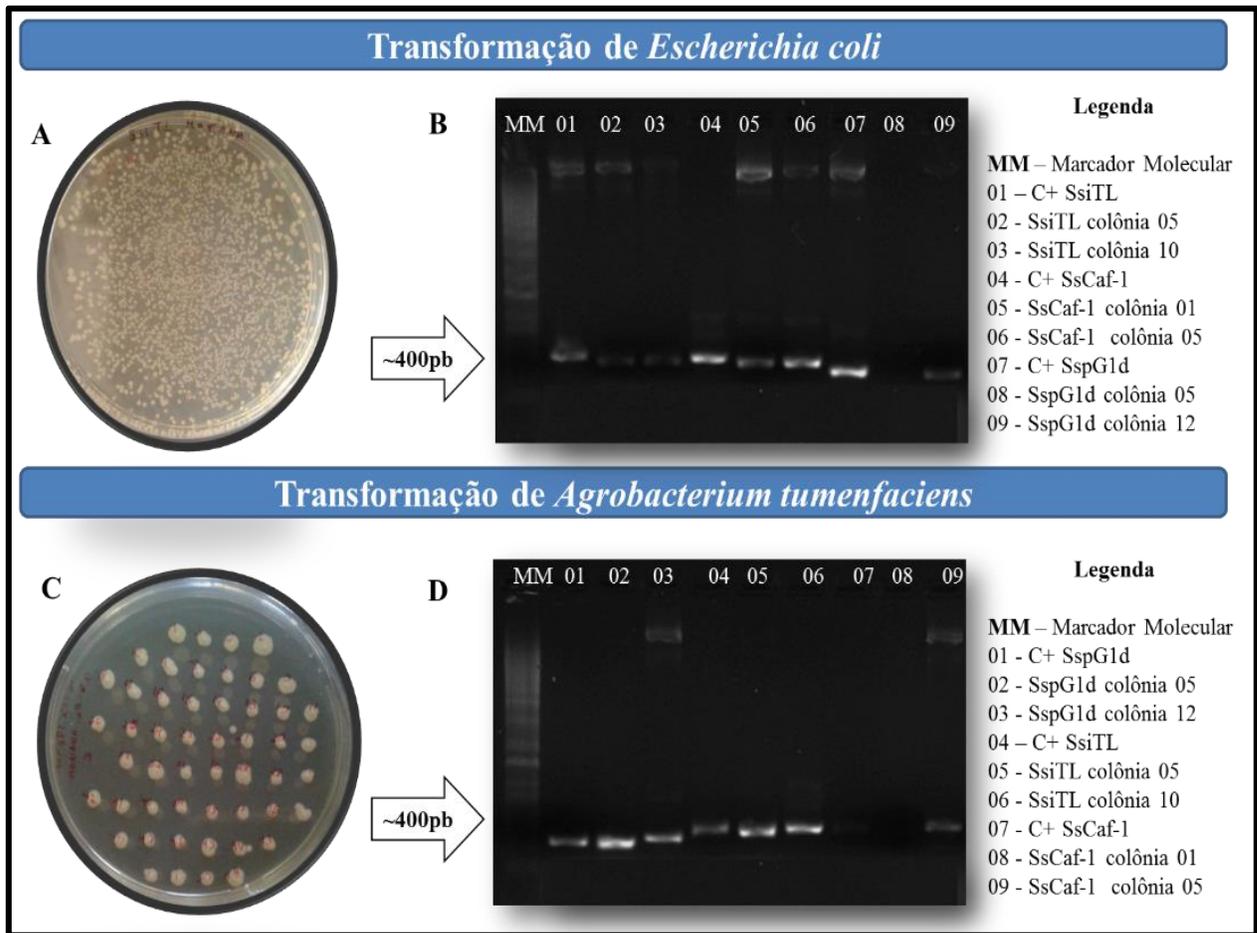


Figura 21. Confirmação da transformação com vetores específicos em *Escherichia coli* e *Agrobacterium tumefaciens*. **A.** *Escherichia coli* transformada cultivada em meio seletivo. **B.** PCR de plasmídeos isolados de *Escherichia coli* utilizando primers específicos para cada vetor. **C.** *Agrobacterium tumefaciens* transformada cultivada em meio seletivo. **D.** PCR de plasmídeos isolados de *Agrobacterium tumefaciens* utilizando primers específicos para cada vetor.

Os fragmentos amplificados obtidos por PCR convencional, e revelados por eletroforese em gel de agarose corresponderam ao tamanho esperado, em torno de 314 pb para *SsPG1* e 400 pb para *SsiTL* e *Ss-caF1*. Após a confirmação por PCR, foi realizado o sequenciamento dos produtos amplificados a partir de plasmídeos extraídos de *E. coli* e *A. tumefaciens* transformadas (Figura 22).

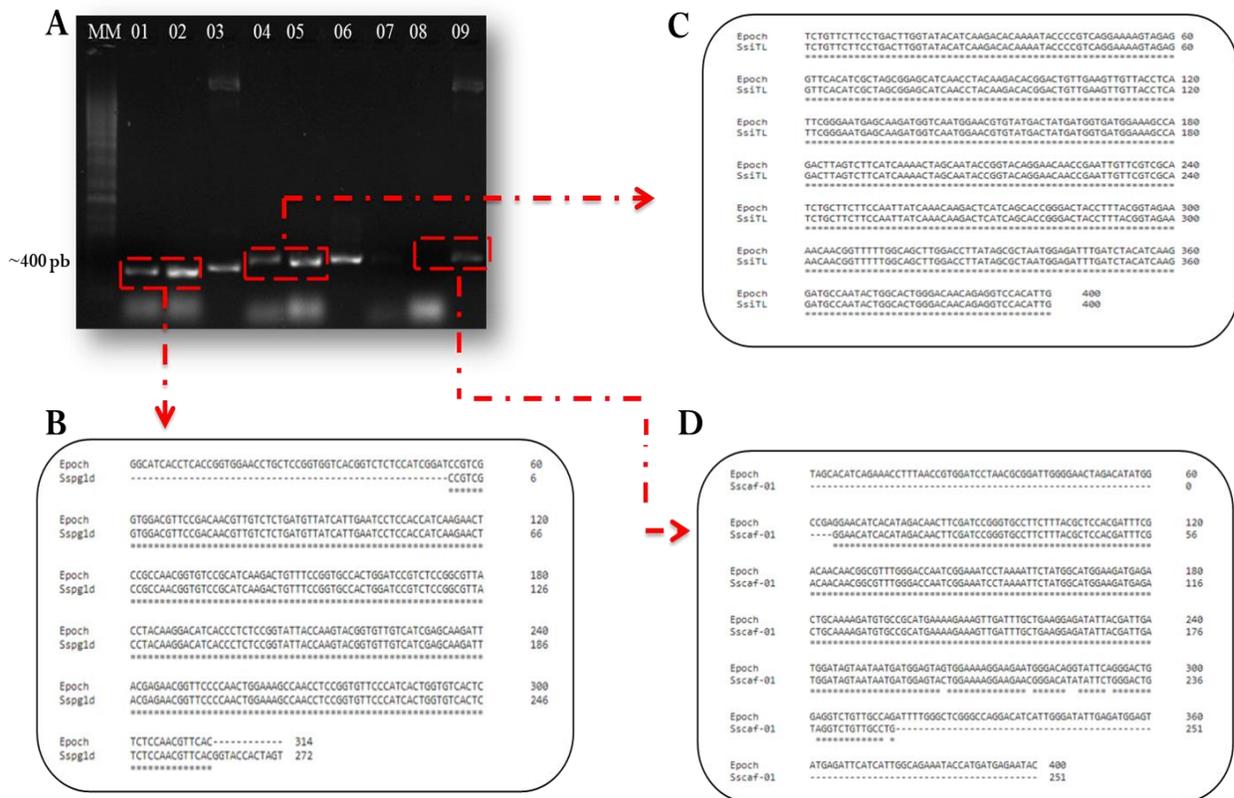


Figura 22. Análise da transformação de *Agrobacterium tumefaciens* por sequenciamento gênico. **A.** Eletroforese em gel de agarose. MM – Marcador molecular. **1 e 2** - Produto de PCR obtido utilizando primers para o gene *SspG1*. **3**- Controle positivo do gene *SspG1*. **4 e 5** - Produto de PCR obtido utilizando primers para o gene *SsiTL*. **6**- Controle positivo do gene *SsiTL*. **7**- Controle positivo do gene *Ss-caF1*. **8 e 9** - Produto de PCR obtido utilizando primers para o gene *Ss-caF1*. **B.** Alinhamento das sequencias enviadas para a síntese do vetor com as sequencias obtidas no sequenciamento dos produtos de PCR de colônias positivas após transformação com o gene *SspG1*. **C.** Alinhamento das sequencias enviadas para a síntese do vetor com as sequencias obtidas no sequenciamento dos produtos de PCR de colônias positivas após transformação com o gene *SsiTL*. **D.** Alinhamento das sequencias enviadas para a síntese do vetor com as sequencias obtidas no sequenciamento dos produtos de PCR de colônias positivas após transformação com o gene *Ss-caF1*. Identidade das sequencias >95%.

Os fragmentos amplificados a partir de colônias de *A. tumefaciens* transformadas foram analisados por sequenciamento. As sequencias obtidas por amplificação de PCR foram comparadas com as sequencias enviadas para a empresa Epoch para a síntese dos vetores (Apêndice B). O sequenciamento resultou em um fragmento de 400 pb para o gene *SsiTL*, 251 pb para o gene *Ss-caF1* e 272 pb para o gene *SspG1* apresentando uma cobertura de 100%, 63% e 87% respectivamente. O alinhamento entre as sequencias (enviadas para a Epoch e as sequencias obtidas a partir da amplificação por PCR de colônias positivas) revelou uma identidade de 100%

para o gene *SsiTL*, 98% para o gene *Ss-caF1* e 96% para o gene *SspG1*. Após o alinhamento das sequencias, foi utilizada a ferramenta blast – “*basic local alignment search tool*” (Ferramenta de busca por alinhamento local) disponível em <<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Foi utilizado o blastn, que busca sequencias nucleotídicas (DÉVELOPPEUR, 1990; JOHNSON *et al.*, 2008), para avaliar a similaridade das sequencias obtidas com os genes *SsiTL*, *Ss-caF1* e *SspG1*. A busca apresentou, como esperado, a identidade de 100% para *SspG1* e *SsiTL* e 97,99% para *Ss-caF1*, com cobertura de 100% para *SspG1* e *SsiTL* e 99% para *Ss-caF1*.

5.4.2 Transformação de planta modelo via *Agrobacterium tumefaciens*

Após a confirmação da transformação de *A. tumefaciens*, plantas de *Arabidopsis thaliana* foram transformadas utilizando a técnica de imersão dos botões florais - “*floral dip*” (Figura 23).

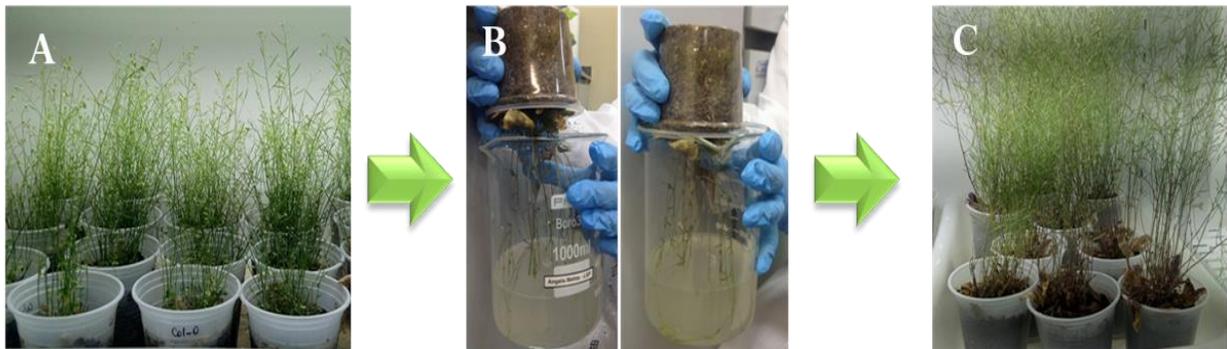


Figura 23. Etapas da transformação de *Arabidopsis thaliana* via *Agrobacterium tumefaciens* por imersão dos botões florais, “*floral dip*”. **A.** Cultivo de *Arabidopsis thaliana* até a formação de buques florais. **B.** Imersão dos botões florais em meio contendo *Agrobacterium tumefaciens* transformadas com os genes selecionados. **C.** Maturação das sementes.

Após a imersão dos botões florais, as plantas foram acondicionadas em ambiente controlado, com temperatura de 21°C e com fotoperíodo de 12h até a maturação e coleta das sementes T0. As sementes T0 foram germinadas em substrato

(Substrato Carolina) e mantidas sob condições adequadas, gerando a planta T1, selecionadas pela resistência ao herbicida glufosinato de amônio 20 mg.L^{-1} , durante 15 dias. As plantas positivas foram individualizadas e denominadas “linhagens” (Figura 24).

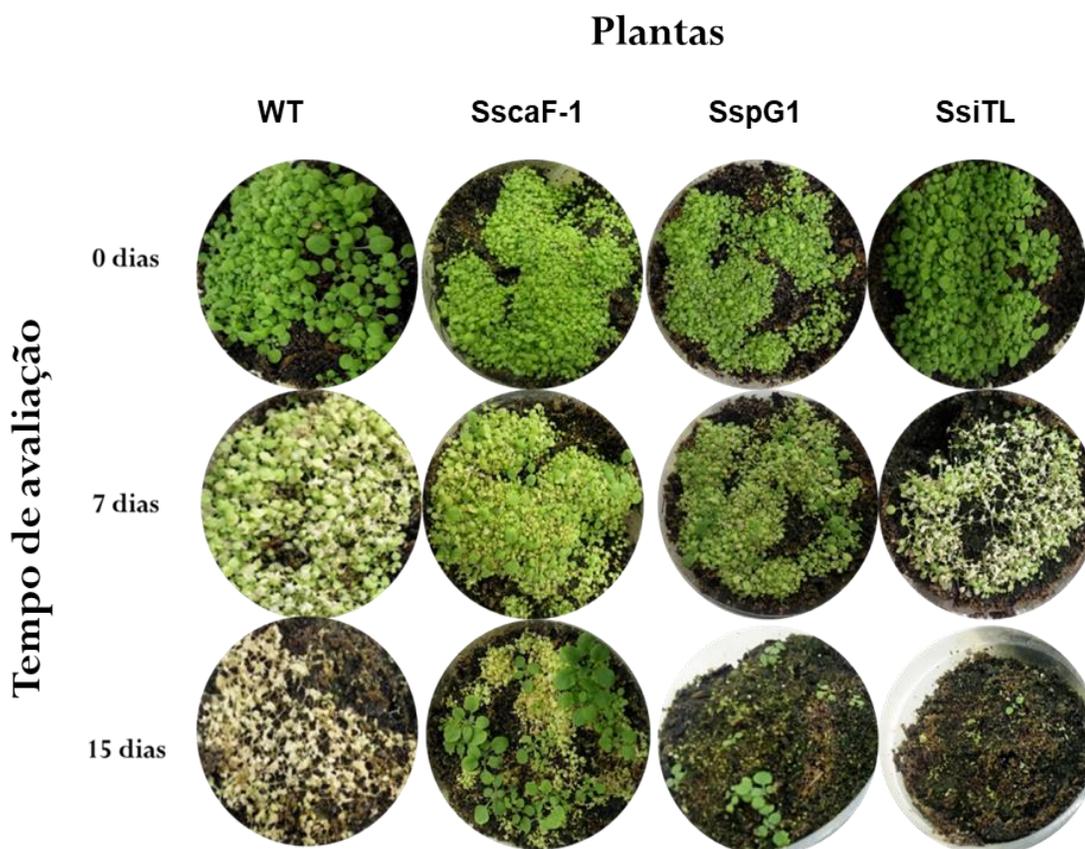


Figura 24. Seleção da primeira geração de plantas transgênicas (T1) utilizando herbicida glufosinato de amônio. WT. Plantas Columbia-0 não transformada, controle. *Ss-caF1*. Plantas Columbia-0 transformadas com o *íntron hairpin Ss-caF1*. *SspG1*. Plantas Columbia-0 transformadas com o *íntron hairpin SspG1*. *SsiTL* - Plantas Columbia-0 transformadas com o *íntron hairpin SsiTL*.

As linhagens geradas foram mantidas como descrito anteriormente, até a geração de sementes. O processo de seleção foi novamente realizado até a obtenção da terceira geração (T3). Três linhagens de plantas transgênicas de cada construção na segunda geração (T2) foram submetidas à avaliação de segregação utilizando 54 réplicas técnicas de cada linhagem (Figura 25).

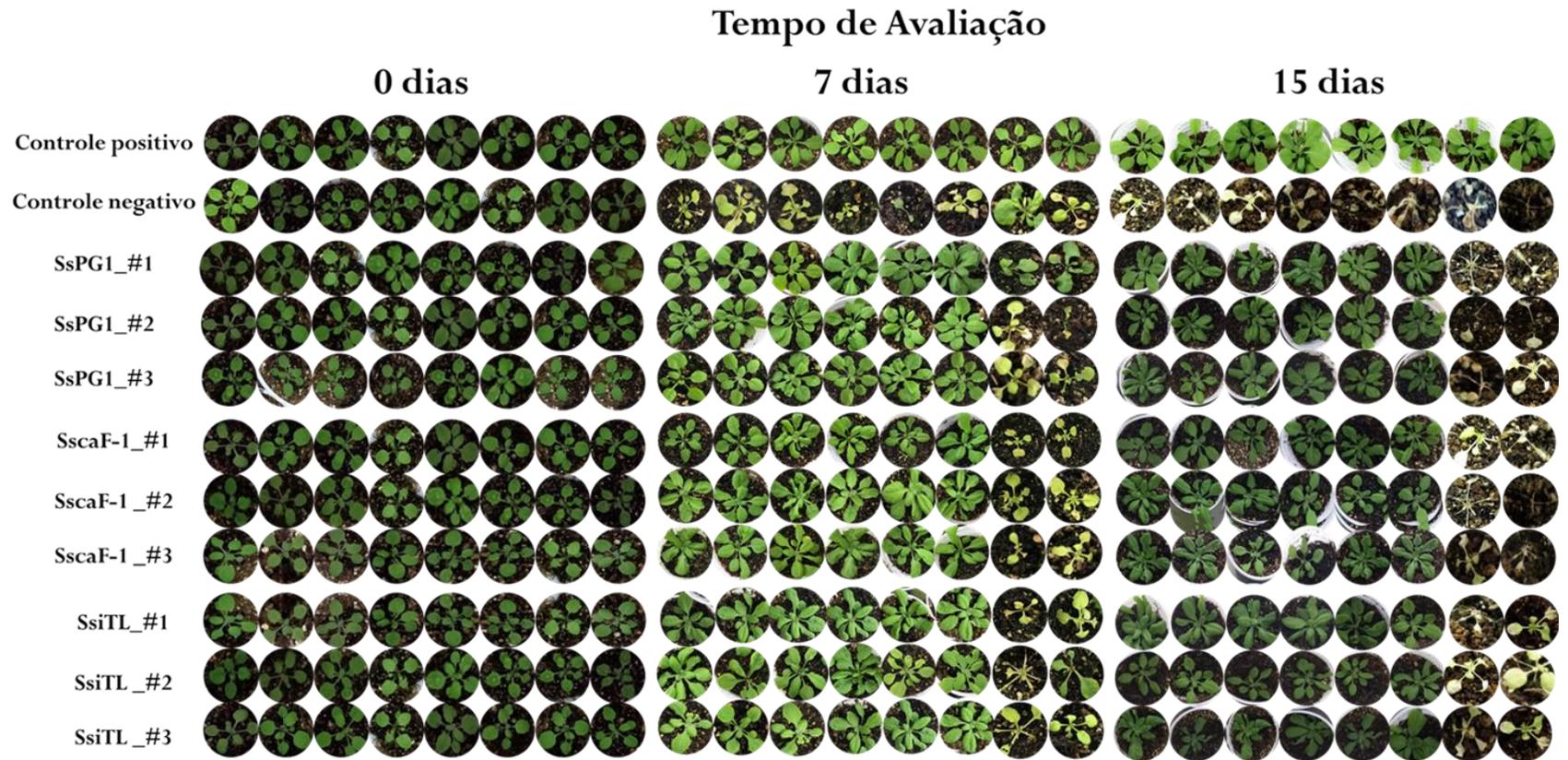


Figura 25. Análise da progênie. Seleção da segunda geração de plantas transgênicas (T2) utilizando herbicida glufosinato de amônio. Controle positivo - Plantas Columbia-0 não transformadas e não submetidas à seleção utilizando herbicida. Controle negativo - Plantas Columbia-0 não transformadas submetidas à seleção utilizando herbicida. *SspG1*. Plantas Columbia-0 transformadas com o *íntron hairpin SspG1*. *Ss-caF1*. Plantas Columbia-0 transformadas com o *íntron hairpin Ss-caF1*. *SsiTL* - Plantas Columbia-0 transformadas com o *íntron hairpin SsiTL*. #1 – Linhagem 1. #2 – Linhagem 2 e #3 – Linhagem 3.

As linhagens avaliadas não apresentaram um padrão de homozigose, normalmente atingido a partir da terceira geração (CLOUGH e BENT, 1998). Para avaliar o padrão de segregação das plantas, foi realizado o teste de χ^2 , com 95% de confiança, conforme Andrade *et al.* (2016). Os resultados obtidos revelaram que as plantas de *A. thaliana* apresentavam um padrão de segregação mendeliano na razão 3:1. Em cada quatro plantas avaliadas, uma não estava transformada (não resistindo à seleção), duas possivelmente eram heterozigotas para o gene avaliado, podendo ter apenas uma cópia do gene em um par de alelos e uma planta possivelmente era homozigota, podendo ter duas cópias do gene em par de alelos. Estes resultados permitiram sugerir que as construções *Íntron-hairpin* encontravam-se sob o controle de apenas um loco (HARUTA *et al.*, 2010; ANDRADE *et al.*, 2016).

5.4.3 Bioensaio

As plantas T2 positivas, que sobreviveram à seleção realizada durante a avaliação da progênie, foram desafiadas com o fungo necrotrófico *S. sclerotiorum* por um período de 7 dias, e os sintomas do mofo branco foram avaliados. Neste ensaio, considerando o padrão de segregação 3:1 era esperado que a cada 3 plantas, ao menos 1 apresentasse resistência ao fitopatógeno, com uma razão de 2:1 para a presença: ausência de sintomas. Entretanto, todas as plantas avaliadas apresentaram sintomas do mofo branco.

Para avaliar melhor o resultado obtido no bioensaio, foi estabelecida uma escala de notas para os sintomas observados (Tabela 3), a escala foi desenvolvida baseada nos trabalhos de Knecht *et al.* (2010) , que avaliou os sintomas em plantas transgênicas de *A. thaliana* desafiadas contra o fungo *Rhizoctonia solani* , e de Chang *et al.* (2018) , que avaliou os sintomas do mofo branco em *Pisum sativum* L.

Tabela 4. Escala de notas para os sintomas do mofo branco em *Arabidopsis thaliana*.

Notas para os sintomas	Descrição dos sintomas
0	Ausência de sintomas
1	Mancha encharcada no local do inóculo
2	Mancha encharcada em até 3 folhas
3	Mancha encharcada em 3 a 5 folhas
4	Mancha encharcada em mais de 5 folhas
5	Micélio no local do inóculo
6	Micélio em até 3 folhas
7	Micélio em 3 a 5 folhas
8	Micélio em mais de 5 folhas
9	Mancha encharcada + micélio no local do inóculo
10	Mancha encharcada + micélio em até 3 folhas
11	Mancha encharcada + micélio em 3 a 5 folhas
12	Mancha encharcada + micélio em mais de 5 folhas
13	Mancha encharcada+ micélio+ necrose no local do inóculo
14	Mancha encharcada+ micélio+ necrose em até 3 folhas
15	Mancha encharcada+ micélio+ necrose em 3 a 5 folhas
16	Mancha encharcada+ micélio+ necrose em mais de 5 folhas
17	Morte de folhas no local do inóculo
18	Morte de folhas de até 3 folhas
19	Morte de folhas de 3 a 5 folhas
20	Morte da planta

As plantas foram avaliadas e notas foram atribuídas aos sintomas (Figura 26). As notas foram utilizadas para avaliar a resistência ou suscetibilidade das plantas transgênicas. A escala de notas dos sintomas desenvolvidos foram associadas com a fórmula desenvolvida por Grau *et al.* (1982). Esta fórmula pode ser utilizada para o cálculo de um score para um grupo de plantas, de acordo com as notas dos sintomas de cada indivíduo avaliado, medindo assim, a severidade dos sintomas que pode variar de 0 a 100. Os valores próximos a 0 podem ser indicativos de grupos resistentes e os valores próximos à 100 podem ser indicativos de grupos suscetíveis.

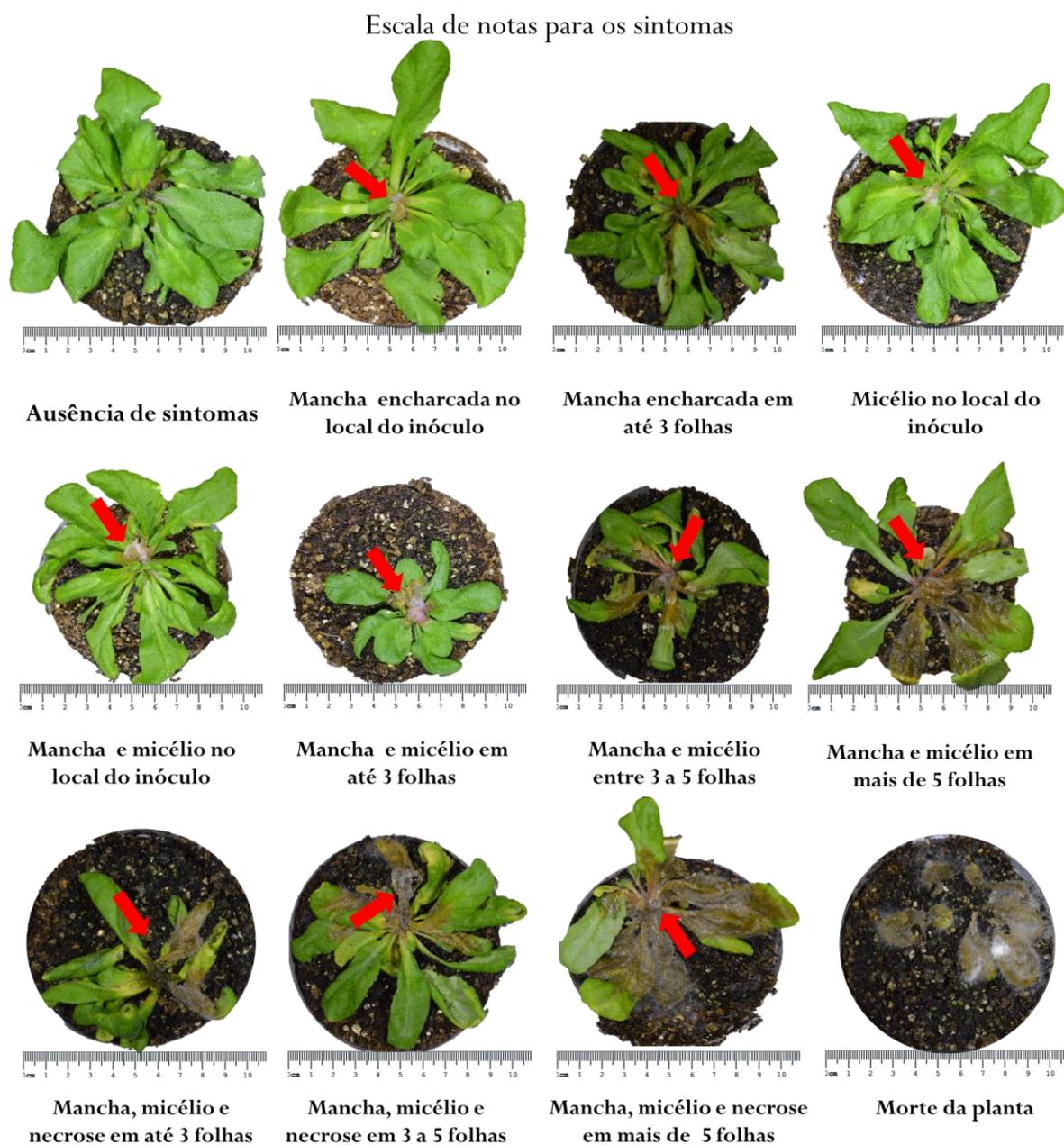


Figura 26. Caracterização dos sintomas do mofo branco em *Arabidopsis thaliana* de acordo com a escala de notas estabelecida. Plantas desafiadas com *Sclerotinia sclerotiorum*. Setas vermelhas indicam áreas com sintomas.

Ao final dos 7 dias de ensaio, todas as plantas apresentaram sintomas do mofo branco, entretanto a severidade da doença manteve-se menor nas linhagens transgênicas com relação à plantas não transformadas – “*wild type*” (Figura 27).

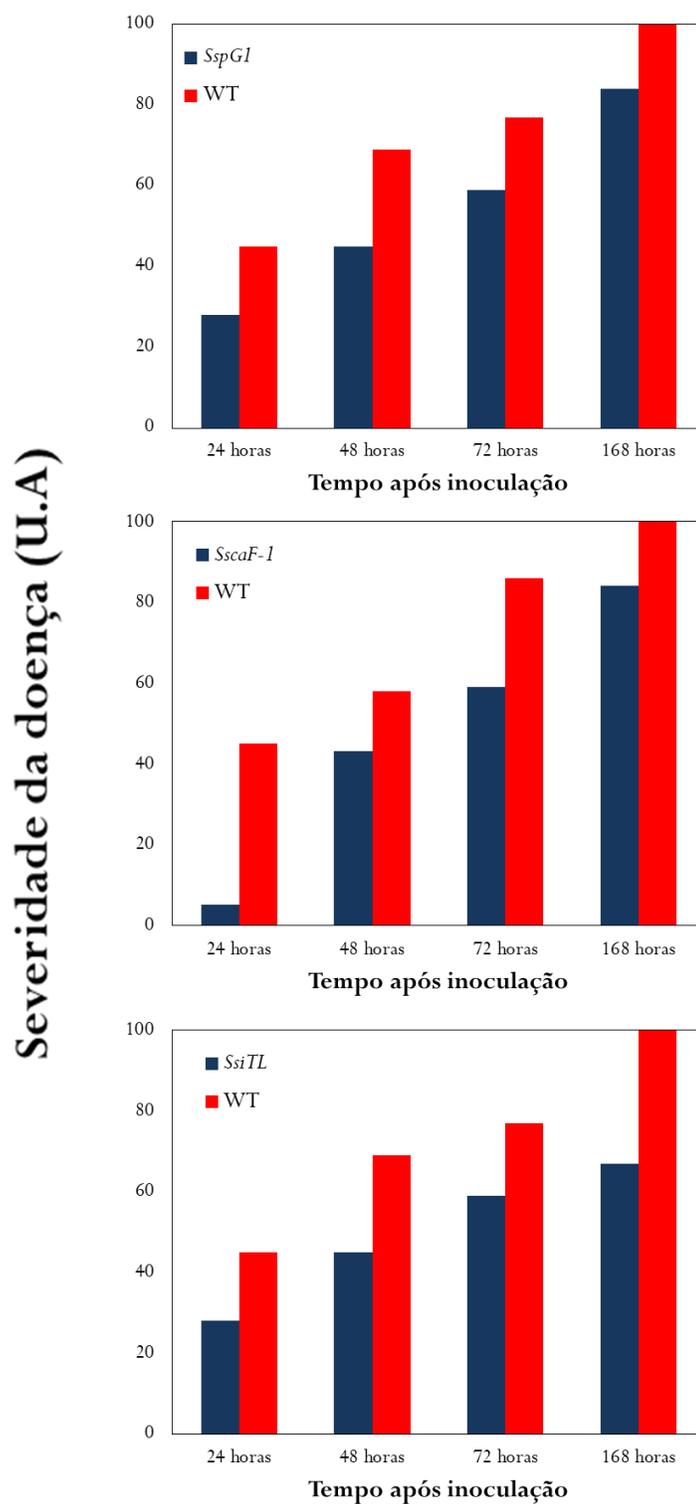


Figura 27. Avaliação da severidade do mofo branco em linhagens de *Arabidopsis thaliana* transgênicas e não transgênicas (WT). A - Avaliação das linhagens que expressam o *ítron-hairpin* *SspG1* e seus controles (WT). B - Avaliação das linhagens que expressam o *ítron-hairpin* *SsiTL* e seus controles. C - Avaliação das linhagens que expressam o *ítron-hairpin* *Ss-caF1* e seus controles. As plantas foram avaliadas durante sete dias após inoculação do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*.

A partir dos resultados obtidos, após o cálculo de score utilizando a fórmula de Grau *et al.* (1982), não foi possível definir nenhuma das linhagens como resistentes. Entretanto, foi possível observar uma redução na severidade dos sintomas nas plantas transgênicas, quando comparadas relativamente a seus respectivos controles (Figura 28). A severidade dos controles foi considerada como 100%, ou seja, o máximo de severidade naquele tempo.

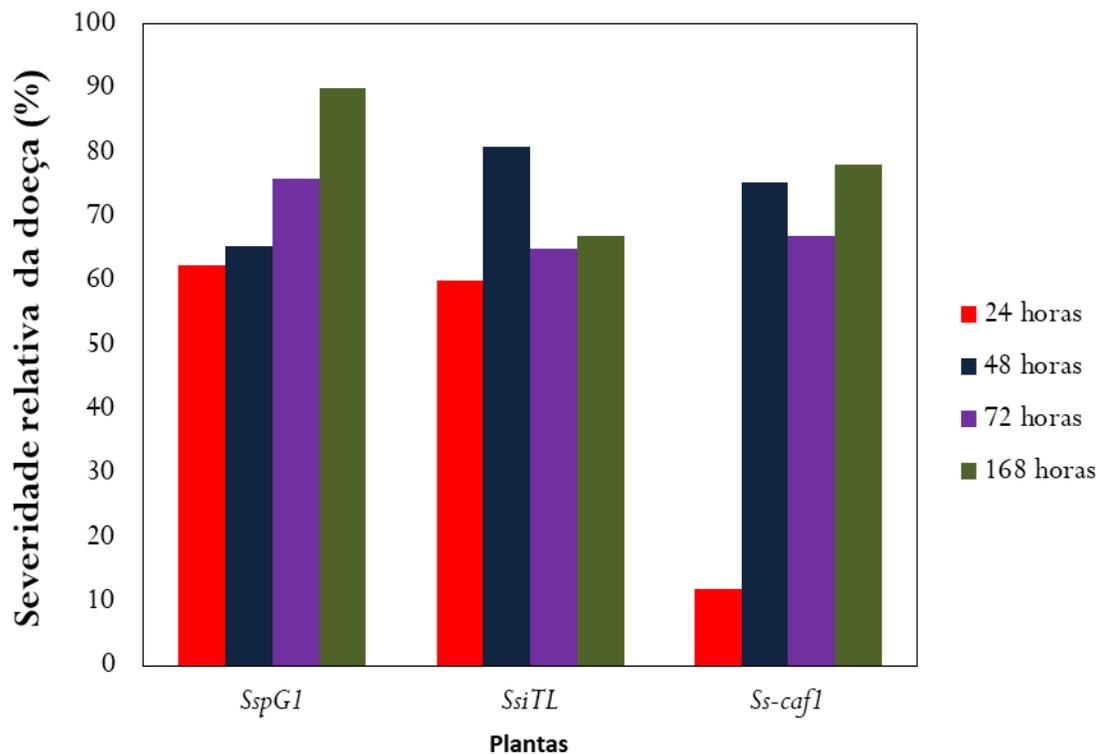


Figura 28. Severidade relativa da doença em comparação ao controle. As barras indicam o tempo após inoculação de *Sclerotinia sclerotiorum*. A severidade dos sintomas nos controles foi considerada como 100%.

Plantas expressando o *íntron-hairpin SspG1* apresentaram um aumento gradual na severidade dos sintomas, apresentando 62% de severidade em 24 hai e 90% em 7 dias, quando comparado ao controle. Este gene codifica uma endopoligalacturanase (PGs), que compõem um grupo de enzimas pectinolíticas, que atuam na degradação da parede celular do hospedeiro, sendo crucial na colonização do

tecido vegetal e determinante na patogenicidade e virulência de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Li *et al.* (2004) , determinou que a expressão do gene *SsPG1* pode ser induzida por estímulos abióticos, bioquímicos e nutricionais. Zuppini *et al.* (2005), relatou em seu trabalho, que esse gene pode estar relacionado à indução da morte celular programada do hospedeiro, facilitando assim a penetração do patógeno pela cutícula foliar, e a expansão da lesão no tecido do hospedeiro. Além disso, foi observado o aumento de Ca^{2+} intracelular no hospedeiro, sugerindo a hipótese da ocorrência de sinalização mediada por estes íons, induzida pela enzima secretada pelo patógeno.

Esta hipótese foi confirmada pelo trabalho de Wang *et al.* (2009), onde foi detectado, a partir de uma biblioteca de cDNA de canola (*B. napus*) utilizando ensaios “*yest two-hybrid*” e *SspG1* como “isca”, uma proteína com domínio C2, denominada IPG-1. Essa proteína foi apontada como sendo o “alvo” de *SsPG1* no hospedeiro. Além disso, os autores postularam que a interação PG/ IPG-1 pode interferir na ligação de IPG-1 com Ca^{2+} e conseqüentemente, com transdução de sinal dependente deste íon, que pode ser relacionada à indução de processos de morte celular programada no hospedeiro.

A maior diminuição de severidade dos sintomas de *S. sclerotiorum*, em plantas capazes de silenciar o gene *SspG1* ocorreu entre 24 e 48 h de inoculação do fungo, com 38% e 35% menos intensidade que seu controle. Interessantemente, o trabalho realizado por Seifbarghi *et al.* (2017), que avaliou a expressão de genes envolvidos nos estágios iniciais da interação de *S. sclerotiorum* com *B. napus*, entre 1 h até 48 h, revelou que em 48 h após a inoculação ocorre um aumento na expressão desse gene. Os resultados de Seifbarghi *et al.* (2017), associados aos resultados obtidos no bioensaio com o fungo, permitem sugerir a ocorrência do silenciamento desse gene entre 24 h e 48 h após o início da infecção, momento em que houve a menor severidade relativa dos sintomas quando comparado ao controle. Esse silenciamento pode ter ocorrido parcialmente, pois, apenas 17% das plantas avaliadas, mantiveram-se vivas após 7 dias de infecção, apresentando sintomas menos severos que as plantas controles.

Plantas transgênicas capazes de silenciar o gene *SsiTL* também apresentaram menor severidade dos sintomas quando comparada a seu controle. Em 24 hai apresentava 40% de sintomas, 72 hai 35% e em 7 dias após inoculação, apresentava 33%. Entretanto a severidade de sintomas foi maior em 48 hai quando as plantas apresentaram 81% de severidade dos sintomas. Interessantemente, apesar dessa maior severidade em 48 hai, as plantas mantiveram a severidade do sintoma próximo a 60% (Figura 28), ou seja, a severidade dos sintomas em plantas controles continuou aumentando, enquanto que nas plantas transgênicas mantiveram-se estáveis. Ao final dos 7 dias de avaliação 45% das plantas transgênicas estavam vivas, enquanto 85% das plantas não transgênicas, já estavam mortas.

O gene *SsiTL*, codifica uma integrina, e pode ser relacionado com a supressão das vias de sinalização do ácido jasmônico e do etileno, e conseqüentemente pode ocasionar o aumento da suscetibilidade do hospedeiro. Em um estudo realizado por Zhu *et al.* (2013) utilizando *A. thaliana* foi observado que nas primeiras 12 h de infecção ocorreu uma alta expressão do gene *SsiTL*. Além disso, ao silenciar esse gene o hospedeiro passou a desenvolver resistência ao fungo. Foi observado também um aumento na expressão de genes de defesa no hospedeiro nas primeiras horas de interação com *S. sclerotiorum* mutante. Esses mutantes apresentaram também um crescimento anômalo de suas hifas e desenvolvimento e germinação dos escleródios comprometidos. Os resultados permitem sugerir que as plantas transgênicas apresentam tolerância parcial ao patógeno, visto o silenciamento parcial do gene *SsiTL*, que pode estar envolvido na suscetibilidade dos hospedeiros *S. sclerotiorum*.

As plantas transgênicas capazes de silenciar o gene *Ss-caF1* apresentaram em 24 hai uma redução na severidade da doença de 88%. Entretanto a severidade dos sintomas aumentou após esse período, atingindo 75% em 48 hai e 78% em 7 dias. O gene *Ss-caF1* codifica uma proteína que pode funcionar como um fator de patogenicidade de *S. sclerotiorum*. Xiao *et al.* (2014) reportaram que esse gene desempenha papel fundamental na formação de apressórios e desenvolvimento dos escleródios. Ainda no trabalho de Xiao *et al.* (2014), *S. sclerotiorum* mutante (que não expressava *Ss-caF1*), apresentou maior sensibilidade ao estresse salino e osmótico,

desenvolvimento anormal dos escleródios, melanização e tamanho reduzidos, além da incapacidade de germinação. Além disso, esse mutante não foi capaz de produzir apressórios, e conseqüentemente foi incapaz de induzir lesões em folhas saudáveis (sem injúrias) de *B. napus*. Entretanto em folhas que apresentavam injúrias, ocorreu o estabelecimento e desenvolvimento da doença.

Interessantemente, as plantas de *A. thaliana* capazes de silenciar esse gene apresentaram uma baixa severidade dos sintomas nas primeiras 24 h de infecção, 12%. Entretanto, houve o desenvolvimento da doença após esse período. Esse fenômeno pode ser explicado pela existência de injúrias pré-existentes nas plantas, que possibilitaram a entrada do patógeno sem a necessidade dos apressórios. Ao final dos 7 dias de avaliação, 45% das plantas estavam vivas, enquanto todas as plantas controle estavam mortas.

Diversos trabalhos relataram o silenciamento de genes em fungos utilizando HIGS (YIN *et al.*, 2011; PANWAR *et al.*, 2013; GHAG *et al.*, 2014; GOVINDARAJULU *et al.*, 2015; ANDRADE *et al.*, 2016; YIN e HULBERT, 2018). Entretanto, em sua maioria referem-se a fungos biotróficos, que estabelecem longos períodos de interação com o hospedeiro principalmente para nutrição a partir de produtos celulares, sem causar sua morte (DELAYE *et al.*, 2013). Essa característica possibilita a transferência de moléculas de RNAi produzidas e armazenadas pelos hospedeiros (CAI *et al.*, 2018) para o patógeno.

Andrade *et al.* (2016) demonstrou o silenciamento parcial do gene quitinase sintase em *S. sclerotiorum*. Entretanto, a interação de *S. sclerotiorum* com o hospedeiro é mais agressiva, contando com a secreção de diversas enzimas e toxinas para a degradação da parede celular do hospedeiro, e devido a essas características foi considerado necrotrófico por vários anos (BOLTON *et al.*, 2006). Entretanto, estudos mais recentes passaram a designar *S. sclerotiorum* como um fitopatógeno hemibiotrófico, devido a evidências de que no início da infecção há uma fase curta biotrófica, anterior ao reconhecimento da planta, podendo durar apenas algumas horas (KABBAGE *et al.*, 2015). Essa característica permite a transferência de siRNAs do hospedeiro ao patógeno nas horas iniciais da infecção.

Os resultados obtidos neste estudo permitiram sugerir a ocorrência do silenciamento parcial dos genes alvo no patógeno, possivelmente no início da interação, em sua fase biotrófica. O silenciamento gênico promoveu uma redução na severidade da doença. Além disso, foi possível observar o retardamento do aparecimento dos sintomas nas plantas capazes de silenciar o gene *Ss-caF1* e a sobrevivência de 45% das plantas avaliadas.

6 DISCUSSÃO GERAL

A produção de alimentos e a segurança alimentar são essenciais para garantir a disponibilidade de alimento para a população (FAO, 2010). Mudanças nos fatores ambientais, incluindo alterações climáticas, da biodiversidade e da disponibilidade de água, podem afetar a produção e disponibilidade de alimentos (PAZ *et al.*, 2000; GHINI, 2005). Além disso, essas mudanças podem alterar os padrões de multiplicação, disseminação, sobrevivência e atividade de fitopatógenos, podendo impactar a produção e a segurança alimentar de maneira negativa (TILMAN *et al.*, 2002; SMITH *et al.*, 2010; LIDDER e SONNINO, 2011; BOYD *et al.*, 2013; HINRICHS, 2013).

Diversos estudos avaliam os prejuízos ocasionados por fitopatógenos, por exemplo, Strange e Scott (2005) apontaram que doenças causadas por esses organismos poderiam ocasionar na perda anual de 10% da produção mundial de alimentos. Rossman (2008) evidenciou que nos Estados Unidos, fungos e outros fitopatógenos podem acarretar um prejuízo anual de aproximadamente 21 bilhões de dólares. Entretanto, Savary *et al.* (2012), ressaltou em seu trabalho que fitopatógenos causam perdas de colheitas de forma direta e indireta. Assim, cálculos de um valor referente ao prejuízo causado, geralmente não refletem o prejuízo real para o consumidor e para o produtor, para o meio ambiente e para a saúde pública.

Fitopatógenos como a bactéria Gram negativa *X. campestris* e o fungo necrotrófico *S. sclerotiorum* causam inúmeros prejuízos à diversas culturas. Ambos os patógenos causam doenças em brássicas, que incluem culturas de grande importância econômica, principalmente para a alimentação (RAKOW, 2004; WARWICK, 2011; ŠAMEC e SALOPEK-SONDI, 2019). *X. campestris* é referida por Mansfield *et al.* (2012) e Buttner *et al.* (2017), como uma das bactérias fitopatogênicas mais importantes, devido ao seu impacto na produção de alimentos. *S. sclerotiorum* é capaz de causar doença em mais de 600 espécies de hospedeiros, incluindo todas as brássicas (BOLAND e HALL, 1994; LANE *et al.*, 2018; TAYLOR *et al.*, 2018). Ambos os

microrganismos interferem na produção mundial de brássicas, podendo causar as doenças conhecidas como podridão negra e mofo branco, respectivamente.

O controle de ambos os fitopatógenos ocorre de maneira similar, utilizando principalmente práticas de manejo integrado associado à utilização de insumos químicos. São utilizados comumente para o controle de *X. campestris* compostos cúpricos, como o sulfato de cobre, oxiclreto de cobre, hidróxido de cobre, óxido cuproso e compostos carbonatos (MAZID e KHAN, 2015). Para o controle do mofo branco, são comumente utilizados químicos de amplo espectro como o Fluazinam®, procimidona® e o tiofanato-metil® (MUELLER *et al.*, 2002; BRADLEY *et al.*, 2006; LEHNER *et al.*, 2015).

Diversos estudos foram desenvolvidos para minimizar a utilização de compostos químicos para o controle de fitopatógenos. Nuñez *et al.* (2018), propôs a utilização bioprodutos, como produtos a base de leite para o controle da podridão negra em couve, produzida de maneira orgânica. Na revisão realizada por Marin *et al.* (2019), os autores chamam a atenção para os avanços realizados na busca por microrganismos capazes de promover um biocontrole de *Xanthomonas spp.* Sabaté *et al.* (2018) e Hu *et al.* (2019), relataram a avaliação na utilização de *Bacillus spp* como antagonico ao desenvolvimento de *S. sclerotiorum*, mostrando uma eficiência de inibição do patógeno de aproximadamente 40%, quando o *Bacillus spp* foi inoculado juntamente com a semente do hospedeiro. Sumida *et al.* (2018), relataram em seu trabalho o potencial de *Trichoderma asperelloides*, na inibição do crescimento micelial e germinação carpogênica, além de promover a diminuição de ascósporo por apotécio. Entretanto, segundo Özkara *et al.* (2016), mesmo com avanços nas áreas de bioprodutos e biocontrole, quando ocorre o estabelecimento da doença são utilizados compostos químicos, que podem acarretar o aumento do custo de produção além de oferecerem o risco de causar danos ao meio ambiente.

Neste contexto, uma maior compreensão de mecanismos envolvidos as interações planta-patógeno podem fornecer alvos moleculares para o controle de fitopatógenos, que podem funcionar como alternativas para diminuir a utilização de produtos químicos no controle desses organismos. No trabalho realizado por Ghag (2017), a metodologia de HIGS (silenciamento gênico induzido pelo patógeno) foi

descrita como uma tecnologia inovadora a partir da utilização de RNAi. Além disso, foi apontado também o potencial da utilização de HIGS para o controle de patógenos de plantas. Desta forma, este trabalho propôs a utilização da metodologia HIGS para o controle da podridão negra e do mofo branco.

O controle de bactérias fitopatogênicas utilizando métodos que envolvem silenciamento gênico é desafiador. Bactérias não possuem o sistema RISC, logo não apresentam o mecanismo de RNAi (NAKASHIMA *et al.*, 2012). Entretanto, a regulação de expressão gênica em bactérias pode envolver pequenos RNAs (sRNAs) (THOMASON e STORZ, 2010). Na revisão realizada por Waters e Storz (2009), foi destacado que essas moléculas podem modular a transcrição, a tradução e até interferir na estabilidade do mRNA, sendo capaz de atuar também na manutenção do DNA ou ocasionar o silenciamento de genes. Os autores apontaram que diversos mecanismos podem estar envolvidos na modulação desses processos, como por exemplo, a mudança na conformação do RNA, a ligação proteica e o pareamento de RNAs.

Segundo Waters e Storz (2009), a atuação dos pequenos RNAs pode ocorrer *in trans*, nesse caso, essas moléculas podem parear com o mRNA alvo, originando um complexo sRNAs-mRNA alvo, um complexo dupla fita. Essa interação podem ocasionar, de maneira frequente, a diminuição de níveis de proteínas através da inibição traducional, degradação do mRNA ou ambos. No trabalho realizado por esses autores foi indicado ainda que os pequenos RNAs de bactérias, geralmente se ligam a região 5' UTR do mRNA alvo, podendo ocasionar a obstrução do local de ligação ao ribossomo, acarretando de maneira indireta a degradação do complexo formado. Essa degradação pode ocorrer por meio da ação de enzimas como a RNaseE. De acordo com Morita *et al.* (2005), a inibição da ligação ribossomal contribui de maneira majoritária para a diminuição dos níveis de proteína, enquanto a degradação subsequente do complexo sRNA-mRNA pode aumentar de maneira significativa a repressão do gene, podendo tornar essa repressão irreversível.

Assim, mesmo sendo um desafio, é possível promover o silenciamento gênico em bactéria. Entretanto é necessário desenvolver metodologias eficientes para que ácidos nucleicos, como pequenos RNA sintéticos ou não, possam ser

transportados até a célula bacteriana alvo. Desta maneira, neste trabalho foi avaliado a possibilidade de siRNAs produzidos pela planta, hospedeiro, silenciar genes expressos pelo fitopatógeno, Xcc. Plantas de *A. thaliana* capazes de silenciar o gene uidA foram inoculadas com *X. campestris* expressando o gene uidA. Os resultados obtidos a partir das avaliações realizadas, não possibilitaram a determinação da ocorrência de silenciamento gênico nas bactérias avaliadas. Entretanto, a ocorrência deste fenômeno, utilizando HIGS, não deve ser sumariamente descartada. É necessária a realização de novos ensaios, a fim de avaliar de forma quantitativa a ocorrência da diminuição da expressão do gene alvo. Além disso, existem evidências obtidas em outros estudos, que demonstram a ocorrência do silenciamento de genes bacterianos, por meio de RNAs, expressos ou não por vetores (GRUEGELSIEPE *et al.*, 2006; NAKASHIMA e TAMURA, 2009; NA *et al.*, 2013; NAKASHIMA e MIYAZAKI, 2014). Por exemplo, no trabalho desenvolvido por Na *et al.* (2013), sRNAs sintéticos foram utilizados para modular negativamente genes que atuavam em vias específicas e conseqüentemente aumentar a produção de cadaverina. Esses autores desenvolveram vetores específicos para a expressão dos sRNAs. Além disso, esse trabalho revelou a eficiência da utilização de sRNAs sintéticos para a supressão da expressão de genes específicos.

A partir dos dados obtidos e dos trabalhos presentes na literatura, fica claro que, o desafio majoritário no silenciamento de genes em bactérias, pode ser o carregamento e entrega de ácidos nucleicos, como pequenos RNAs, na célula bacteriana. Para promover o controle da podridão negra utilizando o silenciamento gênico, pode ser necessário a produção de sRNAs sintéticos ou não, que cheguem até as células de Xcc durante a infecção no campo. Entretanto, para a aplicação *in vivo*, as estratégias utilizando vetores de expressão como realizado por Nakashima *et al.* 2009 e por Na *et al.* (2013), tornam-se inviáveis.

Neste contexto, foi proposto também o desenvolvimento de um carreador capaz de transportar e promover a entrega de ácidos nucleicos no interior de células Gram negativas. A estratégia proposta foi o desenvolvimento de uma nanopartícula capaz de desempenhar o papel de carreador de ácidos nucleicos, como os pequenos RNAs.

Nos últimos anos a nanotecnologia tem apresentado grande potencial para agricultura. A utilização de nanopartículas para o controle de fitopatógenos e para a entrega de bio produtos como fertilizantes, tem se mostrado uma estratégia eficiente em diversos estudos (RAI e INGLE, 2012; AHMED *et al.*, 2013; MUKHOPADHYAY, 2014; CHENG *et al.*, 2016; FRACETO *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2016; AMBIKA, 2018; SANTOS *et al.*, 2018; TRIPATHI *et al.*, 2018). A associação de nanopartículas como carreadores possui grande potencial, amplamente explorado, sobretudo na área da saúde humana.

Na revisão realizada por Kumari *et al.* (2010), nanopartículas biodegradáveis foram apontadas como uma potencial estratégia para a entrega de drogas de forma direcionada, além de promover uma liberação controlada, minimizando problemas encontrados em medicamentos convencionais. A associação de nanopartículas a ácidos nucleicos tem sido avaliada, sobretudo para aplicação na área clínica (MACLACHLAN, 2007; RAO, 2010; PENSADO *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2014; TAN *et al.*, 2016; DURYMANOV e REINEKE, 2018). Trabalhos como realizado por Lakshminarayanan *et al.* (2018), Santos *et al.* (2018) e Liu *et al.* (2019), chamaram atenção para o fato de que a utilização de nanopartículas podem ser uma poderosa ferramenta para o combate de bactérias patogênicas na área clínica.

Os resultados obtidos aqui, neste trabalho mostraram que os ácidos nucleicos foram veiculados para o interior da célula bacteriana por meio na nanopartícula desenvolvida. Desta forma, os resultados sugerem a possibilidade de aplicação para controlar bactérias, sejam elas de interesse clínico ou agrônômico. Na revisão realizada por Kanasty *et al.* (2013), foi ressaltado o potencial da utilização de RNAs como os siRNA ou miRNA para o tratamento de doenças como o câncer, doenças hereditárias, doenças virais, entre outras. Os autores apontaram ainda o grande desafio de promover a entrega desses ácidos nucleicos aos alvos, sendo os lipossomos uma alternativa promissora para transpor esse obstáculo. Em 2013 havia vinte e dois medicamentos em fases iniciais de estudos clínicos, dentre esses, oito eram compostos pela associação entre ácidos nucleicos (siRNA ou miRNA) com lipossomos.

Recentemente o trabalho desenvolvido por Lin e Tam (2019), reafirmaram a eficiência da utilização de lipossomos para promover o carreamento e liberação de ácidos nucleicos *in vivo* no tratamento de diversas doenças, ressaltando seu potencial na área clínica. Na revisão realizada por Yang *et al.* (2018), os autores chamaram atenção para o fato de os nanomateriais não serem aplicados de maneira ampla à agricultura.

Entretanto, afirmaram que à medida que essas nanoestruturas são exploradas na área clínica contra patógenos humanos, surge a possibilidade de aplicação contra fitopatógenos. Além disso, indicaram a ocorrência da utilização dos lipossomos como carreadores de antimicrobianos, que podem ser dispersos através da água de irrigação. Entretanto, esses autores afirmaram também, que a utilização prática dos lipossomos apenas começou a ser avaliada no campo do controle de doenças vegetais.

Tendo em vista os dados presentes na literatura e os resultados obtidos aqui, nesse trabalho, é possível sugerir que a associação de estratégias de silenciamento ou modulação de expressão gênica, com os lipossomos gerados podem tornar-se uma poderosa ferramenta para controle de doenças como a podridão negra, minimizando assim, os danos acarretados pelo uso excessivo de compostos químicos.

Além de propor o controle da podridão negra a partir de métodos de silenciamento gênico e nanotecnologia, o presente trabalho propôs também o controle do mofo branco utilizando a abordagem de HIGS, para promover o silenciamento de efetores específicos desse fitopatógeno. O mofo branco compõe juntamente com a podridão negra, o grupo de doenças, que pode acometer as brássicas. Além disso, *S. sclerotiorum*, agente causal do mofo branco (STEADMAN, 1983) pode infectar e causar doenças em aproximadamente 600 espécies de vegetais distintas (BOLAND e HALL, 1994; FRENCH e SCHULTZ, 2009).

O fungo filamentosos *S. sclerotiorum* durante muitos anos foi relatado como um organismo necrotrófico, Wang *et al.* (2014), descreveram em seu trabalho que patógenos necrotróficos causam a morte dos tecidos hospedeiros antes ou durante a colonização. Esses organismos podem secretar metabólitos secundários e/ou pequenas proteínas que podem induzir no hospedeiro, a produção de espécies reativas

de oxigênio e ocasionar respostas de HR. Na revisão realizada por Mbengue *et al.* (2016), foi relatado que os metabolitos secundários e enzimas podem contribuir para a virulência de fungos necrotróficos.

Entretanto, alguns trabalhos como Zhu *et al.* (2013) e Kabbage (2015), propuseram que *S. sclerotiorum* não seja classificado como necrotrófico e sim como hemibiotrófico. Fungos hemibiotróficos podem ser caracterizados como organismos que, no início da infecção mantem os tecidos de seus hospedeiros intactos e podem nutrir-se a partir desses tecidos, sem causar sua morte. Nos estágios finais de infecção esses organismos podem produzir toxinas e ocasionar a morte das células de seu hospedeiro e completar seu ciclo de vida nos tecidos mortos (WANG *et al.*, 2014; KABBAGE *et al.*, 2015).

No trabalho desenvolvido por Zhu *et al.* (2013), os autores chamaram atenção o fato de *S. sclerotiorum* ser originalmente visto como um patógeno agressivo que logo no início da infecção pode ser capaz secretar grandes quantidades de ácido oxálico e em conjunto com diversas enzimas que degradam a parede celular, poderiam ocasionar rapidamente a morte das células e tecidos do hospedeiro. Mbengue *et al.* (2016), apontaram que metabolitos secundários e enzimas de degradação podem contribuir de maneira positiva para a virulência de fitopatógenos necrotróficos. Entretanto, segundo Wang *et al.* (2014) o ácido oxálico pode desempenhar importantes papéis no início da infecção, podendo suprimir as respostas do hospedeiro e ocasionar condições redutoras nas células dos hospedeiros. Essas condições podem permitir um tempo antes do estabelecimento do fitopatógeno e do reconhecimento do hospedeiro. Este espaço temporal, ainda que curto, pode favorecer a aquisição de nutrientes a partir de tecidos vivos, necessários para o desenvolvimento das hifas.

Os fungos fitopatogênicos, como *S. sclerotiorum* podem secretar além do ácido oxálico, moléculas capazes de alterar a estrutura e função das células hospedeiras, denominadas efetores. Os efetores podem ser peptídeos não ribossomais (PNRs), policetídeos (PKSs), proteínas, alcaloides, terpenos, ou outros metabólitos. (VLEESHOUWERS e OLIVER, 2014; WANG *et al.*, 2014). Essas moléculas podem ser secretadas pelo fitopatógeno e desencadear a resposta ETI no hospedeiro, ocasionando HR e morte celular local. Essa resposta de defesa do hospedeiro pode ser

eficiente contra a infecção de fungos biotróficos, impedindo a infecção. Entretanto, quando se trata de fungos necrotróficos, os efetores secretados ativam a resposta ETI e podem acabar ocasionando ETS (suscetibilidade desencadeada por efetores).

Organismos como *S. sclerotiorum* podem apresentar uma ampla e diversa gama de efetores. No trabalho realizado por Guyon *et al.* (2014), diversos candidatos a efetores foram identificados a partir da análise do secretoma desse fitopatógeno e avaliados *in silico* e *in vitro*. Dentre os efetores conhecidos de *S. sclerotiorum* é possível citar as proteínas SsiTL, uma integrina (ZHU *et al.*, 2013), Ss-caf1, uma proteína putativa de ligação Ca⁺ (WANG *et al.*, 2009; XIAO *et al.*, 2014), SsPG1, uma endopoligalacturonase (ZUPPINI *et al.*, 2005). Essas proteínas foram selecionadas como alvo para o silenciamento neste trabalho, a partir da abordagem HIGS.

A utilização de HIGS para o silenciamento de genes em fungos filamentosos foi proposta inicialmente por Tinoco *et al.* (2010), que produziram plantas transgênicas de *N. tabacum cv. xanthi*, que expressavam um dsRNA que tinha como alvo o gene repórter *uidA*. Esse dsRNA ao ser processado pelo sistema RISC na planta poderia gerar siRNAs. Esses siRNAs foram adquiridos pelo fungo filamentoso *Fusarium verticillioides*, capazes de expressar o gene *uidA* durante a interação desse organismo com as plantas transgênicas. O gene *uidA* expresso no fungo foi silenciado, demonstrando assim, que era possível utilizar HIGS para silenciar genes em fungos filamentosos.

No mesmo ano, Nowara *et al.* (2010), utilizaram HIGS para silenciar genes do fungo fitopatogênico biotrófico *Blumeria graminis*. Os autores revelaram com seu trabalho a possibilidade de controlar fitopatógenos utilizando HIGS para gerar plantas resistentes. Duan *et al.* (2012), apontaram que a utilização de abordagens como HIGS, que explora o fenômeno de RNAi em eucariotos, demonstravam grande potencial para o desenvolvimento de plantas resistentes a doenças. Trabalhos realizados por Koch e Kogel (2014), Quoc e Nakayashiki (2015) e Van de Wouw e Idnurm (2019) reafirmaram o potencial de HIGS como uma ferramenta na geração de plantas resistentes a diversos fungos fitopatogênicos. Nos últimos anos, HIGS tem sido amplamente avaliado para o controle de diversos fungos filamentosos fitopatogênicos (CHENG *et al.*, 2015; GOVINDARAJULU *et al.*, 2015; ZHOU *et al.*, 2016; ZHU *et al.*, 2017; QI *et al.*, 2018;

GUO *et al.*, 2019). Além disso, o trabalho realizado por Andrade *et al.* (2016), demonstrou pela primeira vez a utilização de HIGS para o silenciamento de genes específicos em *S. sclerotiorum*.

Neste trabalho foram geradas plantas transgênicas de *A. thaliana* capazes de expressar dsRNAs, que quando processados pelo sistema RISC, podem gerar siRNAs capazes de promover o silenciamento de genes efetores específicos deste fungo. Essas plantas ao serem desafiadas com o fungo fitopatogênico mostraram a diminuição na intensidade dos sintomas do mofo branco ou retardamento em seu aparecimento.

Interessantemente, o trabalho de Zhou *et al.* (2016) promoveu o silenciamento de genes específicos do fungo necrotrófico *Rhizoctonia solani* e observou também a diminuição no aparecimento das lesões causada por este fitopatógeno. Enquanto no trabalho desenvolvido por Guo *et al.* (2019), os autores promoveram o silenciamento do gene *MoAp1* do fungo hemibiotrófico *Magnaporthe oryzae* utilizando HIGS, e detectaram o desenvolvimento morfológico anormal do fitopatógeno, além da diminuição da virulência. O trabalho desenvolvido por Andrade *et al.* (2016), utilizou HIGS para induzir o silenciamento do gene da quitinase sintase em *S. sclerotiorum* os autores observaram a diminuição na severidade dos sintomas e o retardamento no aparecimento dos mesmos, assim como observado neste trabalho. Interessantemente em nenhum dos trabalhos descritos foi possível observar a resistência completa das plantas transgênicas.

Os resultados obtidos para o controle de *S. sclerotiorum* reafirmam o potencial de HIGS na geração de plantas resistentes a fungos fitopatogênicos. É possível sugerir também, que os genes efetores *SspG1*, *SsiTL* e *Ss-caF1*, não só estão envolvidos na interação como desempenham papéis importantes durante o processo de colonização e infecção do hospedeiro. Além disso, a associação entre os dados observados neste estudo, com os dados presentes na literatura, onde é relatada a complexidade da interação planta - *S. sclerotiorum*, é possível sugerir que a resistência total do hospedeiro a este fitopatógeno esteja condicionado ao silenciamento de mais de um gene envolvido no processo de interação.

Os resultados obtidos no presente trabalho reafirmam o potencial do silenciamento gênico associado ou não a nanotecnologia como estratégia para alcançar o controle de doenças causadas por fitopatógenos, tanto bactérias como Xcc ou fungos como *S. sclerotiorum*. Além disso, os dados gerados poderão ser utilizados no futuro para auxiliar no desenvolvimento de produtos com potencial biotecnológico.

7 CONCLUSÕES GERAIS

- Foi possível mimetizar o sistema de interação *in vivo* (*X. campestris* pv. *campestris*-*B. oleracea*) utilizando um sistema *in vitro* com a presença de extrato vegetal
- A avaliação de coloração para detectar a presença da proteína Gus nos discos foliares infectados com *Xanthomonas campestris* não foram suficientes para afirmar a ocorrência do silenciamento gênico, sendo necessárias avaliações complementares.
- Foi possível carrear e entregar ácidos nucleicos no interior de células bacterianas Gram negativas utilizando os lipossomos desenvolvidos.
- O silenciamento parcial dos genes efetores de *S. sclerotiorum* ocasionou uma redução na severidade dos sintomas do mofo branco.
- O silenciamento do efector *Ss-caF1* retardou em aproximadamente 24 h o aparecimento dos sintomas nas plantas avaliadas.
- Os resultados obtidos neste trabalho possuem potencial para o controle de fitopatógenos como *S. sclerotiorum* e *Xcc*, podendo gerar produtos biotecnológicos eficientes no controle de doenças em plantas (patente em desenvolvimento).

REFERÊNCIAS

- ABU LILA, A. S. and ISHIDA, T. Liposomal Delivery Systems: Design Optimization and Current Applications. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. v.40,n. 1, p. 1-10, 2017.
- ADAMS, P. B. and TATE, C. J. Mycelial germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* on soil. **Plant Disease Reporter**. v.60,n. 6, p. 515-518, 1976.
- AGRAWAL, S. and RATHORE, P. Nanotechnology pros and cons to agriculture: a review. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**. v.3,n. 3, p. 43-55, 2014.
- AGRIOS, G. **Plant Pathology Academic Press San Diego**, Academic Press, San Diego, CA. 1997
- AHMED, F., *et al.* Nanobiotechnology: scope and potential for crop improvement. In: AHMED, F., *et al.* **Crop Improvement Under Adverse Conditions**, Springer. v. 1, p.245-269, 2013.
- AIBA, H., *et al.* Evidence for two functional gal promoters in intact *Escherichia coli* cells. **Journal of Biological Chemistry**. v.256,n. 22, p. 11905-11910, 1981.
- ALAKONYA, A., *et al.* Interspecific RNA interference of SHOOT MERISTEMLESS-like disrupts *Cuscuta pentagona* plant parasitism. **The Plant Cell**. v.24,n. 7, p. 3153-3166, 2012.
- ALAM, M. M., *et al.* Overexpression of a rice heme activator protein gene (OsHAP2E) confers resistance to pathogens, salinity and drought, and increases photosynthesis and tiller number. **Plant Biotechnology Journal**. v.13,n. 1, p. 85-96, 2015.
- ALFANO, J. R. and COLLMER, A. The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. **Journal of Bacteriology**. v.179,n. 18, p. 5655, 1997.
- ALVAREZ, A. M., *et al.* Serological, pathological, and genetic diversity among strains of *Xanthomonas campestris* infecting crucifers. **Phytopathology**. v.84,n. 12, p. 1449-1457, 1994.
- ALY, R., *et al.* Gene silencing of mannose 6-phosphate reductase in the parasitic weed *Orobanche aegyptiaca* through the production of homologous dsRNA sequences in the host plant. **Plant Biotechnology Journal**. v.7,n. 6, p. 487-498, 2009.
- AMARAL, A. M. D., *et al.* Transformation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by electroporation. **Fitopatologia Brasileira**. v.30,n. 3, p. 292-294, 2005.

- AMBIKA, P. P. S. Nanotechnology: Greener Approach for Sustainable Environment. In: AMBIKA, P. P. S. **Nanotechnology in Environmental Science**. A. K. M. Chaudhery Mustansar Hussain. Wiley Online Library v. 1, p.805-824, 2018.
- ANDRADE, A. E., *et al.* In vivo proteome analysis of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in the interaction with the host plant *Brassica oleracea*. **FEMS Microbiology Letters**. v.281,n. 2, p. 167-174, 2008.
- ANDRADE, C. M., *et al.* Host-induced gene silencing in the necrotrophic fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Pathology**. v.65,n. 4, p. 626-632, 2016.
- ARABIDOPSIS GENOME, I. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. **Nature**. v.408,n. 6814, p. 796-815, 2000.
- ARAGAO, F. J. and FARIA, J. C. First transgenic geminivirus-resistant plant in the field. **Nature Biotechnology**. v.27,n. 12, p. 1086-1088, 2009.
- ARLAT, M., *et al.* *Xanthomonas campestris* contains a cluster of hrp genes related to the larger hrp cluster of *Pseudomonas solanacearum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v.4,n. 6, p. 593-601, 1991.
- ARORA, L. and NARULA, A. Gene Editing and Crop Improvement Using CRISPR-Cas9 System. **Frontiers in Plant Science**. v.8,n. p. 1932, 2017.
- ASIF, A., *et al.* Revisiting the mechanisms involved in calcium chloride induced bacterial transformation. **Frontiers in Microbiology**. v.8,n. p. 2169, 2017.
- ASTUA-MONGE, G., *et al.* Expression profiling of virulence and pathogenicity genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Journal of Bacteriology**. v.187,n. 3, p. 1201-1205, 2005.
- BARBER, C., *et al.* A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. **Molecular Microbiology**. v.24,n. 3, p. 555-566, 1997.
- BAUM, J. A., *et al.* Control of coleopteran insect pests through RNA interference. **Nature Biotechnology**. v.25,n. 11, p. 1322-1326, 2007.
- BIRHANU, G., *et al.* Nanotechnology for delivery of gemcitabine to treat pancreatic cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v.88,n. 1, p. 635-643, 2017.
- BIRMINGHAM, D. J., *et al.* Phototoxic bullae among celery harvesters. **Archives of Dermatology**. v.83,n. 1, p. 73-87, 1961.
- BISTUÉ, A. J. S., *et al.* Inhibition of aac (6')-Ib-mediated amikacin resistance by nuclease-resistant external guide sequences in bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.106,n. 32, p. 13230-13235, 2009.

- BOAT, M. A. B., *et al.* Fungicide Tolerance and Effect of Environmental Conditions on Growth of *Trichoderma spp.* with Antagonistic Activity Against *Sclerotinia sclerotiorum* Causing White Mold of Common Bean (*Phaseolus vulgaris*). **International Journal of Innovative Approaches in Agricultural Research**. v. 2,n. 3, p. 226-243, 2018.
- BOLAND, G. and HALL, R. Epidemiology of white mold of white bean in Ontario. **Canadian Journal of Plant Pathology**. v.9,n. 3, p. 218-224, 1987.
- BOLAND, G. and HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**. v.16,n. 2, p. 93-108, 1994.
- BOLTON, M. D., *et al.* *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**. v.7,n. 1, p. 1-16, 2006.
- BONAS, U., *et al.* Isolation of a gene cluster from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that determines pathogenicity and the hypersensitive response on pepper and tomato. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v.4,n. 1, p. 81-88, 1991.
- BOYD, L. A., *et al.* Plant-pathogen interactions: disease resistance in modern agriculture. **Trends in Genetics**. v.29,n. 4, p. 233-240, 2013.
- BOZZUTO, G. and MOLINARI, A. Liposomes as nanomedical devices. **International Journal of Nanomedicine**. v.10,n. 1, p. 975-999, 2015.
- BRADLEY, C., *et al.* Efficacy of fungicides for control of *Sclerotinia* stem rot of canola. **Plant Disease**. v.90,n. 9, p. 1129-1134, 2006.
- BUTTNER, C., *et al.* Bacteriophages and bacterial plant diseases. **Frontiers in Microbiology**. v.8,n. p. 34, 2017.
- BÜTTNER, D. and HE, S. Y. Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria. **Plant Physiology**. v.150,n. 4, p. 1656-1664, 2009.
- CAI, Q., *et al.* Plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes. **Science**. v.360,n. 6393, p. 1126-1129, 2018.
- CAMARGO FILHO, W. P. and CAMARGO, F. P. A quick review of the production and commercialization of the main vegetables in Brazil and the world from 1970 to 2015. **Horticultura Brasileira**. v.35,n. 2, p. 160-166, 2017.
- CASTAÑEDA, A., *et al.* Mutagenesis of all eight avr genes in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* had no detected effect on pathogenicity, but one avr gene affected race specificity. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v.18,n. 12, p. 1306-1317, 2005.
- CHANG, H. X., *et al.* Exploring the genetics of lesion and nodal resistance in pea (*Pisum sativum* L.) to *Sclerotinia sclerotiorum* using genome-wide association studies and RNA-Seq. **Plant Direct**. v.2,n. 6, p. e00064, 2018.

- CHATNAPARAT, T., *et al.* Global Pattern of Gene Expression of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* Within Soybean Leaves. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v.29,n. 6, p. 508-522, 2016.
- CHENG, F., *et al.* Genome triplication drove the diversification of Brassica plants. **Horticulture Research**. v.1,n. 1, p. 14024, 2014.
- CHENG, H. N., *et al.* Nanotechnology in Agriculture.In: CHENG, H. N., *et al.* **Nanotechnology: Delivering on the Promise Volume 2**, American Chemical Society. v. 1224, p.233-242, 2016.
- CHENG, W., *et al.* Host-induced gene silencing of an essential chitin synthase gene confers durable resistance to *Fusarium* head blight and seedling blight in wheat. **Plant Biotechnol J**. v.13,n. 9, p. 1335-1345, 2015.
- CHOMCZYNSKI, P. and SACCHI, N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. **Nature Protocols**. v.1,n. 2, p. 581-585, 2006.
- CHRISTIAN, P., *et al.* Nanoparticles: structure, properties, preparation and behaviour in environmental media. **Ecotoxicology**. v.17,n. 5, p. 326-343, 2008.
- CLOGSTON, J. D. and PATRI, A. K. Zeta potential measurement.In: CLOGSTON, J. D. and PATRI, A. K. **Characterization of nanoparticles intended for drug delivery**, Springer Protocols. v. 697, p.63-70, 2011.
- CLOUGH, S. J. and BENT, A. F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**. v.16,n. 6, p. 735-743, 1998.
- DA SILVA, A. C., *et al.* Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**. v.417,n. 6887, p. 459-463, 2002.
- DA SILVA, L. P., *et al.* Processo de obtenção de moléculas bioativas em sistemas carreadores micro e nanoestruturados. F.-F. U. D. B. Embrapa - Empresa Brasileira De Pesquisa Agropecuária. Brazil. 2015.
- DA SILVA, R. S., *et al.* Using antagonistic soil bacteria and their cell-free filtrates to control the black rot pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Journal of Phytopathology**. v.166,n. 7-8, p. 494-501, 2018.
- DANIELS, M. J., *et al.* Cloning of genes involved in pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* using the broad host range cosmid pLAFR1. **The EMBO Journal**. v.3,n. 13, p. 3323-3328, 1984.
- DARAEI, H., *et al.* Application of liposomes in medicine and drug delivery. **Artificial Cells Nanomedicine Biotechnology**. v.44,n. 1, p. 381-391, 2016.

DELAYE, L., *et al.* Endophytes versus biotrophic and necrotrophic pathogens—are fungal lifestyles evolutionarily stable traits? **Fungal Diversity**. v.60,n. 1, p. 125-135, 2013.

DÉVELOPPEUR, S. Basic local alignment search tool. n. p., 1990.

DING, B. and WANG, Y. Viroids: uniquely simple and tractable models to elucidate regulation of cell-to-cell trafficking of RNA. **DNA and Cell Biology**. v.28,n. 2, p. 51-56, 2009.

DODDS, P. N. and RATHJEN, J. P. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. **Nature Reviews Genetics** v.11,n. 8, p. 539-548, 2010.

DOUDNA, J. A. and CHARPENTIER, E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science**. v.346,n. 6213, p. 1258096, 2014.

DUAN, C. G., *et al.* Application of RNA silencing to plant disease resistance. **Silence**. v.3,n. 1, p. 5, 2012.

DURYMANOV, M. and REINEKE, J. Non-viral Delivery of Nucleic Acids: Insight Into Mechanisms of Overcoming Intracellular Barriers. **Frontiers in Pharmacology**. v.9,n. p. 971, 2018.

EAMENS, A., *et al.* RNA silencing in plants: yesterday, today, and tomorrow. **Plant Physiology**. v.147,n. 2, p. 456-468, 2008.

ELPEL, T. J. Plant Identification, Edible Plants, Weed Ecology, Mushrooms, and more. **Wildflowers & Weeds**. v.1,n. 1, p. 12-32, 2010.

ESCOBAR, M. A., *et al.* RNAi-mediated oncogene silencing confers resistance to crown gall tumorigenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.98,n. 23, p. 13437-13442, 2001.

EWERT, K. K., *et al.* Cationic liposome–nucleic acid complexes for gene delivery and silencing: pathways and mechanisms for plasmid DNA and siRNA. In: EWERT, K. K., *et al.* **Nucleic Acid Transfection**, Springer. v., p.191-226, 2010.

FAGARD, M. and VAUCHERET, H. (TRANS)GENE SILENCING IN PLANTS: How Many Mechanisms? **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. v.51,n. p. 167-194, 2000.

FAO. **The state of food insecurity in the world: Addressing food insecurity in protracted crises**, Fao. 2010

FARGIER, E. and MANCEAU, C. Pathogenicity assays restrict the species *Xanthomonas campestris* into three pathovars and reveal nine races within *X. campestris* pv. *campestris*. **Plant Pathology**. v.56,n. 5, p. 805-818, 2007.

FICARRA, F. A., *et al.* The amino acid arginine 210 of the response regulator HrpG of *Xanthomonas citri* subsp. *Citri* is required for HrpG function in virulence. **PloS One**. v.10,n. 5, p. e0125516, 2015.

FILIPOWICZ, W. and PASZKOWSKI, J. Gene Silencing A2 - Brenner, Sydney. In: FILIPOWICZ, W. and PASZKOWSKI, J. **Encyclopedia of Genetics**. J. H. Miller. New York, Academic Press. v. 1, p.813-814, 2001.

FILLION, P., *et al.* Encapsulation of DNA in negatively charged liposomes and inhibition of bacterial gene expression with fluid liposome-encapsulated antisense oligonucleotides. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**. v.1515,n. 1, p. 44-54, 2001.

FIRE, A., *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**. v.391,n. 6669, p. 806-811, 1998.

FRACETO, L. F., *et al.* Nanotechnology in Agriculture: Which Innovation Potential Does It Have? **Frontiers in Environmental Science**. v.4,n. 20, p. 1-20, 2016.

FRANCESCHETTI, M., *et al.* Effectors of Filamentous Plant Pathogens: Commonalities amid Diversity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v.81,n. 2, p. 1-17, 2017.

FRENCH, R. and SCHULTZ, D. White mold of cabbage. **White Mold of Cabbage**. v.1,n. PLPA-Cab009-01, p. 1-2, 2009.

GHAG, S. B. Host induced gene silencing, an emerging science to engineer crop resistance against harmful plant pathogens. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v.100,n. p. 242-254, 2017.

GHAG, S. B., *et al.* Host-induced post-transcriptional hairpin RNA-mediated gene silencing of vital fungal genes confers efficient resistance against *Fusarium wilt* in banana. **Plant Biotechnology Journal**. v.12,n. 5, p. 541-553, 2014.

GHINI, R. Mudanças climáticas globais e doenças de plantas. n. p., 2005.

GILL, H. K. and GARG, H. Pesticides: environmental impacts and management strategies. In: GILL, H. K. and GARG, H. **Pesticides-toxic aspects**, IntechOpen. v., 2014.

GLAZEBROOK, J. Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. **Annual Review of Phytopathology**. v.43,n. 1, p. 205-227, 2005.

GORGEN, C. A. **Manejo do mofo branco da soja com palhada de *Brachiaria ruziziensis* e *Trichoderma harzianum* 1306**. 2009. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal de Goiás, Jataí.

GOTTESMAN, S. The small RNA regulators of *Escherichia coli*: roles and mechanisms. **Annual Review of Microbiology**. v.58,n. p. 303-328, 2004.

GOVINDARAJULU, M., *et al.* Host-induced gene silencing inhibits the biotrophic pathogen causing downy mildew of lettuce. **Plant Biotechnology Journal**. v.13,n. 7, p. 875-883, 2015.

GRAU, C., *et al.* Resistance of soybean cultivars to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Diseases**.n. p., 1982.

GROSS, A., *et al.* Endocytosis of *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* lipopolysaccharides in non-host plant cells of *Nicotiana tabacum*. **The New Phytologist**. v.165,n. 1, p. 215-226, 2005.

GRUEGELSIEPE, H., *et al.* Antisense Inhibition of RNase P mechanistic aspects and application to live bacteria. **Journal of Biological Chemistry**. v.281,n. 41, p. 30613-30620, 2006.

GUO, X., *et al.* Host-induced gene silencing of MoAP1 confers increased resistance to *Magnaporthe oryzae*. **Frontiers in plant science**. v.10,n. p. 433, 2019.

GUO, Y., *et al.* HrpG and HrpX play global roles in coordinating different virulence traits of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Molecular plant-microbe interactions**. v.24,n. 6, p. 649-661, 2011.

HACKLEY, V. A. and CLOGSTON, J. D. Measuring the hydrodynamic size of nanoparticles in aqueous media using batch-mode dynamic light scattering. In: HACKLEY, V. A. and CLOGSTON, J. D. **Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery**, Springer. v. 697, p.35-52, 2011.

HAO, Y., *et al.* Quantifying the sequence-function relation in gene silencing by bacterial small RNAs. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.108,n. 30, p. 12473-12478, 2011.

HARUTA, M., *et al.* Molecular characterization of mutant *Arabidopsis* plants with reduced plasma membrane proton pump activity. **The Journal of Biological Chemistry**. v.285,n. 23, p. 17918-17929, 2010.

HARVESON, R. M., *et al.* Integrating Planting Dates and Fungicide Applications for Managing White Mold of Dry Beans in Western Nebraska. **Plant Health Progress**. v.11,n. 1, p. 1-8, 2010.

HE, Y.-W. and ZHANG, L.-H. Quorum sensing and virulence regulation in *Xanthomonas campestris*. **FEMS Microbiology Reviews**. v.32,n. 5, p. 842-857, 2008.

HE, Y. W., *et al.* *Xanthomonas campestris* cell–cell communication involves a putative nucleotide receptor protein Clp and a hierarchical signalling network. **Molecular Microbiology**. v.64,n. 2, p. 281-292, 2007.

- HINRICHS, C. C. Regionalizing food security? Imperatives, intersections and contestations in a post-9/11 world. **Journal of Rural Studies**. v.29,n. 7-18, p. 12, 2013.
- HO, Y.-P., *et al.* The AvrB_AvrC domain of AvrXccC of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* is required to elicit plant defense responses and manipulate ABA homeostasis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v.26,n. 4, p. 419-430, 2013.
- HONG, S., *et al.* CRISPR RNA and anti-CRISPR protein binding to the *Xanthomonas albilineans* Csy1-Csy2 heterodimer in the type I-F CRISPR-Cas system. **The Journal of Biological Chemistry**. v.293,n. 8, p. 2744-2754, 2018.
- HU, X., *et al.* Seed treatment containing *Bacillus subtilis* BY-2 in combination with other *Bacillus* isolates for control of *Sclerotinia sclerotiorum* on oilseed rape. **Biological Control**.n. p., 2019.
- HUANG, G., *et al.* Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.103,n. 39, p. 14302-14306, 2006.
- HUANG, G., *et al.* Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.103,n. 39, p. 14302-14306, 2006.
- HUANG, G., *et al.* Characterization of the acyl carrier protein gene and the fab gene locus in *Xanthomonas albilineans*. **FEMS Microbiology Letters**. v.193,n. 1, p. 129-136, 2000.
- HUDYNIA, J., *et al.* Evaluation of wounds as a factor to infection of cabbage by ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**. v.84,n. 3, p. 316-320, 2000.
- HUGHES, G. A. Nanostructure-mediated drug delivery. In: HUGHES, G. A. **Nanomedicine in Cancer**, Pan Stanford. v. 2, p.47-72, 2017.
- IBRAHIM, A. B., *et al.* RNAi-mediated resistance to whitefly (*Bemisia tabaci*) in genetically engineered lettuce (*Lactuca sativa*). **Transgenic Research**. v.26,n. 5, p. 613-624, 2017.
- IGNATOV, A., *et al.* A virulence gene from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* homologous to the avrBs2 locus is recognized in race-specific reaction by two different resistance genes in Brassica plant species. **Genetika**. v.38,n. 12, p. 1656-1662, 2002.
- IKAWA, Y. and TSUGE, S. The quantitative regulation of the hrp regulator HrpX is involved in sugar-source-dependent hrp gene expression in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **FEMS Microbiology Letters**. v.363,n. 10, p., 2016.

ILIES, M. A., *et al.* Pyridinium cationic lipids in gene delivery: an *in vitro* and *in vivo* comparison of transfection efficiency versus a tetraalkylammonium congener. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v.435,n. 1, p. 217-226, 2005.

IMAM, J., *et al.* Plant microbe interactions in post genomic era: perspectives and applications. **Frontiers in Microbiology**. v.7,n. 1, p. 1488-1503, 2016.

ITO, M. F. and PARISI, J. J. D. Mofo-branco: Doença que exige muita atenção, principalmente no período outono-inverno. **JV Biotecnologia**. v.1,n. 1, p. 1-5, 2010.

JACKSON, A. L., *et al.* Widespread siRNA “off-target” transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity. **Rna**. v.12,n. 7, p. 1179-1187, 2006.

JASIN, M. and SCHIMMEL, P. Deletion of an essential gene in *Escherichia coli* by site-specific recombination with linear DNA fragments. **Journal of Bacteriology**. v.159,n. 2, p. 783-786, 1984.

JEFFERSON, R. A., *et al.* GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **The EMBO Journal**. v.6,n. 13, p. 3901-3907, 1987.

JOHNSON, M., *et al.* NCBI BLAST: a better web interface. **Nucleic Acids Research**. v.36,n. suppl_2, p. W5-W9, 2008.

JONES, J. D. and DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**. v.444,n. 7117, p. 323-329, 2006.

KABBAGE, M., *et al.* Pathogenic attributes of *Sclerotinia sclerotiorum*: switching from a biotrophic to necrotrophic lifestyle. **Plant Science**. v.233,n. p. 53-60, 2015.

KAKKAR, A., *et al.* *Xanthomonas campestris* cell-cell signalling molecule DSF (diffusible signal factor) elicits innate immunity in plants and is suppressed by the exopolysaccharide xanthan. **Journal of Experimental Botany**. v.66,n. 21, p. 6697-6714, 2015.

KANASTY, R., *et al.* Delivery materials for siRNA therapeutics. **Nature Materials**. v.12,n. 11, p. 967, 2013.

KAUR, G., *et al.* Nanotechnology: a review. **International Journal of Education and Applied Research**. v.2,n. 1, p. 50-53, 2012.

KETTING, R. F., *et al.* Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. **Genes & Development**. v.15,n. 20, p. 2654-2659, 2001.

KHINAST, J., *et al.* Nano-extrusion: a one-step process for manufacturing of solid nanoparticle formulations directly from the liquid phase. **AAPS PharmSciTech**. v.14,n. 2, p. 601-604, 2013.

KIM, S., *et al.* Time-resolved pathogenic gene expression analysis of the plant pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **BMC Genomics**. v.17,n. 1, p. 345, 2016.

KIM, T. K. T test as a parametric statistic. **Korean Journal of Anesthesiology**. v.68,n. 6, p. 540, 2015.

KNECHT, K., *et al.* Expression of BvGLP-1 encoding a germin-like protein from sugar beet in *Arabidopsis thaliana* leads to resistance against phytopathogenic fungi. **Molecular Plant-Microbe Interactions** v.23,n. 4, p. 446-457, 2010.

KOCH, A. and KOGEL, K. H. New wind in the sails: improving the agronomic value of crop plants through RNAi-mediated gene silencing. **Plant Biotechnology Journal**. v.12,n. 7, p. 821-831, 2014.

KOENIG, D. and WEIGEL, D. Beyond the thale: comparative genomics and genetics of *Arabidopsis* relatives. **Nature Reviews Genetics** v.16,n. 5, p. 285-298, 2015.

KUMARI, A., *et al.* Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v.75,n. 1, p. 1-18, 2010.

LAKSHMINARAYANAN, R., *et al.* Recent Advances in the Development of Antimicrobial Nanoparticles for Combating Resistant Pathogens. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v.7,n. 13, p. e1701400, 2018.

LAM, P. and STEINMETZ, N. F. Plant viral and bacteriophage delivery of nucleic acid therapeutics. **Wiley Interdisciplinary Reviews Nanomedicine Nanobiotechnology**. v.10,n. 1, p., 2018.

LAMSAL, K., *et al.* Application of silver nanoparticles for the control of *Colletotrichum* species *in vitro* and pepper anthracnose disease in field. **Mycobiology**. v.39,n. 3, p. 194-199, 2011.

LANE, D., *et al.* Heat-dried sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* myceliogenically germinate in water and are able to infect *Brassica napus*. **Crop and Pasture Science**. v.69,n. 8, p. 765-774, 2018.

LAPINSKI, M. M., *et al.* Comparison of liposomes formed by sonication and extrusion: rotational and translational diffusion of an embedded chromophore. **Langmuir**. v.23,n. 23, p. 11677-11683, 2007.

LEHNER, M., *et al.* Fungicide sensitivity of *Sclerotinia sclerotiorum*: A thorough assessment using discriminatory dose, EC50, high-resolution melting analysis, and description of new point mutation associated with thiophanate-methyl resistance. **Plant Disease**. v.99,n. 11, p. 1537-1543, 2015.

LI, J., *et al.* Isolation, transformation and overexpression of sugarcane SoP5CS gene for drought tolerance improvement. **Sugar Tech**. v.20,n. 4, p. 464-473, 2018.

LI, R., *et al.* Interaction of *Sclerotinia sclerotiorum* with *Brassica napus*: cloning and characterization of endo- and exo-polygalacturonases expressed during saprophytic and parasitic modes. **Fungal Genetics and Biology**. v.41,n. 8, p. 754-765, 2004.

LI, Z. X., *et al.* First isolation of *Xanthomonas campestris* from the blood of a Chinese woman. **Chinese Medical Journal**. v.103,n. 5, p. 435-439, 1990.

LIANG, Y., *et al.* Disruption of a gene encoding a hypothetical secreted protein from *Sclerotinia sclerotiorum* reduces its virulence on canola (*Brassica napus*). **Canadian Journal of Plant Pathology**. v.35,n. 1, p. 46-55, 2013.

LIDDER, P. and SONNINO, A. Biotechnologies for the management of genetic resources for food and agriculture. **Background Study Paper**. v.52,n. p., 2011.

LIMA, W. C., *et al.* Laterally transferred genomic islands in Xanthomonadales related to pathogenicity and primary metabolism. **FEMS Microbiology Letters**. v.281,n. 1, p. 87-97, 2008.

LIN, P. J. and TAM, Y. K. Controlling Protein Expression by Delivery of RNA Therapeutics Using Lipid Nanoparticles. In: LIN, P. J. and TAM, Y. K. **Nucleic Acid Nanotheranostics**, Elsevier. v., p.277-310, 2019.

LIU, Y.-C., *et al.* Complete genome sequence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* strain 17 from Taiwan. **Genome Announcements**. v.3,n. 6, p. e01466-01415, 2015.

LIU, Y., *et al.* Nanotechnology-based antimicrobials and delivery systems for biofilm-infection control. **Chemical Society Reviews**. v.48,n. 2, p. 428-446, 2019.

LONEZ, C., *et al.* Cationic liposomal lipids: from gene carriers to cell signaling. **Progress in Lipid Research** v.47,n. 5, p. 340-347, 2008.

LU, G.-T., *et al.* An adenosine kinase exists in *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* and is involved in extracellular polysaccharide production, cell motility, and virulence. **Journal of Bacteriology**. v.191,n. 11, p. 3639-3648, 2009.

LUO, J., *et al.* Optimization of electroporation. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.393,n. p., 2018.

LYU, X., *et al.* A small secreted virulence-related protein is essential for the necrotrophic interactions of *Sclerotinia sclerotiorum* with its host plants. **PLoS Pathogens**. v.12,n. 2, p. e1005435, 2016.

MACLACHLAN, I. Liposomal formulations for nucleic acid delivery. In: MACLACHLAN, I. **Antisense drug technology: principles, strategies, and applications** v. 2, p.237-270, 2007.

- MAJUMDAR, R., *et al.* RNA Interference (RNAi) as a Potential Tool for Control of Mycotoxin Contamination in Crop Plants: Concepts and Considerations. **Frontiers in Plant Science**. v.8,n. p. 200, 2017.
- MALAMBANE, G., *et al.* Comparative effects of ethylene inhibitors on *Agrobacterium*-mediated transformation of drought-tolerant wild watermelon. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. v.82,n. 3, p. 433-441, 2018.
- MANSFIELD, J., *et al.* Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**. v.13,n. 6, p. 614-629, 2012.
- MARCO, F., *et al.* Overexpression of SAMDC1 gene in *Arabidopsis thaliana* increases expression of defense-related genes as well as resistance to *Pseudomonas syringae* and *Hyaloperonospora arabidopsidis*. **Frontiers in Plant Science**. v.5,n. 1, p. 115-124, 2014.
- MARIN, V. R., *et al.* Recent advances in the biocontrol of *Xanthomonas spp.* **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v.35,n. 5, p. 72, 2019.
- MARTINS, P. M., *et al.* Subcellular localization of proteins labeled with GFP in *Xanthomonas citri ssp. citri*: targeting the division septum. **FEMS Microbiol Letters**. v.310,n. 1, p. 76-83, 2010.
- MASSE, E., *et al.* Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. **Genes & Development**. v.17,n. 19, p. 2374-2383, 2003.
- MAXIMIANO, M. R., *et al.* Validation of an in vitro system for studies of pathogenicity mechanisms in *Xanthomonas campestris*. **FEMS Microbiol Letters**. v.364,n. 22, p., 2017.
- MAZID, M. and KHAN, T. A. Future of bio-fertilizers in Indian agriculture: an overview. **International Journal of Agricultural and Food Research**. v.3,n. 3, p., 2015.
- MCCORMAC, A. C., *et al.* A simple method for the production of highly competent cells of *Agrobacterium* for transformation via electroporation. **Molecular Biotechnology**. v.9,n. 2, p. 155-159, 1998.
- MCLEOD, F. S. A. and SIMMONDS, R. S. Penicillin facilitates the entry of antisense constructs into *Streptococcus mutans*. **FEMS Microbiology Letters**. v.349,n. 1, p. 25-31, 2013.
- MEHTA, A. and ROSATO, Y. B. Differentially expressed proteins in the interaction of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* with leaf extract of the host plant. **Proteomics**. v.1,n. 9, p. 1111-1118, 2001.
- MEHTA, A. and ROSATO, Y. B. A simple method for in vivo expression studies of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Current Microbiology**. v.47,n. 5, p. 400-403, 2003.

MEISTER, G. and TUSCHL, T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. **Nature**. v.431,n. 7006, p. 343-349, 2004.

MEYER, A., *et al.* The lipopolysaccharides of the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* induce an oxidative burst reaction in cell cultures of *Nicotiana tabacum*. **Planta**. v.213,n. 2, p. 214-222, 2001.

MORITA, T., *et al.* RNase E-based ribonucleoprotein complexes: mechanical basis of mRNA destabilization mediated by bacterial noncoding RNAs. **Genes & Development**. v.19,n. 18, p. 2176-2186, 2005.

MUELLER, D., *et al.* Efficacy of fungicides on *Sclerotinia sclerotiorum* and their potential for control of Sclerotinia stem rot on soybean. **Plant Disease**. v.86,n. 1, p. 26-31, 2002.

MUKHOPADHYAY, S. S. Nanotechnology in agriculture: prospects and constraints. **Nanotechnology, Science and Applications**. v.7,n. 1, p. 63-71, 2014.

NA, D., *et al.* Metabolic engineering of *Escherichia coli* using synthetic small regulatory RNAs. **Nature Biotechnology**. v.31,n. 2, p. 170-174, 2013.

NAKASHIMA, N., *et al.* Subtracting gene function by gene silencing and disruption in bacteria. **Current Biotechnology**. v.1,n. 2, p. 166-174, 2012.

NAKASHIMA, N. and MIYAZAKI, K. Bacterial cellular engineering by genome editing and gene silencing. **International Journal of Molecular Sciences**. v.15,n. 2, p. 2773-2793, 2014.

NAKASHIMA, N. and TAMURA, T. Conditional gene silencing of multiple genes with antisense RNAs and generation of a mutator strain of *Escherichia coli*. **Nucleic Acids Research**. v.37,n. 15, p. e103, 2009.

NAKASHIMA, N. and TAMURA, T. Gene silencing in *Escherichia coli* using antisense RNAs expressed from doxycycline-inducible vectors. **Letters in Applied Microbiology**. v.56,n. 6, p. 436-442, 2013.

NAMDEE, K., *et al.* Thermoresponsive Bacteriophage Nanocarrier as a Gene Delivery Vector Targeted to the Gastrointestinal Tract. **Molecular Therapy Nucleic Acids**. v.12,n. p. 33-44, 2018.

NIEHL, A., *et al.* Synthetic biology approach for plant protection using ds RNA. **Plant Biotechnology Journal**. v.16,n. 9, p. 1679-1687, 2018.

NOWARA, D., *et al.* HIGS: host-induced gene silencing in the obligate biotrophic fungal pathogen *Blumeria graminis*. **Plant Cell**. v.22,n. 9, p. 3130-3141, 2010.

NUÑEZ, A. M., *et al.* Bio-based products control black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) and increase the nutraceutical and antioxidant components in kale. **Scientific Reports**. v.8,n. 1, p. 10199-10210, 2018.

OWCZARZY, R., *et al.* IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. **Nucleic Acids Research**. v.36,n. suppl_2, p. W163-W169, 2008.

ÖZKARA, A., *et al.* Pesticides, environmental pollution, and health. In: ÖZKARA, A., *et al.* **Environmental Health Risk-Hazardous Factors to Living Species**, IntechOpen. v. 1, 2016.

PAL, K. K. and GARDENER, B. M. Biological control of plant pathogens. **The Plant Health Instructor**. v.1,n. 1, p. 1-25, 2006.

PAMMEL, L. H. Bacteriosis of rutabaga. (*Bacillus campestris* n. sp.) sp. nov.). . **Annales de l'Institut Phytopathologique Benaki**. v.9,n. 1, p. 59-81, 1895.

PANWAR, V., *et al.* Host-induced silencing of essential genes in *Puccinia triticina* through transgenic expression of RNA i sequences reduces severity of leaf rust infection in wheat. **Plant Biotechnology Journal**. v.16,n. 5, p. 1013-1023, 2018.

PANWAR, V., *et al.* Host-induced gene silencing of wheat leaf rust fungus *Puccinia triticina* pathogenicity genes mediated by the Barley stripe mosaic virus. **Plant Molecular Biology**. v.81,n. 6, p. 595-608, 2013.

PATEL, N., *et al.* Agronanotechnology for plant fungal disease management: a review. **International Journal Current Microbiology and Applied Sciences**. v.3,n. 10, p. 71-84, 2014.

PATIL, S., *et al.* Role of nanotechnology in delivery of protein and peptide drugs. **Current Pharmaceutical Design**. v.21,n. 29, p. 4155-4173, 2015.

PAZ, V. P. S., *et al.* Recursos hídricos, agricultura irrigada e meio ambiente. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v.3,n. p., 2000.

PEÑA, E., *et al.* *In vivo* RNA labeling using MS2. **Plasmodesmata: Methods and Protocols**. v.1217,n. 1, p. 329-341, 2015.

PENG, A., *et al.* Engineering canker-resistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the susceptibility gene CsLOB1 promoter in citrus. **Plant Biotechnology Journal**. v.15,n. 12, p. 1509-1519, 2017.

PENSADO, A., *et al.* Anionic nanoparticles based on Span 80 as low-cost, simple and efficient non-viral gene-transfection systems. **International Journal of Pharmaceutics**. v.476,n. 1-2, p. 23-30, 2014.

PFAFFL, M. W., *et al.* Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**. v.30,n. 9, p. e36, 2002.

PRELICH, G. Gene Overexpression: Uses, Mechanisms, and Interpretation. **Genetics**. v.190,n. 3, p. 841-854, 2012.

PURDY, L. H. *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. **Phytopathology**. v.69,n. 1, p. 875-880, 1979.

QI, T., *et al.* Host-induced gene silencing of an important pathogenicity factor P s CPK 1 in *Puccinia striiformis f. sp. tritici* enhances resistance of wheat to stripe rust. **Plant biotechnology journal**. v.16,n. 3, p. 797-807, 2018.

QIAN, W., *et al.* Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris pv. campestris*. **Genome Research**. v.15,n. 6, p. 757-767, 2005.

QUOC, N. B. and NAKAYASHIKI, H. RNA silencing in filamentous fungi: from basics to applications. In: QUOC, N. B. and NAKAYASHIKI, H. **Genetic Transformation Systems in Fungi, Volume 2**, Springer. v., p.107-124, 2015.

RAI, M. and INGLE, A. Role of nanotechnology in agriculture with special reference to management of insect pests. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.94,n. 2, p. 287-293, 2012.

RAKOW, G. Species origin and economic importance of Brassica. In: RAKOW, G. **Brassica**, Springer. v., p.3-11, 2004.

RAMOS, L. S., *et al.* Mutation of the *Erwinia amylovora* argD gene causes arginine auxotrophy, nonpathogenicity in apples, and reduced virulence in pears. **Applied and Environmental Microbiology**. v.80,n. 21, p. 6739-6749, 2014.

RAO, N. M. Cationic lipid-mediated nucleic acid delivery: beyond being cationic. **Chemistry and Physics of Lipids**. v.163,n. 3, p. 245-252, 2010.

RASHID, M. M., *et al.* GamR, the LysR-Type Galactose Metabolism Regulator, Regulates hrp Gene Expression via Transcriptional Activation of Two Key hrp Regulators, HrpG and HrpX, in *Xanthomonas oryzae pv. oryzae*. **Applied and Environmental Microbiology**. v.82,n. 13, p. 3947-3958, 2016.

REDDY, N. N. Importance of Horticultural Crops in Foods and Nutrition Constraints in Production of Quality Foods. **Reshaping Agriculture and Nutrition Linkages for Food and Nutrition Security**. v.326,n. 1, p. 195-205, 2016.

REIS, A. and LOPES, C. A. Epidemiologia e manejo do mofo-branco em hortaliças. **Embrapa Hortaliças-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**. v.1,n. 1, p. 1-5, 2007.

REIS FILGUEIRA, F. A. **Novo manual de Olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa, MG:, Editora UFV. 2008

ROBERTSON, C. J., *et al.* Overexpression of the *Arabidopsis* NPR1 protein in citrus confers tolerance to Huanglongbing. **Journal of Citrus Pathology**. v.5,n. 1, p. 1-8, 2018.

ROSA, C., *et al.* RNA interference mechanisms and applications in plant pathology. **Annual Review of Phytopathology**. v.56,n. 1, p. 581-610, 2018.

ROSSMAN, A. Y. The impact of invasive fungi on agricultural ecosystems in the United States. In: ROSSMAN, A. Y. **Ecological Impacts of Non-Native Invertebrates and Fungi on Terrestrial Ecosystems**, Springer. v., p.97-107, 2008.

RUAL, J.-F., *et al.* Novel insights into RNAi off-target effects using *C. elegans* paralogs. **BMC Genomics**. v.8,n. 1, p. 106-114, 2007.

RUKAVINA, Z. and VANIC, Z. Current Trends in Development of Liposomes for Targeting Bacterial Biofilms. **Pharmaceutics**. v.8,n. 2, p. 18-44, 2016.

RYAN, R. P., *et al.* Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium–plant interactions. **Nature Reviews Microbiology**. v.9,n. 5, p. 344, 2011.

RYAN, R. P., *et al.* Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. **Nature Reviews Microbiology**. v.9,n. 5, p. 344-355, 2011.

SABATÉ, D. C., *et al.* Biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary on common bean by native lipopeptide-producer *Bacillus* strains. **Microbiological Research**. v.211,n. p. 21-30, 2018.

SAFFARI, M., *et al.* Barriers to liposomal gene delivery: from application site to the target. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR**. v.15,n. Supl, p. 3, 2016.

SAMBROOK, J., *et al.* **Molecular cloning: a laboratory manual**, Cold spring harbor laboratory press. 1989

ŠAMEC, D. and SALOPEK-SONDI, B. Chapter 3.11 - Cruciferous (Brassicaceae) Vegetables. In: ŠAMEC, D. and SALOPEK-SONDI, B. **Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements**. S. M. Nabavi and A. S. Silva, Cold Spring Harbor Laboratory Press. v., p.195-202, 2019.

SANTOS, C., *et al.* Differential accumulation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* proteins during the interaction with the host plant: Contributions of an *in vivo* system. **Proteomics**. v.17,n. 12, p., 2017.

SANTOS, C. D. **Identificação de proteínas expressas por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* durante a interação com plantas de *Brassica oleracea* usando 2D-nanoUPLC/MSE**. 2015. 115 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Ciências Genômicas - UCB), Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2015.

SANTOS, R. S., *et al.* Nanomaterials and molecular transporters to overcome the bacterial envelope barrier: Towards advanced delivery of antibiotics. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v.136-137,n. p. 28-48, 2018.

SAVARY, S., *et al.* Crop losses due to diseases and their implications for global food production losses and food security, Springer. 2012.

SCHAAD, N. W., *et al.* Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel *et al.*, 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. nov.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and Jones, 1935) dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker *et al.*, 1935) sp. nov. nom. rev.; and "var. *fuscans*" of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**. v.28,n. 6, p. 494-518, 2005.

SCHEEL, L. D., *et al.* The isolation and characterization of two phototoxic furanocoumarins (psoralens) from diseased celery. **Biochemistry**. v.2,n. 5, p. 1127-1131, 1963.

SCHNEIDER, C. A., *et al.* NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**. v.9,n. 7, p. 671-675, 2012.

SCHULTE, R. and BONAS, U. A *Xanthomonas* pathogenicity locus is induced by sucrose and sulfur-containing amino acids. **The Plant Cell**. v.4,n. 1, p. 79-86, 1992.

SEIFBARGHI, S., *et al.* Changes in the *Sclerotinia sclerotiorum* transcriptome during infection of *Brassica napus*. **BMC Genomics**. v.18,n. 1, p. 266, 2017.

SEMENOVA, E., *et al.* Analysis of CRISPR system function in plant pathogen *Xanthomonas oryzae*. **FEMS Microbiology Letters**. v.296,n. 1, p. 110-116, 2009.

SHAPIRO, S. S. and WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**. v.52,n. 3/4, p. 591-611, 1965.

SHIM, G., *et al.* Application of cationic liposomes for delivery of nucleic acids. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.8,n. 2, p. 72-80, 2013.

SIEVERS, F., *et al.* Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular Systems Biology**. v.7,n. 1, p. 539-545, 2011.

SILVERMAN, B. W. **Density estimation for statistics and data analysis**, Routledge. 2018

SLATER, H., *et al.* A two-component system involving an HD-GYP domain protein links cell-cell signalling to pathogenicity gene expression in *Xanthomonas campestris*. **Molecular Microbiology**. v.38,n. 5, p. 986-1003, 2000.

- SMITH, P., *et al.* Competition for land. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.** v.365,n. 1554, p. 2941-2957, 2010.
- SO, J.-S., *et al.* Visualizing the infection process of *Xanthomonas campestris* in cabbage using green fluorescent protein. **World Journal of Microbiology and Biotechnology.** v.18,n. 1, p. 17-21, 2002.
- SONG, Y. and THOMMA, B. P. Host-induced gene silencing compromises *Verticillium wilt* in tomato and *Arabidopsis*. **Molecular Plant Pathology.** v.19,n. 1, p. 77-89, 2018.
- SOTO-SUÁREZ, M., *et al.* In planta gene expression analysis of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae*, African strain MA1. **BMC microbiology.** v.10,n. p. 170-170, 2010.
- SOUZA, J. L. D. and RESENDE, P. **Manual de horticultura orgânica**, Agropolos. 2006
- SRIVASTAVA, G. P., *et al.* Homolog-specific PCR primer design for profiling splice variants. **Nucleic Acids Research.** v.39,n. 10, p. e69-e69, 2011.
- STACH, J. E. M. and GOOD, L. Synthetic RNA silencing in bacteria—antimicrobial discovery and resistance breaking. **Frontiers in Microbiology.** v.2,n. 1, p. 185-196, 2011.
- STEADMAN, J. R. White Mold - a Serious Yield-Limiting Disease of Bean. **Plant Disease.** v.67,n. 4, p. 346-350, 1983.
- STRANGE, R. N. and SCOTT, P. R. Plant disease: a threat to global food security. **Annual Review of Phytopathology.** v.43,n. p. 83-116, 2005.
- SU, H.-Z., *et al.* Characterization of the GntR family regulator HpaR1 of the crucifer black rot pathogen *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. **Scientific Reports.** v.6,n. p. 19862, 2016.
- SUMIDA, C. H., *et al.* *Trichoderma asperelloides* antagonism to nine *Sclerotinia sclerotiorum* strains and biological control of white mold disease in soybean plants. **Biocontrol Science and Technology.** v.28,n. 2, p. 142-156, 2018.
- SUN, T., *et al.* Engineered nanoparticles for drug delivery in cancer therapy. **Angewandte Chemie International Edition.** v.53,n. 46, p. 12320-12364, 2014.
- TAHARA, S. T., *et al.* Proteins induced by *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* with leaf extract of the host plant (*Passiflorae edulis*). **Proteomics.** v.3,n. 1, p. 95-102, 2003.
- TAN, J. Y., *et al.* Non-Viral Nucleic Acid Delivery Strategies to the Central Nervous System. **Frontiers in Molecular Neuroscience.** v.9,n. 1, p. 108, 2016.
- TAYLOR, A., *et al.* Resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in wild *Brassica* species and the importance of *Sclerotinia subarctica* as a *Brassica* pathogen. **Plant Pathology.** v.67,n. 2, p. 433-444, 2018.

THOMASON, M. K. and STORZ, G. Bacterial antisense RNAs: how many are there, and what are they doing? **Annual Review of Genetics**. v.44,n. p. 167-188, 2010.

TILMAN, D., *et al.* Agricultural sustainability and intensive production practices. **Nature**. v.418,n. 6898, p. 671-677, 2002.

TINOCO, M. L. P., *et al.* *In vivo* trans-specific gene silencing in fungal cells by in planta expression of a double-stranded RNA. **BMC Biology**. v.8,n. 1, p. 27-38, 2010.

TJAMOS, E., *et al.* Biological management of plant diseases: highlights on research and application. **Journal of Plant Pathology**. v.92,n. 4, p. 17-21, 2010.

TOMILOV, A. A., *et al.* Trans-specific gene silencing between host and parasitic plants. **The Plant Journal**. v.56,n. 3, p. 389-397, 2008.

TORCHILIN, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. **Nature Reviews Drug Discovery**. v.4,n. 2, p. 145-160, 2005.

TOURNAS, V. Spoilage of vegetable crops by bacteria and fungi and related health hazards. **Critical Reviews in Microbiology**. v.31,n. 1, p. 33-44, 2005.

TRIPATHI, M., *et al.* Agro-nanotechnology: A Future Technology for Sustainable Agriculture. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**. v.1,n. 7, p. 196-200, 2018.

TSUGE, S., *et al.* Regulatory network of hrp gene expression in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Journal of General Plant Pathology**. v.80,n. 4, p. 303-313, 2014.

UNTERGASSER, A., *et al.* Primer3—new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Research**. v.40,n. 15, p. e115-e115, 2012.

VAN DE WOUW, A. P. and IDNURM, A. Biotechnological potential of engineering pathogen effector proteins for use in plant disease management. **Biotechnol Adv**.n. p., 2019.

VANDESOMPELE, J., *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**. v.3,n. 7, p. research0034. 0031, 2002.

VICENTE, J., *et al.* Identification of isolates that cause a leaf spot disease of brassicas as *Xanthomonas campestris* pv. *raphani* and pathogenic and genetic comparison with related pathovars. **Phytopathology**. v.96,n. 7, p. 735-745, 2006.

VICENTE, J. G. and HOLUB, E. B. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops. **Molecular Plant Pathology**. v.14,n. 1, p. 2-18, 2013.

- VLEESHOUWERS, V. G. A. A. and OLIVER, R. P. Effectors as Tools in Disease Resistance Breeding Against Biotrophic, Hemibiotrophic, and Necrotrophic Plant Pathogens. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v.27,n. 3, p. 196-206, 2014.
- VORHOLTER, F. J., *et al.* The genome of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 and its use for the reconstruction of metabolic pathways involved in xanthan biosynthesis. **Journal of Biotechnology**. v.134,n. 1-2, p. 33-45, 2008.
- VORHOLTER, F. J., *et al.* Comparison of two *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* genomes revealed differences in their gene composition. **Journal of Biotechnology**. v.106,n. 2-3, p. 193-202, 2003.
- WANG, H., *et al.* oprM as a new target for reversion of multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa* by antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**. v.60,n. 3, p. 275-282, 2010.
- WANG, P., *et al.* Nanotechnology: A New Opportunity in Plant Sciences. **Trends in Plant Science**. v.21,n. 8, p. 699-712, 2016.
- WANG, X., *et al.* The role of effectors and host immunity in plant-necrotrophic fungal interactions. **Virulence**. v.5,n. 7, p. 722-732, 2014.
- WANG, X., *et al.* Characterization of a canola C2 domain gene that interacts with PG, an effector of the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Experimental Botany**. v.60,n. 9, p. 2613-2620, 2009.
- WANG, Y., *et al.* Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. **Nature Biotechnology**. v.32,n. 9, p. 947-951, 2014.
- WANI, K. A. and KOTHARI, R. Agricultural Nanotechnology: Applications and Challenges. **Annals of Plant Sciences**. v.7,n. 3, p. 2146-2148, 2018.
- WARWICK, S. I. *Brassicaceae* in agriculture. In: WARWICK, S. I. **Genetics and Genomics of the Brassicaceae**, Springer. v., p.33-65, 2011.
- WARWICK, S. I., *et al.* Phylogenetic relationships in the tribes *Anchonieae*, *Chorisporeae*, *Euclidieae*, and *Hesperideae* (*Brassicaceae*) based on nuclear ribosomal ITS DNA sequences. **Annals of the Missouri Botanical Garden**. v.94,n. 1, p. 56-79, 2007.
- WATERHOUSE, P. M., *et al.* Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.95,n. 23, p. 13959-13964, 1998.
- WATERS, L. S. and STORZ, G. Regulatory RNAs in bacteria. **Cell**. v.136,n. 4, p. 615-628, 2009.

WEI, Y., *et al.* RAV transcription factors are essential for disease resistance against cassava bacterial blight via activation of melatonin biosynthesis genes. **Journal of Pineal Research**. v.64,n. 1, p. e12454, 2018.

WESLEY, S. V., *et al.* Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. **The Plant Journal**. v.27,n. 6, p. 581-590, 2001.

WHARTON, P. and KIRK, W. White Mold. **Michigan Potato Diseases**. v.1,n. 1, p. 1-4, 2007.

WILLIAMS, P. H. Black rot. **Rimmer RS, Shattuk VI & Buchwaldt L (Eds.)**. v.1,n. 1, p. 60-62, 2007.

WYENANDT, A. Controlling Black Rot of Cabbage and Other Crucifer Crops. **Plant & Pest Advisory**. v.1,n. 1, p. 1-6, 2008.

XIAO, X., *et al.* Novel secretory protein Ss-Caf1 of the plant-pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* is required for host penetration and normal sclerotial development. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v.27,n. 1, p. 40-55, 2014.

XU, R.-Q., *et al.* AvrACXcc8004, a type III effector with a leucine-rich repeat domain from *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* confers avirulence in vascular tissues of *Arabidopsis thaliana* ecotype Col-0. **Journal of Bacteriology**. v.190,n. 1, p. 343-355, 2008.

XUE, X.-Y., *et al.* Advances in the delivery of antisense oligonucleotides for combating bacterial infectious diseases. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**. v.14,n. 3, p. 745-758, 2018.

XUE, X. Y., *et al.* Advances in the delivery of antisense oligonucleotides for combating bacterial infectious diseases. **Nanomedicine**. v.14,n. 3, p. 745-758, 2018.

YANG, C., *et al.* Advances in plant-derived edible nanoparticle-based lipid nano-drug delivery systems as therapeutic nanomedicines. **Journal of Materials Chemistry B**. v.6,n. 9, p. 1312-1321, 2018.

YANG, D., *et al.* Biological control of *Bacillus amyloliquefaciens* strain XZ-1 against black rot on sweetpotato. **Southwest China Journal of Agricultural Sciences**. v.31,n. 4, p. 736-741, 2018.

YANG, J., *et al.* Design, preparation and application of nucleic acid delivery carriers. **Biotechnology Advances**. v.32,n. 4, p. 804-817, 2014.

YIN, C. and HULBERT, S. Host induced gene silencing (HIGS), a promising strategy for developing disease resistant crops. **Gene Technology**. v.4,n. 3, p. 130-131, 2015.

YIN, C. and HULBERT, S. H. Host-Induced Gene Silencing (HIGS) for elucidating *Puccinia* Gene Function in Wheat. In: YIN, C. and HULBERT, S. H. **Plant Pathogenic**

Fungi and Oomycetes: Methods and Protocols. W. Ma and T. Wolpert. New York, NY, Springer New York. v. 1848, p.139-150, 2018.

YIN, C., *et al.* Development of a host-induced RNAi system in the wheat stripe rust fungus *Puccinia striiformis f. sp. tritici*. **Molecular Plant-Microbe Interactions.** v.24,n. 5, p. 554-561, 2011.

YOO, B.-C., *et al.* A systemic small RNA signaling system in plants. **The Plant Cell.** v.16,n. 8, p. 1979-2000, 2004.

YUAN, Z., *et al.* Genetic and proteomic analyses of a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* purC mutant deficient in purine biosynthesis and virulence. **Journal of Genetics and Genomics.** v.40,n. 9, p. 473-487, 2013.

ZHAO, S. and FERNALD, R. D. Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. **Journal of Computational Biology.** v.12,n. 8, p. 1047-1064, 2005.

ZHAO, Y. and HUANG, L. Lipid nanoparticles for gene delivery. **Advances in Genetics.** v.88,n. p. 13-36, 2014.

ZHOU, B., *et al.* Control of brown patch (*Rhizoctonia solani*) in tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) by host induced gene silencing. **Plant cell reports.** v.35,n. 4, p. 791-802, 2016.

ZHU, W., *et al.* A secretory protein of necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* that suppresses host resistance. **PLoS One.** v.8,n. 1, p. e53901, 2013.

ZHU, X., *et al.* Host-Induced Gene Silencing of the MAPKK Gene PsFUZ7 Confers Stable Resistance to Wheat Stripe Rust. **Plant Physiol.** v.175,n. 4, p. 1853-1863, 2017.

ZHUO, T., *et al.* Molecular study on the carAB operon reveals that carB gene is required for swimming and biofilm formation in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **BMC Microbiology.** v.15,n. 1, p. 225, 2015.

ZUKER, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. **Nucleic Acids Research.** v.31,n. 13, p. 3406-3415, 2003.

ZUPPINI, A., *et al.* An endopolygalacturonase from *Sclerotinia sclerotiorum* induces calcium-mediated signaling and programmed cell death in soybean cells. **Molecular Plant-Microbe Interactions.** v.18,n. 8, p. 849-855, 2005.

APÊNDICE A – “VALIDATION OF AN *in vitro* SYSTEM FOR STUDIES OF PATHOGENICITY MECHANISMS IN *Xanthomonas campestris*”.



FEMS Microbiology Letters, 364, 2017, fnx217

doi: 10.1093/fms/fnx217

Advance Access Publication Date: 12 October 2017

Research Letter

RESEARCH LETTER – Pathogens & Pathogenicity

Validation of an *in vitro* system for studies of pathogenicity mechanisms in *Xanthomonas campestris*

Mariana Rocha Maximiano^{1,2}, Osmundo B. Oliveira-Neto¹,
Octávio L. Franco^{2,3,4} and Angela Mehta^{1,*}

¹Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PBI, Av. W/5 Norte Final, Brasília, Distrito Federal 70770-917, Brazil, ²Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Imunologia e DIP/Genética e Biotecnologia), Universidade Federal de Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer, S/n - Martelos, Juiz de Fora, Minas Gerais, 36036-330, Brazil, ³S-Inova Biotech, Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Av. Tamandaré, 6000, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, 79117-900, Brazil and ⁴Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, SGAN 916N, Módulo C, Sala 219, Brasília, Distrito Federal 70790-100, Brazil

*Corresponding author: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PBI, Av. W/5 Norte Final, Brasília, Distrito Federal 70770-917, Brazil.

Tel: +55 (61) 3448-4901; Fax: +55 (61) 3340-3658; E-mail: angela.mehta@embrapa.br

One sentence summary: The authors showed that addition of plant extract to a defined medium resulted in patterns of virulence-associated gene expression that more closely mimicked in-plant conditions than did defined medium alone.

Editor: David Studholme

ABSTRACT

Several minimal media capable of inducing pathogenicity genes have been used to study plant–pathogen interactions. An *in planta* assay to study a closer interaction between the bacteria and the host was also developed and has been employed by our group. In order to determine whether growth medium could be improved to better approximate *in planta* conditions beyond that offered by the defined minimal medium XVM1, we compared the expression of 20 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) genes by quantitative reverse transcription - polymerase chain reaction (qRT-PCR) under *in vivo* (bacteria recovered from the plant) and *in vitro* (rich medium NYG, minimal medium XVM1 and XVM1 + leaf extract) growth systems. The results showed a higher expression level of the genes in the *in planta* system when compared to growth in culture media. *In planta* growth is closest to a real interaction condition and captures the complexity of the plant cell environment; however, this system has some limitations. The main finding of our work is that the addition of plant extract to XVM1 medium results in a gene expression profile that better matches the *in planta* profile, when compared with the XVM1 medium alone, giving support to the use of plant extract to study pathogenicity mechanisms in *Xanthomonas*.

Keywords: plant–pathogen interaction; black rot disease; gene expression; qRT-PCR

INTRODUCTION

Xanthomonas campestris is a complex species formed by over 140 pathovars, which are pathogenic variants within a species, defined by a group of host plants and/or tissue specificity. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) is of high economic im-

portance since it causes black rot disease that affects all crucifer plants (members of the Brassicaceae family), causing severe losses in production (Vauterin et al. 1995; Vorholter et al. 2003; Ryan et al. 2011).

The genome sequences of *X. campestris* have been determined for three isolates of Xcc (da Silva et al. 2002; Qian et al.

Received: 21 September 2017; Accepted: 11 October 2017

© FEMS 2017. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com

2005; Vorholter et al. 2008), and the analysis of pathogenicity genes revealed four important gene clusters: xps cluster encoding a type II secretion system; gum cluster encoding xanthan synthesis; regulation of pathogenicity factors (rpf) cluster that regulates pathogenicity factors and hrp cluster that encodes the type III secretion system and is responsible for the hypersensitive response in the plant and pathogenicity (Arlat et al. 1991; Alfano and Collmer 1997; Ryan et al. 2011; Kakkar et al. 2015). The type III secretion system is important for the infection process, since this system transfers effector proteins directly into the host cells. In general, the hrp cluster is suppressed in complex growth medium and induced in the plant or in media that simulate the intracellular contents of the host (Arlat et al. 1991; Schulte and Bonas 1992a,b; Alfano and Collmer 1997; Wengelnik, Rossier and Bonas 1999; Castaneda et al. 2005; Lorenz et al. 2008; Ryan et al. 2011). Pioneer studies of pathogenicity genes in *Xanthomonas* using a defined medium were performed by Schulte and Bonas (Schulte and Bonas 1992b) and focused on the hrp cluster. These authors showed that the expression of this cluster was repressed in rich media and its induction in minimal media was dependent on low concentrations of phosphate and sodium chloride, as well as the presence of sucrose or fructose as a carbon source, and sulfur-containing amino acid. As a result, a minimal medium called XVM1 was developed for *in vitro* expression studies of hrp genes (Schulte and Bonas 1992b).

To better understand the infection process in response to host defense, several studies followed using minimal media (*in vitro* systems), in an attempt to mimic the plant cell, as well as *in planta* systems (Mehta and Rosato 2001; da Silva et al. 2002; Mehta and Rosato 2003; Tahara, Mehta and Rosato 2003; Vorholter et al. 2003; Bogdanove et al. 2011; Jiang et al. 2013; Liu et al. 2015; Santos et al. 2017). Both systems have certain limitations; on one hand, the *in vitro* system is not able to provide the complexity of the apoplastic environment (Preston 2017) and on the other hand, in the *in planta* system, a low amount of bacterial cells can be recovered from the plant and a high number of plant compounds (debris and proteins) are detected in the samples (Santos et al. 2017).

An intermediate assay for *in vitro* analysis involves the addition of host-derived compounds, such as leaf extract. Indeed this system has been used in order to get closer to the *in planta* condition (Mehta and Rosato 2001; Tahara, Mehta and Rosato 2003; Astua-Monge et al. 2005; Kim et al. 2016). However, little information is available regarding the comparison of genes expressed *in vitro* and *in planta* and is limited to a few genes. Therefore, the objective of the present work was to compare the different growth systems, using quantitative reverse transcription - polymerase chain reaction (qRT-PCR) approach, to detect the induction of genes involved in pathogenicity. In this study, well-known pathogenicity genes, including *hrp*, *rpf* and *Avirulence (avr)* were selected, as well as genes identified in proteomic studies previously conducted by our group (*argD*, *carB*, *clp*, *clpX*, *fahH*, *fubV*, *ilvC* and *ssb*; Santos et al. 2017). This study, together with the results of previous investigations, allows us to give one step forward in knowledge and support the use of a simple *in vitro* assay for plant-pathogen interaction studies as a valid choice to mimic *in vivo* conditions.

MATERIALS AND METHODS

In planta system—infiltration of Xcc in *Brassica oleracea* leaves

Xanthomonas campestris pv. *campestris* isolate Xcc 51, obtained from the culture collection of Embrapa Hortaliças was grown

on nutrient yeast glycerol (NYG) medium (Daniels et al. 1984). *Brassica oleracea* susceptible cultivar Veloce (commercialized by Agristar do Brasil, Santo Antônio de Posse, SP, Brazil) was maintained in greenhouse conditions, and young leaves were used in this study. Fifty plants were seeded and after 45 days of sowing, nine plants showing similar growth were selected for the *in vivo* assay (bacterial recovery). Xcc 51 was pre-cultured in 5 mL of NYG and 500 μ L of the pre-culture was added to 50 mL of NYG medium in 250 mL Erlenmeyer flasks. Cells were centrifuged, suspended in saline solution (NaCl 0.85%) and adjusted to $OD_{600} = 0.6$ (about 3×10^8 CFU/mL). This bacterial solution was used to infiltrate the leaves with a needle-free syringe.

Initially, a population dynamics study *in planta* was performed in order to verify the bacterial growth. The infiltration was made in one inoculation point at the abaxial leaf blade. A total of five biological replicates were performed. Plants were challenged with independently prepared cells grown from a master cell stock. Leaf discs of 0.8 cm in diameter were excised at 0, 24, 48, 72 and 120 h after inoculation (hai), macerated in 1 mL of water and plated onto Petri dishes in appropriate dilutions. A total of three technical replicates per dilution were performed and colony forming units (CFU) were counted.

For the *in planta* expression analysis, the bacterium recovery from the plant was performed according to Mehta and Rosato (Mehta and Rosato 2003), with some modifications. At 48 hai (time point with the highest amount of bacterial cells), 15 leaves from three plants (five leaves from each plant) were collected. The infiltrated areas were cut using a sterile razor blade in Petri dishes containing 25 mL of deionized water and maintained at room temperature for 25 min. The water containing the bacterial cells was filtered under vacuum using filter paper (Millipore, Bedford, MA, USA) and again in 5 μ m filters (Minisart[®], Sartorius, Goettingen, Germany). The recovered bacterial suspension was centrifuged, and the bacterial pellet was frozen in liquid nitrogen and maintained at -80°C for RNA purification.

In vitro systems—Xcc cultured in different growth media

Different *in vitro* systems were used in this study and compared to the *in vivo* growth condition. The rich medium NYG was used, as well as the minimal medium XVM1. To evaluate the effector induction in Xcc 51, we used XVM1, modified XVM1 (XVM1 100 mM NaCl) to inhibit effector induction (Schulte and Bonas 1992b), used as the control, and XVM1 with plant extract, prepared from leaves of the susceptible host Veloce (*B. oleracea*). The plant extract was prepared from plants grown in a greenhouse for 45 days. The leaves were collected, washed several times with sterile distilled water and 10 g of fresh leaves without the midribs were cut into small pieces and triturated in 100 mL of distilled water using a hand blender (Philips). The homogenate was filtered using 0.45 and 0.22 μ m membranes (Millipore, Bedford, MA, USA) and stored at -20°C . The extract was added to XVM1, hereafter called XVM1*, to obtain a final concentration of 1 mg leaves (fresh weight)/mL medium (Mehta and Rosato 2001; Tahara, Mehta and Rosato 2003).

Thus, we analyzed the induction of effectors in Xcc 51 under four *in vitro* conditions. A growth curve was determined for all four media, and the mid-exponential phase was used to collect cells for further analysis using a spectrophotometer (Eppendorf BioPhotometer[®], Hamburg, Germany). A total of three independent experiments were performed from independently prepared cells grown from a master cell stock.

Table 1. General information of the primers selected for gene expression analysis.

Gene symbol	Annotation	Forward primer (5'-3')	Tm +C	Reverse Primer (5'-3')	Tm +C	Amplicon size
<i>acpP</i> ^a	Acyl carrier protein	GAAGAGGAAGTCACCACCAG	57,25	GCACTCGAAGCTCTTCTTCCA	58,16	102
<i>askA</i>	Adenylate kinase	GGTGGGTGGAATCGGTAT	59,85	ATTGCTGGTTGAGCGGATCG	61,09	108
<i>argD</i>	Acetylornithine transaminase protein	GGATCTGGCCAAACACA	57,7	AGATTGCCGAGAATGTGG	57,1	90
<i>avrBs2</i>	Avirulence protein	ACCGCGAGAACAGATTG	53,81	CGGTCTTGATGAAGTTGC	54,27	99
<i>avrXccCFm</i>	Avirulence protein	CTACTCTGTCTTGCGTGTG	55,80	GGAGAACTATGCCGATGAC	55,05	110
<i>avrB</i>	Carbamoyl-phosphate synthase large chain	TGCTCTACATCGTCAACACC	57,1	GACAGTGGTCGAATAGGTCA	56	104
<i>Clp</i>	cAMP-regulatory protein	GCTTTGCTTGTGGTATGAG	56,24	GTTCAGACGAGTTTGTGGC	57,72	93
<i>clpX</i>	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX	ATGTACGAACTGCGGTAC	57,1	GCCTGGTAGATCAGATACGG	57,2	95
<i>fabH</i>	3-oxoacyl-ACP synthase	GTGTTCAAGTACGGCGTCAA	59,76	GATCAACCAGTCCAGGTGCT	59,97	93
<i>fabV</i>	Trans-2-enoyl-CoA reductase	CACCAACAAGGACACCAT	55,47	ATCCACAGTTCCCAATCC	54,90	105
<i>hrpA</i>	ATP dependent RNA helicase	ATGGGATCCAGATACCAG	53,44	TAACCTCAAGGTGCTGGGA	54,91	105
<i>hrpG</i>	Regulator-HrpG protein-type III secretion protein HrpG	AAAAGATGGTGACCTCTGGG	57,11	AAGGATCGGCATTGCTACTG	57,77	93
<i>hrpX</i>	Regulator ara-C	GGCTTGTAAGTGTAGGG	56,7	GATCTCAAGCGTGGTGATTC	58,2	100
<i>ilvC</i>	Ketol-acid reductoisomerase	ATCTATGGCGTCTACCAGGAC	58,16	OCTTGAACGTGGTCTTGATG	59,13	109
<i>iroN</i>	TonB-dependent receptor	GTGGACAACGACTTOGATAC	55,57	GCTGAAGGTGTAGTTCTTGG	55,02	102
<i>purC</i>	Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase	CACGAAGCTGCTTGTGCTAG	55,48	GTACATGATGGACGAGATGC	57,46	103
<i>rfpB</i>	Long-chain fatty acyl CoA ligase	AATACCGGATGCCACCTTC	57,98	GAGTCGATCAACTGGTGCCTT	57,98	103
<i>rfpC</i>	Response regulator	CGCTATGGCAGCAACTATCT	58,17	AGATAGGGGATTGGCTTTCCA	58,60	101
<i>rfpG</i>	Response regulator	CGGAGTTGAAGGTCTAAGAT	56,9	GGTAATCGAGCAGCAACAG	57	90
<i>rfpH</i>	Response regulator	AOCAGCGTTTCCAATAGCAC	58,92	TAGCGTACGCCAACAATGACA	57,93	102
<i>Ssb</i>	Single-stranded DNA-binding protein	GTTCCTGGTTATTGCCTTGG	59,57	GATCGCGACACCAAGTACAC	57,84	100
<i>xopAc</i>	Type III effector protein with a leucine-rich repeat domain <i>AvrACXcc8004</i>	AOCTGGACGATGTAGCTGT	55,60	GACAACCTCTGTCTGGTCTC	54,56	103

^aReference genes.

Purification of RNA and cDNA synthesis

Total RNA was extracted using hot acid phenol method (Aiba, Adhya and de Crombrughe 1981). RNA quantification was performed using the spectrophotometer NanoDrop[®] (ND-1000 UV-Vis -Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). The integrity of total RNA was confirmed by electrophoresis. Before cDNA synthesis, RNA was treated with Turbo DNase (Applied Biosystems/Ambion, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions to eliminate any possible contamination with genomic DNA. cDNA was synthesized from 1 µg of total RNA using the kit Go Script Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions. The cDNA samples were stored at -20°C for further analyses.

PCR primer design

The primers specific to genes encoding effectors and proteins involved in pathogenicity of Xcc were chosen according to the results obtained in our research group (Santos et al. 2017) and based on the literature (Table 1). These oligonucleotides were designed to meet the following parameters: primer size up to 21 nucleotides, amplicon size between 90 and 110 bp, melting temperature of 58°C-60°C for each primer, absence of hairpins

and absence of nonspecific amplification (Srivastava et al. 2011). Primer 3 software (Untergasser et al. 2012) was used to design all the primers, and the absence of nonspecific amplification and hairpins was evaluated using the software OligoAnalyzer 3.1 (Owczarzy et al. 2008).

qRT-PCR and data analyses

The qRT-PCR experiments were performed in the thermal cycler 7300 Real-Time polymerase chain reaction (PCR) System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The reaction consisted of Fast SYBR[®] Green Master Mix (Applied Biosystems), 0.2 µM of each primer (forward and reverse) and 2 µL single stranded cDNA (diluted 20X) corresponding to each sample. The PCR program used was one step at 95°C for 10 min to activate the Taq polymerase enzyme (hot start), 95°C for 15 s, 60°C for 60 s repeated for 40 cycles. The denaturation curve—melting curve—was held after the end of the amplification to verify the presence of nonspecific products or primer dimers. The program used was 95°C for 15 s, 60°C for 60 s and an increase of 0.3°C up to 95°C. All experiments were performed using three independent biological replicates. Three technical replicates were performed for each biological replicate. The qRT-PCR reactions were performed in 96-well plates, and in each plate a negative control with no cDNA template was included to ensure the absence of contami-

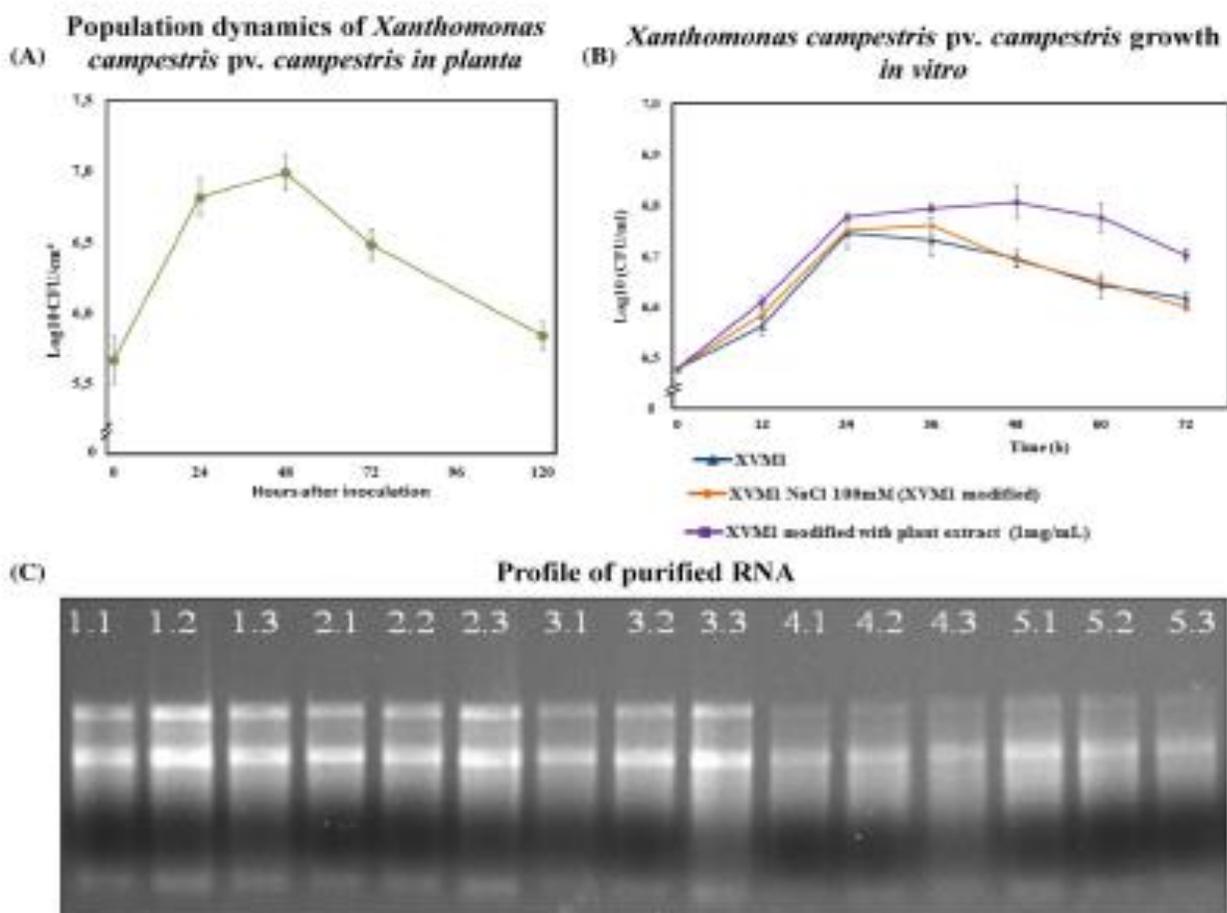


Figure 1. (A) Population dynamics of Xcc 51 in planta. (B) Growth curves of Xcc in vitro. (C) Purified RNA profiles. 1.1, 1.2, 1.3: Xcc 51 grown in modified XVM1. 2.1, 2.2, 2.3: Xcc 51 grown in XVM1. 3.1, 3.2, 3.3: Xcc 51 grown in XVM1 with plant extract (1 mg/ml). 4.1, 4.2, 4.3: Xcc 51 grown in NYG. 5.1, 5.2, 5.3: Xcc 51 grown in the in planta system.

nation. Reactions with DNase-treated RNA were also performed to confirm the absence of DNA contamination. The raw data of fluorescence for all runs were imported into the Real-time PCR Miner software (Zhao and Fernald 2005) in order to determine the quantification cycle value and the PCR efficiency. The analyses of expression and statistics were performed using the Relative Expression Software Tool (REST) software (Pfaffl, Horgan and Dempfle 2002). To compare the differences in expression between the groups, *t*-test was used with four degrees of freedom, $n = 9$ (three biological and three technical replicates for each biological replicate) and 95% of confidence.

RESULTS AND DISCUSSION

Growth of Xcc in planta and in vitro

According to the literature, most studies of *Xanthomonas* species have been performed in vitro, which raises the doubt if culture media are able to reproduce what occurs in vivo. Here different growth conditions were compared in order to determine whether growth medium could be improved to better match in planta conditions beyond that offered by the defined minimal medium XVM1. Initial experiments were directed at evaluating

bacterial growth in the different conditions. In order to determine the sampling point with the highest number of Xcc cells in planta, a population dynamics analysis was performed. The results revealed that at 48 h after the bacterial cells reached maximum growth, which was 1×10^7 CFU/cm² (Fig. 1a). For the in vitro system using minimal media, Xcc growth was monitored for 72 h and cell density was evaluated every 12 h during this period (Fig. 1b). According to the data obtained, the mid-exponential phase reached $OD_{600nm} = 0.5$ during growth in XVM1, XVM1 100 mM NaCl and XVM1+ media. In NYG medium, the mid-exponential phase was obtained at $OD_{600nm} = 0.8$. These results are in accordance with data reported in the literature for the growth of *Xanthomonas* sp. in these media (Tahara, Mehra and Rosato 2003; Liu et al. 2013).

qRT-PCR analyses

According to our previous publications and data from the literature, we chose several genes involved in pathogenicity in order to verify their expression under in vitro and in vivo growth conditions. The qRT-PCR and statistical analyses of the results were carried out with the REST software (Pfaffl, Horgan and Dempfle 2002), using as the internal control the combination of

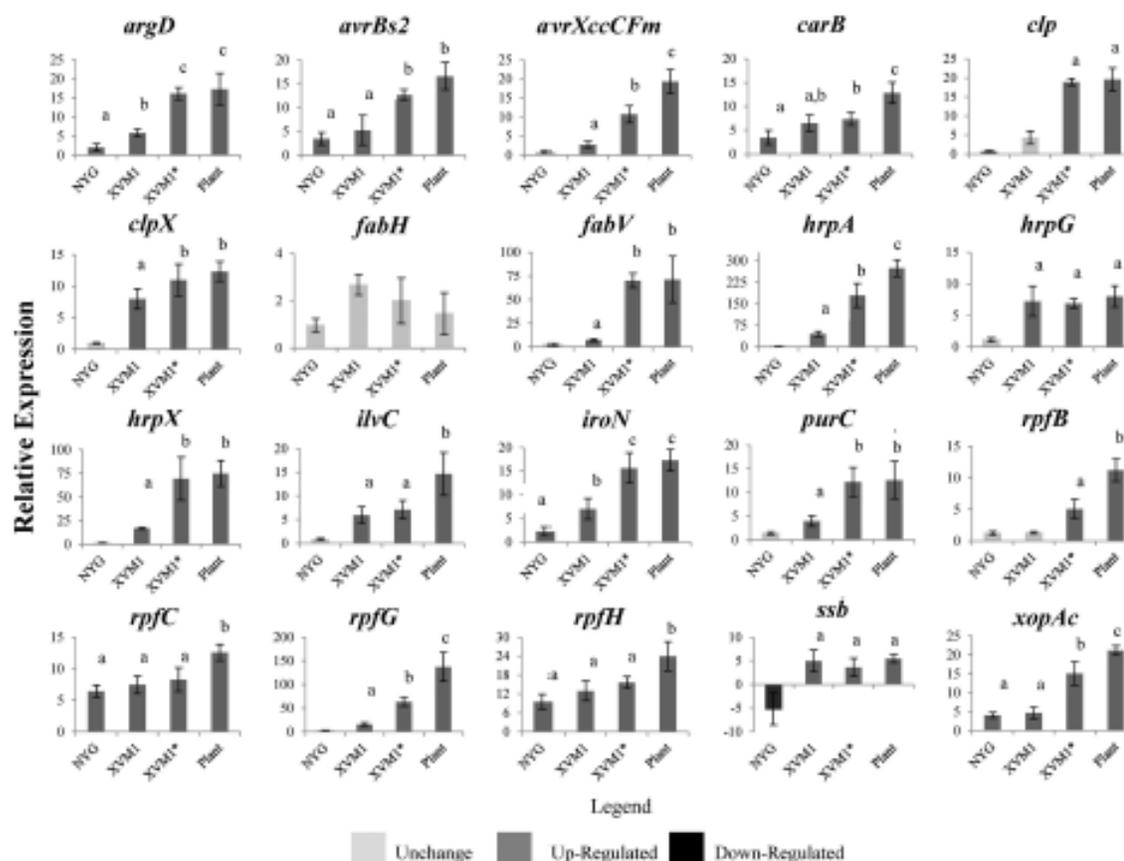


Figure 2. Relative expression of *Xcc* genes involved in pathogenicity, during in planta and *in vitro* growth. Each value represents the mean of *n.s.* of three independent experiments. Different letters represent statistical differences ($P < 0.05$) between the groups. XVM1* is XVM1 with plant extract (1 mg/ml). The relative expression of the genes was considered up-regulated, down-regulated or unchanged, according to the statistical analysis of the REST software.

adk (adenylate kinase; da Silva et al. 2002; Lu et al. 2009) and acpP (acyl carrier protein; Huang, Zhang and Birch 2000; da Silva et al. 2002) genes, determined with the assistance of geNorm software (Vandesompele et al. 2002). The amplification efficiencies were determined individually for each sample by Real-time PCR Miner software (Zhao and Fernald 2005) and were above 90% for all genes evaluated (90%–95%).

The relative expression of *Xcc* genes was calculated relative to the control (*Xcc* grown in XVM1 100 mM NaCl), which does not induce the *hrp* genes (Schulte and Bonas 1992b). After determination of relative gene expression, a statistical analysis was performed to determine the difference in relative expression of *Xcc* grown in the *in vitro* and *in planta* systems. Genes were considered up-regulated, down-regulated or unchanged (Fig. 2), according to the statistical analysis of the REST software.

The main purpose of this work was to validate the closest growth system to a host plant infection condition. For that, we evaluated the gene expression of several genes, including genes from the *hrp* cluster *hrpA*, *hrpG* and *hrpX*, which were selected as positive controls since they have been well studied in minimal media and in planta.

hrpA (adenosine triphosphate [ATP]-dependent helicase) acts in the pilus synthesis, while *hrpG* and *hrpX* are expression reg-

ulators of this cluster (Alfano and Collmer 1997; Su et al. 2016). The expression profile of these genes showed, as expected, an up-regulation in *Xcc* grown in XVM1, XVM1* and in planta, when compared to the control. Interestingly, the fold change of *hrpA* was 275 in planta, 180 in XVM1* and 46 in XVM1 (Fig. 2), showing that the expression in planta was much higher than in the *in vitro* systems and that XVM1* profile was closest to that observed in planta. The *hrpG* and *hrpX* genes were also up-regulated when compared to the control; however, *hrpG* expression was not statistically different in XVM1, XVM1* and in planta and the maximum fold change was of 8. On the other hand, *hrpX* expression showed a maximum fold change of 69 in XVM1* and 75 in planta with no statistical difference among them, while the fold change in XVM1 was 17.

The work performed by Guo et al. (Guo et al. 2011) showed that *hrpG* and *hrpX* play important roles in coordinating different categories of genes. They also suggest that these genes interact with an overall signaling network and coordinate the expression of multiple virulence factors for modification and adaptation of host environment during *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* infection. In *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, it has been shown that the expression of *hrpA* and *hrpX* is not dependent on sugar source, differently from the others genes of this cluster (Ikawa and Tsuge 2016). This could explain the lower expression

of *hrpX* in XVM1 and its induction by plant compounds in XVM1* and in plants, showing the efficiency of XVM1*.

Genes of the *rpf* cluster were also evaluated due to their role in the Xcc infection process, acting in cell-to-cell signaling [2]. The selected genes of this cluster were *rpfB* (long chain of fatty acyl CoA ligase), *rpfC* (sensor kinase), *rpfG* ('two-component' sensor regulator pair) and *rpfH* (putative membrane protein; Barber et al. 1997; He and Zhang 2008). All four *rpf* genes analyzed are involved in a coordinated system for the production of virulence factors by diffusible extracellular factor- (DSF) mediated cell-cell communication (Warwick et al. 2007). In this mechanism, *rpfB* is responsible for generating a signal to *rpfC* and *rpfG* acting in the perception and transduction of the signal. It was reported that a mutation in *rpfB* suppressed the production of DSF (He and Zhang 2008), but *rpfH* together with *rpfC* (Slater et al. 2000) and *rpfG* acted as positive regulators of EPS (synthesis of extracellular polysaccharides) and DSF (He and Zhang 2008). The relative expression of these genes showed a fold change near 15 for Xcc in plants, except for *rpfG*, which reached a fold change of 137, whereas the fold change in XVM1 was 16 and in XVM1* was 64. The expression profiling of these genes (Fig. 2) suggests that the activation of *rpfG* is triggered by environmental factors (Barber et al. 1997), associated with the growth medium XVM1 that mimics the intracellular plant environment, XVM1* with plant extract and in the host itself, showing the role of host molecules in its up-regulation, especially in the in plants condition.

Avr proteins are well-known effectors secreted by the type III secretion system (da Silva et al. 2002; Ignatov et al. 2002; Castaneda et al. 2005; Xu et al. 2008; Ho et al. 2013). In this study, we evaluated the relative expression of *avrBs2*, *avrXccFm* and *xopAc*. Studies suggested that the three genes play important roles in pathogenicity/race specificity and that *xopAc* could be related to Xcc's capacity to colonize the host xylem (Castaneda et al. 2005; Vicente and Holub 2013). The gene expression profile showed an up-regulation of *avrBs2* and *xopAc* in all conditions, but the expression in NYG and XVM1 did not differ statistically. For *avrBs2*, the expression in XVM1* and in plants was not statistically different, whereas for *avrXccFm* and *xopAc* the fold change in plants was higher than in XVM1*. These results support the hypothesis that *xopAc* is linked to the ability of Xcc to colonize the host xylem, and this hypothesis could explain the difference between the fold change of *xopAc* in Xcc grown in XVM1* and in plants.

All the genes mentioned above are well-known pathogenicity genes. The results obtained showed that XVM1* (XVM1 + leaf extract) provides a closer approximation than does XVM1 alone to in plants conditions and therefore offers an improved in vitro model for bacteria-plant interactions.

We were also interested in evaluating other genes previously identified by our proteomic studies in plants (Santos et al. 2017). Therefore, in this study we evaluated some genes encoding proteins involved in the metabolism of Xcc, increased during the interaction Xcc-*Brassica oleracea*, since proteins involved in amino acids biosynthesis and metabolism in general have important roles in the virulence of the pathogen (Lima et al. 2008). We analyzed the interaction between Xcc and *B. oleracea* by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and identified unique and increased proteins potentially involved in pathogenicity, including ArgD, CarB, Clp, ClpX, FabH, FabV, IivC, IroN, PurC and Ssb. The corresponding genes were previously analyzed by qRT-PCR in plants and showed an increased expression when compared to growth in NYG (Santos et al. 2017). In this study, we evaluated the expression of these genes in differ-

ent culture media and in the presence of plant extract. We also analyzed in plants using a different susceptible cultivar of *B. oleracea*.

Among the genes analyzed, we can highlight *argD*, *clp*, *iroN*, *fabV* and *purC*, which did not show a statistical difference in expression during growth in XVM1* and in plants and showed a high fold change when compared to the other growth media (Fig. 2). All of these genes have been implicated in virulence. For example, Ramos et al. (Ramos et al. 2014) revealed that a mutation in *argD* of *Erwinia amylovora* caused reduced virulence. Similarly, a mutation in *purC* affected the expression levels of diverse proteins involved in purine and pyrimidine synthesis, carbon and energy metabolisms, iron uptake, proteolysis, protein secretion and signal transduction (Yuan et al. 2013). Clp (CRP-like protein) is a conserved global regulator playing an important role in regulation of virulence factor production (He et al. 2007; Warwick et al. 2007) and *iroN* is a TonB-dependent receptor, a membrane protein acting in cell signaling (Ryan et al. 2011).

Interestingly, the results obtained in this study showed that the expression profiles of all genes analyzed showed an increased expression under in plants conditions, and in several cases, a similar profile was obtained in the presence of plant extract (XVM1*). On the other hand, the expression profile of these genes in XVM1 condition showed a lower expression level (Fig. 2). It was interesting to observe that the expression of *carB* was not statistically different in XVM1 and XVM1* but was higher in plants. *carB*, a Carbamoyl-phosphate synthase, acts in the biosynthesis of arginine (Zhuo et al. 2015), which has been considered as a factor involved in the virulence of *Xanthomonas* (Ficarra et al. 2015). These results show that plant extract cannot always replace in plants conditions. Although several studies have used synthetic media to mimic the apoplastic environmental or media containing molecules of the host (plant extract) to evaluate gene expression and protein abundance (Mehta and Rosato 2001; Tahara, Mehta and Rosato 2003; Astua-Monge et al. 2005; Kim et al. 2016), in vivo conditions should be always preferred whenever possible, since they provide the biochemical and spatial complexity of the apoplastic environmental, and include the dynamic changes in apoplast composition (Soto-Suárez et al. 2010; Tsuge, Furutani and Ikawa 2014; Chatnapat, Prathuangwong and Lindow 2016; Rashid, Ikawa and Tsuge 2016).

CONCLUSION

Currently, there are numerous studies related to Xcc, but there are still countless questions about the mechanisms of pathogenicity. As mentioned above, the ideal system to be used in plant-pathogen interaction studies is still in plants; however, there are some disadvantages such as the need for plant growth and the small amount of bacterial cells recovered from plant leaves. Moreover, in our previous proteomic studies using the in plants system (Andrade et al. 2008; Santos et al. 2017), several plant proteins were observed, which probably interfered in the detection of bacterial proteins, especially when liquid chromatography-mass spectrometry was used.

In this study, we demonstrated that XVM1* medium presented a better match to in plants conditions than did the other tested media. The expression levels of several genes analyzed were similar in XVM1* (in the presence of leaf extract) and in plants. The results also showed that NYG can be used as the control condition in post-genome studies, since pathogenicity genes are in general not induced in this medium or are induced in a very low level.

Although leaf extract does not fully represent the plant environment, the presence of plant components in the culture medium seems to induce pathogenicity genes, mimicking in planta conditions. Therefore, the use of leaf extract (XVM1⁺) could be an interesting alternative for plant-pathogen interaction studies, especially since XVM1⁺ is simpler than in planta growth.

FUNDING

This work was sponsored by Embrapa, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—CAPES, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico—CNPq and Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal—FAPDF.

Conflict of interest. None declared.

REFERENCES

- Aiba H, Adhya S, de Crombrughe B. Evidence for two functional gal promoters in intact *Escherichia coli* cells. *J Biol Chem* 1981;256:11905–10.
- Alfano JR, Collmer A. The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. *J Bacteriol* 1997;179:5655–62.
- Andrade AE, Silva LP, Pereira JL et al. In vivo proteome analysis of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in the interaction with the host plant *Brassica oleracea*. *FEMS Microbiol Lett* 2008;281:167–74.
- Arlat M, Gough CL, Barber CE et al. *Xanthomonas campestris* contains a cluster of hrp genes related to the larger hrp cluster of *Pseudomonas solanacearum*. *Mol Plant Microbe Interact* 1991;4:593–601.
- Astua-Monge G, Freitas-Astua J, Bacocina G et al. Expression profiling of virulence and pathogenicity genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *J Bacteriol* 2005;187:1201–5.
- Barber CE, Tang JL, Feng JX et al. A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. *Mol Microbiol* 1997;24:555–66.
- Bogdanove AJ, Koebnik R, Lu H et al. Two new complete genome sequences offer insight into host and tissue specificity of plant pathogenic *Xanthomonas* spp. *J Bacteriol* 2011;193:5450–64.
- Castaneda A, Reddy JD, El-Yacoubi B et al. Mutagenesis of all eight avr genes in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* had no detected effect on pathogenicity, but one avr gene affected race specificity. *Mol Plant Microbe Interact* 2005;18:1306–17.
- Chatnaparat T, Prathuangwong S, Lindow SE. Global pattern of gene expression of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* within soybean leaves. *Mol Plant Microbe Interact* 2016;29:508–22.
- da Silva AC, Ferro JA, Reinach FC et al. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* 2002;417:459–63.
- Daniels M, Barber C, Turner P et al. Cloning of genes involved in pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* using the broad host range cosmid pLAFR1. *EMBO J* 1984;3:3323–8.
- Ficarra FA, Garofalo CG, Gottig N et al. The Amino acid arginine 210 of the response regulator HrpG of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* is required for HrpG function in virulence. *PLoS One* 2015;10:e0125516.
- Guo Y, Figueiredo F, Jones J et al. HrpG and HrpX play global roles in coordinating different virulence traits of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Mol Plant Microbe Interact* 2011;24:649–61.
- He YW, Ng AY, Xu M et al. *Xanthomonas campestris* cell-cell communication involves a putative nucleotide receptor protein Clp and a hierarchical signalling network. *Mol Microbiol* 2007;64:281–92.
- He YW, Zhang LH. Quorum sensing and virulence regulation in *Xanthomonas campestris*. *FEMS Microbiol Rev* 2008;32:842–57.
- Ho YP, Tan CM, Li MY et al. The AvrB_AvrC domain of AvrXccC of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* is required to elicit plant defense responses and manipulate ABA homeostasis. *Mol Plant Microbe Interact* 2013;26:419–30.
- Huang G, Zhang L, Birch RG. Characterization of the acyl carrier protein gene and the fab gene locus in *Xanthomonas albilineans*. *FEMS Microbiol Lett* 2000;193:129–36.
- Ignatov AN, Monakhos GF, Dzhaliyov FS et al. [A virulence gene from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* homologous to the avrBs2 locus is recognized in race-specific reaction by two different resistance genes in Brassica plant species]. *Genetika* 2002;38:1656–62.
- Ikawa Y, Tsuge S. The quantitative regulation of the hrp regulator HrpX is involved in sugar-source-dependent hrp gene expression in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *FEMS Microbiol Lett* 2016;363:fnw071.
- Jiang GF, Jiang BL, Yang M et al. Establishment of an inducing medium for type III effector secretion in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Braz J Microbiol* 2013;44:945–52.
- Kakkar A, Nizampatnam NR, Kondreddy A et al. *Xanthomonas campestris* cell-cell signalling molecule DSF (diffusible signal factor) elicits innate immunity in plants and is suppressed by the exopolysaccharide xanthan. *J Exp Bot* 2015;66:6697–714.
- Kim S, Cho Y-J, Song E-S et al. Time-resolved pathogenic gene expression analysis of the plant pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *BMC Genomics* 2016;17:345.
- Lima WC, Paquola AC, Varani AM et al. Laterally transferred genomic islands in *Xanthomonadales* related to pathogenicity and primary metabolism. *FEMS Microbiol Lett* 2008;281:87–97.
- Liu W, Yu YH, Cao SY et al. Transcriptome profiling of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* grown in minimal medium MMX and rich medium NYG. *Res Microbiol* 2013;164:466–79.
- Liu YC, Wang SC, Yu YJ et al. Complete genome sequence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* strain 17 from Taiwan. *Genome Announc* 2015;3:e01466–15.
- Lorenz C, Schulz S, Wolsch T et al. HpaC controls substrate specificity of the *Xanthomonas* type III secretion system. *PLoS Pathog* 2008;4:e1000094.
- Lu GT, Tang YQ, Li CY et al. An adenosine kinase exists in *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* and is involved in extracellular polysaccharide production, cell motility, and virulence. *J Bacteriol* 2009;191:3639–48.
- Mehta A, Rosato YB. Differentially expressed proteins in the interaction of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* with leaf extract of the host plant. *Proteomics* 2001;1:1111–8.
- Mehta A, Rosato YB. A simple method for in vivo expression studies of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Curr Microbiol* 2003;47:400–3.
- Owczarzy R, Tataurov AV, Wu Y et al. IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic Acids Res* 2008;36:W163–9.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical anal-

- ysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 2002;30:e36.
- Preston GM. Profiling the extended phenotype of plant pathogens: challenges in bacterial molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol* 2017;18:443–56.
- Qian W, Jia Y, Ren SX et al. Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Genome Res* 2005;15:757–67.
- Ramos LS, Lehman BL, Peter KA et al. Mutation of the *Erwinia amylovora* *argD* gene causes arginine auxotrophy, non-pathogenicity in apples, and reduced virulence in pears. *Appl Environ Microb* 2014;80:6739–49.
- Rashid MM, Ikawa Y, Tsuge S. GamR, the LysR-type galactose metabolism regulator, regulates *hrp* gene expression via transcriptional activation of two key *hrp* regulators, HrpG and HrpX, in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Appl Environ Microb* 2016;82:3947–58.
- Ryan RP, Vorholter FJ, Potnis N et al. Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. *Nat Rev Microbiol* 2011;9:344–55.
- Santos C, Maximiano MR, Ribeiro DG et al. Differential accumulation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* proteins during the interaction with the host plant: contributions of an in vivo system. *Proteomics* 2017;17, DOI: 10.1002/pmic.201700086.
- Schulte R, Bonas U. Expression of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* *hrp* gene cluster, which determines pathogenicity and hypersensitivity on pepper and tomato, is plant inducible. *J Bacteriol* 1992a;174:815–23.
- Schulte R, Bonas U. A *Xanthomonas* pathogenicity locus is induced by sucrose and sulfur-containing amino acids. *Plant Cell* 1992b;4:79–86.
- Slater H, Alvarez-Morales A, Barber CE et al. A two-component system involving an HD-GYP domain protein links cell-cell signalling to pathogenicity gene expression in *Xanthomonas campestris*. *Mol Microbiol* 2000;38:986–1003.
- Soto-Suárez M, Bernal D, González C et al. In planta gene expression analysis of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae*, African strain MA11. *BMC Microbiol* 2010;10:170.
- Srivastava GP, Hanumappa M, Kushwaha G et al. Homolog-specific PCR primer design for profiling splice variants. *Nucleic Acids Res* 2011;39:e69.
- Su HZ, Wu L, Qi YH et al. Characterization of the GntR family regulator HpaR1 of the crucifer black rot pathogen *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. *Sci Rep* 2016;6:19862.
- Tahara ST, Mehta A, Rosato YB. Proteins induced by *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* with leaf extract of the host plant (*Passiflora edulis*). *Proteomics* 2003;3:95–102.
- Tsuge S, Furutani A, Ikawa Y. Regulatory network of *hrp* gene expression in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *J Gen Plant Pathol* 2014;80:303–13.
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T et al. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* 2012;40:e115.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002;3:RESEARCH0034.
- Vauterin L, Hoste B, Kersters K et al. Reclassification of *Xanthomonas*. *Int J Syst Evol Micro* 1995;45:472–89.
- Vicente JG, Holub EB. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to Brassica crops. *Mol Plant Pathol* 2013;14:2–18.
- Vorholter FJ, Schneiker S, Goesmann A et al. The genome of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 and its use for the reconstruction of metabolic pathways involved in xanthan biosynthesis. *J Biotechnol* 2008;134:33–45.
- Vorholter FJ, Thias T, Meyer F et al. Comparison of two *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* genomes revealed differences in their gene composition. *J Biotechnol* 2003;106:193–202.
- Warwick SI, Sauder CA, Al-Shehbaz IA et al. Phylogenetic relationships in the tribes Anthonieae, Chorisporeae, Euclidiaceae, and Hesperideae (Brassicaceae) based on nuclear ribosomal ITS DNA sequences. *Ann Mo Bot Gard* 2007;94:56–78.
- Wengelnik K, Rossier O, Bonas U. Mutations in the regulatory gene *hrpG* of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* result in constitutive expression of all *hrp* genes. *J Bacteriol* 1999;181:6828–31.
- Xu RQ, Blanvillain S, Feng JX et al. AvrAC(Xcc8004), a type III effector with a leucine-rich repeat domain from *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* confers avirulence in vascular tissues of *Arabidopsis thaliana* ecotype Col-0. *J Bacteriol* 2008;190:343–55.
- Yuan Z, Wang L, Sun S et al. Genetic and proteomic analyses of a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* *purC* mutant deficient in purine biosynthesis and virulence. *J Genet Genomics* 2013;40:473–87.
- Zhao S, Fernald RD. Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. *J Comput Biol* 2005;12:1047–64.
- Zhuo T, Rou W, Song X et al. Molecular study on the *carAB* operon reveals that *carB* gene is required for swimming and biofilm formation in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *BMC Microbiol* 2015;15:225.

APÊNDICE B – ANÁLISE DA TRANSFORMAÇÃO DE *Agrobacterium tumefaciens*

Sequencias gênicas enviadas para síntese dos vetores.

1-Efector- *SsiTL* (Integrina) (400pb)

TCTGTTCTTCCTGACTTGGTATACATCAAGACACAAAATACCCCGTCAGGAAAAGTAGAGGTTTC
 ACATCGCTAGCGGAGCATCAACCTACAAGACACGGACTGTTGAAGTTGTTACCTCATTTCGGGAA
 TGAGCAAGATGGTCAATGGAACGTGTATGACTATGATGGTGTATGGAAAGCCAGACTTAGTCTTC
 ATCAAACCTAGCAATACCGGTACAGGAACAACCGAATTGTTTCGTCGCATCTGCTTCTTCCAATT
 ATCAAACAAGACTCATCAGCACCCGGGACTACCTTTACGGTAGAAAACAACGGTTTTTTGGCAGCT
 TGGACCTTATAGCGCTAATGGAGATTTGATCTACATCAAGGATGCCAATACTGGCACTGGGACA
 ACAGAGGTCCACATTG

2-Efector- *Ss-caF1* (Proteína hipotética) (400 pb)

TAGCACATCAGAAACCTTTAACCCTGGATCCTAACGCGGATTGGGGAAGTAGACATATGGCCGA
 GGAACATCACATAGACAACCTTCGATCCGGGTGCCTTCTTTACGCTCCACGATTTTCGACAACAAC
 GGCGTTTGGGACCAATCGGAAATCCTAAAATTCTATGGCATGGAAGATGAGACTGCAAAAGATG
 TGCCGCATGAAAAGAAAGTTGATTTGCTGAAGGAGATATTACGATTGATGGATAGTAATAATGA
 TGGAGTAGTGGAAAAGGAAGAATGGGACAGGTATTCAGGGACTGGAGGTCTGTTGCCAGATTTT
 GGGCTCGGGCCAGGACATCATTGGGATATTGAGATGGAGTATGAGATTCATCATTGGCAGAAAT
 ACCATGATGAGAATAC

3-Efector- *SspG1* (Endopoligalacturonase) (314 pb)

GGCATCACCTCACCGGTGGAACCTGCTCCGGTGGTCACGGTCTCTCCATCGGATCCGTCCGGTGG
 ACGTTCCGACAACGTTGTCTCTGATGTTATCATTGAATCCTCCACCATCAAGAACTCCGCCAAC
 GGTGTCCGCATCAAGACTGTTTTCCGGTGCCACTGGATCCGTCTCCGGCGTTACCTACAAGGACA
 TCACCCTCTCCGGTATTACCAAGTACGGTGTGTCATCGAGCAAGATTACGAGAACGGTTCCCC
 AACTGGAAAGCCAACCTCCGGTGTTCATCACTGGTGTCACTCTCTCCAACGTTTAC

Secuencias obtidas a partir de productos de PCR de bacteria transformada.

1-Efector- *SsiTL* (Integrina) (400pb)

TCTGTTCTTCCTGACTTGGTATACATCAAGACACAAAATACCCCGTCAGGAAAAGTAGAGGTTC
 ACATCGCTAGCGGAGCATCAACCTACAAGACACGGACTGTTGAAGTTGTTACCTCATTCGGGAA
 TGAGCAAGATGGTCAATGGAACGTGTATGACTATGATGGTGATGGAAAGCCAGACTTAGTCTTC
 ATCAAACCTAGCAATACCGGTACAGGAACAACCGAATTGTTTCGTCGCATCTGCTTCTTCCAATT
 ATCAAACAAGACTCATCAGCACCGGGACTACCTTTACGGTAGAAAACAACGGTTTTTTGGCAGCT
 TGGACCTTATAGCGCTAATGGAGATTTGATCTACATCAAGGATGCCAATACTGGCACTGGGACA
 ACAGAGGTCCACATTG

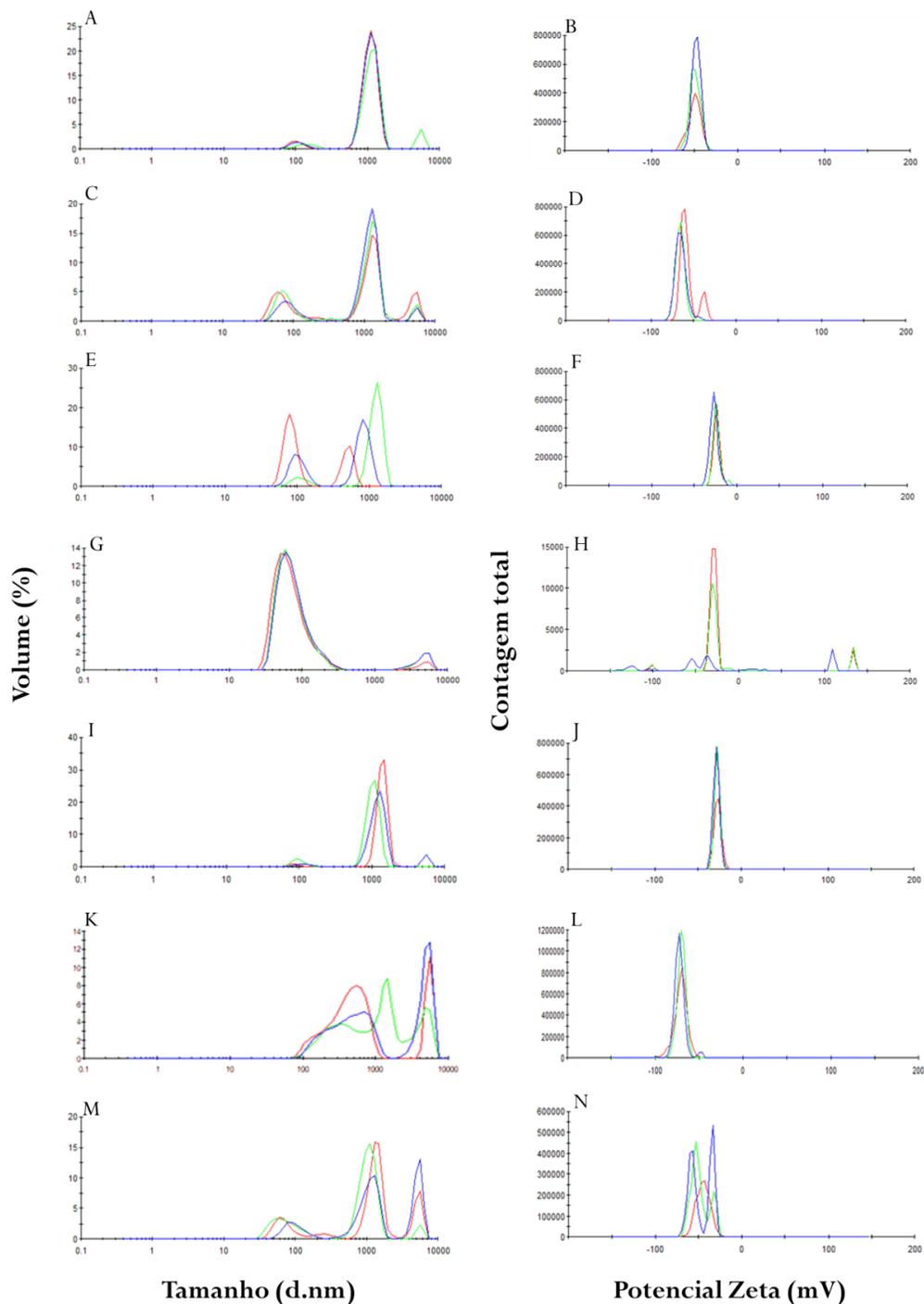
2-Efector- *Ss-caF1* (Proteína hipotética) (400 pb)

GGAACATCACATAGACAACCTTCGATCCGGGTGCCTTCTTTACGCTCCACGATTTTCGACAACAAC
 GGCCTTTGGGACCAATCGGAAATCCTAAAATTCTATGGCATGGAAGATGAGACTGCAAAAAGATG
 TGCCGCATGAAAAGAAAGTTGATTTGCTGAAGGAGATATTACGATTGATGGATAGTAATAATGA
 TGGAGTACTGAAAAGGAAGAACGGGACATATATTCTGGGACTGGAGGTCTGTTGCCTG

3-Efector- *SspGI* (Endopoligalacturonase) (314 pb)

CCGTCGGTGGACGTTCCGACAACGTTGTCTCTGATGTTATCATTGAATCCTCCACCATCAAGAAC
 TCCGCCAACGGTGTCCGCATCAAGACTGTTTCCGGTGCCACTGGATCCGTCTCCGGCGTTACCTA
 CAAGGACATCACCTCTCCGGTATTACCAAGTACGGTGTGTCATCGAGCAAGATTACGAGAACG
 GTTCCCCAACTGGAAGCCAACCTCCGGTGTCCCATCACTGGTGTCACTCTCTCCAACGTTTAC
 GTACCACTAGT

APÊNDICE C – CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMOS.



Caracterização dos lipossomos sintetizados quanto ao tamanho hidrodinâmico, coluna da esquerda, e potencial zeta, coluna da direita. **A e B**- Lipossomo controle. **C e D** - Lipossomo complexoado com o vetor pPM7g. **E e F** - Lipossomo complexoado com o vetor pPM7g tratado com DNase. **G e H** - Vetor pPM7g. **I e J** Lipossomo (Constituído com PEG) complexoado com o vetor pPM7g tratado com DNase. **K e L** - Lipossomo (Constituído com PEG) Controle. **M e N** Lipossomo(Constituído com PEG) complexoado com o vetor pPM7g. Cada amostra foi analisada em triplicata técnica (cores diferentes).

ANEXO A – ARTIGOS PUBLICADOS

MAXIMIANO, MARIANA ROCHA; OLIVEIRA-NETO, OSMUNDO B.; FRANCO, OCTÁVIO L.; MEHTA, ANGELA. Validation of an *in vitro* system for studies of pathogenicity mechanisms in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. FEMS Microbiology Letters, v. 364, p. fnx217-fnx217, 2017.

ANEXO B – TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS

MAXIMIANO, M. R.; SANTOS, C. ; ARAGAO, F. J. L. ; FRANCO, O. L. ; MEHTA, A. . *Sclerotinia sclerotiorum* control by gene silencing. In: 7th Brazilian Biotech Congress and 2nd Biotech Ibero-American Congress, 2018, Brasília,DF. 7th Brazilian Biotech Congress and 2nd Biotech Ibero-American Congress, 2018.

MAXIMIANO, M. R.; OLIVEIRA-NETO, O. B.; GROSSI-DE-SA, M. F.; FRANCO, O. L.; MEHTA, A. Perfil de Expressão de Genes Envolvidos na Patogenicidade de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Utilizando Sistemas *in vitro* e *in vivo*. In: XXI Encontro do Talento Estudantil, 2016, Brasília. XXI Encontro do Talento Estudantil, 2016.

MAXIMIANO, M. R.; OLIVEIRA-NETO, O. B.; FRANCO, O. L. ; MEHTA, A. Expression profile of genes involved in the pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* *in vitro* and *in vivo*. In: VI SIMPÓSIO BRASILEIRO DE GENÉTICA MOLECULAR DE PLANTAS. 2017, Ouro Preto - MG. VI SIMPÓSIO BRASILEIRO DE GENÉTICA MOLECULAR DE PLANTAS.

ANEXO C – ARTIGOS PUBLICADOS RELACIONADOS A OUTROS PROJETOS

TÁVORA, FABIANO T. P. K. ; SANTOS, CRISTIANE ; **MAXIMIANO, MARIANA R.** ; MURAD, ANDRÉ M. ; OLIVEIRA'NETO, OSMUNDO BRILHANTE ; MEGIAS, ESAÚ ; JUNIOR, FÁBIO B. REIS ; FRANCO, OCTÁVIO L. ; MEHTA, ANGELA . Pan Proteome of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Isolates Contrasting in Virulence. PROTEOMICS, v. 1, p. 1900082, 2019.

SANTOS, LUCAS SOUZA ; **MAXIMIANO, MARIANA ROCHA** ; MEGIAS, ESAÚ ; PAPPAS, MARÍLIA ; RIBEIRO, SIMONE GRAÇA ; MEHTA, ANGELA . Quantitative expression of microRNAs in Brassica oleracea infected with *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. MOLECULAR BIOLOGY REPORTS, v. 1, p. 1-7, 2019.

SANTOS, IVONALDO REIS; **MAXIMIANO, MARIANA ROCHA**; ALMEIDA, RAPHAEL FERREIRA; DA CUNHA, RAIMUNDO NONATO VIEIRA; LOPES, RICARDO; SCHERWINSKI-PEREIRA, JONNY EVERSON; MEHTA, ANGELA. Genotype-dependent changes of gene expression during somatic embryogenesis in oil palm hybrids (*Elaeis oleifera* x *E. guineensis*). PLoS One, v. 13, p. e0209445, 2018.

SANTOS, CRISTIANE; **MAXIMIANO, MARIANA R.**; RIBEIRO, DAIANE G.; OLIVEIRA-NETO, OSMUNDO B.; MURAD, ANDRÉ M.; FRANCO, OCTÁVIO L.; MEHTA, ANGELA. Differential accumulation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* proteins during the interaction with the host plant: Contributions of an in vivo system. PROTEOMICS, v. 17, p. 1700086, 2017.

CUNHA, NICOLAU BRITO DA; DE DEUS BARBOSA, AULUS ESTEVÃO ANJOS; DE ALMEIDA, RENATO GOULART; PORTO, WILLIAM FARIAS; **MAXIMIANO, MARIANA ROCHA**; ÁLVARES, LUANA CRISTINA SILVA; MUNHOZ, CASSIA BEATRIZ RODRIGUES; EUGÊNIO, CHESTERTON ULYSSES ORLANDO; VIANA, ANTÔNIO AMÉRICO BARBOSA; FRANCO, OCTAVIO LUIZ; DIAS, SIMONI CAMPOS. Cloning and characterization of novel cyclotides genes from South American plants. BIOPOLYMERS, v. 106, p. 784-795, 2016.

ANEXO D – TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS RELACIONADOS A OUTROS PROJETOS

MAXIMIANO, M. R. ; SANTOS, L. ; MEGIAS, E. ; OLLERO, F. ; MEGIAS, M. ; SANTOS, I. R. ; FRANCO, O. L.; Mehta, A . Identification of differential proteins induced by apigenin in *Rhizobium tropici* CIAT899. In: 7th BrMASS Conference on Mass Spectrometry and the 4th Proteomics Meeting, 2018, Rio de Janeiro. 7th BrMASS Conference on Mass Spectrometry and the 4th Proteomics Meeting, 2018.

SANTOS, L.; **MAXIMIANO, M. R.**; MEGIAS, E. ; OLLERO, F.; MEGIAS, M.; SANTOS, I. R.; FRANCO, O. L; Mehta, A . Differential Proteome of *Rhizobium tropici* CIAT899 in response to salt stress. In: 7th BrMASS Conference on Mass Spectrometry and the 4th Proteomics Meeting, 2018, Rio de Janeiro. 7th BrMASS Conference on Mass Spectrometry and the 4th Proteomics Meeting, 2018.

SANTOS, I. R.; RIOS, T. B. ; **MAXIMIANO, M. R.** ; LIMA, L. M. ; BATISTA, M. ; MARCHINI, F. ; SILVA, L. P. ; OLIVEIRA NETO, O. B. ; Mehta, A . Analysis of proteins involved in resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* in *Gossypium hirsutum* by 2-DE and shotgun techniques. In: 7th conference on mass spectrometry and 4th BrProt, 2018, Rio de Janeiro. 7th conference on mass spectrometry and 4th BrProt, 2018.

SANTOS, I. R.; **MAXIMIANO, M. R.**; ALMEIDA, R. F.; SCHERWINSKI-PERREIRA, J. E. ; MEHTA, A. Differential expression of gene involved in the acquisition of embryogenic competence in oil palm (*Elaeis oleifera* x *E. guineensis* Jacq.). In: 7th Brazilian Biotechnology Congress and 2th Biotechnology Ibero-American Congress, 2018, Brasília, DF. 7th Brazilian Biotechnology Congress and 2th Biotechnology Ibero-American Congress, 2018.

MAXIMIANO, M. R.; MEGIAS, E.; SANTOS, I. R.; LIMA, A. S.; MEGIAS, M.; FRANCO, O. L.; MEHTA, A. Proteome analysis of the symbiont *Rhizobium tropici* CIAT899 in response to stress. In: 29º CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 2017, Foz do Iguaçu. 29º CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 2017.

MAXIMIANO, M. R.; MEGIAS, E. ; MEGIAS, M.; FRANCO, O. L.; MEHTA, A. Análise Proteômica Diferencial de *Rhizobium tropici* CIAT 899 Sob Estresse Salino. In: XXI Encontro do Talento Estudantil, 2016, Brasília. XXI Encontro do Talento Estudantil-2016, 2016.

MAXIMIANO, M. R.; MEGIAS, E.; SANTOS, I. R.; LIMA, A. S.; MEGIAS, M.; FRANCO, O. L.; MEHTA, A. Proteomic Screening of differentially expressed proteins in *Phaseolus vulgaris* symbiont *Rhizobium tropici* CIAT899 under stress saline. In: 1st IBERO American, 6th BrMass Conference on Mass Spectrometry and 13th Uppcon, 2016, Rio de Janeiro. 1st IBERO American, 6th BrMass Conference on Mass Spectrometry and 13th Uppcon, 2016. v. 1.