



Universidade de Brasília – UnB

Instituto de Ciências Biológicas – IB

Departamento de Biologia Celular

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular)

**UTILIZAÇÃO DE FERRAMENTAS BIOTECNOLÓGICAS E
NANOTECNOLÓGICAS PARA O CONTROLE DA BACTÉRIA
FITOPATOGÊNICA *Xanthomonas campestris* pv. *campestris***

IVONALDO REIS SANTOS

Brasília – DF

Janeiro/2023



Universidade de Brasília – UnB

Instituto de Ciências Biológicas – IB

Departamento de Biologia Celular

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular)

**UTILIZAÇÃO DE FERRAMENTAS BIOTECNOLÓGICAS E
NANOTECNOLÓGICAS PARA O CONTROLE DA BACTÉRIA
FITOPATOGÊNICA *Xanthomonas campestris* pv. *campestris***

IVONALDO REIS SANTOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) da Universidade de Brasília como requisito à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Molecular)

Orientador: Luciano Paulino da Silva, PhD

Co-orientadora: Angela Mehta, PhD

Brasília – DF

Janeiro/2023

Tese, autoria de Ivonaldo Reis Santos, intitulada: **UTILIZAÇÃO DE FERRAMENTAS BIOTECNOLÓGICAS E NANOTECNOLÓGICAS PARA O CONTROLE DA BACTÉRIA FITOPATOGÊNICA *Xanthomonas campestris* pv. *campestris***, apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) pela Universidade de Brasília, em 2023, definida e aprovada pela banca examinadora abaixo assinada:

Prof. Dr. Luciano Paulino da Silva
Orientador

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) - UnB

Dra. Angela Mehta
Co-orientadora

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - Embrapa/Cenargen

Dra. Sonia Maria de Freitas
Membro 1

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) - UnB

Dra. Cíntia Caetano Bonatto
Membro 2

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - Embrapa/Cenargen

Dr. Leonardo Lima Pepino de Macedo
Membro 3

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - Embrapa/Cenargen

Dra. Ana Carolina Mendes Bezerra
Suplente

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - Embrapa/Cenargen

“Se quiser triunfar na vida, faça da perseverança a sua melhor amiga; da experiência, o seu conselheiro; da prudência, o seu irmão mais velho; e da esperança; o seu anjo da guarda”.

(Joseph Addison)

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

Em primeiro lugar a Deus, pela saúde, paz e sabedoria concedida para realizar esse sonho. Agradeço a Deus por todos os obstáculos ultrapassados. Nos momentos de dificuldades posso não compreender, mas quando chego ao topo da montanha, reconheço na paisagem a lição que ele me deu.

Aos meus orientadores: Dr. Luciano Paulino da Silva, Dra. Angela Mehta dos Reis, pela oportunidade de fazer parte das equipes, por todos os ensinamentos, por toda a dedicação, paciência, compreensão e pela confiança que depositaram em mim. Em especial, gostaria de agradecer a Dra. Angela Mehta que, desde a minha iniciação científica, nunca deixou de acreditar no meu potencial.

Aos meus queridos pais Maria Domingas dos Reis e José Francisco Lima e aos meus quatro irmãos: Ivonildo Reis, Josenilson Reis, Aldevan Reis e Joerlon Reis, que sempre me apoiaram.

Aos meus amigos e companheiros do Laboratório de Genômica e Proteômica (LGP) e do Laboratório de Nanobiotecnologia (LNANO) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia que de alguma forma, contribuíram com o resultado final deste trabalho. Agradeço em especial a Thalita Fonseca, Daiane Gonzaga, Pollyana Mendes, Fabiano Távora e Eduardo Severo, por terem me auxiliado nas análises.

Ao Laboratório de Química e Bioquímica de Proteínas do departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília. Em especial, ao Dr. Wagner Fontes pelo auxílio na utilização de ferramentas de bioinformática para avaliar os dados proteômicos.

A todos os funcionários e docentes do Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília. Agradeço a todos os meus professores, pelos ensinamentos e paciência.

A todos os colaboradores da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (EMBRAPA), onde foi desenvolvida minha Tese.

Por fim, agradeço a todos que de forma direta ou indiretamente contribuíram para o sucesso desta Tese.

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

SUMÁRIO

RESUMO	16
ABSTRACT	17
1. INTRODUÇÃO GERAL	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 <i>Brassica oleracea</i> e <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> (<i>Xcc</i>)	20
2.2 Imunidade vegetal desencadeada por padrões moleculares associados à patógenos (PAMP) e imunidade desencadeada por efetor (ETI)	23
2.3 O uso de biomoléculas na indução de resistência a doenças em plantas	24
2.4 Avaliação da expressão de genes de defesa	26
2.5 Nanotecnologia no controle de fitopatógenos	28
2.6 Mecanismo de ação das AgNPs em microorganismos	31
3. JUSTIFICATIVA	34
4. HIPÓTESES	35
5. OBJETIVOS	36
5.1. Objetivo geral	36
5.2. Objetivos específicos	36
CAPÍTULO I – Indução de genes relacionados à defesa em <i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> utilizando metabólitos concentrados produzidos por <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899	37
1. INTRODUÇÃO	39
2. MATERIAL E MÉTODOS	41
2.1 Cultivo de <i>R. tropici</i> CIAT 899 e purificação de metabólitos	41
2.2 Tratamento com MC-RT em plantas de <i>B. oleracea</i> para análise de RT-qPCR	42
2.3 Extração e purificação de RNA total	43
2.4 Quantificação e avaliação de ácidos nucleicos	45
2.5 Tratamento de RNA total e síntese de cDNA para RT-qPCR	45
2.6 Validação de cDNAs por RT-PCR convencional	46
2.7 Seleção de genes e desenho de primers	47
2.8 Experimentos de RT-qPCR e análise de dados	47
2.9 Inoculação de <i>Xcc</i> em plantas tratadas com MC-RT	48
3. RESULTADOS	51
3.1 Análise da expressão gênica por RT-qPCR	51
3.2 O potencial do uso de MC-RT para o manejo da podridão-negra	53
4. DISCUSSÃO	56
5. CONCLUSÃO	59

CAPÍTULO II – Biossíntese, caracterização e avaliação da atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata (AgNPs) produzidas utilizando extratos aquosos de plantas.....	60
1. INTRODUÇÃO	62
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	64
2.1 Material vegetal e obtenção de extratos aquosos.....	64
2.2 Síntese verde e caracterização de nanopartículas de prata (AgNPs).....	65
2.3 Atividade antibacteriana das AgNPs contra <i>X. campestris pv. campestris</i> (<i>Xcc</i>).....	68
2.4 Tratamento em plantas <i>B. oleracea var. capitata</i> com AgNPs.....	69
2.5 Extração de RNA total de <i>B. oleracea var. capitata</i> e síntese de cDNA	69
2.6 Inoculação de <i>X. campestris pv. campestris</i> em plantas de <i>B. oleracea var. capitata</i> tratadas com AgNPs.....	70
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
3.1 Análise de espectroscopia UV-vis de AgNPs.....	71
3.2 Avaliação das propriedades físico-químicas de AgNPs por espalhamento de luz dinâmico (DLS)	75
3.3. AgNPs afetam negativamente a sobrevivência de <i>X. campestris pv. campestris in vitro</i>.....	79
3.4 EACFN-AgNPs induz a modulação positiva de genes relacionados à defesa em <i>B. oleracea</i>	82
3.5 Plantas tratadas com EACFN-AgNPs desafiadas com <i>Xcc</i> exibiram tolerância melhorada à doença da podridão negra	85
4. CONCLUSÃO	88
CAPÍTULO III – Mecanismos de ação de nanopartículas de prata (AgNPs) em <i>Xanthomonas campestris pv. campestris</i>: abordagem proteômica	89
1. INTRODUÇÃO	91
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	93
2.1 Cultura bacteriana e preparação de amostras	93
2.2 Extração de proteínas totais de <i>X. campestris pv. campestris</i> tratada com AgNPs	93
2.2.1 Solubilização e digestão das proteínas.....	94
2.2.2 Dessalinização das amostras.....	95
2.2.3 Análise dos peptídeos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS/MS)	95
2.2.4 Identificação, quantificação das proteínas e análise de ontologia gênica	96
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	97
3.1 Análise proteômica de <i>X. campestris pv. campestris</i> (<i>Xcc</i>).....	97
3.2 Identificação de proteínas envolvidas na homeostase de íons metálicos e desintoxicação	100
3.3 Proteólise e fosforilação	129
3.4 Resposta a antibiótico	131

3.5 Organização da parede celular/Biogênese	131
4. CONCLUSÃO	133
CONSIDERAÇÕES FINAIS	134
PERSPECTIVAS	136
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	137
APÊNDICE.....	151
Artigos publicados durante o Doutorado:.....	151
Resumos publicados durante o Doutorado:.....	151
Premiações durante o Doutorado:	154

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Relações entre membros do gênero *Brassica* (triângulo). Baseado em: Liu S, Liu Y, Yang X, Tong C, Edwards D, Parkin IAP et al (2014).

Figura 2. Amostras de duas variedades de *B. oleracea* infectadas por *X. campestris* pv. *campestris*. **A** - Sintomas típicos de *Xcc* nas folhas de repolho (*B. oleracea* var. *capitata*) **B** - Folhas de couve-flor (*B. oleracea* var. *botrytis*) com sintomas da doença podridão negra.

Figura 3. Esquema de crescimento das nanopartículas em síntese verde.

Figura 4. AgNPs atravessando a parede celular e liberando íons prata que se ligam com enzimas e DNA.

Figura 5. Esquema simplificado demonstrando as etapas desenvolvidas para avaliar a possível influência de moléculas produzidas por *R. tropici* (CIAT 899) na indução de genes de defesa por RT-qPCR. **A** – Pulverização das folhas com solução contendo metabólitos concentrados de *R. tropici* (MC-RT) a 1% e coleta de material, parte aérea e radicular, separadamente (0, 24 e 48 hat). **B** – Inoculação das plantas com 1 mL de MC-RT 1% na raiz e coleta de material parte aérea e radicular, separadamente (0, 24 e 48 hai). **C** - Extração de RNA total e análise por RT-qPCR.

Figura 6. Análise da expressão relativa dos genes alvos associados à resposta de defesa, usando o ponto de tempo 0 horas após a inoculação (hai) como uma condição controle não tratada. **a**- Tratamento radicular com MC-RT; **b** - Tratamento foliar com MC-RT. Conforme indicado, as barras azuis e vermelhas representam o tecido aéreo coletado em 24 e 48 hat, enquanto o verde e roxo denotam o tecido radicular coletado em 24 e 48 hat." * " símbolo indica significância estatística da expressão gênica ($p\text{-value} \leq 0.05$).

Figura 7. Fenotipagem de folhas de brássicas tratadas com MC-RT. As fotografias foram obtidas em seis momentos 1, 3, 5, 7, 10 e 15 dias após a infecção (dai), e a gravidade dos sintomas foi analisada por meio do software Quant[®]. **(I)** Sintomas da doença da podridão negra em *Brassica oleracea* var. *capitata* inoculado com *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*), em **(a)** plantas de controle não tratadas, e **(b)** plantas tratadas com MC-RT; **(II)** A significância para a proporção da superfície foliar saudável entre o grupo tratado e o grupo controle foi calculada usando ANOVA de uma via ($p\text{-valor} < 0,05$) seguido pelo teste post hoc t-student ($p\text{-valores} < 0,01, < 0,0001$). Cada *boxplot* colorido representa a média de três réplicas biológicas ($n = 9$ folhas). n.s., não significativo; dai, dias após a inoculação; ANOVA, análise de variância.

Figura 8. Suspensões resultantes das sínteses de AgNPs utilizando EAFN, EAFNS, EAFNB, EAFR e EAFA, EACFN ou EAPSFN em diferentes concentrações (10, 15, 20, 25, 30 e 60 mg/mL) e controles AgNO₃ após 2,5 h de reação.

Figura 9. Curvas cinéticas das reações de síntese de AgNPs. A - EAFN-AgNPs, B - EAFNS-AgNPs, C - EAFNB-AgNPs, D - EAFR-AgNPs, E - EAFA-AgNPs, F - EACFN-AgNPs e G - EAPSFN-AgNPs caracterizados por espectroscopia UV-Visível. Monitoramento por espectroscopia de absorção em um comprimento de onda de 490 nm por 2,5 h.

Figura 10. Caracterização de AgNPs sintetizadas por EAFN, EAFNS, EAFNB, EAFR, EAFA, EACFN e EAPSFN. **A** - Diâmetro Hidrodinâmico (HD), **B** - Índice de Polidispersidade (PDI).

Figura 11. Análise da expressão relativa de genes alvos associados à resposta de defesa, utilizando a condição não tratada como controle. **A** - Tratamento foliar com EACFN-AgNPs sintetizadas com 60 mg/mL de EACFN na concentração de 64 μ M; **B** - Tratamento foliar com AgNO₃ (64 μ M). Conforme indicado, as barras vermelhas representam os genes regulados negativamente, as azuis representam os genes regulados positivamente, enquanto as barras cinzas representam os genes que não mostraram significância estatística. " * " símbolo indica significância estatística da expressão gênica (p-value \leq 0.05).

Figura 12. Plantas de brássica pós-tratamento com EACFN-AgNPs sintetizadas com 60 mg/mL de EACFN na concentração de 64 μ M, ou AgNO₃ (64 μ M), inoculadas com *X. campestris* pv. *campestris*. A severidade dos sintomas foi analisada usando o software Quant[®] em três momentos 5, 7 e 10 dias após a infecção (dai). **(I)** Sintomas da podridão negra em *B. oleracea* var. *capitata* inoculado com *X. campestris* pv. *campestris*; **(II)** A significância para a razão da área foliar lesionada entre os grupos tratado e controle foi calculada usando ANOVA one-way (p-valor <0,05) seguido de teste T-student post hoc (p-valores <0,01, <0,0001). Cada boxplot colorido representa a média (\pm SE) de três réplicas biológicas (n=9 folhas). s.s., não significativo; dai, dias após a inoculação; ANOVA, análise de variância.

Figura 13. Análise de componentes principais (PCA) de *X. campestris* pv. *campestris*. Em cinza indicando cada proteína, pontos coloridos indicam o posicionamento de cada amostra, sendo que as cores indicam as condições e os pontos da mesma cor indicam replicatas. Azul= AgNO₃; roxo= controle (ctrl); laranja= AgNPs (nano).

Figura 14. Mapa de correlações (*heatmap*) entre padrões de abundância normalizada e agrupamento de condições. As cores representam a abundância de proteínas diferenciais. Azul= AgNPs (nano); Verde= controle (ctrl); Vermelho= AgNO₃.

Figura 15. Quantidade de proteínas diferencialmente abundantes.

Figura 16. Análise de ontologia gênica. Processos biológicos nos quais estão inseridas as proteínas diferencialmente abundantes do tratamento com AgNPs-EACFN quando comparado com a condição controle (Ctrl).

Figura 17. Análise de ontologia gênica. Função Molecular nos quais estão inseridas as proteínas diferencialmente abundantes do tratamento com AgNPs-EACFN quando comparado com a condição controle (Ctrl).

Figura 18. Análise de ontologia gênica. Processos biológicos nos quais estão inseridas as proteínas diferencialmente abundantes no tratamento AgNO₃ quando comparado com a condição controle (Ctrl).

Figura 19. Análise de ontologia gênica. Função Molecular nos quais estão inseridas as proteínas diferencialmente abundantes no tratamento AgNO₃ quando comparado com a condição controle (Ctrl).

Figura 20. Análise de ontologia gênica. Processos biológicos nos quais estão inseridas as proteínas diferencialmente abundantes do tratamento com AgNPs-EACFN quando comparado com tratamento AgNO₃.

Figura 21. Análise de ontologia gênica. Função Molecular nos quais estão inseridas as proteínas diferencialmente abundantes do tratamento com AgNPs-EACFN quando comparado com tratamento AgNO₃.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Informações gerais dos genes selecionados para análise da expressão gênica.

Tabela 2. Concentrações de extratos aquosos de folhas de noni (EAFN), neem (Sobradinho) (EAFNS), neem (Brasília) (EAFNB), repolho (EAFR) e *A. thaliana* (EAFA), e extratos aquosos de frutos de noni (casca ou polpa/semente) (EACFN ou EAPSFN), nas amostras de AgNPs e em seus respectivos controles (contendo somente os extratos).

Tabela 3. Diâmetro hidrodinâmico (Z-Average), Índice de Polidispersidade (PdI) e potencial Zeta de superfície de AgNPs sintetizadas por EAFN, EAFNS, EAFNB, EAFR, EAFA, EACFN e EAPSFN em diferentes concentrações. Os valores são representados como a média \pm erro padrão da média.

Tabela 4. Concentração inibitória mínima (MIC) para *X. campestris* pv. *campestris* após 72 h de tratamento com EAFN-AgNPs sintetizadas com 10 ou 60 mg/mL de EAFN, EAFNS-AgNPs sintetizadas com 10 ou 60 mg/mL de EAFNS, EAFNB-AgNPs sintetizadas com 10 ou 20 mg/mL de EAFNB, EAFR-AgNPs sintetizadas com 25 ou 60 mg/mL de EAFR, EAFA-AgNPs sintetizadas com 10 ou 60 mg/mL de EAFA, EACFN-AgNPs sintetizadas com 25 ou 60 mg/mL de EACFN e EAPSFN-AgNPs sintetizadas com 15 ou 60 mg/mL de EAPSFN e nitrato de prata (AgNO_3) (condição controle) em diferentes concentrações (8, 16, 32, 64, 128 e 256 μM).

Tabela 5. Proteínas diferencialmente abundantes de *X. campestris* pv. *campestris* tratadas com EACFN-AgNPs quando comparadas com o controle.

Tabela 6. Proteínas diferencialmente abundantes de *X. campestris* pv. *campestris* tratadas com AgNO_3 quando comparadas com o controle.

Tabela 7. Proteínas diferencialmente abundantes de *X. campestris* pv. *campestris* tratadas com EACFN-AgNPs quando comparadas com AgNO_3 .

LISTA DE ABREVIÇÕES

AgNO₃ – Nitrato de prata
AgNPs - Nanopartículas de prata
ANOVA - Análise de Variância
cDNA - Complementary DNA
CHT - Quitinase
CID - colisão induzida por dissociação
CTAB - Brometo de cetiltrimetilamônio
D.O. - Densidade óptica
DEPC - Pirocarbonato de dietila
DH - Diâmetro hidrodinâmico
DNTP`s - Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
DTT - Ditioneitol
EACFN - Extrato aquoso de casca de frutos de noni
EAFN - Extrato aquoso de folhas de *Arabidopsis*
EAFNB - Extrato aquoso de folhas de neem (Brasília)
EAFNS - Extrato aquoso de folhas de neem (Sobradinho)
EAFR - Extrato aquoso de folhas de repolho
EAPSFN - Extrat aquosos da polpa/sementes de noni
EDTA - Ácido etilenodiamino
ETI - Imunidade desencadeada por efetor
FDR - Taxa de descoberta falsa
GLU - β -1,3-glucanase
Gos - Ontologia Gênica
HAT - Horas após o tratamento
IAA - Ácido indol-3-acético
JA - Ácido jasmônico
LC-MS - Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas
LCOs - Lipo-quito-oligossacarídeos
LCOs -Lipo-quito-oligossacarídeos
MC-RT - Metabólitos concentrados de *R. tropici*
MC-RT - Metabólitos concentrados de *R. tropici*
MIC - Concentração inibitória mínima
MS - Espectrometria de Massa
NCBI - National Center for Biotechnology Information
NPMs - Nanopartículas metálicas
NPs - Nanopartículas
NYG - Nutrient yeast growth
PAA - Ácido poli acrílico
PAMPs - Padrões moleculares associados a patógenos
PdI - Índices de polidispersividade
PGPR - Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas
PR - Pathogenesis-related
PRRs - Receptores de reconhecimento de padrões
PTI - Imunidade desencadeada por padrões
PVA - Poli(álcool vinílico)
PVP - Poli(vinilpirrolidona)
ROS - Espécies reativas de oxigênio
RT-qPCR - PCR quantitativo em tempo real

SA - Ácido salicílico
SAR - Resistência adquirida sistêmica
SPR - Ressonância plasmônica de superfície
TAE - Tris-Acetato-EDTA
TFA - Ácido trifluoracético
TY - Tryptone yeast
Xcc - *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

RESUMO

A fim de controlar a podridão negra das brássicas causada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*), ferramentas biotecnológicas e nanotecnológicas foram utilizadas neste estudo em três etapas. Na primeira etapa, metabólitos concentrados extraídos de *Rhizobium tropici* (MC-RT) foram utilizados na indução de genes relacionados com defesa. Plantas de repolho foram cultivadas em casa de vegetação e aos 21 dias após a semeadura foram pulverizadas com solução de MC-RT a 1% nas folhas ou na raiz. As partes aérea e radicular foram coletadas separadamente no dia 0 (condição controle), 24 e 48 h após o tratamento (hat) e submetidas à extração de RNA para análise por RT-qPCR de 8 genes relacionados com defesa. Os resultados mostraram que MC-RT aplicado nas folhas tem efeito protetor mais duradouro e sistêmico na planta. Os resultados obtidos enfatizam o potencial biotecnológico do uso de MC-RT atuando como um elicitador de respostas de defesa ativas em plantas, podendo contribuir expressivamente para o controle da podridão negra das brássicas. Na segunda etapa foi realizada a síntese verde de nanopartículas de prata (AgNPs) utilizando extratos aquosos de folhas de repolho, *Arabidopsis*, neem e noni, além de extratos aquosos de partes do fruto de noni (casca ou polpa/semente), como agentes redutores e estabilizantes. As reações de síntese de AgNPs foram realizadas em 6 diferentes concentrações de extratos em soluções aquosas de nitrato de prata (AgNO_3), a 1 mM final, totalizando 42 amostras de AgNPs, das quais 14 foram selecionadas, de acordo com seu diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersidade (PdI) e potencial Zeta (ZP) e então testadas *in vitro* para avaliar suas atividades antibacterianas contra *Xcc*. As AgNPs que apresentaram a maior atividade antibacteriana na concentração de 64 μM , apresentaram o menor DH, como as sintetizadas com extrato aquoso da casca do fruto de noni (EACFN) na concentração de 60 mg/mL. Além disso, plantas com genótipos suscetíveis de *B. oleracea* foram tratadas com EACFN-AgNPs, e a modulação positiva de genes biomarcadores relacionados à defesa foi obtida por qRT-PCR. Plantas tratadas com EACFN-AgNPs a 64 μM quando desafiadas com *Xcc* apresentaram um fenótipo mais tolerante, destacando-se que a aplicação de AgNPs parece desencadear uma resposta efetiva de defesa da planta. O presente estudo revela o potencial das AgNPs em direcionar a atividade antibacteriana e melhorar a defesa das culturas de plantas e, finalmente, propõe uma abordagem alternativa interessante para combater a podridão negra, potencialmente extensível a outros patossistemas. Na terceira etapa foi realizada uma análise proteômica para compreender os mecanismos de ação de AgNPs em *Xcc* tratada com AgNPs (32 μM), AgNO_3 (32 μM), ou sem tratamento (condição controle). Posteriormente foi realizada a extração de proteínas totais e as amostras foram submetidas à análise proteômica. Os resultados obtidos revelaram um total de 352 proteínas diferencialmente abundantes. Nas amostras tratadas com AgNPs, 134 proteínas foram diferencialmente abundantes, incluindo 107 proteínas aumentadas e 27 diminuídas, nas amostras tratadas com AgNO_3 foram 14 proteínas diferencialmente abundantes, incluindo 10 proteínas aumentadas e 4 proteínas diminuídas, quando comparadas com a condição controle. Por fim, quando as amostras tratadas com AgNPs foram comparadas com as amostras tratadas com AgNO_3 , os resultados mostraram 204 proteínas diferencialmente abundantes, incluindo 75 proteínas aumentadas e 129 proteínas diminuídas. A análise de ontologia gênica mostrou que a maioria das proteínas reguladas positivamente estavam envolvidas em importantes processos biológicos, como homeostase de íons metálicos, desintoxicação, organização de membrana, processo metabólico de aminoácidos e carboidratos, processo metabólico lipídico, proteólise, transporte transmembranar e outros. Os resultados obtidos trazem importantes contribuições para a melhor compreensão dos mecanismos de ação de AgNPs em *Xcc* e poderão contribuir para o desenvolvimento de estratégias de controle de *Xcc* em brássica. No geral, todas as estratégias utilizadas neste estudo contribuem para o controle da podridão negra e podem levar à redução do uso de agroquímicos.

ABSTRACT

In order to control the black rot disease of cruciferous crops caused by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*), biotechnological and nanotechnological tools were used in this study. In the first stage of this study, concentrated metabolites extracted from *Rhizobium tropici* (CM-RT) were used in the induction of defense-related genes. Cabbage plants were cultivated in a greenhouse and 21 days after sowing were sprayed with a 1% CM-RT solution on the leaves or roots. The aerial and root parts were collected separately on day 0 (control condition), 24 and 48 h after treatment (hat) and submitted to RNA extraction for RT-qPCR analysis of 8 defense-related genes. The results showed that CM-RT applied to the leaves has a more lasting and systemic protective effect on the plant. The results obtained emphasize the biotechnological potential of the use of CM-RT acting as an elicitor of active defense responses in plants, which can significantly contribute to the control of black rot disease. In the second stage of this study, the green synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) was carried out using aqueous extracts of cabbage leaves, *Arabidopsis*, neem, and noni, in addition to aqueous extracts of parts of the noni fruit (peel or pulp/seed), as reducing and stabilizing agents. AgNPs synthesis reactions were performed in 6 different concentrations of extracts in aqueous solutions of silver nitrate (AgNO_3), at 1 mM final, totalizing 42 samples, of which 14 samples of AgNPs were selected, according to their hydrodynamic diameter (HD), polydispersity index (PDI) and Zeta potential (ZP) and then tested *in vitro* to assess their antibacterial activities against *Xcc*. The AgNPs that showed the highest antibacterial activity at a concentration of 64 μM , had the lowest HD, such as those synthesized with aqueous extract of noni fruit peel (AEPFN) at a concentration of 60 mg/mL. In addition, susceptible *B. oleracea* plants were treated with AEPFN-AgNPs, and a positive modulation of defense-related biomarker genes was obtained by qRT-PCR. Plants treated with AEPFN-AgNPs at 64 μM when challenged with *Xcc* showed a more tolerant phenotype, highlighting that the application of AgNPs seems to trigger an effective plant defense response. The present study reveals the potential of AgNPs to direct antibacterial activity and improve plant crop defense and, finally, proposes an interesting alternative approach to combat black rot, potentially extensible to other pathosystems. In the third stage of this study, a proteomic analysis was performed to understand the mechanisms of action of AgNPs in *Xcc* treated with AgNPs (32 μM), AgNO_3 (32 μM), or without treatment (control condition). The results obtained revealed a total of 352 differentially abundant proteins. In samples treated with AgNPs, 134 proteins were differentially abundant, including 107 increased and 27 decreased proteins. In samples treated with AgNO_3 , there were 14 differentially abundant proteins, including 10 increased and 4 decreased proteins, when compared to the control condition. Finally, when samples treated with AgNPs were compared with samples treated with AgNO_3 , the results showed 204 differentially abundant proteins, including 75 increased and 129 decreased proteins. Gene ontology analysis revealed that most increased proteins were involved in important biological processes such as metal ion homeostasis, detoxification, membrane organization, amino acid and carbohydrate metabolic process, lipid metabolic process, proteolysis, transmembrane transport and others. The results obtained bring important contributions to a better understanding of the mechanisms of action of AgNPs in *Xcc* and may contribute to the development of strategies to control *Xcc* in brassica. Overall, all the strategies used in this study contribute to control black rot disease and could lead to a reduction in the use of agrochemicals.

1. INTRODUÇÃO GERAL

As crucíferas (brássicas) são de grande importância agrônômica e econômica global e incluem uma ampla gama de membros, como repolho, couve, brócolis, e também uma grande variedade cultivadas para preparo de condimentos e ornamentação (Rakow, 2004, Šamec & Salopek-Sondi, 2019). O maior fator limitante da produtividade das brássicas tem sido a podridão negra, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*), este fitopatógeno é de fácil disseminação, e causa danos severos na produção e qualidade da cultura, especialmente sob condições de clima quente e úmido (Vicente et al., 2001b, Gupta et al., 2013, Rubel et al., 2017). Para superar os efeitos da podridão negra, controle químico (Mishra & Arora, 2012, Vicente & Holub, 2013), sementes certificadas e livres de doenças, uso de cultivares resistentes (Nega et al., 2003) e a irrigação por gotejamento são geralmente recomendadas (Li et al., 2017). Nas últimas décadas, agroquímicos têm sido utilizados como a principal forma de prevenção contra a podridão negra. Contudo, o uso excessivo resulta em aumento do custo de produção, cepas resistentes à pesticidas, problemas de saúde humana e preocupações ambientais (Sexton et al., 2007).

Poucos são os defensivos estudados para o controle deste fitopatógeno. Nos últimos anos, uma das abordagens mais promissoras para o controle de fitopatógenos tem sido a utilização de estratégias de controle biológico e a indução de resistência a partir do emprego de compostos bioativos ou substâncias elicitoras de plantas, fungos, bactérias ou indutores de resistência, químicos sintéticos ou compostos naturais (González-Hernández et al., 2018, Llorens et al., 2017a, Stangarlin et al., 2011). Recentemente, Marks et al. (2013b) demonstraram que moléculas extraídas de *Rhizobium tropici* juntamente com inoculantes portadores de rizobactérias foram capazes de aumentar o crescimento e a produtividade de soja e milho, demonstrando o potencial biotecnológico. Além de promover o crescimento e aumentar a produtividade de plantas, o uso dessas moléculas para o controle de doenças por

meio da indução de resistência é um método que vem se revelando promissor (Silva et al., 2013, Silva et al., 2007). Os indutores aumentam os níveis de resistência e ativam diversos genes associados a defesa nas plantas, como os que codificam as enzimas peroxidases, quitinases e beta-1,3-glucanases (Ramamoorthy et al., 2002).

Uma outra abordagem que tem recebido bastante destaque envolve o uso da nanobiotecnologia, que oferece oportunidades promissoras quanto à utilização de sistemas nanoparticulados para a veiculação e liberação sustentada de biomoléculas, como RNA e DNA. Nanomateriais apresentam características que possibilitam uma vasta gama de novas aplicações, incluindo o controle de pragas e patógenos de plantas. A nanobiotecnologia constitui uma área do conhecimento inovadora que tem aplicações potenciais na agricultura, desempenhando um papel importante nas melhorias existentes no campo e até mesmo oferecendo um novo conjunto de ferramentas para entrega de genes e bioativos (Nair et al., 2010). Dentre os sistemas nanoestruturados, podem ser destacadas as nanopartículas de prata (AgNPs) produzidas por rotas de síntese verde que podem ser aplicadas em várias áreas como circuitos integrados, sensores, filtros, fibras, eletrodos celulares, agentes antimicrobianos e indutores de resistência (Rolim et al., 2019, Nair & Chung, 2015). As AgNPs são capazes de alterar a expressão de genes relacionados com defesa, como superóxido dismutase (*SOD*), catalase (*CAT*) e ascorbato peroxidase (*APX*) (Nair & Chung, 2015). Além disso, estudos mostram que AgNPs são capazes de aumentar os níveis de pigmentos fotossintéticos, proteína solúvel total e alterar as atividades da peroxidase (*POD*) e da polifenol oxidase (*PPO*) (Noha et al., 2018).

Neste contexto, o presente estudo propõe a análise da indução de genes de defesa em *Brassica oleracea* var. *capitata* após a aplicação de metabólitos concentrados de *R. tropici* CIAT 899 (MC-RT) por RT-qPCR e a síntese, caracterização e avaliação da atividade biológica *in vitro* e *in vivo* de nanopartículas de prata (AgNPs) produzidas utilizando extratos

aquosos de plantas. Além disso, propõe a identificação de proteínas moduladas em *X. campestris* pv. *campestris* e Brássica tratadas com AgNPs utilizando cromatografia líquida acoplada á espectrometria de massa (LC-MS/MS). Espera-se com este trabalho desenvolver estratégias inovadoras para o controle de *X. campestris* pv. *campestris* em brássica, podendo ser extensível a outras culturas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Brassica oleracea* e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc)

A família Brassicaceae é composta por aproximadamente 338 gêneros e 3.709 espécies em todo o mundo (Warwick et al., 2006), onde o grupo Brassica tem o maior impacto socioeconômico dentre todas as hortaliças populares para alimentação humana, forragem, oleaginosas, antioxidante à base de dieta, compostos nutracêuticos para câncer, e biocombustíveis (Hafidh et al., 2013, Zielińska et al., 2015). No gênero *Brassica*, seis espécies (*Brassica rapa*, *B. nigra*, *B. oleracea*, *B. carinata*, *B. juncea* e *B. napus*) são amplamente utilizadas em todo o mundo como forragem, sementes oleaginosas, condimentos ou hortaliças. Três delas (*B. nigra*, *B. rapa* e *B. oleracea*) são diplóides, enquanto as outras três são alotetraploides (Figura 1) (Liu et al., 2014). Dentre essas espécies destaca-se a *B. oleracea*, uma espécie de planta diplóide e agronomicamente importante, que abrange variedades, incluindo repolho, couve-flor, brócolis, couve de bruxelas, couve-rábano e couve. Dentre as variedades, a *B. oleracea* var. *capitata* (repolho) destaca-se por ser uma fonte extremamente valiosa de ácido fólico, vitaminas (por exemplo, C, K, A), flavonóides e cálcio (Gerszberg et al., 2015). Além disso, o repolho contém metabólitos secundários (glicosinolatos) e aminoácidos que contribuem para suas reconhecidas propriedades anti-inflamatórias e anticâncer (Hafidh et al., 2013, Zielińska et al., 2015). No entanto, muitas

doenças de plantas contribuem para a diminuição quantitativa e qualitativa da produção de repolho, afetando o rendimento da planta e o valor nutricional.

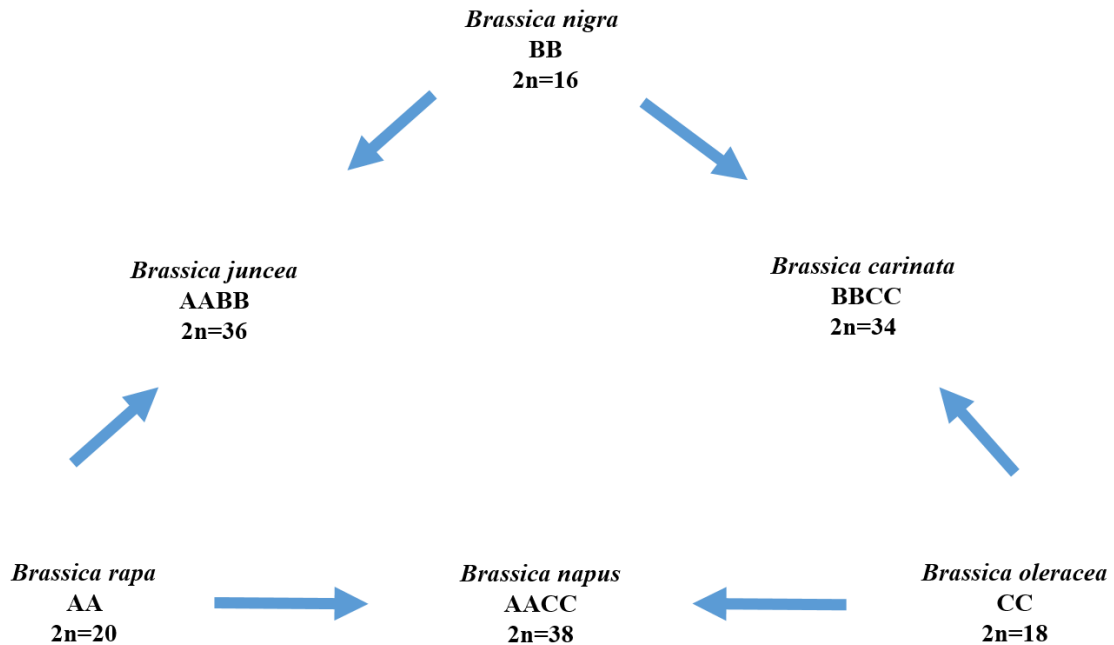


Figura 1. Relações entre membros do gênero *Brassica* (triângulo). Baseado em: Liu S, Liu Y, Yang X, Tong C, Edwards D, Parkin IAP et al (2014).

Os estresses abiótico e biótico, têm impacto significativo na perda de qualidade e quantidade do rendimento de repolho (Yi et al., 2013), levando à busca por alternativas para o controle de patógenos sobretudo aquelas com sustentabilidade. A *Xcc* é uma bactéria fitopatogênica Gram-negativa de grande importância agrônômica, e causa a doença conhecida como podridão negra das brássicas, que devasta diversas culturas crucíferas, produzindo lesões necróticas em forma de “V” nas margens foliares e levando a expressivas perdas econômicas (Figura 2) (Alvarez, 2000). A *Xcc* vive epifiticamente na superfície da folha e infecta o hospedeiro penetrando os estômatos/feridas, colonizando o sistema vascular de muitas *Brassicaceae*, incluindo brócolis, couve, couve-flor, rabanete e a planta modelo *Arabidopsis thaliana* (Danhorn & Fuqua, 2007). A infecção por *Xcc* é uma das doenças

bacterianas mais destrutivas e amplamente disseminada por sementes de crucíferas em todo o mundo (Singh et al., 2011, Singh et al., 2016, Akhtar et al., 2017). A infecção bacteriana é particularmente prejudicial devido à formação de biofilme, que libera enzimas extracelulares degradadoras e outros fatores de virulência (Dow et al., 2003).

A podridão negra das brássicas foi descrita pela primeira vez em repolho por Garman (1892) no Kentucky, EUA. A partir de então, tem sido relatada em todas as regiões do planeta onde as culturas de brássicas são cultivadas (Vicente & Holub, 2013). Diversas estratégias de manejo têm sido adotadas para conter a doença, incluindo rotação de culturas, manejo de resíduos de culturas anteriores, uso de sementes saudáveis, eliminação de outras fontes hospedeiras do fitopatógeno e tratamento de sementes com bactericida; mas, nenhuma dessas estratégias tem se mostrado eficazes (Jensen et al., 2005, Vicente & Holub, 2013).

O controle químico recomendado para o controle da doença não fornece uma solução eficaz para os agricultores e não é rentável, leva à poluição ambiental e também prejuízos à saúde humana. Nesse contexto, o desenvolvimento e cultivo de híbridos ou variedades resistentes à doença representa uma solução tecnológica eficiente e eficaz para reduzir a incidência da doença e, conseqüentemente, perdas na cultura. Nesse sentido, os avanços da biologia molecular e da biotecnologia tem disponibilizado ferramentas poderosas para enfrentar esse desafio, permitindo a identificação e estudo da expressão de genes relacionados com defesa, o que nos permite desvendar os mecanismos pelos quais a resistência a doenças é alcançada por meio do estudo das interações planta-patógeno.

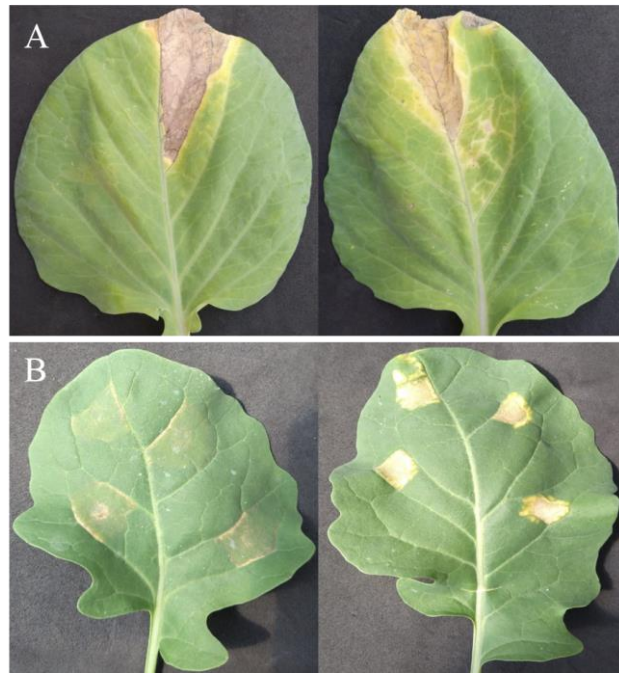


Figura 2. Amostras de duas variedades de *B. oleracea* infectadas por *X. campestris* pv. *campestris*. **A** - Sintomas típicos de *Xcc* nas folhas de repolho (*B. oleracea* var. *capitata*) **B** - Folhas de couve-flor (*B. oleracea* var. *botrytis*) com sintomas da doença podridão negra.

2.2 Imunidade vegetal desencadeada por padrões moleculares associados à patógenos (PAMP) e imunidade desencadeada por efetor (ETI)

O sistema de imunidade inata das plantas é amplamente caracterizado, no qual as respostas de defesa são ativadas por meio da sinalização iniciada pelo reconhecimento do ataque patogênico (Schwessinger & Ronald, 2012). As plantas apresentam mecanismos de defesa indutíveis ou constitutivos para impedir a invasão de patógenos (Pieterse & Dicke, 2007). A indução da resposta de defesa em plantas é tipicamente desencadeada por componentes conservados da parede celular do patógeno, como os lipopolissacarídeos, conhecidos como padrões moleculares associados à patógenos (PAMPS). Essas moléculas indutoras de defesa de plantas são conhecidas como elicitores e, seu reconhecimento por receptores específicos, conhecidos como receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), localizados na membrana plasmática das plantas, leva à uma imunidade desencadeada por PAMP ou PTI (imunidade desencadeada por padrões) (Jones & Dangl, 2006). PTI e ETI

(imunidade desencadeada por efetor) são duas vias de sobreposição diferentes, definidas de acordo com os tipos de moléculas do patógeno reconhecidas pelas plantas (Jones, Katagiri & Tsuda, 2010). No PTI, os eventos de sinalização de defesa do hospedeiro incluem a produção de fitormônios, compostos fenólicos, fitoalexinas e uma grande resposta transcricional que aumenta a expressão de genes relacionados à defesa, incluindo genes relacionados à patogênese (PR) (van Loon et al., 2006). É bem conhecido que as proteínas PR são codificadas por um complexo grupo de famílias de genes relacionados à regulação de processos fisiológicos, e desempenham um papel crucial na resposta de defesa contra estresses abióticos e bióticos (Rout et al., 2016).

Na tentativa de driblar o PTI, muitos patógenos adaptados entregam proteínas efetoras dentro das células vegetais, manipulando as funções celulares ao seu favor e interferindo nas repostas de defesa, resultando na suscetibilidade desencadeada por efetores (*ETS- effector-triggered susceptibility*). As plantas resistentes por sua vez, reconhecem os efetores por meio dos genes de resistência (R) e ativam uma resposta mais rápida denominada ETI. As resposta de defesa PTI e ETI geralmente são semelhantes, porém ETI é mais rápida e amplificada que culmina para uma morte celular programada no local da infecção, conhecida como resposta de hipersensibilidade (HR) (Coll et al., 2011). A HR é caracterizada pela explosão oxidativa, que consiste na geração de superóxido (O_2^-) e acúmulo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), produzindo espécies reativas de oxigênio (EROs).

2.3 O uso de biomoléculas na indução de resistência a doenças em plantas

Diversas biomoléculas têm sido estudadas com a finalidade de proteger as culturas contra patógenos/doenças. Essas moléculas têm a capacidade de induzir resposta de defesa nas plantas que resulta em resistência contra infecção subsequente por um fitopatógeno, denominada *priming*. Em termos de resposta molecular, a defesa da planta envolve um grande

número de mudanças morfológicas e bioquímicas, como: calose, deposição de compostos fenólicos, ativação de vias de ácido salicílico e/ou jasmônico ou síntese de proteínas relacionadas à patogênese (PR) (Llorens et al., 2017b).

As plantas desenvolveram diferentes mecanismos de defesa contra patógenos (Bostock et al., 2014). Elas respondem a "padrões moleculares associados a patógenos" (PAMPs) ativando uma imunidade desencadeada por PAMPs (PTI) ou uma imunidade desencadeada por efector (ETI) mediada por receptores capazes de reconhecer especificamente patógenos (Boller & He, 2009, Návarová et al., 2012). A consequência pode ser o estabelecimento de um status de "resistência adquirida sistêmica" (SAR), que pode aumentar a resistência de toda a planta a ataques subsequentes (Návarová et al., 2012, Schwachtje et al., 2018).

Bactérias comumente conhecidas como rizóbios estabelecem simbioses com várias espécies de plantas leguminosas, formando estruturas específicas denominadas nódulos radiculares, estrutura onde ocorre o processo de fixação biológica de nitrogênio atmosférico, trazendo importantes contribuições para a agricultura e ao meio ambiente em relação ao uso de compostos nitrogenados para adubação vegetal (Peoples et al., 2009, Gundi et al., 2018, Capelesso et al., 2019). A nodulação de leguminosas requer uma cascata de sinais moleculares trocados entre a planta hospedeira e o rizóbio. Esta comunicação molecular começa com a exsudação de flavonoides da leguminosa, os quais são reconhecidos pelas bactérias. Quando induzidas por estas moléculas de plantas, os rizóbios sintetizam lipo-quitooligosacarídeos (LCOs), também conhecidos como fatores Nod, responsáveis pelo início do processo de nodulação (Dénarié et al., 1996, Marks et al., 2013b, Marks et al., 2015).

O nodD é considerado o gene de nodulação mais intrigante, e é constitutivamente expresso e responsável pela transcrição de outros genes de nodulações na presença de indutores de plantas adequados, geralmente flavonoides, iniciando assim o processo de

nodulação (Oldroyd, 2013, Smith et al., 2015). Diversos estudos mostram que os fatores Nod também podem desempenhar outros papéis além do processo de nodulação, incluindo estimulação da fotossíntese, melhorias no crescimento e rendimento de grãos e mudanças nas respostas de defesa em leguminosas e não leguminosas (Khan et al., 2008, Marks et al., 2013b, Liang et al., 2013).

Outras moléculas tem sido utilizadas na indução de resistência a doenças em plantas. Estudos realizados por Liu et al. (2019) mostraram que a melatonina foi capaz de induzir resistência a doenças em frutos de tomate, ativando diversas enzimas antioxidantes relacionadas com defesa, como a superóxido dismutase (*SOD*), ascorbato peroxidase (*APX*) e peroxidase (*POD*). Além disso, outro estudo mostra que o tratamento com melatonina inibiu o mofo cinzento causado por *Botrytis cinerea* em tomateiro e ativou vias de sinalização envolvida na resistência a doenças como a via da fenilpropanóide (Li et al., 2019). Estudos realizados por Małolepsza (2006) mostraram que o tratamento com acibenzolar-S-metil e o-hidroxiethylrutina foi capaz de induzir resposta de defesa contra *B. cinerea* em tomateiro. A indução de resistência a doenças em plantas utilizando moléculas constitui uma ferramenta promissora para o controle de pragas na agricultura convencional.

2.4 Avaliação da expressão de genes de defesa

O estudo da expressão gênica em nível do transcriptoma oferece informações importantes de um organismo em uma determinada condição biológica, embora ela não reflita diretamente a expressão das proteínas deste organismo (Chen & Harmon, 2006). Diversos mecanismos estão envolvidos no controle da síntese proteica, os quais atuam desde a transcrição do gene até a obtenção da proteína na forma ativa. Durante o processo de síntese proteica podem ocorrer modificações pós-transcricionais e pós-traducionais, alterando a conformação espacial de proteínas e gerando diferentes classes proteicas, as quais

bioquimicamente e estruturalmente podem desempenhar diferentes funções nas vias metabólicas e na composição do proteoma do organismo.

Diversos estudos já foram conduzidos para avaliar a expressão de genes de defesa por RT-qPCR, como por exemplo, as expressões de 18 genes de defesa em frutos de morango tratados com elicitores: quitosana, Benzotiadiazol (BTH) e um produto comercial baseado em uma mistura de cálcio e ácidos orgânicos (COA) (Landi et al., 2014). Além disso, outros estudos já foram realizados utilizando a RT-qPCR para analisar a expressão de genes de defesa em interação planta-patógeno, como por exemplo em, *Medicago truncatula* infectada com *Pseudomonas syringae* (Montejano-Ramírez et al., 2020), *Triticum aestivum* cv. *Darya* infectada com o fungo *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (Rezaei et al., 2019) e *Capsicum annuum* infectado com *Colletotrichum scovillei* (Baba et al., 2020).

A técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) permite monitorar em tempo real a amplificação de genes (van Pelt-Verkuil et al., 2008), sendo uma técnica bastante eficiente para a validação da expressão gênica. A RT-qPCR baseia-se no processo de transcrição reversa (RT) seguida pela reação em cadeia da polimerase, tendo o produto quantificado por meio de moléculas fluorescentes incorporadas ao DNA, as quais podem ser monitoradas durante a cinética da reação (Higuchi et al., 1993, Kubista et al., 2006).

Atualmente, estudos de RT-qPCR têm sido empregados como análise complementar em estudos proteômicos, a fim de avaliar quantitativamente a expressão de genes potencialmente envolvidos em diversos processos biológicos, como em estudos de interação planta-patógeno (Braybrook et al., 2006, Ooi et al., 2012). A RT-qPCR tornou-se uma técnica muito informativa para a quantificação de diferenças nos níveis de expressão gênica entre amostras (Taylor et al., 2010). A escolha de genes referência apropriados é fundamental para obtenção de resultados precisos, uma vez que, apesar desses genes apresentarem uma expressão uniforme na maioria dos tecidos, podem variar em diferentes fases de

desenvolvimento, tratamentos biológicos e condições ambientais (Expósito-Rodríguez et al., 2008). A estabilidade dos genes de referência é determinada partindo do princípio de que dois genes normalizadores ideais apresentam razões de expressão idênticas em todas as amostras, independentemente das condições ambientais e experimentais. Assim, um valor de estabilidade do gene (M) baixo indica expressão mais estável.

Vários programas computacionais têm sido utilizados para a identificação e a classificação dos genes constitutivos mais adequados, entre eles destacam-se o geNorm (Vandesompele et al., 2002). O programa geNorm determina os genes de referência mais estáveis em um conjunto de amostras e também quantos genes de referência são necessários para que a normalização seja segura. Este software calcula o valor de M baseado na média geométrica dos genes testados e na média da variação par a par de genes contra os outros presentes nas diferentes amostras (Vandesompele et al., 2002).

2.5 Nanotecnologia no controle de fitopatógenos

Além das abordagens biotecnológicas, mais recentemente o uso de nanotecnologia para o controle de doenças de plantas tem se mostrado como uma estratégia promissora. A nanotecnologia envolve a caracterização, fabricação e/ou manipulação de estruturas, dispositivos ou materiais em nanoescala que geralmente abrange pelo menos uma dimensão de cerca de 1-100 nm (Duncan, 2011). Quando aplicada a questões biológicas, por vezes recebe a terminologia nanobiotecnologia. Existem diferentes tipos de nanomateriais e nanossistemas que podem ser aplicados em sistemas biológicos e cuja preparação exige uma formulação adequada e condições de processamento oportunas.

Por exemplo, as nanopartículas metálicas (NPMs) podem ser aplicadas em diversas áreas do conhecimento como a medicina, biologia, física, química, ciência dos materiais e agricultura (Kumar et al., 2014). Dentre as NPMs, as nanopartículas de prata (AgNPs) tem

recebido crescente destaque pois podem ser aplicadas em várias áreas como circuitos integrados, sensores, filtros, fibras, eletrodos celulares e agentes antimicrobianos (Rolim et al., 2019). Contudo, ainda existem alguns desafios para produzir NPMs, e o principal deles é a obtenção de suspensões coloidais estáveis e escaláveis industrialmente. Isso acontece devido à elevada energia superficial das nanopartículas (NPs), o que facilita termodinamicamente a agregação das mesmas para a geração de ligações metal-metal (Klabunde & Richards, 2009).

Para evitar a agregação das NPs, alguns estabilizantes poliméricos são utilizados, como o poli(álcool vinílico) (PVA), poli(vinilpirrolidona) (PVP) e ácido poli acrílico (PAA), que apresentam sítios básicos de Lewis em suas estruturas, com alta afinidade pelas AgNPs (Klabunde & Richards, 2009). Uma outra forma de evitar a agregação das NPs é a utilização de íons provenientes dos sais boroidreto e citrato de sódio, que adsorvem nas superfícies, criando repulsões eletrostáticas entre as NPs. Mas, para isso é necessária a adição desses reagentes em excesso molar (Solomon et al., 2007).

Um outro método que vem sendo utilizado para síntese de NPs é a síntese verde, que consiste na utilização de agentes redutores e estabilizantes de baixa ou nula toxicidade, substituindo os reagentes convencionais que são tóxicos para o meio ambiente e para a saúde humana, o que torna o método eco-amigável/sustentável (Ahmad et al., 2019). Síntese verde (também atribuída com o termo biológica) pode ser classificada como: utilização de microrganismos como fungos, leveduras (eucariotos), bactérias e actinomicetos (procariontes) ou pelo uso de plantas e extratos vegetais (Rafique et al., 2017). Dentre os organismos utilizados nesta via biológica, se destacam as plantas/extratos vegetais, que contém inúmeras moléculas como enzimas, proteínas, aminoácidos, flavonoides, compostos heterocíclicos e metabólitos hidrossolúveis, capazes de reduzir os íons Ag^+ a AgNPs em apenas uma etapa (Sharma et al., 2009, Rafique et al., 2017).

A síntese verde é vantajosa em relação à síntese química, porque as plantas produzem biomoléculas redutoras que aderem à superfície das NPs, garantindo estabilidade e proteção. Na realização da síntese verde, muitas vezes um extrato é misturado a uma solução aquosa de um sal do metal, geralmente o nitrato de prata (AgNO_3) no caso de AgNPs, e acontece a biorredução, como mostra o esquema na Figura 3. Alguns fatores podem afetar a velocidade da reação de síntese das AgNPs, como por exemplo o pH, temperatura, concentração e natureza do extrato, e concentração do sal metálico (Mittal et al., 2013).

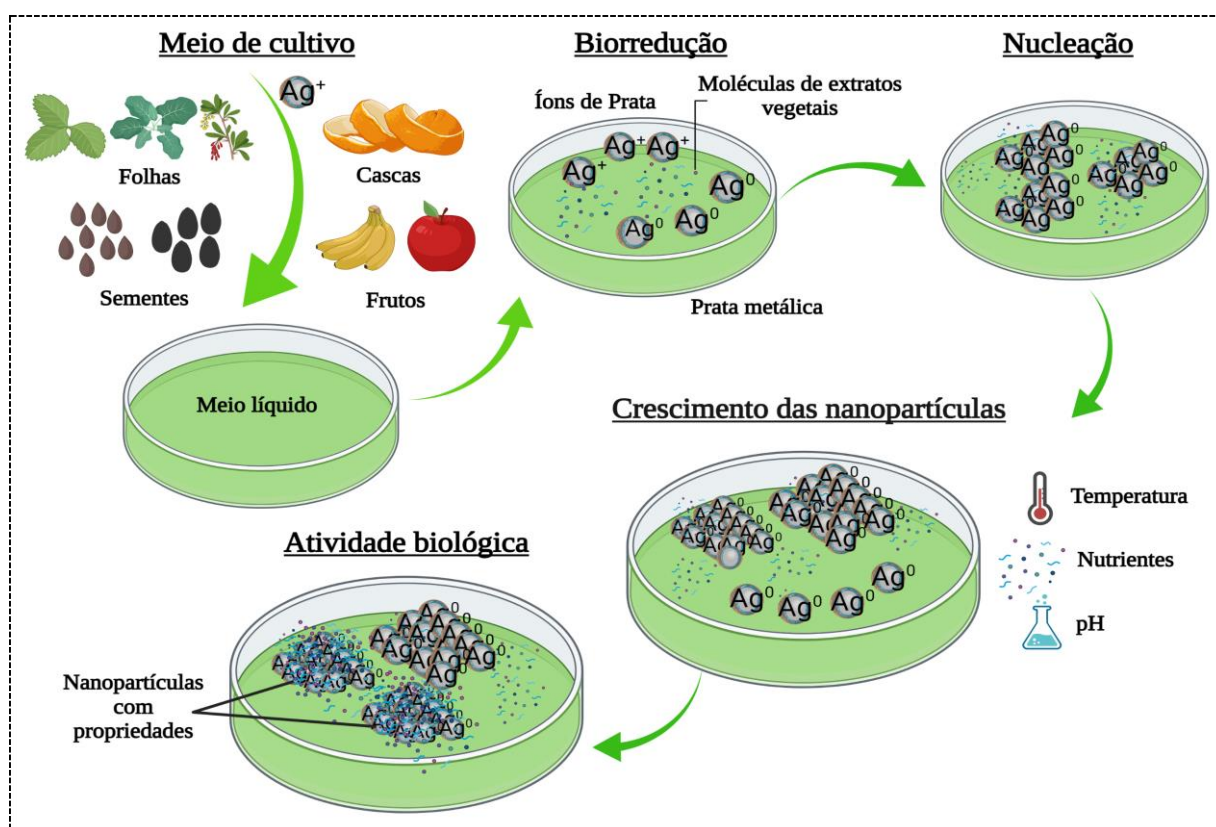


Figura 3. Esquema de nucleação e crescimento das nanopartículas de prata em síntese verde.

A eficiência da síntese e as características das AgNPs dependem da parte da planta utilizada no extrato (folhas, talo, cascas ou sementes ou misturas delas). São exemplos de plantas já estudadas a *Boerhaavia diffusa* (Kumar et al., 2014), *Artemisia annua* e *Sida acuta* (Johnson et al., 2014), *Capsicum annuum L.* (Li et al., 2007), *Berberis vulgaris* (Behravan et

al., 2019) *Salvia spinosa* (Pirtarighat et al., 2019), *Camellia sinensis* (chá verde) (Vilchis-Nestor et al., 2008), *Annona reticulata* (Parthiban et al., 2019), *Allium cepa* (Jini & Sharmila, 2020), *Ziziphus joazeiro* (Guimarães et al., 2020), entre muitas outras.

Diversos estudos têm mostrado a atividade antimicrobiana de AgNPs. Estudos realizados por Savithramma et al. (2011) mostraram que AgNPs sintetizadas com extratos de plantas medicinais foram capazes de inibir o crescimento de *Klebsiella*, *Aspergillus*, *Pseudomonas* e *Fusarium*. Além disso, estudos realizados por (Soliman et al., 2018) mostram que AgNPs sintetizados a partir de extratos de *Rhodotorula* sp. strain ATL72 foram capazes de inibir completamente o crescimento de varios patógenos, incluindo bactérias Gram positivas (*Streptococcus* sp., *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp.) e bactérias Gram negativas (*Shigella* sp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas areuginosa* e *Klebsiella* sp.).

Além de inibir o crescimento de microorganismos, as AgNPs também são capazes de induzir resposta de defesa em plantas. Estudos realizados por Nair and Chung (2015) mostram que AgNPs são capazes de alterar a expressão de genes relacionados com defesa, como catalase (*CAT*), superóxido dismutase (*SOD*) e ascorbato peroxidase (*APX*). Outro estudo mostra que AgNPs são capazes de alterar os níveis de pigmentos fotossintéticos, proteína solúvel total e alterar as atividades da da polifenol oxidase (*PPO*) e peroxidase (*POD*) (Noha et al., 2018).

2.6 Mecanismo de ação das AgNPs em microorganismos

Os mecanismos antibacterianos das AgNPs não são completamente esclarecidos. Sabe-se que a ação das AgNPs impede os processos que ocorrem na superfície e no interior dos microorganismos, resultando em inibição do crescimento, perda da infectividade e diminuição de atividades biológicas, podendo ocasionar danos celulares. As AgNPs afetam a permeabilidade seletiva da membrana (é aumentada), bem como a respiração, resultando na

morte celular. Diversos estudos relatam que o diâmetro das AgNPs e a carga positiva dos íons Ag^+ (liberados pelas AgNPs após atravessarem a parede celular dos microorganismos) são primordiais para a sua atividade antimicrobiana, por meio da atração eletrostática entre a membrana celular dos microorganismos (negativamente carregadas) e as AgNPs (positivamente carregadas) (Morones et al., 2005, Sharma et al., 2009).

Acredita-se que AgNPs são capazes de invadir as células, e interagir com as ligações dissulfeto de glicoproteínas/proteínas dos microorganismos, e conseqüentemente afetam negativamente o DNA, dificultando o processo de replicação impossibilitando a transcrição. Esses mecanismos, isoladamente ou concomitantemente, estão envolvidos nas ações antibacterianas (Lara et al., 2011). Tais fatos ocorrem porque a prata tem alta afinidade com os elementos enxofre e fósforo. A membrana celular, assim como muitas proteínas, é rica em enxofre, já o DNA, é rico em fósforo. Estas modificações nas estruturas das biomoléculas prejudicam os processos bacterianos, podendo ocasionar morte celular (Sharma et al., 2009, Morones et al., 2005). A Figura 4 ilustra a interação de íons prata em bactérias.

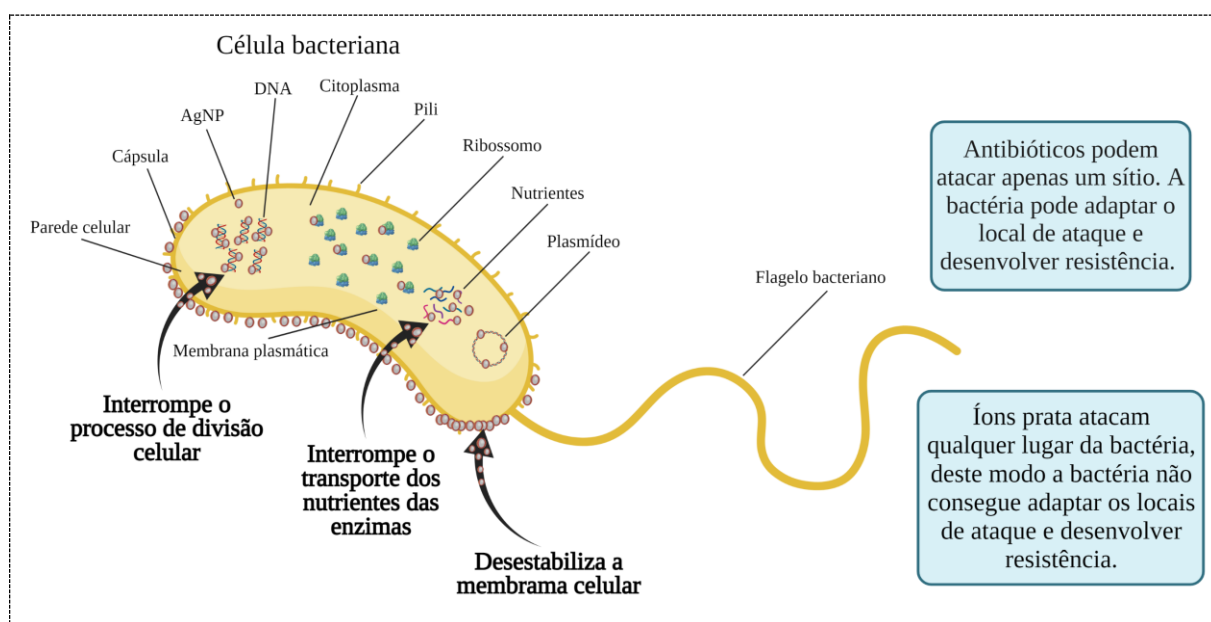


Figura 4. AgNPs atravessando a parede celular e liberando íons prata que se ligam com enzimas e DNA.

Uma das formas de se estudar os efeitos das AgNPs em microorganismos é por meio da avaliação proteômica, uma abordagem de caracterização em larga escala do conjunto de proteínas traduzidas em uma célula ou tecido. Nesse sentido, o estudo do proteoma tem como objetivo identificar os componentes proteicos e analisar a abundância das proteínas, em diferentes condições biológicas (Fournier et al., 2007, Tao et al., 2011). A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS) é a ferramenta mais importante para a identificação e quantificação de proteínas (Alves et al., 2017). A aplicação dos métodos LC-MS permite identificar e quantificar milhares de peptídeos e proteínas em um mesmo experimento. Ter um banco de dados bem curado que inclua todas as possíveis proteínas presentes naquele organismo é uma grande vantagem para a identificação das sequências. No entanto, as sequências peptídicas também podem ser identificadas por sequenciamento de novo (Ferreira et al., 2014). A digestão enzimática é um passo crucial na proteômica *bottom-up*. A digestão é importante, pois a sensibilidade dos métodos depende do tamanho ótimo dos peptídeos, considerando a capacidade de serem ionizados e fragmentados. A tripsina é a enzima mais utilizada devido à sua clivagem específica no lado C-terminal dos resíduos de lisina e arginina (Fiedler et al., 2014, Vensel et al., 2011).

3. JUSTIFICATIVA

A podridão negra consiste em uma doença bacteriana causada por *X. campestris* pv. *campestris* (*Xcc*), responsável por grandes prejuízos na qualidade e produção de diversas hortaliças. Tendo em vista que a podridão negra que acomete as brássicas vem sendo tratada principalmente com a aplicação de agroquímicos, potencialmente danosos ao meio ambiente, atualmente o desenvolvimento de plantas resistentes tem sido considerado como a forma mais eficiente no controle desta doença. Uma estratégia que vem sendo bastante utilizada para o controle de fitopatógenos tem sido a utilização de biomoléculas como indutores de resistência em plantas que tem se apresentado como uma importante alternativa ao uso de plantas resistentes e utilização de agroquímicos. Sabendo que a indução de resistência de plantas tem sido feita com biomoléculas, uma das propostas do presente estudo foi a avaliação da possível influência de metabólitos concentrados produzidos por *R. tropici* (MC-RT) na indução de genes de resistência à *Xcc* por RT-qPCR em brássica. Uma vez comprovado o efeito na indução de defesa em condições controladas (casa de vegetação), esses metabólitos poderão ser utilizados como uma proposta alternativa aos agroquímicos para controle da podridão negra.

Uma outra estratégia alternativa aos agroquímicos, que vem sendo bastante utilizada para o controle de microorganismos é a utilização de AgNPs. Diversos estudos já relataram que AgNPs apresentam atividade biológica contra diversas bactérias resistentes como *Staphylococcus aureus*, *S. pyogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis* (Gopinath et al., 2012). Ainda, sabendo que a obtenção de AgNPs por síntese química gera resíduos tóxicos e danos ao meio ambiente, uma outra proposta do presente estudo é desenvolver uma rota simples, rápida e sustentável para obtenção de AgNPs por síntese verde utilizando extratos aquosos de plantas como agentes redutores e estabilizantes. Nesse sentido, a atividade antimicrobiana dessas AgNPs será avaliada em sistemas biológicos *in vitro* e *in*

vivo, visto que estas NPs podem ser uma alternativa para o controle de *Xcc*. Por fim, as proteínas envolvidas na resposta a AgNPs em *Xcc* e *B. oleracea*, também serão avaliadas por proteômica.

4. HIPÓTESES

Biomoléculas produzidas por *R. tropici* são capazes de induzir genes de resistência à *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em brássica.

Extratos aquosos oriundos de *B. oleracea* var. *capitata*, Arabidopsis, neem (*Azadirachta indica*) e noni (*Morinda citrifolia*) apresentam metabólitos que podem reduzir e estabilizar a prata iônica formando AgNPs, e essas por sua vez, apresentam efeito antibacteriano e/ou indutor de resistência em plantas.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é utilizar ferramentas biotecnológicas e nanotecnológicas visando ao controle da podridão negra das brássicas.

5.2. Objetivos específicos

- Analisar por RT-qPCR a indução de genes de defesa em *B. oleracea* var. *capitata* após a aplicação de metabólitos concentrados de *R. tropici* (MC-RT);
- Sintetizar, caracterizar e avaliar a atividade biológica de AgNPs produzidas utilizando extratos aquosos de plantas;
- Analisar por RT-qPCR a indução de genes de defesa em *B. oleracea* var. *capitata* após a exposição a AgNPs;
- Identificar proteínas moduladas em *X. campestris* pv. *campestris* tratadas com AgNPs utilizando cromatografia líquida acoplada á espectrometria de massa (LC-MS/MS).

CAPÍTULO I – Indução de genes relacionados à defesa em *Brassica oleracea* var. *capitata* utilizando metabólitos concentrados produzidos por *Rhizobium tropici* CIAT 899

Este capítulo foi publicado com pequenas modificações como:

Brazilian Journal of Microbiology
<https://doi.org/10.1007/s42770-022-00722-4>



BACTERIAL AND FUNGAL PATHOGENESIS - RESEARCH PAPER



Priming of defense-related genes in *Brassica oleracea* var. *capitata* using concentrated metabolites produced by *Rhizobium tropici* CIAT 899

Ivonaldo Reis Santos^{1,2} · Daiane Gonzaga Ribeiro^{1,3} · Fabiano Touzdzian Pinheiro Kohlrausch Távora^{1,4} · Mariana Rocha Maximiano^{1,3} · Ana Carolina Rabelo¹ · Thuanny Borba Rios¹ · Fábio Bueno Reis Junior⁵ · Manuel Megias⁶ · Luciano Paulino Silva^{1,2} · Angela Mehta¹

Received: 31 August 2021 / Accepted: 18 February 2022
© The Author(s) under exclusive licence to Sociedade Brasileira de Microbiologia 2022

RESUMO

Extratos de diferentes organismos vivos têm sido investigados como possíveis indutores de resistência com a capacidade de controlar fitopatógenos. Para verificar o potencial de metabólitos extraídos de *Rhizobium tropici* para desencadear respostas de defesa em plantas crucíferas, analisou-se a expressão de genes relacionados à defesa por RT-qPCR. *Brassica oleracea* var. *capitata*, suscetível a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc), foram cultivadas em casa de vegetação. Aos 18 dias após a semeadura, as plantas foram inoculadas com 1 mL de metabólitos concentrados de *R. tropici* (MC-RT) 1% na raiz. Em um segundo experimento, as folhas de *B. oleracea* foram pulverizadas na face adaxial com 1 mL de uma solução contendo 1% de MC-RT. O tecido aéreo e radicular foram coletados separadamente em 0 (condição controle), 24 e 48 horas após o tratamento (hat), submetidos à extração de RNA e análise de expressão gênica por RT-qPCR. Os resultados mostraram que após o tratamento da raiz com MC-RT, os genes avaliados foram regulados positivamente em 24 hat e regulados negativamente em 48 hat nas raízes; enquanto nas folhas, os genes foram regulados negativamente em 24 e 48 hat. Por outro lado, o tratamento foliar com MC-RT mostrou que a maioria dos genes nas folhas e raízes foram regulados positivamente aos 24 e 48 hat. Esses resultados indicam que o efeito do MC-RT aplicado nas raízes parece ficar restrito à região aplicada, enquanto a aplicação nas folhas resulta em uma resposta mais sistêmica e o efeito do MC-RT é sustentado por um período mais longo de tempo. Os resultados obtidos neste estudo enfatizam o potencial biotecnológico do uso de metabólitos de *R. tropici*, atuando como um elicitador de respostas de defesa ativas em plantas.

Palavras chaves: metabólitos concentrados, podridão negra, resposta de defesa e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Xanthomonas* compreende várias bactérias fitopatogênicas de grande importância, que afetam uma grande variedade de culturas de relevância social e econômica, podendo ser destacada *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc), responsável pela podridão negra das brassicas (Vicente & Holub, 2013, Rubel et al., 2017). A família *Brassicaceae* inclui uma grande variedade de culturas cultivadas para alimentação, preparação de especiarias e plantas ornamentais. A podridão negra ocorre em todas as regiões produtoras de crucíferas, causando perdas no rendimento e na qualidade das culturas (Vicente et al., 2001b). A prevenção da podridão negra tem sido de suma importância para o controle de infecções. No entanto, esse controle é dificultado por ser uma doença sistêmica, além de ser transmitido por meio de sementes infectadas (Vicente, 2004). Atualmente, essa doença tem sido parcialmente controlada pelo uso de cultivares resistentes, no entanto, existem poucas fontes de resistência identificadas (Vicente et al., 2001a).

As tecnologias verdes estão se tornando cada vez mais importantes em programas de manejo integrado de pragas e patógenos, especialmente quando se discute a produção integrada para uma agricultura sustentável. Uma estratégia importante para o controle de doenças é o uso de biomoléculas para reduzir pesticidas tóxicos para a saúde e o meio ambiente. *Rhizobium tropici* é uma bactéria fixadora de nitrogênio associada a leguminosas, principalmente em feijões comuns (*Phaseolus vulgaris* L.) e leucena (*Leucaena* spp.). Recentemente, Marks et al. (2013b) demonstraram que moléculas extraídas de *R. tropici* juntamente com inoculantes contendo rizobactérias foram capazes de aumentar o crescimento e a produtividade de soja e milho, demonstrando o potencial biotecnológico desses extratos.

Extratos de diferentes organismos foram investigados como indutores de resistência e têm sido eficazes no controle de fitopatógenos (Silva et al., 2007, Silva et al., 2013). Os indutores aumentam os níveis de resistência e ativam genes associados à defesa nas plantas,

como os que codificam as enzimas peroxidase, quitinases e beta-1,3-glucanase (Ramamoorthy et al., 2002, Guzzo & Harakava, 2007). Em estudos anteriores realizados com metabólitos concentrados de *R. tropici* (MC-RT) por M. Megias (comunicação pessoal), foi verificada a indução de proteínas PR (relacionadas à patogênese) envolvidas na defesa da planta.

As proteínas PR foram relatadas pela primeira vez por van Kammen van Loon and van Kammen (1970) em plantas de tabaco infectadas com o vírus do mosaico do tabaco. Essas proteínas têm sido associadas à defesa ativa das plantas, restringindo o desenvolvimento e a disseminação de doenças. Atualmente, existem 17 famílias de proteínas PR (PR-1 a PR-17) que apresentam várias propriedades antimicrobianas envolvidas na defesa da planta por meio de diferentes processos biológicos (Fister et al., 2016). Outros genes envolvidos na resposta de defesa a patógenos também foram relatados, como a proteína de fusão de ácido graxo dessaturase/citocromo b5, dioxigenase dependente de 2-oxoglutarato tipo DAO e proteína 2 responsiva ao sal (Jiang et al., 2011).

Uma das principais técnicas utilizadas para quantificar a expressão gênica é o PCR quantitativo (RT-qPCR) devido à sua alta sensibilidade e especificidade. A análise da expressão gênica é uma abordagem importante para entender os padrões de expressão gênica em processos biológicos (Dussert et al., 2013, Tranbarger et al., 2011). Assim, a avaliação da expressão de genes envolvidos na indução de resistência pela técnica de RT-qPCR é de suma importância para a melhor compreensão do processo. Nesse contexto, o objetivo deste capítulo foi avaliar a influência das biomoléculas produzidas por *R. tropici* (CIAT 899) na resistência a *Xcc* e verificar a indução de genes relacionados à defesa por RT-qPCR em *B. oleracea*. Os resultados obtidos neste estudo podem auxiliar na otimização do uso de metabólitos concentrados produzidos por *R. tropici* (MC-RT) em estratégias de biocontrole visando à redução do uso de agrotóxicos na produção de culturas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cultivo de *R. tropici* CIAT 899 e purificação de metabólitos

Neste estudo, *R. tropici* CIAT 899, obtido da Embrapa Cerrados, foi cultivado a 28°C em meio tryptone yeast (TY) com a seguinte composição em g.L⁻¹: 3 g de extrato de levedura, 5 g de triptona, 5 g de triptona, 0,65 g de cloreto de cálcio (CaCl₂·2H₂O); pH 6,8-7,0. As vitaminas biotina e tiamina foram adicionadas e dissolvidas em água (H₂O), depois esterilizadas por filtração utilizando filtro (0,2 µm), para uma concentração final de 0,2 e 5 µg/mL, respectivamente.

A partir de um pré-inóculo em meio TY, a bactéria *R. tropici* foi cultivada em meio mínimo B: Manitol (10 g/L), sulfato de magnésio (MgSO₄·7H₂O) (0,55 g/L), nitrato de potássio (KNO₃) (0,55 g/L), nitrato de cálcio (Ca(NO₃)₂·4H₂O) (1,30 g/L), Fe(III)-NaEDTA (2,5 mL/L) e oligoelementos (2,5 mL/L). A solução Fe(III)-NaEDTA (1,3% m/v) foi esterilizada por filtração com filtro de 0,45 µm. A composição da solução de oligoelementos é: sulfato de magnésio (MnSO₄·H₂O) (0,609 g/L), sulfato de zinco (ZnSO₄·7H₂O) (0,097 g/L), ácido bórico (H₃BO₃) (1,269 g/L), molibdato de sódio (Na₂MoO₄·2H₂O) (0,398 g/L) e sulfato de cobre (CuSO₄·5H₂O) (0,035 g/L). O pH foi ajustado para 5,0 e a solução foi autoclavada. Em seguida foram adicionados 10 mL de fosfato de potássio (K₂HPO₄) 1 M com pH 7,2 por litro de meio. Este meio foi suplementado com apigenina (1 mg/mL), ou com cloreto de sódio (NaCl) a 300 mM, exceto os controles negativos, e foram incubados a 28°C sob agitação, durante 3 a 5 dias.

A extração dos metabólitos foi efetuada após a remoção das células por centrifugação, adicionando-se 300 mL de n-butanol por litro de meio. A mistura foi mantida em agitação durante 12 h e deixada em repouso por pelo menos 24 h, até se observar boa separação das fases aquosas e butanólica. Em seguida, a fase butanólica (superior) contendo os fatores de nodulação foi recolhida e concentrada em um evaporador rotativo a baixa temperatura. A

purificação dos metabólitos foi realizada utilizando um cartucho de extração em fase sólida (SPE C₁₈ Resprep, Teknokroma). A fração contendo os metabólitos foi recuperada em metanol, liofilizada e ressuspensa em 5 mL de acetonitrilo 20% em H₂O (v/v). Em seguida, o MC-RT foi diluído em água ultrapura para uma concentração final de 1%.

2.2 Tratamento com MC-RT em plantas de *B. oleracea* para análise de RT-qPCR

Sementes da cultivar de *B. oleracea* var. *capitata* (suscetível á *Xcc* 51), foram plantadas e as plantas cultivadas em casa de vegetação na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, Brasil, sem controle de temperatura. As sementes foram submetidas à desinfestação química com hipoclorito de sódio a 3% por 15 min e lavadas com água destilada por 7×. Após a desinfestação, as sementes foram embebidas em solução contendo metabólitos concentrados de *R. tropici* (MC-RT) a 1% e colocadas em câmara fria a 4°C por 2 horas. Posteriormente, as sementes foram colocadas para germinar em papel Germitest[®] por 3 dias e transplantadas para copos plásticos de 200 mL contendo uma mistura de solo estéril, areia estéril e esterco (3:1:1 w/w). Cada copo de plástico continha 1 planta e 3 plantas formaram cada amostra (n=3). Foram utilizadas 3 repetições biológicas (amostras), totalizando 54 plantas.

Aos 15 dias após o transplante, foram realizados dois experimentos. No primeiro experimento, as plantas foram inoculadas com 1 mL de MC-RT 1% na raiz (rizosfera). Os tecidos aéreos e radiculares foram coletados em triplicata (cada repetição foi formada por 3 plantas) separadamente em 0 h (controle não tratado), 24 e 48 h após a aplicação, totalizando 18 amostras. No segundo experimento, as folhas foram pulverizadas na face adaxial com 1 mL de MC-RT 1%. Os tecidos aéreos e radiculares foram coletados conforme descrito para o primeiro experimento, macerados em nitrogênio líquido e submetidos à extração de RNA total para análise de RT-qPCR. As plantas tratadas (tecidos aéreos e radiculares) 24 e 48 h após a

aplicação foram comparadas com a condição controle (antes do tratamento). Três réplicas biológicas foram analisadas por tratamento, totalizando 36 amostras (Figura 5).

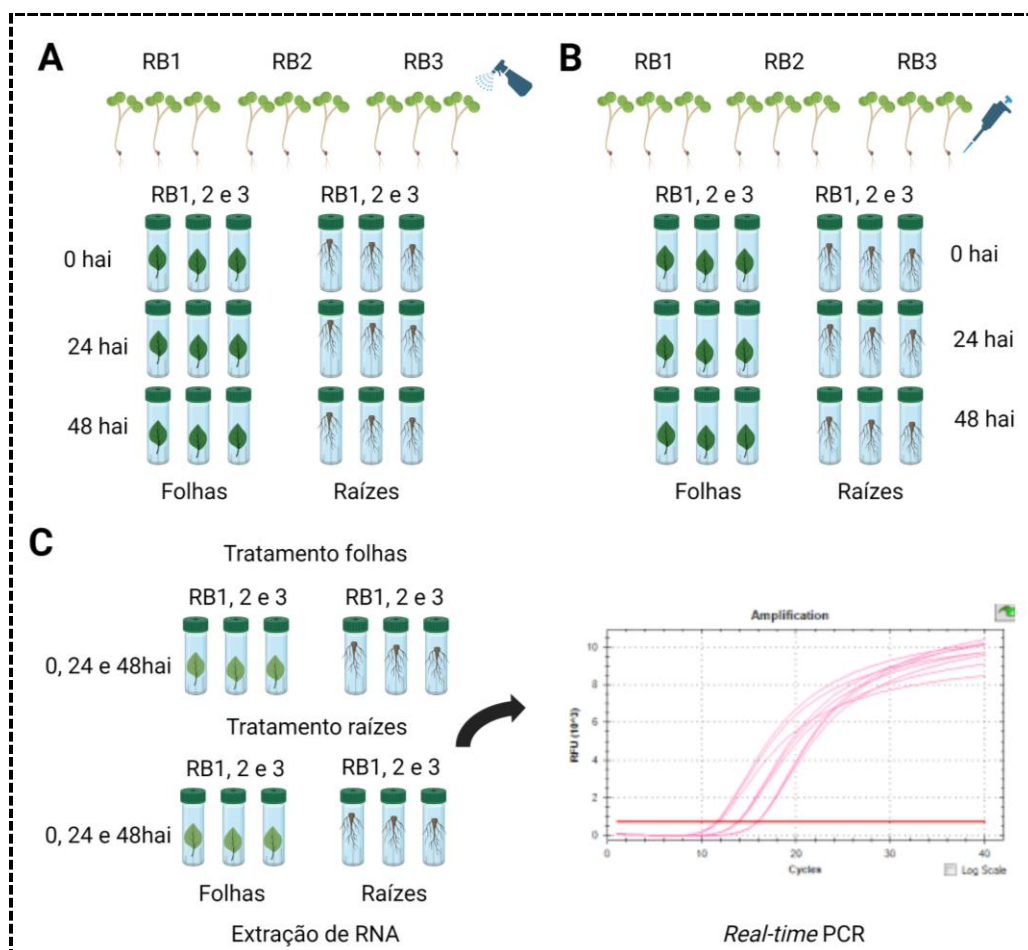


Figura 5. Esquema simplificado demonstrando as etapas desenvolvidas para avaliar a possível influência de moléculas produzidas por *R. tropici* (CIAT 899) na indução de genes de defesa por RT-qPCR. **A** – Pulverização das folhas com solução contendo metabólitos concentrados de *R. tropici* (MC-RT) a 1% e coleta de material, parte aérea e radicular, separadamente (0, 24 e 48 hat). **B** – Inoculação das plantas com 1 mL de MC-RT 1% na raiz e coleta de material parte aérea e radicular, separadamente (0, 24 e 48 hai). **C** - Extração de RNA total e análise por RT-qPCR.

2.3 Extração e purificação de RNA total

A extração de RNA total foi realizada utilizando o método Trizol (*Invitrogen*) para a parte aérea de acordo com Simms et al. (1993), com modificações e o método CTAB para as raízes. Para a parte aérea, aproximadamente 0,1 g do material vegetal foi utilizado e foi

adicionado 1 mL do reagente Trizol, acrescido de 1% de β -mercaptoetanol (mantido a 4°C). As amostras foram homogeneizadas durante 1 min com o auxílio de um agitador de tubos do tipo vórtex. Em seguida, os tubos foram mantidos durante 5 min em gelo e centrifugados ($16128 \times g$ por 10 min a 4°C). Após a centrifugação, o sobrenadante (fase aquosa) foi transferido para um novo tubo de 2 mL e foram adicionados 300 μ L de clorofórmio para a separação de fases.

As amostras foram incubadas novamente durante 3 min em gelo e homogeneizadas por 1 min em vortex. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas por 15 min a $16128 \times g$ a 4°C. Posteriormente, foi coletada a fase aquosa e adicionado o mesmo volume de isopropanol (mantido a 4°C) para a precipitação dos ácidos nucléicos. As amostras foram incubadas durante 2 horas a -20°C e centrifugadas a $16128 \times g$, por 15 min a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e 1 mL de etanol 75% foi adicionado. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 min, a 4°C e a $16128 \times g$ e o sobrenadante foi novamente descartado. O precipitado foi seco por aproximadamente 10 min à temperatura ambiente e depois, eluído em 20 μ L de H₂O ultrapura tratada com DEPC (pirocarbonato de dietila).

Para a parte radicular, aproximadamente 0,1 g do material vegetal foi utilizado e foi adicionados 600 μ L do tampão de extração CTAB (brometo de cetrimônio), acrescido de 2% de β -mercaptoetanol (mantido a 4°C). Posteriormente, as amostras foram aquecidas a 65°C sob agitação e em seguida adicionados 600 μ L de clorofil e centrifugados ($16128 \times g$ por 4 min a 4°C). Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e foram adicionados 600 μ L com clorofil, agitados e centrifugados ($16128 \times g$ por 4 min a 4°C). Posteriormente, foi coletada a fase aquosa e adicionado o mesmo volume de isopropanol (mantido a 4°C). As amostras foram incubadas durante 2 h a -20°C e centrifugadas a $16128 \times$

g, por 30 min a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e 600 µL de etanol 70% foram adicionados. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 5 min, a 4°C e a 16128 × g e o sobrenadante foi novamente descartado. O precipitado foi seco por aproximadamente 10 min à temperatura ambiente e depois, eluído em 20 µL de H₂O tratada com DEPC (pirocarbonato de dietila).

2.4 Quantificação e avaliação de ácidos nucleicos

A quantificação do RNA isolado foi realizada utilizando espectrofotômetro NanoDrop® (ND-1000 UV-Vis -Termo Fisher) de acordo com as instruções do fabricante. Para verificar a integridade do RNA isolado, as amostras foram analisadas em gel de agarose desnaturante (agarose 1%; Tampão TAE 1X), pré-corado com brometo de etídio (0,5 mg/mL) (Sambrook et al., 1989). Foram aplicados no gel 1 µL de RNA acrescido de 2 µL de BlueJuice™ Gel Loading Buffer (10x) (*Invitrogen*). Foi utilizado como marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (*Invitrogen™/Life Technologies™*). Após adição do tampão de corrida (Tris Base, ácido acético e EDTA 0,5 M) na cuba, a eletroforese foi conduzida a 85 V por cerca de 30 min. Os géis foram visualizados e fotografados sob luz ultravioleta.

2.5 Tratamento de RNA total e síntese de cDNA para RT-qPCR

Para o tratamento de RNA com DNase para eliminar possíveis contaminações com DNA genômico, foi utilizado 4 µg de RNA total em volume de 20 µL. Foram adicionados 4 µg de RNA total, 2 µL de tampão 10× Tampão de Reação, 1 µL da enzima Turbo™ DNase (*Applied Biosystems/Ambion*) e completado o volume final com água estéril para 20 µL. As amostras foram mantidas durante 30 min a 37°C. Posteriormente, foram adicionados 4 µL de

EDTA 25 mM (ácido etilenodiamino tetra-acético) para a inativação da enzima Turbo DNase, e as amostras foram mantidas por 10 min a 65°C e em seguida no gelo por 5 min.

A síntese de cDNA foi realizada utilizando 2 µg de RNA tratado. O cDNA foi sintetizado utilizando o kit Next Generation MMLV RNase H Minus First-Strand cDNA Synthesis (DNA Express Biotecnologia LTDA). Para cada reação foram utilizados 10 µL do RNA tratado (2 µg), 1 µL de oligo (DT), 1 µL de DNTP's, seguida de incubação à 65°C por 5 min e em gelo por 5 min. Posteriormente, foram adicionados 4 µL de Tampão de Reação 5× First-Strand cDNA, 2 µL de DTT (Ditiotreitol) e 1 µL da enzima NextGeneration Transcriptase Reversa M-MLV RNase Minus, com incubação à 50°C por 60 min para a reação de transcrição reversa (RT) e 70°C por 15 min para inativação da enzima. O cDNA fita simples foi armazenado a -20°C e utilizado para RT-qPCR.

2.6 Validação de cDNAs por RT-PCR convencional

O RT-PCR semi-quantitativo foi utilizado para a avaliação dos cDNAs sintetizados e para a validação dos primers selecionados para a análise de expressão gênica. As reações foram conduzidas com cDNA diluído 20× em água ultrapura, 2,5 µL de tampão de reação 5× (GE Healthcare Life Sciences), 1 µL de cada primer para a concentração final de 0,2 µM (forward e reverse), 0,5 µL de dNTPs, 0,75 µL de MgCl₂ 50 mM e 0,25 µL de Taq DNA Polimerase (GE Healthcare Life Sciences) para um volume final de 25 µL. A reação ocorreu em termociclador (Veriti 96 Well Thermal Cycler - Applied Biosystems) sob as seguintes condições: 95°C por 3 min; 35 ciclos de 95°C por 30 s, 60°C por 30 s e 72°C por 1 min; finalizando com um passo de 72°C por 5 min. Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

2.7 Seleção de genes e desenho de primers

Proteínas potencialmente envolvidas na resposta de defesa foram selecionadas a partir de estudos publicados anteriormente (Tabela 1) e os genes correspondentes foram utilizados para desenhar os primers. O software Primer3 (Untergasser et al., 2012) foi utilizado para desenhar todos os primers, e a ausência de amplificação e produtos inespecíficos foram avaliados utilizando o software OligoAnalyzer 3.1 (Owczarzy et al., 2008). Os parâmetros utilizados para desenho dos primers foram: temperatura média de 57°C a 63°C para cada primer, tamanho dos primers 20 nucleotídeos.

2.8 Experimentos de RT-qPCR e análise de dados

Os experimentos de RT-qPCR foram realizados em termociclador 7300 96-well Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems). Todas as reações foram compostas por 5 µL de Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems), 0,2 µL de cada primer numa concentração inicial de 10 µM (forward e reverse) e 2 µL de cDNA fita simples referente a cada amostra a ser analisada (diluído 10×). O programa de PCR utilizado foi 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. E para a verificação da presença de dímeros de primers e produtos inespecíficos, a curva de desnaturação -“melting curve” foi analisada após o término da amplificação. O programa foi 95°C por 15 s, 60°C por 60 s, aumentando 0,3°C a cada ciclo até atingir 95°C. Todos os experimentos foram realizados utilizando três réplicas biológicas independentes e para cada réplica biológica, três réplicas técnicas foram utilizadas. Todas as reações de RT-qPCR foram obtidas em placas 96 poços e em cada microplaca foi colocado um controle negativo sem a presença de cDNA para confirmar a ausência de contaminação. Reações com RNA tratado com DNase também foram realizadas para confirmar a ausência de contaminações com DNA genômico.

Os dados brutos da fluorescência de todas as corridas foram importados para o *software Real-time PCR Miner* (Zhao & Fernald, 2005), para determinar a eficiência da PCR e o valor de Cq (*cycle threshold*). A expressão gênica foi analisada utilizando o *software Rest* (Pfaffl et al., 2002). A normalização foi realizada com a utilização de genes de referências internos, conhecidos como genes constitutivos (Guénin et al., 2009). Para comparar as diferenças na expressão entre os grupos, utilizou-se o teste t com 4 graus de liberdade, n = 9 (3 repetições biológicas e 3 técnicas para cada replica biológica).

2.9 Inoculação de *Xcc* em plantas tratadas com MC-RT

A fim de verificar os sintomas em *B. oleracea* var. *capitata* Veloce (suscetível a *Xcc* 51), plantas tratadas com 1% de MC-RT e não tratadas foram inoculadas com o isolado *Xcc* 51. *Xcc* foi cultivada em meio NYG (*Nutrient Yeast Glycerol*), composto por 5 g de peptona, 3 g de extrato de levedura, 10 g de ágar e 20 mL de glicerol por litro (Daniels et al., 1984) a 28°C. Após 48 h de crescimento em placa de Petri, as células foram cultivadas durante 16 h em meio NYG líquido. Posteriormente, a cultura bacteriana foi transferida para tubos de polipropileno de 50 mL e centrifugados (5976 g por 15 min a 4°C). Em seguida o sobrenadante foi descartado e o pellet resuspenso em solução salina estéril (NaCl 0,85%) e a densidade óptica ajustada para $A_{600} = 0,300$ para inoculação. Aproximadamente 0,5 mL da solução bacteriana foi pulverizado nas folhas de cada planta. Um total de 3 réplicas biológicas foram utilizadas. As plantas inoculadas foram mantidas em casa de vegetação, e os sintomas da doença foram monitorados visualmente e também quantificados em função da porcentagem de área foliar lesionada capturada no total de folhas da planta (n = 9), em seis momentos (1-3-5-7-10-15 dias após a infecção - dai), utilizando o software QUANT®, segundo Vale et al. (2003). A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA unilateral (p-

valor $<0,05$) seguido por um teste post hoc *t-student* (p-valores $<0,01$; $<0,0001$) para comparação de média entre os grupos tratado e controle.

Tabela 1. Informações gerais dos genes selecionados para análise da expressão gênica.

<i>Gene</i>	Access GenBank	Annotation/Gene name	Forward Primer (5' to 3')	TM (°C)	Reverse primer (5' to 3')	TM (°C)	Amplicon	Primer Efficiency (%)
<i>FAD</i>	XM_002302577.2	XP_002302613.1/ Fatty desaturase/cytochrome b5 fusion protein	ATAACAGAATCGCGCAGCTC	53	TGAAGAACTTGGTGGAGACG	52	162	85
<i>DLP</i>	NM_001036559.3	NP_001031636.2/ Defensin-like protein	ATCAGCAATGTCTGGTGCAG	53	TTGTCTAGGGATGGGTCCAG	52	179	83
<i>ODD</i>	XM_013745193.1	XP_013600647.1/ 2-oxoglutarate dependent dioxygenase DAO-like	CAAATCCTCCCAAACCACAG	51	CCCTTGAGCAATCAATCTC	50	160	84
<i>SRP2</i>	NM_001247299.2	XP_001234228.2/Salt responsive protein	ACGAGGAAAACGGAGACATC	52	TTAACCCATAACCGCCTCTG	52	166	88
<i>PIDRP8</i>	XM_008345553.1	XP_008343775.1/ pathogen-induced defense-responsive protein 8	AGTCTTGCATGGACCCAAAC	60	TCTCACAAATCGCGTCTTCAG	60	173	88
<i>SAP</i>	NM_001340582.1	NP_001319883.1/ Stromal associated peroxidase	TTCCTCTCTTCGCACTCAAG	52	GAAACTCCGATTACCAACG	52	166	87
<i>ARP</i>	XM_006371764.1	XP_006371826.1/Avirulence-responder family protein	TAACAGATGCTCAGCTAGAG	49	CGAAATCCCATTCTCCAT	45	162	81
<i>CP450</i>	NM_119299.3	NP_194878.1/ Cytochrome P450	CTTAGACTTCACCCAACCAT	49	CTCTCGGGACAAAACCTCG	50	167	83
<i>UBI*</i>	XM_013778573.1	XP_013634027.1/ Ubiquitin ribosomal protein L40	ATGTCAAGGCCAAGATCCAG	52	GAGCCAAAGCCATCAAAGAG	51	186	83
<i>TBP*</i>	XM_013728490.1	XP_013583944.1/ TATA-box-binding protein 1	TCTTGCTCCAGTACAAACC	52	ACATTGTGTCGACGGTGAAC	53	177	86

* Genes de referência

3. RESULTADOS

3.1 Análise da expressão gênica por RT-qPCR

Para avaliar o potencial do uso de MC-RT na indução de resistência de plantas contra fitopatógenos, usamos RT-qPCR para analisar a expressão relativa de 8 genes relacionados à defesa em *B. oleracea* (listados na Tabela 1) tratadas com os metabólitos extraídos de *R. tropici*. Quando o MC-RT foi aplicado nas raízes das plantas, os resultados mostraram que a todos os genes analisados, exceto o gene *FADS*, tiveram suas expressões reguladas positivamente em 24 hat após a aplicação do MC-RT nas partes radiculares quando comparada à condição controle (tempo 0 h após a aplicação) (Fig. 6a). Além disso, observou-se que em 48 hat a expressão relativa da maioria dos genes analisados foi regulada negativamente, exceto os genes *CYP83B1*, *DAO* and *PIDRP8*, isso surge uma indução de curto prazo da resposta de defesa em células radiculares de plantas pelo MC-RT. No entanto, nas partes aéreas, apenas parte do conjunto de genes analisados foram regulados negativamente em 24 h após a aplicação, quando comparado à condição controle (tempo 0 h após a aplicação). Às 48 h após a aplicação os resultados mostraram que todos os genes analisados, exceto o gene *FADS*, foram regulados negativamente, quando comparados à condição controle. Esses resultados indicam que a aplicação de MC-RT na raiz da planta não parece desencadear uma resposta de defesa sistêmica em plantas ameaçadas, que se limitou às células da raiz. Além disso, a regulação negativa desses genes nas folhas (após o tratamento da raiz) pode ter ocorrido para economizar energia para uma resposta de defesa ativa mais pronunciada nas raízes.

Por outro lado, o tratamento das folhas das plantas com MC-RT resultou em uma ampla resposta de defesa da planta, na qual a maioria dos genes de defesa analisados foram regulados positivamente em ambos os tecidos da planta (raiz e folha), exceto para o gene

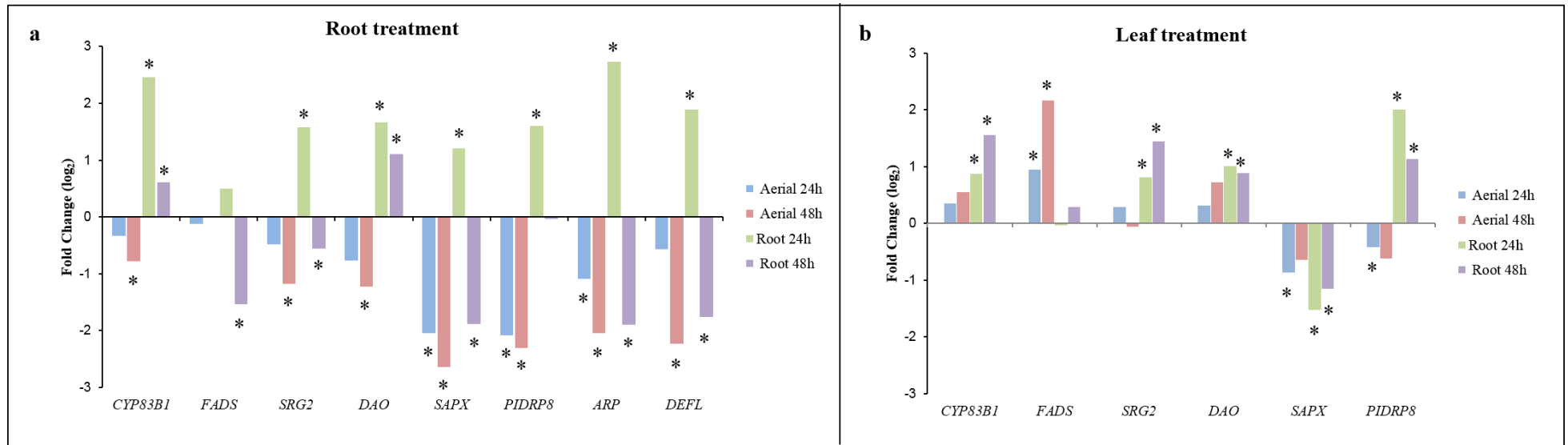


Figura 6. Análise da expressão relativa dos genes alvos associados à resposta de defesa, usando o ponto de tempo 0 horas após a inoculação (hai) como uma condição controle não tratada. **a-** Tratamento radicular com MC-RT; **b-** Tratamento foliar com MC-RT. Conforme indicado, as barras azuis e vermelhas representam o tecido aéreo coletado em 24 e 48 hat, enquanto o verde e roxo denotam o tecido radicular coletado em 24 e 48 hat. " * " símbolo indica significância estatística da expressão gênica ($p\text{-value} \leq 0.05$).

SAPX que foi regulado negativamente em 24 e 48 hat nas raízes e folhas das plantas, e *PIDRP8* que foi regulado negativamente em 24 e 48 hat nas folhas das plantas (Fig. 6b). Os genes *ARP* e *DEFL* não mostraram uma regulação significativa na expressão gênica em folhas tratadas com MC-RT. Esses resultados sugerem que a aplicação de MC-RT em folhas de plantas desencadeia uma resposta de defesa sistêmica, embora tenha sido observado um menor nível de expressão gênica quando comparada à aplicação na raiz.

3.2 O potencial do uso de MC-RT para o manejo da podridão-negra

Para verificar o potencial do MC-RT em reduzir a infecção por *Xcc*, o tratamento foliar foi escolhido porque a infecção por *Xcc* ocorre principalmente por estômatos e também pelo fato de que o tratamento foliar parece induzir uma resposta mais sistêmica em *B. oleracea* e poderia potencialmente fornecer maior proteção à planta. Para examinar os sintomas da doença, plantas de *B. oleracea* (grupos controle e tratado com MC-RT) foram inoculadas com *Xcc* a 24 h após o tratamento com MC-RT. Aos 7 dias após a infecção (dai) com *Xcc*, as plantas tratadas com MC-RT apresentavam apenas manchas cloróticas (Fig. 7 - Ib), enquanto as folhas das plantas controle apresentavam manchas cloróticas e também necróticas (Figura 7 - Ia). Aos 10 dias, as plantas controle ainda exibiam um fenótipo mais afetado. No entanto, no último ponto de tempo avaliado (15 dai), sintomas progressivos, como senescência foliar, foram visualmente observados em ambos os grupos de plantas controle e tratado, sugerindo a perda de funcionalidade do MC-RT, ou seja, a degradação/oxidação dos compostos metabólicos, devido à sua decomposição natural e também ao tempo de exposição ao ambiente hostil do apoplasto foliar.

Os sintomas da doença foliar observados também foram avaliados quantitativamente por meio do software Quant[®] (Vale et al., 2003). A quantificação dos sintomas (média \pm SE) em termos de porcentagem de área de superfície foliar sã, revelou que as folhas de brássicas

10 dias após o tratamento com MC-RT apresentaram a proporção mais significativa de tecido foliar saudável (teste t post hoc; valor de $p < 0,0001$) quando comparado ao grupo controle (Figura 7 - II), sugerindo, em última análise, um priming efetivo das respostas foliares de defesa das plantas contra *Xcc*, devido à aplicação de MC-RT.

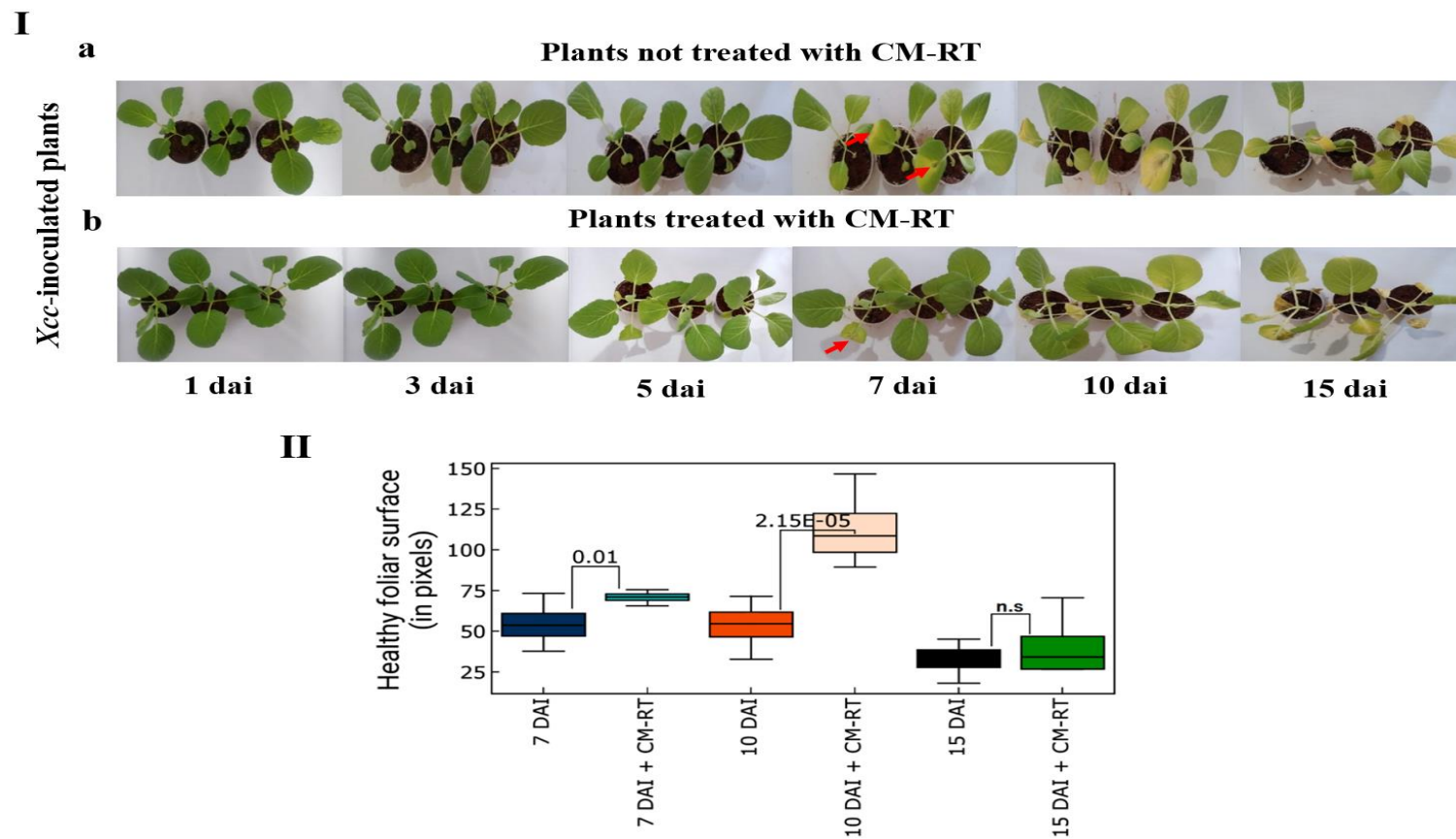


Figura 7. Fenotipagem de folhas de brássicas tratadas com MC-RT. As fotografias foram obtidas em seis momentos 1, 3, 5, 7, 10 e 15 dias após a infecção (dai), e a gravidade dos sintomas foi analisada por meio do software Quant[®]. **(I)** Sintomas da doença da podridão negra em *Brassica oleracea* var. *capitata* inoculado com *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*), em **(a)** plantas de controle não tratadas, e **(b)** plantas tratadas com MC-RT; **(II)** A significância para a proporção da superfície foliar saudável entre o grupo tratado e o grupo controle foi calculada usando ANOVA de uma via (p -valor $<0,05$) seguido pelo teste post hoc t-student (p -valores $<0,01$, $<0,0001$). Cada *boxplot* colorido representa a média de três réplicas biológicas ($n = 9$ folhas). n.s., não significativo; dai, dias após a inoculação; ANOVA, análise de variância.

4. DISCUSSÃO

Neste estudo, a aplicação de MC-RT em *B. oleracea* foi capaz de alterar a expressão de vários genes relacionados à defesa, incluindo *FADS*, *DAO*, *SRG2*, bem como genes PR conhecidos, como *SAPX*, *CYP83B1* e *PIDRP8*, relatados como induzidos no ataque do patógeno (Jiang et al., 2011). Estes genes são importantes no processo de defesa, por exemplo, o gene *SAPX* controla o conteúdo de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) gerado durante estresses abióticos e bióticos (Maruta & Ishikawa, 2018), enquanto *FADS* tem a capacidade de ajustar os níveis de ácidos graxos insaturados, introduzindo ligações duplas na cadeia acila dos ácidos graxos, o que leva ao aumento da resistência das plantas contra vários agentes estressores, incluindo calor, frio, seca e patógenos (Celik Altunoglu et al., 2018, Xu et al., 2019, Xue et al., 2017, Cao et al., 2020).

Estudos realizados por Yu et al. (2016) mostraram que um elicitor de *Trichothecium roseuma* foi capaz de regular positivamente a expressão de genes relacionados à resistência, bem como aumentar a atividade de enzimas relacionadas à resistência e compostos antifúngicos, como PRs β-1,3-glucanase (*GLU*) e quitinase (*CHT*). Recentemente, extratos bacterianos também foram investigados como elicitores de defesa de plantas e estudos mostraram sua capacidade de induzir genes relacionados à defesa. Por exemplo, estudos realizados por Faillace et al. (2019) mostraram que um extrato de *Xanthomonas axonopodis* induziu uma resposta de defesa em *Solanum tuberosum* contra *Pectobacterium atrosepticum*, ativando enzimas antioxidantes como superóxido dismutase, catalase e ascorbato peroxidase, e modulando a atividade de enzimas relacionadas à defesa, como fenilalanina amônia oxidase liase, polifenol, β-1,3-glucanase, quitinase e peroxidase. Da mesma forma, estudos realizados por Munhoz et al. (2017) mostraram que compostos bioativos extracelulares produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* foram capazes de estimular a resposta de defesa do tomateiro por meio da ativação das enzimas peroxidases, polifenol oxidase e fenilalanina amônia liase.

O fato de o MC-RT ser derivado de rizobactérias é particularmente atrativo do ponto de vista biotecnológico. Foi relatado que as rizobactérias benéficas produzem vários metabólitos secundários, como surfactina, fengicina, bacilomicina, bacileno, macrolactina, difidina, bacilisina, ácido indol-3-acético (IAA) e 2,3-butanodiol (Shao et al., 2015, Li et al., 2014). Já foi relatado que alguns desses metabólitos eliciam respostas de defesa da planta, exibindo um efeito protetor mediado pela resistência sistêmica, como a surfactina e a fengicina produzidas por cepas de *Bacillus subtilis* (Redfearn et al., 2005). Elicitores produzidos por rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR) foram identificados e caracterizados como 2,4-diacetilfloroglucinol e lactonas N-aciladas-l-homoserina de *Pseudomonas* (Iavicoli et al., 2003, Schuegger et al., 2006). No presente estudo, observou-se claramente que as folhas tratadas com MC-RT levaram à redução das lesões causadas pelo *Xcc*, resultando em aumento da proteção. Esse efeito provavelmente se deve às propriedades eliciadoras presentes no MC-RT, que parecem resultar em uma resistência sistêmica, uma vez que os efeitos do tratamento de folhas, como a indução de genes relacionados à defesa, também foram observados nas raízes. De acordo com Marks et al. (2013a) os principais componentes do extrato de *R. tropici* são lipoquitooligossacarídeos (LCOs), exopolissacarídeos (EPSs) e hormônios vegetais. Muitas bactérias associadas a plantas, incluindo rizóbios, sintetizam hormônios vegetais, como auxinas, citocininas, etileno e giberelinas (Tien et al., 1979, Arshad & Frankenberger, 1991, Strzelczyk et al., 1994, Bottini et al., 1989). Portanto, a combinação desses compostos pode ter contribuído para os efeitos produzidos pelo extrato de *R. tropici* em brássicas.

Estudos mostraram que produtos químicos de PGPR, como lipo-quitooligossacarídeos ou LCOs (fatores Nod), além de aumentarem o crescimento de plantas, leguminosas e não leguminosas, estimulam a resposta de defesa (Subramanian et al., 2016). A relação simbiótica começa com uma troca de sinais químicos entre o hospedeiro e o rizóbio fixador de N₂. Em

condições de baixo teor de nitrogênio, raízes de leguminosas liberam (iso) flavonóides que ativam a produção bacteriana de compostos sinalizadores específicos (LCOs) e induzem os genes nodais de rizóbio (Currier & Strobel, 1976, Firmin et al., 1986). Os LCOs induzem vários genes relacionados à resposta de defesa em plantas não leguminosas, como as proteínas PR quitinase e peroxidase (Wang et al., 2012, Schultze & Kondorosi, 1996) e enzimas da via fenilpropanóide, como L-fenilalanina amônia-liase (Inui et al., 1997).

No presente estudo, um efeito protetor do MC-RT foi notável em *B. oleracea*, especialmente nas folhas tratadas até 10 dias. Estes resultados demonstram a capacidade dos compostos bioativos, como os LCOs, presentes no MC-RT para preparar a defesa da planta por uma modulação da expressão gênica rápida e sistêmica de um conjunto específico de genes relacionados à defesa, o que refletiu em uma redução significativa de sintomas da doença e também no retardo da progressão da doença.

No entanto, os mecanismos moleculares precisos envolvidos na resposta de defesa durante a infecção por *Xcc* em folhas de *B. oleracea* tratadas com MC-RT são complexos e permanecem obscuros. Os resultados obtidos são consistentes com a observação geral e enfatizam o potencial biotecnológico do uso de metabólitos de *R. tropici* como um eficiente eliciador de defesa em plantas. Este estudo foi o primeiro passo para entender o potencial papel do MC-RT no priming de resposta de defesa em brássicas e pode ser útil em estudos futuros por gerar um bioproduto mais sustentável e com melhor eficácia no manejo de doenças de plantas causadas por *Xanthomonas spp.* ou outros patógenos. Em última análise, esses resultados indicam, pelo menos para o patossistema investigado, que o MC-RT atingiu seu maior potencial como eliciador de respostas de defesa da planta quando aplicado às partes aéreas da planta.

5. CONCLUSÃO

Os genes avaliados neste estudo têm papéis importantes relacionados à resposta de defesa. O tratamento com metabólitos concentrados de *R. tropici* (MC-RT) nas folhas apresentou efeito mais sistêmico e prolongado do que o tratamento nas raízes. Embora a aplicação de MC-RT nas folhas tenha induzido níveis de expressão mais baixos dos genes relacionados à defesa, foi capaz de reduzir a incidência de *X. campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) em plantas de *B. oleracea*. Os resultados obtidos no estudo indicam um alto potencial biotecnológico para o uso de MC-RT para induzir resistência em *B. oleracea*.

Além disso, demonstrou-se que folhas de brassica tratadas com MC-RT e inoculadas com *X. campestris* pv. *campestris*, apresentaram retardo significativo da progressão da doença e redução dos sintomas causados pelo fitopatógeno. No entanto, é importante ressaltar que esse efeito é temporário e podem ser necessárias aplicações posteriores.

Os resultados aqui obtidos sugerem que o MC-RT atua como eliciador de respostas ativas de defesa em plantas e apresenta alto potencial biotecnológico para o controle de doenças causadas por bactérias. Este estudo foi o primeiro passo para entender o potencial papel do MC-RT na indução de resposta de defesa em brássicas e pode ser útil em estudos futuros para a geração de um produto com alta eficácia contra *Xanthomonas* spp. ou outras espécies de fitopatógenos. Tais avanços favorecem a sustentabilidade agrícola ao trazer benefícios econômicos e ambientais, contribuindo para uma produção mais sustentável.

CAPÍTULO II – Biossíntese, caracterização e avaliação da atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata (AgNPs) produzidas utilizando extratos aquosos de plantas

RESUMO

A maioria das rotas de síntese de nanopartículas metálicas (NPMs) utiliza metodologias tradicionais com o uso de reagentes tóxicos que podem causar impactos negativos, tanto ao meio ambiente quanto à saúde humana. Uma alternativa mais segura para a produção de NPMs é a utilização de extratos de plantas baseado nos conceitos da Química Verde, onde são utilizados reagentes menos nocivos e de fontes renováveis. Esta abordagem apresenta vantagens como biocompatibilidade, estabilidade, sustentabilidade, rapidez e custo efetivo. Contudo, quando envolve o uso de recursos biológicos, a seleção da planta é uma etapa muito importante visto que possui relação com o tamanho e a estabilidade das NPMs produzidas. No presente estudo objetivou-se a síntese verde de nanopartículas de prata (AgNPs) utilizando extratos aquosos de folhas de repolho, *Arabidopsis thaliana*, neem e noni, e extratos aquosos de frutos de noni (casca e polpa/sementes) como agentes redutores e estabilizantes. As sínteses de AgNPs foram realizadas em 6 diferentes concentrações de extratos (10, 15, 20, 25, 30 e 60 mg/mL) em solução aquosa de nitrato de prata (AgNO_3), a 1 mM. No total, foram formadas 42 amostras de AgNPs, destas, 14 amostras foram selecionadas de acordo com seu diâmetro hidrodinâmico (DH), índice depolidispersidade (PdI) e potencial Zeta (PZ) e então testadas *in vitro* para avaliar sua atividade antibacteriana contra *Xcc*. As AgNPs sintetizadas com extrato aquoso da casca do fruto de noni (EACFN) na concentração de 60 mg/mL, apresentaram o menor DH e maior efeito antibacteriano em concentração final de 64 μM . Além disso, plantas de genótipos suscetíveis de *B. oleracea* foram tratadas com EACFN-AgNPs, e a modulação positiva de genes relacionados à defesa foi obtida por qRT-PCR. Os resultados mostraram que 4 dos genes analisados foram regulados positivamente, 1 regulado negativamente e 3 não apresentaram regulação significativa na expressão gênica, quando comparados à condição controle (sem tratamento). Por fim, plantas tratadas com EACFN-AgNPs a 64 μM quando desafiadas com *Xcc* apresentaram um fenótipo mais tolerante, destacando que a aplicação de AgNPs parece desencadear uma resposta efetiva de defesa da planta. Isso indica que a aplicação de AgNPs parece desencadear uma resposta de defesa efetiva, provavelmente devido às propriedades elicitoras presentes em AgNPs sintetizadas a partir de EACFN. Nesse contexto, as rotas de síntese verde com extratos aquosos de folhas de repolho, *Arabidopsis*, neem e noni e frutos de noni realizadas no presente trabalho resultaram em AgNPs com características moduladas que podem ser utilizadas para diversos fins, como no controle de *Xcc* em brássica. Outros estudos moleculares são necessários para entender como a bactéria e a planta respondem quando submetidas ao contato com AgNPs.

Palavras chaves: Atividade antimicrobiana, extratos de plantas, nanopartículas de prata, resposta de defesa, síntese verde e *X. campestris* pv. *campestris*.

1. INTRODUÇÃO

A abordagem da química verde é ambientalmente sustentável, econômica, segura, rápida, menos prejudicial, não tóxica, e utiliza diferentes tipos de organismos como plantas, fungos e bactérias para a síntese de nanopartículas metálicas, incluindo nanopartículas de prata (AgNPs) (Konishi et al., 2007, Panda et al., 2020). Este método é superior às abordagens químicas e físicas e mais acessível devido à sua natureza não tóxica (Ahmed et al., 2016a, Rafique et al., 2017, Mohapatra et al., 2015). A atividade antimicrobiana das AgNPs depende principalmente de duas variáveis: a concentração de íons de prata e a sensibilidade das espécies microbianas à prata (Lee et al., 2007b). As AgNPs interagem com proteínas e fosfolípidos que estão ligados a uma bomba de prótons da membrana bacteriana que resulta no rompimento das membranas, metabolismo celular e, portanto, morte celular (Savithramma et al., 2012).

Diversos estudos já foram conduzidos utilizando extratos de plantas como agentes redutores e estabilizantes para a síntese de AgNPs e avaliação da atividade antimicrobiana das mesmas, como por exemplo, extratos de amora (*Morus alba*), abacaxi (*Ananas comosus*), neem (*Azadirachta indica*), pêssigo (*Prunus persica*), erva doce asteca (*Phyla dulcis*), Flamboyant (*Delonix regia* var. *flavida*, Fabaceae), *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos, tomate (*Solanum lycopersicum*) e cominho preto (*Nigella sativa*), (Ahmed et al., 2016b, Kumar et al., 2017, Awwad & Salem, 2012, Ahmad & Sharma, 2012, Carson et al., 2020, Pupe & Silva, 2021, Vijayakumar et al., 2021, Pereira et al., 2020, Santiago et al., 2019).

O fitopatógeno *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc), agente causal da podridão negra, representa há décadas uma grande ameaça para as culturas de crucíferas (brássicas), causando grandes perdas econômicas, reduzindo o desempenho e a qualidade das

culturas (Williams, 1980). *Xcc* é uma bactéria Gram negativa, que vive epifiticamente na superfície da folha, infecta os estômatos, hidátodios ou feridas das plantas hospedeiras e coloniza o sistema vascular. A infecção por *Xcc* é particularmente prejudicial devido à formação de biofilme, que contém enzimas extracelulares degradadoras e outros fatores de virulência (Dow et al., 2003). Uma vez no interior da planta, o patógeno desloca-se pelo sistema vascular, invadindo o xilema e colonizando o mesófilo. Os sintomas típicos incluem, clorose em forma de V nas bordas das folhas, necrose e escurecimento dos tecidos vasculares com intensa clorose e necrose (Aires et al., 2011, Vicente & Holub, 2013). Uma das principais respostas fisiológicas à infecção por patógenos é a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que reduz a viabilidade do patógeno por meio da atividade antibacteriana e também está implicado em dano oxidativo de células vegetais por meio da peroxidação lipídica (Venisse et al., 2001, Lee et al., 2007a, Perveen et al., 2013).

Atualmente não existe um método eficiente para controlar *Xcc*. As tentativas são direcionadas principalmente ao emprego de práticas agronômicas, como por exemplo, a utilização de agroquímicos, material de plantio livre de *Xcc* (sementes ou transplantes), eliminação de outras possíveis fontes de contaminação, como resíduos de lavouras infectadas e de ervas daninhas crucíferas, e a rotação de culturas (Taylor et al., 2002). A busca por estratégias mais eficientes e sustentáveis para o manejo da podridão negra é altamente desejada.

Nesse contexto, o presente trabalho teve por objetivo a síntese verde de AgNPs utilizando extratos aquosos de folhas de repolho (*B. oleracea* var. *capitata*), thale cress (*Arabidopsis thaliana*), neem (*Azadirachta indica*) e noni (*Morinda citrifolia*) e extratos aquosos de frutos de noni como agentes redutores e estabilizantes, bem como sua caracterização e avaliação da atividade antimicrobiana contra o fitopatógeno *X. campestris* pv. *campestris* (*Xcc*). Além disso, verificamos a indução de genes relacionados à defesa por RT-

qPCR em *B. oleracea* tratada com AgNPs, bem como seus efeitos na proteção de plantas de repolho contra a bactéria *Xcc*. Os resultados obtidos forneceram uma estratégia alternativa no combate à podridão negra de culturas crucíferas, além de fortalecer o potencial de uso de AgNPs em estratégias de controle visando à redução do uso de agrotóxicos convencionais na produção de culturas de interesse econômico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e obtenção de extratos aquosos

Para este estudo, foram utilizadas folhas de *A. thaliana*, repolho (*B. oleracea* var. *capitata*), neem (*A. indica*) e noni (*M. citrifolia*). A obtenção dos extratos aquosos foi realizada a partir de folhas de *A. thaliana*, com 90 dias de idade e repolho com 50 dias de idade, cultivadas e coletadas na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, localizada em Brasília, DF. Folhas de neem também foram utilizadas para a obtenção dos extratos aquosos, sendo coletados em locais distintos, na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, localizada em Brasília - DF e na DF 150 Km 11 Rua do Mato, Chácara 15, Fercal, Sobradinho – DF; e folhas de noni foram coletadas, na DF 150 Km 11 Rua do Mato, Fercal, Sobradinho – DF.

Além das folhas, os frutos maduros de noni também foram utilizados como matéria-prima para obtenção dos extratos aquosos utilizado como agente redutor de íons prata. A síntese verde por frutos maduros de noni foi realizada a partir de dois extratos dos frutos (extrato da casca e extrato da polpa/semente), tendo a água ultrapura como solvente. Os frutos foram lavados com detergente neutro Extran a 0,1%. Em seguida, foram submetidos a uma sequência de lavagens com água destilada. Para a preparação dos extratos das partes do fruto, a casca e a polpa/semente foram separadas. A casca foi retirada utilizando um bisturi que

permitiu a realização de cortes finos nos frutos ainda congelados. Posteriormente, a polpa/sementes foram fragmentadas e pesadas.

As folhas de *A. thaliana*, repolho, neem e noni foram lavadas em água destilada estéril por três vezes e, em seguida, foram maceradas em nitrogênio líquido e pesadas. Posteriormente, o material macerado de cada amostra foi colocado em água ultrapura Milli-Q em ebulição, separadamente em béqueres de vidro. O volume de água ultrapura Milli-Q para decocção das folhas e cada parte do fruto de noni variou conforme o peso de cada porção (casca, polpa ou semente) ou de folhas, de maneira a obter uma concentração final de 0,5 g/mL de extrato. A extração por decocção foi realizada em um período de 3 min em agitador magnético com placa de aquecimento, modelo 0261-22 (Quimis). Os extratos foram recuperados por filtração em papel filtro qualitativo em béqueres de vidro e posteriormente armazenados em tubos tipo Falcon de 15 mL, à temperatura de 4°C e protegidos da luz até o momento de serem utilizados para síntese de AgNPs, a qual ocorreu no mesmo dia da preparação dos extratos. No total, 7 amostras de extratos aquosos foram obtidas.

2.2 Síntese verde e caracterização de nanopartículas de prata (AgNPs)

As AgNPs foram produzidas com 1 mM de solução aquosa de nitrato de prata (AgNO_3), utilizando diferentes concentrações (10, 15, 20, 25, 30 e 60 mg/mL) de extratos aquosos de folhas de noni (EAFN), neem (cultivadas em Sobradinho) (EAFNS), neem (cultivadas em Brasília) (EAFNB), repolho (EAFR) e *A. thaliana* (EAFA), e extratos aquosos de frutos de noni (casca ou polpa/semente) (EACFN ou EAPSFN), totalizando 42 amostras, conforme (Tabela 2). Os controles para cada concentração de extratos continham água ultrapura Milli-Q em vez de AgNO_3 em solução. As reações entre os EAFN, EAFNS, EAFNB, EAFR, EAFA, EACFN ou EAPSFN, e íons Ag^+ em Ag^0 ocorreram a 75°C, no escuro por 2,5 h em banho-maria microprocessado, modelo Q334M (Quimis). Os efeitos

cinéticos das reações foram monitorados em leitora de microplacas (ELx808 IU, Biotek, EUA) à temperatura ambiente (25°C). A medição de absorvância foi realizada em comprimentos de onda de 450, 490 e 630 nm em intervalos de 30 min por 2,5 h. As medições foram realizadas em triplicatas em placas de 96 poços em um volume de 100 µL por poço.

Posteriormente, as amostras de AgNPs foram caracterizadas por espalhamento dinâmico de luz (DLS) para determinar o diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersidade (PdI) e mobilidade eletroforética para determinar o potencial Zeta de superfície (carga de superfície) em um equipamento ZetaSizer Nano ZS (Malvern, Reino Unido) usando laser He-Ne (4 mW) operando a 633 nm e em um ângulo de 173° para detecção de espalhamento de luz. As suspensões de AgNPs foram diluídas com água ultrapura Milli-Q 10× (v/v) e 3 leituras independentes foram realizadas à temperatura ambiente. O *software* ZetaSizer versão 7 foi utilizado para obter os potenciais DH, PdI e Zeta das superfícies das partículas. As AgNPs formadas foram armazenadas a 4°C até posterior utilização em ensaios de atividade antibacteriana.

Tabela 2. Concentrações de extratos aquosos de folhas de noni (EAFN), neem (Sobradinho) (EAFNS), neem (Brasília) (EAFNB), repolho (EAFR) e *A. thaliana* (EAFNA), e extratos aquosos de frutos de noni (casca ou polpa/semente) (EACFN ou EAPSFN), nas amostras de AgNPs e em seus respectivos controles (contendo somente os extratos).

Concentrações de EAFN	Amostras EAFN-AgNPs	Controles EAFN
10 mg/mL	EAFN-AgNPs 10 mg/mL	Controle-10 mg/mL
15 mg/mL	EAFN-AgNPs 15 mg/mL	Controle-15 mg/mL
20 mg/mL	EAFN-AgNPs 20 mg/mL	Controle-20 mg/mL
25 mg/mL	EAFN-AgNPs 25 mg/mL	Controle-25 mg/mL
30 mg/mL	EAFN-AgNPs 30 mg/mL	Controle-30 mg/mL
60 mg/mL	EAFN-AgNPs 60 mg/mL	Controle-60 mg/mL
Concentrações de EAFNS	Amostras EAFNS-AgNPs	Controles EAFNS
10 mg/mL	EAFNS-AgNPs 10 mg/mL	Controle-10 mg/mL

15 mg/mL	EAFNS-AgNPs 15 mg/mL	Controle-15 mg/mL
20 mg/mL	EAFNS-AgNPs 20 mg/mL	Controle-20 mg/mL
25 mg/mL	EAFNS-AgNPs 25 mg/mL	Controle-25 mg/mL
30 mg/mL	EAFNS-AgNPs 30 mg/mL	Controle-30 mg/mL
60 mg/mL	EAFNS-AgNPs 60 mg/mL	Controle-60 mg/mL
Concentrações de EAFNB	Amostras EAFNB-AgNPs	Controles EAFNB
10 mg/mL	EAFNB-AgNPs 10 mg/mL	Controle-10 mg/mL
15 mg/mL	EAFNB-AgNPs 15 mg/mL	Controle-15 mg/mL
20 mg/mL	EAFNB-AgNPs 20 mg/mL	Controle-20 mg/mL
25 mg/mL	EAFNB-AgNPs 25 mg/mL	Controle-25 mg/mL
30 mg/mL	EAFNB-AgNPs 30 mg/mL	Controle-30 mg/mL
60 mg/mL	EAFNB-AgNPs 60 mg/mL	Controle-60 mg/mL
Concentrações de EAFR	Amostras EAFR-AgNPs	Controles EAFR
10 mg/mL	EAFR-AgNPs 10 mg/mL	Controle-10 mg/mL
15 mg/mL	EAFR-AgNPs 15 mg/mL	Controle-15 mg/mL
20 mg/mL	EAFR-AgNPs 20 mg/mL	Controle-20 mg/mL
25 mg/mL	EAFR-AgNPs 25 mg/mL	Controle-25 mg/mL
30 mg/mL	EAFR-AgNPs 30 mg/mL	Controle-30 mg/mL
60 mg/mL	EAFR-AgNPs 60 mg/mL	Controle-60 mg/mL
Concentrações de EAFA	Amostras EAFA-AgNPs	Controles EAFA
10 mg/mL	EAFA-AgNPs 10 mg/mL	Controle-10 mg/mL
15 mg/mL	EAFA-AgNPs 15 mg/mL	Controle-15 mg/mL
20 mg/mL	EAFA-AgNPs 20 mg/mL	Controle-20 mg/mL
25 mg/mL	EAFA-AgNPs 25 mg/mL	Controle-25 mg/mL
30 mg/mL	EAFA-AgNPs 30 mg/mL	Controle-30 mg/mL
60 mg/mL	EAFA-AgNPs 60 mg/mL	Controle-60 mg/mL
Concentrações de EACFN	Amostras EACFN-AgNPs	Controles EACFN
10 mg/mL	EACFN-AgNPs 10 mg/mL	Controle-10 mg/mL
15 mg/mL	EACFN-AgNPs 15 mg/mL	Controle-15 mg/mL
20 mg/mL	EACFN-AgNPs 20 mg/mL	Controle-20 mg/mL
25 mg/mL	EACFN-AgNPs 25 mg/mL	Controle-25 mg/mL
30 mg/mL	EACFN-AgNPs 30 mg/mL	Controle-30 mg/mL
60 mg/mL	EACFN-AgNPs 60 mg/mL	Controle-60 mg/mL
Concentrações de EAPSFN	Amostras EAPSFN-AgNPs	Controles EAPSFN

10 mg/mL	EAPSFN-AgNPs 10 mg/mL	Controle-10 mg/mL
15 mg/mL	EAPSFN-AgNPs 15 mg/mL	Controle-15 mg/mL
20 mg/mL	EAPSFN-AgNPs 20 mg/mL	Controle-20 mg/mL
25 mg/mL	EAPSFN-AgNPs 25 mg/mL	Controle-25 mg/mL
30 mg/mL	EAPSFN-AgNPs 30 mg/mL	Controle-30 mg/mL
60 mg/mL	EAPSFN-AgNPs 60 mg/mL	Controle-60 mg/mL

2.3 Atividade antibacteriana das AgNPs contra *X. campestris* pv. *campestris* (*Xcc*)

A investigação das possíveis atividades antibacterianas das EAFN-AgNPs, EAFNS-AgNPs, EAFNB-AgNPs, EAFR-AgNPs, EAFA-AgNPs, EACFN-AgNPs e EAPSFN-AgNPs, foi realizada em suspensão. Com base na caracterização das 42 amostras de AgNPs, foram selecionadas aquelas com maior e menor DH, PdI e potencial Zeta de superfície de cada grupo (EAFN-AgNPs sintetizadas com 10 ou 60 mg/mL de EAFN; EAFNS-AgNPs sintetizadas com 10 ou 60 mg/mL de EAFNS; EAFNB-AgNPs sintetizadas com 10 ou 20 mg/mL de EAFNB; EAFR-AgNPs sintetizadas com 25 ou 60 mg/mL de EAFR; EAFA-AgNPs sintetizadas com 10 ou 60 mg/mL de EAFA; EACFN-AgNPs sintetizadas com 25 ou 60 mg/mL de EACFN; e EAPSFN-AgNPs sintetizadas com 15 ou 60 mg/mL de EAPSFN), totalizando 14 amostras para avaliação da atividade antibacteriana contra *Xcc*. A bactéria foi cultivada em meio NYG, composto por 5 g de peptona, 3 g de extrato de levedura, 10 g de ágar e 20 mL de glicerol por litro (Daniels et al., 1984) a 28°C. Após 48 h de crescimento em placa de Petri, as células foram pré-cultivadas durante 16 h e diluídas em meio NYG líquido e a densidade óptica (D.O.) foi ajustada para $A_{600} = 0,050$ em espectrofotômetro para o preparo do bioensaio contendo AgNPs. Posteriormente, 85 μ L do inóculo da bactéria e 15 μ L contendo as amostras de AgNPs (8, 16, 32, 64, 128 ou 256 μ M) ou controles foram adicionados, sendo o controle negativo com água e o controle positivo com $AgNO_3$ (8, 16, 32, 64, 128 e 256 μ M). O volume final foi de 100 μ L. Estas foram aplicadas em microplacas de

96 poços, as quais foram incubadas a 28°C por 72 h e avaliada a concentração inibitória mínima (MIC). Após esse tempo, o MIC foi determinado por inspeção visual.

2.4 Tratamento em plantas *B. oleracea* var. *capitata* com AgNPs

Após o bioensaio com AgNPs para avaliar a atividade antibacteriana, foi selecionada a AgNP (EACFN-AgNPs sintetizadas com 60 mg/mL de EACFN em uma concentração a 64 µM) que apresentou a menor concentração inibitória mínima (MIC), para avaliar a possível indução de genes de defesa em brássicas. Plantas da cultivar de *B. oleracea* var. *capitata*, foram cultivadas em casa de vegetação na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, Brasil, sem controle de temperatura. As sementes foram submetidas à desinfestação com hipoclorito de sódio a 3% e lavadas com água destilada. Posteriormente, as sementes foram colocadas em vasos plásticos contendo uma mistura de solo. Cada vaso de plástico continha uma planta, e três plantas formaram cada amostra. Foram utilizadas 3 repetições biológicas (amostras) e cada repetição com 3 réplicas técnicas, totalizando 27 plantas.

Aos 18 dias após a germinação as plantas foram pulverizadas com aproximadamente 1 mL de EACFN-AgNPs em uma concentração a 64 µM, ou solução de AgNO₃ a 64 µM ou sem tratamento (condição controle). Após 24 h, as folhas foram coletadas separadamente, maceradas em nitrogênio líquido e submetidas à extração de RNA total para analisar a indução de genes de defesa por RT-qPCR. As plantas tratadas foram comparadas com a condição controle (sem tratamento).

2.5 Extração de RNA total de *B. oleracea* var. *capitata* e síntese de cDNA

Para avaliar a possível indução de genes de defesa por RT-qPCR em plantas da cultivar de *B. oleracea* var. *capitata*, tratadas com EACFN-AgNPs, a extração de RNA total

foi realizada utilizando o método Trizol (Invitrogen) de acordo com Simms et al. (1993), com modificações. A quantificação foi realizada com o espectrofotômetro NanoDrop® (ND-1000 UV-Vis -Thermo Fisher) de acordo com as instruções do fabricante. Para verificar a integridade do RNA isolado, as amostras foram analisadas em gel de agarose (1% de agarose; 1× TAE Buffer), pré-corado com brometo de etídio (0,5 mg/mL) (Sambrook et al., 1989). A enzima Turbo™ DNase (Applied Biosystems/Ambion) foi utilizada para o tratamento de RNA total para eliminar possível contaminação com DNA genômico. Subsequentemente, a síntese de cDNA foi realizada usando 2 µg de RNA tratado, utilizando GoScript™ Reverse Transcription System (Promega). O cDNA obtido foi armazenado a -20°C e utilizado para RT-qPCR. Os primers dos genes relacionados com defesa utilizados para análise de RT-qPCR e condições da RT-qPCR e análise de dados foram realizados de acordo com o Capítulo 1.

2.6 Inoculação de *X. campestris* pv. *campestris* em plantas de *B. oleracea* var. *capitata* tratadas com AgNPs

Para verificar o potencial de EACFN-AgNPs para reduzir os sintomas da podridão negra em *B. oleracea* var. *capitata* Veloce (suscetível ao isolado *Xcc* 51), as sementes foram submetidas à desinfestação com hipoclorito de sódio 3% e colocadas para germinar em copos plásticos de 200 mL contendo uma mistura de terra estéril, esterco e areia estéril (3:1:1 w/w/w). Foram utilizadas 3 réplicas biológicas (amostras), totalizando 9 plantas. Para avaliar os sintomas da doença, aos 18 dias após a germinação, as plantas foram pulverizadas na face adaxial das folhas com 1 mL de EACFN-AgNPs na concentração de 64 µM, ou AgNO₃ (64 µM) ou sem tratamento (condição controle). Plantas não tratadas (controle) e tratadas com 1 mL de EACFN-AgNPs ou AgNO₃ a 64 µM foram pulverizadas com *Xcc* isolado 51 em 24h após a aplicação.

As suspensões bacterianas foram cultivadas em meio NYG líquido por 16 h, centrifugadas e ressuspensas em água. Aproximadamente 1 mL da solução bacteriana ($A_{600} = 0,300$) foi pulverizada nas folhas das plantas. As plantas inoculadas foram mantidas em casa de vegetação e os sintomas da doença foram monitorados visualmente e também quantificados considerando a porcentagem de área foliar lesionada capturada nas folhas totais das plantas ($n=9$), em três momentos (5-7-10 dias após a infecção - dai), utilizando o *software* QUANT[®] (Vale et al., 2003). A avaliação de possíveis diferenças significativas entre os grupos tratados e controle foi realizada usando ANOVA one-way (p -valor $<0,05$) seguido por um teste t-student post hoc (p -valores $<0,01$; $<0,0001$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise de espectroscopia UV-vis de AgNPs

O monitoramento das reações de síntese de AgNPs por meio de espectrofotometria é um aspecto muito importante que deve ser levado em consideração. De acordo com Baker et al. (2013), as AgNPs formadas após a síntese verde possuem ressonância plasmônica de superfície (SPR) que dá origem a picos característicos nas absorções no espectro eletromagnético.

As AgNPs sintetizadas utilizando extratos aquosos de folhas de noni (EAFN), neem (Sobradinho) (EAFNS), neem (Brasília) (EAFNB), repolho (EAFR) e Arabidopsis (EAFA), e extratos aquosos de frutos de noni (casca ou polpa/ sementes) (EACFN ou EAPSFN), foram realizadas em diferentes concentrações de extratos aquosos (10, 15, 20, 25, 30 e 60 mg/mL) (tabela 2), totalizando 42 amostras. A formação das AgNPs a partir de uma solução de 1 mM de $AgNO_3$ foi confirmada por análise em UV-vis. A medição de absorbância foi realizada em comprimentos de onda de 450 nm, 490 nm e 630 nm em intervalos de 30 min por 2,5 h. A

Figura 8 indica a inspeção visual ao final das reações de síntese de AgNPs em diferentes concentrações em contraste com solução aquosa de AgNO_3

O aumento da concentração de extratos de EAFNS, EAFNB, EAFR, EAFA, EACFN e EAPSFN utilizados para a síntese de AgNPs aumentou o nível de intensidade de cor das suspensões, variando de reação com 10 mg/mL a reação com 60 mg/mL. Enquanto as AgNPs sintetizadas com EAFN, o aumento da concentração dos extratos utilizados para a síntese de AgNPs diminuiu o nível de intensidade de cor das suspensões. Essa evidência é corroborada pela Figura 9 que mostra esse monitoramento por espectroscopia de absorvância na região do visível no comprimento de 490 nm a cada 30 min da reação de síntese e é possível observar que o aumento nas concentrações dos extratos aquosos está diretamente relacionado ao aumento ou diminuição da intensidade de absorção. Isso ocorre porque diferentes extratos apresentam concentrações e proporções diferentes compostos. Estudos mostram que extratos aquosos de cúrcuma de cor amarela foram alterados para marrom avermelhado escuro devido à redução de íons de prata a AgNPs (Alsammarraie et al., 2018).

Diveros estudos têm sido realizados utilizando extratos vegetais como agentes redutores e estabilizantes para a síntese de AgNPs (Ahmed et al., 2016b, Kumar et al., 2017, Awwad & Salem, 2012, Ahmad & Sharma, 2012, Carson et al., 2020, Pupe & Silva, 2021, Vijayakumar et al., 2021, Pereira et al., 2020, Santiago et al., 2019). De acordo com Ovais et al. (2018), dentre os principais componentes dos extratos vegetais incluem polifenóis (terpenóides, flavonóides, taninos), proteínas (enzimas), ácidos orgânicos e alcalóides, que podem atuar como agentes químicos para reduzir os sais de prata e estabilizar as AgNPs.

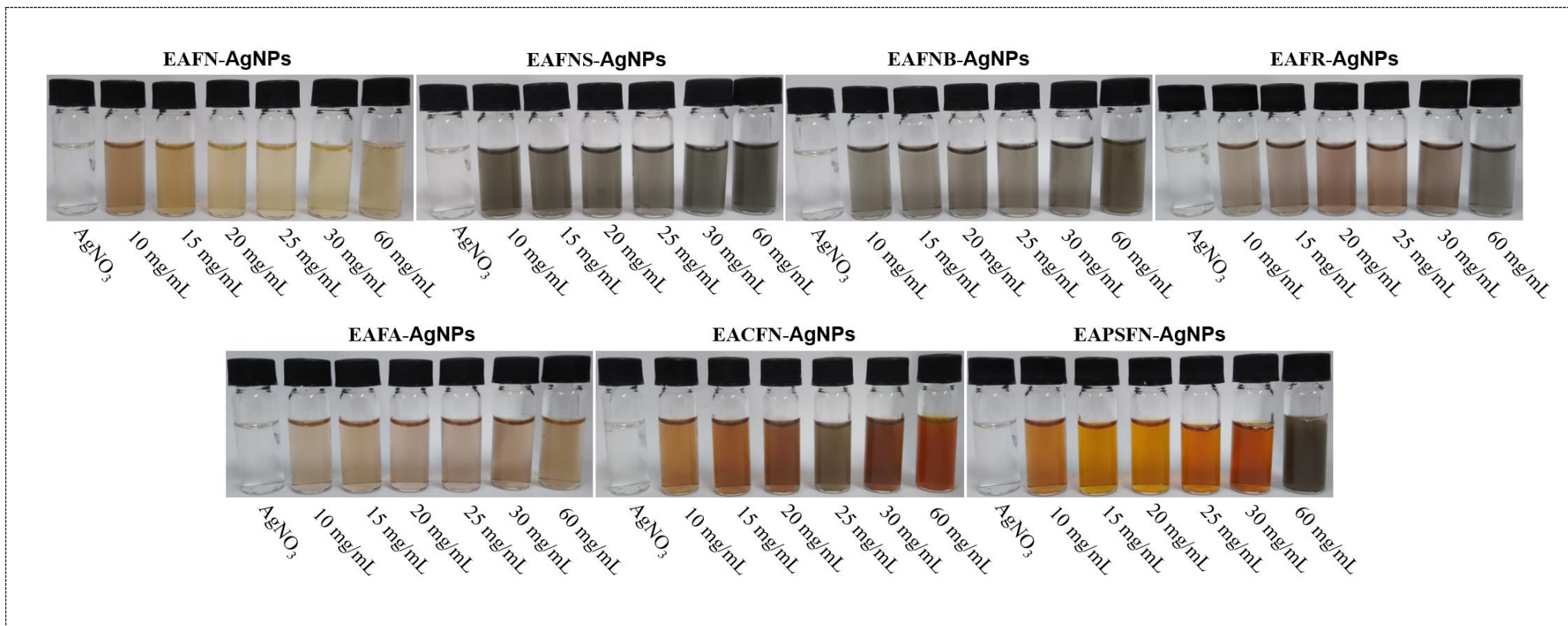


Figura 8. Suspensões resultantes das reações de síntese de AgNPs utilizando EAFN, EAFNS, EAFNB, EAFR e EAFA, EACFN ou EAPSFN em diferentes concentrações (10, 15, 20, 25, 30 e 60 mg/mL) e controles AgNO₃ após 2,5 h de reação.

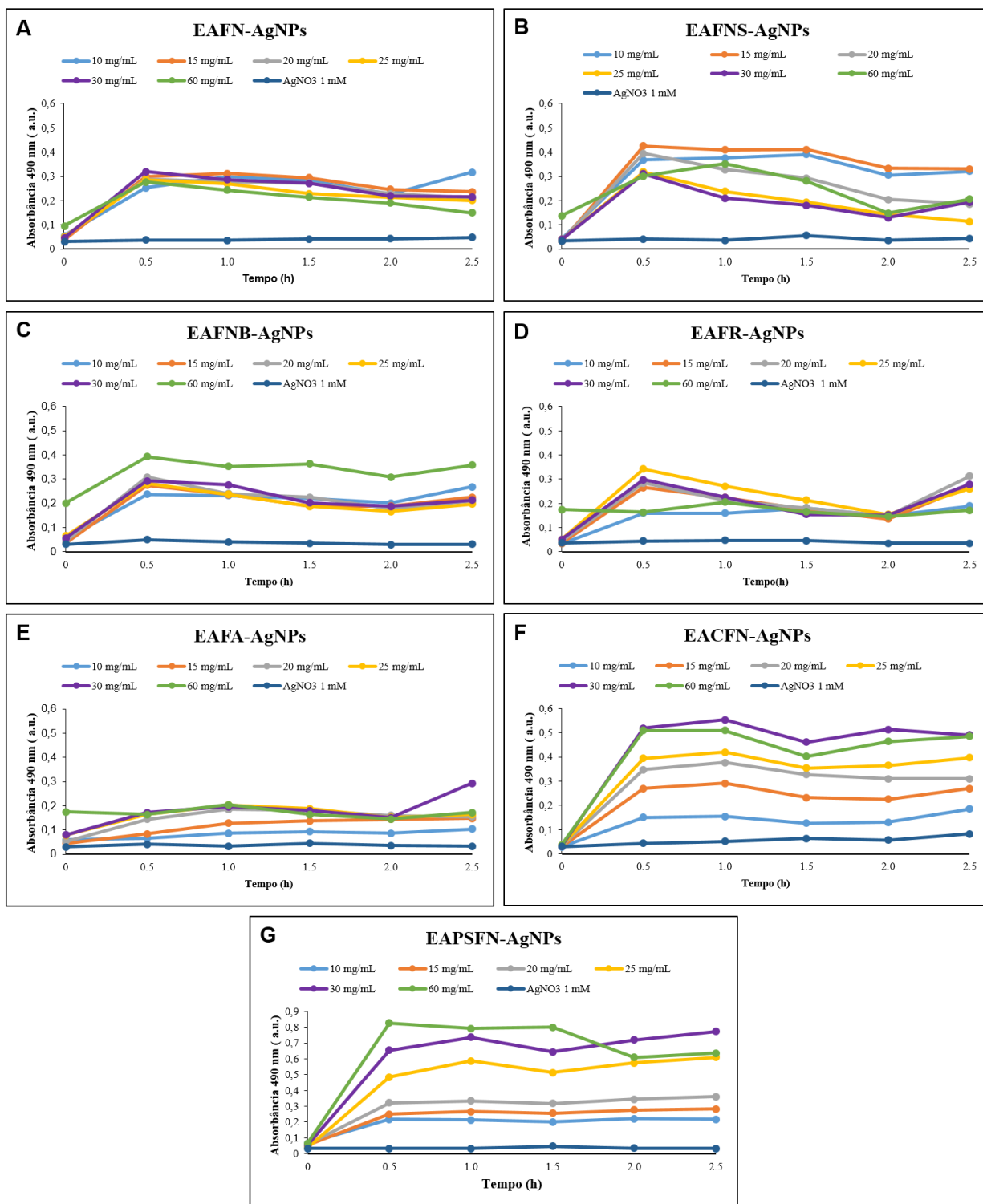


Figura 9. Curvas cinéticas das reações de síntese de AgNPs. **A** - EAFN-AgNPs, **B** - EAFNS-AgNPs, **C** - EAFNB-AgNPs, **D** - EAFR-AgNPs, **E** - EAFA-AgNPs, **F** - EACFN-AgNPs e **G** - EAPSFN-AgNPs caracterizados por espectroscopia UV-Visível. Monitoramento por espectroscopia de absorção em um comprimento de onda de 490 nm por 2,5 h.

3.2 Avaliação das propriedades físico-químicas de AgNPs por espalhamento de luz dinâmico (DLS)

A técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) foi também utilizada para confirmação da formação de AgNPs. Após formadas, as EAFN-AgNPs, EAFNS-AgNPs, EAFNS-AgNPs, EAFR-AgNPs, EAFA-AgNPs, EACFN-AgNPs e EACFN-AgNPs apresentaram grande variação dos diâmetros hidrodinâmicos (DH) e dos índices de polidispersividade (PdI), apresentados em decorrência da concentração do extrato. As AELR-AgNPs formadas apresentaram DH variando de 2136,0 – 3218,0 nm, e PdI 0,481 – 0,709, e as AELA-AgNPs formadas apresentaram DH variando de 266,6 – 4636,0 nm e PdI 0,372 – 0,646. Nas suspensões EAFNB-AgNPs e EAFNS-AgNPs, o DH variou entre 890,1 – 2958,0 nm e 168,3 – 1513,0 nm, e apresentou valores de PdI de 0,506 – 0,780 e 0,371 – 0,717, respectivamente. Na suspensão EAFN-AgNPs, o DH varia entre 724,0 – 1652,0 nm, e PdI moderado (0,405 – 0,543). Nas suspensões EACFN-AgNPs e EAPSFN -AgNPs, o DH variou de 184,7 – 422,8 nm e PdI 0,255 – 0,466. O potencial Zeta de superfície dessas AgNPs variou de -11.2 a -23.7 mV (Tabela 3, Figura 10).

A caracterização das AgNPs por espalhamento de luz dinâmico, em relação ao tamanho das partículas, forneceu o diâmetro hidrodinâmico das AgNPs com variação entre 168,3 nm e 4636,0 nm aproximadamente. Na Figura 10B pode ser observado que as amostras de AgNPs obtidas por síntese com EACFN e EAPSFN apresentaram nanopartículas com PdI moderados quando comparadas às partículas sintetizadas com EAFN, EAFNS, EAFNB, EAFR e EAFA. O DH está relacionado ao tamanho das partículas em água, um parâmetro importante que pode afetar as propriedades de biodistribuição das suspensões. O PdI é um parâmetro utilizado para medir a largura da distribuição de partículas e, portanto, a homogeneidade de uma suspensão. Neste estudo, ficou abaixo de 0,500 (em média) para todas as nanosuspensões, o que indica distribuições de tamanhos de partículas moderadamente

polidispersas. Conforme Tabela 3 e Figura 10, pode-se observar que os aumentos das concentrações de EAFN, EAFNS, EAFNB, EAFR, EAFA, EACFN e EAPSFN resultaram em tendências de aumentos nos valores de DH e também de PdI. Enquanto os aumentos das concentrações de AENFP e AENFPS, resultaram em tendências de diminuição dos valores de DH e também de PdI, o que está relacionado com a homogeneidade do tamanho das partículas obtidas.

Por último, o valor do potencial Zeta relaciona-se com as propriedades da superfície dos nanomateriais, podendo ser utilizado para indicar estabilidade de nanosuspensões. A amostra de AgNP com menor concentração de extrato (10 mg/mL) referente a folhas de noni foi a que apresentou carga de superfície mais negativa com aproximadamente -23,7 mV, sendo a mais negativa dentre todas as amostras de AgNPs, conferindo a ela uma maior estabilidade coloidal com relação às outras amostras. Esse evento pode ser relacionado com a possibilidade de diferenças fitoquímicas presentes nessa espécie.

Nesse contexto, as rotas de síntese verde com EAFN, EAFNS, EAFNB, EAFR e EAFA, EACFN e EAPSFN realizadas no presente trabalho resultaram em AgNPs com características diferenciais que podem ser utilizadas para diversos fins, como no controle de *Xcc* em brassica. O método de síntese verde é simples e ecologicamente correto e pode ser estendido para a produção de outros tipos de nanopartículas, como nanopartículas de cobre, com uma ampla gama de aplicações no campo das ciências dos materiais, bem como na agricultura.

Tabela 3. Diâmetro hidrodinâmico (Z-Average), Índice de Polidispersidade (PdI) e potencial Zeta de superfície de AgNPs sintetizadas por EAFN, EAFNS, EAFNB, EAFR, EAFA, EACFN e EAPSFN em diferentes concentrações. Os valores são representados como a média \pm erro padrão da média.

EAFN	Z-Average (nm)	PdI	Potencial Zeta (mV)
EAFN-AgNPs_10 mg mL ⁻¹	724,0 \pm 45,2	0,423 \pm 0,020	-23,7 \pm 0,2
EAFN-AgNPs_15 mg mL ⁻¹	769,1 \pm 56,8	0,458 \pm 0,057	-22,9 \pm 0,3
EAFN-AgNPs_20 mg mL ⁻¹	952,5 \pm 19,7	0,543 \pm 0,017	-21,6 \pm 0,3
EAFN-AgNPs_25 mg mL ⁻¹	1147,0 \pm 48,3	0,415 \pm 0,071	-20,9 \pm 0,8
EAFN-AgNPs_30 mg mL ⁻¹	1222,0 \pm 51,5	0,463 \pm 0,072	-20,9 \pm 0,4
EAFN-AgNPs_60 mg mL ⁻¹	1652,0 \pm 270,3	0,474 \pm 0,065	-17,0 \pm 0,5
EAFNS	Z-Average (nm)	PdI	Potencial Zeta (mV)
EAFNS-AgNPs_10 mg mL ⁻¹	890,1 \pm 63,3	0,519 \pm 0,071	-18,2 \pm 0,4
EAFNS-AgNPs_15 mg mL ⁻¹	1106,0 \pm 234,2	0,767 \pm 0,129	-16,2 \pm 0,7
EAFNS-AgNPs_20 mg mL ⁻¹	2958,0 \pm 1549,0	0,558 \pm 0,124	-13,9 \pm 1,3
EAFNS-AgNPs_25 mg mL ⁻¹	2035,0 \pm 162,0	0,506 \pm 0,047	-15,4 \pm 0,9
EAFNS-AgNPs_30 mg mL ⁻¹	2038,0 \pm 318,2	0,780 \pm 0,010	-12,3 \pm 2,2
EAFNS-AgNPs_60 mg mL ⁻¹	1381,0 \pm 61,3	0,420 \pm 0,051	-13,6 \pm 0,6
EAFNB	Z-Average (nm)	PdI	Potencial Zeta (mV)
EAFNB-AgNPs_10 mg mL ⁻¹	168,3 \pm 2,9	0,371 \pm 0,012	-21,6 \pm 0,5
EAFNB-AgNPs_15 mg mL ⁻¹	402,9 \pm 9,6	0,438 \pm 0,054	-21,3 \pm 0,7
EAFNB-AgNPs_20 mg mL ⁻¹	1117,0 \pm 15,3	0,612 \pm 0,110	-21,3 \pm 0,1
EAFNB-AgNPs_25 mg mL ⁻¹	1489,0 \pm 118,0	0,558 \pm 0,090	-20,4 \pm 1,1
EAFNB-AgNPs_30 mg mL ⁻¹	1513,0 \pm 207,9	0,717 \pm 0,066	-20,4 \pm 0,5
EAFNB-AgNPs_60 mg mL ⁻¹	1448,0 \pm 30,7	0,560 \pm 0,175	-18,9 \pm 0,4
EAFR	Z-Average (nm)	PdI	Potencial Zeta (mV)
EAFR-AgNPs_10 mg mL ⁻¹	2033,0 \pm 147,6	0,709 \pm 0,114	-17,5 \pm 0,8
EAFR-AgNPs_15 mg mL ⁻¹	2880,0 \pm 154,3	0,722 \pm 0,216	-17,2 \pm 2,6
EAFR-AgNPs_20 mg mL ⁻¹	2338,0 \pm 30,7	0,481 \pm 0,084	-16,7 \pm 0,5
EAFR-AgNPs_25 mg mL ⁻¹	3218,0 \pm 461,1	0,497 \pm 0,054	-19,5 \pm 1,7
EAFR-AgNPs_30 mg mL ⁻¹	2134,0 \pm 162,5	0,669 \pm 0,050	-19,5 \pm 1,1
EAFR-AgNPs_60 mg mL ⁻¹	1566,0 \pm 300,2	0,525 \pm 0,162	-17,0 \pm 1,6
EAFA	Z-Average (nm)	PdI	Potencial Zeta (mV)
EAFA-AgNPs_10 mg mL ⁻¹	266,6 \pm 6,6	0,372 \pm 0,021	-16,5 \pm 3,0
EAFA-AgNPs_15 mg mL ⁻¹	757,8 \pm 88,2	0,502 \pm 0,031	-20,5 \pm 1,2
EAFA-AgNPs_20 mg mL ⁻¹	1115,0 \pm 117,5	0,545 \pm 0,041	-20,6 \pm 0,5
EAFA-AgNPs_25 mg mL ⁻¹	2750,0 \pm 511,5	0,543 \pm 0,192	-19,3 \pm 1,5
EAFA-AgNPs_30 mg mL ⁻¹	3608,0 \pm 1122,0	0,646 \pm 0,145	-14,5 \pm 1,6
EAFA-AgNPs_60 mg mL ⁻¹	4636,0 \pm 1708,0	0,443 \pm 0,110	-11,2 \pm 1,2
EACFN	Z-Average (nm)	PdI	Potencial Zeta (mV)
EACFN-AgNPs_10 mg mL ⁻¹	243,3 \pm 3,6	0,423 \pm 0,007	-16,8 \pm 2,0
EACFN-AgNPs_15 mg mL ⁻¹	297,7 \pm 7,2	0,382 \pm 0,040	-20,3 \pm 1,1
EACFN-AgNPs_20 mg mL ⁻¹	236,1 \pm 3,6	0,255 \pm 0,005	-22,5 \pm 0,3
EACFN-AgNPs_25 mg mL ⁻¹	293,4 \pm 4,6	0,268 \pm 0,002	-23,4 \pm 0,1
EACFN-AgNPs_30 mg mL ⁻¹	221,1 \pm 1,2	0,261 \pm 0,009	-20,9 \pm 0,9
EACFN-AgNPs_60 mg mL ⁻¹	192,3 \pm 1,1	0,362 \pm 0,047	-19,6 \pm 1,8
EAPSFN	Z-Average (nm)	PdI	Potencial Zeta (mV)
EAPSFN-AgNPs_10 mg mL ⁻¹	347,1 \pm 0,9	0,386 \pm 0,007	-18,6 \pm 0,6
EAPSFN-AgNPs_15 mg mL ⁻¹	422,8 \pm 30,3	0,466 \pm 0,171	-18,4 \pm 1,9
EAPSFN-AgNPs_20 mg mL ⁻¹	301,6 \pm 6,1	0,386 \pm 0,010	-19,7 \pm 1,2
EAPSFN-AgNPs_25 mg mL ⁻¹	276,0 \pm 3,3	0,421 \pm 0,005	-19,6 \pm 0,8
EAPSFN-AgNPs_30 mg mL ⁻¹	240,5 \pm 5,3	0,411 \pm 0,033	-19,4 \pm 0,7
EAPSFN-AgNPs_60 mg mL ⁻¹	214,7 \pm 2,8	0,278 \pm 0,004	-17,8 \pm 0,3

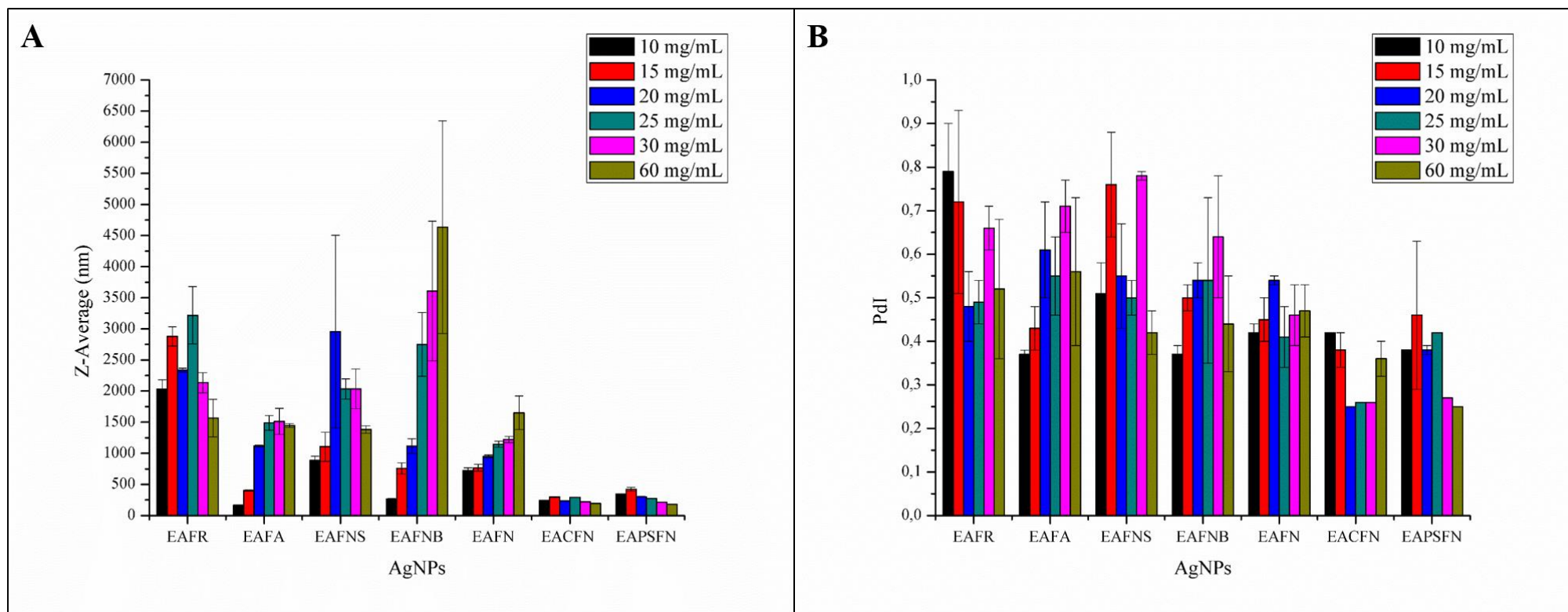


Figura 10. Caracterização de AgNPs sintetizadas utilizando EAFN, EAFNS, EAFNB, EAFR, EAFA, EACFN e EAPSFN. **A** - Diâmetro Hidrodinâmico (HD), **B** - Índice de Polidispersidade (Pdl).

3.3. AgNPs afetam negativamente a sobrevivência de *X. campestris* pv. *campestris* in vitro

Diversos estudos relataram que bactérias Gram positivas são mais resistentes aos mecanismos de ação de nanopartículas (NPs) (Feng et al., 2000, Dorobantu et al., 2015), devido à camada de peptidoglicano muito mais espessa do que as bactérias Gram-negativas, abrangendo mais de 80 nm com ácidos teicóico e teicurônico ligados covalentemente. Por outro lado as bactérias Gram-negativas são cobertas por uma camada de lipopolissacarídeos (1–3 µm de espessura) e peptidoglicanos (~ 8 nm de espessura). Este arranjo pode facilitar a entrada de íons liberados de AgNPs na célula. A destruição da parede celular que ocorre a partir da interação física entre as AgNPs e a parede celular é mais prejudicial para as bactérias Gram-negativas, pois elas não apresentam a espessa camada de peptidoglicano encontrada nas bactérias Gram-positivas que poderia atuar como uma camada protetora.

O efeito antibacteriano das 14 amostras de AgNPs selecionadas (EAFN-AgNPs sintetizadas com 10 ou 60 mg/mL de EAFN; EAFNS-AgNPs sintetizadas com 10 ou 60 mg/mL de EAFNS; EAFNB-AgNPs sintetizadas com 10 ou 20 mg/mL de EAFNB; EAFR-AgNPs sintetizadas com 25 ou 60 mg/mL de EAFR; EAFA-AgNPs sintetizadas com 10 ou 60 mg/mL de EAFA; EACFN-AgNPs sintetizadas com 25 ou 60 mg/mL de EACFN; e EAPSFN-AgNPs sintetizadas com 15 ou 60 mg/mL de EAPSFN) foram avaliadas contra *Xcc*. As MICs foram determinadas por inspeção visual após 72 h de ensaios e os resultados são mostrados na Tabela 4. EAFN-AgNPs sintetizadas com 10 ou 60 mg/mL de EAFN apresentaram efeitos antibacterianos contra *Xcc* na concentração de 128 e 256 µM, respectivamente. AS EAFNS-AgNPs e EAFNB-AgNPs sintetizadas com 10 mg/mL de EAFNS ou EAFNB apresentaram efeitos antibacterianos contra *Xcc* na concentração de 256 µM, enquanto as sintetizadas com 60 mg/mL de EAFNS ou EAFNB não mostraram efeito antibacteriano na concentração máxima avaliada de 256 µM. Curiosamente, as EAFR-AgNPs sintetizadas com 25 ou 60 mg/mL de AEFR, hospedeiro de *Xcc*, não apresentaram efeitos

antibacterianos na concentração máxima avaliada de 256 μM . EAFA-AgNPs sintetizadas com 10 ou 60 mg/mL de EAFA apresentam efeito antibacteriano na concentração de 128 μM . As EACFN-AgNPs sintetizadas com 25 mg/mL de EACFN apresentaram efeitos antibacterianos contra *Xcc* em uma concentração de 128 μM , enquanto aquelas sintetizadas com 60 mg/mL de EACFN mostraram efeito antibacteriano em uma concentração de 64 μM . Além disso, EAPSFN-AgNPs sintetizadas com 15 mg/mL de EAPSFN apresentam efeito antibacteriano na concentração de 128 μM , enquanto que aquelas sintetizadas com 60 mg/mL de EAPSFN não mostraram efeito antibacteriano na concentração máxima avaliada de 256 μM .

No teste de atividade antibacteriana contra *Xcc*, as AgNPs com maior efeito antibacteriano foram aquelas com menor DH, como EACFN-AgNPs sintetizadas com 60 mg/mL de EACFN na concentração de 64 μM (Tabela 4). Os resultados obtidos neste estudo indicam que EACFN-AgNPs sintetizadas com 60 mg/mL na concentração de 64 μM parece ser eficaz no controle de *Xcc*, atuando como agente bactericida ou bacteriostático. Em geral, a atividade antibacteriana das AgNPs é atribuída à ligação entre a parede celular bacteriana e as AgNPs. Sabe-se que AgNPs interagem com proteínas e fosfolipídeos que estão ligados à bomba de prótons da membrana bacteriana, o que resulta em ruptura da membrana, alteração do metabolismo celular e morte celular (Savithramma et al., 2012). De acordo com Lee et al. (2007b), a atividade antimicrobiana das AgNPs depende principalmente de duas variáveis, a concentração de íons prata e a sensibilidade de cada espécie microbiana à prata.

Diversos estudos têm relatado que AgNPs com dimensões pequenas apresentam maior atividade antibacteriana (Martinez-Gutierrez et al., 2010, Ivask et al., 2014, Pérez-Díaz et al., 2015). O fato de que NPs pequenas tendem a ser mais tóxicas do que NPs grandes pode ser explicado pela relação à área de superfície maior para a razão de volume em comparação com NPs maiores. Isso pode aumentar muito a produção de ROS, o que, conseqüentemente, pode danificar e inativar biomoléculas essenciais, incluindo DNA, proteínas e lipídios (Karakoti et

al., 2006). No entanto, vários estudos relataram que AgNPs com dimensões maiores também apresentam atividade biológica notável, indicando que a toxicidade das nanopartículas está associada a outros fatores, além do seu tamanho, como forma, concentração, agentes de revestimento e estado coloidal (El Badawy et al., 2011, Sohm et al., 2015). Outros fatores que podem ser importantes no mecanismo de ação de AgNPs inclui o processo de formulação, o ambiente, o mecanismo de defesa bacteriana e as características físicas. Os resultados obtidos são consistentes com os disponíveis na literatura, reforçando o potencial da abordagem realizada baseada em síntese verde visando à formação de AgNPs e sua atividade contra *Xcc*.

Tabela 4. Características físico-químicas e concentração inibitória mínima (MIC) para *X. campestris* pv. *campestris* após 72 h de tratamento com EAFN-AgNPs sintetizadas com 10 ou 60 mg/mL de EAFN, EAFNS-AgNPs sintetizadas com 10 ou 60 mg/mL de EAFNS, EAFNB-AgNPs sintetizadas com 10 ou 20 mg/mL de EAFNB, EAFR-AgNPs sintetizadas com 25 ou 60 mg/mL de EAFR, EAFA-AgNPs sintetizadas com 10 ou 60 mg/mL de EAFA, EACFN-AgNPs sintetizadas com 25 ou 60 mg/mL de EACFN e EAPSFN-AgNPs sintetizadas com 15 ou 60 mg/mL de EAPSFN e nitrato de prata (AgNO_3) (condição controle) em diferentes concentrações (8, 16, 32, 64, 128 e 256 μM).

	Z-Average (nm)	PdI	Potencial Zeta (mV)	MIC
EAFN				
EAFN-AgNPs_10 mg mL ⁻¹	724,0 ± 45,2	0,423 ± 0,020	-23,7 ± 0,2	128
EAFN-AgNPs_60 mg mL ⁻¹	1652,0 ± 270,3	0,474 ± 0,065	-17,0 ± 0,5	256
EAFNS				
EAFNS-AgNPs_10 mg mL ⁻¹	890,1 ± 63,3	0,519 ± 0,071	-18,2 ± 0,4	256
EAFNS-AgNPs_20 mg mL ⁻¹	2958,0 ± 1549,0	0,558 ± 0,124	-13,9 ± 1,3	-
EAFNB				
EAFNB-AgNPs_10 mg mL ⁻¹	168,3 ± 2,9	0,371 ± 0,012	-21,6 ± 0,5	256
EAFNB-AgNPs_60 mg mL ⁻¹	1513,0 ± 207,9	0,717 ± 0,065	-20,4 ± 0,5	-
EAFR				
EAFR-AgNPs_25 mg mL ⁻¹	3218,0 ± 461,1	0,497 ± 0,054	-19,5 ± 1,7	-
EAFR-AgNPs_60 mg mL ⁻¹	1566,0 ± 300,2	0,524 ± 0,160	-17,0 ± 1,6	-
EAFA				
EAFA-AgNPs_10 mg mL ⁻¹	266,6 ± 6,6	0,372 ± 0,021	-16,5 ± 3,0	128
EAFA-AgNPs_60 mg mL ⁻¹	4636,0 ± 1708,0	0,443 ± 0,110	-11,2 ± 1,2	128
EACFN				
EACFN-AgNPs_25 mg mL ⁻¹	293,4 ± 4,6	0,268 ± 0,002	-23,4 ± 0,1	128
EACFN-AgNPs_60 mg mL ⁻¹	192,3 ± 1,1	0,362 ± 0,047	-19,6 ± 1,8	64
EAPSFN				
EAPSFN-AgNPs_15 mg mL ⁻¹	422,8 ± 30,3	0,466 ± 0,171	-18,4 ± 1,9	128
EAPSFN-AgNPs_60 mg mL ⁻¹	214,1 ± 2,8	0,278 ± 0,004	-17,8 ± 0,3	-
AgNO₃				
Ag ⁺	-	-	-	64

3.4 EACFN-AgNPs induz a modulação positiva de genes relacionados à defesa em *B. oleracea*

Para reduzir a severidade das doenças, a indução de resistência sistêmica na planta hospedeira tornou-se uma meta de suma importância, de baixo custo e sem danos adversos ao meio ambiente e à saúde humana (Abdou et al., 2003, Elsharkawy et al., 2012). Diversos nanomateriais podem ser utilizados como elicitores de defesa de plantas, como nanopartículas de prata, titânio e cobre, que podem aumentar a atividade antimicrobiana contra fitopatógenos (Kanhed et al., 2014, Abdelmoteleb et al., 2018, Elsharkawy & Derbalah, 2019). Uma das alternativas mais recentes para o controle de fitopatógenos tem sido o uso de NPs (Kumar & Yadav, 2009, Morsy et al., 2018, Alam et al., 2019).

Sabe-se que as AgNPs apresentam atividade antimicrobiana, mas os mecanismos de ação das AgNPs na resposta de defesa em plantas ainda não estão bem esclarecidos. Para avaliar o potencial do uso de AgNPs para induzir resposta de defesa de plantas contra fitopatógenos, foi utilizada RT-qPCR para analisar a expressão relativa de 8 genes relacionados à defesa em *B. oleracea* (listados na Tabela 1, Capítulo 1) tratados com EACFN-AgNPs em uma concentração de 64 μM (que apresentou maior efeito antibacteriano contra *Xcc*), ou AgNO_3 (64 μM) ou sem tratamento (condição controle). Quando EACFN-AgNPs foram aplicadas nas folhas das plantas, os resultados mostraram que 4 (*DEFL*, *DAO*, *FADS* e *PIDRP8*) dos genes analisados foram regulados positivamente, 1 regulado negativamente (*SAPX*) e 3 (*SRG2*, *ARP* e *CYP83B1*) não mostraram uma regulação significativa na expressão gênica em 24 hat, quando comparados à condição controle (sem tratamento) (Figura 11A). Esses resultados indicam que a aplicação de EACFN-AgNPs parece desencadear uma resposta de defesa efetiva, provavelmente devido aos componentes presentes nas AgNPs sintetizadas a partir de EACFN.

Por outro lado, o tratamento das folhas de plantas de *B. oleracea* com AgNO_3 ($64 \mu\text{M}$) não mostrou uma ampla resposta de defesa da planta, uma vez que 4 dos genes analisados (*DAO*, *FADS*, *SRG2* e *ARP*) não mostraram uma regulação significativa na expressão gênica em folhas tratadas com AgNO_3 ($64 \mu\text{M}$), quando comparadas à condição controle (sem tratamento) (Figura 11B). Os genes *DEFL* e *PIDRP8* foram regulados positivamente e os genes *SAPX* e *CYP83B1* foram regulados negativamente quando comparados à condição controle. Esses resultados sugerem que a aplicação de AgNO_3 em brássicas não desencadeia resposta de defesa efetiva, embora seja observada regulação positiva de alguns genes.

Neste estudo, a aplicação de EACFN-AgNPs em *B. oleracea* foi capaz de alterar a expressão de genes relacionados à defesa, incluindo *FADS*, *DAO*, bem como genes PR conhecidos, como *DEFL* e *PIDRP8*, relatados como induzidos no ataque do patógeno (Jiang et al., 2011). Esses genes são importantes no processo de defesa da planta, por exemplo, o gene *FADS* desempenha um papel importante na resistência da planta contra vários estressores, incluindo frio, calor, seca e patógenos (Celik Altunoglu et al., 2018, Xu et al., 2019, Xue et al., 2017, Cao et al., 2020). Por outro lado, o gene *DAO* é importante no catabolismo da auxina e na manutenção da homeostase central da auxina para o desenvolvimento reprodutivo das plantas (Zhao et al., 2013). O gene *DEFL* foi relatado como envolvido na resposta de defesa e na sinalização do desenvolvimento de plantas (Dresselhaus & Márton, 2009). Além disso, o gene *PIDRP8* foi relatado como envolvido na resposta de defesa (Xiong et al., 2002).

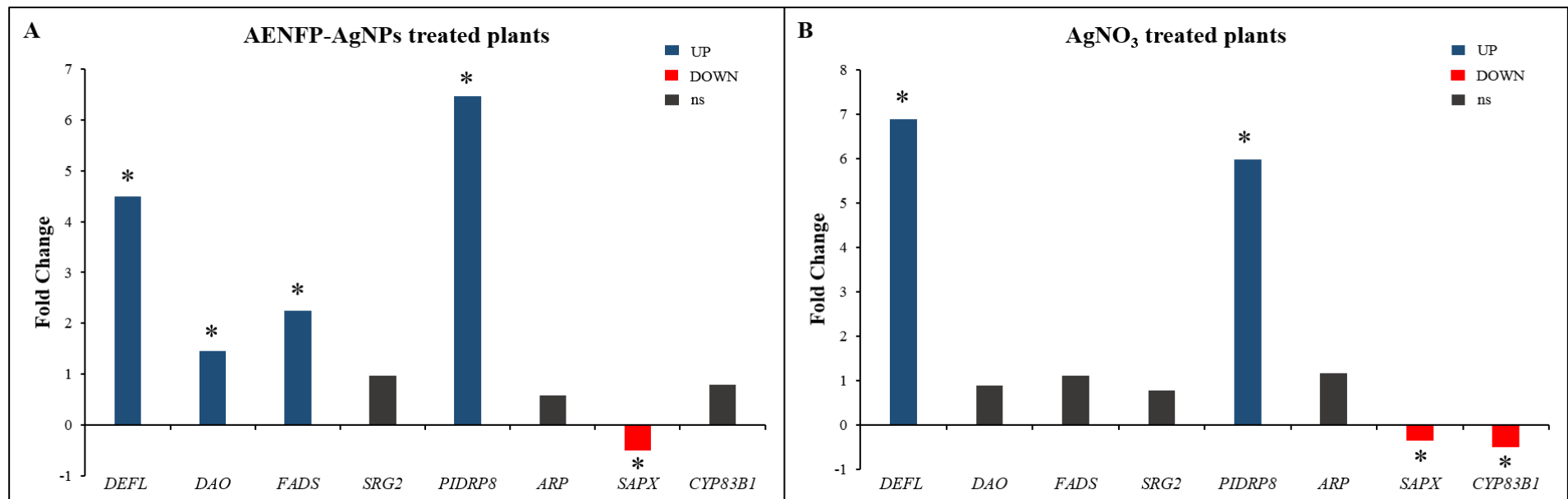


Figura 11. Análise da expressão relativa de genes alvos associados à resposta de defesa, utilizando a condição não tratada como controle. **A-** Tratamento foliar com EACFN-AgNPs sintetizadas com 60 mg/mL de EACFN na concentração de 64 μ M; **B-** Tratamento foliar com AgNO₃ (64 μ M). Conforme indicado, as barras vermelhas representam os genes regulados negativamente, as azuis representam os genes regulados positivamente, enquanto as barras cinzas representam os genes que não mostraram significância estatística. " * " símbolo indica significância estatística da expressão gênica (p-value \leq 0.05).

Estudos realizados por Noha et al. (2018) mostraram que tomateiros suscetíveis ao Tomato mosaic virus (ToMV) e Potato virus Y (PVY) tratados com AgNPs foram capazes de aumentar os pigmentos fotossintéticos, proteína solúvel total e alterar as atividades da peroxidase (*POD*) e da polifenol oxidase (*PPO*). Além disso, estudos realizados por Prakash M. Gopalakrishnan Nair e Ill Min Chung (2015) mostraram que plântulas de feijão mungo sob estresse de AgNPs foram capazes de regular a expressão de genes relacionados à defesa, como superóxido dismutase (*SOD*), catalase (*CAT*) e ascorbato peroxidase (*APX*). Os resultados do presente estudo são claramente consistentes com os relatados na literatura e enfatizam o alto potencial biotecnológico do uso de AgNPs sintetizadas utilizando extrato da casca de frutos de noni como um eficiente elicitor de defesa de plantas e indicam que AgNPs sintetizadas a partir de síntese verde podem ser utilizadas como agente antimicrobiano para inibir o crescimento de *Xcc*. No entanto, os mecanismos moleculares precisos envolvidos na resposta de defesa em plantas de *B. oleracea* tratadas com AgNPs são complexos e permanecem obscuros.

3.5 Plantas tratadas com EACFN-AgNPs desafiadas com *Xcc* exibiram tolerância melhorada à doença da podridão negra

Para verificar o potencial de EACFN-AgNPs para reduzir a infecção por *Xcc* e examinar os sintomas da doença, plantas de *B. oleracea* tratadas com EACFN-AgNPs em uma concentração de 64 μ M, ou AgNO₃ (64 μ M) ou sem tratamento (condição controle) foram inoculadas com *Xcc* 24 h após a aplicação. A aplicação de EACFN-AgNPs retardou os sintomas de podridão negra em plantas de brássicas (Figura 12 I). A primeira aparição visível dos sintomas ocorreu 5 dias após a infecção (dai) com *Xcc*, plantas tratadas com EACFN-AgNPs, ou AgNO₃ (64 μ M) apresentaram apenas manchas cloróticas, enquanto as folhas das plantas controles apresentaram manchas cloróticas e também necróticas (Fig. 12 I). Aos 7 dai,

as plantas tratadas com AgNO_3 ($64 \mu\text{M}$) e a condição controle apresentaram um fenótipo mais afetado. No entanto, no último tempo avaliado (10 dai), sintomas progressivos foram observados em todos os tratamentos (Fig. 12 I), sugerindo a perda da funcionalidade das EACFN-AgNPs, ou seja, o fim da liberação de íons Ag^+ ou a degradação/oxidação de compostos metabólicos presentes na superfície das AgNPs.

Nesse estudo, foi observado que a aplicação de EACFN-AgNPs pode suprimir o desenvolvimento da podridão negra causada por *Xcc*, resultando em maior proteção, e pode ser utilizada como estratégia para o controle desse patógeno que causa grandes danos à agricultura. Este efeito é provavelmente devido ao contato entre *Xcc* e EACFN-AgNPs, e também às propriedades elicitoras presentes em EACFN-AgNPs, o que parece resultar em uma resistência sistêmica. Uma das estratégias mais bem sucedidas para o controle de doenças de plantas tem sido a indução de resistência do hospedeiro (Servin et al., 2015). Portanto, as EACFN-AgNPs também podem ser utilizadas em outras culturas para controlar outras doenças e potencialmente aumentar a produtividade de outras culturas.

A quantificação dos sintomas (média \pm SE) em termos da porcentagem de área foliar lesionada, mostrou que as plantas de *B. oleracea* tratadas com EACFN-AgNPs e inoculadas com *Xcc*, apresentaram a menor proporção de área foliar lesionada (teste t post hoc; valor de p $<0,04$ e $<0,03$, respectivamente) quando comparado ao grupo controle (Figura 12 II) aos 5 e 7 dai, enquanto aos 10 dai não houve diferença estatisticamente significativa. No tratamento com AgNO_3 ($64 \mu\text{M}$), não houve diferença estatisticamente significativa nos três tempos (5, 7 e 10 dai), quando comparado ao grupo controle. Esses resultados sugerem que o tratamento com EACFN-AgNPs suprime o crescimento de *Xcc* e ativa as respostas de defesa da planta contra *Xcc*, garantindo proteção efetiva em *B. oleracea*, até 7 dias. No entanto, é importante notar que este efeito é temporário e pode ser corrigido com aplicações posteriores.

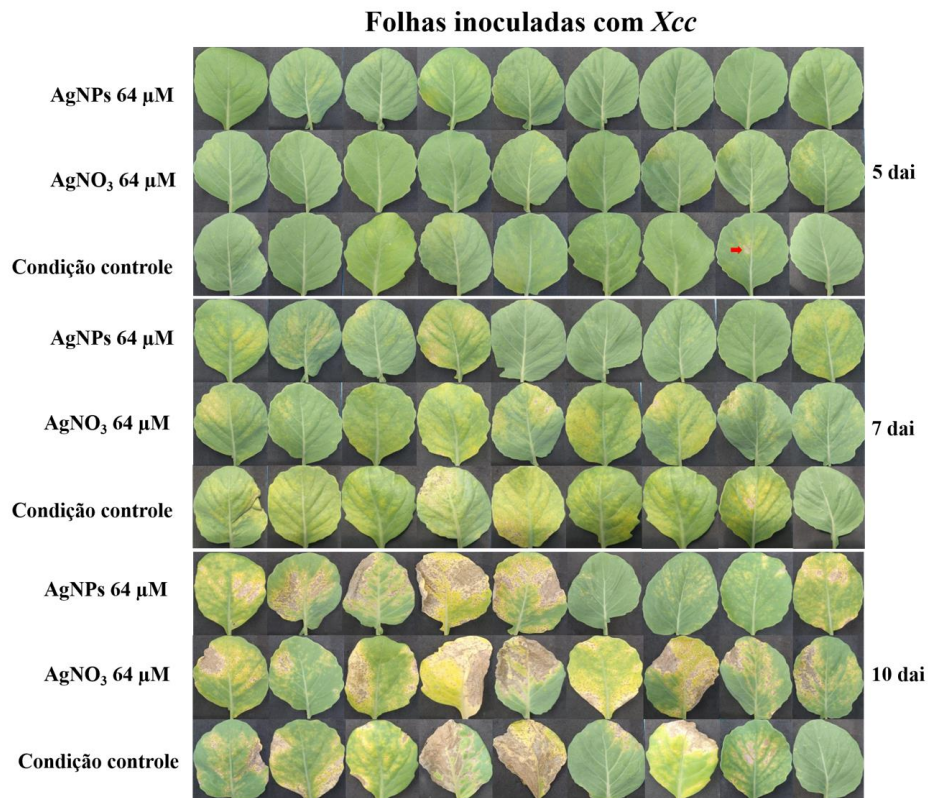
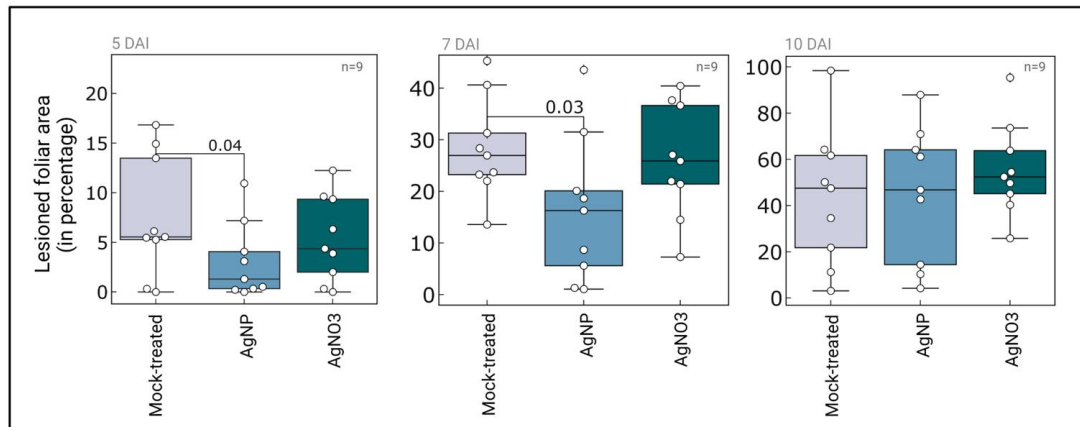
I**II**

Figura 12. Plantas de brássica pós-tratamento com EACFN-AgNPs sintetizadas com 60 mg/mL de EACFN na concentração de 64 μ M, ou AgNO₃ (64 μ M), inoculadas com *X. campestris* pv. *campestris*. A severidade dos sintomas foi analisada utilizando o software Quant[®] em três momentos 5, 7 e 10 dias após a infecção (dai). **(I)** Sintomas da podridão negra em *B. oleracea* var. *capitata* inoculada com *X. campestris* pv. *campestris*; **(II)** A significância para a razão da área foliar lesionada entre os grupos tratado e controle foi calculada usando ANOVA one-way (p -valor < 0,05) seguido de teste T-student post hoc (p -valores < 0,01, < 0,0001). Cada boxplot colorido representa a média (\pm SE) de três réplicas biológicas ($n=9$ folhas). s.s., não significativo; dai, dias após a inoculação; ANOVA, análise de variância.

4. CONCLUSÃO

O presente estudo apresentou AgNPs produzidas por rotas de síntese verde com diferentes extratos aquosos de plantas. Essas sínteses mostraram que as AgNPs foram obtidas pela redução da Ag^+ por meio da mistura reacional desses extratos com solução de AgNO_3 a 1 mM. Os resultados mostraram que o uso dos diferentes extratos aquosos resulta em AgNPs com características variadas que podem ser utilizadas para diversas finalidades que envolvam controle de microrganismos, como por exemplo, no controle de *Xcc* em brássicas. Além disso, mostra que plantas de brássica pulverizadas com EACFN-AgNPs sintetizadas com 60 mg/mL de EACFN em uma concentração de 64 μM induzem resistência adquirida sistêmica (RAS) contra *Xcc* e ativam a expressão de um conjunto específico de genes relacionados com defesa, o que refletiu em uma redução significativa dos sintomas da doença e também no retardo da progressão da doença. A supressão da doença pode estar relacionada às características das AgNPs utilizadas.

Os resultados obtidos sugerem que EACFN-AgNPs atuam como um elicitador de respostas de defesa ativa em plantas. O uso de EACFN-AgNPs na agricultura representa uma abordagem promissora para induzir a resposta de defesa das plantas, que pode ter um impacto direto na redução das aplicações de pesticidas no campo e na melhoria da produtividade das culturas. Um estudo mais detalhado do uso de EACFN-AgNPs como indutor da resposta de defesa das plantas contra ataques de patógenos pode levar ao desenvolvimento de produtos multifuncionais, conferindo resistência de amplo espectro contra diversos fitopatógenos. Tais propostas estão de acordo com o conceito de sustentabilidade ambiental, equilibrando economia e benefícios ambientais, contribuindo para uma produção agrícola mais sustentável.

CAPÍTULO III – Mecanismos de ação de nanopartículas de prata (AgNPs) em *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: abordagem proteômica

RESUMO

Nanopartículas de prata (AgNPs) sintetizadas por rotas de síntese verde são amplamente utilizadas como agentes antimicrobianos, pois, apresentam vantagens como biocompatibilidade, estabilidade, sustentabilidade, rapidez e custo efetivo. Embora as AgNPs pareçam ser mais potentes que os íons de prata, os mecanismos relacionados com a atividade antibacteriana ainda não estão totalmente elucidados. O mecanismo mais comum de toxicidade de AgNPs proposto até o momento é a liberação de íons de prata e/ou funções específicas da partícula. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo investigar os mecanismos de ação de AgNPs sintetizadas utilizando cascas de frutos de noni (*Morinda citrifolia*) contra *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) por proteômica. Neste estudo, *Xcc* foi tratada com AgNPs (32 µM), AgNO₃ (32 µM), ou sem tratamento (condição controle) e sua resposta proteômica foi caracterizada de forma abrangente para elucidar os mecanismos antimicrobianos de AgNPs no microrganismo fitopatogênico. No total, 352 proteínas diferencialmente abundantes foram identificadas. A maioria das proteínas foram reguladas nas comparações/condições AgNPs × Ctrl e AgNPs × AgNO₃. Quando *Xcc* tratadas com AgNPs a 32 µM foram comparadas com os controles, os resultados mostraram 134 proteínas diferencialmente abundantes, incluindo 107 proteínas aumentadas e 27 diminuídas. Ao contrario, quando as *Xcc* tratadas com AgNO₃ a 32 µM foram comparadas com aos controles sem tratamento, os resultados mostraram apenas 14 proteínas diferencialmente abundantes, incluindo 10 proteínas aumentadas e 4 proteínas diminuídas foram observadas. E por fim, quando *Xcc* tratadas com AgNPs a 32 µM foram comparadas com as *Xcc* tratadas com AgNO₃ a 32 µM, os resultados mostraram 204 proteínas diferencialmente abundantes, incluindo 75 proteínas aumentadas e 129 proteínas diminuídas. A análise de enriquecimento da ontologia gênica revelou que a maioria das proteínas reguladas positivamente estavam envolvidas em importantes processos biológicos, como homeostase de íons metálicos, desintoxicação, organização de membrana, processos metabólicos relacionados a aminoácidos e carboidratos, processos metabólicos lipídicos, proteólise, transporte transmembranar e outros. Os resultados obtidos neste estudo trazem importantes contribuições para a melhor compreensão dos mecanismos de ação de AgNPs em *Xcc* e poderão contribuir para o desenvolvimento de estratégias de controle de *Xcc* em brássica.

Palavras chaves: Atividade antibacteriana, nanopartículas de prata, mecanismos de ação, proteômica.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Xanthomonas* compreende diversas bactérias fitopatogênicas, que afetam uma grande variedade de culturas de relevância social e econômica. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) é uma bactéria Gram negativa pertencente à família *Xanthomonadaceae*, causadora da podridão negra em crucíferas, considerada uma das doenças mais importantes para a agricultura, causando graves perdas na produção (Vicente & Holub, 2013). Uma das principais formas de controlar a doença tem sido a utilização de agrotóxicos que causam grandes impactos ambientais, além de gerar resistência resultante do uso excessivo. Uma alternativa à utilização de agrotóxicos tem sido o uso de outras alternativas, como por exemplo as nanopartículas de prata (AgNPs) sintetizadas por rota de síntese verde.

AgNPs exibem forte ação antibacteriana contra bactérias Gram positivas ou Gram negativas, incluindo *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e *S. mutans* (Sondi & Salopek-Sondi, 2004, Kim et al., 2007, Lee et al., 2008, Jung et al., 2008). A liberação de ions Ag^+ desempenha um forte papel antimicrobiano ao interagir com os componentes da parede celular e da membrana celular das bactérias, que é um dos mecanismos cruciais de toxicidade de AgNPs (Xiu et al., 2012). Em estudos realizados por Sondi and Salopek-Sondi (2004) foi relatado que o acúmulo de AgNPs na membrana celular de *E. coli* levaram à formação de “depressões”, resultando no aumento da permeabilidade da parede celular e morte celular.

Os mecanismos mais conhecidos da ação de AgNPs envolvem o rompimento da parede e membrana celular bacteriana, promovendo a permeabilidade da membrana e a liberação dos constituintes celulares (Shrivastava et al., 2007), interrupção da respiração celular resultando em peroxidação lipídica e dano oxidativo ao DNA e proteínas (Hamed et al., 2017, Dasgupta et al., 2018). AgNPs se ligam a grupos de enxofre e fósforo do DNA, o

que ocasiona danos e agregação do DNA e interrompe a transcrição e tradução (Durán et al., 2010). Além disso, AgNPs promovem a desfosforilação de fosfotirosinas e, assim, interferem no processo de transdução de sinal e morte das células (Shrivastava et al., 2007). No entanto, os mecanismos antibacterianos das AgNPs não são totalmente compreendidos.

Técnicas proteômicas podem fornecer novas informações para elucidar os mecanismos de ação das nanopartículas. Essas técnicas detectam mudanças qualitativas e quantitativas nos perfis de abundância de proteínas, e são ferramentas poderosas para a identificação de proteínas relacionadas a sinais específicos de desenvolvimento e/ou de fatores ambientais (Rogić et al., 2015). Estudos proteômicos demonstraram que o contato com AgNPs induziu respostas celulares em *E. coli*, incluindo a produção de precursores de proteínas do envelope celular adicionais, sugerindo desestabilização da membrana externa e colapso da força motriz dos prótons (Lok et al., 2006, Lok et al., 2007, Lundqvist et al., 2008, Navarro et al., 2008). Além disso, outros estudos proteômicos relataram que a parede celular de *S. aureus* exposta a AgNPs e íons Ag^+ foi rompida, resultando na liberação do conteúdo celular para os ambientes circundantes, e colapso (Li et al., 2011, Smith et al., 2012). A proteômica quantitativa e a análise de bioinformática podem fornecer uma visão abrangente nas respostas globais das bactérias às AgNPs, o que possibilita elucidar o mecanismo antibacteriano.

Neste contexto, e com base em pesquisas anteriores (dados em fase de publicação), o presente estudo teve como objetivo investigar os mecanismos de ação de AgNPs sintetizadas utilizando cascas de frutos de noni (*Morinda citrifolia*) contra *Xcc*. Os resultados obtidos neste estudo podem auxiliar na compreensão dos mecanismos de ação de AgNPs em estratégias de controle visando à redução do uso de agrotóxicos na produção de culturas de interesse agronômico e econômico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cultura bacteriana e preparação de amostras

Para este estudo, nanopartículas de prata (AgNPs) que apresentaram a menor concentração inibitória mínima (MIC) (Capítulo 2), sintetizadas utilizando 60 mg/mL de extratos aquosos de cascas de frutos de noni (*M. citrifolia*), foram selecionadas para investigar os mecanismos moleculares da atividade antimicrobiana de AgNPs em *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*). *Xcc* foi cultivada em meio NYG (*Nutrient Yeast Glycerol*), composto por 5 g de peptona, 3 g de extrato de levedura, 10 g de ágar e 20 mL de glicerol por litro (Daniels et al., 1984) a 28°C. Após 48 h de crescimento em placa de Petri, as células foram pré-cultivadas em tubos de polipropileno de 50 mL durante 16 h em meio NYG líquido. Em seguida, a densidade óptica (D.O.) foi ajustada para $A_{600} = 0,050$ em meio NYG líquido para o preparo do bioensaio contendo AgNPs. Posteriormente, os inóculos (50 mL) contendo as AgNPs com o subMIC de 32 μM , ou controles, sendo o controle negativo com água, o controle positivo com AgNO_3 a 32 μM , foram adicionadas em frascos Erlenmeyer e incubadas a 28°C até atingir uma D.O. de $A_{600} = 0,800$. Após o crescimento as amostras foram centrifugadas (5976 g por 15 min), o sobrenadante foi descartado e as amostras armazenadas a -80°C para posterior extração de proteínas totais. Três réplicas biológicas foram analisadas por tratamento, totalizando 9 amostras. As bactérias tratadas foram comparadas com a condição controle (sem tratamento).

2.2 Extração de proteínas totais de *X. campestris* pv. *campestris* tratada com AgNPs

A fim de compreender os mecanismos moleculares envolvidos na atividade antimicrobiana de AgNPs em *Xcc*, uma abordagem proteômica foi utilizada. A extração de proteínas foi realizada utilizando o protocolo descrito por Carmo et al. (2013). Aproximadamente 0,1 g de células bacterianas foram homogeneizadas em 750 μL de tampão

de extração (0,7 M sacarose, 0,5 M Tris HCl, 30 mM HCl, 50 mM EDTA, 0,1 M KCl e 40 mM DTT). Posteriormente foram adicionados 750 µL de fenol equilibrado em pH 8,0. Em seguida, as amostras foram agitadas por 15 minutos com o auxílio de um vortex e centrifugadas a 16128 g por 3 min. Após a centrifugação, a fase superior foi transferida para um novo tubo e extraído mais duas vezes com tampão de extração. As proteínas totais foram precipitadas em acetato de amônio 0,1 M em metanol e lavadas com acetona 80%, secas e armazenadas a -20°C.

2.2.1 Solubilização e digestão das proteínas

Após a extração, as proteínas totais foram solubilizadas com 60 µL de bicarbonato de amônio a 50 mM (NH_4HCO_3 pH 8,5). Posteriormente foram acrescentados 25 µL de RapiGestTM SF – Waters (0,2% v/v), em sequência as amostras foram aquecidas a 80°C por 15 min, sob agitação e acrescentados 2,5 µL de dithiothreitol (DTT) a 100 mM. Em seguida, as amostras foram aquecidas a 60°C por 30 min e, após esse período, permaneceram à temperatura ambiente até o resfriamento. Posteriormente foram acrescentados 2,5 µL de iodoacetamida 300 mM e então, as amostras foram deixadas à temperatura ambiente por 30 min ao abrigo da luz.

Para a hidrólise das proteínas totais, foram acrescentados 40 µL de solução contendo 200 ng de tripsina (2 µg solubilizada em 400 µL de bicarbonato de amônio 50 mM), em seguida as amostras foram incubadas em estufa a 37°C por 19 h. Após esse período, foram adicionados 10 µL de ácido trifluoracético 5% (TFA) e as amostras foram homogeneizadas e incubadas novamente a 37°C por 1,5 h. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 400 g a 10°C por 30 min, em seguida o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e seco em centrifuga a vácuo por 1,5 h.

2.2.2 Dessalinização das amostras

A dessalinização das amostras foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Rappsilber et al. (2007), com modificações. Primeiramente, foi realizado o preparo das ponteiros (P200 μL) com discos Empore[®] C₁₈, contendo um disco em cada ponteira. Posteriormente, as ponteiros contendo os discos foram lavadas com 20 μL de metanol, centrifugadas a 2000 g por 30 s (as ponteiros foram centrifugadas com o auxílio de microtubos de 1,5 mL). Em seguida, foram adicionados 20 μL de resina POROS[®] R2 em solvente B (Ácido fórmico 0,1%/ acetonitrila 98%) e as ponteiros foram centrifugadas a 2000 g por 30 s. Em sequência duas lavagens em cada ponteira foram realizadas com 20 μL de solvente A (ácido fórmico 0,1%/ acetonitrila 2%) seguidas de centrifugação. Após o preparo das ponteiros, as amostras foram solubilizadas em solvente A, inseridas nas ponteiros e centrifugadas a 2000 g por 2 min. Em seguida, as amostras solubilizadas foram eluídas com 20 μL de solvente B e secas em centrífuga a vácuo por 45 min. Os pellets formados foram solubilizados em ácido fórmico 0,1% e quantificados utilizando Qubit[®] Fluorometer (Invitrogen), de acordo com o manual do fabricante e injetadas no ESI LC- MS/MS.

2.2.3 Análise dos peptídeos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS/MS)

Após a digestão triptica e dessalinização, as amostras foram aplicadas em cromatógrafo líquido (Dionex Ultimate 3000 nano). Um total de 3 μg da mistura de peptídeos foram injetados em uma coluna de aprisionamento (trap-column) com 2 cm \times 100 μm , contendo partículas de C₁₈ 5 μm para concentração. Em seguida, os peptídeos foram eluídos da trap-column para uma coluna analítica (32 cm \times 75 μm , C₁₈ 3 μm). A eluição foi realizada em gradiente crescente de acetonitrila de 7 a 35% durante 3 h sob fluxo constante de 230 nL/min. Posteriormente, os peptídeos foram destinados à fonte de ionização do espectrômetro

de massa. As frações eluídas diretamente na fonte de ionização do espectrômetro de massa do tipo Orbitrap Elite foram analisadas em modo DDA (aquisição dependente de dados), gerando espectros MS1 no analisador Orbitrap (com resolução de 120.000 FWHM a m/z 400) entre as m/z 350-1650. Para cada espectro MS1, foram definidos automaticamente os 20 íons mais intensos com cargas acima de dois e direcionados a fragmentação por CID (colisão induzida por dissociação) com o ganho automático controle (AGC) de 1×10^6 e tempo de preenchimento máximo (máximo TI) de 120 ms. A configuração determinada para CID consistiu na: detecção por ion trap, janela de isolamento de m/z 2,0 em 20 s, com AGC de 5×10^4 , máximo TI de 100 ms, com energia de colisão normalizada em 35% e limiar para a seleção de 3000.

2.2.4 Identificação, quantificação das proteínas e análise de ontologia gênica

Os espectros de massa obtidos foram alinhados e os peptídeos foram quantificados utilizando o software Progenesis[®] QI for proteomics v. 1.0 (Nonlinear Dynamics). A identificação das proteínas foi realizada por meio do software Peaks[®] 7.0 (Bioinformatics Solutions Inc.), sendo as sequências deduzidas a partir das informações de fragmentação e a busca realizada no banco de dados de sequências de proteínas do NCBI (National Center for Biotechnology Information). Os parâmetros utilizados para pesquisas em bancos de dados foram: tolerância de massa de precursores, 10 ppm; tolerância MS/MS de 0,5 Da; carbamidometilação foi selecionada como modificação fixa; oxidação de metionina e acetilação (proteína N-terminal) foram selecionadas como modificações variáveis. A enzima de hidrólise teórica selecionada foi a tripsina e foram toleradas duas clivagens perdidas. O número de proteínas e grupos de proteínas foram filtrados para taxa de descoberta falsa de menos 1% (FDR 1%). No software Progenesis[®] foi realizada a análise estatística multivariada de componentes principais (PCA) para avaliação da homogeneidade entre as condições e

entre as replicatas. O teste ANOVA foi utilizado para detectar as proteínas que apresentarem abundância com diferenças significativas entre os grupos estudados, considerando $p < 0,05$ como limite de significância.

Após a identificação e quantificação, foi realizada a ontologia gênica por meio do software Blast2GO[®], a fim de identificar os processos biológicos e funções moleculares associados à essas proteínas, assim como sua localização celular esperada. Os termos GOs foram agrupados em categorias de acordo com sua anotação funcional.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise proteômica de *X. campestris* pv. *campestris* (*Xcc*)

Neste estudo, investigou-se os mecanismos moleculares envolvidos na atividade antimicrobiana de AgNPs em *Xcc*, realizando uma análise proteômica com *Xcc* tratada com AgNPS em concentração subMIC de 32 μ M, ou controles, sendo o controle negativo com água, o controle positivo com AgNO₃ a 32 μ M. Na análise proteômica, mais de 19.000 sequências peptídicas e 1429 proteínas foram identificadas. No total, foram identificadas 352 proteínas diferencialmente abundantes entre todas as condições analisadas, que permitiram o agrupamento de replicatas e distinção entre condições. A análise de componentes principais (PCA) foi realizada e uma maior variação foi observada na homogeneidade das amostras tratadas com AgNO₃, conforme Figura 13. Também foi gerado um mapa de correlação entre condições por perfis de abundância para as 352 proteínas diferencialmente abundantes. A análise das comparações entre pares de condições foi realizada pelo teste post-hoc de Tukey. Observou-se que as proteínas reguladas por AgNPs e AgNO₃ mostraram um padrão contrastante. Interessantemente, as proteínas do grupo tratado com AgNO₃ não mostraram mudanças significativas nos níveis de expressões em relação ao grupo controle (Figura 14).

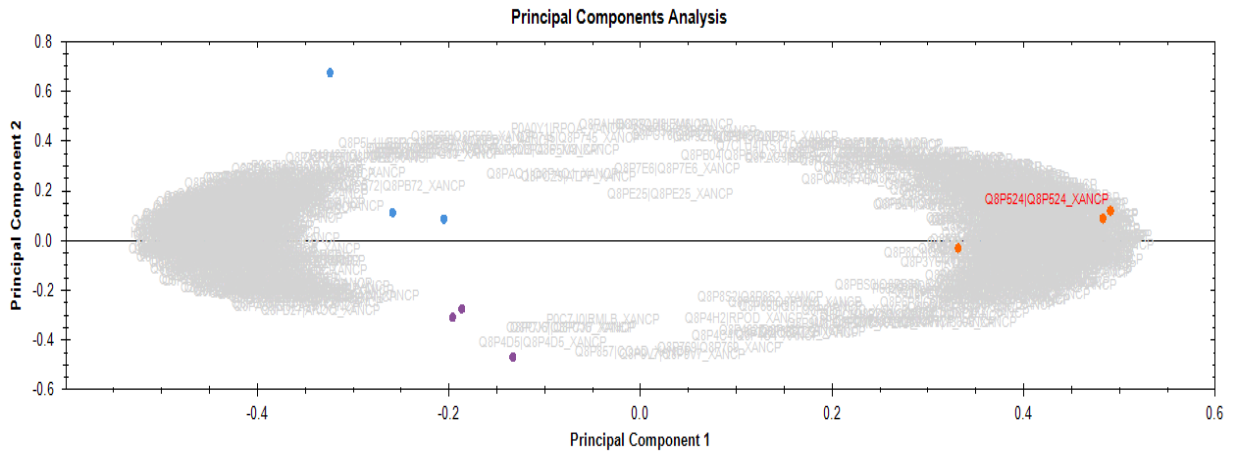


Figura 13. Análise de componentes principais (PCA) de *X. campestris* pv. *campestris*. Em cinza indicando cada proteína, pontos coloridos indicam o posicionamento de cada amostra, sendo que as cores indicam as condições e os pontos da mesma cor indicam replicatas. Azul= AgNO₃; roxo= controle (ctrl); laranja= AgNPs (nano).

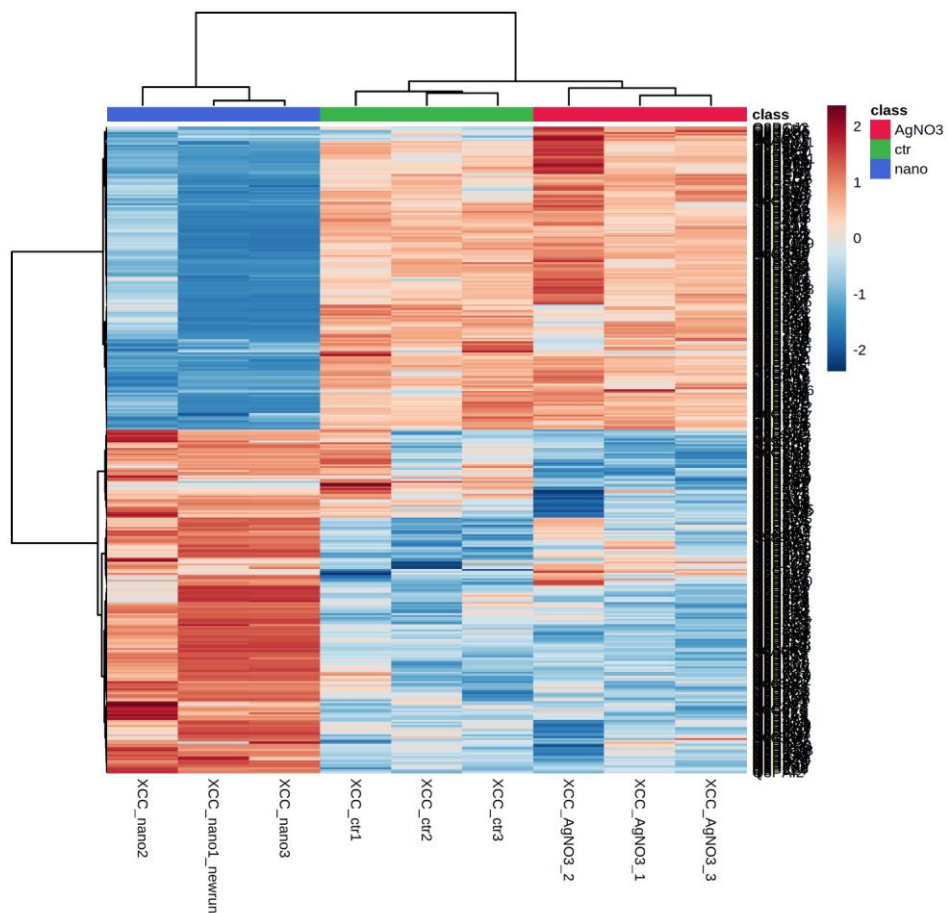


Figura 14. Mapa de correlações (*heatmap*) entre padrões de abundância normalizada e agrupamento de condições. As cores representam a abundância de proteínas diferenciais. Azul= AgNPs (nano); Verde= controle (ctrl); Vermelho= AgNO₃.

A maioria das proteínas diferencialmente abundantes foram reguladas nas comparações/condições AgNPs × Ctrl e AgNPs × AgNO₃ (Figura 15). Quando as *Xcc* tratadas com AgNPs a 32 μM foram comparadas com as amostras controles, os resultados mostraram 134 proteínas diferencialmente abundantes (Tabela 5), incluindo 107 proteínas aumentadas e 27 diminuídas. Quando as *Xcc* tratadas com AgNO₃ 32 μM foram comparadas com as *Xcc* controles, os resultados mostraram 14 proteínas diferencialmente abundantes (Tabela 6), incluindo 10 proteínas aumentadas e 4 proteínas diminuídas. Quando as *Xcc* tratadas com AgNPs a 32 μM foram comparadas com as *Xcc* tratadas com AgNO₃ 32 μM, os resultados mostraram 204 proteínas diferencialmente abundantes, incluindo 75 proteínas aumentadas e 129 proteínas diminuídas (Tabela 7) (Figura 15).

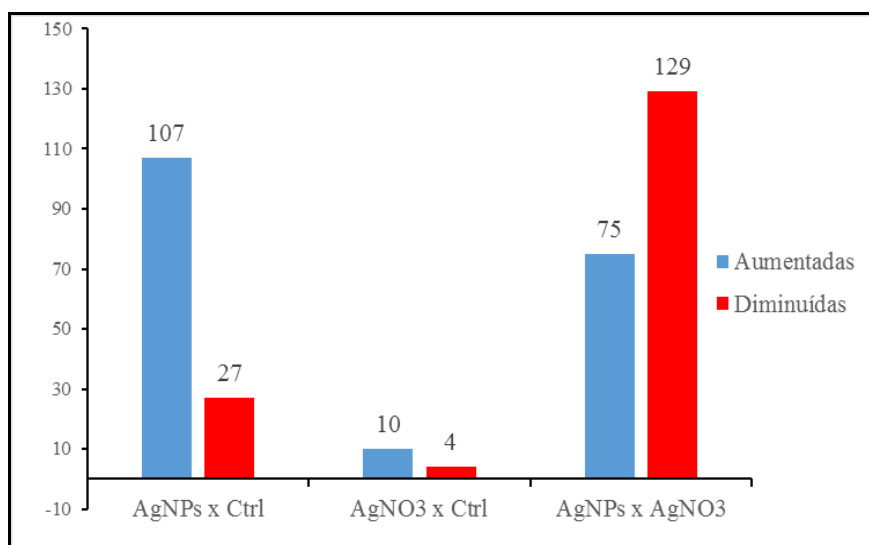


Figura 15. Quantidade de proteínas diferencialmente abundantes.

A análise de enriquecimento da ontologia gênica revelou que a maioria das proteínas reguladas positivamente nas condições AgNPs × Ctrl, AgNO₃ × Ctrl, e AgNPs × AgNO₃, estavam envolvidas em importantes processos biológicos, como homeostase de íons metálicos, desintoxicação, organização de membrana, processos metabólicos de aminoácidos

e carboidratos, processos metabólicos lipídicos, proteólise, transporte transmembranar e outros (Figura 16, 18 e 20). As categorias funcionais mais representadas para as proteínas reguladas pela prata foram atividade de hidrolase, atividade de isomerase, atividade de liase, atividade de ligase, atividade de transferase, atividade de transporte e atividade oxidorreductase (Figura 17, 19 e 21).

3.2 Identificação de proteínas envolvidas na homeostase de íons metálicos e desintoxicação

Os íons metálicos são essenciais para diversos processos metabólicos, mas o excesso de metais pode ser tóxico. Os metais não podem ser sintetizados ou degradados e, portanto, a homeostase depende principalmente da modulação do transporte para dentro e para fora da célula. No entanto, a adaptação à limitação e ao excesso de metal é complexa. Além do aumento da importação, a limitação de metal pode levar à mobilização de metais armazenados, à ativação de vias alternativas independentes do metal limitante e à regulação negativa de algumas enzimas e processos dependentes de metal (Merchant & Helmann, 2012). Em bactérias, a limitação de metais ativa vias que estão envolvidas na importação e mobilização de metais, enquanto o excesso de metais induz o efluxo e o armazenamento. Além dessas várias respostas adaptativas, bactérias cessam o crescimento e, finalmente, morrem sob condições de severa limitação de metal (inanição) ou excesso (intoxicação) (Weinberg, 1975).

Nesse estudo, foram identificadas sete proteínas aumentadas relacionadas com a homeostase de íons metálicos nas condições AgNPs × Ctrl e AgNPs × AgNO₃, entre elas: ferripyoverdine receptor (*fpvA*), OmpA-related protein (*OmpA*) TonB-dependent receptor (*TonB*) e Zinc-type alcohol dehydrogenase-like protein (*XCC0934*).

Tabela 5. Proteínas diferencialmente abundantes de *X. campestris* pv. *campestris* tratadas com EACFN-AgNPs quando comparadas com o controle.

ID proteínas aumentadas (UniProt)	Peptídeos usados para quantificação	Score	Anova (p)	FC	Descrição	Código GO	Processo biológico	Função molecular	Componente celular
Q8P982	3	364,83	0,0022	2,43	DUF4115 domain-containing protein	-	-	Ligação ao DNA	-
Q8PCX8	2	122,91	0,0033	3,44	PG_binding_1 domain-containing protein	-	-	-	-
Q8PCF3	2	84,46	0,0001	12,58	SGNH_hydro domain-containing protein	-	-	Atividade de hidrolase	-
Q8PBE1	2	70,35	0,0227	14,09	Uncharacterized protein	-	-	-	-
Q8PAC7	2	86,26	0,0015	8,35	Uncharacterized protein	-	-	-	-
Q8P9V5	2	167,34	0,0022	2,89	Uncharacterized protein	-	-	-	-
Q8P927	4	378,81	0,0122	2,32	Copper chaperone PCu(A)C	-	-	-	-
Q8P8F1	2	108,3	0,0043	1,71	EAL domain-containing protein	GO:0000166	-	Ligação de nucleotídeos	-
Q8P6Y1	2	83,72	0,0027	3,04	Uncharacterized protein	-	-	-	-
Q8P7U8	3	321,77	0,0345	1,60	Ribosome-binding factor A	GO:0042254	Biogênese do ribossomo	Ligação de subunidades pequenas ribossomais	Citosol
Q8P7L4	3	216,21	0,0115	2,69	Alkaline phosphatase	GO:0016311	Desfosforilação	Atividade de hidrolase	-
Q8PDZ3	3	242,8	0,0054	2,07	Superoxide dismutase	GO:0019430	Desintoxicação	Atividade antioxidante	-
P0C0F8	3	219,65	0,0022	2,46	Superoxide dismutase	GO:0019430	Desintoxicação	Atividade antioxidante	-
Q8P7Z3	2	225,55	0,0241	2,39	Translation initiation factor IF-3	GO:0006351	Desmontagem do ribossomo	Atividade reguladora de tradução	Citosol
P0A0R6	4	259,87	0,0019	6,04	Co-chaperonin GroES	GO:0006457	Dobramento de proteínas	Chaperona de dobramento de proteínas	Citoplasma
Q8P6V0	2	168,35	0,0529	3,23	Heat shock protein	GO:0042026	Dobramento de proteínas	chaperona de dobramento de proteínas	Citoplasma

Q7CLT3	4	333,23	0,0019	1,81	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	GO:0006515	Dobramento de proteínas	Atividade de isomerase	-
Q8PDM8	2	172,86	0,0051	1,94	FMN oxidoreductase	GO:0016491	Fosforilação	Atividade oxidoreductase	-
Q8P572	2	82,66	0,0010	13,02	Sugar kinase	GO:0016310	Fosforilação	Atividade de transferase	-
Q8P8K8	2	116,24	0,0241	12,36	Cytochrome D ubiquinol oxidase subunit I	GO:0006091	Geração de metabólitos precursores e energia	Atividade oxidoreductase	Membrana plasmática
Q8PCT2	4	253,88	0,0061	1,51	Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase	GO:0006091	Geração de metabólitos precursores e energia	Atividade oxidoreductase	-
Q8P8V4	6	447,19	0,0075	1,57	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	GO:0006091	Geração de metabólitos precursores e energia	Atividade oxidoreductase	Membrana plasmática
Q8P677	5	346,73	8,60E-05	11,00	Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha	GO:0006091	Geração de metabólitos precursores e energia	Atividade de ligase	Citoplasma
Q8P529	2	118,65	0,0335	1,67	Ferripyoverdine receptor	GO:0055065	Homeostase de íons metálicos	Atividade de transporte	Membrana externa da célula
Q8PE25	7	325,94	0,0099	1,01	Ferripyoverdine receptor	GO:0055065	Homeostase de íons metálicos	Atividade de transporte	Membrana externa da célula
Q8P3E0	6	248,32	0,0004	6,63	OmpA-related protein	GO:0055072	Homeostase de íons metálicos	Atividade de transporte	Componente intrínseco da membrana plasmática
Q8P3D9	6	442,13	0,0167	2,77	OmpA-related protein	GO:0055072	Homeostase de íons metálicos	Atividade de transporte	Componente intrínseco da membrana plasmática
Q8P605	3	174,21	0,0002	1,98	TonB-dependent receptor	GO:0055072	Homeostase de íons metálicos	Atividade de transporte	Membrana externa da célula
Q8P621	3	132,12	0,0007	1,58	TonB-dependent receptor	GO:0055072	Homeostase de íons metálicos	Atividade de transporte	Membrana externa da célula
Q8PC20	2	120,78	0,0003	2,23	Zinc-type alcohol dehydrogenase-like protein	GO:0006094	Homeostase de íons metálicos	Atividade oxidoreductase	-
Q8PAJ8	3	167,27	0,0054	2,64	Dihydropolypyl dehydrogenase	GO:0045454	Homeostase redox celular	Atividade oxidoreductase	-
Q8PAC3	2	184,39	0,0110	1,45	Fe-S_biosyn domain-containing protein	GO:0097428	Maturação de proteínas	Ligação a ions metálicos	Citoplasma
Q8P585	2	146,44	0,0265	2,88	Serine-type D-Ala-D-Ala carboxypeptidase 1	GO:0071555	Organização da parede celular/Biogênese	Atividade de hidrolase	-
Q8P5P6	2	144,7	0,0121	1,97	UDP-N-acetylmuramate--L-alanyl-gamma-D-glutamyl-meso-2,6-	GO:0071555	Organização da parede	Atividade de ligase	Membrana plasmática

					diaminoheptandioate ligase		celular/Biogênese		
Q8PCL3	3	239,89	0,0068	2,70	Penicillin-binding protein activator	GO:0071554	Organização da parede celular/Biogênese	Atividade catalítica	Membrana plasmática
Q8P447	3	200,89	0,0045	2,16	Polyamine aminopropyltransferase	GO:0008295	Processo biossintético da espermidina	Atividade de transferase	Citosol
Q9X4I6	6	416,15	0,0084	2,85	S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme	GO:0006557	Processo biossintético da espermidina	Atividade de liase	Citosol
H9L4N5	2	128,16	0,0031	1,73	Fumarylacetoacetate hydrolase	GO:0009251	Processo catabólico	Atividade de hidrolase	-
Q8P627	2	78,83	0,0115	2,44	Fumarylacetoacetate hydrolase	GO:0009251	Processo catabólico	Atividade de hidrolase	-
Q8PB56	5	242,53	0,0002	3,67	Periplasmic serine endoprotease DegP-like	GO:0055085	Processo catabólico de proteínas	Atividade de hidrolase	Espaço periplásmico
Q8PAR4	7	372,73	0,0040	2,95	Ferredoxin--NADP(+) reductase	GO:0042167	processo catabólico do heme	Atividade oxidoreductase	-
Q8P5R4	2	230,42	0,0166	2,31	Glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase	GO:0042168	Processo catabólico do heme	Atividade de transferase	Citoplasma
Q8P736	2	130,9	0,0190	2,23	FAD:protein FMN transferase	GO:0036211	Processo de modificação de proteínas	Atividade de transferase	Membrana plasmática
Q8P5B0	3	196,6	0,0014	2,17	Class I SAM-dependent methyltransferase	GO:0036211	Processo de modificação de proteínas	Atividade de transferase	-
Q8P457	2	105	0,0084	2,19	Coenzyme A biosynthesis bifunctional protein CoaBC	GO:0006766	Processo metabólico da vitamina	Atividade ligase	Complexo fosfopantotenoilcisteína descarboxilase
Q8PBG7	3	173,62	0,0393	1,43	Riboflavin biosynthesis protein	GO:0006766	Processo metabólico da vitamina	Atividade de transferase	-
P58949	4	253,81	0,0011	6,81	3-isopropylmalate dehydratase large subunit	GO:0006520	Processo metabólico de aminoácidos	Atividade de liase	Complexo de 3-isopropilmalato desidratase
Q8P5K9	2	149,93	0,0088	2,87	3-isopropylmalate dehydratase small subunit	GO:0006520	Processo metabólico de aminoácidos	Atividade de liase	Complexo de 3-isopropilmalato desidratase
Q8PDT9	2	114,36	0,0017	2,05	Acyl-CoA dehydrogenase	GO:0006520	Processo metabólico de aminoácidos	Atividade oxidoreductase	-

Q8P767	3	194,67	0,0235	2,34	Aspartate carbamoyltransferase	GO:0006520	Processo metabólico de aminoácidos	Atividade de transferase	Citoplasma
Q8P772	3	197,96	0,0105	2,54	Aspartate kinase	GO:0006520	Processo metabólico de aminoácidos	Atividade de transferase	Citoplasma
Q8P476	7	437,21	0,0006	2,92	Bifunctional protein PutA	GO:0006520	Processo metabólico de aminoácidos	Atividade oxidorreductase	Membrama plasmática
Q8PCV5	5	368,6	0,0100	1,66	Cystathionine beta-synthase	GO:0006520	Processo metabólico de aminoácidos	Atividade de transferase	Citoplasma
Q8P878	10	632,39	0,0105	2,26	Glutamate dehydrogenase	GO:0006520	Processo metabólico de aminoácidos	Atividade oxidorreductase	-
Q8PBK7	7	569,84	9,08E-05	2,38	Glycine dehydrogenase (decarboxylating)	GO:0006520	Processo metabólico de aminoácidos	Atividade oxidorreductase	Citosol
Q8P8Q6	2	72,75	0,0167	5,54	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	GO:0006520	Processo metabólico de aminoácidos	Atividade de hidrolase	Citosol
Q8P6A2	2	163,53	0,0438	2,64	Homocysteine synthase PA5025 (Imported)	GO:0006520	Processo metabólico de aminoácidos	Atividade de transferase	-
Q8P5L5	5	407,88	0,0109	4,83	Ketol-acid reductoisomerase (NADP(+))	GO:0006520	Processo metabólico de aminoácidos	Atividade oxidorreductase	Citosol
Q8P865	2	136,16	0,0142	1,82	L-lysine 6-aminotransferase	GO:0006520	Processo metabólico de aminoácidos	Atividade de transferase	Citosol
Q8PCQ7	7	402,22	0,0036	5,05	Phosphoribosylformylglycinamidin e synthase	GO:0006935	Processo metabólico de aminoácidos	Atividade de ligase	Citoplasma
Q8P608	2	113,12	0,0020	13,78	Sulfite reductase	GO:0019344	Processo metabólico de aminoácidos	Atividade oxidorreductase	-
Q8P7A1	4	259,42	0,0003	2,42	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase	GO:0005975	Processo metabólico de carboidratos	Atividade isomerase	-
Q8P6F5	2	116,14	0,0129	2,36	7-carboxy-7-deazaguanine synthase	GO:0005975	Processo metabólico de carboidratos	Atividade de liase	-
Q8PD06	8	537,62	0,0010	2,28	Acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	GO:0005975	Processo metabólico de carboidratos	Atividade de transferase	Citoplasma

Q8P9U2	2	109,49	0,0008	2,19	Alpha-xylosidase	GO:0005975	Processo metabólico de carboidratos	Atividade de hidrolase	-
Q8P9S3	3	212,21	0,0005	1,82	Glucan 1,4-beta-glucosidase	GO:0016052	Processo metabólico de carboidratos	Atividade de hidrolase	-
Q8P3B9	2	135,85	0,0008	1,88	Glucose-6-phosphate 1-epimerase	GO:0005975	Processo metabólico de carboidratos	Atividade de liase	-
Q8PCY1	2	110,64	0,0005	3,10	Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing]	GO:0005975	Processo metabólico de carboidratos	Atividade de transferase	Citosol
Q8P5Z0	10	854,82	0,0059	3,10	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GO:0005975	Processo metabólico de carboidratos	Atividade oxidoredutase	Citosol
Q8P6W2	3	137,13	0,0124	7,26	L-serine dehydratase	GO:0005975	Processo metabólico de carboidratos	Atividade de liase	-
Q8P5Z7	3	216,93	0,0009	12,24	Probable fructose-bisphosphate aldolase class 1 1	GO:0005975	Processo metabólico de carboidratos	Atividade de liase	-
Q8PDB0	2	157,23	0,0035	3,238	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha	GO:0005975	Processo metabólico de carboidratos	Atividade oxidoredutase	-
Q8PAI0	5	271,56	0,0038	3,63	UDP-glucose 6-dehydrogenase	GO:0005975	Processo metabólico de carboidratos	Atividade oxidoredutase	-
Q8PDX2	3	244,14	0,0022	4,68	Acyl-CoA:acyl-CoA alkyltransferase	GO:0006629	Processo metabólico de lipídico	Atividade de transferase	Citoplasma
Q8PCX0	3	283,03	0,0047	2,88	Beta-ketoacyl-[ACP] synthase I	GO:0006629	Processo metabólico de lipídico	Atividade de transferase	Citosol
Q8PAY7	3	178,93	0,0021	2,50	Methionine--tRNA ligase	GO:0006399	Processo metabólico de tRNA	Ligação ao RNA	Citosol
Q8PD87	3	198,99	0,0112	2,41	Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase	GO:1901135	Processo metabólico derivado de carboidratos	Atividade de ligase	-
Q8P8Q1	4	353,79	0,0018	2,27	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	GO:1901135	Processo metabólico derivado de carboidratos	Atividade de transferase	-
Q8P5M4	4	276,98	0,0147	3,38	Inorganic pyrophosphatase	GO:0006793	Processo metabólico do fósforo	Atividade de hidrolase	Citosol

Q8PBL4	4	239,54	0,0453	2,05	Alanyl dipeptidyl peptidase	GO:0006508	Proteólise	Atividade de hidrolase/Atividade catalítica	-
Q8PBY5	4	307,82	0,0409	1,80	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX	GO:0006508	Proteólise	Chaperona de dobramento de proteínas	Citosol
Q8P9Y0	3	198,66	0,0108	2,35	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH	GO:0006508	Proteólise	Atividade de hidrolase	Membrana plasmática
Q8P412	3	240,3	0,0005	3,21	Leucine aminopeptidase	GO:0006508	Proteólise	Atividade de hidrolase	Citoplasma
Q8P7N7	4	241,55	0,0053	2,27	Metallopeptidase	GO:0006508	Proteólise	Atividade de hidrolase	Membrana plasmática
Q8P541	3	152,31	0,0089	1,58	Prolyl oligopeptidase	GO:0006508	Proteólise	Atividade de hidrolase	-
Q8PE86	5	351,78	0,0008	3,74	TldD protein	GO:0006508	Proteólise	Atividade de hidrolase	Citosol
Q8PE88	3	229,09	0,0034	2,49	TldD protein	GO:000650	Proteólise	Atividade de hidrolase	Citosol
Q8P524	10	634,55	2,17E-06	2,82	Zinc protease	GO:0006508	Proteólise	Atividade de hidrolase	-
Q8P6E7	2	93,03	0,0337	2,88	Holliday junction ATP-dependent DNA helicase RuvB	GO:0019346	Reparo de DNA	Ligação ao DNA	-
Q8P3T3	6	358,19	0,0073	2,53	Ribonucleoside-diphosphate reductase	GO:0009263	Replicação do DNA	Atividade oxidoreductase	Citosol
Q8P876	3	135,06	0,0026	3,28	Multidrug resistance protein	GO:0046677	Resposta ao antibiótico	Atividade de transporte	Componente intrínseco da membrana plasmática
Q8PBF9	8	679,84	0,0395	1,94	PDZ domain-containing protein	GO:0046677	Resposta ao antibiótico	-	-
Q8PAK9	8	701,91	0,0013	2,73	Chaperone protein DnaK	GO:0051085	Resposta ao estresse	Chaperona de dobramento de proteínas	Citosol
Q8PAI2	2	127,15	2,74E-05	3,93	Glutathione peroxidase	GO:0006979	Resposta ao estresse oxidativo	Atividade antioxidante	-
Q8P6P5	3	202,53	0,0023	2,84	Pilus biogenesis protein	GO:0023052	Sinalização	Atividade do transdutor molecular	Componente integral da membrana
Q8P6P2	2	123,78	0,0383	1,88	Pilus protein	GO:0023052	Sinalização	Atividade do transdutor molecular	Componente integral da membrana

P66536	3	220,09	0,0011	5,91	30S ribosomal protein	GO:0006412	Tradução	Atividade da molécula estrutural	Ribossomo
P66587	7	493,97	0,0339	1,47	30S ribosomal protein S5	GO:0006412	Tradução	Atividade da molécula estrutural	Ribossomo
Q8PAC2	3	440,13	0,0054	2,50	30S ribosomal protein S6	GO:0006412	Tradução	Atividade da molécula estrutural	Ribossomo
Q8PC34	2	143,43	0,0026	5,12	50S ribosomal protein L15	GO:0006412	Tradução	Atividade da molécula estrutural	Ribossomo
Q8PAV6	2	111,58	0,0164	2,36	Ribosome-recycling factor	GO:0002184	Tradução	Ligação de subunidade grande ribossomal	Citoplasma
Q8PCG0	2	124,83	0,0339	3,03	ABC transporter substrate binding protein	GO:0055085	Transporte transmembranar	Atividade de transporte	-
Q8PC19	22	2265,1	0,0275	1,60	Outer membrane protein	GO:0055085	Transporte transmembranar	Atividade de transporte	Membrana externa da célula
Q8P5Y8	2	251,17	0,0008	9,94	Outer membrane protein DSM	GO:0055085	Transporte transmembranar	Atividade de transporte	Membrana externa da célula
Q8P5K4	5	374,98	0,0001	2,60	TolC protein	GO:0015562	Transporte transmembranar	Atividade de transporte	Membrana externa da célula
Q8P3V2	2	122,21	0,0068	1,71	TonB-like protein	GO:0055085	Transporte transmembranar	Atividade do transdutor molecular	Membrana plasmática
Q8PBG3	4	456,44	0,0041	2,03	Ubiquinol oxidase subunit 2	GO:0055085	Transporte transmembranar	Atividade de transporte	Membrana plasmática
ID proteínas diminuídas (UniProt)	Peptídeos usados para quantificação	Score	Anova (p)	FC	Descrição	Código GO	Processo biológico/ Função molecular/ Componente celular	Função molecular	Componente celular
Q8PBH7	4	198,73	0,0022	3,76	Ca2+-binding protein, EF-hand superfamily	-	-	-	-
Q8PA73	2	80,49	0,0016	5,53	Signal peptide protein	-	-	-	-
Q8PA72	3	190,3	0,0033	7,46	Lipoprotein	-	-	-	-
Q8P4T4	2	129,86	0,0012	5,50	Lipoprotein	-	-	-	-
Q8P682	4	209,18	0,0162	3,68	Ribosomal large subunit pseudouridine synthase D	GO:0000455	Biogênese do ribossomo	Ligação ao RNA	Citoplasma
Q8PBC2	2	87,06	0,0003	2,68	Ribosome maturation factor RimM	GO:0000455	Biogênese do ribossomo	Ligação ao Ribossomo	Ribossomo
Q8P6S8	3	227,32	0,0061	3,82	TonB-dependent receptor	GO:0055072	Homeostase de íons metálicos	Atividade de transporte	Membrana externa da célula

Q8P5V2	3	139,86	0,0479	1,61	Penicillin-binding protein 1A	GO:0071554	Organização da parede celular/Biogênese	Atividade de hidrolase	Membrana plasmática
Q8P774	2	191,78	0,0001	6,38	UDP-N-acetyl-alpha-D-muramoyl-L-alanyl-L-glutamate epimerase	GO:0071554	Organização da parede celular/Biogênese	Atividade de isomerase	Citoplasma
Q8P6P6	2	109,36	0,0136	2,38	Histidine kinase	GO:0036211	Processo de modificação de proteínas	Atividade de transferase	Citoplasma
Q8P536	1	103,73	0,0337	2,67	Porphobilinogen deaminase	GO:0036211	Processo de modificação de proteínas	Atividade de transporte	Citoplasma
Q8P6X3	2	83,55	0,0203	3,81	3-dehydroquininate synthase	GO:0006520	Processo metabólico de aminoácidos	Atividade de ligase	Citoplasma
Q8P5I2	10	652,68	1,71E-05	14,29	Amylosucrase or alpha amylase	GO:0005975	Processo metabólico de carboidratos	Atividade de hidrolase	-
Q8P7J1	2	201,53	0,0393	3,51	Leucine--tRNA ligase	GO:0006399	Processo metabólico de tRNA	Atividade de hidrolase	Citosol
Q8P4G0	2	184,02	0,0218	4,03	Methionyl-tRNA formyltransferase	GO:0006399	Processo metabólico de tRNA	Atividade de transferase	Citosol
Q8P7Z6	3	242,47	0,0022	3,14	Phenylalanine--tRNA ligase beta subunit	GO:0006399	Processo metabólico de tRNA	Ligação ao RNA	Citoplasma
Q8P475	4	203,93	0,0199	1,42	Tyrosine--tRNA ligase	GO:0006399	Processo metabólico de tRNA	Atividade motora do citoesqueleto	Citosol
Q8P3L1	10	835,6	0,0033	2,11	Acetyl-coenzyme A synthetase	GO:1901135	Processo metabólico derivado de carboidratos	Atividade de ligase	Citosol
Q8PDU2	2	204,17	0,0026	3,97	Dipeptidyl aminopeptidase	GO:0006508	Proteólise	Atividade de hidrolase	-
Q8PAR6	7	401,73	0,0085	2,25	Peptidyl-dipeptidase	GO:0006508	Proteólise	Atividade de hidrolase	Espaço periplásmico
Q8PC44	5	152,63	0,0028	3,01	30S ribosomal protein S3	GO:0006412	Tradução	Atividade da molécula estrutural	Ribossomo
Q8PC39	2	73,89	0,0146	2,09	50S ribosomal protein L5	GO:0006412	Tradução	Atividade da molécula estrutural	Ribossomo
Q8PAP2	2	167,44	0,0097	1,81	Transcriptional regulator	GO:0006351	Transcrição	Ligação ao DNA	Citoplasma
Q8P746	2	78,95	5,78E-05	7,24	ABC transporter permease	GO:0006633	Transporte transmembranar	Atividade de transporte	-
Q8P875	5	339,31	0,0020	1,62	Efflux pump membrane transporter	GO:0055085	Transporte transmembranar	Atividade de transporte	Membrana plasmática

Q8P691	4	155,78	0,0020	2,93	Ferric enterobactin receptor	GO:0055085	Transporte transmembranar	Atividade de transporte	Membrana plasmática
Q8P727	3	129,28	0,0066	3,21	Permease	GO:0055085	Transporte transmembranar	-	Componente integral da membrana

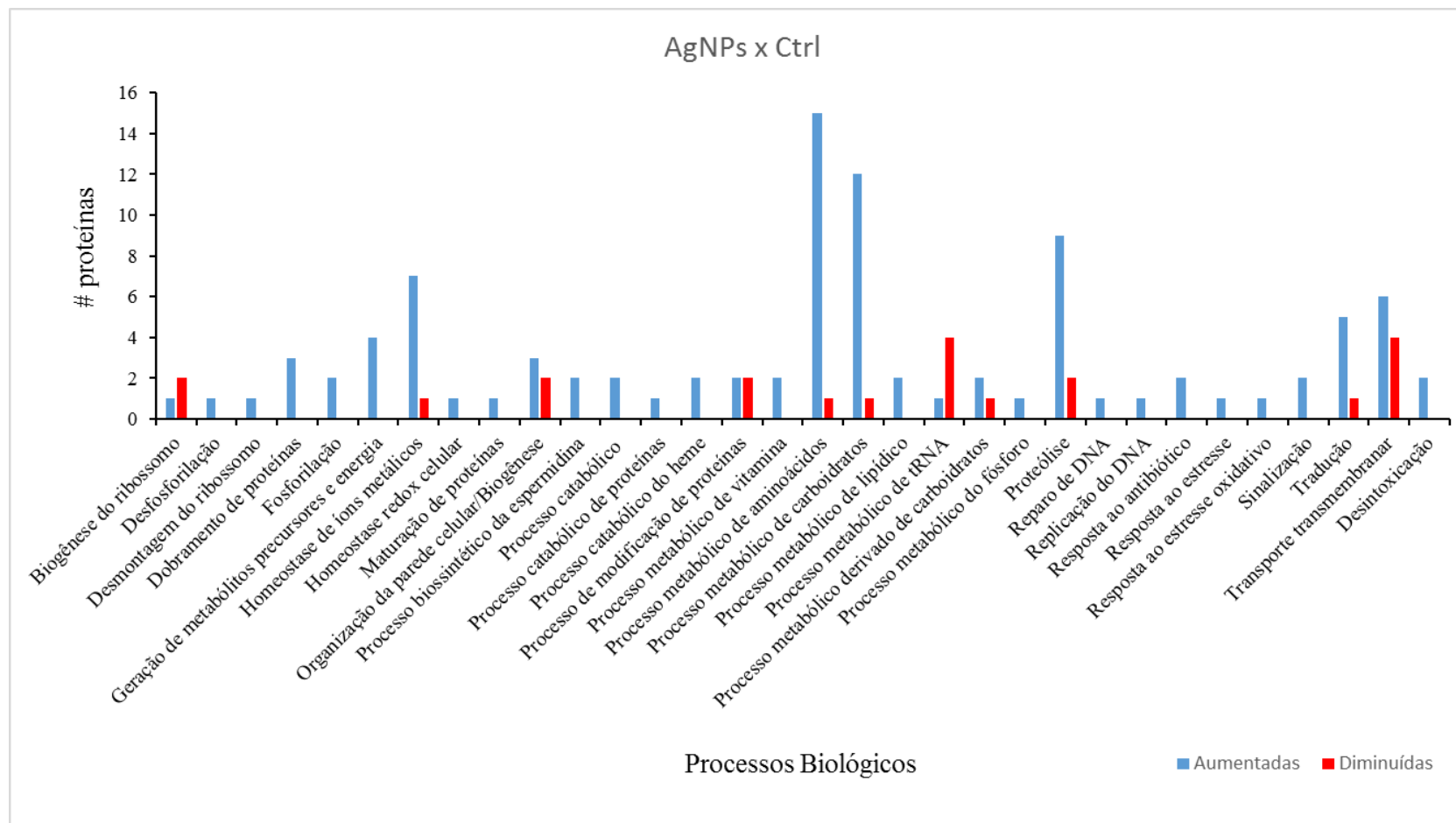


Figura 16. Análise de ontologia gênica. Processos biológicos nos quais estão inseridas as proteínas diferencialmente abundantes do tratamento com AgNPs-EACFN quando comparado com a condição controle (Ctrl).

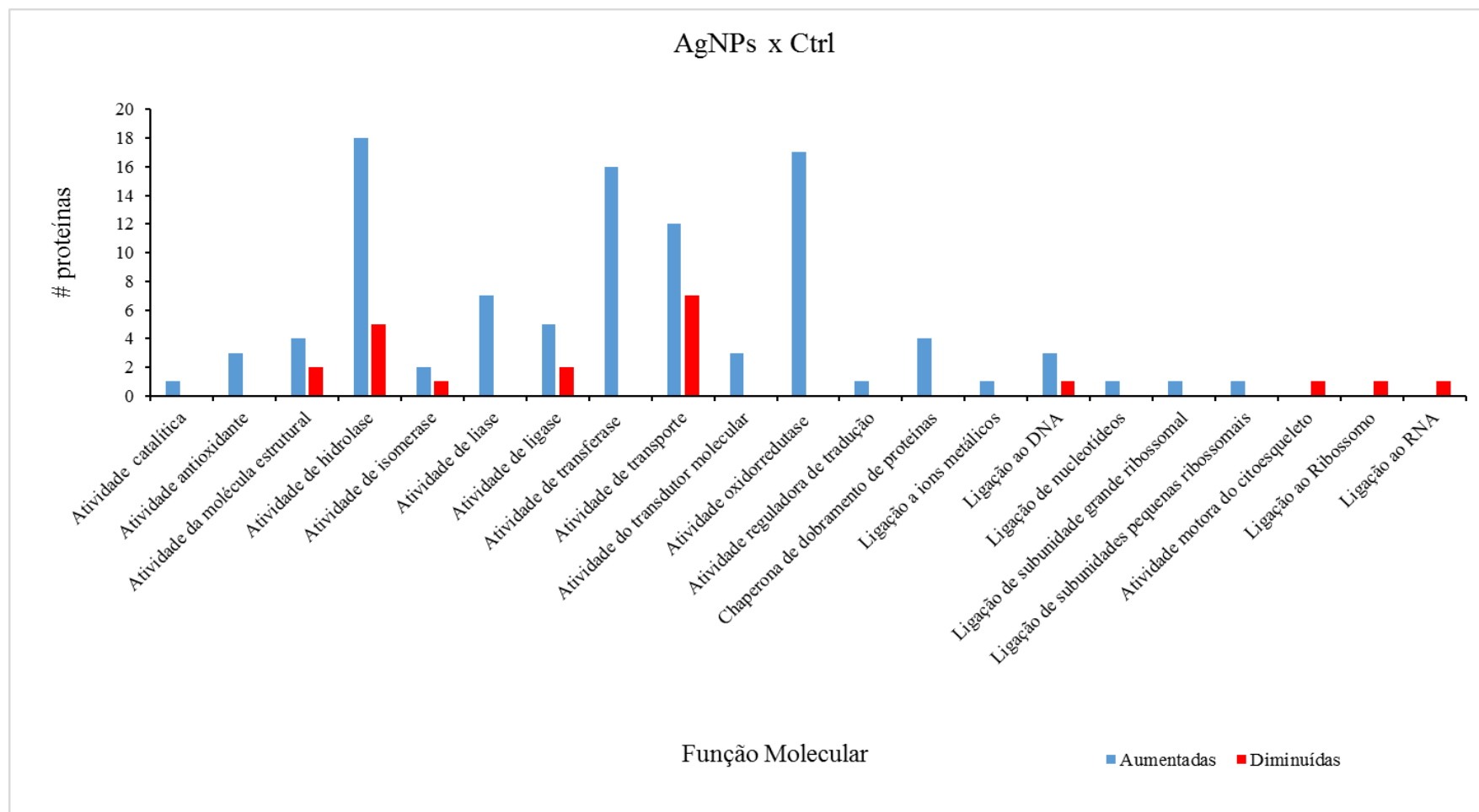


Figura 17. Análise de ontologia gênica. Função Molecular nos quais estão inseridas as proteínas diferencialmente abundantes do tratamento com AgNPs-EACFN quando comparado com a condição controle (Ctrl).

Tabela 6. Proteínas diferencialmente abundantes de *X. campestris* pv. *campestris* tratadas com AgNO₃ quando comparadas com o controle.

ID proteínas aumentadas (UniProt)	Peptídeos usados para quantificação	Score	Anova (p)	FC	Descrição	Código GO	Processo biológico	Função molecular	Componente celular
Q8P6C7	9	442,89	0,0344	1,46	Ferric enterobactin receptor	-	-	Receptor	Membrana externa da célula
Q8PAJ6	10	920,88	0,1683	1,28	Oxoglutarate dehydrogenase (succinyl-transferring)	GO:0006091	Geração de metabólitos precursores e energia	Atividade oxidoredutase	Citosol
Q8P560	4	283,28	0,0237	1,52	Aminopeptidase N	GO:0006508	Proteólise	Atividade de hidrolase	-
Q8P530	2	108,37	0,0311	1,86	Aminopeptidase	GO:0006508	Proteólise	Atividade de hidrolase	-
Q8PAB5	3	142,73	0,0080	2,39	DNA ligase	GO:0006260	Replicação do DNA	Atividade ligase	Citosol
Q8PBY4	2	142,85	0,0299	2,67	Lon protease	GO:0006950	Resposta ao estresse	Atividade de hidrolase	Citoplasma
Q7CLU4	2	135,7	0,01887	1,94	30S ribosomal protein S14	GO:0006412	Tradução	Ligação ao RNA	Ribossomo
Q8PC60	3	200,06	0,0242	1,62	Ribosome-binding ATPase YchF	GO:0043022	Tradução	Atividade de hidrolase	Citoplasma
P0A0Y1	10	798,11	0,0353	1,42	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	GO:0006351	Transcrição	Atividade de transferase	Citoplasma
Q8PCJ2	7	532,21	0,0135	1,60	Protein translocase subunit S	GO:0055085	Transporte transmembranar	Atividade de transporte	Membrana plasmática
ID proteínas diminuídas (UniProt)	Peptídeos usados para quantificação	Score	Anova (p)	FC	Descrição	Código GO	Processo biológico/ Função molecular/ Componente celular	Função molecular	Componente celular
Q8P434	2	124,34	0,0096	1,91	PHB domain-containing protein	-	-	-	Membrana plasmática
Q8P8S2	2	126,92	0,0441	1,44	Small conductance mechanosensitive ion channel	GO:0055085	Transporte transmembranar	Atividade de transporte	Membrana plasmática
Q8P4H2	4	213,56	0,0338	2,47	RNA polymerase sigma factor RpoD	GO:0006352	Transcrição	Ligação ao DNA	Citoplasma
Q8P7X7	2	85,15	0,0134	3,41	Type IV secretion system protein	GO:0044097	Secreção pelo sistema de secreção tipo IV	Ligação de ATP	Membrana plasmática

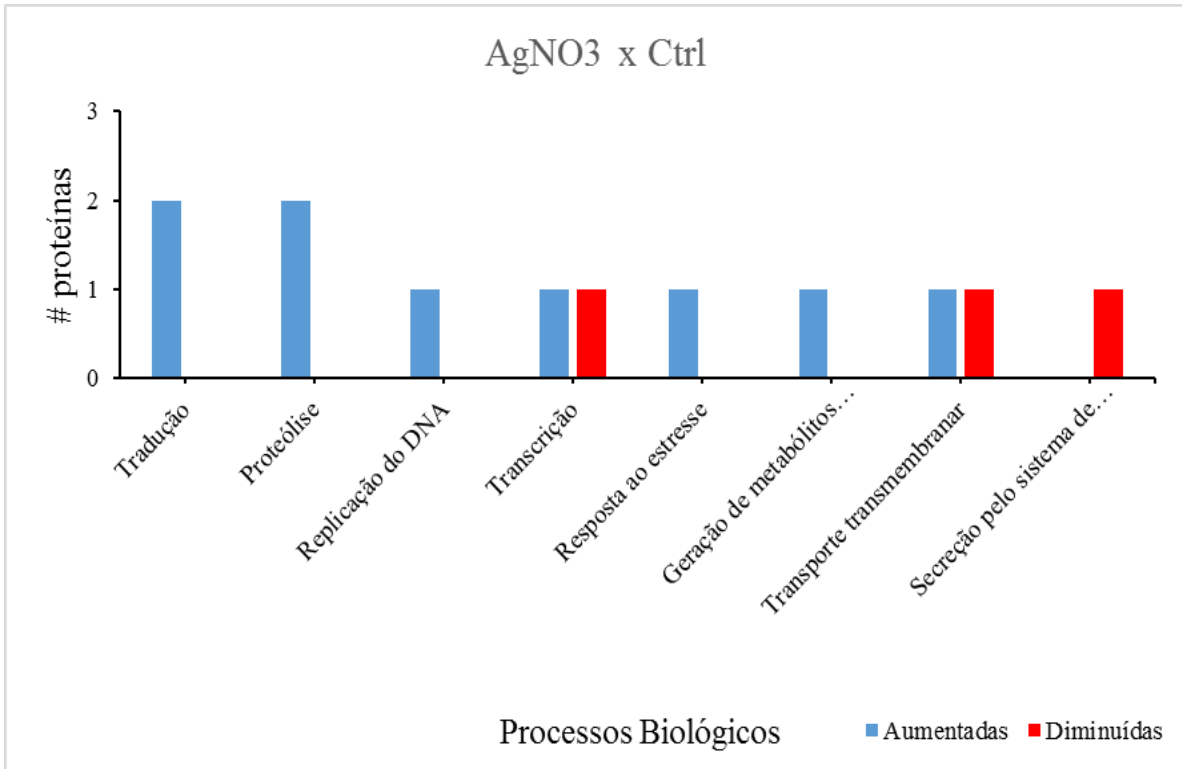


Figura 18. Análise de ontologia gênica. Processos biológicos nos quais estão inseridas as proteínas diferencialmente abundantes no tratamento AgNO₃ quando comparado com a condição controle (Ctrl).

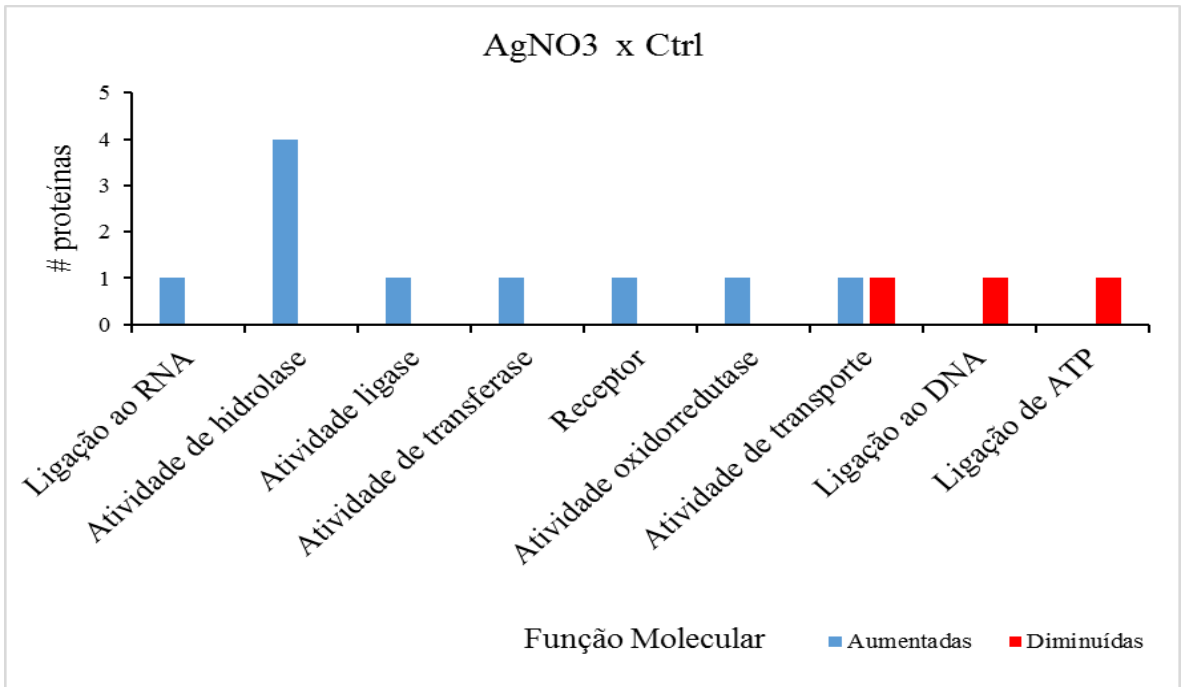


Figura 19. Análise de ontologia gênica. Função Molecular nos quais estão inseridas as proteínas diferencialmente abundantes no tratamento AgNO₃ quando comparado com a condição controle (Ctrl).

Tabela 7. Proteínas diferencialmente abundantes de *X. campestris* pv. *campestris* tratadas com EACFN-AgNPs quando comparadas com AgNO₃.

ID proteínas aumentadas (UniProt)	Peptídeos usados para quantificação	Score	Anova (p)	FC	Descrição	Código GO	Processo biológico	Função molecular	Componente celular
Q8PDB3	3	235,77	0,0028	2,14	Dihidrolipoamide acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	-	-	Atividade de transferase	Citoplasma
Q8P3P4	2	84,33	0,0002	4,08	Nodulation protein	-	-	Atividade de transferase	Citosol
Q8PEG9	4	368,44	0,0081	2,34	Tetratricopeptide repeat protein	-	-	-	-
Q8PEE7	2	106,81	0,0001	4,55	Peptidase inhibitor I78 family protein	-	-	-	-
Q8PD11	2	124,2	0,0180	3,10	DUF4488 domain-containing protein	-	-	-	-
Q8PBL3	2	201,7	0,0005	4,13	ASCH domain-containing protein	-	-	-	-
Q8P7V4	3	150,27	0,0056	4,25	Trm112 family protein	-	-	-	-
Q8P6Z2	2	225,14	0,0107	6,72	Stress-induced protein	-	-	-	-
Q8P6X7	2	118,45	0,0008	7,74	PspA-IM30 family protein	-	-	-	-
Q8P8U4	3	201,03	0,0002	3,06	2-dehydro-3-deoxy-phosphogluconate aldolase	GO:0016829	-	Atividade de liase	-
Q8PC79	3	135,48	0,0068	2,40	Asparaginase	-	-	Atividade de hidrolase	-
Q8PDU1	4	332,66	0,0007	2,19	Biotin carboxylase	-	-	Atividade ligase	-
Q8PAY5	3	159,62	0,0405	2,87	DUF2147 domain-containing protein	-	-	-	-
Q8PCS3	5	343,19	0,0024	4,82	DUF4124 domain-containing protein	-	-	Ligação ao DNA	-
Q8PCB9	3	263,35	0,0004	4,80	Glucose-fructose oxidoreductase	-	-	Ligação de nucleotídeos	-

Q8P5H3	2	200,13	5,66E-05	3,24	Glutaredoxin-like protein	-	-	Atividade oxidorrredutase	-
Q8PBW5	2	119,79	0,0035	4,77	Nucleoid-associated protein XCC1002	-	-	Ligação ao DNA	Citosol
Q8PDX9	7	538,41	0,0026	1,61	OMP_b-brl domain-containing protein	-	-	-	-
Q8P4V1	2	142,23	0,0155	3,93	Putative NADH dehydrogenase/NAD(P)H nitroreductase XCC3605	-	-	Atividade oxidorrredutase	-
Q8PCQ8	3	215,75	0,0379	2,00	Thiol:disulfide interchange protein	-	-	Atividade de isomerase	Espaço periplásmico
Q8PE12	2	134,44	0,0030	2,65	Tetratricopeptide repeat protein	-	-	-	-
Q8PDR3	2	154,07	0,0198	2,65	Methyltransferase	-	-	-	-
Q8PDR1	2	81,27	0,0156	8,91	Transmembrane protein	-	-	-	Componente integral da membrana
Q8PBJ7	2	137,11	0,0066	3,38	DUF955 domain-containing protein	-	-	-	-
Q8P858	4	299,34	0,0028	3,03	Secreted protein	-	-	-	-
Q8P4Y0	2	125,68	0,0217	5,49	Transmembrane protein	-	-	-	-
Q8P4S5	2	204,45	0,0059	2,66	UPF0234 protein XCC3632	-	-	Ligação de nucleotídeos	Citosol
Q8PD23	9	664,31	0,0007	5,41	Chaperonin GroEL	GO:0006457	Dobramento de proteínas	Chaperona de dobramento de proteínas	Citosol
Q8P8F5	3	138,74	0,0036	2,71	Major cold shock protein	GO:0010468	Expressão gênica	Ligação de ácido nucleico	Citosol
Q8P8I6	2	282,06	0,0002	3,76	RNA polymerase-binding transcription factor DksA	GO:0010467	Expressão gênica	Ligação a ions metálicos	Citoplasma
Q8P611	2	131,1	0,0261	1,24	Multifunctional fusion protein	GO:0016310	Fosforilação	Atividade gtpase	-
Q8P3Y6	2	85,46	0,0414	1,83	Thymidylate kinase	GO:0016310	Fosforilação	Atividade de transferase	Citoplasma
P59009	2	168,24	0,0174	7,07	Uridylate kinase	GO:0016310	Fosforilação	Atividade de transferase	Citosol
Q8P5V0	3	146,18	0,0097	2,20	Citrate synthase	GO:0006091	Geração de metabólitos precursores e energia	Atividade de transferase	Citoplasma

Q8PC25	5	427,63	0,0002	5,12	Malate dehydrogenase	GO:0006091	Geração de metabólitos precursores e energia	Atividade oxidorreductase	-
Q8P7T3	3	136,87	0,0014	19,64	NADH-quinone oxidoreductase subunit B	GO:0006091	Geração de metabólitos precursores e energia	Atividade oxidorreductase	Membrana plasmática
Q8P5Z6	2	56,85	0,0008	7,69	Pyruvate kinase	GO:0006091	Geração de metabólitos precursores e energia	Atividade de transferase	Citoplasma
Q8P8V5	3	147,75	0,0013	2,60	Succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit	GO:0006091	Geração de metabólitos precursores e energia	Atividade oxidorreductase	-
Q8PDE5	3	131,48	0,0015	8,27	TonB-dependent receptor	GO:0055065	Homeostase de íons metálicos	atividade do transdutor molecular	Estrutura de encapsulamento externa
Q8P8Z9	3	180,19	0,0241	2,95	Fe/S biogenesis protein NfuA	GO:0051604	Maturação de proteínas	Ligação a ions metálicos	-
Q8P7N5	4	163,41	0,0042	2,24	Metallopeptidase	GO:0051604	Maturação de proteínas	Atividade de hidrolase	Membrana plasmática
Q8P7A3	4	169,06	9,10E-05	3,27	Metallopeptidase	GO:0051604	Maturação de proteínas	Atividade de hidrolase	Membrana plasmática
Q8PAI1	6	350,47	0,0019	5,33	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	GO:0042026	Maturação de proteínas	Atividade de isomerase	-
Q8PDT0	3	200,38	0,0018	3,05	Nuclease	GO:0006308	Processo catabólico do DNA	Ligação ao DNA	-
Q8P9N4	4	200,83	8,59E-05	9,56	Acireductone dioxygenase	GO:0006520	Processo metabólico de aminoácidos	Atividade oxidorreductase	-
Q8PDZ8	3	287,53	0,0020	2,35	Glutamine synthetase	GO:0006520	Processo metabólico de aminoácidos	Atividade ligase	Citoplasma
Q8PD70	2	94,68	0,0119	1,61	Indole-3-glycerol phosphate synthase	GO:0006520	Processo metabólico de aminoácidos	Atividade de isomerase	-
Q8PBD0	2	46,8	0,0064	5,13	Aldose 1-epimerase	GO:0005975	Processo metabólico de carboidratos	Atividade de isomerase	Citoplasma
Q8P5D0	2	128,76	0,0118	3,12	Glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase	GO:1901135	Processo metabólico de carboidratos	Atividade de transferase	-
Q8PD48	2	163,46	0,0001	1,60	Phosphoribosylamine--glycine ligase	GO:1901135	Processo metabólico de carboidratos	Atividade ligase	-
Q8PE30	2	117,93	0,0090	3,66	Sugar-phosphate isomerase	GO:0005975	Processo metabólico de carboidratos	Atividade de isomerase	-
Q8PBU8	3	341,3	0,0001	3,88	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase 2	GO:0006629	Processo metabólico lipídico	Atividade de transferase	Citosol
Q8PBG4	2	202,07	0,0063	4,16	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl	GO:0006629	Processo metabólico lipídico	Atividade oxidorreductase	-

					diphosphate reductase				
Q8PBT6	2	129,88	0,0006	1,44	Aconitate hydratase 1	GO:0006629	Processo metabólico lipídico	Atividade de liase	Citosol
Q8P8G4	3	211,09	0,0090	2,91	Inositol-1-monophosphatase	GO:0006629	Processo metabólico lipídico	Atividade de hidrolase	-
Q8PE24	2	71	0,0067	2,63	PNPLA domain-containing protein	GO:0016042	Processo metabólico lipídico	Atividade de hidrolase	-
Q8P614	1	115,59	0,0009	3,01	Aminopeptidase	GO:0006508	Proteólise	Atividade de hidrolase	Citoplasma
Q8PBY6	2	92,48	0,0024	3,42	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	GO:0006508	Proteólise	Atividade de hidrolase	Citoplasma
Q8PEF9	5	268	0,0132	1,77	Carboxyl-terminal protease	GO:0006508	Proteólise	Atividade de hidrolase	Espaço periplásmico
Q8P3Q3	2	80,94	0,0016	4,40	Dipeptidyl-peptidase	GO:0006508	Proteólise	Atividade de hidrolase	-
Q8P732	1	167,28	0,0049	120,32	Succinyl-diaminopimelate desuccinylase	GO:0006508	Proteólise	Atividade de hidrolase	-
Q8P8D3	2	208,45	0,0240	4,27	Virulence regulator	GO:0006355	Regulação da transcrição modelada por DNA	Atividade da molécula estrutural	Cromossomo
Q8P7K0	2	83,72	0,0092	4,31	Outer membrane protein	GO:0006974	Resposta celular ao estímulo de dano ao DNA	Atividade de transporte	Membrama externa da célula
Q8PCV7	5	255,93	0,0066	4,03	Outer membrane protein	GO:0006974	Resposta celular ao estímulo de dano ao DNA	Atividade de transporte	Membrama externa da célula
Q8PBS0	2	123,28	0,0149	2,60	Regulatory protein-PilH family	GO:0023052	Sinalização	-	-
Q8PBD5	3	166,98	0,0084	2,56	Two-component system regulatory protein	GO:0023052	Sinalização	-	-
Q8PAC1	3	329,64	0,0001	4,56	30S ribosomal protein S18	GO:0006412	Tradução	Ligação ao RNA	Ribossomo
Q8PC36	2	150,02	0,0013	11,54	50S ribosomal protein L18	GO:0006412	Tradução	Ligação ao RNA	Ribossomo
Q8PC57	4	229,05	0,0125	2,49	50S ribosomal protein L7/L12 1	GO:0006412	Tradução	Ligação ao RNA	Ribossomo
Q8PAC0	2	206,59	0,0131	2,40	50S ribosomal protein L9	GO:0006412	Tradução	Ligação ao RNA	Ribossomo
Q8P9M3	2	146,19	0,0170	3,64	Elongation factor P-like protein	GO:0006412	Tradução	Atividade reguladora de tradução	Citoplasma
POC7M0	4	229,92	0,0075	3,04	Biopolymer transport protein	GO:0055085	Transporte transmembranar	Atividade de transporte	Componente integral da membrana

exbD1 1									
ID proteínas diminuídas (UniProt)	Peptídeos usados para quantificação	Score	Anova (p)	FC	Descrição	Código GO	Processo biológico	Função molecular	Componente celular
Q8P7U1	2	217,8	0,0008	4,21	NADH-quinone oxidoreductase subunit J	GO:0055085	Transporte transmembranar	Atividade de transporte	Membrana plasmática
Q8P7U3	2	134,87	0,0471	2,11	NADH-quinone oxidoreductase subunit M	GO:0055085	Transporte transmembranar	Atividade de transporte	Membrana plasmática
Q8P7Y1	2	65,48	0,0255	1,84	VirB4 protein	GO:0065002	Virulência	Ligação de ATP	-
Q8PE05	2	140,2	0,0121	2,27	4HBT domain-containing protein	-	-	Atividade de hidrolase	Citosol
Q8P3D6	3	209,69	0,0153	2,55	Acid phosphatase	-	-	-	Membrana externa da célula
Q8PEF1	5	504,54	8,32E-05	3,02	Alcohol dehydrogenase	-	-	Atividade oxidoreductase	-
Q8P8B4	2	121,75	0,0036	4,37	ATP-binding protein	-	-	Ligação de ATP	Citosol
Q8PB11	3	190,61	0,0041	3,33	GTN reductase	-	-	Atividade oxidoreductase	-
Q8P5V8	4	264,37	0,0145	3,23	Methanol dehydrogenase regulatory protein	-	-	Atividade de hidrolase	-
Q8P4Y5	2	141,9	0,0001	2,34	Oxidoreductase	-	-	Atividade oxidoreductase	-
Q8P9K7	2	166,09	0,0011	1,85	Peptide chain release factor 2	-	-	Atividade reguladora de tradução	Citoplasma
Q8PBY3	5	334,88	0,0012	1,53	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	-	-	Atividade de isomerase	Membrana plasmática
Q8PAG7	2	79,87	0,0035	2,18	Ribonuclease R	-	-	Atividade de hidrolase	Citosol
Q8PCU5	2	124,24	0,0262	2,73	UDP-glucose 4-epimerase	-	-	-	-
Q8PDG2	3	153,78	0,0014	5,42	DUF2490 domain-containing protein	-	-	-	-
Q8PCN0	2	127,16	0,0462	5,31	OMP_b-brl domain-containing protein	-	-	-	-
Q8PBJ0	14	1156,29	0,0139	2,06	Polyketide cyclase	-	-	-	-

Q8PA03	4	246,84	0,0003	7,60	Pit accessory protein	-	-	-	-
Q8P7H9	4	237,28	0,0034	3,38	DUF885 domain-containing protein	-	-	-	-
Q8P3B3	3	172,1	0,01867	2,75	ATP-binding protein	-	-	-	-
Q8P5S6	2	289,98	0,0135	2,04	UPF0149 protein XCC3260	-	-	-	-
Q8P979	5	425,48	0,0007	4,97	GTPase Der	GO:0042254	Biogênese do ribossomo	Ligação ao Ribossomo	-
Q8PB51	3	179,73	0,0020	3,09	GTPase Era	GO:0042254	Biogênese do ribossomo	Ligação ao RNA	.Citosol
Q8PCK7	2	115,39	0,0100	7,57	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase H	GO:0042254	Biogênese do ribossomo	Atividade de transferase	-
Q8P994	2	150,2	0,0003	4,38	Thioredoxin reductase	GO:0098754	Desintoxicação	Atividade antioxidante	Citoplasma
Q7CLU9	2	108,61	0,0027	3,01	Cell division protein FtsA	GO:0051301	Divisão celular	-	Membrana plasmática
Q8PAB7	2	106,18	0,0448	2,06	Cell division protein ZipA	GO:0051301	Divisão celular	-	Membrana plasmática
Q8P9Y4	2	86,37	0,0036	2,18	Lipoprotein	GO:0051301	Divisão celular	Atividade de hidrolase	Membrana externa da célula
Q8P6F3	2	102,3	0,0001	5,41	Peptidoglycan-associated protein	GO:0051301	Divisão celular	-	Membrana externa da célula
Q8P5E4	2	195,89	0,0166	3,62	Probable GTP-binding protein EngB 1	GO:0051301	Divisão celular	Ligação de GTP	Citosol
Q8P8P4	2	195,76	0,0113	3,49	Cytidylate kinase	GO:0016310	Fosforilação	Atividade de transferase	Citosol
Q8PAH4	3	219,8	0,0006	3,39	Fructokinase	GO:0016310	Fosforilação	Atividade de transferase	-
Q8PAJ7	6	535,12	8,93E-05	3,19	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex	GO:0006091	Geração de metabólitos precursores e energia	Atividade de transferase	Citosol
Q8PAR2	7	498,67	0,0200	2,77	Fumarate hydratase class I	GO:0006091	Geração de metabólitos precursores e energia	Atividade de liase	-
Q8PBY9	4	356,21	0,0104	2,59	Isocitrate dehydrogenase	GO:0015980	Geração de metabólitos precursores e energia	Atividade oxidorreductase	-
Q8P7T8	3	299,3	0,0002	4,16	NADH-quinone oxidoreductase	GO:0015980	Geração de metabólitos precursores e energia	Atividade oxidorreductase	Membrana plasmática
Q8P7U0	2	79,06	0,0163	13,94	NADH-quinone oxidoreductase	GO:0015980	Geração de metabólitos precursores e energia	Atividade oxidorreductase	Membrana plasmática

subunit I									
Q8PCG6	12	764,33	0,0022	1,68	Outer membrane hemin receptor	GO:0055072	Homeostase de íons metálicos	Atividade de transporte	Membrana externa da célula
Q8P6U8	15	1100,74	0,0053	3,17	TonB-dependent receptor	GO:0055065	Homeostase de íons metálicos	atividade do transdutor molecular	Estrutura de encapsulamento externa
Q8P5M2	29	1772,77	0,0096	1,63	TonB-dependent receptor	GO:0055065	Homeostase de íons metálicos	atividade do transdutor molecular	Estrutura de encapsulamento externa
Q8P5D6	2	77,32	0,0149	7,39	TonB-dependent receptor	GO:0055065	Homeostase de íons metálicos	atividade do transdutor molecular	Estrutura de encapsulamento externa
Q8P5I3	34	2744,45	7,89E-06	15,05	TonB-dependent receptor	GO:0055065	Homeostase de íons metálicos	atividade do transdutor molecular	Estrutura de encapsulamento externa
Q8P4F3	4	186,5	0,0055	1,70	DNA topoisomerase I	GO:0006265	Mudança topológica do DNA	Ligação ao DNA	Citoplasma
Q8P338	4	266,34	0,0212	1,49	Membrane protein insertase YidC	GO:0061024	Organização de membrana	Atividade de transporte	Membrana plasmática
Q8PAW1	6	582,33	0,0097	3,14	Outer membrane protein assembly factor BamA	GO:0061024	Organização de membrana	-	Estrutura de encapsulamento externa
Q8P980	5	267,78	0,0260	1,81	Outer membrane protein assembly factor BamB	GO:0061024	Organização de membrana	-	Estrutura de encapsulamento externa
Q8P681	5	333,43	0,0088	3,12	Outer membrane protein assembly factor BamD	GO:0061024	Organização de membrana	-	Estrutura de encapsulamento externa
Q8PD56	3	252,1	0,0037	4,49	NAD(+) diphosphatase	GO:0019677	Processo catabólico	Atividade de hidrolase	-
Q8P5L1	3	198,09	0,0349	2,12	3-isopropylmalate dehydrogenase	GO:0006520	Processo metabólico de aminoácidos	Atividade oxidoreductase	Citosol
Q8P5Q4	3	153,11	0,0057	2,54	Acetylornithine aminotransferase	GO:0006520	Processo metabólico de aminoácidos	Atividade de transferase	Citoplasma
Q8PAT8	2	106,37	0,0002	3,44	Asparagine synthase B	GO:0006520	Processo metabólico de aminoácidos	Atividade de ligase	Citosol
Q8P6E0	5	350,55	0,0101	2,07	Aspartate--tRNA ligase	GO:0006520	Processo metabólico de aminoácidos	Atividade de ligase	Citoplasma
Q8P9Z6	2	199,93	0,0098	4,18	CTP synthase	GO:0006520	Processo metabólico de aminoácidos	Atividade de ligase	Citosol
Q8PAB2	3	227,16	0,0062	2,61	Methylthioribose-1-phosphate isomerase	GO:0006520	Processo metabólico de aminoácidos	Atividade de isomerase	-

Q8PCR7	6	493,44	0,0149	2,44	Valine--tRNA ligase	GO:0006520	Processo metabólico de aminoácidos	Atividade de hidrolase	Citosol
Q8P744	2	125,58	0,0097	2,49	Acetyltransferase	GO:0005975	Processo metabólico de carboidratos	Atividade de transferase	Citoplasma
Q8PBR6	2	93,15	0,0472	2,71	Adenylosuccinate synthetase	GO:1901137	Processo metabólico de carboidratos	Atividade de ligase	Citoplasma
Q8P5G9	3	211,02	0,0179	1,91	Amidohydro-rel domain-containing protein 1	GO:1901136	Processo metabólico de carboidratos	Atividade de hidrolase	-
Q8PE85	4	214,27	0,0008	3,90	Fructose-1,6-bisphosphatase class 1	GO:0005975	Processo metabólico de carboidratos	Atividade de hidrolase	Citoplasma
Q8P8U7	3	201,21	0,0006	6,28	Glucokinase	GO:0016052	Processo metabólico de carboidratos	Atividade de transferase	Citosol
Q8P8U5	2	90,8	0,0154	1,80	Phosphogluconate dehydratase	GO:0019752	Processo metabólico de carboidratos	Atividade de liase	Citosol
Q8PCA4	3	251,51	0,0186	1,69	Transaldolase	GO:0005975	Processo metabólico de carboidratos	Atividade de transferase	Citosol
Q8P7R8	6	402,98	0,0005	3,33	Tryptophan synthase beta chain	GO:0006520	Processo metabólico de carboidratos	Atividade de liase	Citoplasma
Q8PCK3	3	178,98	0,0142	3,39	UDP-N-acetylmuramoyl-tripeptide--D-alanyl-D-alanine ligase	GO:1901137	Processo metabólico de carboidratos	Atividade de ligase	Citoplasma
P0C7J3	7	564,96	0,0027	1,82	Xanthan biosynthesis protein XanB	GO:0005975	Processo metabólico de carboidratos	Atividade de transferase	-
Q8PCH3	4	265,49	0,0085	2,64	S-adenosylmethionine synthase	GO:0006730	Processo metabólico de carbono	Atividade de transferase	Citosol
Q8P9T2	5	332,03	0,0005	3,00	Poly(A) polymerase I	GO:0016071	Processo metabólico de mRNA	Ligação ao RNA	Citoplasma
Q8PAD8	2	94,52	0,0034	3,64	5'-nucleotidase	GO:0009117	Processo metabólico de nucleotídeos	Atividade de hidrolase	Citoplasma
Q8P986	7	423,26	0,0030	2,27	3-hydroxyacyl-CoA	GO:0009062	Processo metabólico lipídico	Atividade oxidoreductase	-
Q8PBV1	2	173,87	0,0063	4,34	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase 3	GO:0006629	Processo metabólico lipídico	Atividade de transferase	Citoplasma
Q8PAW9	2	126,08	0,0097	2,82	Acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subunit alpha	GO:0006629	Processo metabólico lipídico	Atividade de transferase	Citoplasma
Q8PD30	4	326,69	0,0164	1,98	Biotin carboxylase	GO:0044255	Processo metabólico lipídico	Atividade de ligase	-

Q8PBT7	3	283,7	0,0396	2,10	Citrate synthase	GO:0006629	Processo metabólico lipídico	Atividade de transferase	Citoplasma
Q8PE66	5	325,65	0,0108	2,00	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH]	GO:0006629	Processo metabólico lipídico	Atividade oxidorreductase	-
P0C7J4	3	279,14	0,0085	3,61	Glucose-1-phosphate thymidyltransferase	GO:0006629	Processo metabólico lipídico	Atividade de transferase	-
P0C7I8	3	188,4	0,0130	1,71	Succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase subunit B	GO:0008610	Processo metabólico lipídico	Atividade de transferase	-
Q8PAW3	2	199,56	0,0146	4,20	UDP-3-O-acylglucosamine N-acyltransferase	GO:0009245	Processo metabólico lipídico	Atividade de transferase	-
Q8PBT3	2	127,97	0,0210	1,51	2-methylaconitate cis-trans isomerase PrpF	GO:0009245	Processo metabólico lipídico	Atividade de isomerase	-
Q8P9X0	5	417,63	0,0240	1,68	Alanine--tRNA ligase	GO:0006399	Processo metabólico tRNA	Atividade de ligase	Citosol
Q8P455	4	236,33	0,0003	3,03	Arginine--tRNA ligase	GO:0006399	Processo metabólico tRNA	Atividade de ligase	Citoplasma
Q8P3I5	2	124,31	0,0051	2,71	Glycine--tRNA ligase beta subunit	GO:0006399	Processo metabólico tRNA	Atividade de ligase	Citosol
Q8P9P5	4	207,9	0,0005	4,85	Histidine--tRNA ligase	GO:0006399	Processo metabólico tRNA	Atividade de ligase	.Citosol
Q8PBG6	6	430,18	0,0282	6,37	Isoleucine--tRNA ligase	GO:0006399	Processo metabólico tRNA	Atividade de ligase	.Citosol
Q9L3G6	3	209,86	0,0033	2,85	Lysine--tRNA ligase 1	GO:0006399	Processo metabólico tRNA	Atividade de ligase	Citosol
Q8P7Z2	4	205,22	0,0040	1,54	Threonine--tRNA ligase	GO:0006399	Processo metabólico tRNA	Ligação ao RNA	Citosol
Q8PBC1	2	77,12	0,0191	2,02	tRNA (guanine-N(1)-)-methyltransferase	GO:0006399	Processo metabólico tRNA	Atividade de transferase	Citosol
Q8P552	7	407,09	0,0137	2,59	ATP-dependent protease ATPase subunit HslU	GO:0006508	Proteólise	Atividade de hidrolase	Citosol
Q8P551	3	138,56	0,0142	2,80	ATP-dependent protease subunit HslV	GO:0006508	Proteólise	Atividade de hidrolase	Citosol
Q8PCW1	3	130,23	0,0052	1,99	ATP-dependent RNA helicase	GO:0006508	Proteólise	Atividade de hidrolase	Citosol
Q8PA00	2	113,9	0,0063	2,58	Carboxypeptidase-related protein	GO:0006508	Proteólise	Atividade de hidrolase	-

Q8P7K7	2	134,6	0,0091	3,53	PmbA protein	GO:0006508	Proteólise	Atividade de hidrolase	Citosol
Q8P7K5	2	140,88	0,0030	6,93	TldD protein	GO:0006508	Proteólise	Atividade de hidrolase	Citosol
Q8P3P3	4	240,82	0,0105	2,37	DNA helicase	GO:0006281	Reparo do DNA	Ligação ao DNA	Citosol
Q8PEH5	2	146,77	2,59E-05	3,64	Chromosomal replication initiator protein DnaA	GO:0006260	Replicação do DNA	Ligação ao DNA	Citoplasma
Q8PAB1	7	335,13	0,0069	2,05	DNA gyrase subunit A	GO:0006260	Replicação do DNA	Ligação ao DNA	Citoplasma
Q8PEH2	2	150,11	0,0184	2,19	DNA gyrase subunit B	GO:0006260	Replicação do DNA	Ligação ao DNA	Citoplasma
Q8PBW6	2	129	0,0207	5,13	DNA polymerase III subunit gamma/tau	GO:0006260	Replicação do DNA	Ligação ao DNA	-
Q8PCA1	2	76,28	0,0023	7,99	Alkyl hydroperoxide reductase subunit F	GO:0000302	Resposta a espécies reativas de oxigênio	Atividade antioxidante	Citosol
Q8P7C8	2	136,85	0,0001	2,01	Multidrug resistance protein	GO:0046677	Resposta ao antibiótico	Atividade de transporte	Membrana plasmática
Q8PAK8	2	158,29	0,0044	2,50	Chaperone protein DnaJ	GO:0006950	Resposta ao estresse	Ligação proteica de choque térmico	-
Q8P8Q8	2	157,95	0,0006	1,67	Methyl-accepting chemotaxis protein	GO:0023052	Sinalização	-	Membrana plasmática
Q9Z3F0	3	287,97	0,0162	8,19	30S ribosomal protein S13	GO:0006412	Tradução	Ligação ao RNA	Ribossomo
Q8PC41	2	96,5	0,0063	3,24	30S ribosomal protein S17	GO:0006412	Tradução	Ligação ao RNA	Ribossomo
Q8PC38	5	349,86	0,0043	2,81	30S ribosomal protein S8	GO:0006412	Tradução	Ligação ao RNA	Ribossomo
Q8RTJ4	8	468,61	0,0259	1,72	50S ribosomal protein L1	GO:0006412	Tradução	Ligação ao RNA	Ribossomo
Q8RTJ5	5	379,61	0,0371	3,19	50S ribosomal protein L11	GO:0006412	Tradução	Ligação ao RNA	Ribossomo
Q7CLV7	5	476,03	0,0349	2,50	50S ribosomal protein L13	GO:0006412	Tradução	Ligação ao RNA	Ribossomo
Q7CLU5	8	687,5	0,0085	1,88	50S ribosomal protein L14	GO:0006412	Tradução	Ligação ao RNA	Ribossomo
Q8PC43	4	279,31	0,0023	3,73	50S ribosomal protein L16	GO:0006412	Tradução	Ligação ao RNA	Ribossomo
Q8PBC0	3	244,73	0,0411	2,31	50S ribosomal protein L19	GO:0006412	Tradução	Ligação ao RNA	Ribossomo
Q8P7Z4	5	297,31	0,0076	2,54	50S ribosomal protein L20	GO:0006412	Tradução	Ligação ao RNA	Ribossomo

Q8PBH2	7	638,7	0,0001	3,77	50S ribosomal protein L21	GO:0006412	Tradução	Ligação ao RNA	Ribossomo
Q7CLU6	2	200,17	0,0038	8,09	50S ribosomal protein L22	GO:0006412	Tradução	Ligação ao RNA	Ribossomo
Q8PBH1	2	201,49	0,0014	2,67	50S ribosomal protein L27	GO:0006412	Tradução	Ligação ao RNA	Ribossomo
Q8PC48	5	545,29	0,0094	7,96	50S ribosomal protein L4	GO:0006412	Tradução	Ligação ao RNA	Ribossomo
Q8PC37	5	273,71	0,0071	2,33	50S ribosomal protein L6	GO:0006412	Tradução	Ligação ao RNA	Ribossomo
Q8PB55	4	213,14	0,0074	2,91	Elongation factor 4	GO:0006412	Tradução	Atividade reguladora de tradução	Citoplasma
Q8PC59	29	2864,1	0,0004	2,96	Elongation factor Tu-A	GO:0006412	Tradução	Atividade reguladora de tradução	Citoplasma
Q8PC27	5	482,2	0,0369	2,79	GTP-binding elongation factor protein	GO:0006412	Tradução	Atividade reguladora de tradução	Citoplasma
Q8P7J6	2	117,62	0,0310	2,81	Ribosomal silencing factor RsfS	GO:0006412	Tradução	Ligação ao Ribossomo	Citoplasma
Q8P4D2	6	300,39	9,44E-05	3,52	Transcription termination factor Rho	GO:0010467	Transcrição	Ligação ao RNA	Citosol
H9L4N0	3	275,45	5,85E-05	4,54	Transcription termination/antitermination protein NusG	GO:0010467	Transcrição	Ligação ao RNA	Citosol
Q8PAI4	2	126,65	0,0039	1,67	ABC transporter ATP-binding protein	GO:0055085	Transporte transmembranar	Atividade de transporte	-
Q8P747	3	226,57	0,0077	4,09	ABC transporter ATP-binding protein	GO:0055085	Transporte transmembranar	Atividade de transporte	-
Q8PCZ6	3	155,25	0,0113	1,35	ATP synthase gamma chain	GO:0055085	Transporte transmembranar	Atividade de transporte	Membrana plasmática
Q8P6C0	4	381,73	0,0019	2,78	Citrate-dependent iron transporter	GO:0055085	Transporte transmembranar	Atividade de transporte	Membrana externa da célula
Q8P7C9	2	129,28	0,0041	2,57	Efflux pump membrane transporter	GO:0055085	Transporte transmembranar	Atividade de transporte	Membrana plasmática
Q8P4C3	2	167,13	0,0212	2,89	Membrane fusion protein	GO:0055085	Transporte transmembranar	Atividade de transporte	Membrana plasmática
Q8P5Y7	2	165,7	0,0050	4,69	Outer membrane protein	GO:0055085	Transporte transmembranar	-	Estrutura de encapsulamento externa

Q8PEG3	4	205,71	0,0056	2,15	Outer membrane protein	GO:0055085	Transporte transmembranar	Atividade de transporte	Membrana externa da célula
Q8PAN7	2	146,56	0,0290	5,57	Outer membrane protein	GO:0055085	Transporte transmembranar	Atividade de transporte	Membrana externa da célula
Q8P870	2	138,02	0,0024	7,88	Protein translocase subunit SecD	GO:0055085	Transporte transmembranar	Atividade de transporte	Membrana plasmática

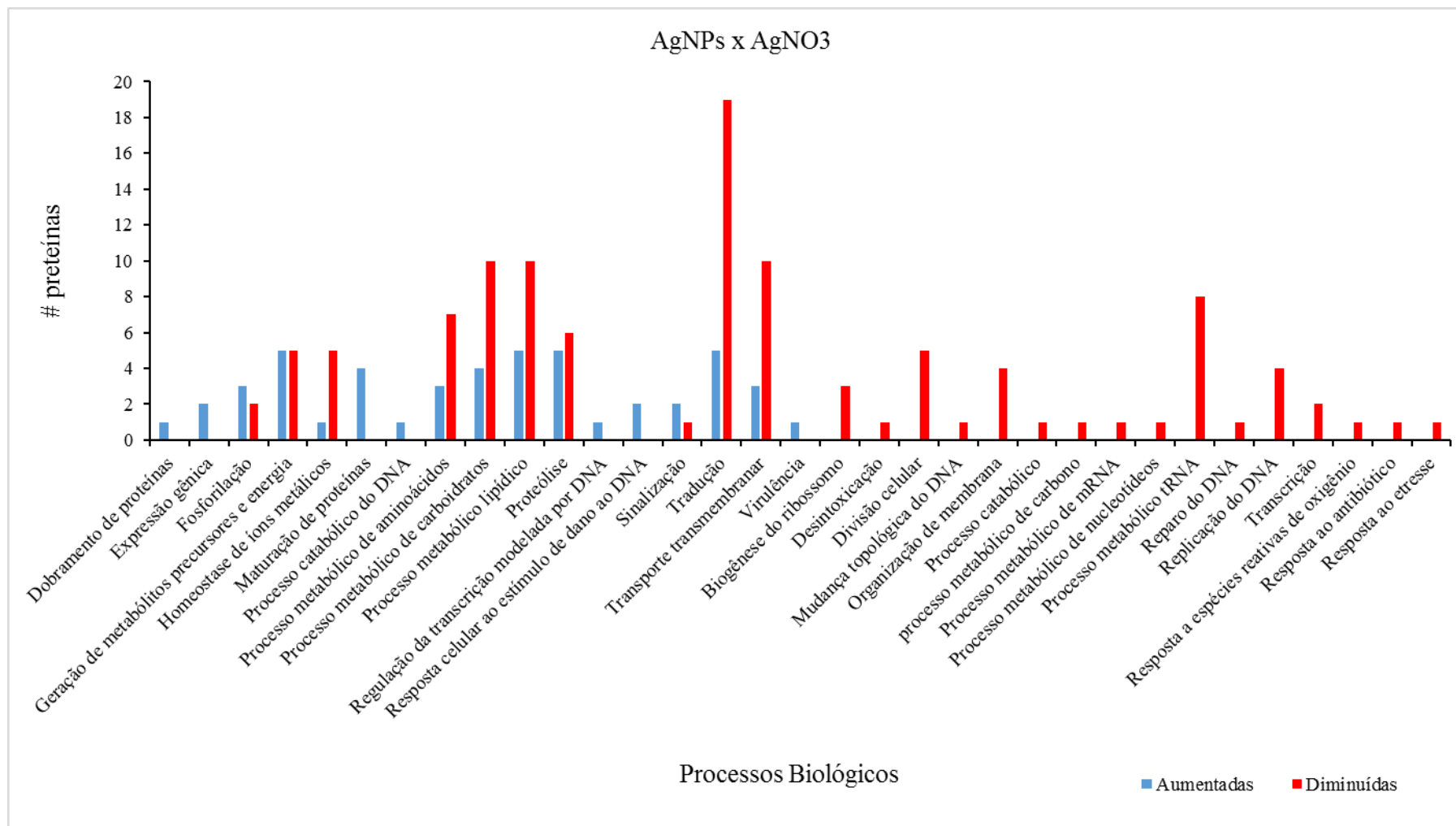


Figura 20. Análise de ontologia gênica. Processos biológicos nos quais estão inseridas as proteínas diferencialmente abundantes do tratamento com AgNPs-EACFN quando comparado com tratamento AgNO₃.

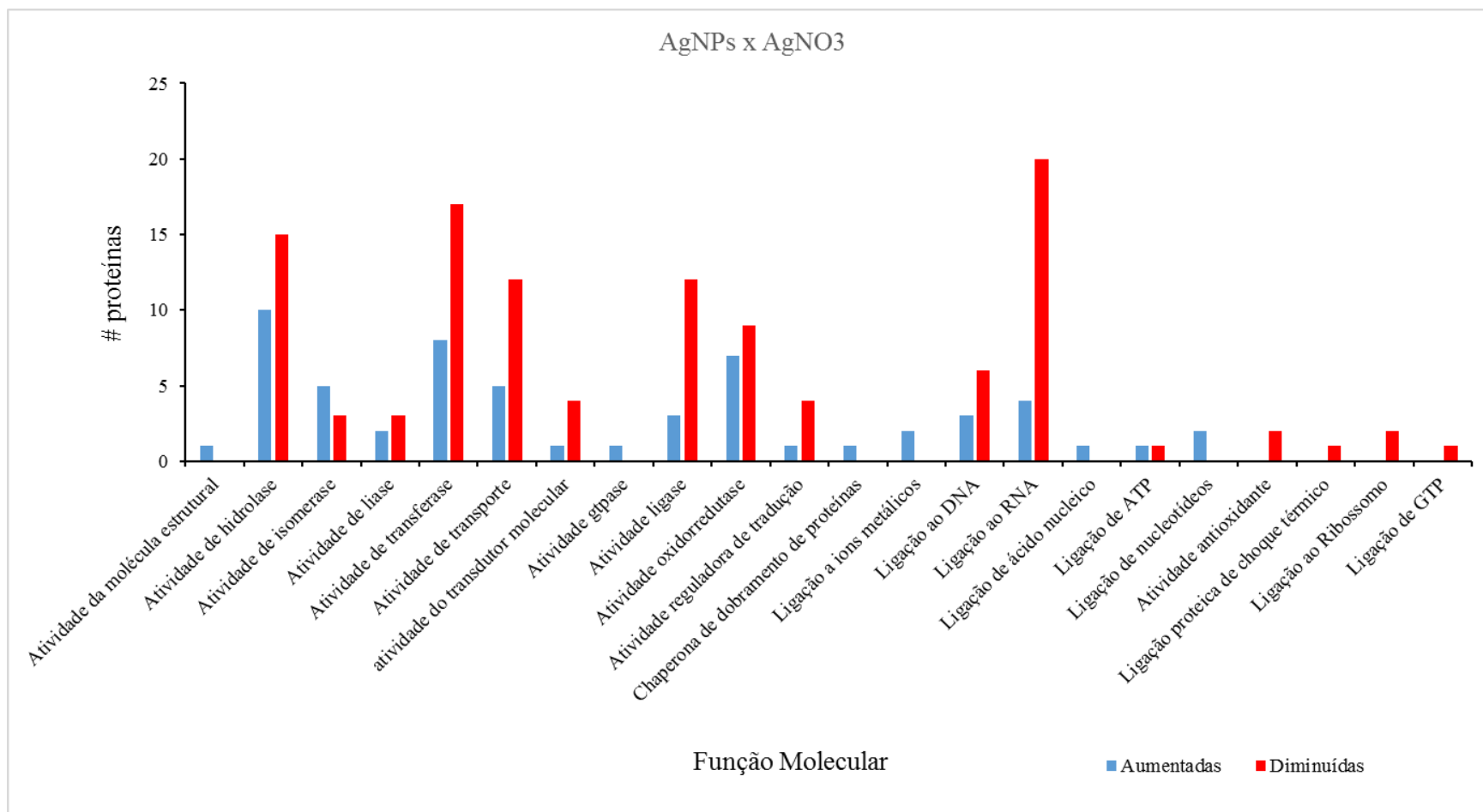


Figura 21. Análise de ontologia gênica. Função Molecular nos quais estão inseridas as proteínas diferencialmente abundantes do tratamento com AgNPs-EACFN quando comparado com tratamento AgNO₃.

Além disso, também foram identificadas duas proteínas aumentadas relacionadas com desintoxicação, como a superoxide dismutase (*Sod*) (Q8PDZ3 e P0C0F8).

A *fpvA* é uma proteína receptora de membrana externa específica (receptor de ferripioverdina) (Ghysels et al., 2004), receptora de ferro que também pode estar envolvida na virulência (Bodilis et al., 2009). Uma outra proteína envolvida na homeostase de íons metálicos é a *OmpA*, principal componente protéico da membrana externa, transportadora de íons metálicos (Ishida et al., 2014, Carnielli et al., 2017). Os sistemas *TonB* de bactérias Gram negativas são sistemas de transporte que realizam a absorção ativa específica de vários compostos através da membrana externa (Postle, 2007). O sistema TonB é particularmente conhecido pela absorção de ferro (Braun & Endriß, 2007). Proteínas de membrana externa (OMPs) desempenham papéis-chave na integridade estrutural da membrana externa e funcionam como transportadores, poros de membrana, proteínas de reconhecimento, enzimas ligadas à membrana ou componentes de cascatas de transdução de sinal (Kostakioti et al., 2005, Bishop, 2008, Koebnik et al., 2000).

Em contra partida, as *Sods* são enzimas antioxidantes que desempenham papéis na resposta ao estresse oxidativo, catalisando a degradação do radical superóxido deletério. As *Sods* são metalo-oxidoredutases que catalisam a dismutação do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Elas geralmente agem em conjunto com catalases que dismutam H_2O_2 em oxigênio e água (Bartosz, 2005). Durante a reação de dismutação o substrato atua alternando como doador e aceptor de elétrons, suportado pelo íon metálico. O aumento da abundância dessas proteínas em *Xcc* tratada com AgNPs-EACFN parece estar relacionado ao dano oxidativo intracelular e, ao aumento da elevação das espécies reativas de oxigênio (EROs) causado pelas AgNPs, o que pode ser atribuído a liberação de íons de prata. A produção de EROs e seu papel na toxicidade e morte celular foram estudados anteriormente (Rai et al., 2012). O excesso de EROs pode levar à

peroxidação lipídica, aumento da permeabilidade da membrana e danos oxidativos ao DNA, RNA e proteínas, eventualmente causando morte bacteriana (Huang et al., 2018, Liao et al., 2019). Essas EROs reagem com diferentes estruturas celulares, como núcleo, proteínas e membranas, prejudicando sua integridade, por isso, a produção excessiva de EROs deve ser controlada pelo sistema antioxidante para evitar danos e a morte celular. Possivelmente o patógeno utiliza essas enzimas antioxidantes para superar o estresse oxidativo, a fim de desintoxicar e adaptar-se a atividade biológica das AgNPs, o que evidencia que essas proteínas sejam candidatas chaves potencialmente envolvidas na adaptação à AgNPs. De acordo com os resultados obtidos nesse estudo é muito provável que o aumento da abundância das proteínas *Sods* seja uma tentativa do microrganismo em minimizar os efeitos oxidativos causados pelas AgNPs. De acordo com Cheloni et al. (2016) o estresse oxidativo é um dos principais contribuintes para alterar a permeabilidade da membrana bacteriana e, portanto, pode danificar as membranas celulares. Além disso, estudos realizados por AshaRani et al. (2009) apontam que estresse oxidativo resultante do aumento da produção de EROs é um dos principais mecanismos de toxicidade induzida por AgNPs em células humanas.

3.3 Proteólise e fosforilação

Geralmente as vias de sinalização em células eucarióticas e procarióticas são divididas em dois modos principais de acordo com as proteínas participantes: irreversível e reversível. Os mecanismos regulatórios desses dois tipos de vias de sinalização celular já foram extensivamente investigados, mas a regulação cruzada entre eles ainda não é totalmente compreendida. Por exemplo, a fosforilação de proteínas catalisada por quinases receptoras é reversível (Hunter, 1995), enquanto que a proteólise é uma cascata de sinalização pós-traducional irreversível que modula a fisiologia celular (Gur et al., 2011, Tomko Jr & Hochstrasser, 2013).

Nesse estudo, foram identificadas duas proteínas aumentadas relacionadas com fosforilação na condição AgNPs × Ctrl como a FMN oxidoreductase (FC: 1,94) e *sugar kinase* (*XCC3471*) (FC: 13,02). A *frp* é uma proteína envolvida em processos de oxido-redução, onde pode trocar um ou dois elétrons em processos de transferência de elétron (Patridge & Ferry, 2006). Nesse contexto, e de acordo com os resultados obtidos nesse estudo é muito provável que as proteínas *FMN oxidoreductase* e *sugar kinase* atuem em cascatas efetivas relacionadas com o estresse, na tentativa de minimizar os danos causados pelas AgNPs. Devido ao alto nível de dobra da proteína *sugar kinase* acumulada em *Xcc* submetida ao contato com AgNPs, é provável que essa proteína seja um candidato chave nos mecanismos de ação das AgNPs e estudos futuros poderão elucidar esse aspecto.

Além de proteínas relacionadas com fosforilação, também foram identificadas nove proteínas aumentadas relacionadas com proteólise na condição AgNPs × Ctrl e AgNPs × AgNO₃, entre elas estão: *ATP-dependent zinc metalloprotease* *FtsH* (FC: 2,35), *Leucine aminopeptidase* (*LAP*) (FC: 3,21), *TldD protein* (FC: 3,74) e *Zinc protease* (FC: 2,82). *FtsH* é uma protease de membrana integral encontrada em bactérias, cloroplastos e mitocôndrias. Em bactérias, o mau funcionamento do *FtsH* causa fenótipos como graves defeitos de divisão celular e parada de crescimento (Begg et al., 1992). *FtsH* é uma metaloprotease de zinco ligada à membrana, dependente de ATP, que está envolvida na degradação proteolítica de proteínas integrais de membrana específicas e proteínas citoplasmáticas. O motivo de ligação ao zinco e um dos motivos de ligação ao ATP são essenciais para a atividade proteolítica (Akiyama et al., 1996). A *LAP*, conhecida como uma importante exopeptidase, hidrolisa especialmente o resíduo de leucina do N-terminal de proteínas ou peptídeos (Drinkwater et al., 2019). *LAP* apresenta um papel importante na virulência e tem sido encontrada na associação com a formação de biofilme bacteriano e patogenicidade (Esoda & Kuehn, 2019, Correa et al., 2017). É possível que essas proteínas atuem na manutenção das funções da

membrana celular e controle do estresse oxidativo, tipicamente causados pela liberação de íons de prata e das características das AgNPs.

3.4 Resposta a antibiótico

Antibióticos afetam vias específicas no metabolismo bacteriano, o que significa que, quando bactérias desenvolvem mecanismos para contornar a via afetada, elas desenvolvem resistência aos antibióticos. Esses mecanismos incluem degradação do antibiótico, redução ou alteração do local alvo, aumento do efluxo para expelir o antibiótico para fora da célula e inibição da síntese de DNA ou proteínas (Walsh, 2003). Nesse estudo, foram identificadas duas proteínas aumentadas relacionadas com resposta ao antibiótico na condição AgNPs × Ctrl: Multidrug resistance protein (FC: 3,28) e PDZ domain-containing protein (FC: 1,94). *Multidrug resistance proteins* são pequenas proteínas de resistência a múltiplas drogas presentes nas membranas que conferem resistência a uma ampla gama de anti-sépticos (Bay & Turner, 2009). A hipótese é de que essas proteínas estejam envolvidas na adaptação à atividade antibacteriana das AgNPs, na tentativa de contornar o efeito antibiótico. Estes resultados demonstram o potencial antibacteriano das AgNPs e podem ser utilizadas no controle de *Xcc* em brássica.

3.5 Organização da parede celular/Biogênese

As AgNPs parecem ser mais tóxicas contra bactérias do que os íons de prata devido à sua grande área de superfície, o que proporciona melhor contato com as células. Com microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia eletrônica de transmissão (MET), e análise proteômica, foi demonstrado que AgNPs interagem com a membrana bacteriana e penetram na célula, o que causa danos estruturais, distúrbios na função celular e culmina em morte celular (Morones et al., 2005, Mirzajani et al., 2014, McShan et al., 2014). O estresse

oxidativo é um dos principais contribuintes na alteração da permeabilidade da membrana bacteriana e, portanto, pode danificar as membranas celulares (Cheloni et al., 2016).

Nesse estudo, foram identificadas três proteínas aumentadas relacionadas com organização da parede celular/biogênese na condição AgNPs × Ctrl como: *Serine-type D-Ala-D-Ala carboxypeptidase 1 (DacA)* (FC: 2,88), *UDP-N-acetylmuramate--L-alanyl-gamma-D-glutamyl-meso-2,6-diaminoheptandioate ligase* (FC: 1,97) e *Penicillin-binding protein activator (PBP)* (FC: 2,70). A expressão da *DacA* está associada à permeabilidade e organização das membranas internas e externas (Pan et al., 2019). Em contrapartida, as *PBPs* desempenham papéis cruciais no estágio final da biossíntese do peptidoglicano (PG) (Lupoli et al., 2014). Possivelmente, essas proteínas sejam essenciais na adaptação dos micorganismos a AgNPs e na organização da parede celular. Portanto, pode-se postular que as estruturas das paredes celulares primárias podem ser afetadas resultado do contato com AgNPs (Mirzajani et al., 2011, Mirzajani et al., 2013). Os resultados obtidos mostram que as AgNPs avaliadas induziram uma resposta rápida no micorganismo, aumentando proteínas essenciais na reestruturação da parede celular.

4. CONCLUSÃO

Neste capítulo foi utilizada proteômica quantitativa, para identificar e quantificar as proteínas envolvidas nos mecanismos de ação de AgNPs em *Xcc*. Foram identificadas centenas de proteínas associadas com diversos processos biológicos como: divisão celular, geração de metabólitos precursores e energia, homeostase de íons metálicos, desintoxicação, organização de membrana, processos metabólicos de aminoácidos, processos metabólicos de carboidratos, processos metabólicos lipídicos, processos metabólicos de tRNA, proteólise, tradução, transporte transmembranar e outros. As análises comparativas possibilitaram um maior entendimento sobre os possíveis mecanismos envolvidos na ação antibacteriana de AgNPs em *Xcc*. Este trabalho mostrou pela primeira vez os perfis proteômicos de *Xcc* submetidas ao contato com AgNPs. Os resultados proteômicos deste estudo sugerem efeito sobre proteínas de membrana e o estresse oxidativo induzido por AgNPs como os principais mecanismos responsáveis pela atividade antimicrobiana. Esses resultados fornecem conhecimentos valiosos para futuras investigações sobre a atividade antibacteriana de AgNPs em bactérias fitopatogênicas. Além disso, demonstram fortemente o potencial biotecnológico das AgNPs na agricultura visando ao controle de bactérias fitopatogênicas em diversas culturas de interesse social e econômico.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A podridão negra das crucíferas é uma doença altamente destrutiva, causada pela bactéria fitopatogênica *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*). A *Xcc* é considerada um dos patógenos mais importantes que incidem na cultura das brássicas. Os sintomas característicos da doença são clorose, lesões nas folhas em forma de "V", partindo das bordas em direção ao centro da folha. Em casos severos podem ocorrer murcha, queda prematura de folhas e apodrecimento das plantas atacadas. As principais formas de controle da doença tem sido a utilização de plantas sadias, tratamento preventivo de sementes com uso de antibióticos e aplicação de agroquímicos à base de cobre. Atualmente não existe um método eficiente para controlar a doença. Neste estudo, foram investigadas formas de controlar a podridão negra das brássicas, além da tentativa de compreender os mecanismos de ação de nanopartículas de prata (AgNPs) sobre este patógeno.

Na primeira etapa deste trabalho, foram utilizados metabólitos concentrados de *R. tropici* (MC-RT) na indução de resposta de defesa em brássica. O tratamento com MC-RT em brássica foi eficiente na indução de resposta de defesa, evidenciando o potencial biotecnológico para o uso de MC-RT na indução de resistência. Os resultados aqui obtidos são consistentes, e forneceram indícios que sugerem que o MC-RT atua como eliciador de respostas ativas de defesa em plantas e apresenta alto potencial biotecnológico para o controle de doenças causadas por fitobactérias. Este estudo foi essencial para compreender o potencial do MC-RT na indução de resposta de defesa em brássica e pode ser útil no controle de *Xanthomonas* spp.

Na segunda etapa deste trabalho, foi realizada a biossíntese de AgNPs utilizando extratos aquosos de diversas plantas em diferentes concentrações e a atividade antibacteriana das AgNPs obtidas foi testada contra *Xcc*. Além disso, foi testado o potencial das AgNPs em induzir resposta de defesa em brássica. Os resultados obtidos demonstraram o potencial das

AgNPs na atividade antibacteriana contra *Xcc*. Além disso, mostraram que plantas de brássica tratadas com AgNPs, induzem resposta de defesa efetiva contra *Xcc* e ativam a expressão de genes relacionados com defesa, o que refletiu em uma redução significativa dos sintomas da doença e também no retardo da progressão da doença. Os resultados obtidos nesta etapa do estudo também demonstraram fortemente o potencial biotecnológico das AgNPs no controle de doenças causadas por fitobactérias. Estudos mais detalhados com AgNPs são necessários para o desenvolvimento de produtos multifuncionais, para o controle de fitobactérias e outros patógenos.

E por fim, na terceira etapa deste estudo foi realizada análise proteômica para compreender os mecanismos de ação de AgNPs em *Xcc*. Os resultados obtidos demonstram indícios dos mecanismos de ação das AgNPs em *Xcc*. No geral, este trabalho contribuiu para um melhor entendimento dos mecanismos de ação de AgNPs em *Xcc*, revelando proteínas que estão presentes em vias que são afetadas durante a interação AgNPs-*Xcc*. As propostas utilizadas neste trabalho estão de acordo com o conceito de sustentabilidade ambiental, equilibrando economia e benefícios ambientais, contribuindo para uma produção agrícola mais sustentável.

PERSPECTIVAS

Visando complementar os resultados obtidos neste trabalho, pretende-se em estudos futuros:

- Realizar ensaios para avaliação quantitativa da expressão de genes modulados por AgNPs em *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.
- Realizar avaliação proteômica para elucidar os mecanismos de ação de AgNPs em *Brassica oleracea*.
- Realizar ensaios para avaliação quantitativa da expressão de genes modulados por AgNPs em *Brassica oleracea*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelmoteleb A, Gonzalez-Mendoza D, Valdez-Salas B, Grimaldo-Juarez O, Ceceña-Duran C, 2018. Inhibition of *Fusarium solani* in transgenic insect-resistant cotton plants treated with silver nanoparticles from *Prosopis glandulosa* and *Pluchea sericea*. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* **28**, 1-5.
- Abdou E, Abd-Alla H, Galal A, 2003. Survey of sesame root rot/wilt disease in Minia and their possible control by ascorbic salicylic acids. *Assiut Journal of Agricultural Sciences (Egypt)*.
- Ahmad N, Sharma S, 2012. Green synthesis of silver nanoparticles using extracts of *Ananas comosus*.
- Ahmad S, Munir S, Zeb N, *et al.*, 2019. Green nanotechnology: a review on green synthesis of silver nanoparticles—an ecofriendly approach. *International journal of nanomedicine* **14**, 5087.
- Ahmed S, Ahmad M, Swami BL, Ikram S, 2016a. A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: a green expertise. *Journal of advanced research* **7**, 17-28.
- Ahmed S, Saifullah, Ahmad M, Swami BL, Ikram S, 2016b. Green synthesis of silver nanoparticles using *Azadirachta indica* aqueous leaf extract. *Journal of radiation research and applied sciences* **9**, 1-7.
- Aires A, Dias CS, Carvalho R, *et al.*, 2011. Correlations between disease severity, glucosinolate profiles and total phenolics and *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* inoculation of different Brassicaceae. *Scientia Horticulturae* **129**, 503-10.
- Akhtar J, Singh B, Kumar AKP, Maurya A, Dubey S, 2017. Interception of pathogens during quarantine processing: An effort towards safe import of oilseed and vegetable Brassicas germplasm in India. *Journal of Oilseed Brassica* **81**, 120-30.
- Akiyama Y, Kihara A, Tokuda H, Ito K, 1996. FtsH (HflB) is an ATP-dependent protease selectively acting on SecY and some other membrane proteins. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 31196-201.
- Alam T, Khan RaA, Ali A, Sher H, Ullah Z, Ali M, 2019. Biogenic synthesis of iron oxide nanoparticles via *Skimmia laureola* and their antibacterial efficacy against bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Materials Science and Engineering: C* **98**, 101-8.
- Alsammarraie FK, Wang W, Zhou P, Mustapha A, Lin M, 2018. Green synthesis of silver nanoparticles using turmeric extracts and investigation of their antibacterial activities. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **171**, 398-405.
- Alvarez AM, 2000. Black rot of crucifers. In. *Mechanisms of resistance to plant diseases*. Springer, 21-52.
- Alves T, D'almeida C, Ferreira M, 2017. Celiac disease and non-celiac gluten sensitivity. *Determination of Gluten Peptides Associated with Celiac Disease by Mass Spectrometry*.
- Arshad M, Frankenberger W, 1991. Microbial production of plant hormones. In. *The rhizosphere and plant growth*. Springer, 327-34.
- Asharani P, Low Kah Mun G, Hande MP, Valiyaveetil S, 2009. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS nano* **3**, 279-90.
- Awwad AM, Salem NM, 2012. Green synthesis of silver nanoparticles by Mulberry Leaves Extract. *Nanoscience and Nanotechnology* **2**, 125-8.

- Baba VY, Powell AF, Ivamoto-Suzuki ST, *et al.*, 2020. Capsidiol-related genes are highly expressed in response to *Colletotrichum scovillei* during *Capsicum annum* fruit development stages. *Scientific reports* **10**, 1-14.
- Baker S, Rakshith D, Kavitha KS, *et al.*, 2013. Plants: emerging as nanofactories towards facile route in synthesis of nanoparticles. *BioImpacts: BI* **3**, 111.
- Bartosz G, 2005. Superoxide dismutases and catalase. *Reactions, Processes*, 109-49.
- Bay DC, Turner RJ, 2009. Diversity and evolution of the small multidrug resistance protein family. *BMC evolutionary biology* **9**, 1-27.
- Begg K, Tomoyasu T, Donachie W, *et al.*, 1992. Escherichia coli mutant Y16 is a double mutant carrying thermosensitive ftsH and ftsI mutations. *Journal of bacteriology* **174**, 2416-7.
- Behravan M, Panahi AH, Naghizadeh A, Ziaee M, Mahdavi R, Mirzapour A, 2019. Facile green synthesis of silver nanoparticles using *Berberis vulgaris* leaf and root aqueous extract and its antibacterial activity. *International journal of biological macromolecules* **124**, 148-54.
- Bishop RE, 2008. Structural biology of membrane-intrinsic β -barrel enzymes: Sentinels of the bacterial outer membrane. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1778**, 1881-96.
- Bodilis J, Ghysels B, Osayande J, *et al.*, 2009. Distribution and evolution of ferripyoverdine receptors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology* **11**, 2123-35.
- Boller T, He SY, 2009. Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science* **324**, 742-4.
- Bostock RM, Pye MF, Roubtsova TV, 2014. Predisposition in plant disease: exploiting the nexus in abiotic and biotic stress perception and response. *Annual review of phytopathology* **52**, 517-49.
- Bottini R, Fulchieri M, Pearce D, Pharis RP, 1989. Identification of gibberellins A1, A3, and iso-A3 in cultures of *Azospirillum lipoferum*. *Plant physiology* **90**, 45-7.
- Braun V, Endriß F, 2007. Energy-coupled outer membrane transport proteins and regulatory proteins. *Biometals* **20**, 219-31.
- Braybrook SA, Stone SL, Park S, *et al.*, 2006. Genes directly regulated by LEAFY COTYLEDON2 provide insight into the control of embryo maturation and somatic embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 3468-73.
- Cao Z, Rosenkranz D, Wu S, *et al.*, 2020. Different classes of small RNAs are essential for head regeneration in the planarian *Dugesia japonica*. *BMC genomics* **21**, 1-11.
- Capelesso D, Da Costa ACT, Júnior JBD, 2019. Nitrogen Fertilization and Inoculation of Seeds with *Rhizobium tropici* on the Agronomic Performance of Common Beans. *Journal of Experimental Agriculture International*, 1-9.
- Carmo LST, Resende RO, Silva LP, Ribeiro SG, Mehta A, 2013. Identification of host proteins modulated by the virulence factor AC 2 of Tomato chlorotic mottle virus in *Nicotiana benthamiana*. *Proteomics* **13**, 1947-60.
- Carnielli CM, Artier J, De Oliveira JCF, Novo-Mansur MTM, 2017. *Xanthomonas citri* subsp. *citri* surface proteome by 2D-DIGE: ferric enterobactin receptor and other outer membrane proteins potentially involved in citric host interaction. *Journal of proteomics* **151**, 251-63.
- Carson L, Bandara S, Joseph M, *et al.*, 2020. Green synthesis of silver nanoparticles with antimicrobial properties using *Phyla dulcis* plant extract. *Foodborne pathogens and disease* **17**, 504-11.
- Celik Altunoglu Y, Unel NM, Baloglu MC, Ulu F, Can TH, Cetinkaya R, 2018. Comparative identification and evolutionary relationship of fatty acid desaturase (FAD) genes in

- some oil crops: the sunflower model for evaluation of gene expression pattern under drought stress. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **32**, 846-57.
- Cheloni G, Marti E, Slaveykova VI, 2016. Interactive effects of copper oxide nanoparticles and light to green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquatic Toxicology* **170**, 120-8.
- Chen S, Harmon AC, 2006. Advances in plant proteomics. *Proteomics* **6**, 5504-16.
- Coll NS, Epple P, Dangl JL, 2011. Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death & Differentiation* **18**, 1247-56.
- Correa AF, Bastos IM, Neves D, Kipnis A, Junqueira-Kipnis AP, De Santana JM, 2017. The activity of a hexameric M17 metallo-aminopeptidase is associated with survival of *Mycobacterium tuberculosis*. *Frontiers in microbiology* **8**, 504.
- Currier WW, Strobel GA, 1976. Chemotaxis of *Rhizobium* spp. to plant root exudates. *Plant physiology* **57**, 820-3.
- Danhorn T, Fuqua C, 2007. Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **61**, 401-22.
- Dasgupta N, Ranjan S, Mishra D, Ramalingam C, 2018. Thermal Co-reduction engineered silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human colon cancer cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. *Chemico-Biological Interactions* **295**, 109-18.
- Dénarié J, Debellé F, Promé J-C, 1996. *Rhizobium* lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annual review of biochemistry* **65**, 503-35.
- Dorobantu LS, Fallone C, Noble AJ, *et al.*, 2015. Toxicity of silver nanoparticles against bacteria, yeast, and algae. *Journal of nanoparticle research* **17**, 1-13.
- Dow JM, Crossman L, Findlay K, He Y-Q, Feng J-X, Tang J-L, 2003. Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell-cell signaling and is required for full virulence to plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 10995-1000.
- Dresselhaus T, Márton ML, 2009. Micropylar pollen tube guidance and burst: adapted from defense mechanisms? *Current opinion in plant biology* **12**, 773-80.
- Drinkwater N, Malcolm TR, McGowan S, 2019. M17 aminopeptidases diversify function by moderating their macromolecular assemblies and active site environment. *Biochimie* **166**, 38-51.
- Duncan TV, 2011. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: barrier materials, antimicrobials and sensors. *Journal of colloid and interface science* **363**, 1-24.
- Durán N, Marcato PD, Conti RD, Alves OL, Costa F, Brocchi M, 2010. Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **21**, 949-59.
- Dussert S, Guerin C, Andersson M, *et al.*, 2013. Comparative transcriptome analysis of three oil palm fruit and seed tissues that differ in oil content and fatty acid composition. *Plant physiology* **162**, 1337-58.
- El Badawy AM, Silva RG, Morris B, Scheckel KG, Suidan MT, Tolaymat TM, 2011. Surface charge-dependent toxicity of silver nanoparticles. *Environmental science & technology* **45**, 283-7.
- Elsharkawy M, Shimizu M, Takahashi H, Hyakumachi M, 2012. Induction of systemic resistance against Cucumber mosaic virus by *Penicillium simplicissimum* GP17-2 in *Arabidopsis* and tobacco. *Plant Pathology* **61**, 964-76.
- Elsharkawy MM, Derbalah A, 2019. Antiviral activity of titanium dioxide nanostructures as a control strategy for broad bean strain virus in faba bean. *Pest management science* **75**, 828-34.

- Esoda CN, Kuehn MJ, 2019. *Pseudomonas aeruginosa* leucine aminopeptidase influences early biofilm composition and structure via vesicle-associated antibiofilm activity. *MBio* **10**, e02548-19.
- Expósito-Rodríguez M, Borges AA, Borges-Pérez A, Pérez JA, 2008. Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. *BMC plant biology* **8**, 1-12.
- Faillace GR, Santarém ER, Astarita LV, 2019. Extract of *Xanthomonas axonopodis* induces resistance in *Solanum tuberosum* against *Pectobacterium atrosepticum*. *Biological Control* **134**, 53-62.
- Feng QL, Wu J, Chen GQ, Cui F, Kim T, Kim J, 2000. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of biomedical materials research* **52**, 662-8.
- Ferreira MS, Mangavel C, Rogniaux H, Bonicel J, Samson M-F, Morel M-H, 2014. A MALDI-TOF based study of the in-vivo assembly of glutenin polymers of durum wheat. *Food research international* **63**, 89-99.
- Fiedler KL, Mcgrath SC, Callahan JH, Ross MM, 2014. Characterization of grain-specific peptide markers for the detection of gluten by mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry* **62**, 5835-44.
- Firmin J, Wilson K, Rossen L, Johnston A, 1986. Flavonoid activation of nodulation genes in *Rhizobium* reversed by other compounds present in plants. *Nature* **324**, 90-2.
- Fister AS, Mejia LC, Zhang Y, Herre EA, Maximova SN, Gultinan MJ, 2016. *Theobroma cacao* L. pathogenesis-related gene tandem array members show diverse expression dynamics in response to pathogen colonization. *BMC genomics* **17**, 1-16.
- Fournier ML, Gilmore JM, Martin-Brown SA, Washburn MP, 2007. Multidimensional separations-based shotgun proteomics. *Chemical reviews* **107**, 3654-86.
- Garman H, 1892. *A bacterial disease of cabbage*.
- Gerszberg A, Hnatuszko-Konka K, Kowalczyk T, 2015. In vitro regeneration of eight cultivars of *Brassica oleracea* var. capitata. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* **51**, 80-7.
- Ghysels B, Dieu BTM, Beatson SA, *et al.*, 2004. FpvB, an alternative type I ferripyoverdine receptor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **150**, 1671-80.
- González-Hernández AI, Llorens E, Agustí-Brisach C, *et al.*, 2018. Elucidating the mechanism of action of copper heptagluconate on the plant immune system against *Pseudomonas syringae* in tomato (*Solanum lycopersicum* L). *Pest management science* **74**, 2601-7.
- Gopinath V, Mubarakali D, Priyadarshini S, Priyadharsshini NM, Thajuddin N, Velusamy P, 2012. Biosynthesis of silver nanoparticles from *Tribulus terrestris* and its antimicrobial activity: a novel biological approach. *Colloids and surfaces B: biointerfaces* **96**, 69-74.
- Guénin S, Mauriat M, Pelloux J, Van Wuytswinkel O, Bellini C, Gutierrez L, 2009. Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. *Journal of experimental botany* **60**, 487-93.
- Guimarães ML, Da Silva FaG, Da Costa MM, De Oliveira HP, 2020. Green synthesis of silver nanoparticles using *Ziziphus joazeiro* leaf extract for production of antibacterial agents. *Applied Nanoscience* **10**, 1073-81.
- Gundi JS, Santos MS, Oliveira A, Martinez EL, Nogueira MA, Hungria M, 2018. Development of liquid inoculants for strains of *Rhizobium tropici* group using response surface methodology. *African Journal of Biotechnology* **17**, 411-21.

- Gupta M, Vikram A, Bharat N, 2013. Black rot-A devastating disease of crucifers: a review. *Agricultural Reviews* **34**, 269-78.
- Gur E, Biran D, Ron EZ, 2011. Regulated proteolysis in Gram-negative bacteria—how and when? *Nature Reviews Microbiology* **9**, 839-48.
- Guzzo S, Harakava R, 2007. Mecanismos envolvidos na resistência induzida em plantas a doenças: Sinalização e expressão de genes de defesa. *Indução de resistência em plantas a patógenos. Viçosa: Suprema*, 281-301.
- Hafidh R, Abdulmir A, Bakar FA, *et al.*, 2013. Novel anticancer activity and anticancer mechanisms of Brassica oleracea L. var. capitata f. rubra. *European Journal of Integrative Medicine* **5**, 450-64.
- Hamed S, Emara M, Shawky RM, El-Domany RA, Youssef T, 2017. Silver nanoparticles: Antimicrobial activity, cytotoxicity, and synergism with N-acetyl cysteine. *Journal of basic microbiology* **57**, 659-68.
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R, 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/technology* **11**, 1026-30.
- Huang Z, He K, Song Z, *et al.*, 2018. Antioxidative response of Phanerochaete chrysosporium against silver nanoparticle-induced toxicity and its potential mechanism. *Chemosphere* **211**, 573-83.
- Hunter T, 1995. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* **80**, 225-36.
- Iavicoli A, Boutet E, Buchala A, Métraux J-P, 2003. Induced systemic resistance in Arabidopsis thaliana in response to root inoculation with Pseudomonas fluorescens CHA0. *Molecular plant-microbe interactions* **16**, 851-8.
- Inui H, Yamaguchi Y, Hirano S, 1997. Elicitor actions of N-acetylchitooligosaccharides and laminarioligosaccharides for chitinase and L-phenylalanine ammonia-lyase induction in rice suspension culture. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **61**, 975-8.
- Ishida H, Garcia-Herrero A, Vogel HJ, 2014. The periplasmic domain of Escherichia coli outer membrane protein A can undergo a localized temperature dependent structural transition. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1838**, 3014-24.
- Ivask A, Elbadawy A, Kaweeteerawat C, *et al.*, 2014. Toxicity mechanisms in Escherichia coli vary for silver nanoparticles and differ from ionic silver. *ACS nano* **8**, 374-86.
- Jensen BD, Massomo SM, Swai IS, Hockenhull J, Andersen SB, 2005. Field evaluation for resistance to the black rot pathogen Xanthomonas campestris pv. campestris in cabbage (Brassica oleracea). *European Journal of Plant Pathology* **113**, 297-308.
- Jiang H, Song W, Li A, Yang X, Sun D, 2011. Identification of genes differentially expressed in cauliflower associated with resistance to Xanthomonas campestris pv. campestris. *Molecular biology reports* **38**, 621-9.
- Jini D, Sharmila S, 2020. Green synthesis of silver nanoparticles from Allium cepa and its in vitro antidiabetic activity. *Materials Today: Proceedings* **22**, 432-8.
- Johnson A, Obot I, Ukpong U, 2014. Green synthesis of silver nanoparticles using Artemisia annua and Sida acuta leaves extract and their antimicrobial, antioxidant and corrosion inhibition potentials. *J Mater Environ Sci* **5**, 899-906.
- Jones J. Dangl., JL (2006). *The plant immune system. nature* **444**, 323-9.
- Jones JD, Dangl JL, 2006. The plant immune system. *Nature* **444**, 323-9.
- Jung WK, Koo HC, Kim KW, Shin S, Kim SH, Park YH, 2008. Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in Staphylococcus aureus and Escherichia coli. *Applied and environmental microbiology* **74**, 2171-8.
- Kanhd P, Birla S, Gaikwad S, *et al.*, 2014. In vitro antifungal efficacy of copper nanoparticles against selected crop pathogenic fungi. *Materials Letters* **115**, 13-7.

- Karakoti A, Hench L, Seal S, 2006. The potential toxicity of nanomaterials—the role of surfaces. *Jom* **58**, 77-82.
- Katagiri F, Tsuda K, 2010. Understanding the plant immune system. *Molecular plant-microbe interactions* **23**, 1531-6.
- Khan W, Prithiviraj B, Smith DL, 2008. Nod factor [Nod Bj V (C18: 1, MeFuc)] and lumichrome enhance photosynthesis and growth of corn and soybean. *Journal of plant physiology* **165**, 1342-51.
- Kim JS, Kuk E, Yu KN, *et al.*, 2007. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, biology and medicine* **3**, 95-101.
- Klabunde KJ, Richards RM, 2009. *Nanoscale materials in chemistry*. John Wiley & Sons.
- Koebnik R, Locher KP, Van Gelder P, 2000. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Molecular microbiology* **37**, 239-53.
- Konishi Y, Ohno K, Saitoh N, *et al.*, 2007. Bioreductive deposition of platinum nanoparticles on the bacterium *Shewanella* algae. *Journal of biotechnology* **128**, 648-53.
- Kostakioti M, Newman CL, Thanassi DG, Stathopoulos C, 2005. Mechanisms of protein export across the bacterial outer membrane. *Journal of bacteriology* **187**, 4306-14.
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, *et al.*, 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine* **27**, 95-125.
- Kumar PV, Pammi S, Kollu P, Satyanarayana K, Shameem U, 2014. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Boerhaavia diffusa* plant extract and their anti bacterial activity. *Industrial Crops and Products* **52**, 562-6.
- Kumar R, Ghoshal G, Jain A, Goyal M, 2017. Rapid green synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) using (*Prunus persica*) plants extract: exploring its antimicrobial and catalytic activities. *J Nanomed Nanotechnol* **8**, 1-8.
- Kumar V, Yadav SK, 2009. Plant-mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and their applications. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology* **84**, 151-7.
- Landi L, Feliziani E, Romanazzi G, 2014. Expression of defense genes in strawberry fruits treated with different resistance inducers. *Journal of agricultural and food chemistry* **62**, 3047-56.
- Lara HH, Garza-Treviño EN, Ixtapan-Turrent L, Singh DK, 2011. Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds. *Journal of nanobiotechnology* **9**, 30.
- Lee B-R, Kim K-Y, Jung W-J, Avice J-C, Ourry A, Kim T-H, 2007a. Peroxidases and lignification in relation to the intensity of water-deficit stress in white clover (*Trifolium repens* L.). *Journal of experimental botany* **58**, 1271-9.
- Lee B-U, Yun S-H, Ji J-H, Bae G-N, 2008. Inactivation of *S. epidermidis*, *B. subtilis*, and *E. coli* bacteria bioaerosols deposited on a filter utilizing airborne silver nanoparticles. *Journal of microbiology and biotechnology* **18**, 176-82.
- Lee HY, Park HK, Lee YM, Kim K, Park SB, 2007b. A practical procedure for producing silver nanocoated fabric and its antibacterial evaluation for biomedical applications. *Chemical Communications*, 2959-61.
- Li B, Li Q, Xu Z, Zhang N, Shen Q, Zhang R, 2014. Responses of beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to different soilborne fungal pathogens through the alteration of antifungal compounds production. *Frontiers in microbiology* **5**, 636.
- Li N, Chen F, Cui F, *et al.*, 2017. Improved postharvest quality and respiratory activity of straw mushroom (*Volvariella volvacea*) with ultrasound treatment and controlled relative humidity. *Scientia Horticulturae* **225**, 56-64.

- Li S, Shen Y, Xie A, *et al.*, 2007. Green synthesis of silver nanoparticles using *Capsicum annuum* L. extract. *Green Chemistry* **9**, 852-8.
- Li S, Xu Y, Bi Y, *et al.*, 2019. Melatonin treatment inhibits gray mold and induces disease resistance in cherry tomato fruit during postharvest. *Postharvest Biology and Technology* **157**, 110962.
- Li W-R, Xie X-B, Shi Q-S, Duan S-S, Ouyang Y-S, Chen Y-B, 2011. Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *Biometals* **24**, 135-41.
- Liang Y, Cao Y, Tanaka K, *et al.*, 2013. Nonlegumes respond to rhizobial Nod factors by suppressing the innate immune response. *Science* **341**, 1384-7.
- Liao S, Zhang Y, Pan X, *et al.*, 2019. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *International journal of nanomedicine* **14**, 1469.
- Liu C, Chen L, Zhao R, *et al.*, 2019. Melatonin induces disease resistance to *Botrytis cinerea* in tomato fruit by activating jasmonic acid signaling pathway. *Journal of agricultural and food chemistry* **67**, 6116-24.
- Liu S, Liu Y, Yang X, *et al.*, 2014. The Brassica oleracea genome reveals the asymmetrical evolution of polyploid genomes. *Nature communications* **5**, 1-11.
- Llorens E, García-Agustín P, Lapeña L, 2017a. Advances in induced resistance by natural compounds: towards new options for woody crop protection. *Scientia Agricola* **74**, 90-100.
- Llorens E, García-Agustín P, Lapeña L, 2017b. Advances in induced resistance by natural compounds: towards new options for woody crop protection. *Scientia Agricola* **74**, 90-100.
- Lok C-N, Ho C-M, Chen R, *et al.*, 2006. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *Journal of proteome research* **5**, 916-24.
- Lok C-N, Ho C-M, Chen R, *et al.*, 2007. Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* **12**, 527-34.
- Lundqvist M, Stigler J, Elia G, Lynch I, Cedervall T, Dawson KA, 2008. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 14265-70.
- Lupoli TJ, Lebar MD, Markovski M, Bernhardt T, Kahne D, Walker S, 2014. Lipoprotein activators stimulate *Escherichia coli* penicillin-binding proteins by different mechanisms. *Journal of the American Chemical Society* **136**, 52-5.
- Małolepsza U, 2006. Induction of disease resistance by acibenzolar-S-methyl and o-hydroxyethylorutin against *Botrytis cinerea* in tomato plants. *Crop Protection* **25**, 956-62.
- Marks BB, Megías M, Nogueira MA, Hungria M, 2013a. Biotechnological potential of rhizobial metabolites to enhance the performance of *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense* inoculants with soybean and maize. *AMB Express* **3**, 1-10.
- Marks BB, Megías M, Nogueira MA, Hungria M, 2013b. Biotechnological potential of rhizobial metabolites to enhance the performance of *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense* inoculants with soybean and maize. *AMB Express* **3**, 21.
- Marks BB, Megías M, Ollero FJ, Nogueira MA, Araujo RS, Hungria M, 2015. Maize growth promotion by inoculation with *Azospirillum brasilense* and metabolites of *Rhizobium tropici* enriched on lipo-chitoooligosaccharides (LCOs). *AMB Express* **5**, 1-11.
- Martinez-Gutierrez F, Olive PL, Banuelos A, *et al.*, 2010. Synthesis, characterization, and evaluation of antimicrobial and cytotoxic effect of silver and titanium nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **6**, 681-8.

- Maruta T, Ishikawa T, 2018. Ascorbate peroxidase functions in Higher plants: The control of the balance between oxidative damage and signaling. In. *Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants*. Springer, 41-59.
- Mcshan D, Ray PC, Yu H, 2014. Molecular toxicity mechanism of nanosilver. *Journal of food and drug analysis* **22**, 116-27.
- Merchant SS, Helmann JD, 2012. Elemental economy: microbial strategies for optimizing growth in the face of nutrient limitation. *Advances in microbial physiology* **60**, 91-210.
- Mirzajani F, Askari H, Hamzelou S, Farzaneh M, Ghassempour A, 2013. Effect of silver nanoparticles on *Oryza sativa* L. and its rhizosphere bacteria. *Ecotoxicology and environmental safety* **88**, 48-54.
- Mirzajani F, Askari H, Hamzelou S, *et al.*, 2014. Proteomics study of silver nanoparticles toxicity on *Bacillus thuringiensis*. *Ecotoxicology and environmental safety* **100**, 122-30.
- Mirzajani F, Ghassempour A, Aliahmadi A, Esmaeili MA, 2011. Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *Research in microbiology* **162**, 542-9.
- Mishra S, Arora NK, 2012. Evaluation of rhizospheric *Pseudomonas* and *Bacillus* as biocontrol tool for *Xanthomonas campestris* pv *campestris*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **28**, 693-702.
- Mittal AK, Chisti Y, Banerjee UC, 2013. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnology advances* **31**, 346-56.
- Mohapatra B, Kuriakose S, Mohapatra S, 2015. Rapid green synthesis of silver nanoparticles and nanorods using *Piper nigrum* extract. *Journal of Alloys and Compounds* **637**, 119-26.
- Montejano-Ramírez V, García-Pineda E, Valencia-Cantero E, 2020. Bacterial compound N, N-dimethylhexadecylamine modulates expression of iron deficiency and defense response genes in *Medicago truncatula* independently of the jasmonic acid pathway. *Plants* **9**, 624.
- Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, *et al.*, 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* **16**, 2346.
- Morsy MK, Elsabagh R, Trinetta V, 2018. Evaluation of novel synergistic antimicrobial activity of nisin, lysozyme, EDTA nanoparticles, and/or ZnO nanoparticles to control foodborne pathogens on minced beef. *Food control* **92**, 249-54.
- Munhoz LD, Fontequ JP, Santos IMO, *et al.*, 2017. Control of bacterial stem rot on tomato by extracellular bioactive compounds produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain. *Cogent Food & Agriculture* **3**, 1282592.
- Nair PMG, Chung IM, 2015. Physiological and molecular level studies on the toxicity of silver nanoparticles in germinating seedlings of mung bean (*Vigna radiata* L.). *Acta physiologiae plantarum* **37**, 1-11.
- Nair R, Varghese SH, Nair BG, Maekawa T, Yoshida Y, Kumar DS, 2010. Nanoparticulate material delivery to plants. *Plant science* **179**, 154-63.
- Návarová H, Bernsdorff F, Döring A-C, Zeier J, 2012. Pipecolic acid, an endogenous mediator of defense amplification and priming, is a critical regulator of inducible plant immunity. *The Plant Cell* **24**, 5123-41.
- Navarro E, Piccapietra F, Wagner B, *et al.*, 2008. Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental science & technology* **42**, 8959-64.
- Nega E, Ulrich R, Werner S, Jahn M, 2003. Hot water treatment of vegetable seed—an alternative seed treatment method to control seed-borne pathogens in organic farming/Heißwasserbehandlung von Gemüsesaatgut—eine alternative Saatgutbehandlungsmethode zur Bekämpfung samenbürtiger Pathogene im

- ökologischen Landbau. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz/Journal of Plant Diseases and Protection*, 220-34.
- Noha K, Bondok A, El-DougDoug K, 2018. Evaluation of silver nanoparticles as antiviral agent against ToMV and PVY in tomato plants. *Sciences* **8**, 100-11.
- Oldroyd GE, 2013. Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Reviews Microbiology* **11**, 252-63.
- Ooi S-E, Choo C-N, Ishak Z, Ong-Abdullah M, 2012. A candidate auxin-responsive expression marker gene, EgIAA9, for somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* **110**, 201-12.
- Ovais M, Khalil AT, Islam NU, *et al.*, 2018. Role of plant phytochemicals and microbial enzymes in biosynthesis of metallic nanoparticles. *Applied Microbiology and Biotechnology* **102**, 6799-814.
- Owczarzy R, Tataurov AV, Wu Y, *et al.*, 2008. IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic acids research* **36**, W163-W9.
- Pan X, Sun C, Tang M, *et al.*, 2019. Loss of serine-type D-Ala-D-Ala carboxypeptidase DacA enhances prodigiosin production in *Serratia marcescens*. *Frontiers in bioengineering and biotechnology* **7**, 367.
- Panda MK, Singh YD, Behera RK, Dhal NK, 2020. Biosynthesis of nanoparticles and their potential application in food and agricultural sector. *Green Nanoparticles. Nanotechnology in the Life Sciences; Springer: Cham, Switzerland*, 213-25.
- Parthiban E, Manivannan N, Ramanibai R, Mathivanan N, 2019. Green synthesis of silver-nanoparticles from *Annona reticulata* leaves aqueous extract and its mosquito larvicidal and anti-microbial activity on human pathogens. *Biotechnology Reports* **21**, e00297.
- Patridge EV, Ferry JG, 2006. WrbA from *Escherichia coli* and *Archaeoglobus fulgidus* is an NAD (P) H: quinone oxidoreductase. *Journal of Bacteriology* **188**, 3498-506.
- Peoples M, Brockwell J, Herridge D, *et al.*, 2009. The contributions of nitrogen-fixing crop legumes to the productivity of agricultural systems. *Symbiosis* **48**, 1-17.
- Pereira TM, Polez VLP, Sousa MH, Silva LP, 2020. Modulating physical, chemical, and biological properties of silver nanoparticles obtained by green synthesis using different parts of the tree *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos. *Colloid and Interface Science Communications* **34**, 100224.
- Pérez-Díaz MA, Boegli L, James G, *et al.*, 2015. Silver nanoparticles with antimicrobial activities against *Streptococcus mutans* and their cytotoxic effect. *Materials Science and Engineering: C* **55**, 360-6.
- Perveen S, Javed SB, Anis M, Aref IM, 2013. Rapid in vitro multiplication and ex vitro establishment of Caribbean copper plant (*Euphorbia cotinifolia* L.): an important medicinal shrub. *Acta physiologiae plantarum* **35**, 3391-400.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L, 2002. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic acids research* **30**, e36-e.
- Pieterse CM, Dicke M, 2007. Plant interactions with microbes and insects: from molecular mechanisms to ecology. *Trends in plant science* **12**, 564-9.
- Pirtarighat S, Ghannadnia M, Baghshahi S, 2019. Green synthesis of silver nanoparticles using the plant extract of *Salvia spinosa* grown in vitro and their antibacterial activity assessment. *Journal of Nanostructure in Chemistry* **9**, 1-9.
- Postle K, 2007. TonB system, in vivo assays and characterization. In. *Methods in enzymology*. Elsevier, 245-69. (422.)

- Pupe JM, Silva LP, 2021. Modulation of physico-chemical and biological properties of silver nanoparticles synthesized using aqueous extract of flamboyant (*Delonix regia* var. *flavida*, Fabaceae) seeds. *Journal of Cluster Science* **32**, 1053-60.
- Rafique M, Sadaf I, Rafique MS, Tahir MB, 2017. A review on green synthesis of silver nanoparticles and their applications. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology* **45**, 1272-91.
- Rai MK, Deshmukh S, Ingle A, Gade A, 2012. Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. *Journal of applied microbiology* **112**, 841-52.
- Rakow G, 2004. Species origin and economic importance of Brassica. In. *Brassica*. Springer, 3-11.
- Ramamoorthy V, Raguchander T, Samiyappan R, 2002. Induction of defense-related proteins in tomato roots treated with *Pseudomonas fluorescens* Pf1 and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Plant and soil* **239**, 55-68.
- Rappsilber J, Mann M, Ishihama Y, 2007. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nature protocols* **2**, 1896-906.
- Redfearn DP, Trim GM, Skanes AC, *et al.*, 2005. Esophageal temperature monitoring during radiofrequency ablation of atrial fibrillation. *Journal of cardiovascular electrophysiology* **16**, 589-93.
- Rezaei A, Mahdian S, Babaeizad V, Hashemi-Petroudi S, Alavi S, 2019. RT-qPCR Analysis of Host Defense-Related Genes in Nonhost Resistance: Wheat-Bgh Interaction. *Russian Journal of Genetics* **55**, 330-6.
- Rogić T, Horvatić A, Tkalec M, Cindrić M, Balen B, 2015. Proteomic analysis of *Mammillaria gracilis* Pfeiff. in vitro-grown cultures exposed to iso-osmotic NaCl and mannitol. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* **122**, 127-46.
- Rolim WR, Pelegrino MT, De Araújo Lima B, *et al.*, 2019. Green tea extract mediated biogenic synthesis of silver nanoparticles: characterization, cytotoxicity evaluation and antibacterial activity. *Applied Surface Science* **463**, 66-74.
- Rout E, Nanda S, Joshi RK, 2016. Molecular characterization and heterologous expression of a pathogen induced PR5 gene from garlic (*Allium sativum* L.) conferring enhanced resistance to necrotrophic fungi. *European Journal of Plant Pathology* **144**, 345-60.
- Rubel MH, Robin AHK, Natarajan S, *et al.*, 2017. Whole-genome re-alignment facilitates development of specific molecular markers for races 1 and 4 of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, the cause of black rot disease in Brassica oleracea. *International journal of molecular sciences* **18**, 2523.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory press.
- Šamec D, Salopek-Sondi B, 2019. Cruciferous (Brassicaceae) vegetables. In. *Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements*. Elsevier, 195-202.
- Santiago TR, Bonatto CC, Rossato M, *et al.*, 2019. Green synthesis of silver nanoparticles using tomato leaf extract and their entrapment in chitosan nanoparticles to control bacterial wilt. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **99**, 4248-59.
- Savithamma N, Linga Rao M, Ankanna S, Venkateswarlu P, 2012. Screening of medicinal plants for effective biogenesis of silver nanoparticles and efficient antimicrobial activity. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* **3**, 1141-8.
- Savithamma N, Rao ML, Rukmini K, Devi PS, 2011. Antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized by using medicinal plants. *International Journal of ChemTech Research* **3**, 1394-402.

- Schuhegger R, Ihring A, Gantner S, *et al.*, 2006. Induction of systemic resistance in tomato by N-acyl-L-homoserine lactone-producing rhizosphere bacteria. *Plant, Cell & Environment* **29**, 909-18.
- Schultze M, Kondorosi Á, 1996. The role of lipochitoooligosaccharides in root nodule organogenesis and plant cell growth. *Current opinion in genetics & development* **6**, 631-8.
- Schwachtje J, Fischer A, Erban A, Kopka J, 2018. Primed primary metabolism in systemic leaves: a functional systems analysis. *Scientific reports* **8**, 1-11.
- Schwessinger B, Ronald PC, 2012. Plant innate immunity: perception of conserved microbial signatures. *Annual review of plant biology* **63**, 451-82.
- Servin A, Elmer W, Mukherjee A, *et al.*, 2015. A review of the use of engineered nanomaterials to suppress plant disease and enhance crop yield. *Journal of Nanoparticle Research* **17**, 1-21.
- Sexton SE, Lei Z, Zilberman D, 2007. The economics of pesticides and pest control. *International Review of Environmental and Resource Economics* **1**, 271-326.
- Shao J, Xu Z, Zhang N, Shen Q, Zhang R, 2015. Contribution of indole-3-acetic acid in the plant growth promotion by the rhizospheric strain *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9. *Biology and Fertility of Soils* **51**, 321-30.
- Sharma VK, Yngard RA, Lin Y, 2009. Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in colloid and interface science* **145**, 83-96.
- Shrivastava S, Bera T, Roy A, Singh G, Ramachandrarao P, Dash D, 2007. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology* **18**, 225103.
- Silva R, Pascholati S, Bedendo I, 2013. Induced resistance in tomato plants to *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* by *Lentinula edodes* and *Agaricus subrufescens* (syn. *Agaricus brasiliensis*). *Journal of plant pathology*, 285-97.
- Silva RF, Pascholati SF, Bedendo IP, 2007. Indução de resistência em tomateiro por extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*. *Fitopatologia Brasileira* **32**, 189-96.
- Simms D, Cizdziel PE, Chomczynski P, 1993. TRIzol: A new reagent for optimal single-step isolation of RNA. *Focus* **15**, 532-5.
- Singh D, Dhar S, Yadava D, 2011. Genetic and pathogenic variability of Indian strains of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* causing black rot disease in crucifers. *Current microbiology* **63**, 551.
- Singh D, Rathaur P, Vicente J, 2016. Characterization, genetic diversity and distribution of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* races causing black rot disease in cruciferous crops of India. *Plant Pathology* **65**, 1411-8.
- Smith A, Rowan R, Mccann M, Kavanagh K, 2012. Exposure of *Staphylococcus aureus* to silver (I) induces a short term protective response. *Biometals* **25**, 611-6.
- Smith S, Habib A, Kang Y, Leggett M, Diaz-Zorita M, 2015. LCO applications provide improved responses with legumes and nonlegumes. *Biological nitrogen fixation*, 1077-86.
- Sohm B, Immel F, Bauda P, Pagnout C, 2015. Insight into the primary mode of action of TiO₂ nanoparticles on *Escherichia coli* in the dark. *Proteomics* **15**, 98-113.
- Soliman H, Elsayed A, Dyaa A, 2018. Antimicrobial activity of silver nanoparticles biosynthesised by *Rhodotorula* sp. strain ATL72. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences* **5**, 228-33.

- Sondi I, Salopek-Sondi B, 2004. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of colloid and interface science* **275**, 177-82.
- Stangarlin J, Kuhn O, Assi L, Schwan-Estrada K, 2011. Control of plant diseases using extracts from medicinal plants and fungi. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. Badajoz: Formatex **2**, 1033-42.
- Strzelczyk E, Kampert M, Li C, 1994. Cytokinin-like substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. *Microbiological Research* **149**, 55-60.
- Subramanian S, Souleimanov A, Smith DL, 2016. Proteomic studies on the effects of lipochitooligosaccharide and thuricin 17 under unstressed and salt stressed conditions in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in plant science* **7**, 1314.
- Tao D, Zhang L, Shan Y, Liang Z, Zhang Y, 2011. Recent advances in micro-scale and nano-scale high-performance liquid-phase chromatography for proteome research. *Analytical and bioanalytical chemistry* **399**, 229-41.
- Taylor J, Conway J, Roberts S, Astley D, Vicente J, 2002. Sources and origin of resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Brassica genomes. *Phytopathology* **92**, 105-11.
- Taylor S, Wakem M, Dijkman G, Alsarraj M, Nguyen M, 2010. A practical approach to RT-qPCR—publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods* **50**, S1-S5.
- Tien T, Gaskins M, Hubbell D, 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Applied and environmental microbiology* **37**, 1016-24.
- Tomko Jr RJ, Hochstrasser M, 2013. Molecular architecture and assembly of the eukaryotic proteasome. *Annual review of biochemistry* **82**.
- Tranbarger TJ, Dussert S, Joët T, *et al.*, 2011. Regulatory mechanisms underlying oil palm fruit mesocarp maturation, ripening, and functional specialization in lipid and carotenoid metabolism. *Plant physiology* **156**, 564-84.
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, *et al.*, 2012. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic acids research* **40**, e115-e.
- Vale F, Fernandes Filho E, Liberato J. QUANT. A software for plant disease severity assessment. *Proceedings of the 8th international congress of plant pathology, 2003: Christchurch New Zealand*, 105.
- Van Loon L. Rep., M. y Pieterse, CM (2006). *Significance of inducible defense-related proteins in infected plants*. *Ann Rev Phytopathol* **44**, 135-62.
- Van Loon L, Van Kammen A, 1970. Polyacrylamide Disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" and "Samsun NN". In.: [sn].
- Van Loon LC, Rep M, Pieterse CM, 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual review of phytopathology* **44**, 135-62.
- Van Pelt-Verkuil E, Van Belkum A, Hays JP, 2008. Deoxynucleotide triphosphates and buffer components. *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*, 91-101.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, *et al.*, 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology* **3**, 1-12.
- Venisse J-S, Gullner G, Brisset M-N, 2001. Evidence for the involvement of an oxidative stress in the initiation of infection of pear by *Erwinia amylovora*. *Plant physiology* **125**, 2164-72.

- Vensel WH, Dupont FM, Sloane S, Altenbach SB, 2011. Effect of cleavage enzyme, search algorithm and decoy database on mass spectrometric identification of wheat gluten proteins. *Phytochemistry* **72**, 1154-61.
- Vicente J, 2004. *A podridao negra das cruciferas*. Alcobaça.
- Vicente JG, Conway J, Roberts S, Taylor J, 2001a. Identification and origin of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* races and related pathovars. *Phytopathol.* **91**, 492-9.
- Vicente JG, Conway J, Roberts S, Taylor J, 2001b. Identification and origin of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* races and related pathovars. *Phytopathology* **91**, 492-9.
- Vicente JG, Holub EB, 2013. *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* **14**, 2-18.
- Vijayakumar S, Divya M, Vaseeharan B, *et al.*, 2021. Biological compound capping of silver nanoparticle with the seed extracts of blackcumin (*Nigella sativa*): a potential antibacterial, antidiabetic, anti-inflammatory, and antioxidant. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials* **31**, 624-35.
- Vilchis-Nestor AR, Sánchez-Mendieta V, Camacho-López MA, Gómez-Espinosa RM, Camacho-López MA, Arenas-Alatorre JA, 2008. Solventless synthesis and optical properties of Au and Ag nanoparticles using *Camellia sinensis* extract. *Materials letters* **62**, 3103-5.
- Walsh C, 2003. *Antibiotics: actions, origins, resistance*. American Society for Microbiology (ASM).
- Wang N, Khan W, Smith DL, 2012. Changes in soybean global gene expression after application of lipo-chitooligosaccharide from *Bradyrhizobium japonicum* under sub-optimal temperature. *PLoS One* **7**, e31571.
- Warwick S, Francis A, Al-Shehbaz I, 2006. Brassicaceae: species checklist and database on CD-Rom. *Plant Systematics and Evolution* **259**, 249-58.
- Weinberg ED, 1975. Nutritional immunity: host's attempt to withhold iron from microbial invaders. *Jama* **231**, 39-41.
- Williams PH, 1980. Black rot: a continuing threat to world crucifers. *Plant disease* **64**, 736-42.
- Xiong M, Wang S, Zhang Q, 2002. Coincidence in map positions between pathogen-induced defense-responsive genes and quantitative resistance loci in rice. *Science in China Series C: Life Sciences* **45**, 518-26.
- Xiu Z-M, Zhang Q-B, Puppala HL, Colvin VL, Alvarez PJ, 2012. Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles. *Nano letters* **12**, 4271-5.
- Xu L, Zeng W, Li J, *et al.*, 2019. Characteristics of membrane-bound fatty acid desaturase (FAD) genes in *Brassica napus* L. and their expressions under different cadmium and salinity stresses. *Environmental and Experimental Botany* **162**, 144-56.
- Xue Y, Zhang X, Wang R, *et al.*, 2017. Cloning and expression of *Perilla frutescens* FAD2 gene and polymorphism analysis among cultivars. *Acta physiologiae plantarum* **39**, 84.
- Yi D, Cui L, Wang L, *et al.*, 2013. Pyramiding of Bt cry1Ia8 and cry1Ba3 genes into cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) confers effective control against diamondback moth. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* **115**, 419-28.
- Yu X-Y, Bi Y, Yan L, *et al.*, 2016. Activation of phenylpropanoid pathway and PR of potato tuber against *Fusarium sulphureum* by fungal elicitor from *Trichothecium roseum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **32**, 1-12.
- Zhao S, Fernald RD, 2005. Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. *Journal of computational biology* **12**, 1047-64.

- Zhao Z, Zhang Y, Liu X, *et al.*, 2013. A role for a dioxygenase in auxin metabolism and reproductive development in rice. *Developmental Cell* **27**, 113-22.
- Zielińska M, Lewandowska U, Podsędek A, *et al.*, 2015. Orally available extract from *Brassica oleracea* var. *capitata rubra* attenuates experimental colitis in mouse models of inflammatory bowel diseases. *Journal of Functional Foods* **17**, 587-99.

APÊNDICE

Artigos publicados durante o Doutorado:

- 1- SANTOS, I. R.; RIBEIRO, D. G. ; TAVORA, FABIANO T. P. K. ; MAXIMIANO, M. R. ; RABELO, A. C. ; RIOS, THUANNY BORBA ; REIS JUNIOR, F. B. ; MEGÍAS, M. ; SILVA, L. P. ; Mehta, A . Priming of defense-related genes in *Brassica oleracea* var. *capitata* using concentrated metabolites produced by *Rhizobium tropici* CIAT 899. BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY, v. 53, p. 0001-00002, 2022. (<https://link.springer.com/article/10.1007/s42770-022-00722-4>).
- 2- RIBEIRO, DAIANE GONZAGA ; MOTA, ANA PAULA ZOTTA ; SANTOS, IVONALDO REIS ; ARRAES, FABRÍCIO BARBOSA MONTEIRO ; GRYNBERG, PRISCILA ; FONTES, WAGNER ; DE SOUZA CASTRO, MARIANA ; DE SOUSA, MARCELO VALLE ; LISEI-DE-SÁ, MARIA EUGÊNIA ; GROSSI-DE-SÁ, MARIA FATIMA ; FRANCO, OCTÁVIO LUIZ ; MEHTA, ANGELA . NBS-LRR-WRKY genes and protease inhibitors (PIs) seem essential for cowpea resistance to root-knot nematode. JOURNAL OF PROTEOMICS, v. 0001, p. 104575, 2022 (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391922000987?via%3Dihub>)
- 3- SANTOS, IVONALDO REIS; RIOS, THUANNY BORBA ; MAXIMIANO, MARIANA ROCHA ; COUTINHO, WIRTON MACEDO ; DE LIMA, LIZIANE MARIA ; SILVA, LUCIANO PAULINO ; OLIVEIRA-NETO, OSMUNDO BRILHANTE ; MEHTA, ANGELA . Proteomic screening for the identification of proteins involved in resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* in cotton. PHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR PLANT PATHOLOGY, v. 113, p. 101562, 2021. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0885576520302307?via%3Dihub>)
- 4- MAXIMIANO, M.R. ; MEGÍAS, E. ; SANTOS, I.R. ; SANTOS, L.S. ; OLLERO, F.J. ; MEGÍAS, M. ; FRANCO, O.L. ; MEHTA, A . Proteome responses of *Rhizobium tropici* CIAT 899 upon apigenin and salt stress induction. APPLIED SOIL ECOLOGY, v. 0000, p. 103815, 2020. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0929139320307447?via%3Dihub>)

Resumos publicados durante o Doutorado:

- 1- **SANTOS, I. R.**; TAVORA, FABIANO T. P. K. ; SEVERO, E. A. F. ; OLIVEIRA NETO, O. B. ; **Mehta, A**; **SILVA, L. P.**. Silver nanoparticles obtained by green synthesis exhibit antibacterial activity *in vitro* and enhance the resistance of cabbage to black rot. In: XI Simpósio do programa de pós-graduação em Biologia Molecular, 2022, Brasília. XI Simpósio do programa de pós-graduação em Biologia Molecular, 2022.
- 2- SEVERO, E. A. F. ; **SANTOS, I. R.** ; MAXIMIANO, M. R. ; MOURA, D. R. ; OLIVEIRA NETO, O. B. ; WENDLAND, A. ; **Mehta, A** . Perfil de expressão de genes envolvidos na suscetibilidade nas interações *Brassica oleracea* var. *capitata*

- (Repolho) - *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* e *Phaseolus vulgaris* (Feijão comum) - *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli*. In: XXVI Encontro do Talento Estudantil, 2022, Brasília. XXVI Encontro do Talento Estudantil, 2022.
- 3- **SANTOS, I. R.**; TAVORA, FABIANO T. P. K. ; SEVERO, E. A. F. ; OLIVEIRA NETO, O. B. ; **Mehta, A** ; **SILVA, L. P.** . Nanopartículas de prata obtidas por síntese verde exibem atividade antibacteriana *in vitro* e aumentam a resistência de *Brassica oleracea* à podridão negra. In: XXVI Encontro do Talento Estudantil, 2022, Brasília. XXVI Encontro do Talento Estudantil, 2022.
 - 4- Batista M.M. ; **SANTOS, I. R.** ; Mendes P.N. ; LIMA, J. D. ; RIBEIRO, D. G. ; Sousa M. V. ; FONTES, WAGNER ; RICART, C. A. O. ; Castro M. S. ; Fernandez D. ; **Mehta, A.** ANÁLISE PROTEÔMICA VISANDO À IDENTIFICAÇÃO DE ALVOS PARA O CONTROLE DE *Hemileia vastatrix* EM PLANTAS DE *Coffea arabica*. In: XXVI Encontro do Talento Estudantil, 2022. XXVI Encontro do Talento Estudantil, 2022.
 - 5- **SANTOS, I. R.**; RIBEIRO, DAIANE GONZAGA ; TAVORA, FABIANO T. P. K. ; MAXIMIANO, M.R. ; RABELO, A. C. ; RIOS, T. B. ; REIS JUNIOR, F. B. ; MEGÍAS, M. ; **SILVA, L. P.** ; **Mehta, A** . Induction of defense-related genes in Cabbage using concentrated metabolites produced by *Rhizobium tropici*. In: X Simpósio do programa de pós-graduação em Biologia Molecular - UnB, 2021, BRASILIA. X Simpósio do programa de pós-graduação em Biologia Molecular - UnB, 2021.
 - 6- TAVORA, FABIANO T. P. K. ; SEVERO, E. A. F. ; **SANTOS, I. R.** ; **Mehta, A.** Aplicação da tecnologia de silenciamento gênico baseada em DNA antisense visando o aumento da resistência em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) à mancha bacteriana. In: II Congresso Brasileiro de Biologia Molecular On-line, 2021, Fortaleza, 2021, Fortaleza. II Congresso Brasileiro de Biologia Molecular On-line, 2021, 2021.
 - 7- **SANTOS, I. R.**; RIBEIRO, D. G. ; RABELO, A. C. ; RIOS, T. B. ; MAXIMIANO, M. R. ; REIS JUNIOR, F. B. ; GUIJO, M. M. ; **SILVA, L. P.** ; **Mehta, A.** INDUÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA EM *Brassica oleracea* var. *capitata* UTILIZANDO BIOMOLÉCULAS PRODUZIDAS POR *Rhizobium tropici* CIAT 899. In: IX Simpósio LNANO e V Simpósio LPCB, 2020, BRASILIA. IX Simpósio LNANO e V Simpósio LPCB, 2020.
 - 8- SEVERO, E. A. F. ; **SANTOS, I. R.** ; SANTOS, C. ; **Mehta, A.** Expressão diferencial de genes envolvidos na suscetibilidade de *Brassica oleracea* var. *capitata* à *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. In: xxv Talento Estudantil da EMBRAPA, 2020, BRASILIA. XXV Encontro do Talento Estudantil, 2020.
 - 9- **SANTOS, I. R.**; RIBEIRO, D. G. ; RABELO, A. C. ; RIOS, T. B. ; MAXIMIANO, MARIANA ROCHA ; REIS JUNIOR, F. B. ; MEGIAS, M. ; **SILVA, L. P.** ; **Mehta, A.** Estratégias biotecnológicas para o controle de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em *Brassica oleracea* var. *capitata*. In: xxv Talento Estudantil da EMBRAPA, 2020, BRASILIA. XXV Encontro do Talento Estudantil, 2020.

- 10- **SANTOS, I. R.; Mehta, A ; SILVA, LUCIANO PAULINO** . Atividades remotas e distanciamento social. In: X simpósio do laboratório de Nanobiotecnologia, 2020, BRASÍLIA. X simpósio do laboratório de Nanobiotecnologia, 2020.
- 11- **SANTOS, I. R.; SILVA, L. P. ; Mehta, A** . Nanoencapsulation of molecules produced by *Rhizobium tropici* for the control of phytopathogenic bacteria (*Xanthomonas* spp.). In: VII Simpósio do Laboratório de Nanobiotecnologia (LNANO), III Simpósio do Laboratório de Prospecção de Compostos Bioativos (LPCB), 2019, Brasília. VII Simpósio do Laboratório de Nanobiotecnologia (LNANO), III Simpósio do Laboratório de Prospecção de Compostos Bioativos (LPCB), 2019.
- 12- **SANTOS, I. R.; Mehta, A ; SILVA, L. P.** . SÍNTESE VERDE E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA PRODUZIDAS UTILIZANDO EXTRATOS DE PLANTAS EURO-ASIÁTICAS. In: IX Simpósio do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular), 2019, BRASÍLIA. IX Simpósio do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular), 2019.
- 13- **SANTOS, I. R.; Mehta, A ; SILVA, L. P.** . Síntese verde e atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata produzidas utilizando extratos de plantas euro-asiáticas [Green synthesis and antimicrobial activity of silver nanoparticles produced using Eurasian plant extracts]. In: XXIV Encontro do Talento Estudantil, 2019, Brasília. XXIV Encontro do Talento Estudantil, 2019.
- 14- **SANTOS, I. R.; Mehta, A ; SILVA, L. P.** . THE USE OF NANOBIOLOGICAL TOOLS AIMING TO CONTROL PHYTOPATHOGENIC BACTERIA. In: VIII Simpósio LNANO e IV LPCB., 2019, Brasília. VIII Simpósio LNANO e IV LPCB., 2019.
- 15- SOUSA, L. J. ; **SANTOS, I. R.** ; BLUM, L. E. B. ; GUIJO, M. M. ; REIS JUNIOR, F. B. ; **Mehta, A** . EXPRESSÃO DE GENES DE DEFESA EM GRÃO DE BICO APÓS APLICAÇÃO DE EXTRATO DE *Rhizobium tropici*. In: XXIV Encontro do Talento Estudantil, 2019, Brasília. XXIV Encontro do Talento Estudantil, 2019.
- 16- **SANTOS, I. R.**; MAXIMIANO, M. R. ; ALMEIDA, R. F. ; CUNHA, R. N. ; Lopes, R. ; 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. 7th Brazilian Biotechnology Congress and 2th Biotechnology Ibero-American Congress, 2018.
- 17- **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.
- 18- **SANTOS, I. R.; SILVA, L. P. ; Mehta, A** . Nanoencapsulamento de moléculas produzidas por *Rhizobium tropici* para o controle de bactérias fitopatogênicas (*Xanthomonas* spp.). In: VIII Simpósio do Programa de Pós-Graduação em Ciências

Biológicas (Biologia Molecular), 2018, Brasília. VIII Simpósio do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular), 2018.

- 19-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.
- 20-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.

Premiações durante o Doutorado:

- 1- **3º Lugar no XXVI Encontro do Talento Estudantil, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.**

SANTOS, I. R.; TAVORA, FABIANO T. P. K. ; SEVERO, E. A. F. ; OLIVEIRA NETO, O. B. ; **Mehta, A** ; **SILVA, L. P.** . Nanopartículas de prata obtidas por síntese verde exibem atividade antibacteriana *in vitro* e aumentam a resistência de *Brassica oleracea* à podridão negra. In: XXVI Encontro do Talento Estudantil, 2022, Brasília. XXVI Encontro do Talento Estudantil, 2022.

- 2- **2º lugar no XXV Encontro do Talento estudantil, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.**

SEVERO, E. A. F. ; **SANTOS, I. R.** ; SANTOS, C. ; **Mehta, A.** Expressão diferencial de genes envolvidos na suscetibilidade de *Brassica oleracea* var. capitata à *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. In: xxv Talento Estudantil da EMBRAPA, 2020, BRASILIA. XXV Encontro do Talento Estudantil, 2020.